

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Analysen zu intestinalen Immunparametern und zur
Darmbarriere bei Langzeit-SIV-infizierten
Rhesusaffen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Maria Daskalaki
aus Nürnberg

Hannover 2018

Wissenschaftliche Betreuung:

Univ.-Prof. Dr. med. vet. F.-J. Kaup

Abt. Infektionspathologie, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen

Dr. med. vet. C. Stahl-Hennig

Abt. Infektionsmodelle, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. F.-J. Kaup

Tierärztliche Hochschule Hannover

Deutsches Primatenzentrum, Göttingen

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Georg Herrler

Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	11
II.	LITERATURÜBERSICHT	13
1.	Lentiviren	13
1.1	HIV und AIDS	14
1.2	HIV-1 und HIV-2	14
1.3	Das Affenimmundefizienzvirus	15
1.4	Die Herkunft von HIV und die Verwandtschaft mit SIV	15
1.5	Morphologie und Struktur von HIV und SIV	16
2.	Pathogenese der HIV-/SIV-Infektion	17
2.1	Übertragung und Replikation	17
2.2	Krankheitsverlauf der HIV-Infektion	18
2.3	Verlaufsformen der HIV- und SIV-Infektion	19
3.	Das SIV-Makaken-Modell in der HIV-Forschung.....	20
4.	Das Immunsystem	22
4.1	Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems	23
4.1.1	Natürliche Killerzellen	23
4.1.2	Gamma-Delta T-Zellen	23
4.1.3	Dendritische Zellen	24
4.2	Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems	24
4.2.1	T-Zellen.....	24
4.2.2	Interleukin-17 produzierende T-Zellen	25
4.2.3	Regulatorische T-Zellen	26
4.2.4	Invariante natürliche Killer-T-Zellen	27
4.3	Das Myxovirus Resistance Protein 1	27
4.4	Das $\alpha\beta 7$ -Integrin	28
4.5	Chronische Immunaktivierung	29
4.6	Caspase-induzierter Zelltod: Apoptose und Pyroptose.....	29
5.	Das intestinale System in der HIV-/SIV-Infektion	30
5.1	Funktion und Morphologie des Colons	30
5.2	Die epitheliale Barriere	31
5.3	Das mukosale Immunsystem und die Rolle des intestinalen Systems in der HIV-/SIV-Infektion.....	33
5.4	Ablagerung von Kollagen im Colon	34
5.5	Opportunistische Infektionen	35
III.	MATERIAL UND METHODEN	36
1.	Versuchstiere	36
1.1	Narkotisierung	37

1.2 Blutentnahme	37
1.3 Bronchoalveoläre Lavage	37
1.4 Colonbiopsien.....	38
1.5 Euthanasie und Sektion.....	39
2. Isolierung und Zahlbestimmung von mononukleären Zellen.....	40
2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus der BAL	41
2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus Colonbiopsien	41
2.3 Zellzahlbestimmung.....	42
3. Virusbeladung in Colon und Blut.....	42
3.1 RNA-Extraktion von Colonbiopsien	42
3.2 Bestimmung der Virusbeladung im Plasma und im Colon mit qRT-PCR.....	43
4. Die polychromatische Durchflusszytometrie	44
4.1 Markierung von Oberflächenantigenen im Vollblut	45
4.2 Markierung von Oberflächenantigenen bei isolierten mononukleären Zellen ...	46
4.3 Intrazelluläre Färbung.....	46
4.4 Verwendete Gating-Strategien	46
4.5 Auflistung der verwendeten Antikörper und Antikörperkombinationen in den verschiedenen Tubes.....	50
5. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	53
5.1 Anfertigung der Schnitte	53
5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	53
5.3 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	54
5.4 Immunhistochemische Analysen	54
5.5 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen.....	55
6. Grafiken und statistische Auswertung.....	56
IV. ERGEBNISSE.....	57
1. Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in Blut, Colon und BAL bei SIV-negativen Rhesusaffen.....	57
1.1 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des angeborenen Immunsystems	58
1.2 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des adaptiven Immunsystems ...	59
1.2.1 CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ CD8 ⁺ und CD4 ⁻ CD8 ⁻	59
1.2.2 Naive und CD4 ⁺ T-Gedächtniszellen	59
1.2.3 Th17, CD4 ⁺ Tregs, Tc17 und CD8 ⁺ Tregs	60
1.2.4 iNKTs, IL17 ⁺ iNKTs, FoxP3 ⁺ iNKTs, CD4 ⁺ iNKTs	61
1.3 Expression des CCR5 Korezeptors (CD195) auf T-Helferzellen	62
1.4 Expression des α 4 β 7-Integrins auf Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems in Blut und Colon.....	62
2. Virusbeladung	64

2.1	Klassifizierung der SIV-infizierten Rhesusaffen in Elite Controller, virämische Controller, failing Controller und Progressoren anhand der Viruslast im Plasma	64
2.2	Viruslast im Colon von LTNPs und Progressoren.....	66
3.	Durchflusszytometrische Charakterisierung von Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in Blut, Colon und BAL bei Langzeit-infizierten Rhesusaffen im Vergleich zu gesunden Tieren und Progressoren.....	68
3.1	Verteilung von Zellen des angeborenen Immunsystems in Blut, Colon und BAL	69
3.2	Verteilung von T-Zellen als Teil der adaptiven Immunantwort in Blut, Colon und BAL	73
3.2.1	Verteilung von CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ CD8 ⁺ und CD4 ⁻ CD8 ⁻ T-Zellen.....	73
3.2.2	Verteilung von Th17, CD4 ⁺ Tregs, Tc17, CD8 ⁺ Tregs	75
3.2.3	Verteilung von iNKTs und deren Subpopulationen	77
3.2.4	Verteilung von naiven und CD4 ⁺ T-Gedächtniszellen in Blut, Colon und BAL.....	79
3.2.5	Verteilung von CD4 ⁺ CD195 ⁺ T-Zellen in Blut, Colon und BAL	81
4.	Expression des α4β7-Integrins auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems	83
4.1	Expression des α 4 β 7-Integrins auf Zellen des angeborenen Immunsystems ..	84
4.2	Expression des α 4 β 7-Integrins auf Zellen des adaptiven Immunsystems	85
5.	Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ T-Helferzellen und α4β7⁺ Zellen. 88	
6.	Longitudinaler Verlauf der CD4/CD8 Ratio in Blut und Colon bei EC, VC und FC.....	91
7.	Zusammenfassender Vergleich der prozentualen Anteile von CD4⁺ T-Helferzellen, deren Subpopulationen und iNKTs im Blut und den zwei mukosalen Kompartimenten	93
8.	Korrelationsanalysen zwischen dem Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und der Viruslast in Blut und Colon.....	95
9.	Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen im Colon bei Langzeit-infizierten Rhesusaffen im Vergleich zu gesunden Tieren und Progressoren.....	99
9.1	Histologische Auswertung von Colonbiopsien und Colonresektaten.....	99
9.2	Auswertung der Kollagenablagerungen im Colon.....	104
9.3	Immunhistochemische Untersuchungen.....	106
9.3.1	Vergleich der Mx1 Expression in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen, EC, VC, FC und Progressoren.....	106
9.3.2	Vergleich der Apoptoserate in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren.....	108

9.3.3	Vergleich der Akkumulierung von Lipopolysacchariden in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren	110
9.3.4	Vergleich der Expression des Oberflächenmarkers CD4 in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren	112
9.3.5	Vergleich von IL-17-sezernierenden Immunzellen in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren	114
9.3.6	Vergleich von regulatorischen T-Zellen in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren	116
9.3.7	Vergleich der Expression des GPR-15 Korezeptors in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren	118
9.3.8	Vergleich der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren	120
9.3.9	Immunhistochemische Darstellung des Claudin-3 Proteins in Colonbiopsien und Colonresektaten	122
9.3.10	Immunhistochemischer Nachweis von SIV in Colonbiopsien und Colonresektaten.....	124
10.	Klinischer Verlauf und Pathologie zum Zeitpunkt der Sektion bei den obduzierten Langzeit-infizierten Rhesusaffen.....	126
V.	DISKUSSION.....	130
1.	Unterschiede der Definition von Langzeit-Infizierten beim Menschen und NHP aufgrund der unterschiedlichen Krankheitsverläufe.....	132
2.	Möglicher Einfluss des Alters auf das Immunsystem der Versuchstiere.	133
3.	Vergleich zwischen Colonbiopsien und Resektaten: Die Entnahme von Colonbiopsien repräsentiert einen minimal invasiven Eingriff.....	134
4.	Immunhistochemischer Nachweis von SIV: Applikation der Antikörper AG3.0 und KK75 erzeugt unterschiedliche Signale	135
5.	Unterschiede im SIV-Nachweis mittels PCR und IHC	136
6.	Vergleich der immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Methode	136
7.	Histologische Veränderungen, Kollagenablagerungen und opportunistische Infektionen im Colon von FC und Progressoren.....	137
8.	Hinweise auf eine weitestgehend intakte intestinale Barriere bei EC	140
9.	Generalisierte Immunaktivierung durch mikrobielle Translokation in allen infizierten Gruppen	144
10.	Erhaltene CD4⁺ und CD4⁺CD195⁺T-Zellen im Colon der EC	148

11. Erhöhte Expression der Korezeptoren GPR-15 und $\alpha 4\beta 7$ im Colon der FC	151
12. Korrelationsanalysen zwischen Viruslasten und T-Zellen	153
13. Mildere Veränderungen in der Mukosa der oberen Atemwege im Vergleich zu der Darmmukosa	154
VI. ZUSAMMENFASSUNG	156
VII. SUMMARY	158
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	160
IX. ANHANG	179
Protokolle für Histologie und Immunhistochemie	179
Paraffin-Einbettungsprotokoll	179
4 %iges neutral gepuffertes Formalin	179
Hämatoxylin-Eosin Färbung	179
Trichromfärbung nach Masson-Goldner	180
Protokoll für die immunhistochemische Reaktion	181
Tierefassung	183
X. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	186

I. Einleitung

Die erworbene Immunschwäche AIDS (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*) wurde zum ersten Mal 1981 als klinische Entität beschrieben. Im Jahr 1983 konnte schließlich das humane Immundefizienzvirus (HIV) als auslösender Erreger von AIDS identifiziert werden. Es gibt inzwischen kein Land mehr, das nicht betroffen ist. Laut UNAIDS lebten 2016 weltweit 36.7 Millionen Menschen mit HIV/AIDS (davon 50 % Frauen), etwa 1.1 Millionen starben daran. Am schwersten betroffen sind die Regionen Subsahara/Afrika mit ca. 19 Millionen HIV-Infizierten.

Die bei HIV-Infizierten auftretende Immunschwäche gilt als das charakteristische Merkmal der HIV-Infektion. Nach neuen Erkenntnissen scheint eine massive Immunaktivierung die eigentliche Ursache des Krankheitsprozesses zu sein [1] [2] [3]. Es wurde nachgewiesen, dass die Translokation mikrobieller Abbauprodukte durch das geschädigte Darmepithel in die Blutzirkulation eng mit der generalisierten persistierenden Immunaktivierung in Verbindung steht [4] [5] [6] [7]. Außerdem repräsentiert die Darmmukosa das zentrale Gewebe in der Pathogenese der HIV-Infektion, da es die meisten Zielzellen für das Virus beherbergt [8] und den Manifestationsort klinischer Symptome darstellt [9].

Das Affenimmundefizienzvirus (engl. *simian immunodeficiency virus*, SIV) gilt als das Ursprungsvirus für HIV [10] und wird als Modellvirus für die HIV-Forschung verwendet. Die experimentelle Infektion von Makaken mit SIVmac ist heute eines der wichtigsten Modellsysteme für die Erforschung der HIV-Infektion des Menschen. Üblicherweise kommt es nach experimenteller Infektion mit SIV zu AIDS-ähnlichen Symptomen und in der Regel versterben die Tiere innerhalb von zwei Jahren [11]. Im Zuge der HIV-Infektion des Menschen bzw. der SIV-Infektion von Makaken gibt es einen kleinen Anteil an Personen/Affen, die in der Lage sind, die Infektion zu kontrollieren und über einen längeren Zeitraum keine Krankheitssymptome entwickeln [12].

Am Deutschen Primatenzentrum wurde eine Gruppe von Langzeit-SIV-infizierten Makaken gehalten, die als LTNPs (engl. *long-term non-progressors*) bezeichnet wurde. Das gemeinsame Merkmal dieser Tiere bestand in einer außergewöhnlich

langen symptomfreien Infektionszeit, ohne dass die Tiere antiretroviral behandelt worden waren. Weiterhin ließ sich diese Gruppe aufgrund unterschiedlicher Viruslasten im Plasma in drei Untergruppen aufteilen: (i) bei manchen war das Virus im Blut nicht nachweisbar (Elite Controllers), (ii) manche wiesen eine mittlere Viruslast auf (virämische Controllers) und (iii) bei anderen waren nach einer längeren Phase der Viruskontrolle ansteigende Viruslasten zu beobachten (failing Controllers). Trotz der Bedeutsamkeit des Darmtraktes in der HIV-/SIV-Infektion sind wegen der eingeschränkten Zugänglichkeit zu diesem Organ noch eine Reihe von Fragen bezüglich der Pathogenese zu beantworten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten intestinale Immunparameter und die Darmbarriere der oben genannten Affenkohorte untersucht werden, um Faktoren zu identifizieren, die mit der Kontrolle der Infektion assoziiert sein könnten. Dies beinhaltete Untersuchungen zu immunologischen Unterschieden sowohl zwischen den drei Untergruppen der LTNPs wie auch diesen mit SIV-negativen Tieren und Progressoren in Blut und Colon.

Dazu gehörten umfassende durchflusszytometrische Analysen im Blut und in Colonbiopsien zur Phänotypisierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems und die Charakterisierung des Aktivierungsstatus des Immunsystems.

Obwohl histologische Veränderungen im intestinalen System HIV-infizierter Patienten sehr früh beobachtet wurden [9], war unklar, inwieweit eine Darmschädigung auch bei LTNPs unter Berücksichtigung ihrer Untergruppen manifest war. Deshalb sollten immunhistochemische Untersuchungen zur Charakterisierung der Entzündung, sowie zum Nachweis von Apoptose und Akkumulierung mikrobieller Abbauprodukte im Colon die histopathologische Analyse ergänzen.

In HIV-infizierten Personen und SIV-infizierten Affen mit typischem Infektionsverlauf findet sich Virus im Blut und in diversen Organen. Hingegen sind Controller zumeist nicht virämisch, aber es ist durchaus möglich Virus im Gewebe nachzuweisen [13] [14]. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde die Viruslast der LTNPs im Blut und in Colonbiopsien mittels PCR bestimmt.

II. Literaturübersicht

1. Lentiviren

Lentiviren sind behüllte Einzelstrang-RNA-Viren und gehören zur Familie der Retroviren. Die Bezeichnung stammt von der lateinischen Sprache (*lentus* = langsam). Lentiviren verursachen bei vielen Spezies wie Rindern, Pferden, Schafen, Katzen und Primaten chronische degenerative Erkrankungen, die meistens tödlich verlaufen (Abb. 1). Als Retroviren besitzen sie die Fähigkeit, mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), Ribonukleinsäure (RNA) in Desoxyribonukleinsäure (DNA) umzuschreiben. Darüber hinaus können sie ihr Genom in die DNA des Wirtes integrieren und durch erhöhte Mutationsrate den Aufbau effektiver Immunantworten verhindern [15] [16].

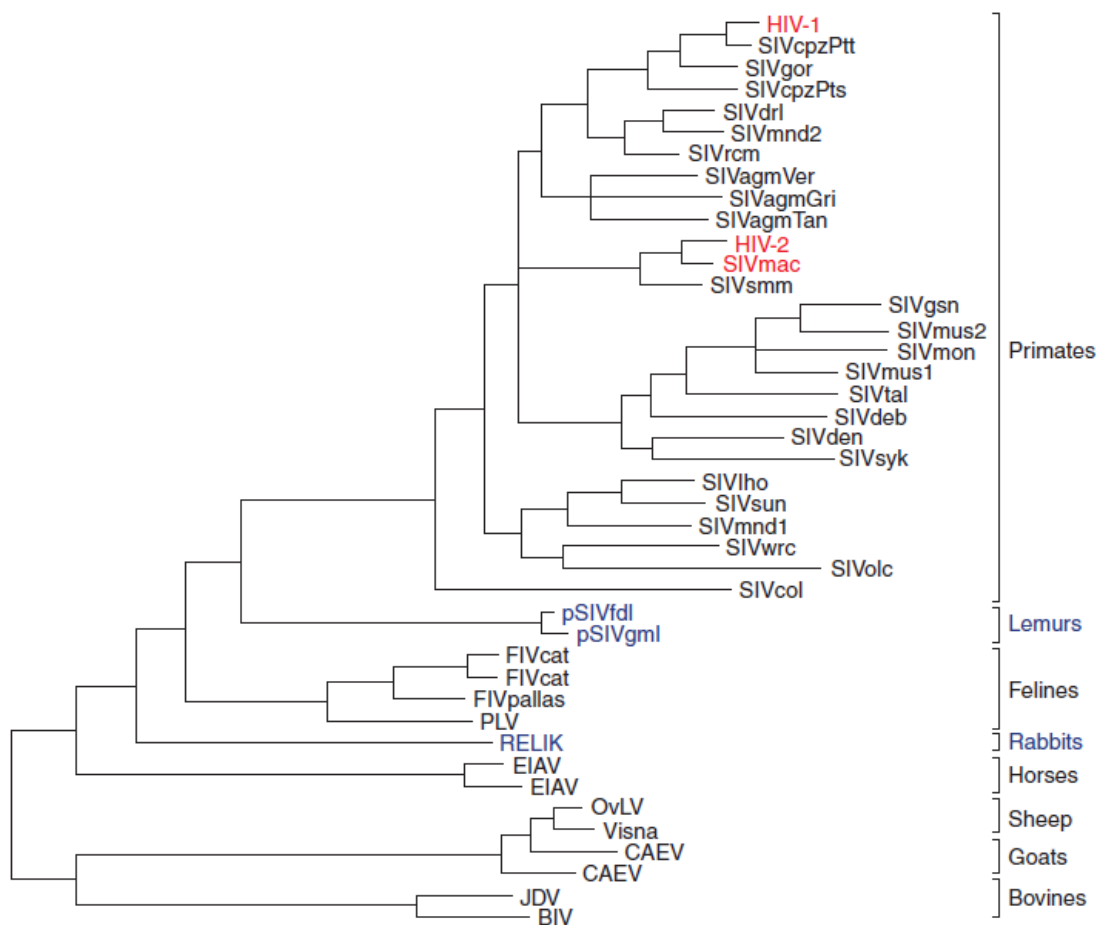


Abbildung 1: Phylogenetische Verwandtschaft der Lentiviren. Dargestellt ist ein phylogenetischer Baum basierend auf Pol-Sequenzen (SHARP and HAHN, 2011, [10]).

1.1 HIV und AIDS

Unzweifelhaft ist das humane Immundefizienzvirus (HIV) der bekannteste Vertreter der Gattung der Lentiviren. Im Jahr 1981 beobachteten GOTTLEB *et al.* in den USA bei homosexuellen Männern diverse virale Infektionen, u. a. Zytomegalievirus-Infektionen, extensive mukosale Mykosen, Pneumonien verursacht durch *Pneumocystis carinii* und Kaposi-Sarkome. Alle Patienten waren vorher gesund gewesen und zeigten nach Auftreten der Symptome eine Lymphopenie [17]. Im Jahr 1982 bezeichnete das Zentrum für Krankheitskontrolle und Prävention (engl. *Center of Disease Control*, CDC) das Krankheitsbild als AIDS (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*) und erläuterte Richtlinien zum Schutz vor Transmission [18]. BARRE-SINOUSI *et al.* gelang es im Jahr 1983, ein neues Virus zu isolieren, das für AIDS verantwortlich war. Es handelte sich um ein T-lymphotropes Retrovirus, welches präferenziell CD4⁺ T-Helferzellen infizierte und sich von den bisher bekannten Viren unterschied [19]. Es wurde zunächst als Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV), humanes T-lymphotropes Virus-III (HTLV-III) oder AIDS-assoziiertes Retrovirus (ARV) bezeichnet [20]. 1986 beschrieben ROUZIOUX *et al.* ein humanes Retrovirus, das in Westafrika isoliert wurde und biologische und morphologische Ähnlichkeiten zu LAV zeigte [21]. Seit 1986 werden diese Retroviren offiziell als humane Immundefizienzviren (HIV) bezeichnet [22].

1.2 HIV-1 und HIV-2

Beim Menschen sind zwei Immundefizienzviren nämlich HIV-1 und HIV-2 bekannt, die eine Sequenzidentität von etwa 60 % aufweisen [23]. Sie teilen morphologische und biologische Eigenschaften und lösen beide AIDS aus. HIV-1 wird mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert, der ohne Therapie meistens zum Tod führt. Im Gegensatz dazu ist HIV-2 weniger virulent und die Infektion führt zu einem milderem Krankheitsbild [24].

Initial wurde HIV-1 in die Gruppen M (engl. *Main*) und O (engl. *Outlier*) eingeteilt [25]. Zusätzlich dazu wurden 1998 die Gruppe N (engl. *non-M non-O*) [26] und 2009 die Gruppe P in einer Kamerunerin identifiziert [27]. HIV-2 wird in acht Gruppen, A-H, unterteilt. HIV-1 Typ M wird als Ursache der AIDS-Pandemie betrachtet, im

Gegensatz zu den anderen Typen, die sehr sporadisch vorkommen und sich nur in bestimmten Regionen ausbreiten [28].

1.3 Das Affenimmundefizienzvirus

Im Jahre 1983 wurden im „*New England Regional Primate Research Center*“ Todesfälle bei Makaken durch Lymphome, opportunistische Infektionen, wie *Pneumocystis*-Pneumonien und nekrotische Gingivitiden beschrieben. In einer retrospektiven Studie wurde festgestellt, dass seit 1980 15 Tiere mit ähnlichen Symptomen verstorben waren. Mit Hilfe von Blutuntersuchungen und Analysen von Immunzellen stellte sich heraus, dass diese Tiere eine Immundefizienz zeigten, die der humanen AIDS-Erkrankung sehr ähnelte [29]. Das isolierte Virus war mit dem zuvor beschriebenen HTLV-III vergleichbar, replizierte präferenziell in CD4⁺ T-Helferzellen und wurde zunächst als „simianes“ T-lymphotropes Virus-III (STLV-III) bezeichnet [30]. 1986 wurde es analog zu HIV in Affenimmundefizienzvirus (engl. *simian immunodeficiency virus*, SIV) umbenannt [22]. Wie HIV ist SIV der Familie der Retroviren und der Gattung der Lentiviren zugeordnet. Die Nomenklatur wurde für die Subtypen der verschiedenen Affenspezies beibehalten. So unterscheidet man zum Beispiel zwischen SIVagm bei der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*; engl. *african green monkey*) [31], SIVsmm bei Rußmangabenen (*Cercocebus atys*; engl. *sooty mangabey*) [32], SIVmnd bei Mandrills (*Papio sphinx*; engl. *mandrill*) [33] und SIVcpz bei Schimpansen (*Pan troglodytes*; engl. *chimpanzee*) [34]. Bei etwa 40 verschiedenen afrikanischen Primatenspezies wurden bis heute speziesspezifische Immundefizienzviren erkannt [35]. Afrikanische Primaten gelten als natürliche Wirte und in den meisten Fällen verläuft die Infektion trotz hoher Viruslast im Blut symptomlos [36].

1.4 Die Herkunft von HIV und die Verwandtschaft mit SIV

Die Herkunft des HI-Virus wird bis heute diskutiert. Epidemiologische Recherchen und molekulare Stammbaumanalysen weisen darauf hin, dass SIV das ursprüngliche Virus für HIV ist [37]. Wie die exakte Übertragung auf den Menschen stattgefunden hat, ist jedoch nicht abschließend geklärt. Die Jagd auf Affen in Afrika, die

Zubereitung und der Verzehr von Affenfleisch und der damit verbundene kutane und mukosale Kontakt haben möglicherweise zur Transmission beigetragen [38] [39]. SI-Viren gelten nicht als klassische zoonotische Erreger, sondern über ungewöhnliche Transmissionsrouten übertragene Pathogene, die sich an den humanen Wirt adaptiert haben. Als Ursprung von HIV-2 wird das SIV_{mm} der Rußmangaben betrachtet, da die Viren eine enge phylogenetische Verwandtschaft und identische Genomstruktur aufweisen. Außerdem wurden HIV-2 und SIV_{smm} in den gleichen geographischen Gebieten identifiziert [40]. Das SIV_{cpz} der Schimpansen wird als das Ursprungsvirus von HIV-1 betrachtet [10].

Die Sequenzanalysen von HIV und SIV bestätigen die Verwandtschaft zwischen HIV-1 und SIV_{cpz} als auch zwischen HIV-2 und SIV_{smm} sowie SIV_{mac} (Abb. 2). Nach Beobachtung der Phylogenie scheint die Entstehung von HIV durch zoonotische Transmission sehr wahrscheinlich.

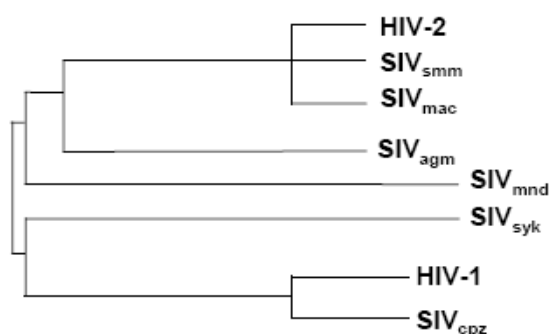


Abbildung 2: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen HIV-1 und HIV-2. Dargestellt ist ein phylogenetischer Baum, der die Beziehungen zwischen HIV-1, HIV-2 und den dazugehörigen SIV-Stämmen veranschaulicht (modifiziert nach RAMBAUT *et al.*, 2004 [41]).

1.5 Morphologie und Struktur von HIV und SIV

Der Aufbau von HIV und SIV ist nahezu identisch. Die kompletten infektiösen Partikel haben eine Größe von etwa 110 nm. Ein konisches Kapsid umhüllt das Genom, das aus zwei identischen RNA-Kopien besteht. Diese Struktur des Virus wird bei Lentiviren auch Core genannt. Das Kapsid besteht bei HIV-1 aus dem Protein p24,

und bei HIV-2 und SIV aus dem Protein p27. Die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase sind ebenso im Kapsid enthalten. Außerhalb umgibt es eine Lipiddoppelmembran, die während des Vorgangs der Knospung aus der Zellmembran der Wirtszelle entsteht. Auf der Oberfläche des Virions sind zwei virale Glykoproteine zu erkennen: das Transmembranprotein gp41, das mit der Hülle verankert ist und das externe gp120 bzw. gp130 bei SIV. Letztere spielen eine entscheidende Rolle bei der Infektion und Fusion mit der Wirtszelle, da sie die einzigen Oberflächenproteine sind, die vom Virus kodiert werden [42]. Auf der inneren Seite der Membran befindet sich das Matrixprotein p17 [43].

2. Pathogenese der HIV-/SIV-Infektion

2.1 Übertragung und Replikation

Die Übertragung von HIV ist relativ schwierig, da es nicht durch Hautkontakt, Speichel, Schweiß oder Tränenflüssigkeit übertragen wird. Es stellt daher im täglichen Umgang mit Infizierten keine große Gefahr dar [44]. Homosexuelle, Drogenabhängige und Hämophile wurden bei Ausbruch der Epidemie als Risikogruppen bezeichnet. Folglich wurde vermutet, dass die Transmission entweder über sexuellen Kontakt oder über das Blut stattfindet [45]. Inzwischen ist bekannt, dass Blut, Sperma und Scheidenflüssigkeit sowie Muttermilch das Virus enthalten können. Eine Übertragung findet statt, wenn die oben genannten Körperflüssigkeiten in Kontakt mit Schleimhäuten oder nicht intakter Haut kommen [46]. Eine hohe Viruslast des Überträgers und häufige Exposition gegenüber dem Virus erhöhen das Risiko einer Infektion.

Nachdem das Virus die physikalische Barriere überwunden hat, tritt es in die Zielzelle ein, in der die Replikation erfolgt. Als primärer und essentieller Rezeptor wurde bereits 1984 das CD4 Molekül erkannt [47], das hauptsächlich auf der Oberfläche von T-Zellen, aber auch auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird [48]. Das Virus repliziert in der akuten Phase der Infektion in den aktivierten CD4⁺ T-Zellen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes [49] und provirale DNA ist bereits drei Tage nach Infektion in mukosalen Geweben nachweisbar [50]. Die

Adsorption an die Zielzelle erfolgt, indem das Oberflächen-Glykoprotein gp120 des Virus an den CD4-Rezeptor der Zielzelle bindet, wodurch eine Konformationsänderung im gp41 erfolgt. Außer dem CD4-Rezeptor gibt es noch weitere Korezeptoren, die für die Bindung des Virus an die Zelle essentiell sind. Der Chemokinrezeptor CCR5 (eng. *C-C chemokine receptor type 5*) dient als Korezeptor für die M-tropen Viren [51] und der CXCR4 (engl. *C-X-C chemokine receptor type 4, fusin*) als solcher bei T-tropen Viren [52]. Durch diese Konformationsänderung von gp41 kommt es zur rezeptorvermittelten Fusion der viralen und zellulären Membran, sodass das Kapsid in das Innere der Zielzelle gelangt [53]. Dort werden das virale Genom und die im Kapsid enthaltenen Enzyme freigesetzt (engl. *uncoating*). Anschließend wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase die virale einsträngige RNA in doppelsträngige provirale DNA umgeschrieben. Die so entstehenden DNA Kopien weisen eine hohe Variabilität auf, was wiederum an der geringen Kopiergenauigkeit der Reversen Transkriptase liegt [54]. Danach wird mittels der viralen Integrase die provirale DNA in das Genom des Wirtes eingebaut. Es handelt sich bei dieser Phase um eine latente Infektion, die entweder jahrelang so vorliegen kann oder nach Aktivierung der Zelle produktiv wird [55]. Nach der Transkription der proviralen DNA erfolgt die Translation der viralen Proteine im Zytoplasma am endoplasmatischen Retikulum. Das Virus verlässt die Zelle, indem vollständige virale Kapside die Lipidmembran der Wirtszelle annehmen, in der die Hüllproteine des Virus eingebettet sind.

2.2 Krankheitsverlauf der HIV-Infektion

Der klassische Verlauf der HIV-Infektion kann in drei Stadien klassifiziert werden [56]. Nach der Infektion folgt die akute Phase, die durch steigende Immunaktivierung, hohe Viruslast (Spitzenvirämie, engl: *peak viremia*) und einen massiven Verlust von mukosalen CD4⁺ T-Zellen gekennzeichnet ist (Abb. 3) und zwei bis vier Wochen andauert. Der Verlust der Zellen ist im Blut und in den mukosalen Geweben nachweisbar, am stärksten ist das lymphatische Gewebe des Intestinaltraktes betroffen [8] [57] [58] [59]. In dieser Phase können auch grippeähnliche klinische Symptome wie Fieber, generalisierte Lymphadenopathie, Inappetenz und Diarrhoe

auftreten [60]. Auf die akute Phase folgt die chronische, klinisch asymptomatische Phase, in der die Viruslast im Blut zwar sinkt, jedoch messbar bleibt. Die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Blut steigt an und stabilisiert sich auf einen Wert, der unter dem Ausgangswert liegt. Allerdings erholt sich der Anteil der CD4⁺ T-Zellen im Darm nur minimal [58]. Obwohl diese Phase auch als Latenzphase beschrieben wird und bis zu zehn Jahre anhalten kann, ist eine konstante Virusreplikation und Immunaktivierung nachweisbar. Im finalen AIDS-Stadium werden ein rapider Anstieg der Viruslast und eine signifikante Depletion von CD4⁺ T-Zellen beobachtet (Abb. 3). Das Immunsystem ist durch die chronische Aktivierung erschöpft und es kommt oft zu opportunistischen Infektionen wie *Pneumocystis*-Pneumonien, oralen Candidosen und viralen und parasitären Enteritiden, die meistens innerhalb kurzer Zeit zum Tod führen [61].

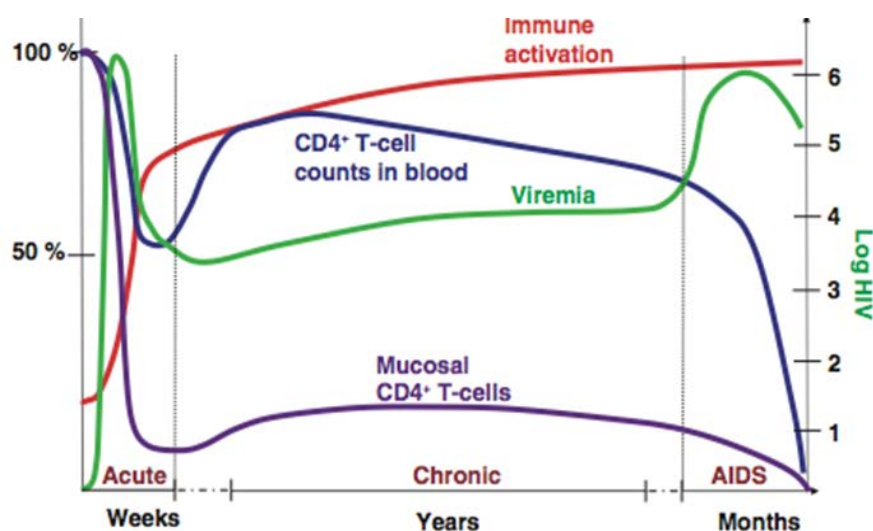


Abbildung 3: Klassischer Verlauf der HIV-Infektion. Auf der x-Achse ist die Zeit nach der Infektion aufgetragen. Auf den y-Achsen sind die Veränderungen der Viruslast im Plasma, der CD4⁺ T-Zellzahlen in Blut und mukosalen Geweben und der Grad der Immunaktivierung im Verlauf der HIV-Infektion aufgetragen (modifiziert nach GROSSMAN *et al.*, 2006 [62]).

2.3 Verlaufsformen der HIV- und SIV-Infektion

Zwar kann die HIV-Infektion individuell sehr unterschiedlich verlaufen, jedoch gibt es typische Verläufe. Die meisten HIV-infizierten Patienten entwickeln innerhalb von zehn bis zwölf Jahren AIDS. Patienten unter antiretroviraler Therapie (ART)

überleben mehr als zehn Jahre nach dem Auftreten erster AIDS-Symptome. Im Gegensatz dazu versterben in der Regel diejenigen, die keine Medikation erhalten, innerhalb von zwei Jahren nach dem Ausbruch von AIDS [63]. Eine kleine Gruppe von sogenannten Langzeitüberlebenden (engl. *long-term non-progressors*, LTNPs), die etwa 5 - 10 % aller HIV-Infizierten ausmacht, entwickelt auch ohne ART kein AIDS. Diese Individuen sind in der Lage, die Virusreplikation zu kontrollieren und weisen stabile CD4⁺ T-Zellzahlen im Blut auf [12] [64]. Darüber hinaus wurden noch „rapid Progressors“ beschrieben die innerhalb von etwa drei Jahren AIDS entwickeln. Sie entsprechen etwa 2.8 % der infizierten Population [65]. Im Gegensatz dazu ist der Krankheitsverlauf bei SIV-infizierten Rhesusaffen (engl. *rhesus macaques*) im Vergleich zum Menschen deutlich schneller. So entwickeln die meisten Tiere innerhalb von ein bis zwei Jahren eine AIDS-ähnliche Erkrankung [11] [66]. Ein rapider Krankheitsverlauf, bei dem die Tiere innerhalb von drei bis sechs Monaten AIDS-ähnliche Symptome entwickeln, wurde auch bei der SIV-Infektion beschrieben [67]. Auch ein Teil der SIV-infizierten Rhesusaffen kann die Infektion kontrollieren und für längere Zeit asymptomatisch bleiben; dieser repräsentiert 5 % der Rhesusaffen indischer Herkunft [68].

3. Das SIV-Makaken-Modell in der HIV-Forschung

Da sich Rhesusaffen nicht mit HIV-1 infizieren lassen [69], repräsentiert die experimentelle Infektion mit SIV das wichtigste und zuverlässigste Tiermodell für die Erforschung der HIV-Infektion. Viele Fortschritte in der Bekämpfung der Krankheit sind diesem Modell zu verdanken [70]. Aus ethischen Gründen sind Experimente an nicht-humanen Primaten (NHP) zu vermeiden, jedoch zeigt das Makaken-Modell im Vergleich zum murinen oder felines Tiermodell große Vorteile u. a. aufgrund der anatomischen und immunologischen Ähnlichkeit zum Menschen [71] [72].

Von großem Interesse sind auch die Modelle mit natürlichen Wirten, die zwar infiziert werden können, jedoch keine AIDS-ähnliche Erkrankung entwickeln. Die Untersuchung der infizierten Zielzellen und der Immunaktivierung *ex vivo* können in

diesen Modellen zur Entwicklung von therapeutischen und präventiven Strategien beitragen [73] [74].

Der typische Verlauf der Infektion beim Menschen und bei NHP ist in Abbildung 4 dargestellt. Im Vergleich zum Menschen erreichen NHP eine Woche früher die Spitzenvirämie und die Plateauphase (engl. *viral set point*) tritt acht Wochen früher ein. Darüber hinaus bleibt die Viruslast höher und die Progression zu AIDS erfolgt viel schneller. So entwickeln Rhesusaffen in der Regel nach einem halben bis drei Jahren AIDS - im Gegensatz zum Menschen, bei dem die ersten AIDS-Symptome erst nach acht bis zehn Jahren auftreten [11].

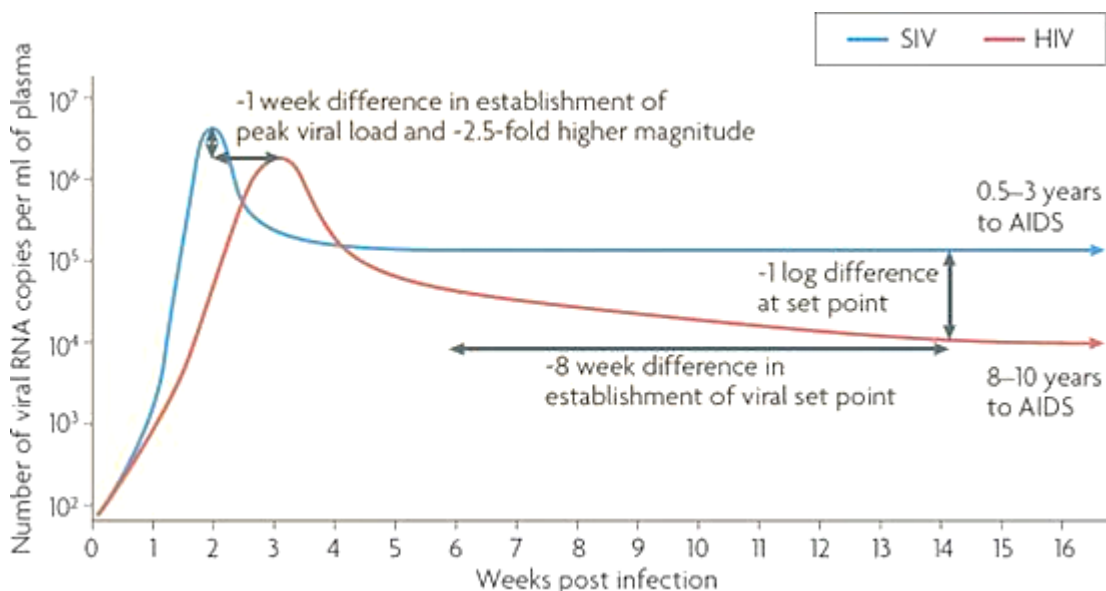


Abbildung 4: Unterschiede im Verlauf zwischen HIV- und SIV-Infektion. Die blaue Kurve repräsentiert den Verlauf der SIV- und die rote den der HIV-Infektion. Es sind Unterschiede bezüglich der Spitzenvirämie und des zeitlichen Verlaufs erkennbar (WEINER *et al.*, 2009 [11]).

Viele HIV-Patienten erklären sich inzwischen bereit, an klinischen Studien teilzunehmen, jedoch ist die Nutzung des Tiermodells aus vielen Gründen unumgänglich. Bei HIV-infizierten Menschen ist der Zeitpunkt der Infektion meistens unbekannt, und die Diagnose wird zufällig oder erst nach dem Auftreten von HIV-assoziierten Symptomen gestellt. So ist die Untersuchung von immunologischen Ereignissen in der frühen Phase der Infektion zumeist unmöglich. Im Tiermodell hingegen können der Zeitpunkt der Infektion, das Virusisolat, die Dosis und die

Infektionsroute ganz genau definiert werden. Zusätzlich unterstreichen die möglichen, regelmäßigen Eingriffe zu bestimmten Zeitpunkten über den gesamten Verlauf der Infektion und ein großes Spektrum an zur Verfügung stehenden Organproben die Unerlässlichkeit des Modells.

4. Das Immunsystem

Wirbeltiere besitzen ein Abwehrsystem, das auf der einen Seite vor Krankheitserregern (z. B. Viren, Bakterien) und körperfremden Stoffen durch Einleitung einer Immunantwort schützt und auf der anderen Seite körpereigene Substanzen erkennt und für Homöostase und Toleranz sorgt. Es ist ein komplexes Netzwerk, das aus diversen Zellen und Molekülen besteht und sich über den ganzen Organismus erstreckt. Es wird zwischen dem angeborenen und dem erworbenen (oder adaptiven) Immunsystem unterschieden.

Das angeborene Immunsystem entspricht der ersten Verteidigungslinie des Körpers, indem es mit einer sehr schnellen, jedoch unspezifischen Immunantwort auf ein Pathogen reagiert. Im Gegensatz dazu ist die Antwort des adaptiven Immunsystems spezifisch gegen das Antigen gerichtet, die Ausbildung dieser Abwehrmechanismen dauert jedoch beim ersten Kontakt deutlich länger (zwei bis vier Wochen). Falls es zu einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen kommt, folgt eine schnelle und starke Reaktion. Dieses immunologische Gedächtnis bietet einen lebenslangen Schutz gegen viele Antigene.

Die zellulären Immunantworten werden durch diverse Zellpopulationen des angeborenen und adaptiven Immunsystems vermittelt. Die humorale Immunantwort basiert auf nicht-zellulären Komponenten und besteht aus Immunglobulinen (Antikörpern), die von B-Zellen produziert werden, dem Komplementsystem und diversen Immunbotenstoffen.

4.1 Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems

Im Folgenden wird nur auf die Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems eingegangen, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

4.1.1 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) erkennen und töten geschädigte Zellen, z. B. Tumorzellen oder infizierte Zellen. Sie besitzen als Teil der angeborenen Immunantwort keine Antigen-spezifischen Rezeptoren, unterscheiden jedoch zwischen entarteten oder infizierten Zellen und normalen Zellen mittels spezifischer Rezeptoren, die mit MHC (engl. *major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex)-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzellen interagieren. Virusinfektionen oder Tumorzellen können zu einer verminderten oder fehlenden Expression von MHC-Molekülen führen, was zur Aktivierung der NK-Zellen führt. NK-Zellen sezernieren daraufhin zytotoxische Moleküle wie Granzym B und Perforin, die in sekretorischen Lysosomen gespeichert sind. Diese führen wiederum zur Apoptose der Zielzellen. Neben dieser zytotoxischen Funktion produzieren NK-Zellen eine Vielzahl verschiedener Zytokine und Chemokine wie IL-1, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- α , IFN- γ , MIP1 α , MIP1 β , IL-8 und RANTES [75]. Die Aktivität von NK-Zellen kann durch Zytokine wie IFN- α , IFN- β und IL-12 bis auf das Hundertfache verstärkt werden [76]. Bei der HIV-Infektion wurde ein Verlust dieser Zellen festgestellt [77].

4.1.2 Gamma-Delta T-Zellen

Gamma-delta T-Zellen (engl. $\gamma\delta$ *T-cells*) gehören zu der Gruppe der „innate-like“ Lymphozyten. Im Gegensatz zu den als Teil der adaptiven Immunantwort vorkommenden $\alpha\beta$ T-Zellen, die einen T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*, TCR) aus sogenannten α - und β -Glykoprotein-Ketten aufweisen, besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen einen TCR aus einer γ - und einer δ -Kette. Es gibt zwei unterschiedliche Gruppen von $\gamma\delta$ T-Zellen: diejenigen, die sich im lymphatischen Gewebe befinden und stark differenzierte Rezeptoren aufweisen, und solche, die sich in den Epithelien befinden

und Rezeptoren einer geringeren Diversität aufweisen [78]. Durch ihre zytotoxische Aktivität können sie direkt Zellen eliminieren. Sie werden durch Stressproteine aktiviert, produzieren Zytokine und sind in der Aufrechterhaltung der Homöostase involviert [79]. In der akuten Phase der HIV-Infektion wurde eine geschwächte zytotoxische Aktivität dieser Zellen beschrieben [80].

4.1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs) gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APCs) und besitzen die Fähigkeit, naiven T-Zellen Antigene zu präsentieren. Darüber hinaus sind sie auch in der Induktion immunologischer Toleranz involviert [81]. Sie sind in Oberflächengewebe und inneren Schleimhäuten zahlreich vertreten. Ihre langen zytoplasmatischen Dendriten können durch die dichten Zellverbindungen (engl. *tight junctions*) zwischen den Oberflächenzellen dringen, ohne die Funktion der Oberflächen als Diffusionsmembran zu beeinträchtigen. Anhand ihrer Oberflächenmarker können zwei Subpopulationen erkannt werden: plasmazytoide DC (pDCs) und myeloide DC (mDCs). Während pDCs (CD123⁺) nach ihrer Aktivierung große Mengen an Interferon- α sezernieren, sind mDCs (CD11c⁺) die klassischen antigenpräsentierenden Zellen [82]. Ihre Rolle in der HIV-Infektion wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite leiten sie die spezifische Immunantwort gegen HIV ein, auf der anderen Seite tragen sie zur Verbreitung des Virus bei [83].

4.2 Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems

Da sich die vorliegende Arbeit vorwiegend auf T-Zellen konzentriert, wird nachfolgend hierauf besonders eingegangen.

4.2.1 T-Zellen

T- und B-Lymphozyten bilden gemeinsam das adaptive Immunsystem. Wie alle lymphoiden Zellen werden T-Zellen im Knochenmark erzeugt. Anschließend reifen sie im Thymus (T) aus, wonach sie auch benannt werden. Dabei werden auf der

Oberfläche MHC-Rezeptoren ausgebildet. Alle T-Zellen exprimieren den T-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche, der körperfremde Antigene auf MHC-Molekülen erkennen kann.

Die zwei wesentlichen Vertreter der T-Lymphozyten sind die CD4⁺ T-Helferzellen und die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. CD4⁺ T-Helferzellen sezernieren Zytokine, die entweder die zellvermittelte Immunantwort induzieren oder die humorale Immunantwort stimulieren. Hingegen erkennen zytotoxische CD8⁺ T-Zellen infizierte oder tumoröse Zellen und induzieren unmittelbar den programmierten Zelltod.

Das CD4-Molekül, das auf der Oberfläche T-Helferzellen exprimiert wird, gilt als die primäre Andockstelle für HIV und SIV. Ein wesentliches Merkmal der HIV-/SIV-Infektionen ist daher die Depletion von CD4⁺ T-Zellen, die am stärksten in den mukosalen Geweben zu beobachten ist. Eine partielle Erholung der CD4-Zellzahlen wurde nach Initiation von ART beschrieben. Wenn im akuten Stadium der Infektion mit der Therapie begonnen wird, ist eine wesentliche Erholung der Zellen zu erwarten [84]. 1986 wurde die Hemmung der Virusreplikation durch CD8⁺ T-Lymphozyten *in vitro* zum ersten Mal beschrieben [85]. Die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen ist bei HIV-/SIV-Infektionen meistens erhöht, jedoch sinkt die Effektivität der CD8⁺ T-Zellantwort im Laufe der Infektion [86]. Darüber hinaus wurden auch doppelt positive (CD4⁺CD8⁺) und doppelt negative (CD4⁻CD8⁻) Populationen beschrieben. Doppelt positive Zellen repräsentieren Zielzellen für das Virus. Ein schneller Verlust dieser Zellen wurde in der akuten Phase der SIV-Infektion in der Darmschleimhaut beobachtet [87] [88]. Doppelt negative Zellen sollen einen regulatorischen Charakter besitzen und den Verlust der CD4⁺ T-Zellen kompensieren [89].

4.2.2 Interleukin-17 produzierende T-Zellen

Eine Vielzahl von Immunzellen wie z. B. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, NK Zellen und pDCs ist in der Lage, Interleukin-17 (IL-17) zu produzieren. IL-17 produzierende CD4⁺ T-Helferzellen werden als Th17 bezeichnet. Sie sind mit der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten assoziiert und spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien [90]. Jedoch scheinen diese Zellen auch bei persistierenden Entzündungen im Darm sowie Autoimmunerkrankungen wichtig zu

sein [91] [92] [93]. Außerdem tragen sie zur Integrität der Darmbarriere bei und werden als essentiell für die mukosale Immunität betrachtet, da sie neben ihrer Rolle bei der Erhaltung der strukturellen Barriere die Expression von Claudinen, antibakteriellen Defensinen und Muzinen induzieren [94]. Bei der HIV-/SIV-Infektion werden mukosale Th17-Zellen präferenziell infiziert und depletiert [95] [96]. Es wurde beschrieben, dass auch IL-17 sezernierende CD8⁺ T-Zellen in der chronischen Phase der SIV-Infektion reduziert waren [97]. Eine antiretrovirale Langzeittherapie kann jedoch zur Erholung von Th17-Zellen im gastrointestinalen System führen [98].

4.2.3 Regulatorische T-Zellen

Die regulatorischen T-Zellen (engl. *Tregs*) sind eine spezielle Subpopulation der T-Zellen, die überwiegend FoxP3 (engl. *forkhead-box-protein P3*) exprimieren. Neben den CD4⁺Tregs wurden auch regulatorische CD8⁺ T-Zellen sowie invariante natürliche Killer-T-Zellen (iNKT) beschrieben.

CD4⁺Tregs wirken vorwiegend suppressiv und immunregulatorisch, ihre Rolle wird jedoch kontrovers diskutiert. Sie sind in der Lage, die Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken und damit stark in der Regulierung von Selbsttoleranz involviert [99]. Des Weiteren sind sie an der Homöostase des gastrointestinalen Systems beteiligt, indem sie die Toleranz gegen Nahrungsmittelantigene und kommensale Bakterien gewährleisten. Im Fall einer immunologischen Dysregulation können kommensale Darmkeime eine generalisierte Immunaktivierung hervorrufen. Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass es in Abwesenheit dieser Zellen schnell zur massiven Entzündung des Darms kommt [100]. Jedoch sind CD4⁺Tregs möglicherweise auch an verminderten spezifischen Immunantworten gegen virale, bakterielle und parasitäre Erreger beteiligt [101] und potentiell auch in die Onkogenese involviert [102].

CD8⁺Tregs repräsentieren eine nur sehr kleine Zellpopulation beim Menschen und sind an Toleranz und Suppression von autoimmunen Reaktionen beteiligt. In Mäusen konnten diese Zellen nicht identifiziert werden. Eine Expansion dieser Zellen wurde bei humanen Patienten mit colorektalen Tumoren festgestellt [103]. Bei gesunden

Rhesusaffen ist die Anzahl der Zellen ebenfalls gering, jedoch wurde in der akuten Phase der SIV-Infektion ein Anstieg dieser Zellen im Colon beobachtet [104].

4.2.4 Invariante natürliche Killer-T-Zellen

Invariante natürliche Killer-T-Zellen (iNKTs) sind eine kleine Population, die sowohl NK-Oberflächenmarker als auch einen invarianten T-Zell-Rezeptor exprimieren. Diese Zellen erkennen Lipidantigene, die auf dem MHC-ähnlichen CD1d Molekül präsentiert werden, und binden daran. Sie exprimieren den Oberflächenrezeptor V α 24-J α 18, gehören zu den APCs und dienen als Brücke zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Zudem können aktivierte iNKTs pro-inflammatorische Zytokine produzieren. Daher ist ihre Funktion in Allergie, Onkogenese, Autoimmunität und Infektionskrankheiten sehr wichtig [105]. Bei HIV-Infektionen wurde eine Depletion von iNKTs beschrieben [106].

4.3 Das Myxovirus Resistance Protein 1

Nach ihrer Aktivierung bilden Immunzellen eine Vielzahl von Chemokinen und Zytokinen als Reaktion auf Pathogene. In der akuten Phase einer Infektion ist die Aktivierung und Anlockung von Immunzellen sowie die Blockierung von Rezeptoren essentiell für die Bekämpfung der Erreger. Die dauerhafte Expression von Zytokinen kann jedoch zu einer chronischen Immunaktivierung führen, die schädlich für den Wirt ist [107]. Interferone (IFN) sind Glykoproteine, die von vielen Zellen produziert werden, insbesondere nach einer Virusinfektion. Sie besitzen immunstimulierende, antivirale und antitumoröse Eigenschaften und wurden bereits vor 50 Jahren als ein Faktor, der die Replikation von Influenzavirus inhibiert, entdeckt [108]. Interferone werden in drei Hauptklassen unterteilt: IFN- α , IFN- β und IFN- γ . Da IFN- α und IFN- β ähnliche immunologische und biochemische Charakteristika aufweisen, werden sie auch als Typ-1-Interferone und IFN- γ als Typ-2-Interferon bezeichnet. Nachdem das Interferon an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden hat, wird die antivirale Aktivität induziert. Dazu gehören eine Hemmung der Zellproliferation, die Regulierung der Zelldifferenzierung und eine Modulierung des Immunsystems. Myxovirus Resistance (Mx) Proteine sind Interferon-induzierte Guanosintriphosphat-

bindende Proteine. Mx1 befindet sich im Zytoplasma und weist eine weite antivirale Aktivität auf. Es inhibiert die Replikation von diversen RNA-Viren wie Orthomyxoviren, Paramyxoviren, Rhabdoviren und Bunyaviren [109] und wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, darunter Hepatozyten, endotheliale Zellen, Monozyten und dendritische Zellen [108]. In der akuten Phase der HIV-Infektion spielen Typ-I IFN aufgrund ihrer antiviralen Eigenschaften eine sehr wichtige Rolle. Während der chronischen Phase der HIV-/SIV-Infektion erfolgt oft keine Herabregulierung der IFN-Expression, was zu einer chronischen Immunaktivierung führen kann [110]. Im Gegensatz dazu wurde bei natürlichen Wirten für SIV, wie grünen Meerkatzen, eine Regulierung von Typ-1 IFN in der chronischen Phase der Infektion nachgewiesen [111]. Die Rolle der IFN in der HIV-Infektion wird bis heute kontrovers diskutiert [112].

4.4 Das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin

Integrine sind heterodimere membranständige Glykoproteine, die an Wechselwirkungen zwischen den Zellen untereinander und zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix involviert sind. Sie vermitteln die Adhäsion von Lympho- und Leukozyten an das Gefäßendothel. Zudem fördern sie die Wanderung der Zellen in die verschiedenen Gewebe und bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit [113]. Das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin wird auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert, die in den Darm einwandern. Es wurde mit dem Krankheitsbild der ulzerativen Colitis assoziiert, wobei die Verabreichung eines Antikörpers gegen $\alpha 4\beta 7$ als vielversprechender therapeutischer Ansatz betrachtet wird [114]. Es spielt eine bedeutende Rolle in der HIV-Infektion, da *in vitro* nachgewiesen wurde, dass $CD4^+$ T-Zellen, die $\alpha 4\beta 7$ exprimieren, zu den präferentiellen Zielzellen von HIV zählen [115]. Darüber hinaus wurde im Makaken-Modell gezeigt, dass die Verabreichung eines Antikörpers gegen das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin vor und nach der Virusinokulation zu einer anhaltenden Kontrolle der Virusreplikation führte [116].

4.5 Chronische Immunaktivierung

Unzweifelhaft ist die Aktivierung des Immunsystems bei Kontakt mit Pathogenen äußerst wichtig. Ziel ist es, die schädlichen Noxen zu bekämpfen und gegebenenfalls Gewebeschäden zu beseitigen. Wenn die Balance zwischen Aktivierung und Suppression gestört ist, wird die Immunaktivierung nach der akuten Phase nicht wie üblich reduziert. Dies kann zu einer chronischen Aktivierung des Abwehrsystems führen. In den letzten Jahrzehnten wurde eine persistierende Immunaktivierung mit zahlreichen Krankheitsbildern wie z. B. Krebs, Diabetes und Alzheimer assoziiert [107]. In der HIV-Infektion wird die chronische Immunaktivierung als ein zuverlässiger prognostischer Marker betrachtet; eine persistierende Aktivierung des Immunsystems führt zur Progression [1] [117]. Trotz antiretroviraler Therapie ist bei infizierten Individuen eine permanente residuale Aktivierung zu beobachten [2]. Bakterien, die durch eine geschädigte intestinale Barriere in die systemische Blutzirkulation gelangen (mikrobielle Translokation), scheinen zur Aufrechterhaltung dieser Aktivierung beizutragen [118].

4.6 Caspase-induzierter Zelltod: Apoptose und Pyroptose

Das apoptotische Absterben als irreversibler Schluss der gesamten Lebensprozesse einer Zelle kann durch exogene oder endogene Reize ausgelöst werden. Die Balance zwischen Zelltod und Zellproliferation ist entscheidend für alle Funktionen eines Organismus, einschließlich der des Immunsystems. Eine Störung im Gleichgewicht kann zu Onkogenese oder Autoimmunkrankheiten führen [119].

Die Apoptose repräsentiert eine Form des programmierten Zelltodes durch proteolytische Enzyme, die als Caspasen bezeichnet werden. Es handelt sich um eine Kaskade, die mit den Effektorcaspasen 3, 6 und 7 endet [120].

Die Pyroptose unterscheidet sich von der klassischen Apoptose dadurch, dass der Zelltod exklusiv von der inflammatorischen Caspase-1 abhängig ist [120].

Beide Mechanismen (Apoptose und Pyroptose) können bei HIV-infizierten Individuen den Tod von CD4⁺ T-Zellen verursachen [121]. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Caspasenaktivität im Darm mit einer beeinträchtigten intestinalen Barriere assoziiert [122].

5. Das intestinale System in der HIV-/SIV-Infektion

5.1 Funktion und Morphologie des Colons

Als Colon wird der Teil des Dickdarms bezeichnet, der nach dem Caecum anfängt und ins Rektum mündet. Hauptaufgaben des Colons sind die Resorption von Wasser und Elektrolyten und die Sekretion von Schleim. Die epitheliale Oberfläche des Colons besteht hauptsächlich aus Krypten. Im Gegensatz zum Dünndarm besitzt sie keine Zotten. Auch im Colon ist der typische schichtweise Aufbau der Darmwand zu erkennen. Die Colonwand besteht aus der *Lamina mucosae*, der *Tela submucosa*, der *Tunica muscularis*, welche wiederum aus dem *Stratum circulare* und dem *Stratum longitudinale* besteht, und der *Tunica serosa* (Abb. 5).

Die *Lamina mucosae* wird nochmals in die *Lamina epithelialis mucosae*, die *Lamina propria mucosae* und die *Lamina muscularis mucosae* unterteilt. In der *Lamina propria* (LP) befinden sich einzelne Immunzellen und Immunzellaggregate (isolierte Lymphfollikel) [123]. Immunologisch gesehen befindet sich im Darm die größte Anzahl an Lymphozyten, die mindestens 70 % der gesamten Lymphozyten des Körpers ausmacht [124]. Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Immunzellen der LP. Aktivierte CD4⁺ T-Gedächtniszellen stellen die Mehrzahl der Immunzellen in der LP dar, hingegen ist die Anzahl der B-Zellen geringer [125] [126]. Die Lymphozyten, die sich im Darmepithel befinden, bestehen hauptsächlich aus zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen [127].

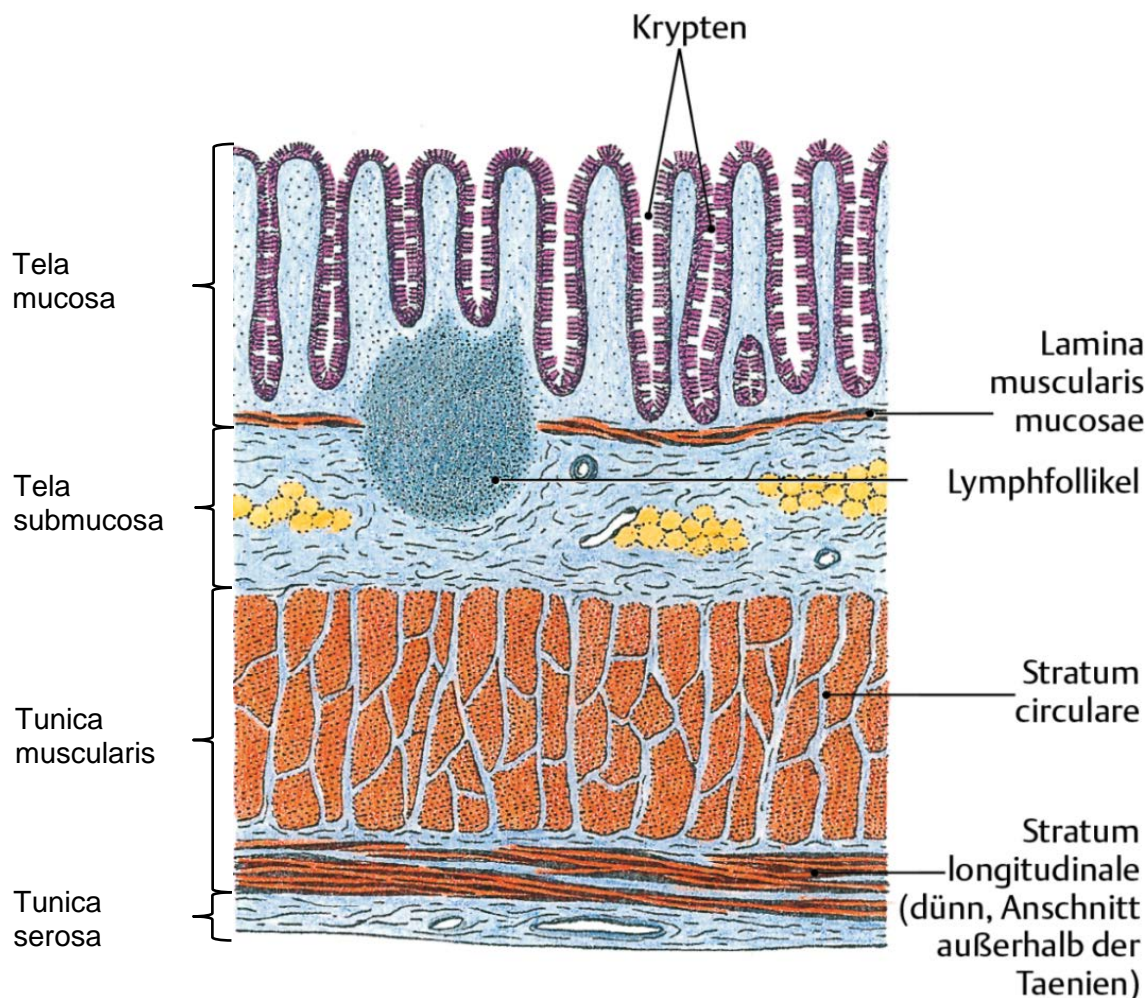


Abbildung 5: Morphologie des Colons (modifiziert nach ULFIG, 2011 [128]).

5.2 Die epitheliale Barriere

Das Epithel des gastrointestinalen Traktes stellt die größte Oberfläche zwischen dem Körper und der Umwelt dar und wird stetig einer enormen Anzahl an Antigenen ausgesetzt [129] [130]. Beim Menschen wird diese Fläche auf ca. 200 m² geschätzt [131]. Es handelt sich um eine Diffusionsbarriere, die durchlässig für Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht ist. Nährstoffe werden resorbiert, während der Einstrom schädlicher Bakterien, Viren, Parasiten und Allergenen verhindert wird. Man unterscheidet zwischen der extrazellulären Komponente, welche aus Muzinen besteht, und der zellulären Komponente, die das Zylinderepithel der Darmmukosa und die engen Verbindungen (engl: *tight junctions*) zwischen den Epithelzellen

beinhaltet (Abb. 6) [132]. Durch die engen Verbindungen wird der Fluss von Substanzen in den Zellzwischenräumen kontrolliert. Claudine (lat: *claudere* = „schließen“) sind Transmembranproteine, die am häufigsten in Zellverbindungen der Epithelien vorkommen. Sie sind für die parazelluläre Permeabilität der Barriere verantwortlich. Internalisierung von Claudinen kann zum schädlichen Anstieg der Permeabilität führen [133]. Die Aufrechthaltung der physischen Barriere ist eine der wichtigsten Funktionen des Epithels, und der Verlust dieser Barriere ist mit einem erhöhtem Krankheitsrisiko assoziiert [132]. Lipopolysaccharide (LPS) sind Hauptbestandteile der äußeren Zellwand von gramnegativen Bakterien; sie sind hitzestabile Moleküle und wirken hochgradig inflammatorisch [134]. In der HIV-Infektion führt die Translokation von mikrobiellen Abbauprodukten, wie LPS, in die Blutzirkulation zu chronischer Immunaktivierung und ist durch eine geschädigte Darmbarriere bedingt [135].

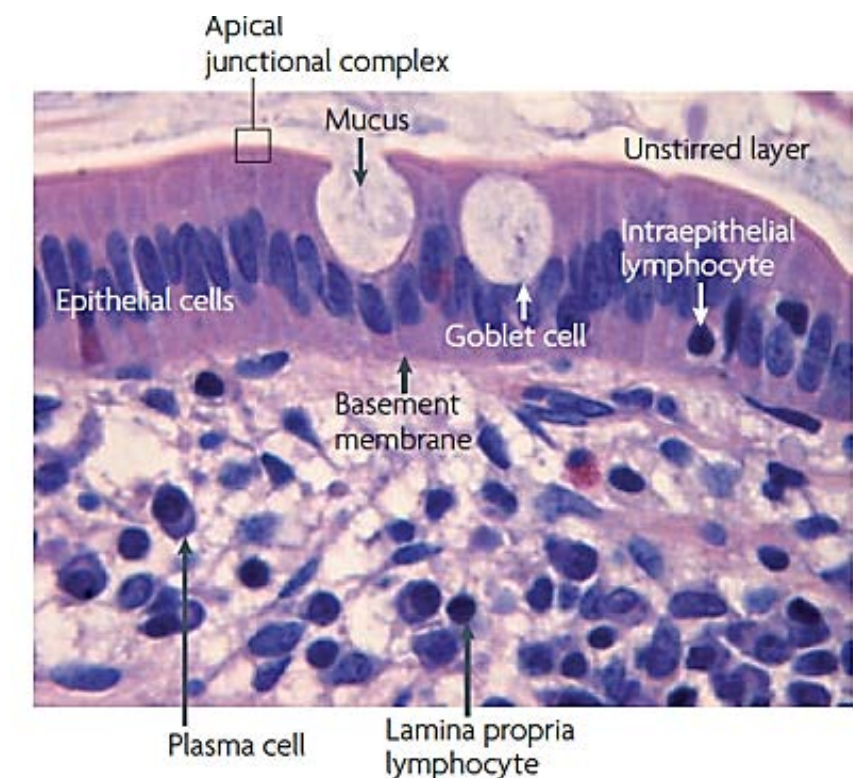


Abbildung 6: Die intestinale Barriere. Dargestellt sind die Komponenten der intestinalen Barriere: Mucus, Epithelzellen, intraepitheliale Lymphozyten und Immuncellen in der Lamina propria. (TURNER, 2009 [132]).

5.3 Das mukosale Immunsystem und die Rolle des intestinalen Systems in der HIV-/SIV-Infektion

Das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (engl: *mucosa associated lymphoid tissue*, MALT) besteht aus dem lymphatischen Gewebe, das sich im respiratorischen, urogenitalen und intestinalen Trakt (engl: *gut associated lymphoid tissue*, GALT) befindet [136]. Der Intestinaltrakt wird als das größte lymphatische Organ des Körpers betrachtet, da etwa 70 % des gesamten immunologisch aktiven Gewebes dort lokalisiert sind. Im peripheren Blut befinden sich nur 0.3 % - 0.5 % der gesamten CD4⁺ T-Zellen, der Rest befindet sich im lymphatischen Gewebe des Körpers [137]. Immunzellen der LP (Abb. 6), intraepitheliale Immunzellen und das organisierte lymphatische Gewebe (isolierte Lymphfollikel) in der Mukosa bilden eine immunologische Barriere.

Das intestinale System spielt eine herausragende Rolle in der Übertragung und Pathogenese der HIV-Infektion. Intestinale Manifestationen wie Diarrhoe und Malabsorption treten häufig im Verlauf der Infektion auf und werden auch als HIV-Enteropathie beschrieben [9]. In Bezug auf die HIV-Infektion ist es sehr wichtig, dass die meisten Immunzellen in der LP den primären HIV/SIV Rezeptor CD4 an ihrer Oberfläche exprimieren, damit das Virus dort angreifen kann. Dies reicht jedoch nicht für eine erfolgreiche Infektion der Zelle aus, denn weitere Korezeptoren werden benötigt. Ein Großteil der mukosalen CD4⁺ T-Zellen exprimiert zusätzlich den Chemokinrezeptor CCR5 [138] [88] oder das Integrin $\alpha 4\beta 7$, das auch als Korezeptor fungieren kann, indem es an das HIV-Oberflächenprotein gp120 bindet [139]. Darüber hinaus wird der alternative HIV-/SIV-Korezeptor GPR-15 vorwiegend im Darm exprimiert und in Verbindung mit der Apoptose von Epithelzellen und der HIV-/SIV-Enteropathie gebracht [140] [141]. Im Mausmodell wurde GPR-15 mit dem „homing“ von regulatorischen Zellen ins Colon assoziiert [142]. Die selektive und progressive Depletion der mukosalen CD4⁺ T-Zellen im Darm erfolgt sehr schnell nach der Infektion [57]. Im Gegensatz zum Blut, wo ein Verlust später erfolgt und nicht so ausgeprägt ist, ist der Verlust im Darm mehr oder weniger irreversibel [8]. In Abbildung 7 ist die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen in mukosalen Geweben von natürlich mit SIV und experimentell infizierten NHP und von HIV-infizierten Menschen im

Verlauf der Infektion dargestellt. Bei natürlichen Wirten, die keine AIDS-ähnliche Erkrankung entwickeln, ist eine eindeutig bessere Erholung der mukosalen CD4⁺ T-Zellen in der chronischen Phase der Infektion zu beobachten als bei SIV-infizierten Makaken oder bei HIV-infizierten Menschen.

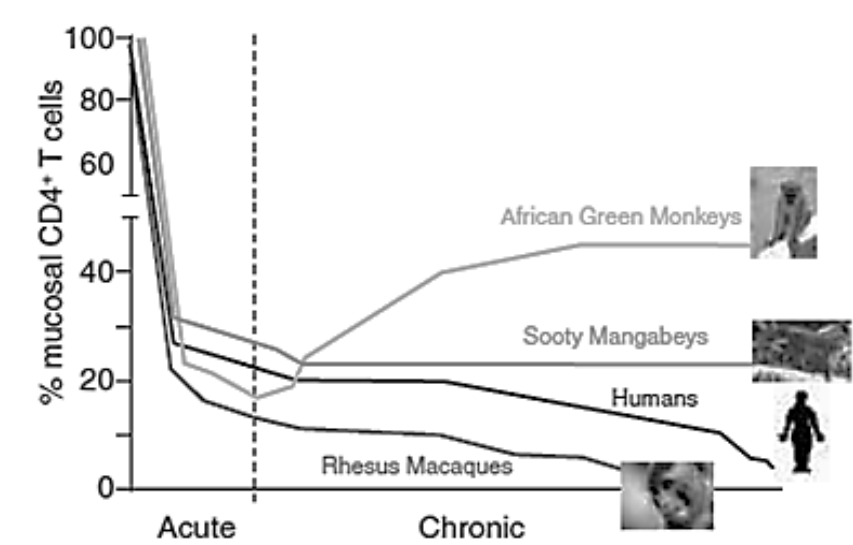


Abbildung 7: Verlauf der Depletion von mukosalen CD4⁺ T-Zellen in verschiedenen Spezies. Vergleich der Depletion der CD4⁺ T-Zellen in mukosalen Geweben bei Menschen, Rhesusaffen und natürlichen Wirten in der akuten und chronischen Phase der Infektion (PAIARDINI *et al.*, 2008 [6]).

5.4 Ablagerung von Kollagen im Colon

Die erhöhte Ablagerung von vornehmlich Kollagen I, III und Fibronectin wird als Fibrose bezeichnet. Die Fibrose eines Organes kommt oft bei chronischen Infektionen, Entzündungen und Tumoren vor [143]. Im gastrointestinalen Trakt wurde die Entität der kollagenen Colitis beschrieben, die bei den mikroskopischen Koliden eingeordnet wird und durch die Verdickung des subepithelialen Kollagenbandes charakterisiert ist [144] [145]. Die persistente Immunaktivierung und Entzündung, welche eine HIV-Infektion begleiten, führen zu tiefgehenden pathologischen Veränderungen und progressiven Kollegendeposition im lymphatischen Gewebe [146]. Die Verdrängung des lymphatischen Gewebes durch Kollagen scheint vor allem im GALT die Rekonstitution der immunologischen Funktionen zu verzögern [147].

5.5 Opportunistische Infektionen

Im Endstadium der HIV-/SIV-Infektion, was als AIDS bezeichnet wird, werden üblicherweise Infektionen durch opportunistische Erreger (das heißt Erreger, die bei gesunden Individuen keine Krankheit hervorrufen) diagnostiziert [148] [149]. Das Auftreten opportunistischer Infektionen ist mit der Depletion der CD4⁺ T-Zellen verbunden und stellt einen wichtigen Indikator für eine Immunschwäche dar [61]. Sehr häufig treten Pneumonien durch *Pneumocystis jirovecii* (früher *Pneumocystis carinii*) auf. Darüber hinaus kann das respiratorische System auch durch atypische Mykobakterien, hauptsächlich *Mycobacterium avium*, befallen werden. Für die Entwicklung der Soor-Ösophagitis ist der Hefepilz *Candida albicans* verantwortlich. Retinitiden, Enzephalitiden und Colitiden können durch das Zytomegalievirus (engl. *cytomegalovirus*, CMV) hervorgerufen werden. Der Hefepilz *Cryptococcus neoformans* wird überwiegend durch Inhalation übertragen. Der Erreger manifestiert sich hauptsächlich im Respirationstrakt und im zentralen Nervensystem mit entsprechender Symptomatik. Der intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondi* verursacht eine neurologische AIDS-Erkrankung, die zerebrale Toxoplasmose oder Toxoplasma-Enzephalitis genannt wird [150] [151]. Darüber hinaus werden oft Non-Hodgkin-Lymphome diagnostiziert, die möglicherweise mit einer Epstein-Barr-Virus (EBV) Infektion im Zusammenhang stehen [152] [153].

Im Gastrointestinaltrakt werden häufig Parasiten (*Cryptosporidium sp.*, *Trichuris sp.*, *Trichomonas sp.*, *Spironucleus sp.*), Viren (CMV, Adenovirus) und Bakterien (*Mycobacterium*, *Cambylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella*) als opportunistische Infektionen diagnostiziert [154] [155]. Zudem ist der Gastrointestinaltrakt ein Manifestationsorgan für Kaposi-Sarkome und Lymphome überwiegend vom B-Zell-Typ [156] [157].

III. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Alle in dieser Studie eingesetzten Tiere wurden im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) gehalten. Es handelte sich um adulte Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) indischer Herkunft und unterschiedlichen Geschlechts, die der Abteilung Infektionsmodelle oder der Primatenhaltung zugeordnet waren. Die Haltung und Verwendung der Versuchstiere folgte strikt den Regeln des Deutschen Tierschutzgesetzes, §§7 - 9, deren direkte Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlamentes und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere entspricht. Der Tierversuch wurde unter dem Aktenzeichen 33.9-42502-04-12/0820 von der Genehmigungsbehörde LAVES autorisiert. Die Tiere wurden gemäß den Anforderungen des Versuchs einzeln oder in Gruppen in experimentellen Tiereinheiten der biologischen und gentechnischen Sicherheitsstufe 2 gehalten. Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde täglich von erfahrenen Tierpflegern beurteilt, zusätzlich wurde eine umfassende tierärztliche Untersuchung in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Ein Abbruchscore wurde im Vorfeld der Studie festgelegt: wenn die Tiere eine gewisse „Punktzahl“ erreicht hatten, bzw. bestimmte Symptome zeigten, wurden sie gemäß dieses Scores euthanasiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden als LTNPs SIV-infizierte Rhesusaffen definiert, die mindestens fünf Jahre keine AIDS-ähnlichen Symptome zeigten. Die Gruppe der LTNPs setzte sich aus Tieren, die aus unterschiedlichen Vakzine-Experimenten stammten, zusammen. In der vorliegenden Arbeit wurden die LTNPs im Rahmen von Querschnittsanalysen über einen Zeitraum von 2,5 Jahren beobachtet. Einige Tiere entwickelten bereits im Beobachtungszeitraum typische Krankheitssymptome und wurden gemäß Abbruchscore euthanasiert. Darüber hinaus wurden zum Vergleich auch SIV-negative Tiere und Progressoren beprobt. Alle für diese Studie relevanten Informationen über die Versuchstiere, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, sind in der Tabelle 13 im Anhang hinterlegt.

1.1 Narkotisierung

Gemäß Tier- und Arbeitsschutz wurden alle Probenentnahmen in Narkose durchgeführt. In der Regel wurden die Tiere den Morgen vor der Narkose nüchtern gelassen. Bei der Entnahme von Colonbiopsien wurde eine Nahrungskarenz von 24 Stunden eingehalten, um die Menge des Kots im Enddarm zu minimieren. Die mobile Rückwand des Gitterkäfigs wurde vorgezogen, die Tiere immobilisiert und das Narkosemittel in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Bei leichteren, weitgehend schmerzfreien Eingriffen, wie z. B. Blutentnahmen, wurde das dissoziative Anästhetikum Ketamin (0,10 - 0,15 ml/kg Körpergewicht Ketavet; Wirkstoff: Ketamin; Fa. Pfizer, Berlin) injiziert. Im Fall von schmerzhafteren und länger andauernden Eingriffen, wie z. B. bei Colonbiopsien, wurde 0,15 - 0,2 ml/kg Körpergewicht (KGW) der Göttinger Mischung II (GMII) verabreicht. 1 ml GMII enthält 5 % Ketamin (Ketavet), 1 % Xylazin (Rompun, Fa. Bayer, Leverkusen) und 0,1 % Atropinsulfatlösung (Fa. Dr. Franz Köhler Chemie, Bensheim). Als Grundlage für die GMII Lösung wurde isotonische Kochsalzlösung (Fa. B. Braun, Melsungen) benutzt.

1.2 Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurde die *Vena femoralis* in der rechten oder linken Leiste punktiert. Vor der Punktion wurde die Entnahmestelle großflächig mit Sterillium Virugard (Fa. Bode Science Center, Hamburg) desinfiziert und anschließend wurde das BD-Vacutainer-System (Fa. BD, Heidelberg) benutzt. Je nach Größe des untersuchten Tieres wurden 21G bzw. 22G Kanülen benutzt. Für die Durchführung von durchflusszytometrischen Analysen wurden Röhrchen mit EDTA (Ethyldiamintetraacetat) als Gerinnungshemmer eingesetzt.

1.3 Bronchoalveoläre Lavage

An sich wird die bronchoalveoläre Lavage (BAL) als ein schmerzloser Eingriff betrachtet, jedoch ist für die erfolgreiche Durchführung eine tiefe Anästhesie der Tiere erforderlich, damit der Hustenreflex ausgeschaltet wird und es zu keinen Komplikationen, wie z. B. Aspirationspneumonien, kommt. Aus diesem Grund

wurden die Tiere mit 0,2 ml GMII pro kg KGW narkotisiert. Die Tiere wurden in Rückenlage gebracht und der Kopf wurde leicht hochgelagert. Um ein gutes Sichtfeld zu erschaffen, wurde der Unterkiefer an den Canini gespreizt und der Kopf leicht überstreckt. Mit einem Laryngoskop (Fa. Aesculap, Tuttlingen) mit eingebauter Lichtquelle wurde der Zungengrund herunter gedrückt und damit Kehlkopf und Stimmritze sichtbar gemacht. Im Anschluss wurde ein flexibles Bronchoskop (Fa. Richard Wolf, Knittlingen) in die Trachea eingeführt. Während der Atmung öffnet sich die Ritze reflexartig. Die Berührung des Kehlkopfs sollte vermieden werden, da Husten ausgelöst werden könnte. Das Bronchoskop wurde langsam bis zur *Bifurcatio tracheae* geschoben und letztlich in einem der Hauptbronchen bis zur Verkeilungsposition geführt. Danach wurde in zwei Portionen insgesamt 60 ml sterile körperwarme physiologische Kochsalzlösung durch den Arbeitskanal eingeführt und mit einer 5 ml Spritze portionsweise wieder abgesaugt. Im Fall eines Widerstandes wurde das Endoskop minimal bewegt, sodass das Atemwegsepithel nicht geschädigt wurde. Die gewonnene Flüssigkeit wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gestellt.

1.4 Colonbiopsien

Die Entnahme von Colonbiopsien erfolgte in Seitenlage unter Narkose. Die Tiere wurden mit 0,2 ml/kg KGW GMII narkotisiert. Eine Nahrungskarenz von 24 Stunden war erforderlich, damit sich so wenig Kot wie möglich im Colon ansammelt. Das distale Ende des Endoskops (Fa. Fujifilm, Düsseldorf) wurde mit Wasser benetzt, um die Gleitfähigkeit zu steigern und Verletzungen zu vermeiden. Nach der Einführung in den Analkanal wurde das Endoskop vorsichtig unter Sichtkontrolle 15 - 25 cm in das *Colon descendens* eingeführt. Ein gutes Sichtfeld wurde durch das Einbringen von Luft und die Spülung mit Wasser durch das Endoskop geschaffen. Erst nachdem die erwünschte Entnahmelokalisation erreicht war, wurde die zuvor in das Endoskop eingeführte Biopsiezange (oval gefenstert ohne Dorn, Fa. Fujifilm, Düsseldorf, mit einem Durchmesser von 1,8 mm, F6BOPK1803180 und 2,3 mm, F6BOPK2304180, Länge insgesamt 180 cm) aus dem Arbeitskanal ausgeführt und je nach Dehnung des Organs Luft hineingeblasen oder abgesaugt. Zunächst wurde die Zange

geöffnet, senkrecht und unter leichtem Druck auf das Epithel geschoben, dann geschlossen und wieder in den Arbeitskanal zurückgezogen. Durch die Bewegung wurde das Gewebe aus der Schleimhaut herausgezogen; es kam in der Regel zu leichten Blutungen an der Entnahmestelle, die spontan stoppten. Die Zange wurde zunächst aus dem Endoskopkanal entfernt und danach das entnommene Gewebe in die Probengefäße überführt. Dies erfolgte durch leichtes Schütteln der geöffneten Zange in PBS oder Formaldehyd (FA). Das Endoskop wurde sukzessiv zurückgezogen und Proben von diversen Lokalisationen gewonnen. Gleichzeitig wurde der Darm makroskopisch beurteilt und bei Bedarf Luft und Flüssigkeit abgesaugt. Die für durchflusszytometrische Analysen gewonnenen Biopsien wurden in PBS überführt und sofort auf Eis gelagert. Für die histologischen und immunhistochemischen Analysen wurde frisch angesetztes neutral gepuffertes 4 %iges FA benutzt. Für die RNA-Extraktion wurden alle Proben in RNAlater aufbewahrt. Die Biopsien wurden mit Hilfe einer feinen Pinzette aus der Zange entfernt und vorsichtig in das Gefäß überführt, um Verluste an RNAlater zu vermeiden. Die Biopsiezange wurde zwischen den Entnahmen gespült, sodass Medium- und Gewebereste entfernt wurden. Das Endoskop wurde nach jeder Entnahme innen und außen gründlich gereinigt, desinfiziert und getrocknet. Außerdem wurde regelmäßig eine Dichtigkeitskontrolle durchgeführt.

1.5 Euthanasie und Sektion

Mit der Applikation von 0,2 - 0,3 ml GMII /kg KGW wurde bei den Versuchstieren eine tiefe Narkose eingeleitet. Vor der Sektion wurde durch Punktion der *Aorta abdominalis* ein maximales Blutvolumen in tiefer Narkose entnommen. Final wurde eine Überdosis Narcoren (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium; Fa. Merial, Hallbergmoos,) über die *Aorta abdominalis* appliziert. Ein breites Probenspektrum wurde erst nach Feststellung des Todes der Tiere entnommen.

2. Isolierung und Zahlbestimmung von mononukleären Zellen

Tabelle 1: Auflistung von Medien und Lösungen

Medium/Lösung	Ansatz
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl. phosphate buffered saline, PBS</i>); pH 7,2
PBS/0,5 % BSA	PBS + 0,5 % BSA
PBS/5 % FCS	PBS + 5 % FCS
Kollagenasemedium	475 ml LPL-Medium (siehe Tabelle) + 15 ml Kollagenaselösung (10 mg/ml Collagenase III, Fa. Biochrom, Berlin) + 5 ml Trypsininhibitorlösung (10 mg/ml; Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) + 5 ml DNaselösung (10 mg/ml; Fa. Roche, Mannheim)
Fix/Lyse-Puffer	Erythrozyten-Lyse (Fa. BioLegend, San Diego), 10x, mit destilliertem Wasser auf 1x verdünnt
Fix/Perm-Puffer	FOXP3 Fix/Perm-Puffer (Fa. BioLegend, San Diego), 4x, mit PBS auf 1x verdünnt
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution mit 0,35 g/l NaHCO ₂
LPL-Medium	500 ml RPMI 1640 Medium (+ Glutamin; + 2,0 g/L NaHCO ₃ ; + 25mM Hepes (Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure; Fa. PAN-Biotech, Aidenbach) + 5 ml Penicillin/Streptomycin + 5 ml Amphotericin + 50 ml FCS +500 µl β-Mercapthoethanol (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Pancoll	Lymphozytenseparationsmedium, Dichte 1,077 g/ml (Fa. PAN-Biotech, Aidenbach)
Percoll 30 %	Basis 450 ml Percoll (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) + 50 ml 10xPBS, daraus 30 % Percoll mit HBSS + Phenolrot (<i>engl. Hank's Balanced Salt Solution</i> ; Fa. PAN-Biotech, Aidenbach) ansetzen
Percoll 70 %	Basis 450 ml Percoll + 50 ml 10xPBS, daraus 70 % Percoll mit HBSS ohne Phenolrot (Fa. PAN-Biotech, Aidenbach) ansetzen
Perm-Puffer	FOXP3 Perm-Puffer (Fa. BioLegend, San Diego), 10x, mit PBS auf 1x verdünnt
Trypanblau Lösung	0,5 g Trypanblau in 100 ml PBS
Natriumacetat Lösung	3 mol Natriumacetat /Liter doppeltdestilliertem Wasser

2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus der BAL

Die im 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelte BAL-Flüssigkeit wurde gegebenenfalls mit PBS/5 % FCS aufgefüllt und für 6 Minuten (min) bei 450xg zentrifugiert. Zunächst wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Zellpellet in 10 ml PBS/5 % FCS resuspendiert. Für die Zellvereinzelung wurde die Probe durch ein 70 µm Zellsieb (Fa. BD, Heidelberg) filtriert. Die filtrierte Flüssigkeit wurde mit PBS/5 % FCS auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurde, je nach Zellzahl, das Pellet im benötigten Volumen PBS aufgenommen.

2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus Colonbiopsien

Zur Isolierung von mononukleären Zellen wurden die Biopsien nach der Entnahme in PBS auf Eis gelagert. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das PBS vorsichtig abgekippt und anschließend wurden die Biopsien mit Hilfe einer Eppendorf Pipette auf einen Objektträger in einer Petrischale platziert. Mit einem Skalpell wurde das Probenmaterial kleinstmöglich geschnitten. Objektträger und Skalpell wurden mit insgesamt 8 ml Kollagenasemedium gespült und die Flüssigkeit wurde direkt in einen 250 ml Kolben mit Schraubdeckel überführt. Die Biopsien wurden zunächst drei Stunden im Schüttler Multitron Standard (Fa. Infors HT, Einsbach) bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Medium ohne die Biopsiereste über ein 100 µm Zellsieb (Fa. BD, Heidelberg) gegossen, das sich auf einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen befand. Die Biopsiereste wurden in der verbleibenden Menge Medium mehrmals auf und ab pipettiert und danach auch auf das Sieb gegeben. Die Gewebereste wurden kräftig mit einem Spritzenstempel durchgerieben. Es wurde mehrmals mit PBS/5 % FCS nachgespült und auf 50 ml aufgefüllt. Die so gewonnenen Zellen wurden anschließend für 6 min bei 450xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml 30 % Percoll resuspendiert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig, in einem konischen 15 ml-Zentrifugenröhrchen, auf 5 ml 70 % Percoll geschichtet und für 20 min bei 1000xg zentrifugiert. In der Interphase war ein

deutlicher Zellsaum erkennbar, der hauptsächlich aus Lymphozyten bestand. Die Lymphozyten wurden vorsichtig abgenommen, in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen übergeführt und mit PBS/5 % FCS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS/5 % FCS resuspendiert und 20 µl wurden zur Zellzahlbestimmung abgenommen.

2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer-Zählkammer (Fa. Marienfeld-Superior, Lauda Königshofen) eingesetzt. Die Zählprobe wurde zum Ausschluss toter Zellen 1:2 mit Trypan blau verdünnt und davon 10 µl in die Kammer überführt. Die Zellzahl wurde umgehend mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt. Lebende Zellen erschienen leuchtend im Gegensatz zu toten Zellen, die sich blau färbten, da ihre Membran durchlässig ist.

3. Virusbeladung in Colon und Blut

3.1 RNA-Extraktion von Colonbiopsien

Für die RNA-Extraktion wurden die Biopsien bis zur Aufarbeitung in RNAlater (Fa. Qiagen, Hilden) bei -80°C gelagert. Zwei Biopsien, eine 5 mm Stahlkugel (Stainless Steel Beads, Fa. Qiagen, Hilden) und 100 µl peqGOLDTriFast (Fa. PEQLAB, Erlangen) wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 15 Schwingungen/sec im Tissue Lyser (Fa. Qiagen, Hilden) homogenisiert. Danach wurden 900 µl peqGOLDTriFast dazugegeben und weitere 3 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße kräftig per Hand geschüttelt. Das Homogenat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße umgefüllt, 200 µl Chloroform EMSURE (Fa. Merck, Darmstadt) dazugegeben und anschließend für 10 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12.000xg, 4°C für 10 min wurde der Überstand abgenommen, mit 500 µl Isopropanol (Fa. Roth, Karlsruhe) versetzt und für 15 min inkubiert. Es wurde erneut zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet dreimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet in 50 µl RNase-freiem (Fa. Qiagen, Hilden) Wasser aufgenommen. 5 µl

Natriumacetatlösung (Fa. Merck, Darmstadt) und 125 µl 100 % Ethanol (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden dazugegeben und danach wurde die RNA bei -20°C mindestens 24 Stunden gefällt. Nach der Fällung wurde die Probe bei 12.000xg, 4°C für 30 min zentrifugiert und anschließend zweimal mit 80 % und einmal mit 100 % Ethanol gewaschen. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und im Anschluss die optische Dichte mit dem NanoDrop (Fa. PEQLAB, Erlangen) photometrisch gemessen. Alle Inkubationsschritte fanden auf Eis statt. Die Proben wurden schließlich in Aliquots bei -80°C gelagert.

3.2 Bestimmung der Virusbeladung im Plasma und im Colon mit qRT-PCR

Die Viruslast im Plasma wurde mit der Methode der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR, engl. *real-time quantitative reverse transcription PCR*) von Dr. ULRIKE SAUERMAN, Abteilung Infektionsmodelle des DPZ, bestimmt [158]. Die RNA Extraktion erfolgte mit Hilfe des QIAmp Viral RNA Mini Kits (Fa. Qiagen, Hilden) aus EDTA-Plasma. Für die Quantifizierung der viralen RNA aus Darmbiospien wurden 250 ng der Gesamt-RNA eingesetzt.

Die PCR wurde im Rotor-Gene-Q (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde eine RNA-Standardreihe von 10 bis 10⁶, RNA-Kopien/ml verwendet. Bei der negativen Kontrolle wurde die RNA-Lösung durch RNase-freies Wasser ersetzt. Der Ablauf, die Bedingungen sowie die Ansätze der PCR sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

Alle Bestimmungen erfolgten in zwei PCR-Ansätzen. Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden mit der Software des Rotor-Gene Q ausgewertet.

Tabelle 2: Ablauf der qRT-PCR

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

Tabelle 3: Reaktionsansatz der PCR zur Quantifizierung der viralen Kopien

Reagenz	Menge (Plasma)	Menge (Colon)
Mastermix	12,5 µl	12,5 µl
Primer Gag sense	0,625 µl	0,625 µl
Primer Gag antisense	0,625 µl	0,625 µl
Sonde	0,3 µl	0,3 µl
RT-Mix	0,25 µl	0,25 µl
RNA	8,5 µl	250 ng
H ₂ O (RNase- und DNase-frei)	ad 25 µl	ad 25 µl

4. Die polychromatische Durchflusszytometrie

Während der laminären Strömung einer Zelle durch einen Laserstrahl werden optische Signale unterschiedlicher Wellenlänge ausgesendet. Auf diesem Prinzip beruht die Methode der Durchflusszytometrie. Diese Technik wird häufig in der Hämatologie und Immunologie angewendet, um Zellen in heterogenen Zellsuspensionen zu phänotypisieren und zu quantifizieren. Je nach Form, Größe und Struktur erzeugt jede Zelle unterschiedliche Effekte, woraus schließlich Schlüsse über die Art und Eigenschaften der Zelle gezogen werden können.

Die Zellen passieren durch die Messzelle des Durchflusszytometers (LSR II, Fa. BD, Heidelberg) und werden mit einem Laserstrahl bestimmter Wellenlänge bestrahlt. Über den Vorwärtsstreulichtdetektor (engl. *Forward Scatter*, FSC) und den Seitwärtsstreulichtdetektor (engl. *Side Scatter*, SSC) können aufgrund der Intensität des gestreuten Lichtes Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden.

Darüber hinaus können die Zellen durch den Einsatz von monoklonalen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern weiter charakterisiert werden. Diese können an Strukturen der Oberfläche oder des Zellinneren binden. So werden sehr häufig CD-Marker (engl. *clusters of differentiation*, CD) der Zelloberfläche bestimmt. Durch den Laserstrahl werden die Fluorochrome angeregt, und es erfolgt die Emission

spezifischer Signale, die von Detektoren des Durchflusszytometers gemessen und ausgewertet werden. Um die optimale Antikörperkonzentration zu ermitteln, wurden regelmäßig Antikörpertitrationen durchgeführt.

Für diese Arbeit wurde das Gerät LSRII (Fa. BD, Heidelberg) benutzt. Es bietet die Möglichkeit, zehn Fluorochrome gleichzeitig zu analysieren und verfügt über drei Laser: einen roten der Wellenlänge 633 nm, einen blauen der Wellenlänge 488 nm, und einen violetten mit der Wellenlänge 405 nm.

Da es immer zu einer Überlagerung bei den Emissionsspektren kommen kann, wurde vor jeder Messung eine Kompensationsmessung durchgeführt. Dazu wurden beads (Fa. Spherotech, Illinois) mit jedem Fluorochrom einzeln gefärbt und gemessen. Zur Aufnahme der Signale wurde die Software FACS Diva (Version 6.1.3, Fa. BD, Heidelberg) benutzt und für die Auswertung die Software FlowJo (Version 9.6.4, Fa. Tree Star, USA) eingesetzt.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden frisches EDTA-Blut und isolierte mononukleäre Zellen aus BAL und Colon verwendet. Pro Färbung wurden entweder 50 µl Vollblut oder 0.5×10^6 - 10^6 isolierte Zellen, die in 50 µl PBS resuspendiert wurden, eingesetzt. Dazu wurden spezielle Röhrchen (Rundbodenröhrchen, Fa. BD, Heidelberg) zur Messung benutzt. Es erfolgten Oberflächen- und intrazelluläre Färbungen mit direkt gekoppelten Antikörpern. Dieses Vorgehen wird im Folgenden näher beschrieben.

4.1 Markierung von Oberflächenantigenen im Vollblut

Antikörpergemische mit Antikörpern in optimaler Gebrauchskonzentration wurden in FACS-Röhrchen vorgelegt. Denen wurde 50µl EDTA Blut hinzugefügt und das Antikörper-Blut-Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Lyse der Erythrozyten mittels des Fix-Lyse Puffers (Fa. BioLegend, San Diego) für 15 min. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und danach das Zellpellet mit PBS/0,5 % BSA gewaschen. Die Probe wurde in 50 µl PBS/0,5 % BSA aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Dunklen gelagert.

4.2 Markierung von Oberflächenantigenen bei isolierten mononukleären Zellen

$0.5 \times 10^6 - 10^6$ in 50 μ l PBS aufgenommene isolierte Zellen und das Antikörpergemisch wurden für 30 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Fix/Perm-Puffer (Fa. BioLegend, San Diego) für 20 min fixiert. Nach einem Zentrifugationsschritt der Probe für 5 min bei 1200 rpm, wurde der Überstand vorsichtig verworfen. Die Probe wurde mit PBS/0,5 % BSA gewaschen, das Zellpellet in 50 μ l PBS/0,5 % BSA aufgenommen und die Zellsuspension bis zur Messung kühl und dunkel gelagert.

4.3 Intrazelluläre Färbung

Bei der intrazellulären Färbung müssen die Antikörper die Zellmembran passieren und das Zellinnere erreichen. Nach der Oberflächenfärbung und Erythrozyten-Lyse wurden die Zellen für 20 min mit Fix/Perm-Puffer inkubiert, zentrifugiert und mit PBS/0,5 % BSA gewaschen. Die Zellmembran der so nach Erythrozyten-Lyse gewonnenen und behandelten Zellen sowie die wie unter 4.2 beschriebenen behandelten mononukleären Zellen wurden daraufhin für 15 min mit Perm-Puffer (Fa. BioLegend, San Diego) permeabilisiert. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen, die in Perm-Puffer aufgenommenen intrazellulären Antikörper dazu gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde nochmals mit Perm-Puffer gewaschen, die Zellen in 50 μ l PBS/0,5 % BSA aufgenommen und bis zur Messung kühl und dunkel gelagert.

4.4 Verwendete Gating-Strategien

Ziel der durchflusszytometrischen Untersuchung ist die Phänotypisierung und Quantifizierung von Zellen, die sich in einer Zellsuspension befinden. Diese Auswertungstechnik nennt sich „Gating“. Unter Gate ist eine definierte Region gemeint. Es handelt sich um eine kaskadenartige Methode, bei der die Zellen, die von Interesse sind, ausgewählt werden und von großen zu kleinen Zellpopulationen „gegated“ werden. Dieses Gating wirkt wie hintereinander geschaltete Filter.

Zur Charakterisierung der Immunzellen wurden unterschiedliche Gating-Strategien eingesetzt, die beispielhaft in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt sind. Um die Zellen des angeborenen Immunsystems zu charakterisieren (Abb. 8), wurden zu Beginn Dubletten ausgeschlossen (ein Singlet-gate). Danach wurden entweder CD3-negative Zellen oder Lymphozyten anhand des Markers CD45 ausgewählt. Von den CD3⁻ Zellen ausgehend wurde weiter auf Makrophagen (CD16⁺), Monozyten (CD14⁺) und DCs (pDCs: CD11c⁻ CD123⁺, mDCs: CD11c⁺ CD123⁻) gegatet. Ausgehend vom Lymphozyten-Gate (Panel unten links) wurde auf $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen gegatet. Die Expression von $\alpha 4\beta 7$ wurde bei allen Populationen überprüft.

Zur Charakterisierung der Zellen des adaptiven Immunsystems wurden zunächst die Dubletten ausgeschlossen (Abb. 9). Daraufhin wurden die Lymphozyten mittels SSC und CD45 definiert. T- Zellen wurden anhand des Markers CD3 identifiziert. Davon ausgehend wurde auf CD4 versus CD8, CD4 oder CD8 versus IL17, CD4 oder CD8 versus FoxP3 oder CD4 versus CD195 gegatet. Weitere Charakterisierungen der Zellpopulation hinsichtlich Aktivierung, Proliferation, naive Zellen gegenüber Gedächtniszellen oder $\alpha 4\beta 7$ -Expresion erfolgte ausgehend von den einzelnen Subpopulationen.

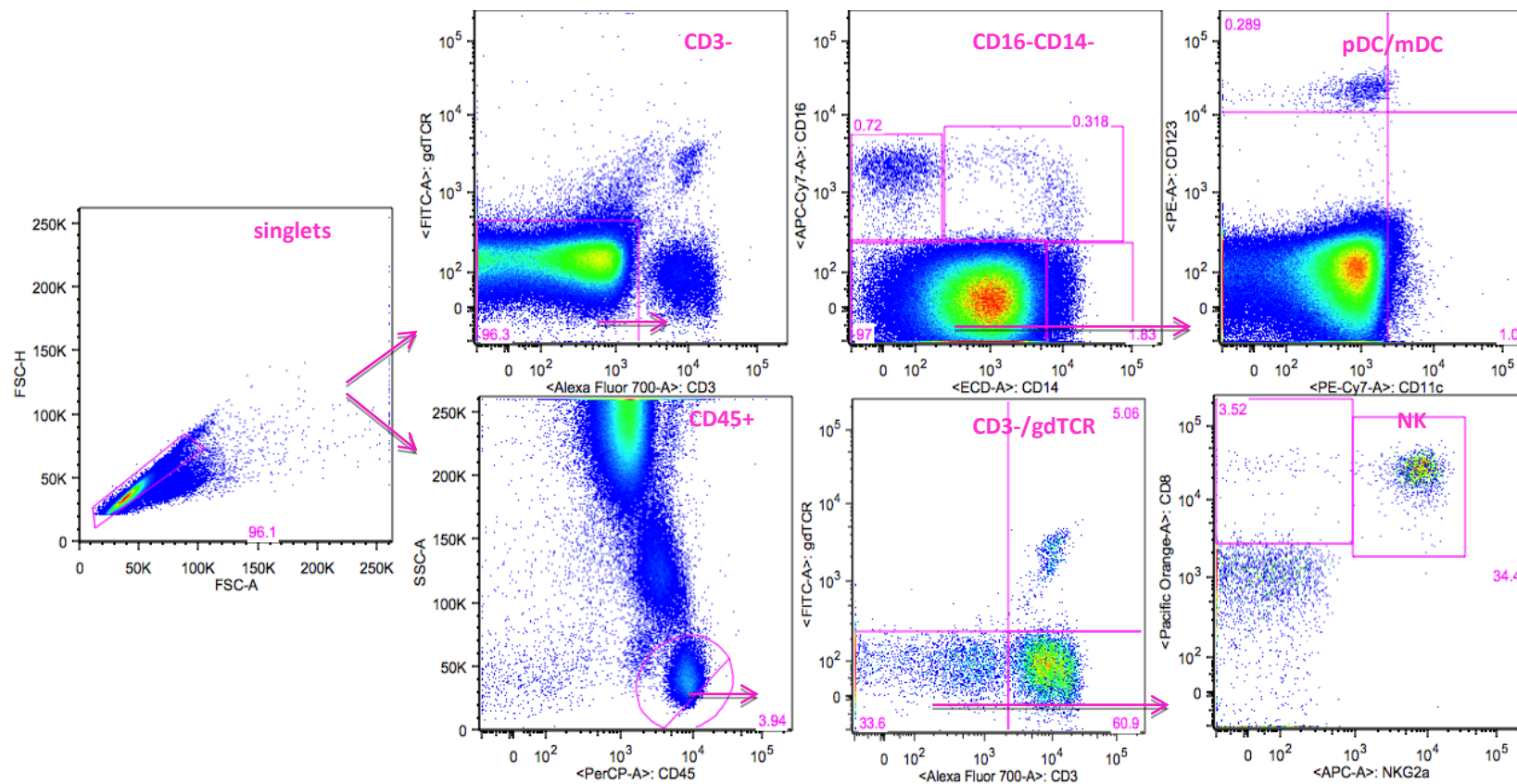


Abbildung 8: Gating-Strategie der Zellen des angeborenen Immunsystems. Dargestellt sind repräsentative Dot Plots der verschiedenen Zellpopulationen im Blut. Pinkfarbene Linien stellen ein Gate dar. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil an der vorherigen Population an. Von CD3-negativen Zellen ausgehend wurde die Expression von CD16 und CD14 analysiert. Von der CD16⁻ CD14⁻ Population wurde CD123 versus CD11c analysiert. Lymphozyten wurden über die Expression von CD45 und einem niedrigen SSC-Signal identifiziert. $\gamma\delta$ -Zellen wurden über die Expression von CD3 und $\gamma\delta$ -TCR identifiziert. Von CD3-negativen Zellen ausgehend wurde die Expression von NKG2a analysiert und die Population der NK-Zellen definiert.

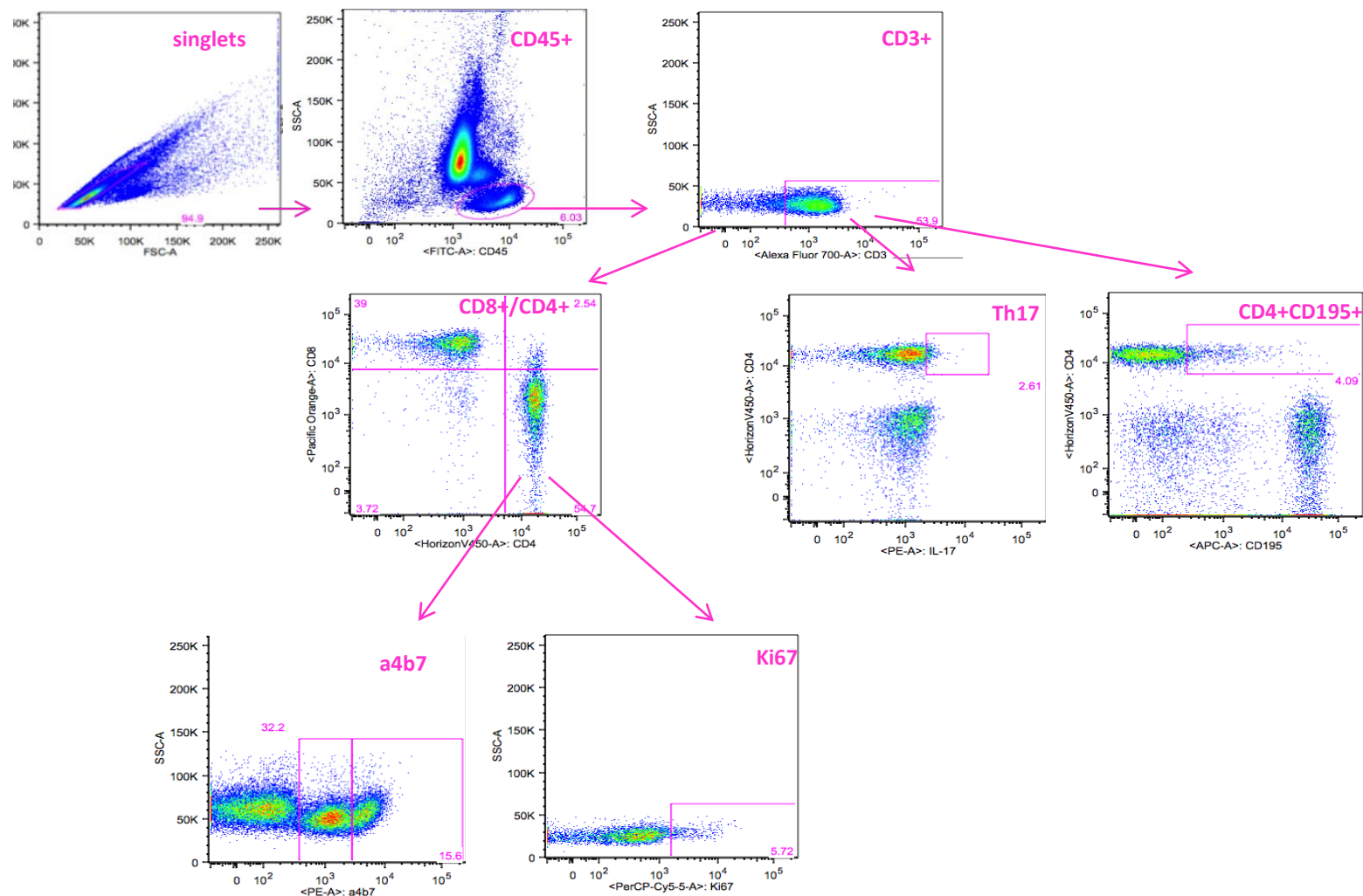


Abbildung 9: Gating-Strategie der Zellen des adaptiven Immunsystems. Dargestellt sind repräsentative Dot Plots der verschiedenen Zellpopulationen im Blut. Pinkfarbige Linien stellen ein Gate dar. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil an der vorherigen Population an. Lymphozyten wurden über die Expression von CD45 und einem niedrigen SSC-Signal identifiziert. T-Zellen wurden über die Expression von CD3 identifiziert und davon ausgehend hinsichtlich der Expression von CD4, CD8 oder CD4 versus IL-17 oder CD195. Ausgehend von CD4⁺ T-Zellen wurde die Expression von Ki67 oder α4β7 analysiert.

4.5 Auflistung der verwendeten Antikörper und Antikörperkombinationen in den verschiedenen Tubes

Tabelle 4: Verwendete Antikörper zur Färbung von Zellen der angeborenen Immunantwort

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
$\gamma\delta$ TCR	5A6.E9	FITC	Caltag Laboratories
CD123	6H6	PE	BioLegend
CD14	RMO52	ECD	Beckman Coulter
CD45	TÜ116	PerCP	Becton Dickinson
CD11c	3.9	PE-Cy7	BioLegend
CD159a	Z199	APC	Beckman Coulter
CD3	SP34-2	AF700	Becton Dickinson
CD16	3G8	APC-Cy7	Becton Dickinson
CD8	3B5	PO	Invitrogen

Tabelle 5: Verwendete Antikörper zur Färbung von Zellen der adaptiven Immunantwort

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
CD45	MB4-6D6	FITC	Miltenyi Biotec
IL-17A	Bio64CAP17	PE	eBioscience
CD69	TP1.55.3	ECD	Beckman Coulter
Ki67	B56	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson
iNKT	6B11	PE-Cy7	BioLegend
FoxP3	206D	AF647	BioLegend
CD3	SP34-2	AF700	Becton Dickinson
HLA-DR	L243	APC-Cy7	BioLegend
CD4	L200	V450	Becton Dickinson
CD8	3B5	PO	Invitrogen

Tabelle 6: Verwendete Antikörper zur Färbung und Charakterisierung von CD4⁺CD195⁺ T-Zellen

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
CD28	CD28.2	FITC	Becton Dickinson
Ki67	SC-23900	PE	SantaCruz Biotech
CD69	TP1.55.3	ECD	Beckman Coulter
CD8	RPA-T8	PerCP-Cy5.5	BioLegend
CD95	Dx2	PE-Cy7	BioLegend
CD195	3A9	APC	Becton Dickinson
CD3	SP34-2	AF700	Becton Dickinson
HLA-DR	L243	APC-Cy7	BioLegend
CD4	L200	V450	Becton Dickinson
CD45	D058-1283	V500	Becton Dickinson

Tabelle 7: Verwendete Antikörper zur Färbung von α 4 β 7 auf Zellen der angeborenen Immunantwort

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
$\gamma\delta$ TCR	5A6.E9	FITC	Caltag Laboratories
a4b7	recombinant	PE	NIH nonhuman primate reagent resource
CD123	7G3	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson
CD11c	3.9	PE-Cy7	BioLegend
CD159a	Z199	APC	Beckman Coulter
CD3	SP34-2	AF700	Becton Dickinson
CD8	SK1	APC-Cy7	BioLegend
CD45	D058-1283	V500	Becton Dickinson

Tabelle 8: Verwendete Antikörper zur Färbung von $\alpha 4\beta 7$ auf Zellen der adaptiven Immunantwort

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
CD95	Dx2	FITC	BioLegend
a4b7	recombinant	PE	NIH nonhuman primate reagent resource
CD4	OKT4	PerCP-Cy5.5	BioLegend
iNKT	6B11	PE-Cy7	BioLegend
CD8	RPA-T8	APC	BioLegend
CD3	SP34-2	AF700	Becton Dickinson
CD25	M-A251	APC-Cy7	BioLegend
CD45	D058-1283	V500	Becton Dickinson

Tabelle 9: Verwendete Antikörper zur Färbung von $\alpha 4\beta 7$ und CD195⁺ auf Zellen der adaptiven Immunantwort

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
CD95	Dx2	FITC	BioLegend
a4b7	recombinant	PE	NIH nonhuman primate reagent resource
Ki67	OKT4	PerCP-Cy5.5	BioLegend
iNKTs	6B11	PE-Cy7	BioLegend
CD195	3A9	APC	Becton Dickinson
CD3	SP34-2	AF700	Becton Dickinson
CD8	SK1	APC-Cy7	BioLegend
CD45	D058-1283	V500	Becton Dickinson
CD4	LK200	V450	Becton Dickinson

AF 700, Alexa Fluor 700; AF647, Alexa Fluor 647; APC, Allophycocyanin; APC-Cy7, Allophycocyanin-Cyanin7 ECD, Energy Coupled Dye; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PE-Cy7; Phycoerythrin-Cyanin7; PerCP, Peridinin-chlorophyll-protein; PerCP-Cy5.5, Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanin5.5; PO, Pacific Orange; V500, Horizon V500; V450, Horizon v450

5. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

5.1 Anfertigung der Schnitte

Nach der Entnahme wurden die für histologische und immunhistochemische Untersuchungen vorgesehenen Colonbiopsien in frisch angesetztes neutral gepuffertes 4 %iges FA gegeben, mindestens 24 Stunden fixiert und danach in Einbettkassetten gelegt. In jeder Kassette wurden 5 bis 7 Biopsien platziert. Zur Einbettung wurde der Einbettautomat Shandon Excelsior ES (Fa. Thermo Fisher Scientific, Dreieich) benutzt. Zunächst wurden die Proben mit Paraffin ausgegossen (Ausgießstation EC 350-1, Fa. Thermo Fisher Scientific, Dreieich) und in Stahlblechformen gelegt. Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden aus den Formen entfernt und auf Eis gestellt. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (HM 440 E Fa. Microm, Walldorf) wurden Schnitte von 3 bis 5 µm Dicke angefertigt. Diese wurden erst in ein auf 40°C erwärmtes Wasserbad gelegt, um sie faltenfrei auf Objektträger zu überführen. Für die immunhistochemische Färbung wurden silanisierte Superfrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Fa. Menzel, Braunschweig) benutzt. Für die Hämatoxylin-Eosin und Masson-Goldner-Färbung wurden Standardobjektträger eingesetzt. Die Schnitte wurden mindestens zwei Stunden im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Alle Schnitte, die in dieser Arbeit benutzt wurden, wurden von den technischen Assistenten der Abteilung Infektionspathologie des DPZ angefertigt.

5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Proben wurden mit Hilfe des Färbeautomaten Varistain Gemini (Fa. Thermo Fisher Scientific, Dreieich) gefärbt (s. Protokoll im Anhang). Die Schnitte wurden entparaffiniert und rehydriert. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer und die Gegenfärbung mit Eosin. Abschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

5.3 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Masson-Goldner-Färbung für Elastika wurde manuell durchgeführt (s. Protokoll im Anhang). Nach Dehydrierung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin nach Weigert gefärbt und anschließend gewässert. Daraufhin erfolgte die Färbung mit Azophloxin, Phosphormolybdänsäure-Orange und Lichtgrün. Final wurden sie noch durch Ethanol und Xylol geführt und eingedeckt.

5.4 Immunhistochemische Analysen

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden im Immunfärbeautomaten Discovery XT (Fa. Roche, Mannheim) durchgeführt. Durch die Formalinfixierung wurde die räumliche Struktur der Epitope verändert, weshalb eine Epitop-Demaskierung erforderlich war. Diese erfolgte durch Erhitzen in Kombination mit der Applikation von EDTA- oder Zitrat-Puffer. Ein Streptavidin-Biotin (engl. *Strept-Avidin-Biotin Complex, SABC*) Kit (Fa. Roche, Mannheim,) wurde zur Durchführung der Reaktion benutzt. Zur Sichtbarmachung des Signales kam das Chromogen Diaminobenzidin (DAB, Fa. Roche, Mannheim) zum Einsatz. Die Antikörper wurden bezüglich der Vorbehandlung und Verdünnung bis zum optimalen Ergebnis ausgetestet. Die primären Antikörper sind in Tabelle 10 aufgelistet, und das Protokoll befindet sich im Anhang.

In jeder Färbeserie lief ein Schnittpräparat als negative Kontrolle mit. Dies wurde so wie die anderen Schnitte behandelt, außer dass die Applikation des primären Antikörpers entfiel. Bei den Antikörpern KK75 und AG3.0 lief zusätzlich Gewebe von SIV-negativen Rhesusaffen mit Applikation des primären Antikörpers als Negativkontrolle mit. Als Positivkontrolle wurden Schnitte benutzt, in denen ein positives Signal bekannt war.

Tabelle 10: Auflistung der Primärantikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Herkunft
KK75	SIV-Nef-Protein mouse monoclonal	1:100	NIBSC
AG3.0	HIV-1 p24 mouse monoclonal	1:100	RKI
Mx1	M143 mouse monoclonal	1:100	Uni Freiburg
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E)	rabbit monoclonal	1:200	Cell signaling
Lipopolysaccharide core	clone WN1 222-5 mouse monoclonal	1:50	Hycult biotech
IL-17 ab79056	rabbit polyclonal	1:400	Abcam
FoxP3 ab20034	clone 236A/E7 mouse monoclonal	1:100	Abcam
GPCR GPR15 C-terminal ab150607	SIV coreceptor rabbit polyclonal	1:100	Abcam
Claudin-3 RB-9251-R7	transmembrane protein rabbit polyclonal	ready-to-use	Thermo scientific
Ki67	clone MIB-1 mouse monoclonal	1:50	Dako
CD4	clone 1F6 mouse monoclonal	1:20	Leica biosystems
Caspase-1 (ab1872)	polyclonal	diverse getestet keine Kreuzreaktivität	Cell signaling abcam

5.5 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Die gefärbten Schnitte wurden eingescannt und elektronisch ausgewertet. Zum Einscannen der Schnitte wurde das Aperio Scan Scope CS2 (Fa. Leica Biosystems, Nussloch) benutzt. Die Schnitte wurden in hoher Vergrößerung eingescannt (400x), um eine gute Bildqualität zu gewährleisten. Die Daten wurden elektronisch gespeichert und mit dem Programm eSlide Manager verwaltet. Zur Auswertung wurde das Programm Aperio ImageScope Version 12.3.2.5030 angewendet. Mit Hilfe der elektronischen Werkzeuge (engl. *tools*) wurden die auszuwertenden Bereiche so abgegrenzt, dass Artefakte oder andere störende Partikel (z. B. Darminhalt)

ausgeschlossen werden konnten. Zur Auswertung des gefärbten Gewebes wurden Messverfahren (Algorithmen) angewendet, die von Aperio Image scope vorgegebenen wurden. Es wurden die Algorithmen „positive pixel count“ und „nuclear“ verwendet. Die Ergebnisse wurden in Form einer Excel-Tabelle berechnet. Bei großflächiger Färbung wurde der Algorithmus „Positiv Pixel Count“ benutzt: Dieses Messverfahren errechnete die positiven Pixel zu den gesamten Pixel, die in der Abbildung des Gewebes vorhanden sind. Das Ergebnis wurde mit 100 multipliziert und entsprach der Prozentzahl der gefärbten Fläche des Gewebes. Im Falle nur einzelner Zellsignale im Gewebe wurde wiederum der Algorithmus „nuclear“ angewendet, der die Prozentzahl der gefärbten Zellen errechnete. Aus der Tabelle 11 ist ersichtlich, welcher Algorithmus bei den diversen Färbungen benutzt wurde.

Tabelle 11: Auflistung der benutzten Algorithmen

Mx1	positive pixel count	% gefärbter Fläche
Lipopolysaccharide core	positive pixel count	% gefärbter Fläche
IL-17 ab79056	nuclear	% gefärbter Zellen
FoxP3 ab20034	nuclear	% gefärbter Zellen
GPR15 ab150607	nuclear	% gefärbter Zellen
Ki67	positive pixel count	% gefärbter Fläche
CD4	positive pixel count	% gefärbter Fläche

6. Grafiken und statistische Auswertung

Die Erstellung der Grafiken und die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.01 durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit dem Standardfehler um den Mittelwert (engl. *standard error of the mean, SEM*) dargestellt. Zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden bei nicht normalverteilten Daten wurden der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test, der Kruskal-Wallis-Test und der Dunn's Test eingesetzt. Für Korrelationsanalysen wurde die Spearman-Rang-Korrelation genutzt. Testergebnisse, die ein Signifikanzniveau (p -Wert) kleiner als 0,05 hatten, wurden als signifikant betrachtet.

IV. Ergebnisse

1. Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in Blut, Colon und BAL bei SIV-negativen Rhesusaffen

Um die Veränderungen in den diversen Zellpopulationen bei SIV-infizierten Rhesusaffen zu bestimmen, mussten Basiswerte von nicht infizierten Tieren erstellt werden. Da bei dieser Arbeit das Interesse in der Charakterisierung sowohl von Zellen der angeborenen Immunität als auch von verschiedenen T-Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems lag, wurden zunächst Blut, Colonbiopsien und BAL von nicht infizierten Tieren untersucht. Für den Bereich des angeborenen Immunsystems wurden die prozentualen Anteile von Monozyten, atypischen Monozyten, Makrophagen, $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen, mDCs und pDCs bestimmt.

Für das adaptive Immunsystem wurden die prozentualen Anteile von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an den CD3⁺ T-Zellen analysiert. Außerdem wurde der Anteil von iNKTs an Lymphozyten sowie der Anteil von IL-17 produzierenden Zellen und FoxP3 exprimierenden Zellen an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht. Zudem wurden die Prozentsätze der naiven, zentralen und Effektor T-Gedächtniszellen von CD3⁺ Zellen bestimmt. Die Prozentzahl der CD4⁺ T-Zellen, die den SIV-Korezeptor CCR5 (CD195) an ihrer Oberfläche exprimieren und als eine der primären Zielzellen von HIV und SIV fungieren, wurde ebenfalls analysiert. Darüber hinaus wurde die Expression des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins auf diversen Immunzellen untersucht.

1.1 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des angeborenen Immunsystems

Der Anteil an den Vorläuferzellen der Makrophagen, den Monozyten ($CD14^+CD16^-$), war im Blut signifikant höher als im Colon und in der BAL (Abb. 10a). Im Gegensatz dazu akkumulierten Makrophagen ($CD14^+CD16^+$) im Colon (Abb. 10b), während ihr Anteil im Blut und in der BAL geringer war. Hingegen waren die Spiegel an atypischen Makrophagen ($CD14^+CD16^+$) im Colon signifikant niedriger im Vergleich zu den anderen beiden Organen (Abb. 10c). $\gamma\delta$ T-Zellen (gd^+CD3^+) und NK-Zellen ($CD8^+NKG2a^+CD3^-$) befanden sich in höherem Anteil im Blut, das gleiche traf auf mDCs ($CD11^+CD123^-$) und pDCs ($CD11^-CD123^+$) zu (Abb. 10d-g).

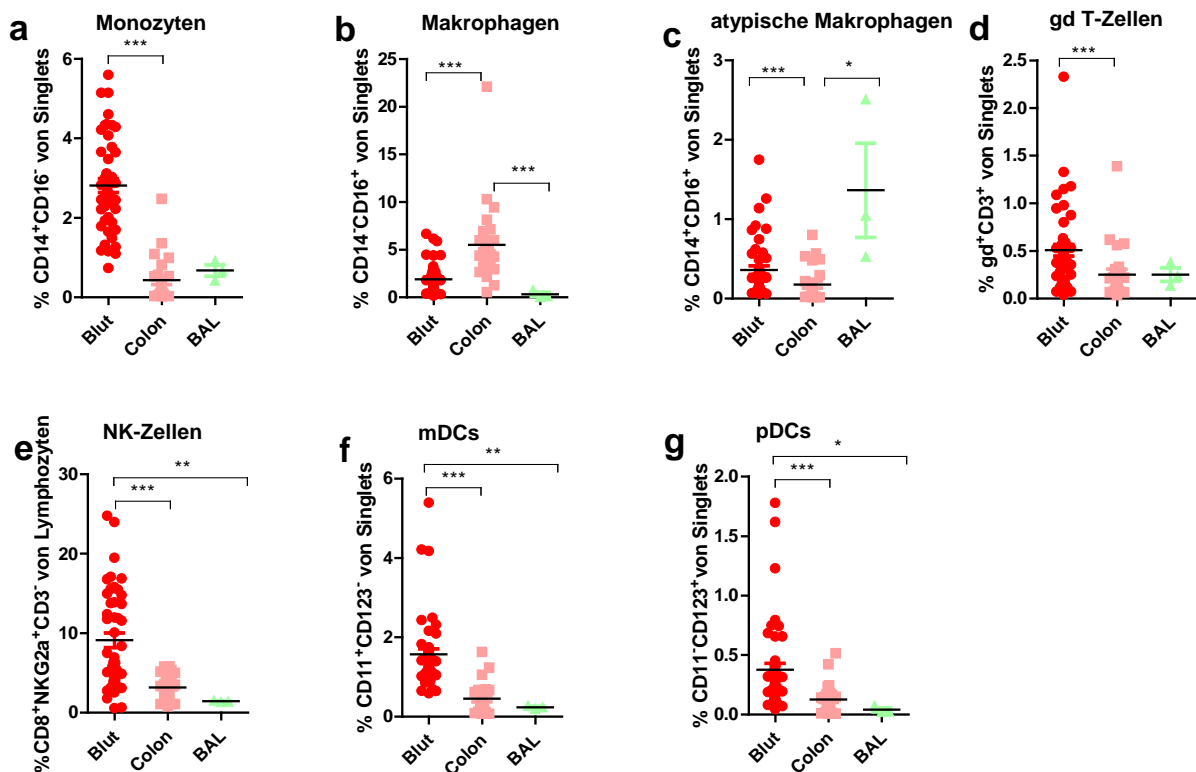


Abbildung 10: Relativer Anteil verschiedener Zellen des angeborenen Immunsystems. Prozentualer Anteil von a) Monozyten, b) Makrophagen, c) atypischen Makrophagen, d) gd^+ T-Zellen, e) NK-Zellen, f) mDCs, g) pDCs an Lymphozyten oder Singlets in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Die Sterne und Querbalken in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten an (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

1.2 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des adaptiven Immunsystems

1.2.1 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ und CD4⁺CD8⁻

Alle T-Zellen tragen das CD3-Antigen auf ihrer Zelloberfläche; die zwei wichtigsten Untergruppen sind die T-Helferzellen (CD4⁺) und die zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺). Der prozentuale Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an den CD3⁺ T-Lymphozyten unterschied sich signifikant in den verschiedenen Kompartimenten. So war der Anteil an CD4⁺ T-Zellen im Blut signifikant höher als in den übrigen beiden Organen (Abb. 11a). Umgekehrt war der Prozentsatz von CD8⁺ T-Zellen in den mukosalen Geweben deutlich höher (Abb. 11b). Ebenfalls waren CD4⁺CD8⁺ als auch CD4⁺CD8⁻ T-Lymphozyten in der Mukosa erhöht (Abb. 11c und d).

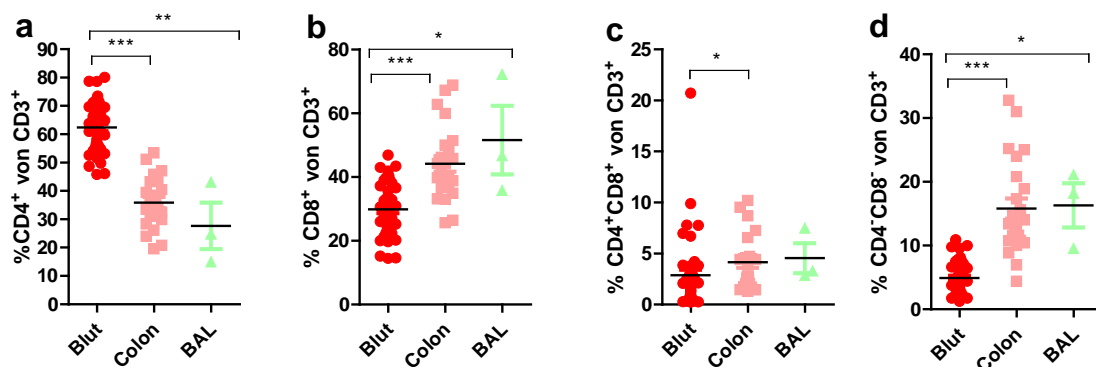


Abbildung 11: Prozentualer Anteil an CD4 und CD8 T-Zellpopulationen. Prozentualer Anteil von a) CD4⁺, b) CD8⁺, c) CD4⁺CD8⁺ und d) CD4⁺CD8⁻ an CD3⁺ T-Lymphozyten in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Die Sterne und Querbalken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001).

1.2.2 Naive und CD4⁺ T-Gedächtniszellen

Zunächst wurden die CD4⁺ T-Zellen anhand der Expression der CD28- und CD95-Oberflächenmarker untersucht. So wurden CD95⁻CD28⁺ als naive, CD95⁺CD28⁺ als zentrale (engl. *central memory*, T_{CM}) und CD95⁺CD28⁻ als Effektor (engl. *effector memory*, T_{EM}) CD4⁺ T-Gedächtniszellen definiert. Der Anteil an undifferenzierten naiven CD4⁺T-Zellen war im Blut signifikant höher als im Colon und in der BAL, in letzter kaum nachweisbar (Abb. 12a). Im Gegensatz dazu war der Anteil der zentralen CD4⁺ T-Gedächtniszellen in allen untersuchten Kompartimenten sehr

ähnlich (Abb. 12b), während der Anteil an Effektor T-Gedächtniszellen in der BAL am höchsten war (Abb. 12c).

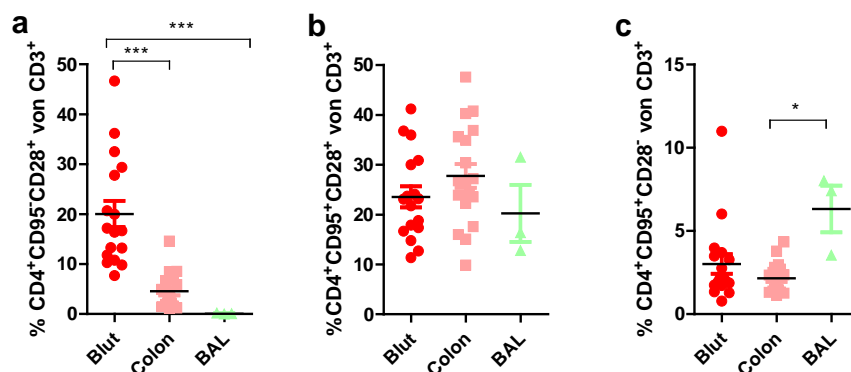


Abbildung 12: Prozentualer Anteil von naiven und CD4⁺ T-Gedächtniszellen. Prozentualer Anteil von a) naiven, b) T_{CM} und c) T_{EM} CD4⁺ T-Gedächtniszellen an CD3⁺ Lymphozyten in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Die Sterne und Querbalken in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05, ***p<0,001).

1.2.3 Th17, CD4⁺Tregs, Tc17 und CD8⁺Tregs

Sowohl Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems besitzen die Fähigkeit, IL-17 zu produzieren. IL-17 produzierende T-Helferzellen (CD4⁺IL17⁺, Th17) und zytotoxische T-Lymphozyten (CD8⁺IL17⁺, Tc17) wiesen einen höheren Anteil im Colon und in der BAL auf (Abb. 13a und b). Zellen, die das forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) exprimieren, werden als regulatorische Zellen bezeichnet. Ein hoher Anteil an CD4⁺ regulatorischen T-Zellen wurde im Colon beobachtet (Abb. 13c). Im Gegensatz dazu war der Anteil der regulatorischen CD8⁺ T-Zellen im Colon signifikant geringer als in den anderen beiden Organen (Abb. 13d).

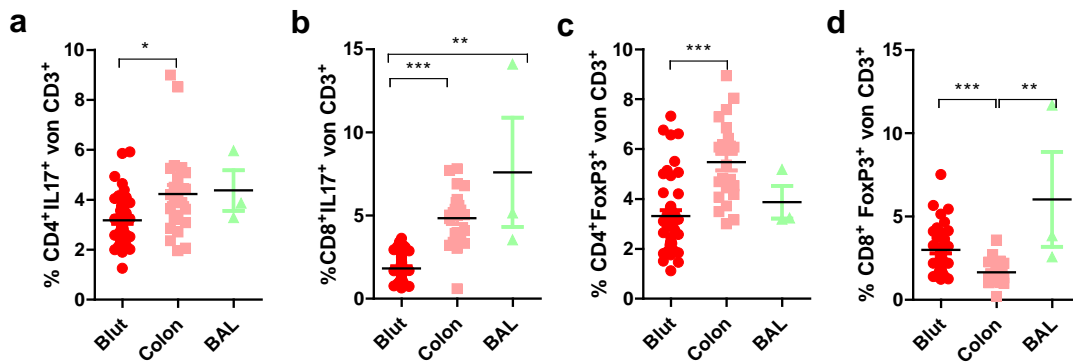


Abbildung 13: Prozentualer Anteil von IL-17-produzierenden und regulatorischen T-Zellen
 Prozentualer Anteil von a) Th17 (CD4⁺IL17⁺), b) Tc17 (CD8⁺IL17⁺), c) CD4⁺Tregs (CD4⁺FoxP3⁺), und d) CD8⁺Tregs (CD8⁺FoxP3⁺), an CD3⁺ T-Lymphozyten in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Die Sterne und Querbalken in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001).

1.2.4 iNKTs, IL17⁺iNKTs, FoxP3⁺iNKTs, CD4⁺iNKTs

iNKTs besitzen den T-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche und werden als Brücke zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem betrachtet. Sie können CD4 und FoxP3 exprimieren und IL-17 produzieren. Der höchste Anteil an iNKTs (Abb. 14a) und auch an deren Subpopulationen (Abb. 14b-d) war im Colon zu beobachten, und die Prozentsätze waren durchgehend signifikant höher im Vergleich zum Blut. Die Prozentsätze in der BAL bewegten sich bis auf die Subpopulation der CD4⁺iNKTs (Abb. 14d) zwischen denen von Blut und Colon.

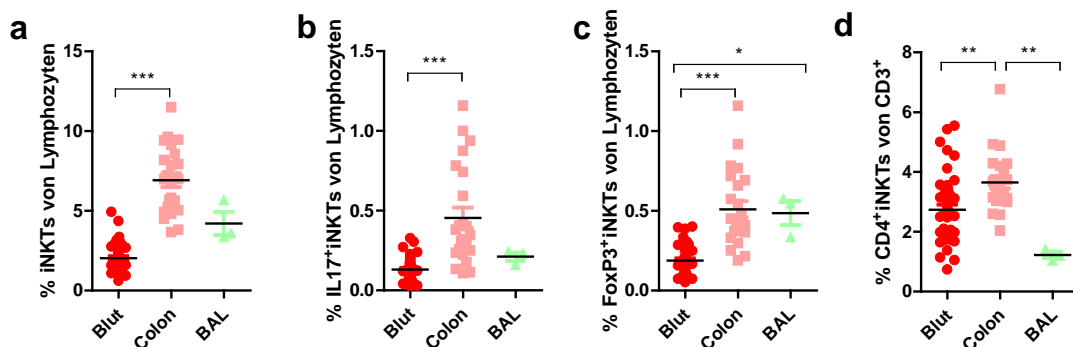


Abbildung 14: Prozentualer Anteil von iNKTs und deren Subpopulationen. Prozentualer Anteil von a) iNKTs ,b) IL17⁺iNKTs, c) FoxP3⁺iNKTs an Lymphozyten und d) CD4⁺iNKTs an CD3⁺ T-Lymphozyten in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Die Sterne und Querbalken in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001).

1.3 Expression des CCR5 Korezeptors (CD195) auf T-Helferzellen

Um eine Zelle mit HIV/SIV zu infizieren, ist der Korezeptor CCR5 (CD195) essentiell. Sowohl CD4⁺ T-Helferzellen als auch CD4⁺ T-Gedächtniszellen können den Korezeptor exprimieren. Der Anteil der CD4⁺CD195⁺ T-Zellen war in beiden untersuchten mukosalen Kompartimenten erhöht, insbesondere in der BAL (Abb. 15a). Hingegen war der Anteil der zentralen CD4⁺CD195⁺ T-Gedächtniszellen im Blut deutlich höher (Abb. 15b). Die Prozentzahl der Effektor CD4⁺CD195⁺ T-Gedächtniszellen war im Colon sehr gering und konnte nicht bestimmt werden.

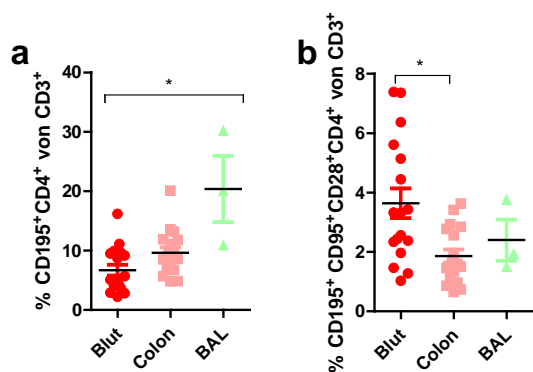


Abbildung 15: Prozentualer Anteil an CD195⁺CD4⁺ und CD195⁺CD28⁺CD95⁺CD4⁺ T-Zellen. Prozentualer Anteil von a) CD195⁺ CD4⁺ und b) CD195⁺CD28⁺CD95⁺ CD4⁺ an CD3⁺ Lymphozyten in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Die Sterne und Querbalken in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05).

1.4 Expression des α 4 β 7-Integrins auf Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems in Blut und Colon

Das α 4 β 7-Integrin ist entscheidend für die Umverteilung von Immunzellen aus der Blutzirkulation in den Darm (engl. *homing*). Die Prozentzahlen sowohl angeborener als auch adaptiver Immunzellen, die das Integrin an ihrer Oberfläche exprimieren, wurden in Blut und Colon durchflusszytometrisch bestimmt. Bei allen untersuchten Zellpopulationen war der Anteil an α 4 β 7-exprimierenden Zellen des angeborenen Immunsystems im Colon signifikant höher als im Blut (Abb. 16). Die Anzahl von α 4 β 7-positiven pDCs war sehr gering und konnte nicht bestimmt werden.

Des Weiteren wurde die Expression des α 4 β 7-Integrins auf den Zellen des adaptiven Immunsystems untersucht. Der Prozentsatz der α 4 β 7-exprimierenden Lymphozyten (CD45⁺), T-Zellen (CD3⁺) und zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) war im Darm signifikant

höher als im Blut (Abb. 17a-c), während sich bei T-Helferzellen ($CD4^+$), $CD4^+$ T-Gedächtniszellen ($CD4^+CD95^+$) und iNKTs das Verhältnis umkehrte (Abb. 17d-f).

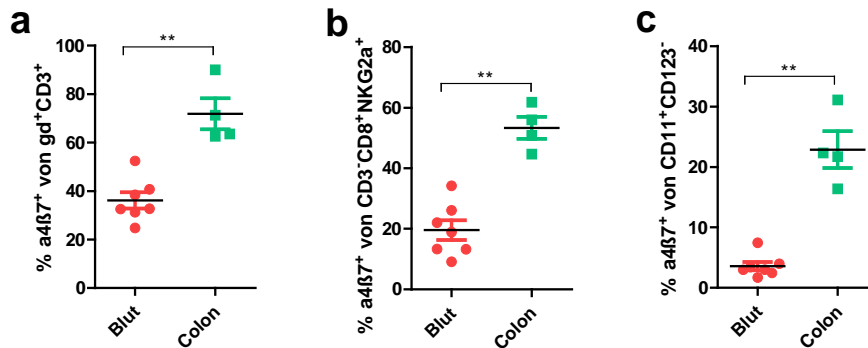


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der Expression des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins auf Zellen des angeborenen Immunsystems. Prozentualer Anteil von $\alpha 4\beta 7^+$ Zellen an a) $\gamma\delta$ T-Zellen b) NK-Zellen, c) mDCs in Blut und Colon. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Die Sterne und Querbalken in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten (Mann-Whitney-Test, ** $p < 0,01$).

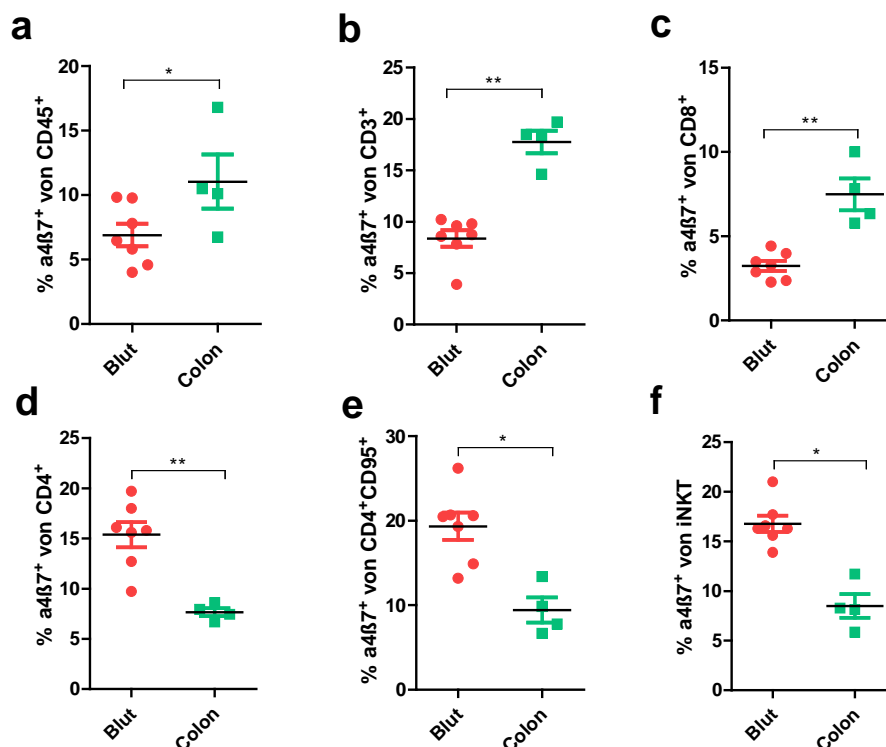


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der Expression des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins auf Zellen des adaptiven Immunsystems Prozentualer Anteil von $\alpha 4\beta 7^+$ Zellen an a) $CD45^+$, b) $CD3^+$, c) $CD8^+$, d) $CD4^+$, e) $CD4^+CD95^+$ und f) iNKT in Blut und Colon. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Die Sterne und Querbalken in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten (Mann-Whitney-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

2. Virusbeladung

2.1 Klassifizierung der SIV-infizierten Rhesusaffen in Elite Controller, virämische Controller, failing Controller und Progressoren anhand der Viruslast im Plasma

SIV-infizierte Rhesusaffen entwickeln üblicherweise innerhalb von sechs Monaten bis zu zwei Jahren nach der Infektion AIDS-assoziierte Symptome und werden aufgrund von Abbruchkriterien mit fortschreitender Verschlechterung des Gesundheitszustandes aus dem Versuch genommen. Einige Tiere sind in der Lage die Infektion zu kontrollieren und weisen für Jahre nach der Infektion keine klinischen Symptome auf. Diese Tiere werden als Langzeitüberlebende (engl. *long-term non-progressors*, LTNPs) bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden diejenigen Tiere als LTNPs definiert, die länger als 260 Wochen mit SIV infiziert waren und keine AIDS-ähnlichen Symptome aufwiesen (bis auf LTNP 13906, der 213 wpi euthanasiert wurde).

Nach der Spitzenvirämie, die gewöhnlich zwei Wochen nach Infektion zu beobachten war, pendelte sich die Viruslast im Blut auf unterschiedliche Niveaus ein. Interessanterweise waren bei den Langzeit-infizierten Tieren unterschiedliche Viruslasten im Blut zu beobachten, sodass die Gruppe der LTNPs in drei Untergruppen aufgeteilt wurde. Als Elite Controller (**EC**) wurden die Tiere bezeichnet, bei denen die Viruslasten meist unter 10^2 viralen Kopien/ml Plasma lagen (Abb. 18a). Die virämischen Controller (**VC**) wiesen konstant eine moderate Virusbeladung im Blut im Bereich zwischen 10^2 und 10^4 viralen Kopien/ml Plasma (Abb. 18b) auf. Als failing Controller (**FC**) wurden die Tiere bezeichnet, die nach einer längeren Zeit effektiver Kontrolle der Virusreplikation ansteigende und hohe Viruslasten im Blut aufwiesen (10^4 - 10^7 Kopien/ml Plasma, Abb. 18c). Parallel dazu untersuchte Progressoren (**Prog**) wiesen nach der Spitzenvirämie kontinuierlich hohe Viruslasten im Blut von über 10^4 viralen Kopien/ml Plasma auf (Abb. 18d).

Zu Beginn der Untersuchungen standen 19 LTNPs mit folgender Klassifizierung zur Verfügung: acht EC, neun VC und zwei FC. Bei den LTNPs 13906 und 9794 liegen nur die Viruslasten vor, da sie vor oder zu Beginn der Arbeit euthanasiert wurden. Im Laufe der Studie mussten verschiedene Tiere reklassifiziert werden, da der

Controllerstatus eine dynamische Situation repräsentiert. Zusätzlich wurden neun Progressoren untersucht, die ca. in der Mitte der Arbeit euthanasiert wurden und nicht für alle Analysen zu Verfügung standen.

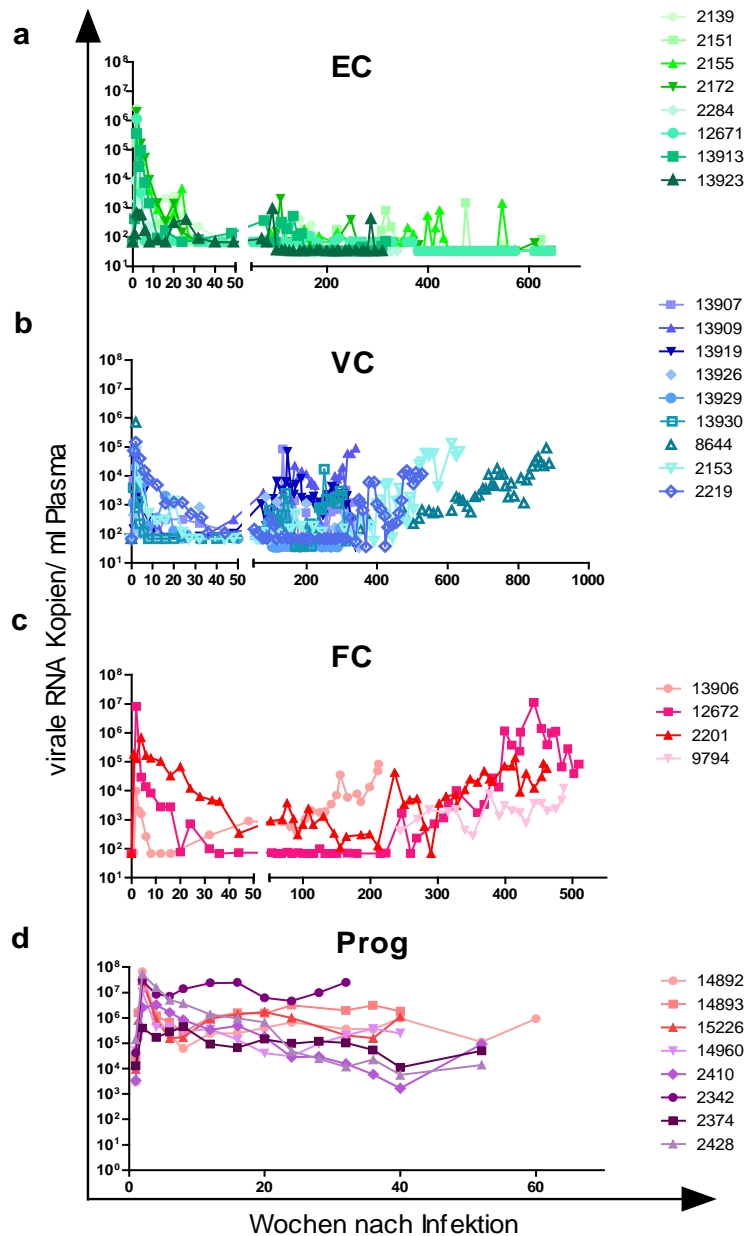


Abbildung 18: RNA-Viruslast im Blut von EC, VC, FC und Progressoren im Infektionsverlauf. Dargestellt ist die Viruslast als RNA Kopien/ml Plasma in den Wochen nach der Belastungsinfektion in a) EC, b) VC, c) FC und d) Progressoren (für das Tier 8644 sind keine Daten von der akuten Phase der Infektion verfügbar außer der Spitzenvirämie). EC weisen eine niedrige, VC eine mittlere und FC und Progressoren eine hohe Viruslast im Blut auf. EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

2.2 Viruslast im Colon von LTNPs und Progressoren

Da sich im Darm die größte Anzahl an Immunzellen befindet und die Replikation des Virus vor allem dort stattfindet, sollte im Rahmen einer Querschnittsanalyse untersucht werden, ob sich der fehlende Virusnachweis im Blut von EC im Darm widerspiegelte. Es wurde daher die Viruslast im Colon von EC, VC, FC und Progressoren bestimmt und mit der im Blut und zwischen den Gruppen verglichen.

Für die Extraktion der RNA von Darmbiopsien wurde kein kommerzielles Analysesystem benutzt, sondern es musste zunächst ein Protokoll etabliert werden. Die Gesamt-RNA von jeweils zwei Colonbiopsien wurde extrahiert und anschließend 250 ng RNA zur Quantifizierung eingesetzt. Die Nachweisgrenze der PCR lag bei einer viralen RNA-Kopie pro eingesetzte RNA Menge. Bei den LTNPs wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten im Abstand von 16 Wochen Colonbiopsien entnommen und der Mittelwert gebildet. Bei Tier Nr. 12672 wurde die Viruslast einmalig zum Zeitpunkt der Sektion gemessen. Bei den Progressoren (n = 5) erfolgte die Entnahme der Biopsien unmittelbar vor der Sektion.

In Abbildung 19a ist zum Vergleich die Viruslast im Blut dargestellt. Auch hier wurde der Mittelwert von zwei Entnahmen bei den LTNPs gebildet. Bei Tier Nr. 12672 und bei den Progressoren handelt es sich um die Viruslast zum Zeitpunkt der Sektion. Während im Blut die Viruslast der EC unterhalb der Nachweisgrenze lag (Abb. 19a), traf dies im Darm nur auf die Hälfte der EC zu. Bei der anderen Hälfte wurden bis zu 117 virale Kopien pro 250 ng RNA nachgewiesen (Abb. 19b). Die Viruslast in der VC-Gruppe lag zwischen 27 und $3,17 \times 10^3$ viralen Kopien pro 250 ng Gesamt-RNA (Abb. 19b). Interessanterweise war bei einem VC (Tier Nr. 13929) trotz 91 RNA Kopien im Blut (36 Kopien/ml Plasma zur einen Entnahme und 146 zur anderen) kein Virus im Darm zu finden. In der Gruppe der FC lag die Viruslast im Bereich von 10^3 Kopien (Abb. 19b). Bei den Progressoren lagen die Viruslasten im Colon zwischen $5,5 \times 10^3$ und $3,3 \times 10^4$ Kopien bis auf einen Progressor (Tier Nr. 2374) bei dem nur 18 Kopien gemessen wurden (Abb. 19b). Vergleichbar mit den Viruslasten im Blut war die Viruslast im Darm der VC-Gruppe sowie der der Progressoren signifikant höher im Vergleich zur Gruppe der EC. Dementsprechend korrelierte die Viruslast im Blut mit der Viruslast im Colon (Abb. 19c).

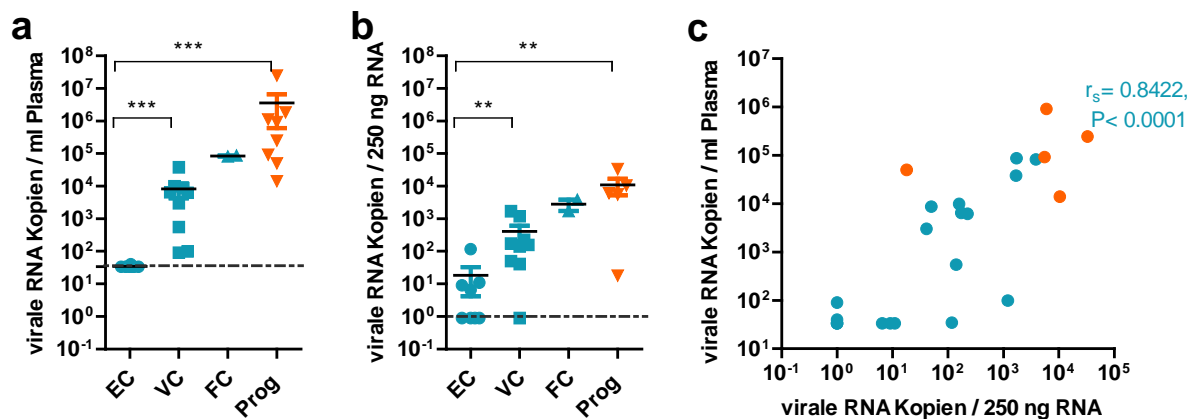


Abbildung 19: Viruslast in Blut und Colon SIV-infizierter Rhesusaffen sowie die Korrelation zwischen Viruslast in Blut und Colon. Die Werte repräsentieren den Mittelwert von zwei Analysen bei den LTNP (außer Tier Nr. 12672) und bei Progressoren und Tier Nr. 12672 die Werte zum Zeitpunkt der Sektion. Dargestellt sind virale RNA-Kopien in a) Blut (pro ml Plasma) und b) Colon (pro 250 ng Gesamt-RNA) bei den EC, VC, FC und Progressoren. Die Querstriche geben den Mittelwert der jeweiligen Gruppe an. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). c) Korrelationsanalyse zwischen viralen RNA-Kopien im Colon und der systemischen Viruslast. Die Werte der LTNP sind in blau dargestellt und die der Progressoren in orange. Die x-Achse gibt in logarithmischer Darstellung die viralen RNA-Kopien (pro 250 ng Gesamt-RNA) in zwei Colonbiopsien wieder, r_s gibt den Spearman-Korrelationskoeffizienten an. Die gestrichelten Linien geben die Nachweisgrenze für die viralen Kopien an. EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

In Abbildung 20 ist ein Vergleich der Viruslasten in Blut und Colon für jedes Tier dargestellt. Die Viruslast im Plasma der LTNP wurde routinemäßig alle acht Wochen untersucht. Die Nachweisgrenze im Blut lag bei 33,8 viralen Kopien pro ml Plasma. Auch hier sind die Mittelwerte von zwei Messungen bei den LTNP dargestellt (außer Tier Nr. 12672) und die Werte zum Zeitpunkt der Sektion bei den Progressoren.

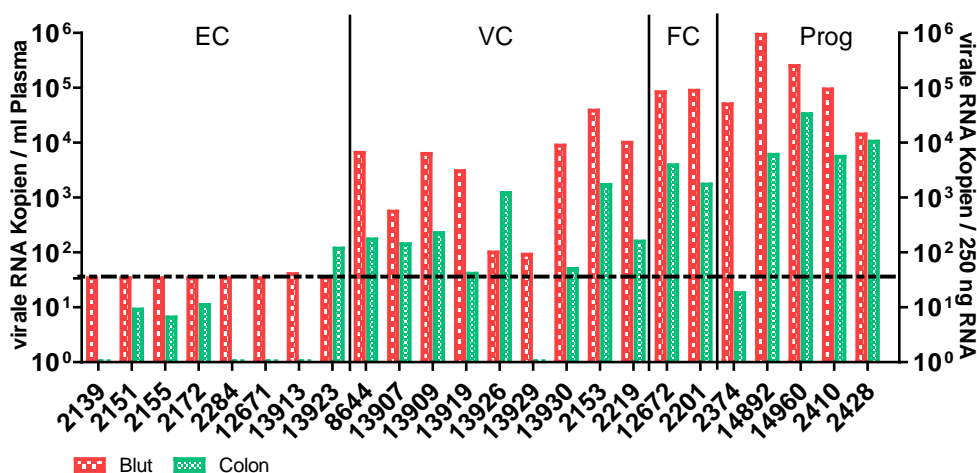


Abbildung 20: Vergleich der Viruslast in Blut und Colon SIV-infizierter Tiere. Die Werte repräsentieren den Mittelwert von zwei Analysen bei den LTNPs (außer Tier Nr. 12672) und bei Progressoren und Tier Nr. 12672 die Werte zum Zeitpunkt der Sektion. Virale RNA-Kopien in Plasma und Colon sind bei LTNPs (EC, VC, FC) und Progressoren dargestellt. Die x-Achse zeigt die Tiernummern, auf der linken y-Achse ist die Viruslast pro ml Plasma dargestellt und auf der rechten y-Achse die viralen Kopien pro 250 ng Gesamt-RNA aus dem Colon. Die gestrichelte Linie gibt die Nachweisgrenze der viralen Kopien im Blut an. EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

3. Durchflusszytometrische Charakterisierung von Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in Blut, Colon und BAL bei Langzeit-infizierten Rhesusaffen im Vergleich zu gesunden Tieren und Progressoren

Dieser Teil der vorliegenden Arbeit umfasst eine breite durchflusszytometrische Analyse diverser Zellpopulationen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in Blut, Colon und der Mukosa der oberen Atemwege der LTNPs im Vergleich zu gesunden Tieren sowie Progressoren.

Blut und Colon wurden jeweils zeitgleich, jedoch mit unterschiedlichen Färbeprotokollen entsprechend der Fragestellung (z. B. Verteilung der Zellpopulationen der angeborenen oder adaptiven Immunantwort, Expression von Aktivierungs- oder Proliferationsmarkern) untersucht. Die BAL wurde einmalig bei EC und VC durchgeführt, analysiert und mit den Daten von drei gesunden Tieren verglichen. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren die LTNPs klinisch unauffällig.

3.1 Verteilung von Zellen des angeborenen Immunsystems in Blut, Colon und BAL

Das angeborene Immunsystem wird als die erste Verteidigungslinie des Körpers betrachtet und spielt eine entscheidende Rolle in der akuten Phase von Infektionen, noch bevor das adaptive Immunsystem aktiviert wird und seine Tätigkeit aufnimmt. Wenig ist bekannt über die Rolle des angeborenen Immunsystems in der chronischen Phase der SIV-Infektion sowie in der möglichen Kontrolle der Infektion oder dem Fortschreiten der Krankheit.

Unterschiedliche Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems wurden in Blut, Colon und BAL von LTNPs, Progressoren und gesunden Tieren untersucht und verglichen. Es wurden die prozentualen Anteile von Monozyten ($CD14^+CD16^-$), Makrophagen ($CD14^+CD16^+$), NK-Zellen ($CD8^+NKG2a^+CD3^-$), mDCs ($CD11^+CD123^-$) und pDCs ($CD11^-CD123^+$) sowie $\gamma\delta$ T-Zellen (gd^+CD3^+) bestimmt. $\gamma\delta$ T-Zellen werden auch als „innate-like“ Lymphozyten bezeichnet und werden als Verbindung zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort betrachtet.

Der Anteil einzelner Zellpopulationen unterschied sich teilweise erheblich zwischen den Gruppen. Monozyten im Blut waren im Vergleich zu gesunden Tieren ausschließlich bei Progressoren signifikant erhöht (Abb. 21a), im Colon hingegen ausschließlich bei EC (Abb. 21g). Ein tendenzieller Verlust von peripheren Makrophagen und NK-Zellen wurde bei allen SIV-infizierten Tieren beobachtet (Abb. 21b und d), der sich allerdings nicht signifikant von den Spiegeln nicht infizierter Tiere unterschied. Im Colon war der Anteil an Makrophagen bei allen SIV-infizierten Tieren erhöht, in der Gruppe der EC sogar signifikant (Abb. 21h). NK-Zellen waren im Colon SIV-infizierter Tiere im Vergleich zu gesunden Tieren tendenziell vermindert, wobei in der Gruppe der VC und Progressoren jeweils ein Tier deutlich erhöhte NK-Zell-Werte aufwies (Abb. 21j). Der Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut war vergleichbar zwischen gesunden Tieren und EC sowie VC, während FC und Progressoren verminderte Prozentzahlen aufwiesen (Abb. 21c). Im Colon zeigten alle LTNP-Gruppen verminderte $\gamma\delta$ T-Zell-Prozentzahlen, während diese bei einem Teil der Progressoren erhöht waren (Abb. 21i). Ein signifikant erhöhter Anteil an mDCs im Blut wurde bei der VC-Gruppe (Abb. 21e) und im Colon bei EC und VC (Abb. 21k)

beobachtet. In den anderen Gruppen SIV-infizierter Tiere war dieser nur leicht erhöht. Ein Tier der FC zeigte im Colon einen sehr hohen Wert. pDCs waren im Blut der LTNPs leicht vermindert, im Colon hingegen einschließlich der Progressoren leicht erhöht (Abb. 21f und I), ohne jeweils einen statistisch signifikanten Unterschied zu den gesunden Tieren zu erreichen.

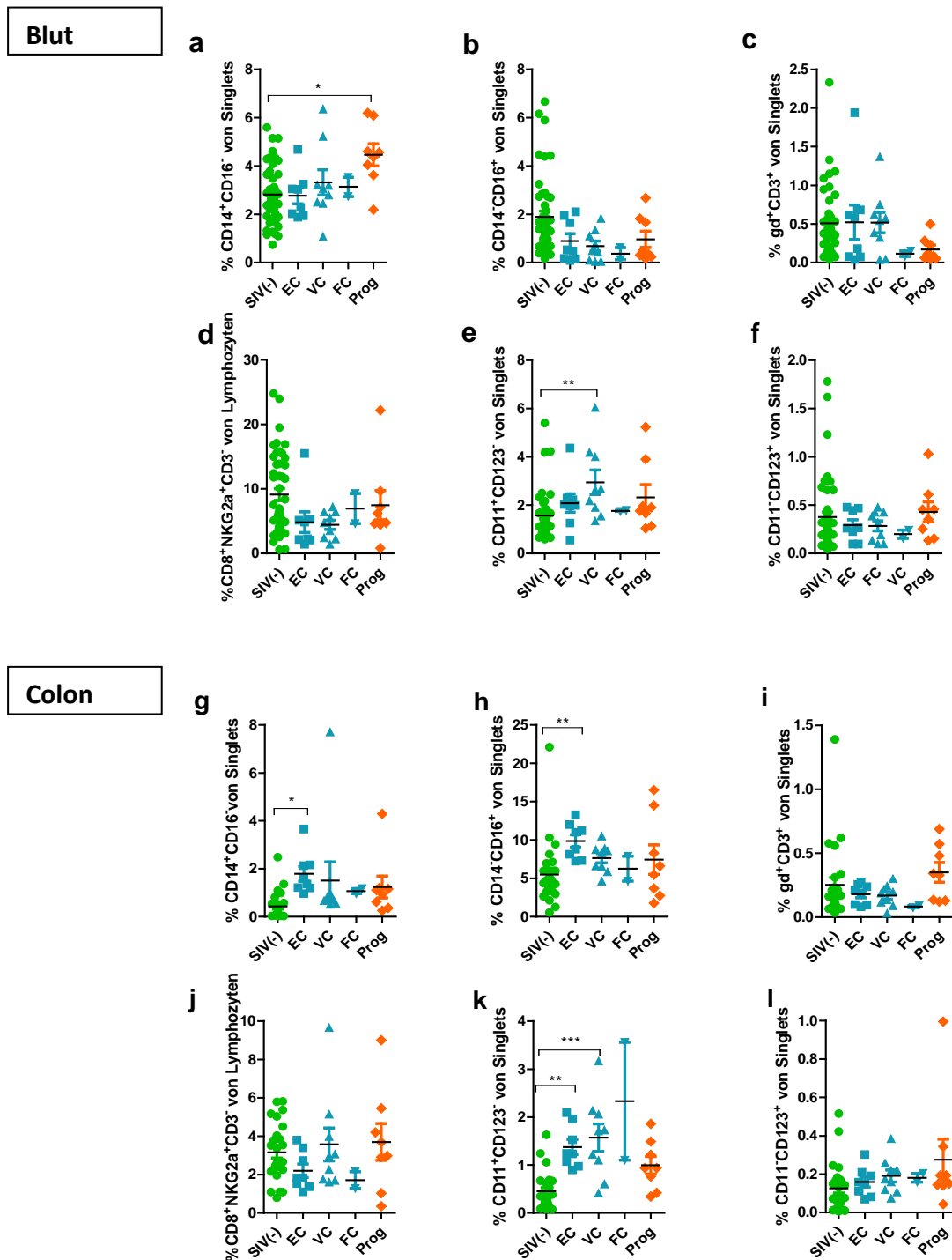


Abbildung 21: Prozentualer Anteil diverser Zellen des angeborenen Immunsystems in Blut und Colon. Dargestellt ist der Anteil an Lymphozyten oder Singlets in Blut und Colon von (a, g) Monozyten, (b, h) Makrophagen, (c, i) $\gamma\delta$ T-Zellen, (d, j) NK Zellen, (e, k) mDCs und (f, l) pDCs. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

In der BAL wurde bei beiden untersuchten LTNP-Gruppen ein erhöhter Anteil aller analysierten Zellpopulationen der angeborenen Immunantwort im Vergleich zu gesunden Tieren nachgewiesen (Abb. 22). Einzige Ausnahme bildeten die pDCs, deren Anteil in der EC-Gruppe vergleichbar mit gesunden Tieren, jedoch in der VC-Gruppe erhöht war (Abb. 22f). Der Anteil der Monozyten war hingegen bei den EC im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Gruppen signifikant erhöht (Abb. 22a)

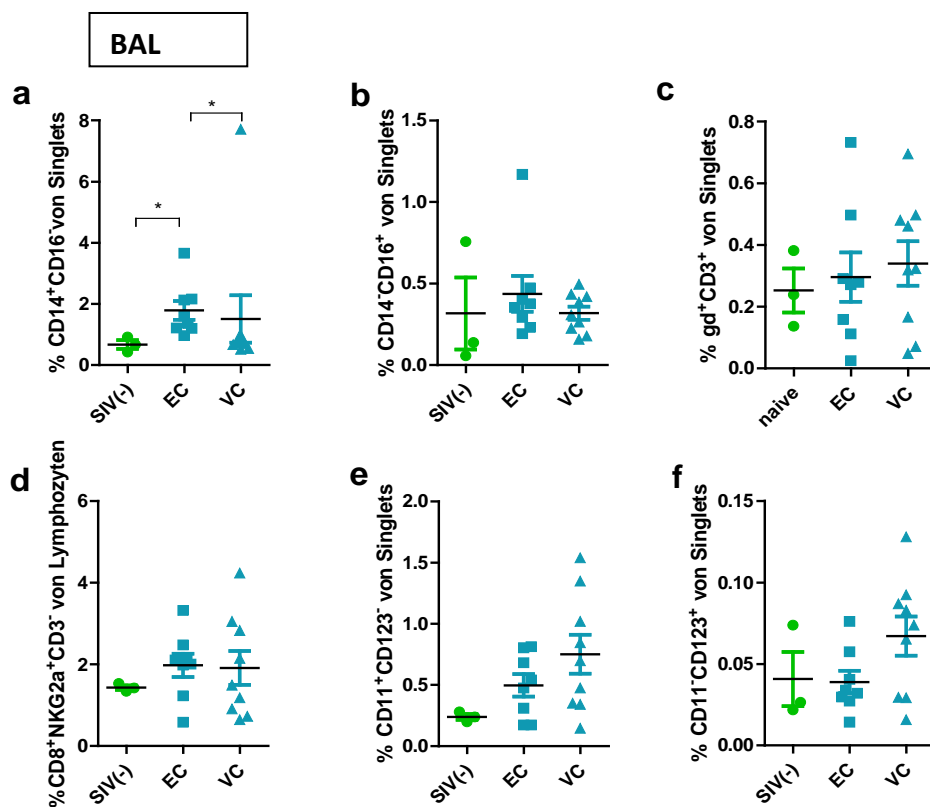


Abbildung 22: Prozentualer Anteil diverser Zellen des angeborenen Immunsystems in der BAL. Dargestellt sind a) Monozyten, b) Makrophagen, c) $\gamma\delta$ T-Zellen, d) NK Zellen, e) mDCs, f) pDCs. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller.

3.2 Verteilung von T-Zellen als Teil der adaptiven Immunantwort in Blut, Colon und BAL

Zum adaptiven Immunsystem zählen neben T- auch B-Lymphozyten. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich verschiedene Subpopulationen von T-Zellen untersucht. Sie sind durch die Expression des T-Zell-Rezeptors auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet.

3.2.1 Verteilung von CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ und CD4⁻CD8⁻ T-Zellen

CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen stellen die zwei wesentlichen Subpopulationen der T-Lymphozyten dar. Die Depletion der CD4⁺ T-Helferzellen, insbesondere in den mukosalen Geweben, wurde schon sehr früh in der HIV-Infektion erkannt.

Im Blut und Colon SIV-infizierter Rhesusaffen wurden niedrigere Prozentzahlen an CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu SIV-negativen Tieren detektiert (Abb. 23a und e). Der Verlust im Colon war jedoch ausgeprägter als im Blut. Bei EC war der CD4⁺ T-Zell-Verlust gering bis moderat, während bei Progressoren in beiden Organen und bei VC im Colon der Verlust signifikant war. Der Anteil an CD8⁺ T-Zellen war dementsprechend in allen Gruppen und beiden Organen erhöht, bei den Progressoren signifikant (Abb. 23b und f). Doppelt positive T-Zellen waren im Blut von EC und VC signifikant erhöht, im Colon in allen untersuchten Gruppen vermindert (Abb. 23c und g). Doppelt negative Zellen waren im Blut der drei LTNP-Gruppen leicht vermindert, im Colon hingegen tendenziell erhöht (Abb. 23d und h).

In der BAL gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen SIV-negativen Tieren und den beiden untersuchten LTNP-Gruppen (Daten nicht gezeigt).

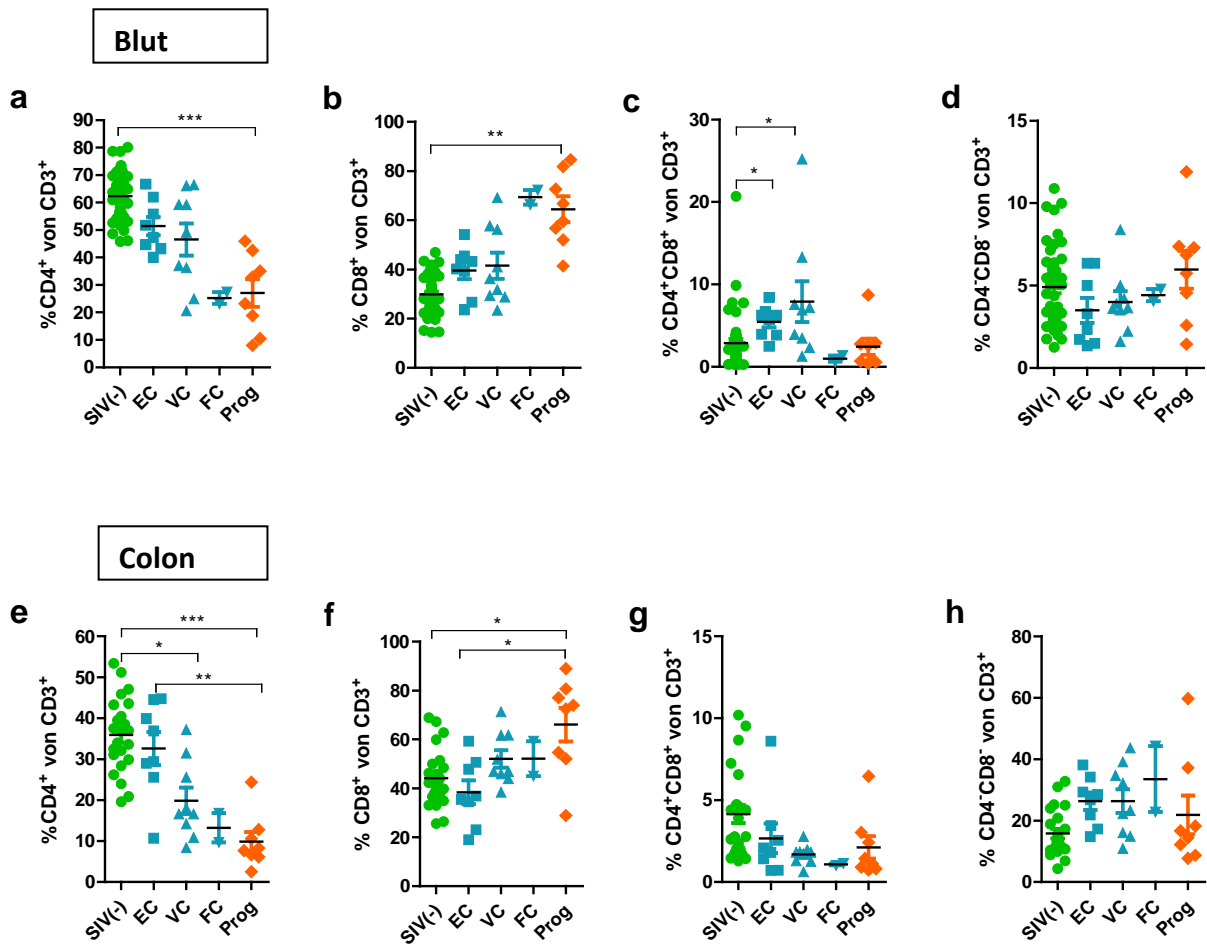


Abbildung 23: Prozentualer Anteil an CD4 versus CD8 T-Zellpopulationen in Blut und Colon. Anteil von (a, e) CD4⁺, (b, f) CD8⁺, (c, g) CD4⁺CD8⁺ und (d, h) CD4⁺CD8⁻ an CD3⁺ in Blut und Colon. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

3.2.2 Verteilung von Th17, CD4⁺Tregs, Tc17, CD8⁺Tregs

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen können das proinflammatorische Zytokin IL-17 sezernieren und werden als Th17 bzw. Tc17 bezeichnet. Regulatorischen T-Zellen (Tregs) hingegen wird eine unterdrückende Wirkung auf bestimmte Zellen des Immunsystems zugeschrieben. Man unterscheidet CD4⁺Tregs und CD8⁺Tregs, die das Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) im Zellkern exprimieren.

In Blut und Colon wiesen alle Gruppen SIV-infizierter Tiere einen Verlust an Th17 auf, der bei den Progressoren in beiden Organen und bei VC im Colon Signifikanz erreichte. Der Verlust bei EC war im Blut nur minimal und im Colon etwas stärker ausgeprägt, jedoch in beiden Fällen nicht signifikant (Abb. 24a und e). Periphere CD4⁺Tregs waren bei den LTNPs im Vergleich zu gesunden Tieren und Progressoren signifikant erhöht (Abb. 24b). Im Colon war der Anteil an CD4⁺Tregs im Vergleich zu gesunden Tieren bei allen Gruppen vermindert (Abb. 24f). Der Anteil an Tc17 war bei den EC und VC im Blut im Vergleich zu nicht infizierten Tieren signifikant erhöht, im Darm hingegen signifikant vermindert. FC zeigten einen tendenziell erhöhten Anteil an Tc17 im Blut, im Darm zeigten sie jedoch wie alle Gruppen einen geringeren Anteil. Bei Progressoren wurden im Blut, mit SIV-negativen Tieren vergleichbare Werte ermittelt, hingegen war der Anteil im Colon niedriger. (Abb. 24c und g). Der Anteil der peripheren CD8⁺Tregs war in allen Gruppen infizierter Tiere erhöht (Abb. 24d). Hingegen war im Colon der Anteil der CD8⁺Tregs nur bei FC und Progressoren deutlich erhöht (Abb. 24h).

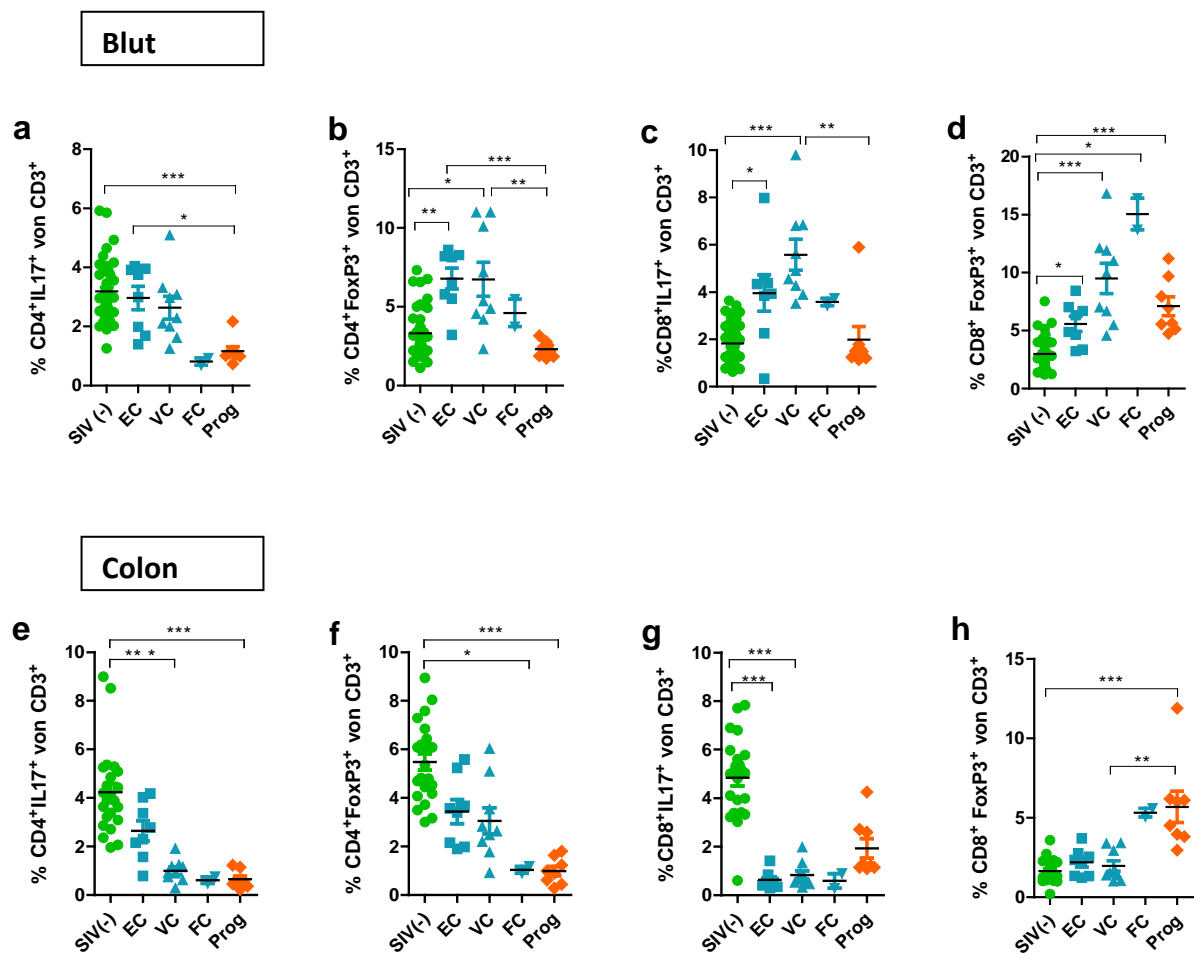


Abbildung 24: Prozentualer Anteil von IL-17-produzierenden und regulatorischen T-Zellen in Blut und Colon. Anteil von (a, e) Th17, (b, f) CD4⁺Tregs, (c, g) Tc17 und (d, h) CD8⁺Tregs an CD3⁺ Zellen in Blut und Colon. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

In der BAL wurden im Vergleich zu SIV-negativen Tieren bei beiden untersuchten Gruppen geringere Prozentzahlen der untersuchten Zellpopulationen beobachtet (Abb. 25). Insbesondere waren die Prozentzahlen der IL-17 produzierenden Zellen in beiden Gruppen reduziert, die bei VC für Th17 (Abb. 25a) und bei EC für Tc17 (Abb. 25c) Signifikanz erreichten.

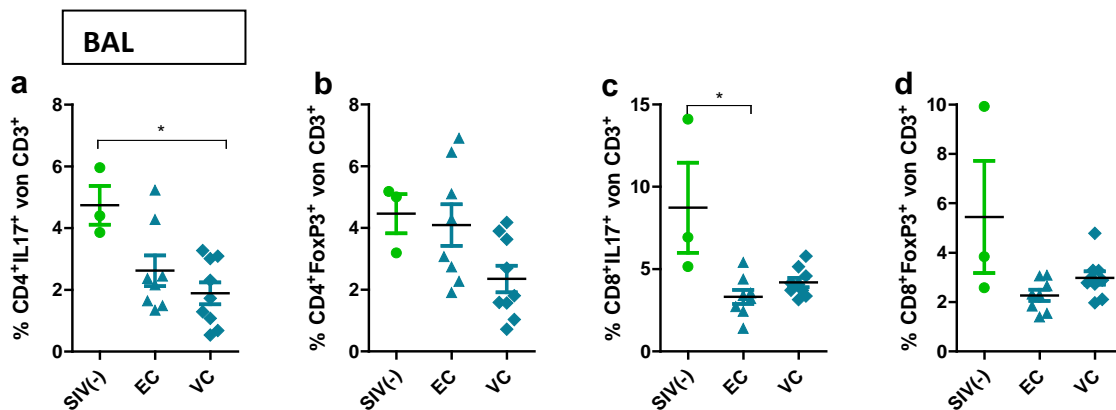


Abbildung 25: Prozentualer Anteil von IL-17-produzierenden und regulatorischen T-Zellen in der BAL. Anteil von a) Th17, b) CD4⁺Tregs, c) Tc17 und d) CD8⁺Tregs an CD3⁺ T-Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller.

3.2.3 Verteilung von iNKTs und deren Subpopulationen

iNKTs zählen zu den T-Lymphozyten, da sie den T-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Sie können Zytokine wie IL-17 produzieren, den Oberflächenrezeptor CD4 und das intranukleäre FoxP3 exprimieren.

Im Blut war ein geringer Verlust an iNKTs bei VC, FC und Progressoren festzustellen (Abb. 26a). Der Anteil an peripheren CD4⁺iNKTs war in allen Gruppen erniedrigt und erreichte bei VC und Progressoren Signifikanz (Abb. 26b). Die IL-17-sezernierenden iNKTs fielen bei allen infizierten Gruppen außer der Gruppe der EC ab (Abb. 26c). Regulatorische iNKTs, die FoxP3 exprimierten, waren im Blut aller infizierten Gruppen leicht erhöht (Abb. 26d). Im Colon wurde ein signifikanter Verlust an iNKTs und CD4⁺iNKTs in den Gruppen der VC, FC und Progressoren festgestellt. Hingegen blieb der Verlust bei EC moderat (Abb. 26e und f). IL-17-produzierende und regulatorische iNKTs waren im Colon aller infizierten Gruppen tendenziell reduziert, am stärksten bei FC und Progressoren (Abb. 26g und h). Bei letzteren war der Anteil im Vergleich zu den nicht infizierten Affen signifikant niedriger.

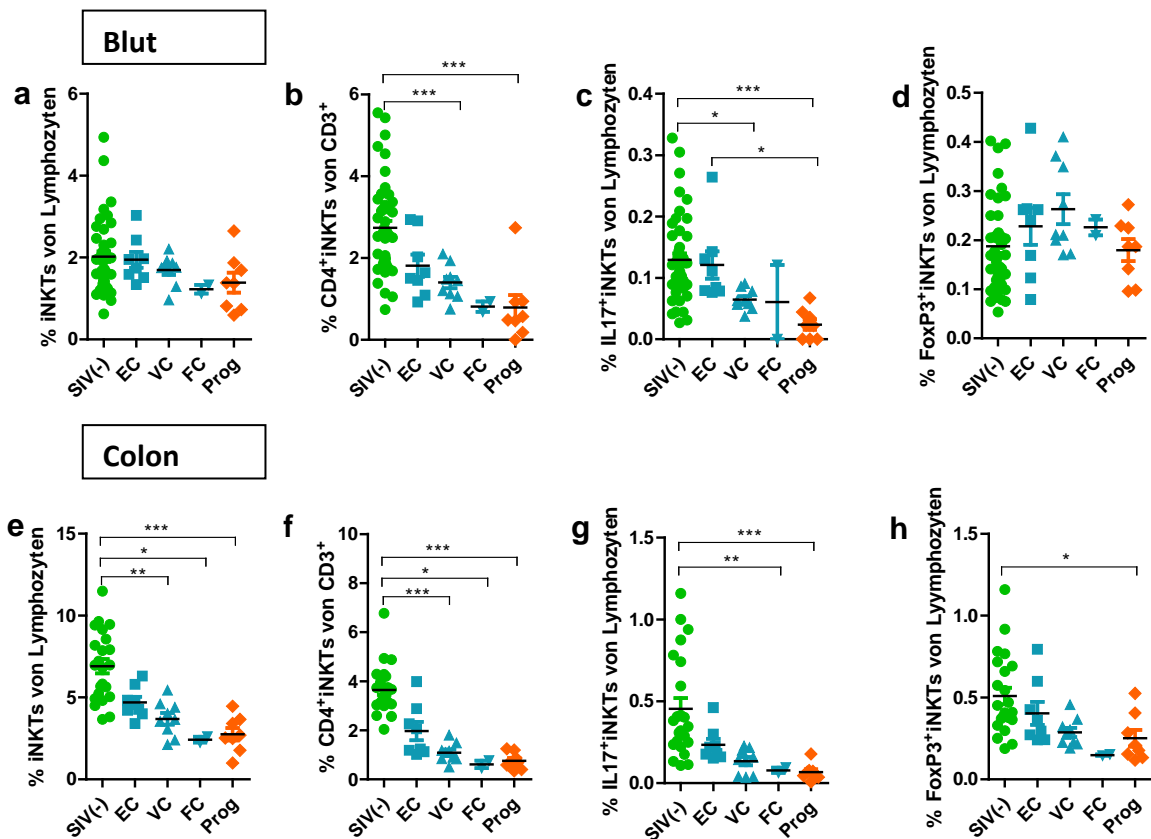


Abbildung 26: Prozentualer Anteil von iNKTs und entsprechenden Subpopulationen in Blut und Colon. Anteil von (a, e) iNKTs, (b, f) CD4⁺iNKTs, (c, g) IL17⁺iNKTs und (d, h) FoxP3⁺iNKTs an Lymphozyten oder CD3 in Blut und Colon. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

In der BAL wurde bei EC und VC im Vergleich zu gesunden Tieren ein tendenzieller Verlust an iNKTs (Abb. 27a), CD4⁺iNKTs (Abb. 27b) und FoxP3⁺iNKTs (Abb. 27d) festgestellt, hingegen war der Anteil IL-17-sezernierender Zellen leicht erhöht (Abb. 27c), allerdings waren die Unterschiede nie signifikant.

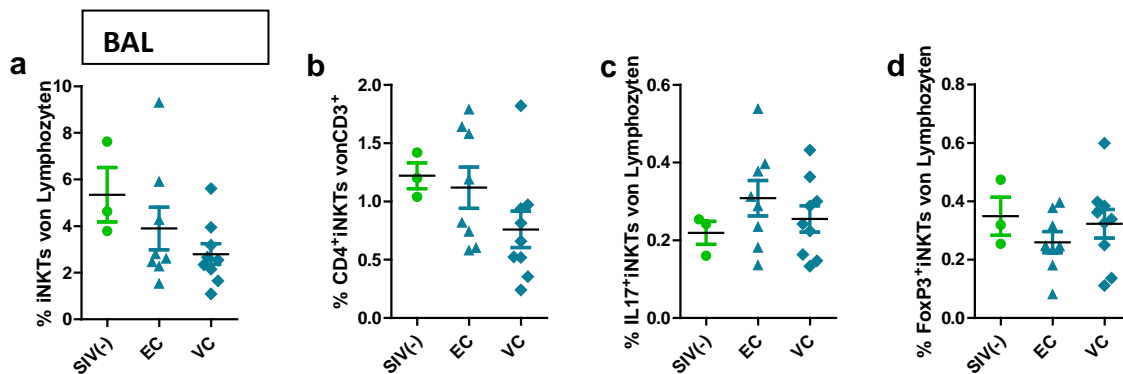


Abbildung 27: Prozentualer Anteil von iNKTs und entsprechenden Subpopulationen in der BAL. Anteil von a) iNKTs, b) CD4⁺iNKTs, c) IL17⁺iNKTs und d) FoxP3⁺iNKTs an Lymphozyten oder CD3⁺ Zellen in der BAL. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller.

3.2.4 Verteilung von naiven und CD4⁺ T-Gedächtniszellen in Blut, Colon und BAL

Mit Hilfe der Oberflächenmarker CD28 und CD95 können T-Helferzellen in naive, zentrale (T_{CM}) und Effektor (T_{EM}) CD4⁺ T-Gedächtniszellen unterteilt werden. Naive T-Zellen sind CD28⁺CD95⁻ und bewegen sich zwischen Blut und lymphatischen Organen. Gedächtnis T-Zellen sind CD95⁺, wobei T_{CM} CD28⁺ und T_{EM} CD28⁻ sind. Sie repräsentieren das immunologische T-Zell-Gedächtnis. CD4⁺ T_{EM} Zellen können schnell aktiviert werden und sich rasch teilen, besitzen jedoch eine sehr kurze Lebenszeit. CD4⁺ T_{CM} Zellen residieren in den sekundären lymphatischen Organen und sind langlebig. Nach ihrer Aktivierung können sie zu Effektorzellen differenzieren. CD4⁺ T-Gedächtniszellen repräsentieren die präferentiellen Zielzellen für HIV und SIV.

Zum Zeitpunkt dieser Messung musste der erste FC zwischenzeitlich euthanasiert werden, sodass Material lediglich von einem Tier aus dieser Gruppe analysiert werden konnte.

Im Blut war der Anteil naiver T-Helferzellen in allen Gruppen signifikant erniedrigt (Abb. 28a). Hingegen waren die Anteile von CD4⁺ T_{CM}-Zellzahlen in der EC-Gruppe auf vergleichbarem Niveau wie das der nicht infizierten Tiere, während die Spiegel in VC und Progressoren signifikant niedriger waren (Abb. 28b). CD4⁺ T_{EM} Zellen waren

mit Ausnahme von dem einen FC in allen SIV-infizierten Gruppen mäßig erhöht (Abb. 28c).

Im Darm gesunder Tiere repräsentierten naive $CD4^+$ T-Zellen nur eine kleine Population, die bei allen infizierten Rhesusaffen fast vollständig depletiert war (Abb. 28d). Der Anteil an $CD4^+$ T_{CM} -Zellen im Darm war bei EC erhöht und bei den VC, FC und Progressoren deutlich vermindert (Abb. 28e). $CD4^+$ T_{EM} -Zellen waren im Vergleich zu nicht infizierten Tieren bei EC signifikant und bei den anderen Gruppen der LTNPs leicht erhöht, Progressoren wiesen gleiche Anteile dieser Population wie die SIV-negativen Tieren auf (Abb. 28 f).

In der BAL gab es nur geringe Unterschiede zwischen SIV-negativen und infizierten Tieren (Daten nicht gezeigt).

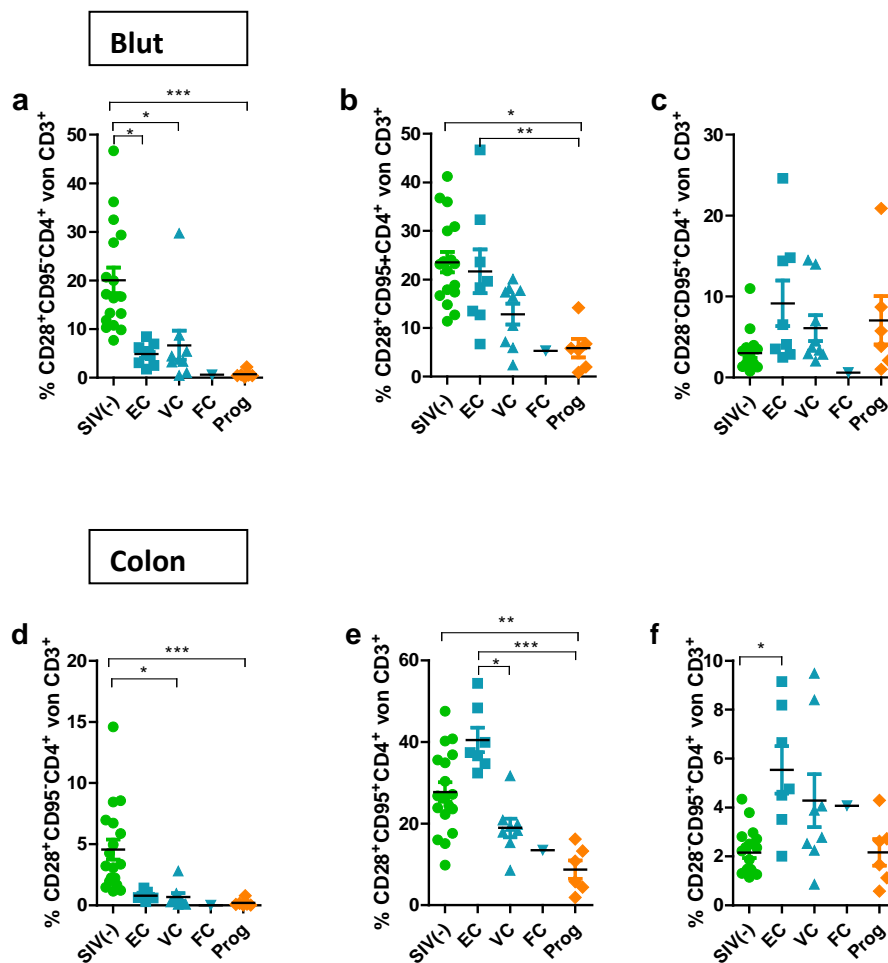


Abbildung 28: Prozentualer Anteil von naiven und CD4⁺ T- Gedächtniszellen in Blut und Colon. Anteil von (a,d) naiven, (b,e) T_{CM} und (c,f) T_{EM} CD4⁺ an CD3⁺ T-Zellen in Blut und Colon. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, prog = Progressoren.

3.2.5 Verteilung von CD4⁺CD195⁺ T-Zellen in Blut, Colon und BAL

Neben dem CD4-Rezeptor repräsentiert das Transmembranprotein CCR5 (entsprechend CD195) den wichtigsten Korezeptor für HIV und SIV. Sowohl die Verteilung von CD4⁺CD195⁺ T-Zellen als auch von CD195⁺CD4⁺ T_{CM} (CD28⁺CD95⁺) wurde in den unterschiedlichen Geweben untersucht. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt stand nur ein FC zur Verfügung.

Im Blut wurde ein massiver Verlust beider Zellpopulationen bei FC und Progressoren festgestellt (Abb. 29a und d). Bei den EC entsprachen die Blutspiegel von $CD4^+CD195^+$ T-Zellen und den $CD4^+CD195^+$ T_{CM} -Zellen denen der nicht infizierten Tiere (Abb. 29a und d), im Colon traf dies auch auf die $CD4^+CD195^+$ zu, während die $CD4^+CD195^+$ T_{CM} bei diesen Tieren sogar signifikant höhere Spiegel aufwiesen (Abb. 29b und e). Bei VC und Progressoren war ein signifikanter Verlust an $CD4^+CD195^+$ T-Zellen im Colon zu beobachten, während diesbezüglich der Verlust an $CD4^+CD195^+$ T_{CM} in diesem Kompartiment nur auf die Progressoren zutraf (Abb. 29e).

In der BAL zeigte sich ein Verlust beider Zelltypen bei den infizierten Tieren im Vergleich zu den gesunden, der in der Gruppe der VC signifikant war (Abb. 29e und f).

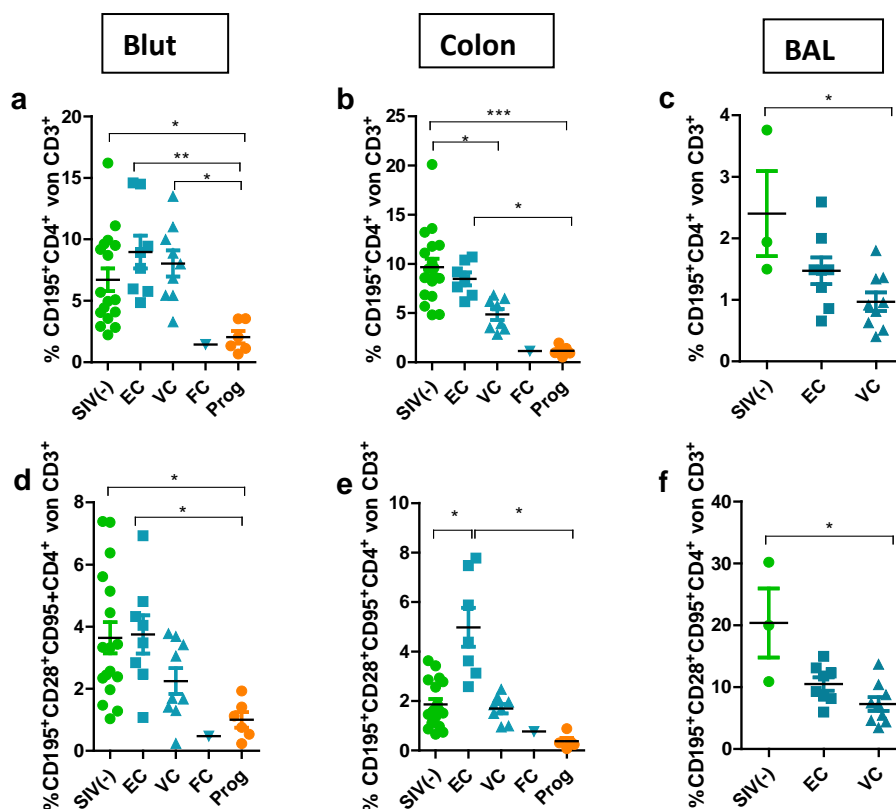


Abbildung 29: Prozentualer Anteil an $CD195^+$ und $CD195^+CD28^+CD95^+$ $CD4^+$ T-Zellen in Blut, Colon und BAL. Anteil von (a, b, c) $CD195^+CD4^+$ und (d, e, f) $CD195^+CD28^+CD95^+CD4^+$ an $CD3^+$ T-Zellen in Blut, Colon und BAL. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

4. Expression des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems

Die Rolle des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins in der HIV-/SIV-Infektion ist nicht vollständig abgeklärt. Eine durchflusszytometrische Untersuchung der Expression des Integrins auf Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems wurde im Blut und Colon bei SIV-negativen Tieren und LTNPs durchgeführt. Dieser Oberflächenmarker wurde bei Progressoren nicht untersucht, da diese zwischenzeitlich euthanasiert werden mussten. Darüber hinaus zeigten einige VC am Ende der Untersuchungsphase stetig ansteigende Viruslasten im Plasma, die schließlich den Schwellenwert von 10^4 viralen Kopien/ml überstiegen, sodass sie in die Gruppe der FC klassifiziert wurden. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchung hatte sich die Aufteilung der LTNPs in den drei Gruppen folgendermaßen geändert (Abb. 30).

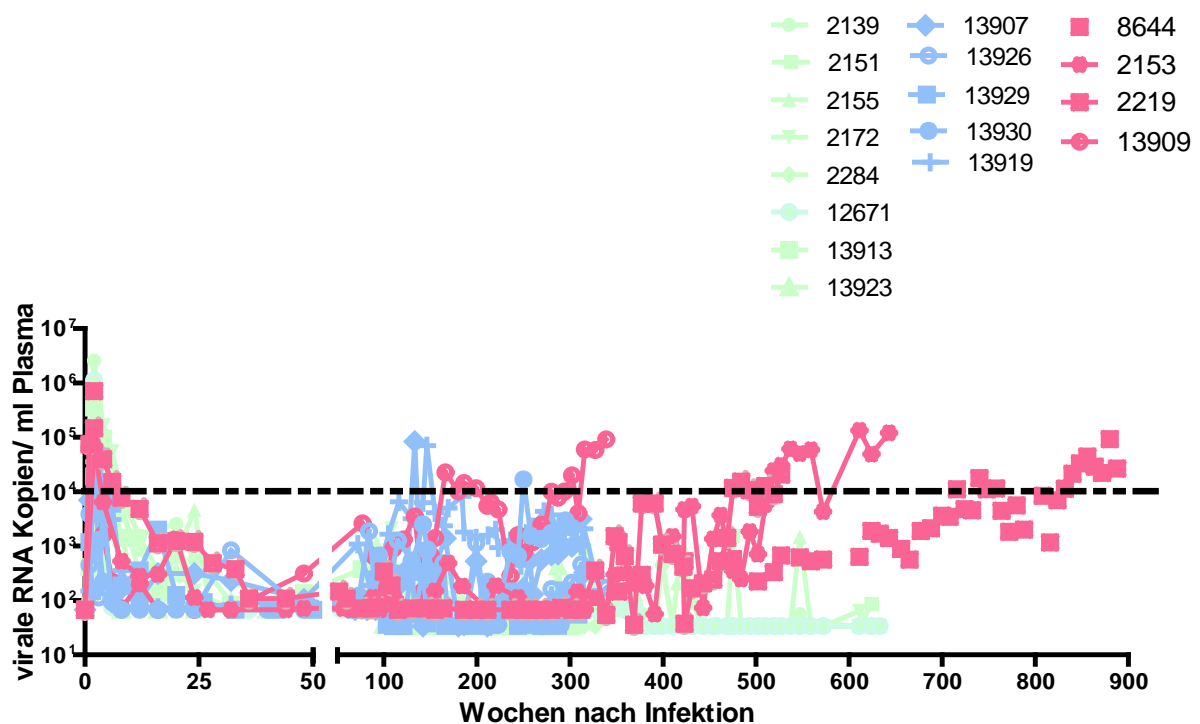


Abbildung 30: Plasmaviruslast im Zeitverlauf. Dargestellt ist die Viruslast im Blut von EC (grün), VC (blau) und FC (rosa) im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion. Die schwarze gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert von 10^4 viralen Kopien im Plasma dar. EC weisen eine niedrige, VC eine mittlere und FC eine hohe Viruslast im Blut auf. EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller.

4.1 Expression des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins auf Zellen des angeborenen Immunsystems

Bei $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen, mDCs und pDCs, welche Zellen des angeborenen Immunsystems repräsentieren, wurde die Prozentzahl der $\alpha 4\beta 7$ positiven Zellen analysiert. Im Blut von VC und FC wurde ein Verlust der $\alpha 4\beta 7$ -exprimierenden Zellen bei allen untersuchten Zellpopulationen beobachtet (Abb. 31a-d), der bei mDCs signifikant war (Abb. 31c). Bei EC waren die Prozentzahlen der $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und mDCs, die das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin exprimierten, vergleichbar mit denen bei gesunden Tieren, bei pDCs jedoch leicht vermindert (Abb. 31d). Zudem waren die Spiegel der $\alpha 4\beta 7$ positiven Zellen im Colon der EC vergleichbar mit denen bei SIV-negativen Tieren. Im Colon von VC und FC waren die $\alpha 4\beta 7^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen und $\alpha 4\beta 7^+$ mDCs hingegen reduziert (Abb. 31 e und f). Allerdings waren die Abweichungen von den Spiegeln der nicht infizierten Tiere aufgrund größerer Streuung nicht signifikant. Der Anteil an Integrin positiven NK-Zellen war bei FC deutlich niedriger als bei den Kontrolltieren (Abb. 31e-g). Wegen der geringen Anzahl von pDCs im Colon konnte die Prozentzahl die $\alpha 4\beta 7^+$ pDCs nicht bestimmt werden.

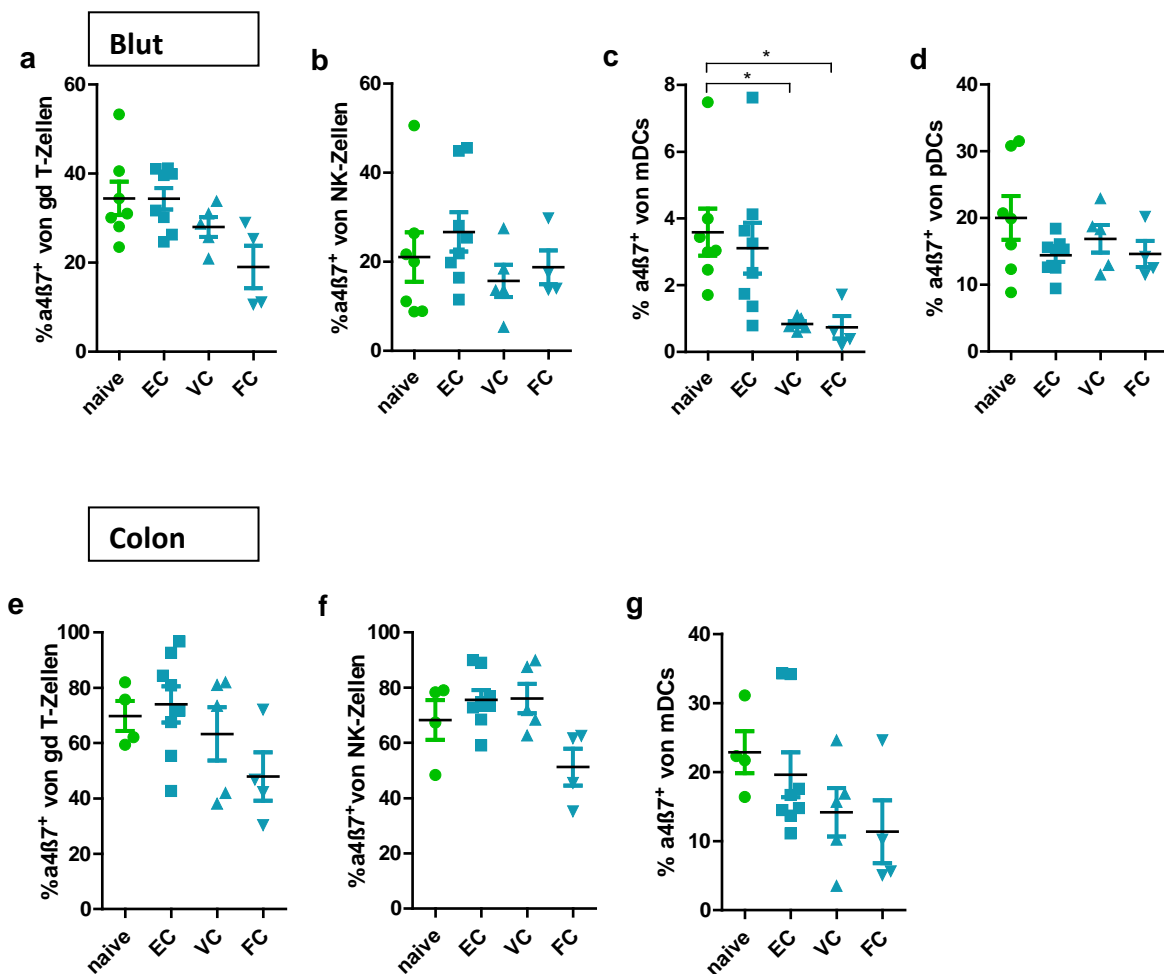


Abbildung 31: Prozentualer Anteil der $\alpha 4\beta 7$ -exprimierenden Zellen des angeborenen Immunsystems in Blut und Colon. Dargestellt ist der Anteil von $\alpha 4\beta 7^+$ Zellen an (a, e) $\gamma\delta$ T-Zellen (b, f) NK-Zellen, (c, g) mDCs in Blut und Colon und d) pDCs im Blut. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Mit Querstrich und Sternchen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller.

4.2 Expression des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins auf Zellen des adaptiven Immunsystems

Das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin spielt eine entscheidende Rolle beim „homing“ von Immunzellen in den Darm. Außerdem dient es als weiterer Korezeptor für HIV und SIV. Neben den Zellen der angeborenen Immunantwort wurden $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+$ T-Gedächtniszellen ($CD95^+$) und iNKTs als Teil des adaptiven Immunsystems in Blut und Colon hinsichtlich der Expression von $\alpha 4\beta 7$ untersucht. Des Weiteren wurde die

gleichzeitige Expression der HIV/SIV Korezeptoren $\alpha 4\beta 7$ und CD195 auf diesen Zellpopulationen im Blut gemessen.

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem wurden bei der durchflusszytometrischen Analyse des adaptiven Immunsystems im Blut zwei Populationen offensichtlich: eine $\alpha 4\beta 7$ „intermediate“ ($\alpha 4\beta 7^{\text{int}}$)-Population und eine $\alpha 4\beta 7$ „high“ ($\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}$)-Population (Abb. 32). $\text{CD4}^+\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}$ Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der HIV-Infektion [115], daher wurde bei den Zellen der adaptiven Immunität im Blut die „high“-Population bestimmt.

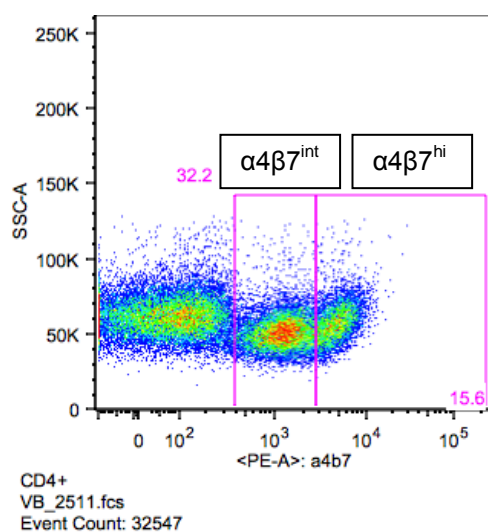


Abbildung 32: Repräsentativer Dot Plot der durchflusszytometrischen Analyse von $\alpha 4\beta 7$. Dargestellt sind die $\alpha 4\beta 7$ intermediate ($\alpha 4\beta 7^{\text{int}}$)- und $\alpha 4\beta 7$ high ($\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}$)-Populationen im Blut.

Die Prozentzahlen der $\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}\text{CD3}^+$ T-Zellen im Blut waren in allen LTNP-Gruppen reduziert und erreichten in der Gruppe der FC Signifikanz im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren (Abb. 33a). Bei CD4^+ T-Helferzellen, CD4^+ T-Gedächtniszellen und iNKTs wurde eine leichte Erhöhung der exprimierenden Zellen in der Gruppe der EC beobachtet, bei VC und FC waren diese Zellen im Vergleich zu SIV-negativen Tieren vermindert (Abb. 33b-d).

Im Colon waren $\alpha 4\beta 7$ exprimierende CD3^+ T-Zellen bei VC und FC vermindert im Vergleich zu nicht infizierten Tieren und signifikant vermindert im Vergleich zu EC (Abb. 33e). Hingegen war in allen LTNP-Gruppen ein im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöhter Anteil an Integrin exprimierenden CD4^+ T-Helferzellen, CD4^+ T-Gedächtniszellen und iNKTs im Colon zu beobachten. Für CD4^+ T-Helferzellen

und CD4⁺ T-Gedächtniszellen der FC war diese Erhöhung signifikant im Vergleich zu SIV-negativen Tieren (Abb. 33f-h).

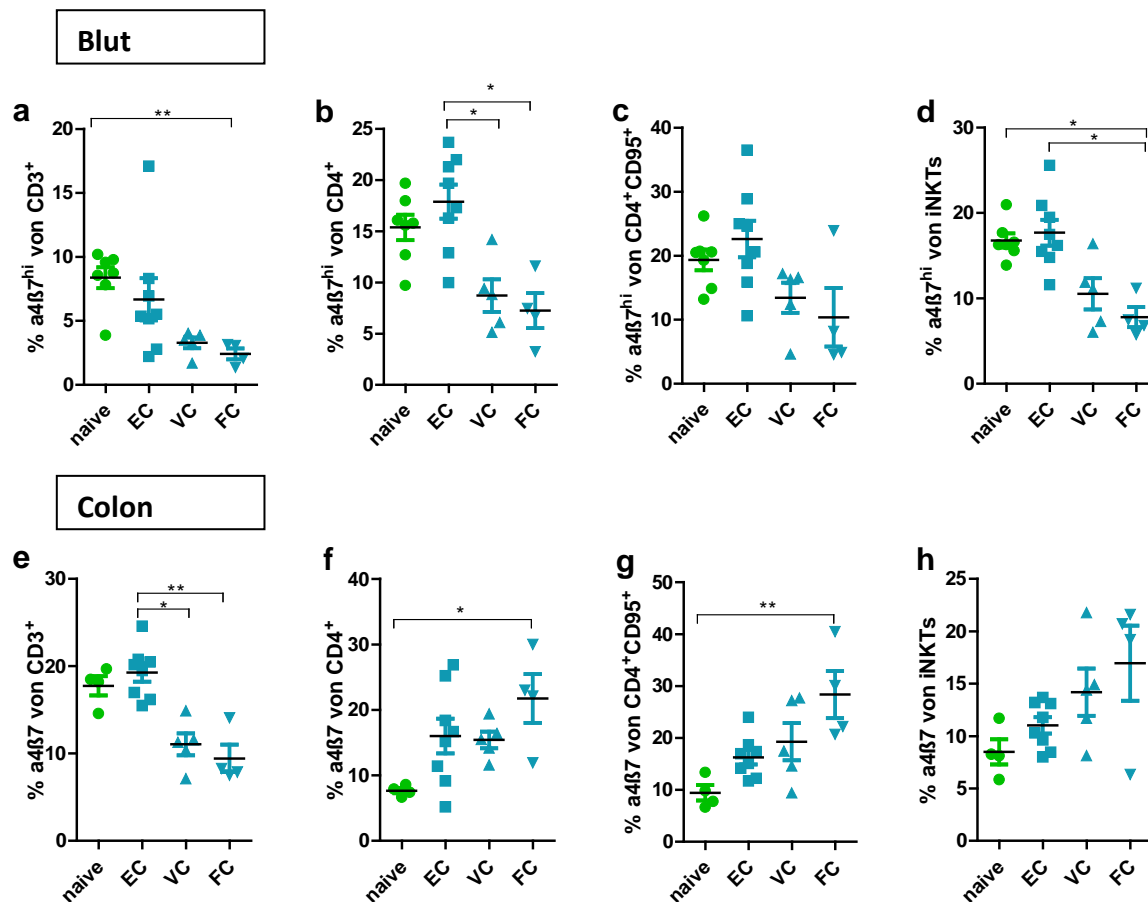


Abbildung 33: Prozentualer Anteil von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin exprimierenden Zellen des adaptiven Immunsystems in Blut und Colon. Dargestellt ist der Anteil von $\alpha 4\beta 7^+$ Zellen an (a, e) CD3⁺ T-Zellen (b, f) CD4⁺ T-Zellen, (c, g) CD4⁺ T-Gedächtniszellen (CD95⁺) und (d, h) iNKTs in Blut und Colon. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller.

Die Prozentzahl der CD3⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen, CD4⁺ T- Gedächtniszellen und iNKTs, die gleichzeitig die Korezeptoren $\alpha 4\beta 7$ und CD195 exprimieren, wurde ausschließlich in Blutproben analysiert. Bei EC und VC wurden keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu SIV-negativen Tieren festgestellt. Im Gegensatz dazu war bei den FC eine Erhöhung der Prozentzahl dieser Zellen zu beobachten, die im Fall der CD3⁺ und iNKTs signifikant war (Abb. 34).

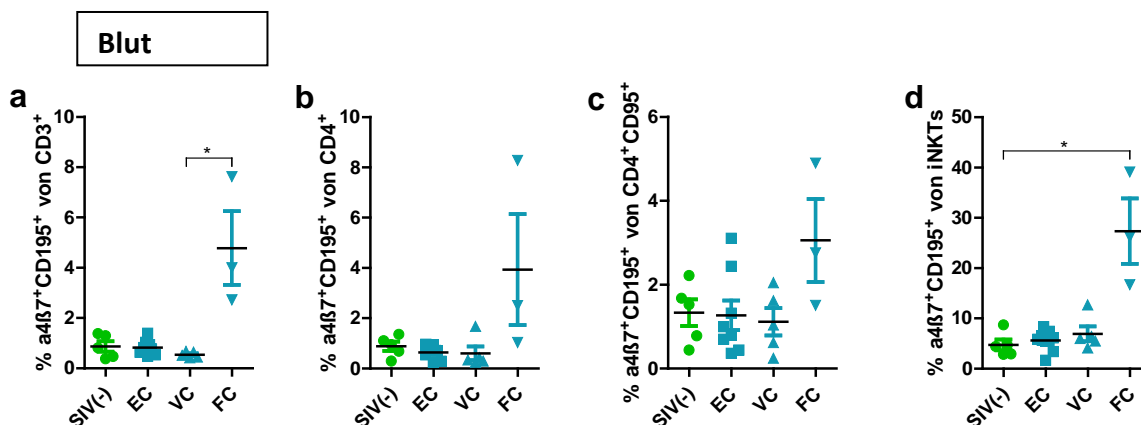


Abbildung 34: Prozentualer Anteil von Zellen des adaptiven Immunsystems im Blut, die $\alpha 4\beta 7$ und $CD195$ koexprimieren. Dargestellt ist der Anteil an a) $CD3^+$ b) $CD4^+$, c) $CD4^+ CD95^+$ und d) iNKTs im Blut. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller.

5. Aktivierung und Proliferation von $CD4^+$ T-Helferzellen und $\alpha 4\beta 7^+$ Zellen

Eine persistierende, chronische Immunaktivierung ist das Hauptmerkmal der HIV- und SIV-Infektion. Patienten unter ART, bei denen kein Virus im Plasma nachweisbar ist, wiesen trotzdem eine Restimmunaktivierung auf, die mit AIDS-Komorbiditäten assoziiert ist. Um die Immunaktivierung im Blut und in mukosalen Geweben zu bewerten, wurde in dieser Arbeit die Expression des Proliferationsmarkers Ki67, der Hinweis auf sich teilende Zellen gibt, und des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf verschiedenen Immunzellen analysiert.

In Blut und Colon der LTNPs und Progressoren wurde im Vergleich zu gesunden Tieren ein teilweise signifikant erhöhter Anteil an Ki67 (Abb. 35a und b) und HLA-DR (Abb. 35d und e) exprimierenden $CD4^+$ T-Helferzellen nachgewiesen. Am ausgeprägtesten war dieser bei FC und Progressoren zu beobachten, jedoch war selbst bei den EC ein signifikant höherer Anteil an Ki67 exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen im Blut auffällig (Abb. 35a). In der BAL wurde eine verstärkte Proliferation, jedoch eine niedrigere Aktivierung in den beiden infizierten Gruppen beobachtet

(Abb. c und f). Insgesamt betrachtet war die Proliferation der CD4⁺ T-Helferzellen in den untersuchten Kompartimenten bei allen infizierten Tieren erhöht.

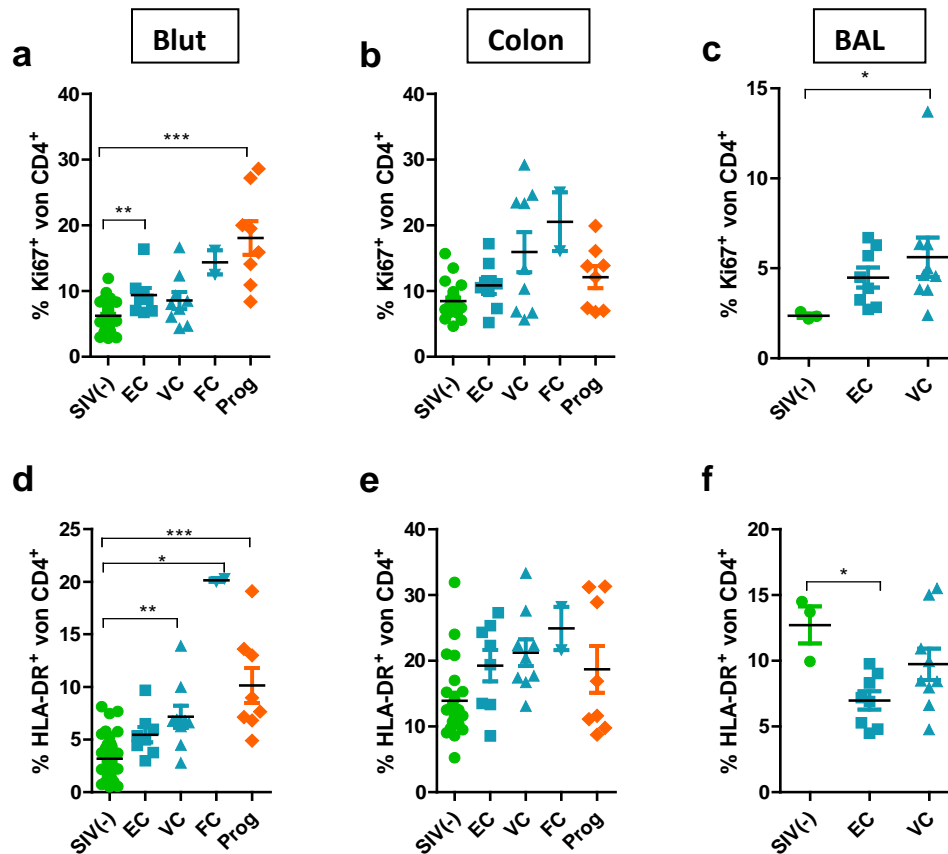


Abbildung 35: Proliferation und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen in Blut, Colon und BAL. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Expression von (a, b, c) Ki67 und (d, e, f) HLA-DR bei CD4⁺ T-Zellen in den angegebenen Organen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert (Querstrich) für jedes Kompartiment. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

Darüber hinaus wurde im Blut von Kontrolltieren und LTNPs die Proliferation anhand der Expression von Ki67 bei diversen Immunzellpopulationen, die das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin exprimieren, untersucht. Bei $\alpha 4\beta 7$ -positiven CD3⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen, CD4⁺ T-Gedächtniszellen und iNKTs war der Anteil an Ki67 exprimierenden Zellen in allen SIV-infizierten Gruppen erhöht. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren traten bei den VC hinsichtlich der CD4⁺ T-Helferzellen und bei den FC

bei allen untersuchten Zellpopulationen auf (Abb. 36a-d). Zusätzlich wurde die Proliferation von $CD3^+$ T-Zellen und iNKTs, die $\alpha 4\beta 7$ und CD195 auf ihrer Oberfläche koexprimieren, untersucht. Diese doppelt positive Population war bei allen anderen Zelltypen für eine Auswertung zu klein. Die Proliferation von $\alpha 4\beta 7^+ CD195^+$ T-Zellen und iNKTs war bei allen infizierten Tieren erhöht, bei den FC sogar signifikant (Abb. 36e und f).

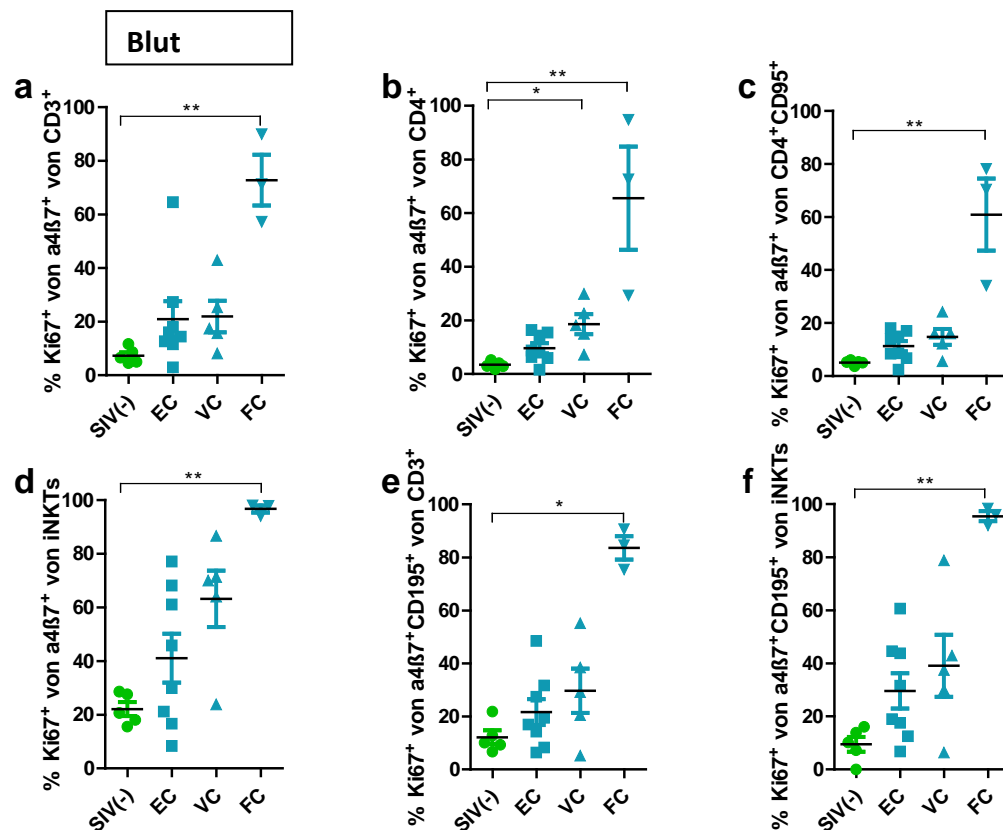


Abbildung 36: Anteil von verschiedenen proliferierenden $\alpha 4\beta 7^+$ Zellpopulationen im Blut. Prozentualer Anteil von Ki67-exprimierenden Zellen an a) $\alpha 4\beta 7^+ CD3^+$ T-Zellen, b) $\alpha 4\beta 7^+ CD4^+$ T-Zellen, c) $\alpha 4\beta 7^+ CD4^+ CD95^+$ T-Zellen und d) $\alpha 4\beta 7^+$ iNKTs sowie, e) $\alpha 4\beta 7^+ CD195^+ CD3^+$ T-Zellen und f) $\alpha 4\beta 7^+ CD195^+$ iNKT-Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller.

6. Longitudinaler Verlauf der CD4/CD8 Ratio in Blut und Colon bei EC, VC und FC

HIV infiziert selektiv CD4⁺ T-Helferzellen und führt letztlich zur Depletion dieser Zellpopulation. Insbesondere sind die CD4⁺ T-Zellen in mukosalen Geweben, vor allem im Intestinaltrakt, betroffen. Bereits wenige Tage nach der Infektion ist eine beginnende Depletion dieser Zellen in der Darmmukosa festzustellen, die im Laufe der Infektion nicht wieder ausgeglichen wird [159]. Das Ausmaß der Depletion im Blut hingegen ist geringer und die Zellzahlen erholen sich nach der akuten Phase der Infektion. In Abbildung 37 ist die CD4/CD8-Ratio in Blut und Colon longitudinal sowohl für die einzelnen Tiere als auch gruppenweise dargestellt. Im Laufe der Arbeit wurde mehrfach durchflusszytometrisch die Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Allerdings wurden bei jeder Analyse unterschiedliche Antikörper und Antikörperkombinationen benutzt. Aus diesem Grund wurde der Verlauf der CD4/CD8 Ratio und nicht der Verlauf der Prozente der CD4⁺ T-Zellen dargestellt.

Bei gesunden Rhesusaffen liegen die Werte der CD4/CD8 Ratio im Blut bei 1,5 bis 2 [160] und im Colon bei 0,74 bis 1,3 [161]. Blut und Colon von LTNPs wurden über einen Zeitraum von ungefähr zweieinhalb Jahren zu vier Zeitpunkten durchflusszytometrisch zeitgleich untersucht. Tiere, die im Laufe der Arbeit von VC zu FC reklassifiziert wurden, werden hier in der Gruppe der FC dargestellt (Tier Nr. 8644, 2153, 2219, 13909). Wie aus der Grafik (Abb. 37) ersichtlich, war die Ratio bei EC und VC (Abb. 37a und c) im Blut im Vergleich zu den FC (Abb. 37e) eindeutig höher und die Mittelwerte der Gruppen der EC und VC hielten sich auf ähnlichem Niveau (Abb. 37g). Im Gegensatz dazu zeigten EC deutlich höhere Werte im Colon (Abb. 37b) im Vergleich zu VC und FC (Abb. 37d und f), bei denen sich die Ratio der Gruppen ähnlich niedrig darstellte (Abb. 37h). Bei den EC blieb die Ratio in Blut und Colon bei der Mehrheit der Tiere über die Zeit stabil und befand sich, bis auf den letzten Messungswert im Referenzbereich (Abb. 37g und h). Hingegen wurde bei VC und FC eine stetige Minderung des Wertes beobachtet und interessanterweise zeigten VC, die im Laufe der Studie in FC reklassifiziert wurden, von Beginn der Untersuchungen an deutlich niedrige Werte (Abb. 37e und f).

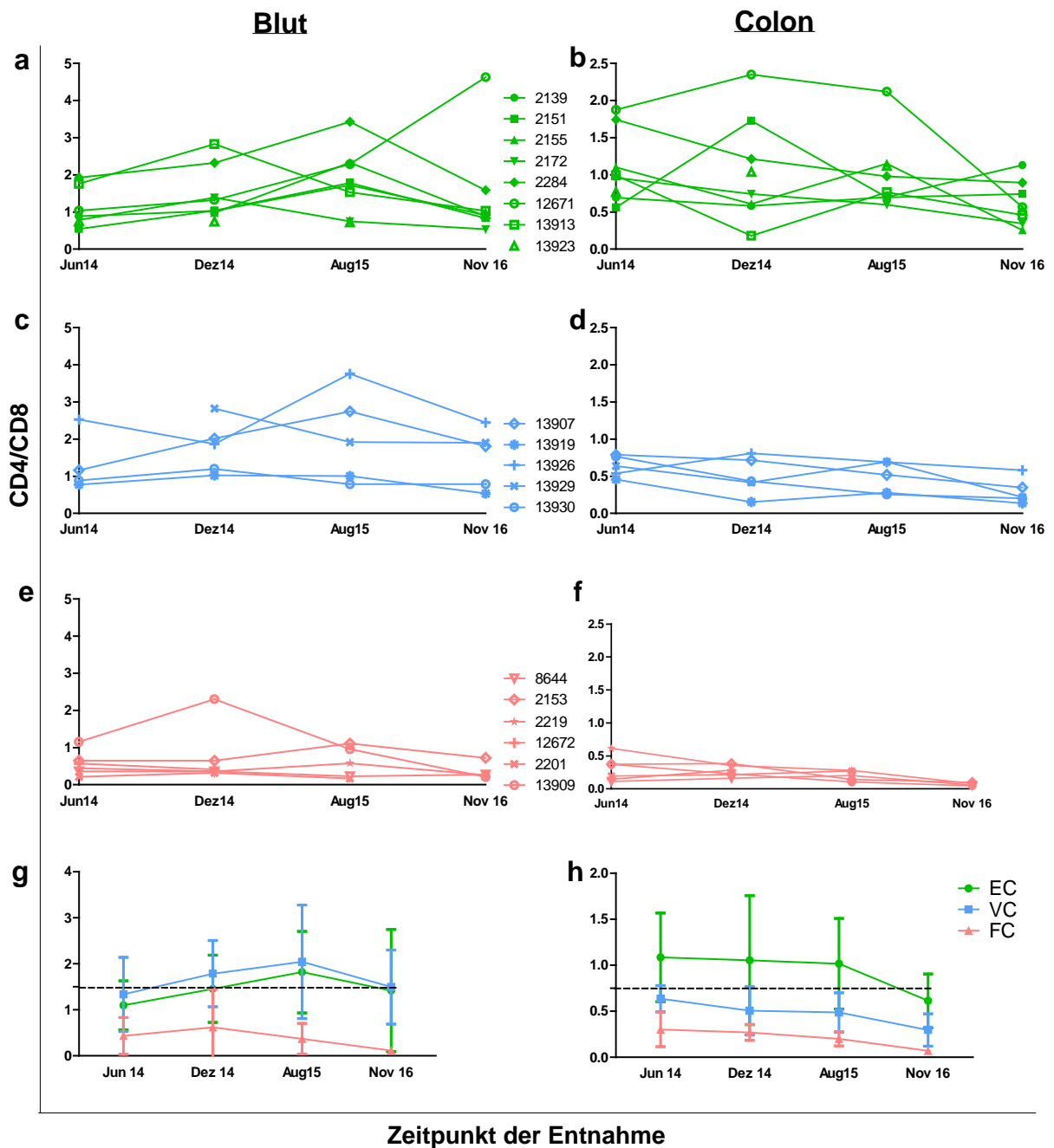


Abbildung 37: Longitudinaler Verlauf der CD4/CD8 Ratio in Blut und Colon von EC, VC und FC. (a-f) Dargestellt ist das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen in Blut und Colon bei jedem Tier über einen Zeitraum von ca. zweieinhalb Jahren. (g, h) Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die schwarze gestrichelte Linie repräsentiert die untere Grenze der Werte bei gesunden Tieren, die beim Blut 1,5 und beim Colon 0,74 beträgt. EC = Elite Controller (grün), VC = virämische Controller (blau), FC = failing Controller (rot). Jun 14 = Juni 2014, Dez 14 = Dezember 2014, Aug 15 = August 2015, Nov 16 = November 2016.

7. Zusammenfassender Vergleich der prozentualen Anteile von CD4⁺ T-Helferzellen, deren Subpopulationen und iNKTs im Blut und den zwei mukosalen Kompartimenten

Die Depletion von Immunzellen, insbesondere CD4⁺ T-Helferzellen, beginnt in den mukosalen Geweben bereits wenige Tage nach der HIV-/SIV-Infektion. In Abbildung 38 sind zur besseren Übersicht nochmals CD4⁺ T-Zellen, deren Subpopulationen und iNKTs in Blut, Colon und BAL bei SIV-negativen Tieren, LTNPs und Progressoren zusammengestellt worden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Eine BAL wurde bei gesunden Tieren und in den Gruppen der EC und VC durchgeführt. Ein Verlust von CD4⁺ T-Zellen war bei allen infizierten Gruppen in allen untersuchten Kompartimenten zu beobachten (außer in der BAL bei EC, Abb. 38a). Bei SIV-negativen Tieren waren die Prozentsätze von CD4⁺CD195⁺ Zellen, Th17, CD4⁺Tregs, iNKTs und CD4⁺iNKTs (außer in der BAL, Abb. 38f) in den mukosalen Geweben immer höher als im Blut. Nach der Infektion ist eine Reversion dieser Verteilung bei CD4⁺CD195⁺ Zellen, Th17, CD4⁺Tregs, und CD4⁺iNKTs festzustellen, das heißt, dass die Prozentzahlen im Blut höher als diejenigen in den mukosalen Geweben waren. Bei iNKTs war zwar der Verlust der Zellen in der Mukosa höher, jedoch blieben die prozentualen Anteile im Colon und in der BAL höher als im Blut. Ein dramatischer Abfall von CD4⁺, CD4⁺CD195⁺, Th17, CD4⁺Tregs und CD4⁺iNKTs wurde vor allem im Colon von VC, FC und Progressoren festgestellt. Im Gegensatz dazu war im Colon der EC bei allen Populationen eine geringe bis moderate Abnahme im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten.

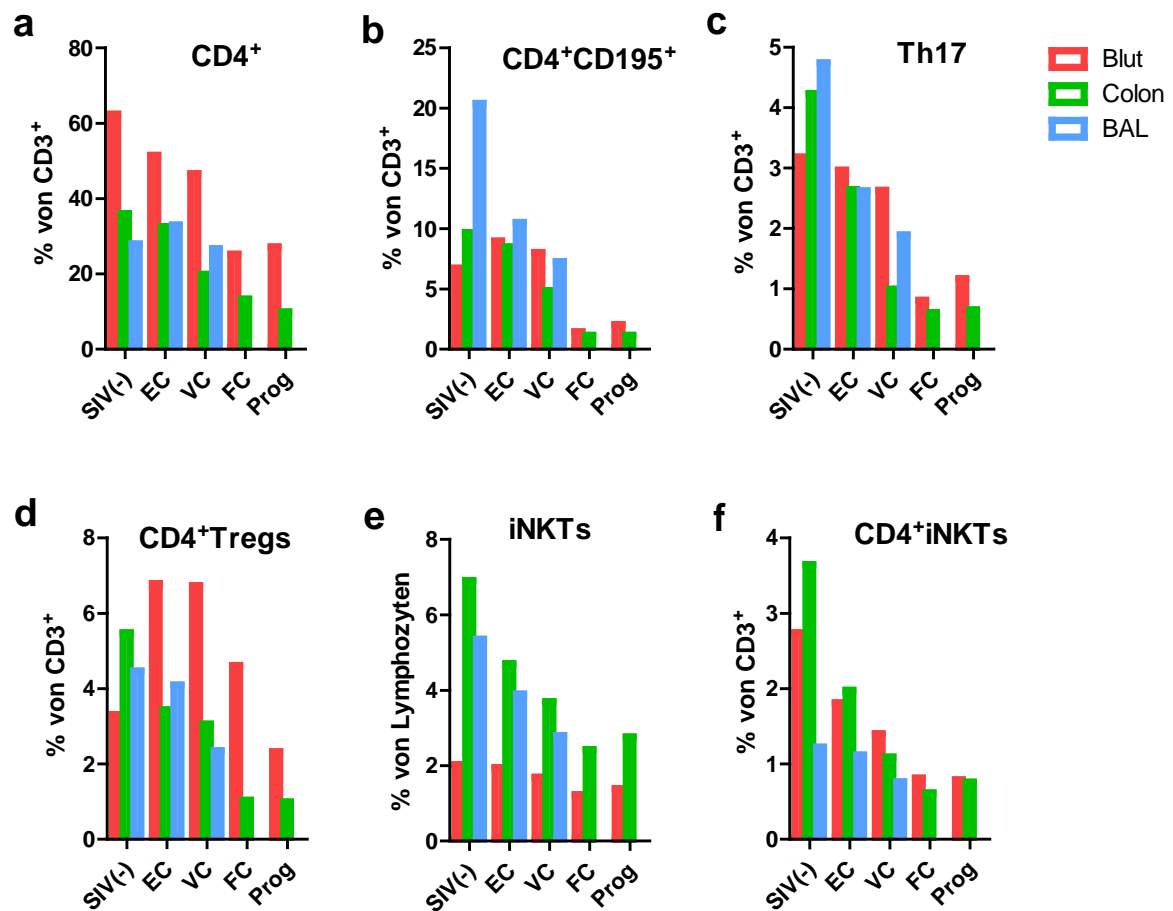


Abbildung 38: Verteilung von CD4⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen sowie iNKTs in Blut, Colon und BAL SIV-negativer und SIV-infizierter Tiere. Prozentualer Anteil von a) CD4⁺ T-Helferzellen, b) CD4⁺CCR5⁺, c) Th17, d) CD4⁺Tregs, e) iNKTs und CD4⁺iNKTs in Blut (rot), Colon (grün) und BAL (blau). EC, n = 8; VC, n = 9; FC, n = 2; Prog = 9. EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

8. Korrelationsanalysen zwischen dem Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und der Viruslast in Blut und Colon

Die folgenden Abbildungen stellen Korrelationsanalysen zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen sowie der Viruslast in Blut und Colon dar. Bei EC und VC wurde für die Viruslast im Blut der Mittelwert von drei Entnahmen innerhalb eines Jahres gebildet. Die Viruslast im Colon wurde zweimal im Abstand von 16 Wochen bestimmt und der Mittelwert von den beiden Entnahmen berechnet. Die beschriebenen Zellpopulationen in Blut und Colon wurden durchflusszytometrisch zweimal im Abstand von acht Monaten bestimmt. Auch hier ist der Mittelwert dargestellt. Bei den FC (Tier Nr. 12672 und 2201), die im Laufe der Studie seziiert werden mussten, wurde der Mittelwert von zwei durchflusszytometrischen Analysen und zwei Bestimmungen der Viruslast im Blut, und einer Bestimmung der Viruslast im Colon eingesetzt. Bei den Progressoren wurden die zum Zeitpunkt der Sektion erhobenen Werte verwendet. Es wurden mehrere Korrelationen zwischen CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen mit den Viruslasten im Blut und Colon analysiert.

Abbildung 39 stellt die Korrelationen zwischen der Viruslast im Blut und CD4⁺ T-Zellen (Abb. 39a), CD4⁺iNKTs (Abb. 39b), Th17 (Abb. 39c) und CD4⁺Tregs (Abb. 39d) dar. Diese Zellpopulationen wurden im Blut (rote Punkte) und im Colon (grüne Vierecke) bestimmt und mit der Plasmaviruslast korreliert. Die Korrelationsanalyse ergab, dass CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺iNKTs, Th17 und CD4⁺Tregs im Blut und im Colon invers mit der Viruslast im Blut korrelierten. Die Korrelationen waren in allen Fällen hochsignifikant.

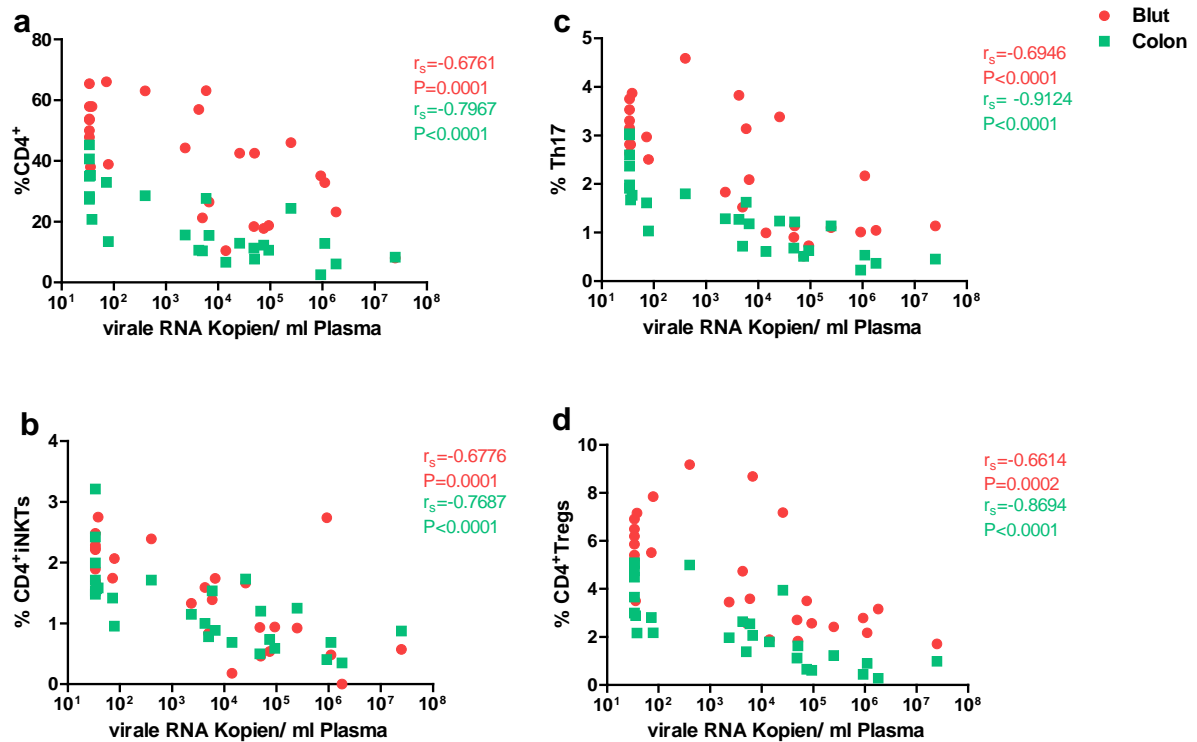


Abbildung 39: Korrelationen der viralen RNA-Kopien im Blut mit verschiedenen CD4⁺ Zellpopulationen aus Blut und Colon. Auf den y-Achsen sind die Prozentzahlen von a) CD4⁺ T-Zellen, b) CD4⁺iNKTS, c) Th17 und d) CD4⁺Tregs im Blut (rote Punkte) und im Colon (grüne Vierecke) aufgetragen, auf den x-Achsen die viralen RNA-Kopien pro ml Plasma in logarithmischer Skalierung. r_s gibt den Spearman-Korrelationskoeffizienten an und der p-Wert die Signifikanz.

Weiterhin wurden Korrelationsanalysen mit den gleichen Zellpopulationen und der Viruslast im Colon vorgenommen (Abb. 40). Es wurde eine inverse Korrelation zwischen der Viruslast im Colon und den Prozentzahlen der CD4⁺ T-Zellen (Abb. 40a), CD4⁺iNKTS (Abb. 40b), Th17 (Abb. 40c) und CD4⁺Tregs (Abb. 40d) in Blut und Colon festgestellt. Auch hier bestanden in allen Fällen hochsignifikante Abhängigkeiten (Abb. 40).

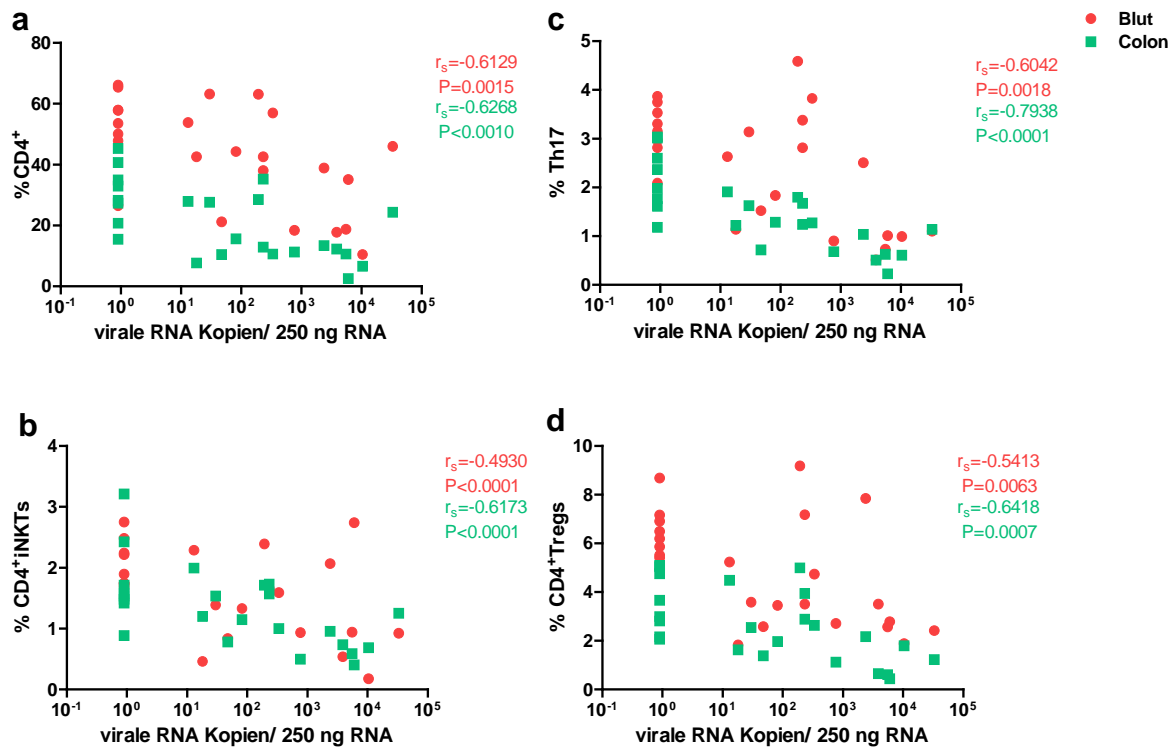


Abbildung 40: Korrelationen der viralen RNA-Kopien im Colon mit verschiedenen CD4⁺ Zellpopulationen aus Blut und Colon. Auf den y-Achsen sind die Prozentzahlen von a) CD4⁺ T-Zellen, b) CD4⁺iNKs, c) Th17 und d) CD4⁺Tregs im Blut (rote Punkte) und im Colon (grüne Vierecke) aufgetragen, auf den x-Achsen die viralen RNA-Kopien pro 250 ng gesamt-RNA in logarithmischer Skalierung. r gibt den Spearman-Korrelationskoeffizienten an und der p-Wert die Signifikanz.

Darüber hinaus wurden die Korrelation zwischen der Viruslast und CD8⁺ T-Zellen, CD8⁺Tregs und Tc17 untersucht. In Abbildung 41 ist auf der linken Seite die Korrelation dieser Zellpopulationen mit der Viruslast im Blut und auf der rechten Seite mit der Viruslast im Colon dargestellt. Die Zahlen der CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺Tregs in Blut und Colon korrelierten signifikant mit der Viruslast im Blut und im Colon (Abb. 41a-d). Die Prozentzahlen der Tc17 im Blut korrelierte wiederum invers mit der Plasmaviruslast (Abb. 41e). Darüber hinaus korrelierte die Prozentzahl der Tc17 im Colon mit der Viruslast im Colon (Abb. 41f). Die Prozentzahl der Tc17 im Colon korrelierte nicht mit der Viruslast im Blut und der Anteil der Tc17 im Blut korrelierte

nicht mit der Viruslast im Colon. In allen Fällen waren die Korrelationen hochsignifikant

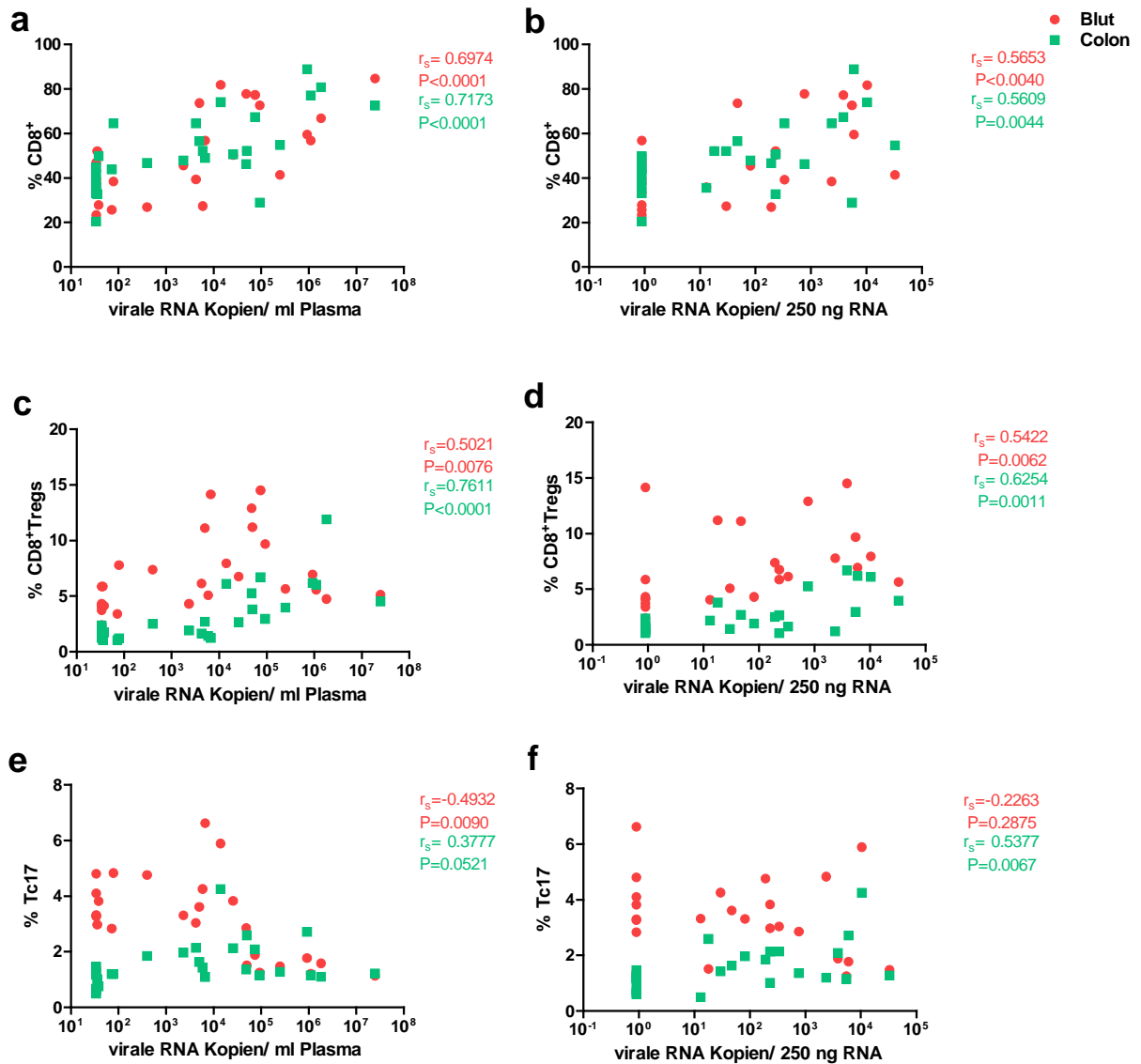


Abbildung 41: Korrelationen der viralen RNA-Kopien im Blut (links) und im Colon (rechts) mit verschiedenen CD8⁺ Zellpopulationen. Auf den y-Achsen sind die Prozentzahlen von CD8⁺ T-Zellen (a-b), CD8⁺Tregs (c-d) und Tc17 (e-f) im Blut (rote Punkte) und im Colon (grüne Vierecke) aufgetragen, auf den x-Achsen die viralen RNA-Kopien im Blut (rechts, Kopien/ml) und im Colon (links, Kopien/250 ng Gesamt-RNA) in logarithmischer Skalierung. r_s gibt den Spearman-Korrelationskoeffizienten an und der p-Wert die Signifikanz.

9. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen im Colon bei Langzeit-infizierten Rhesusaffen im Vergleich zu gesunden Tieren und Progressoren

Ein großer Teil des lymphatischen Gewebes befindet sich im Darm, entweder in Form von Follikeln (Induktionsbereich) oder von einzelnen Zellen in der LP (Effektorbereich), in denen das Virus zu hohen Titern repliziert [13]. Im Laufe der HIV-/SIV-Infektion kommt es häufig zu intestinalen Symptomen, die als HIV-/SIV-Enteropathie zusammengefasst werden. Der Grad der Entzündung, die im Darm während der HIV-/SIV-Enteropathie persistent erkennbar ist, kann histologisch bewertet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur histologischen Analyse der Darmschleimhaut Schnittpräparate von Colonbiopsien oder Colonresektaten mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Des Weiteren wurde eine Masson-Goldner-Färbung durchgeführt, um die Kollagenablagerungen im Darm zu bestimmen. Darüber hinaus wurde immunhistochemisch die Expression diverser Parameter im Darm (z. B. Mx1, CD4 Expression) bestimmt. Die folgenden Daten wurden bei den LTNPs im Rahmen von Querschnittsanalysen zu Zeitpunkten erhoben, bei denen die Tiere klinisch unauffällig waren. Bei den Progressoren erfolgte die Entnahme der Biopsien unmittelbar vor der Sektion. Die Biopsieentnahme erfolgte zufällig, sodass nur in einzelnen Proben isolierte Lymphfollikel des GALT nachweisbar waren. Aus diesem Grund lag der Untersuchungsfokus auf den Immunzellen der LP.

9.1 Histologische Auswertung von Colonbiopsien und Colonresektaten

Während sich die LTNPs in ihrer klinisch unauffälligen Phase befanden, konnten keine markanten histologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen der LTNPs oder zwischen LTNPs und SIV-negativen Tieren festgestellt werden. Einzig wurden gelegentlich geringgradige gemischtzellige Infiltrate in der LP beobachtet. Sowohl bei gesunden als auch bei SIV-infizierten Tieren wurden Zysten des obligat pathogenen Parasiten *Balantidium coli* im Darmlumen identifiziert.

Im Gegensatz dazu wurden in den untersuchten Colonbiopsien und Colonresektaten der Progressoren diverse Veränderungen diagnostiziert. In der Regel bestand eine ausgeprägte Colitis, die durch eine Infiltration der LP mit einem gemischtzelligen

Entzündungszellinfiltrat charakterisiert war. In Einzelfällen traten auch mehrkernige Riesenzellen in der LP auf (Abb. 42a). Mitunter war eine Infiltration der *Lamina muscularis mucosae* mit Entzündungszellen zu beobachten (Abb. 42b). Daneben bestanden Kryptabszessbildungen (Abb. 42c) und Kryptdilatationen (Abb. 42d) in unterschiedlicher Ausprägung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gruppe der LTNPs über insgesamt zweieinhalb Jahre beobachtet. Die Gruppe der EC blieb weitestgehend stabil, hingegen zeigten Tiere aus den Gruppen der VC und FC nach langfristiger Kontrolle der Infektion klinische Symptome und mussten gemäß Abbruchscore euthanasiert werden. Das klinische Bild und die histopathologischen Befunde variierten stark, jedoch gab es bei den meisten Tieren zum Zeitpunkt der Sektion auch Veränderungen im Intestinaltrakt. Bei Tier 13906 war eine geringgradige diffuse, chronisch-aktive, lymphoplasmazelluläre Colitis mit Kryptabszessbildungen, Nachweis von Balantidien im Darmlumen und einer deutlichen GALT Hyperplasie zu erkennen (Abb. 43). Eine CMV-Colitis mit Nachweis von charakteristischen Einschlusskörperchen des Virus und Ausbildung von Kryptabszessen wurde bei Tier 12672 festgestellt (Abb. 44). Das Tier 2219 wies eine hochgradige, chronische, herdförmige, granulomatöse Colitis mit Nachweis von säurefesten Stäbchen, die als *Mycobacterium intracellulare* typisiert wurden, auf. Ferner bestand bei diesem Tier eine fokale Umfangsvermehrung aus mesenchymalen spindelförmigen Zellen im *Colon sigmoideum*, die als Kaposi-Sarkom ähnliche Läsion angesprochen wurde.

Bei den Tieren 2153, 13909 und 8644 wurde eine geringgradige. bis mittelgradige. chronisch aktive Colitis diagnostiziert.

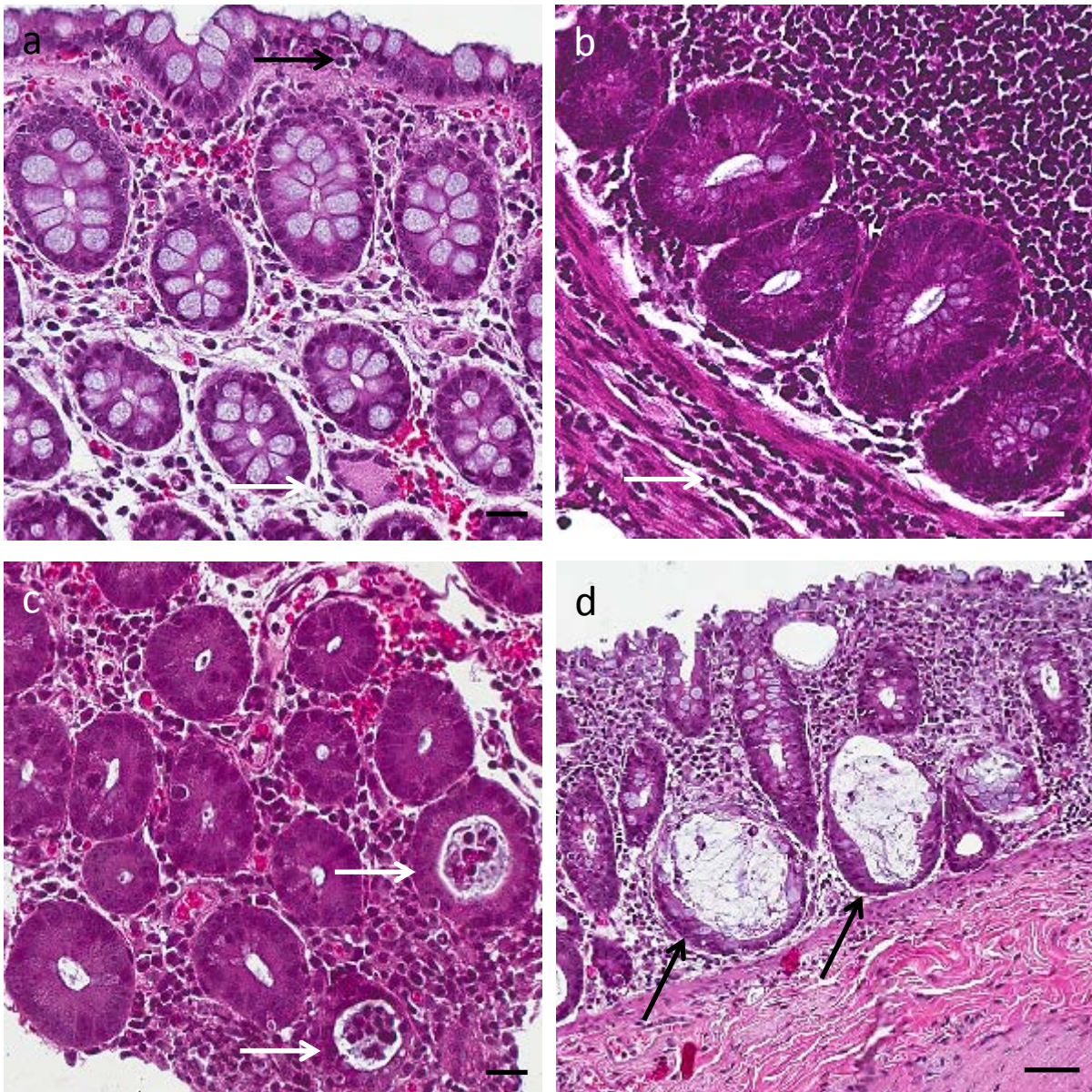


Abbildung 42: Histomorphologische Befunde im Colon von Progressoren, HE Färbung.

a) 2342: Riesenzelle in der LP (weißer Pfeil), Akkumulation und Migration von Entzündungszellen im Darmepithel (schwarzer Pfeil), Balken = 20 μm , b) 14893: Akkumulation von Entzündungszellen in der Lamina muscularis mucosae (weißer Pfeil), Balken = 20 μm , c) 14893: Kryptabszesse (weiße Pfeile), Balken = 20 μm , d) 14893: Kryptdilatation (schwarze Pfeile) und Infiltration der LP mit Entzündungszellen, Balken = 50 μm . LP = Lamina propria.

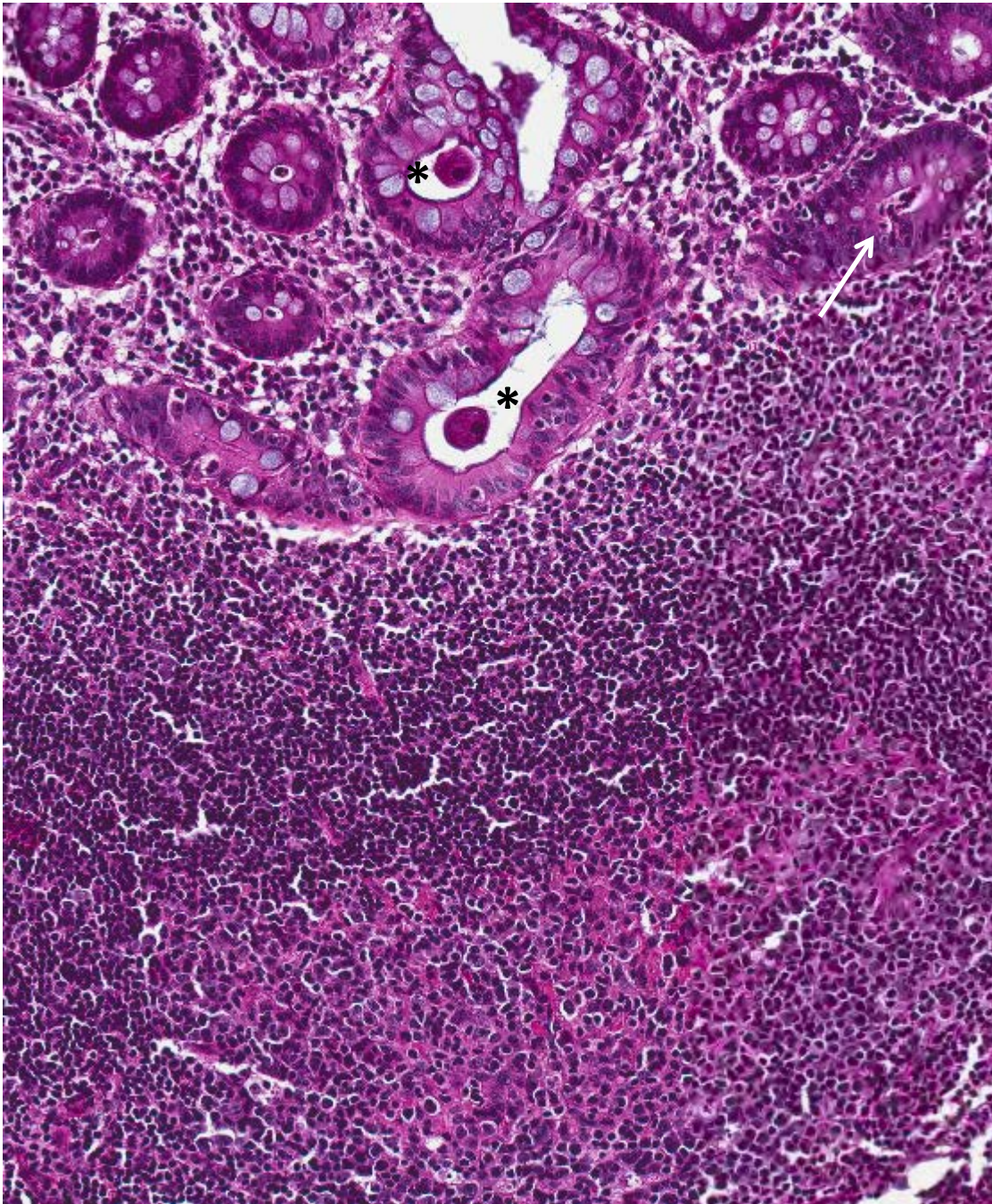


Abbildung 43: Histomorphologische Befunde im Colon eines failing Controllers (Tier Nr. 13906), HE Färbung.

Balantidium coli im Darmlumen (*), Kryptabszess (weißer Pfeil), GALT Hyperplasie und beginnende Depletion im unteren Bildabschnitt, Balken = 20 µm.

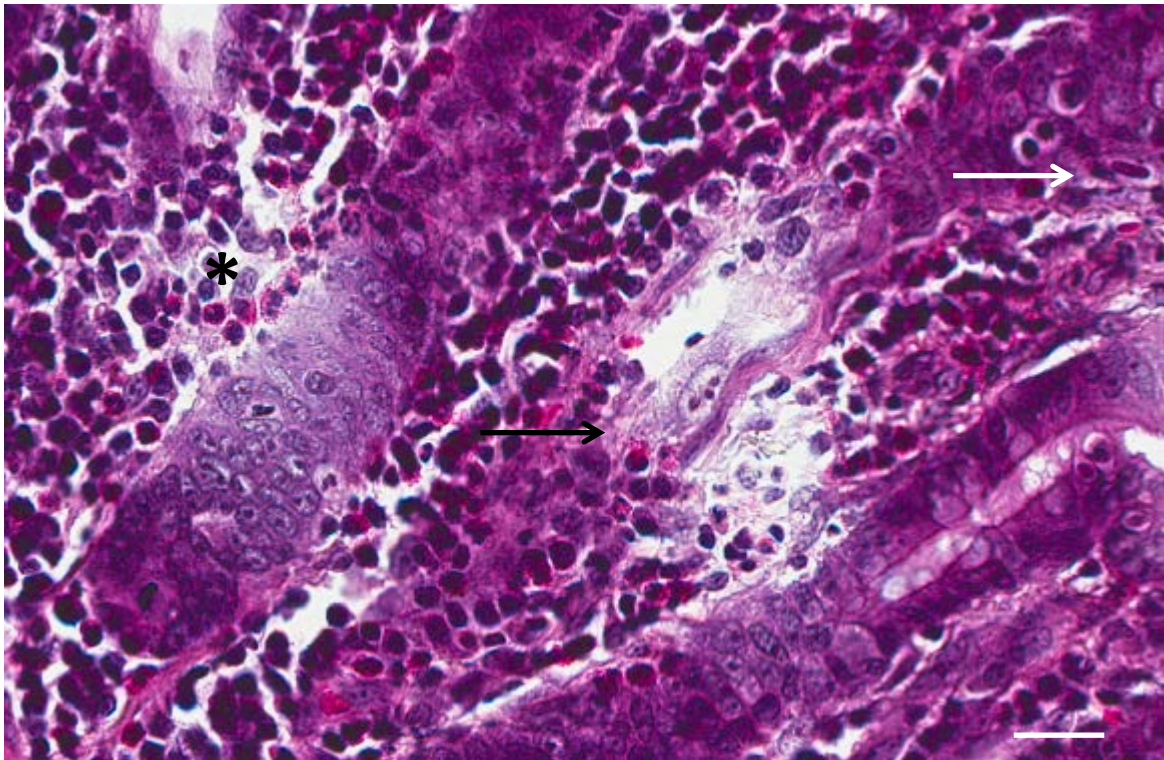


Abbildung 44: Histomorphologische Befunde im Colon eines failing Controllers (Tier Nr. 12672) mit CMV-Infektion, HE Färbung.

Intraepitheliales CMV-Einschlusskörperchen im Colon (weißer Pfeil), Infiltration von eosinophilen Granulozyten (Asterisk), Ödematisierung und beginnende Kryptabszessbildung (schwarzer Pfeil), Balken = 20 μ m.

9.2 Auswertung der Kollagenablagerungen im Colon

Zur Bestimmung von Kollagenablagerungen wurde die Trichrom-Färbung nach Masson Goldner angewandt. Ziel war die Dickenmessung des subepithelialen Kollagenbandes in Colonbiopsien von LTNPs. Das Biopsiematerial erwies sich als nicht optimal für diese Untersuchung, da der Anschnitt der Proben sehr unterschiedlich und die Menge des Materials gering waren. Colonresektate, die im Zuge der Sektion entnommen wurden, ließen sich hingegen problemlos auswerten. Es wurde die Dicke des Bandes in fünf verschiedenen Lokalisationen, in denen das Gewebe vertikal angeschnitten war, gemessen und der Mittelwert davon gebildet. Zur Untersuchung wurde Sektionsmaterial von SIV-negativen Tieren, FC und Progressoren verwendet. In Abbildung 45a ist das subepitheliale Kollagenband bei einem SIV-negativen Tier dargestellt. Im Vergleich zu SIV-negativen Tieren war das Kollagenband sowohl in der Gruppe der FC als auch der Progressoren signifikant verdickt (Abb. 45b und c). Gelegentlich zeigten sich auch Kollagenablagerungen in der LP (Abb. 45d). Bei SIV-negativen Tieren betrug die Dicke des Kollagenbandes zwischen 2,6 und 4 μm . Bei den FC und bei Progressoren war das Band um das 2-fache verdickt, mit einem Mittelwert (\pm Standardfehler) von 6,5 (\pm 0,3) bei FC und von 6,3 (\pm 0,4) bei Progressoren. In Abbildung 46 sind der Vergleich der Dicke des Kollagenbandes und die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen schematisch dargestellt.

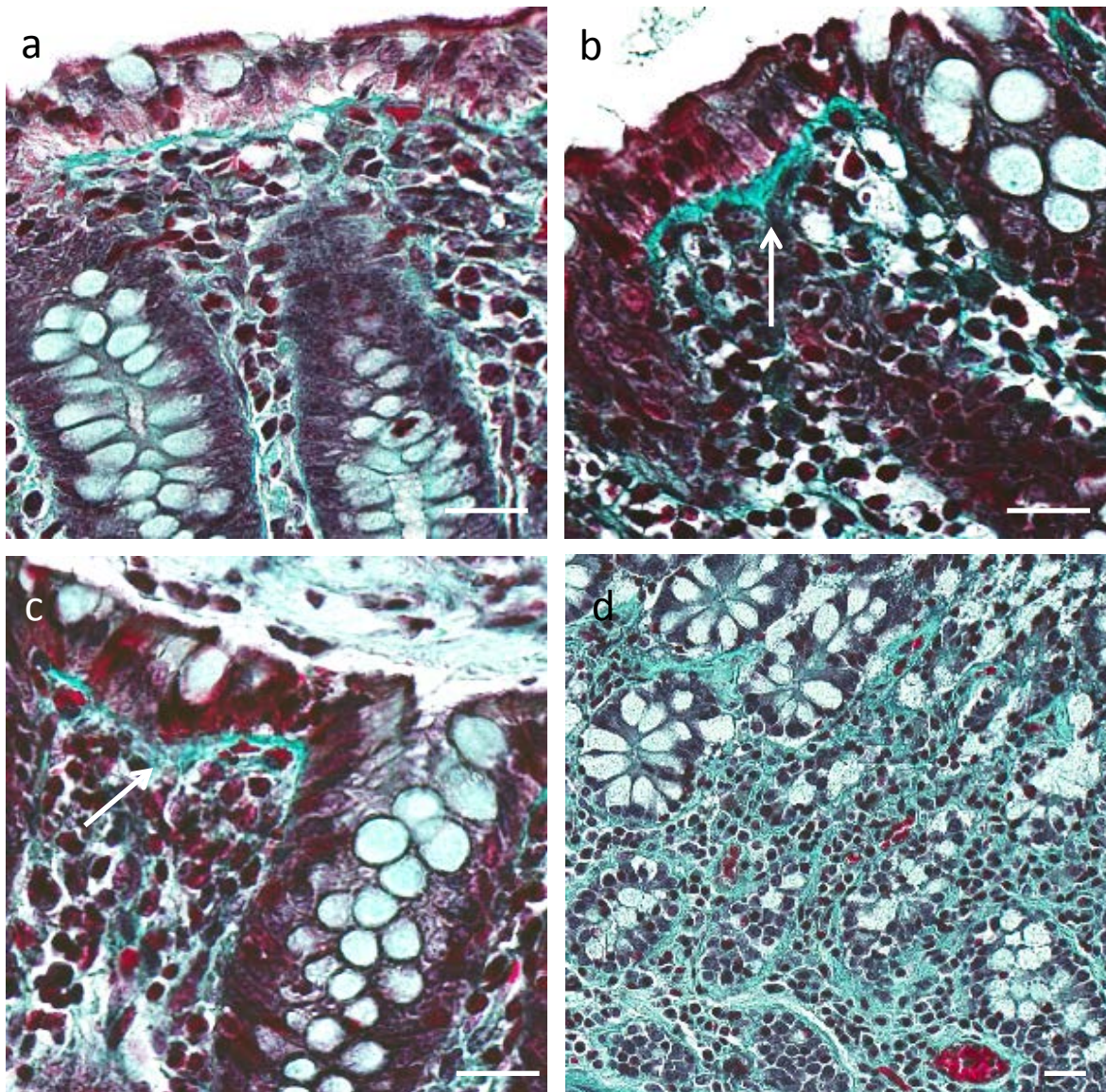


Abbildung 45: Färbung nach Masson Goldner an Sektionsmaterial von SIV-negativen Tieren, FC und Progressoren. Zunahme der Dicke des subepithelialen Kollagenbandes bei FC und Progressoren.

a) 15265: SIV-negatives Tier, Balken = 20 µm; b) 13906: FC, verdicktes Band (weißer Pfeil), Balken = 20 µm, c) 14960: Progressor, verdicktes Band (weißer Pfeil), Balken = 20 µm, d) 2342: Progressor mit hochgradiger Kollagenablagerungen in der LP und Verlust der Struktur des Dickdarmes, Balken = 20 µm. FC = failing Controller, LP = Lamina propria.

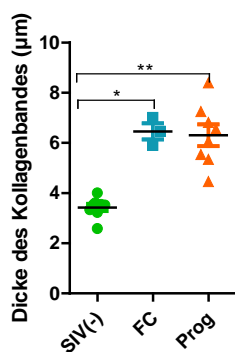


Abbildung 46: Dicke des Kollagenbandes bei SIV-negativen Tieren, FC und Progressoren gemessen in Sektionsmaterial. Für jedes Tier ist ein Mittelwert dargestellt, der aus fünf Einzelauswertungen gebildet wurde. Der Mittelwert der Gruppen ist als Querstrich dargestellt. Die Sterne und Querbalken in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

9.3 Immunhistochemische Untersuchungen

9.3.1 Vergleich der Mx1 Expression in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen, EC, VC, FC und Progressoren

Das IFN- α -induzierte Protein Mx1 (engl. *myxovirus resistance protein 1*) wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, darunter Lymphozyten, Enterozyten und Nervenzellen. Mx1 besitzt eine antivirale Wirkung, die in der akuten Phase zur Limitierung von Infektionen beiträgt. Hingegen ist die Expression in der chronischen Phase mit persistierender Immunaktivierung assoziiert. In dieser Arbeit wurde das Mx1-Protein als Entzündungsmarker im Colon eingesetzt. Die immunhistochemischen Färbungen belegen, dass das Mx1 Protein im Zytoplasma von Immunzellen, Epithelzellen und Enterozyten exprimiert wurde. Bei den EC war nur eine minimale Expression des Proteins in der LP (Abb. 47a) zu beobachten. Auch in der Gruppe der VC blieb die Expression moderat (Abb. 47b), während FC und Progressoren eine hochgradige Mx1 Expression in der LP und im Epithel aufwiesen (Abb. 47c und d). In der Abbildung 48 sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen dargestellt. Die Mittelwerte und Standardfehler der gefärbten Fläche der Biopsien lagen bei SIV-negativen Tieren bei 3,2 % ($\pm 0,6$), bei EC bei 2 % ($\pm 0,5$), bei VC bei 5,5 % ($\pm 0,9$), bei FC bei 24,2 % ($\pm 6,9$), und bei Progressoren bei 35,9 % ($\pm 11,5$).

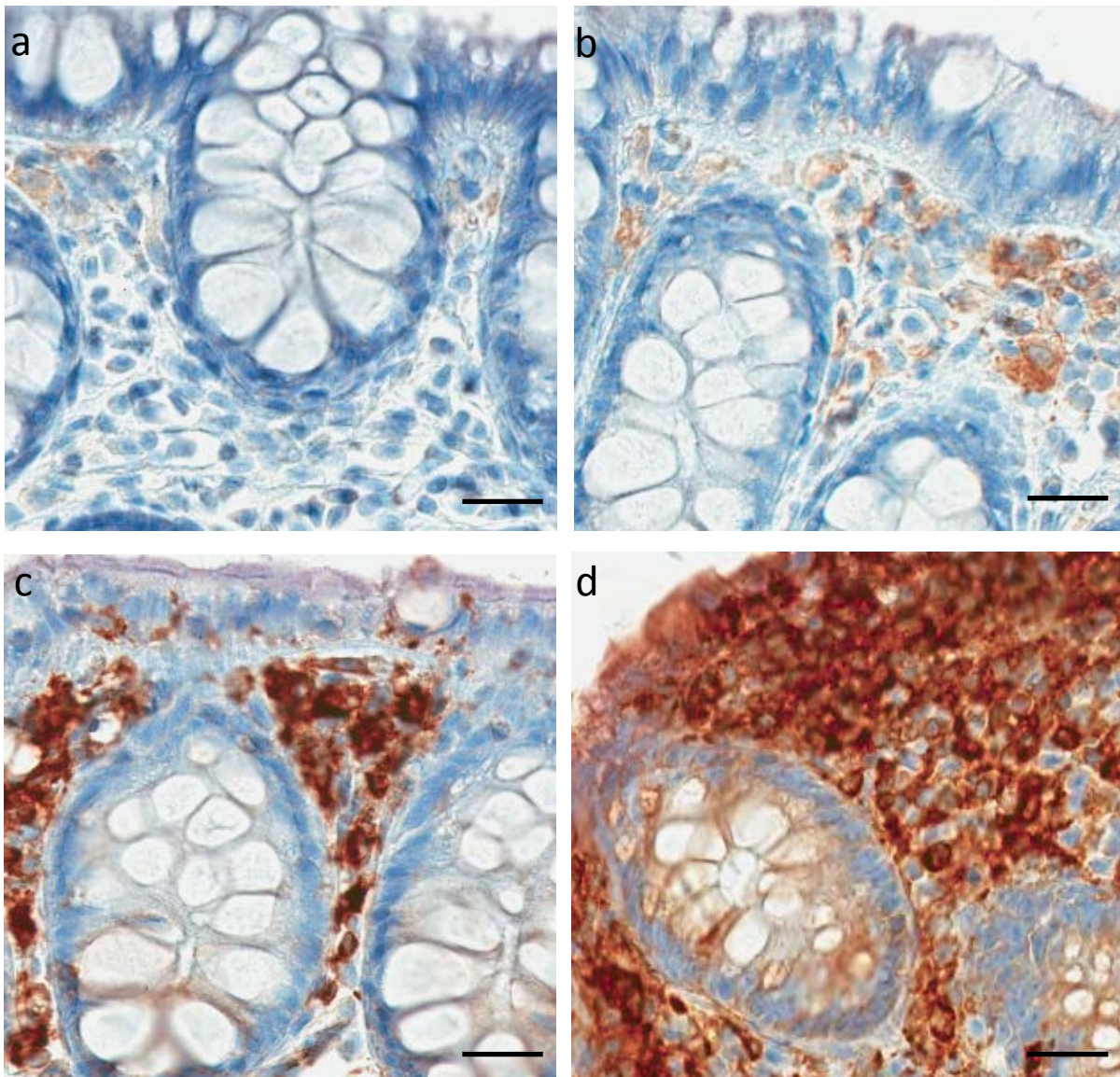


Abbildung 47: Immunhistochemischer Nachweis der Mx1 Expression in der LP, SABC-Methode, DAB. Erhöhte Expression im Colon von FC und Progressoren, dargestellt sind Biopsien von repräsentativen Tieren der verschiedenen Gruppen: a) 2139: EC, Balken = 20 μm , b) 13907: VC, Balken = 20 μm , c) 12672: FC, Balken = 20 μm , d) 15226: Progressor, Balken = 20 μm . EC = Elite Controller, VC = virämischer Controller, FC = failing Controller, LP = Lamina propria.

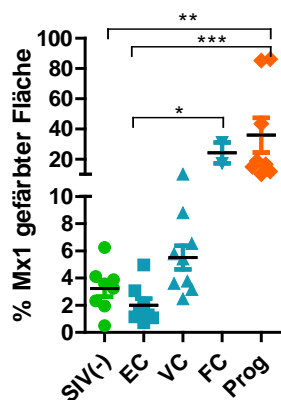


Abbildung 48: Prozentualer Anteil der gefärbten Fläche für Mx1. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jeder Gruppe. Die Sterne und Querbalken in der Grafik zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$), EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

9.3.2 Vergleich der Apoptoserate in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren

Caspasen sind Enzyme der Familie der Zysteinproteasen und stellen wichtige Enzyme der Apoptose dar. Sie sind Teil einer Enzymkaskade, die letztlich zum Tod der Zelle führt. Unter Apoptose versteht man den physiologischen Zelltod, der durch Caspase-3 ausgelöst wird und unter Pyroptose den entzündlichen Zelltod im Rahmen von Infektionserkrankungen, in dem Caspase-1 involviert ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene humane Antikörper, die gegen Caspase-1 gerichtet sind, getestet, jedoch erwies sich keiner als kreuzreaktiv mit Rhesusaffen (Tabelle 10). Um die Apoptoserate der Epithelzellen und der Immunzellen in der LP zu analysieren, wurde ein Antikörper gegen aktivierte (engl. *cleaved*) Caspase-3 eingesetzt und die Prozentzahl der gefärbten Zellen bestimmt. In der Gruppe der EC (Abb. 49a) war die Apoptoserate mit 0,25 % ($\pm 0,07$) apoptotischer Zellen im Vergleich zu SIV-negativen Tieren (0,11 % $\pm 0,02$) leicht erhöht. Bei VC (Abb. 49b, 0,39 % $\pm 0,09$) und Progressoren (Abb. 49d, 0,43 % $\pm 0,06$) lag eine signifikant erhöhte Apoptoserate sowohl im Epithel als auch in der LP im Vergleich zu nicht infizierten Tieren vor (Abb. 50). Die Werte der FC wiesen eine hohe Streuung auf (Abb. 50, 0,55 % $\pm 0,35$).

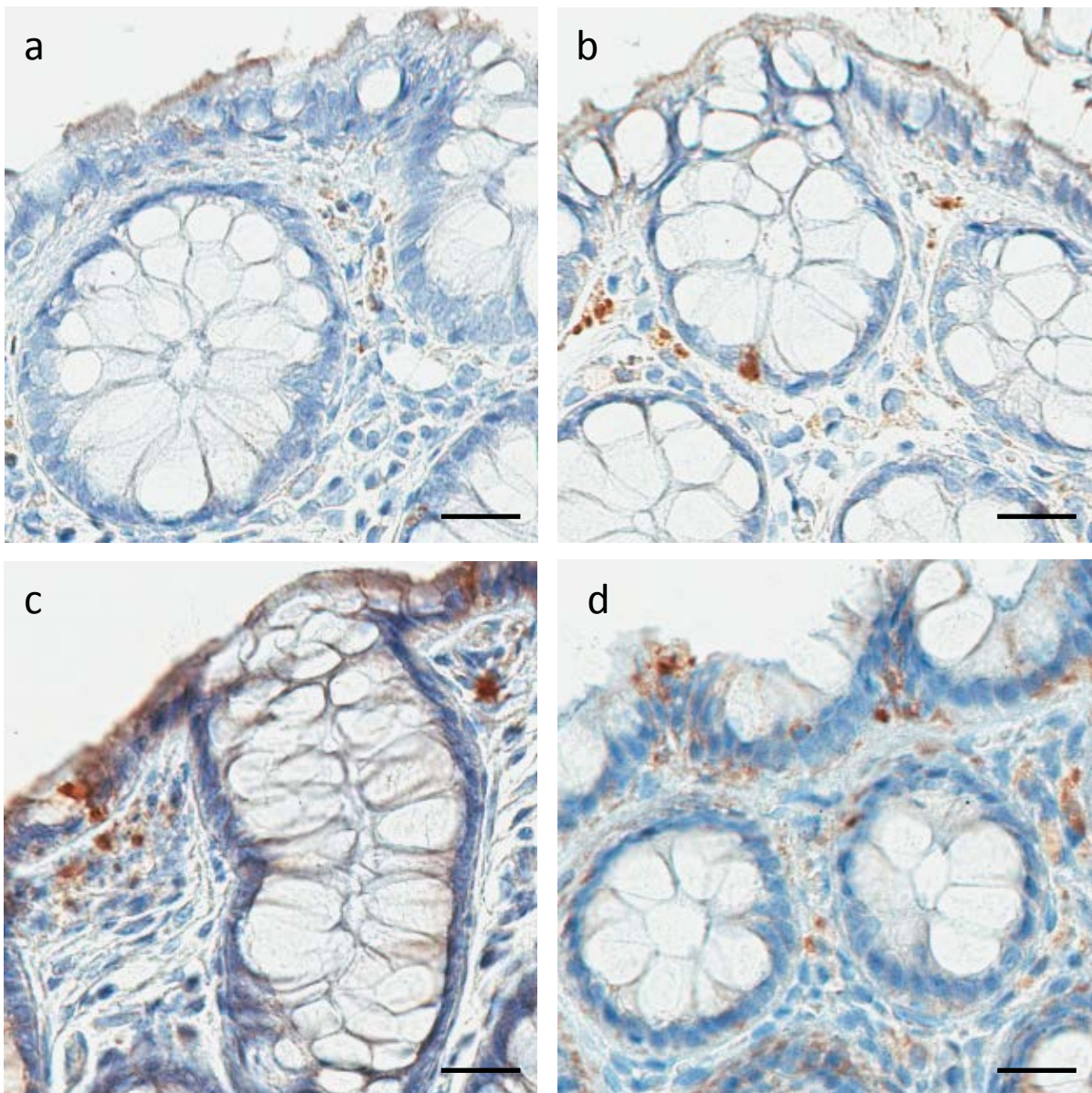


Abbildung 49: Immunhistochemischer Nachweis von cleaved Caspase-3 in der LP und im Colonepithel, SABC-Methode, DAB. Niedrige Apoptoserate im Colon von EC, dargestellt sind Biopsien von repräsentativen Tieren der verschiedenen Gruppen: a) 2284: EC, Balken = 20 µm, b) 13907: VC, Balken = 20 µm, c) 12672: FC, Balken = 20 µm, d) 2342: Progressor; Balken = 20 µm. EC = Elite Controller, VC = virämischer Controller, FC = failing Controller, LP = Lamina propria.

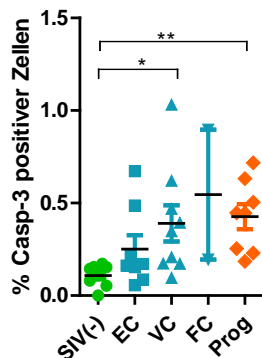


Abbildung 50: Prozentualer Anteil der Caspase-3-positiven Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jeder Gruppe. Die Sterne und Querstriche in der Grafik zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

9.3.3 Vergleich der Akkumulierung von Lipopolysacchariden in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der externen Membran gramnegativer Bakterien. Sie werden beim Zerfall der Bakterien freigesetzt und wirken toxisch auf die Zellen des Wirtes. LPS gelangen hauptsächlich aufgrund einer gestörten Darmbarriere in die Blutzirkulation und werden häufig als Marker für die Translokation mikrobieller Produkte genutzt. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Akkumulierung von LPS in der LP, in den Krypten und im Darmepithel bewertet. Bei EC war eine niedrige bis moderate Ansammlung von LPS im Colon zu beobachten (Abb. 51a), die im Vergleich zu SIV-negativen Tieren eindeutig erhöht war. In der Gruppe der VC war die Akkumulierung moderat, jedoch signifikant erhöht im Vergleich zu nicht infizierten Tieren (Abb. 51b). FC und Progressoren zeigten eine hochgradige Akkumulierung von LPS im Colon (Abb. 51c und d). Wie aus Abbildung 52 ersichtlich ist, bestand eine hohe Streuung der Werte innerhalb der infizierten Gruppen. Der Mittelwert lag bei SIV-negativen Tieren bei 8,7 % ($\pm 1,8$), bei EC bei 20,7 % ($\pm 4,0$), bei VC bei 29,8 % ($\pm 4,9$), bei FC 27,0 % ($\pm 10,7$) und bei Progressoren bei 26,5 % (± 5). Aufgrund hoher Streuung bei den FC und des einen Ausreißerwertes in der Gruppe der Progressoren waren die Unterschiede zu den nicht infizierten Tieren nicht signifikant (Abb. 52).

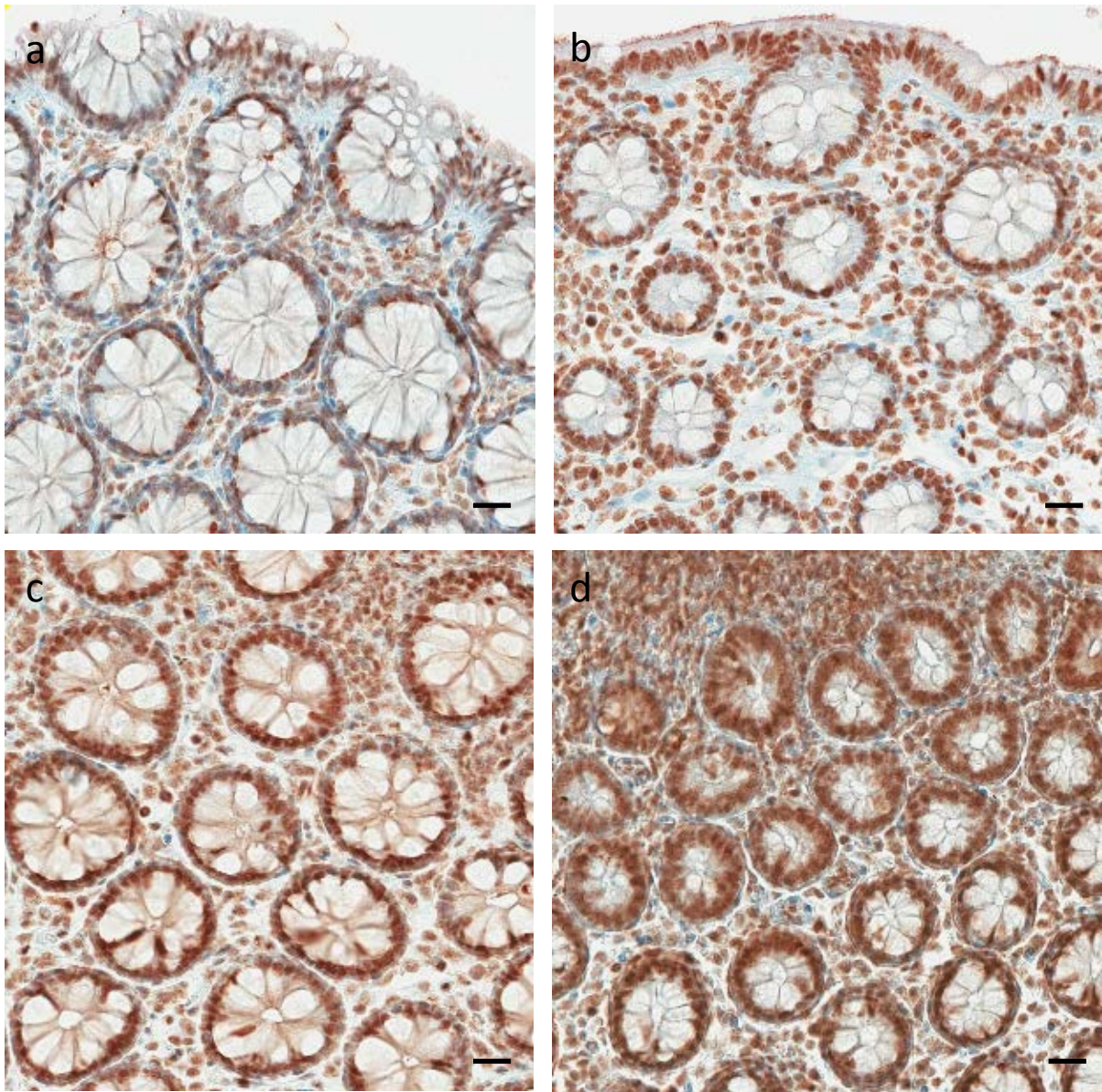


Abbildung 51: Immunhistochemischer Nachweis von LPS, SABC-Methode, DAB. Hochgradige Akkumulierung von LPS im Darm von FC und Progressoren, dargestellt sind Biopsien von repräsentativen Tieren der verschiedenen Gruppen: a) 2284: EC, Balken = 20 µm, b) 13930: VC, Balken = 20 µm, c) 12672: FC; Balken = 20 µm, d) 2342: Progressor, Balken = 20 µm. EC = Elite Controller, VC = virämischer Controller, FC = failing Controller, LPS = Lipopolysaccharide.

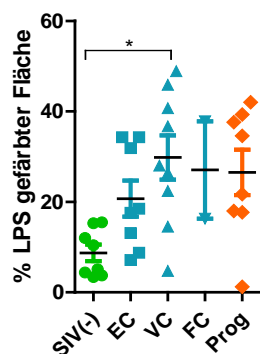


Abbildung 52: Prozentualer Anteil der gefärbten Fläche für LPS. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jeder Gruppe. Die Sterne und Querbalken in der Grafik zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$), EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren, LPS = Lipopolysaccharide.

9.3.4 Vergleich der Expression des Oberflächenmarkers CD4 in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren

Das CD4 Oberflächenmolekül stellt den Hauptrezeptor für HIV und SIV dar und CD4-positive Zellen werden im Laufe der Infektion depletiert. Colonbiopsien von allen Gruppen wurden untersucht und die gefärbte Fläche berechnet. Der Mittelwert lag bei SIV-negativen Tieren bei 19,4 % ($\pm 2,2$). Bei den SIV-infizierten Tieren gab es keinen Verlust an CD4⁺ T-Zellen in der Gruppe der EC (18,8 % $\pm 1,3$, Abb. 53a). Selbst bei VC wurde ein geringer Verlust dieser Zellpopulation festgestellt (17,2 % $\pm 0,9$, Abb. 53b). FC und Progressoren zeigten hingegen eine Depletion der CD4⁺ T-Helferzellen in der Darmschleimhaut (Abb. 53c und d), die Werte lagen jeweils bei 12,6 % ($\pm 1,3$) und 15 % ($\pm 1,6$). Wie Abbildung 54 zu entnehmen ist, gab es hinsichtlich der gefärbten Fläche für CD4 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

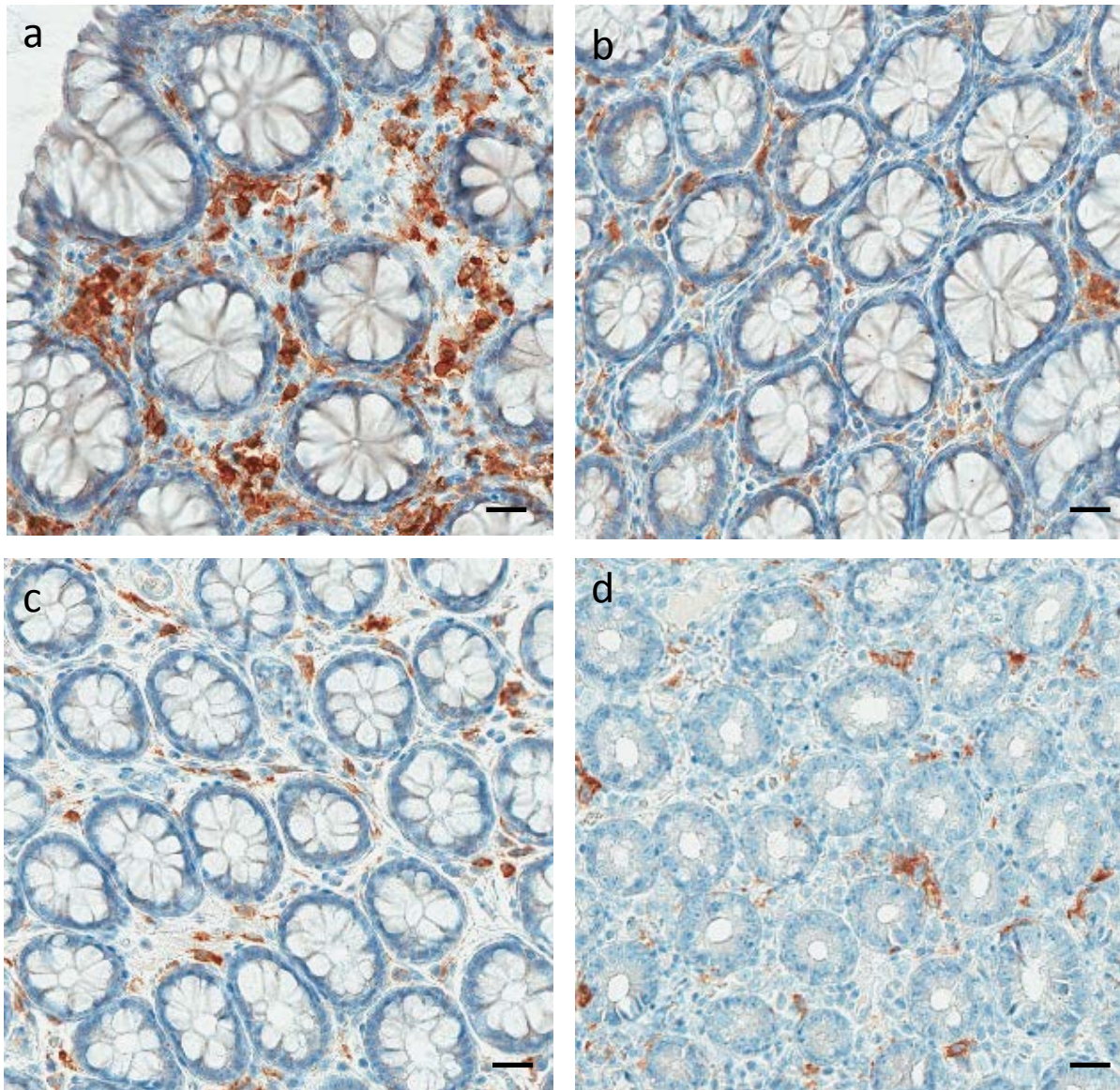


Abbildung 53: Immunhistochemischer Nachweis der CD4 Expression auf den Immunzellen der LP, SABC-Methode, DAB. Vergleichsweise hoher Anteil an CD4 positiven Zellen im Colon von EC, dargestellt sind Biopsien von repräsentativen Tieren der verschiedenen Gruppen: a) 12671: EC, Balken = 20 μm , b) 2153: VC Balken = 20 μm , c) 12672: FC, Balken = 20 μm , d) 14893: Progressor, Balken = 20 μm . EC = Elite Controller, VC = virämischer Controller, FC = failing Controller, LP = Lamina propria.

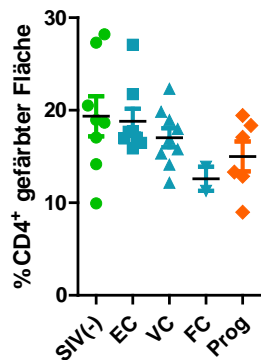


Abbildung 54: Prozentualer Anteil der gefärbten Fläche für CD4. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jeder Gruppe. (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test), EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

9.3.5 Vergleich von IL-17-sezernierenden Immunzellen in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren

Das proinflammatorische Zytokin IL-17 wird von diversen Immunzellen sezerniert. In dieser Arbeit wurde die Prozentzahl der IL-17 sezernierenden Zellen in der LP gemessen. Insgesamt ist die Population dieser Zellen im Colon auch bei SIV-negativen Tieren gering, der Mittelwert beträgt bei gesunden Tieren 0,51 % ($\pm 0,07$). In Abbildung 55 sind IL-17-positive Zellen in der LP und in einem Lymphfollikel von SIV-negativen (Abb. 55a und c) und SIV-infizierten Tieren (Abb. 55 b und d) dargestellt, wobei IL-17 im Zytoplasma nachweisbar ist. Bei der Auswertung wurde nur die Anzahl der Zellen in der LP berücksichtigt, da die Verteilung von Lymphfollikeln in den Biopsien sehr unterschiedlich war. Im Vergleich zu SIV-negativen Tieren war die Anzahl der IL-17-sezernierenden Zellen in allen infizierten Gruppen deutlich vermindert, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 56), was vermutlich auf mindestens einen Ausreißer pro Gruppe zurückzuführen ist. Der Mittelwert lag bei EC bei 0,19 % ($\pm 0,05$), bei VC bei 0,23 % ($\pm 0,07$) bei FC bei 0,11 % ($\pm 0,02$) und bei Progressoren bei 0,32 % ($\pm 0,06$).

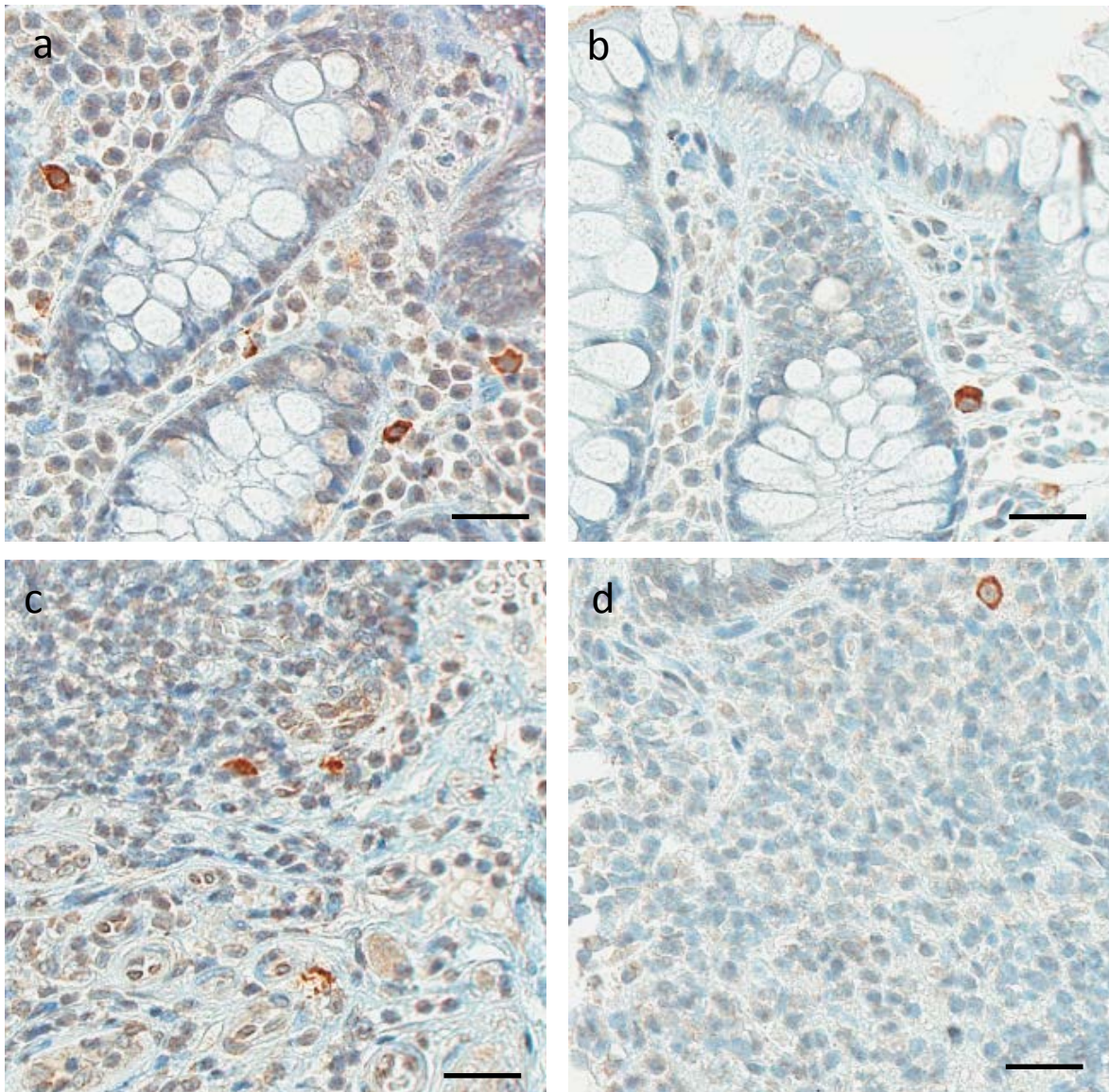


Abbildung 55: Immunhistochemischer Nachweis von IL-17 produzierenden Immunzellen in der LP und in Lymphfollikeln, SABC-Methode, DAB. Abnahme der Anzahl positiver Zellen in allen infizierten Gruppen, dargestellt sind Biopsien von repräsentativen SIV-negativen und SIV-positiven Tieren: a) 2232: LP eines SIV-negativen Tieres, Balken = 20 µm, b) 8644: LP eines VC, Balken = 20 µm, c) 2232: Lymphfollikel eines SIV-negativen Tieres, Balken = 20 µm, d) 8644: Lymphfollikel eines VC, Balken = 20 µm. VC = virämischer Controller, LP = Lamina propria.

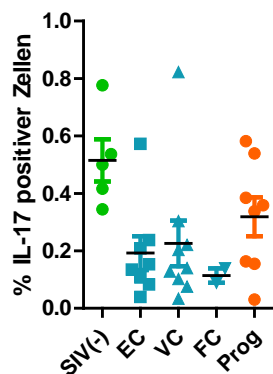


Abbildung 56: Prozentualer Anteil der IL-17-positiven Zellen in der LP. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jeder Gruppe, (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test) EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren, LP = Lamina propria.

9.3.6 Vergleich von regulatorischen T-Zellen in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren

Die regulatorischen Zellen wurden in dieser Arbeit durch die Expression des intranukleären Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) identifiziert. Mehrere Immunzellen wie z. B. CD4⁺ T-Helferzellen, zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und iNKT-Zellen können das FoxP3 Protein exprimieren. Im Rahmen dieser Studie waren FoxP3-positive Zellen immunhistochemisch in der LP und in Lymphfollikeln von Rhesusaffen nachweisbar. In Abbildung 57a sind regulatorische Zellen in der LP und in Abbildung 57c in einem Lymphfollikel eines gesunden Tieres dargestellt. Da nicht in jeder Biopsie Lymphfollikel vorhanden waren, wurde die Anzahl der Zellen, die das FoxP3 im Nukleus beinhalten, in der LP analysiert. Bei gesunden Tieren wurden 2,88 % ($\pm 0,36$) regulatorische Zellen gemessen. Ein Abfall der regulatorischen Zellen in der LP wurde bei allen Subgruppen der LTNPs beobachtet. Insbesondere wurde in der Gruppe der FC ein deutlicher Verlust dieser Zellpopulation festgestellt, bei denen der Mittelwert bei 1,02 % ($\pm 0,39$) lag. Bei EC und VC wurde eine moderate Abnahme beobachtet. Die Werte lagen jeweils bei 2,39 % ($\pm 0,35$) und 1,97 % ($\pm 0,32$). In der Gruppe der Progressoren gab es Tiere, bei denen die regulatorischen Zellen vermindert waren (Abb. 57 b und d), während bei anderen hohe Werte beobachtet wurden. Der Mittelwert lag in dieser Gruppe bei 2,69 % ($\pm 0,55$). In der Abbildung 58 sind die Unterschiede zwischen den Gruppen schematisch dargestellt.

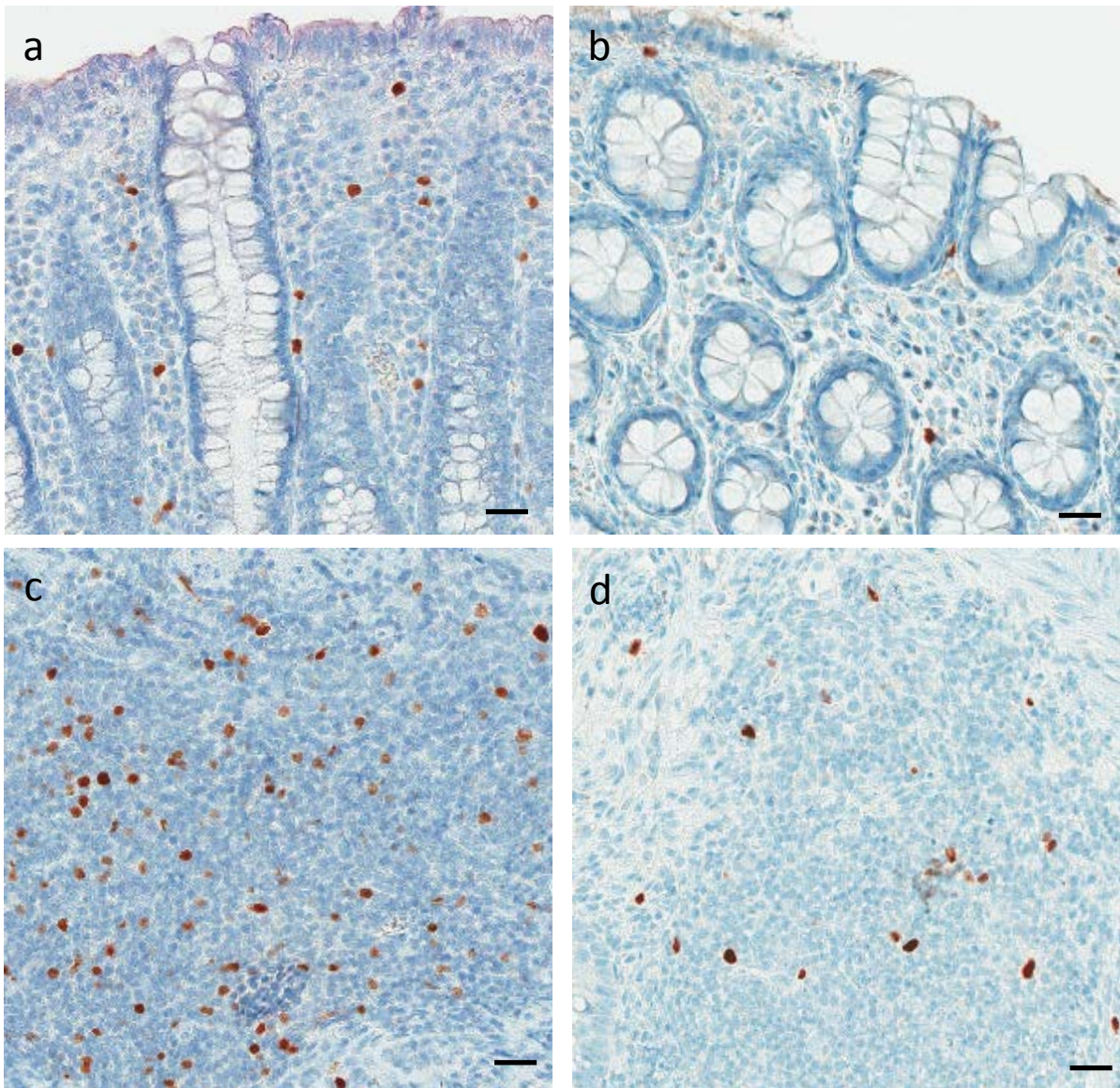


Abbildung 57: Immunhistochemischer Nachweis von FoxP3-positiven Immunzellen in der LP und in Lymphfollikeln, SABC-Methode, DAB. Verlust von FoxP3-positiven Zellen in allen infizierten Gruppen, dargestellt sind Biopsien von repräsentativen SIV-negativen und SIV-positiven Tieren: a) 2232: LP eines SIV-negativen Tieres, Balken = 20 µm, b) 2342: LP eines Progressors, Balken = 20 µm, c) 2232: Lymphfollikel eines SIV-negativen Tieres, Balken = 20 µm, d) 15226: Lymphfollikel eines Progressors, Balken = 20 µm, LP = Lamina propria.

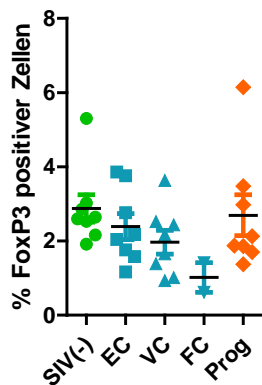


Abbildung 58: Prozentualer Anteil der FoxP3-positiven Zellen in der LP. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jeder Gruppe (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test), EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren, LP = Lamina propria.

9.3.7 Vergleich der Expression des GPR-15 Korezeptors in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren

GPR-15 (engl. *orphan G-protein-coupled receptor 15*) oder BOB (engl. *brother of Bonzo*) ist ein Korezeptor für HIV und SIV, der mit der HIV-Enteropathie in Verbindung zu stehen scheint. Die immunhistochemische Darstellung des Rezeptors im Colon von Rhesusaffen ergab, dass SIV-negative Tiere eine geringe Menge des Rezeptors exprimieren. Bei diesen Tieren entspricht der Mittelwert 0,08 % ($\pm 0,02$). Ähnliche Prozentsätze waren bei den Progressoren zu beobachten, während bei den LTNPs die Prozentsätze im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht waren, insbesondere bei den FC (Abb. 59, 60). Insgesamt war der Anteil der Immunzellen, die in der LP den Korezeptor GPR-15 exprimierten, gering und die Mittelwerte und Standardfehler ergaben sich in den untersuchten Gruppen wie folgend dargestellt: EC: 0,18 % ($\pm 0,03$), VC: 0,13 % ($\pm 0,03$), FC: 0,50 % ($\pm 0,16$), Progressoren: 0,08 % ($\pm 0,01$).

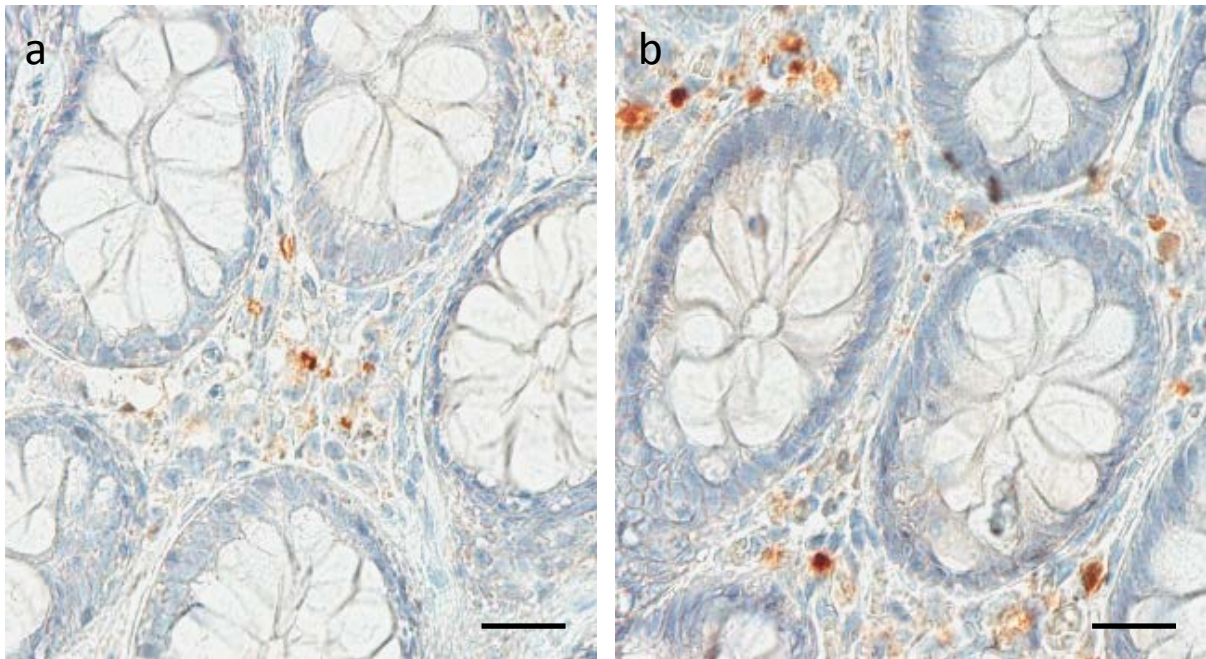


Abbildung 59: Immunhistochemischer Nachweis der Expression des Korezeptors GPR-15 auf Immunzellen in der LP, SABC-Methode, DAB. Erhöhte Expression bei allen LTNPs, insbesondere bei den FC, dargestellt sind Biopsien von repräsentativen LTNPs: a) 2172: EC, Balken = 20 µm, b) 2201: FC, Balken = 20 µm. EC = Elite Controller, FC = failing Controller, LTNPs = long-term non-progressors, LP = Lamina propria.

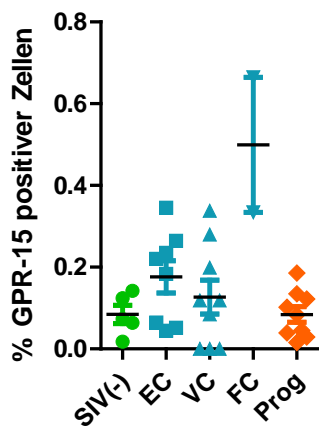


Abbildung 60: Prozentualer Anteil der GPR-15-positiven Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jeder Gruppe (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test), EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren.

9.3.8 Vergleich der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 in Colonbiopsien von SIV-negativen Rhesusaffen EC, VC, FC und Progressoren

Das nukleäre Protein Ki67 wird in der immunhistochemischen Diagnostik routinemäßig als Proliferationsmarker eingesetzt. Mitotisch aktive Zellen werden angefärbt, ruhende Zellen hingegen nicht. Im Rahmen dieser Studie wurde die gesamte Proliferation von Immunzellen und Epithelzellen im Colon der unterschiedlichen Gruppen ausgewertet. Darüber hinaus wurde explizit die Proliferation von Immunzellen in der LP berücksichtigt, da eine erhöhte Proliferation von Immunzellen im Kontext der generalisierten Immunaktivierung in allen Organen zu erwarten ist. In Abbildung 61a ist die gesamte Proliferation in einer Biopsie von einem SIV-negativen Rhesusaffen dargestellt, der Mittelwert bei gesunden Tieren beträgt $47,8 (\pm 1,9)$. Eine erhöhte Proliferation von Epithelzellen und Immunzellen wurde bei allen infizierten Tieren beobachtet (Abb. 61b-d). Die Werte lagen in den verschiedenen Gruppen sehr nahe beieinander (EC: $54,7 \pm 2,9$, VC: $51,6 \pm 1,7$, FC: $59,2 \pm 2,9$ und Progressoren $54,2 \pm 6,0$), ohne dass die Unterschiede signifikant waren (Abb.62a). Das gleiche galt auch für die Proliferation der Immunzellen in der LP (Abb. 62b).

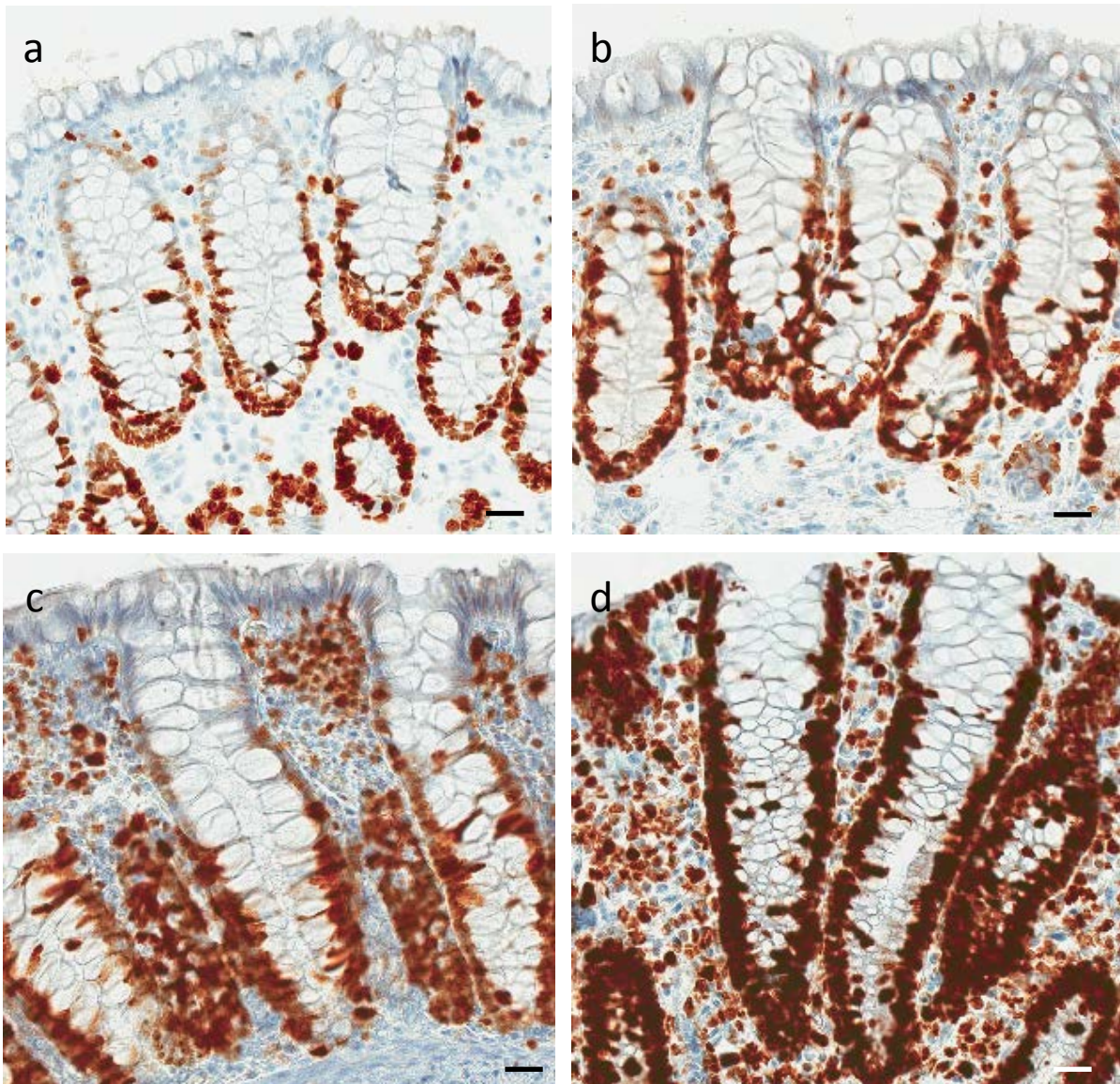


Abbildung 61: Immunhistochemischer Nachweis von Ki67-positiven Zellen im Epithel, in den Krypten und in der LP, SABC-Methode, DAB. Erhöhte Proliferation im Colon aller infizierten Gruppen, dargestellt sind Biopsien von repräsentativen Tieren der verschiedenen Gruppen: a) 2232: SIV-negatives Tier, Balken = 20 µm, b) 2155: EC, Balken = 20 µm, c) 12672: FC, Balken = 20 µm, d) 15226: Progressor, Balken = 20 µm. EC = Elite Controller, FC = failing Controller, LP = Lamina propria.

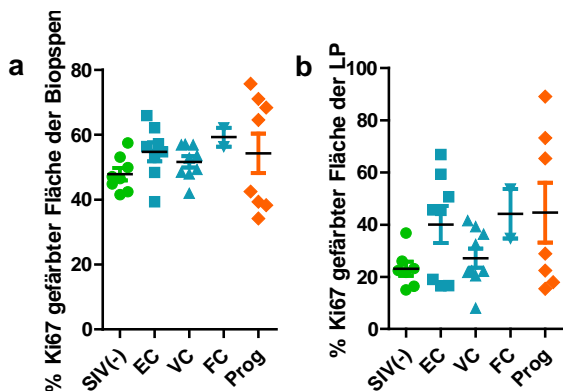


Abbildung 62: Prozentualer Anteil der gefärbten Fläche der Biopsien (a) und der LP (b). Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jeder Gruppe. (Dunn's Test nach Kruskal-Wallis-Test), EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, Prog = Progressoren, LP = Lamina propria.

9.3.9 Immunhistochemische Darstellung des Claudin-3 Proteins in Colonbiopsien und Colonresektaten

Epithelzellen sind über „tight junctions“ verbunden und Claudine stellen die wichtigsten Proteine dieser Zellverbindungen dar. In dieser Arbeit wurde Claudin-3 analysiert, um die Integrität des Epithels im Colon zu bewerten. Ziel der Studie war, Brüche im Epithel von Biopsien auszumessen. Die Intensität der Färbung erwies sich als irrelevant und schien eher mit der Dicke des Schnittes zu korrelieren. Das Biopsiematerial erwies sich als ungeeignet für diese Untersuchung, da das Epithel durch die Biopsieentnahme oft Verletzungen aufwies, sodass Artefakte und primäre Brüche im Epithel nicht voneinander zu unterscheiden waren und daher die Auswertung nicht möglich war (Abb. 63a). Hingegen schien das Sektionsmaterial eher für diese Untersuchung geeignet zu sein. Es wurde Sektionsmaterial von SIV-negativen Tieren, FC und Progressoren untersucht. Bei naiven Tieren war das Epithel im Colon größtenteils intakt (Abb. 63b). Bei FC und Progressoren gab es Hinweise auf Brüche (Abb. 63c) und Verlust des Epithels (Abb. 63d), obwohl auch hier entnahmebedingte Artefakte nicht ausgeschlossen werden konnten.

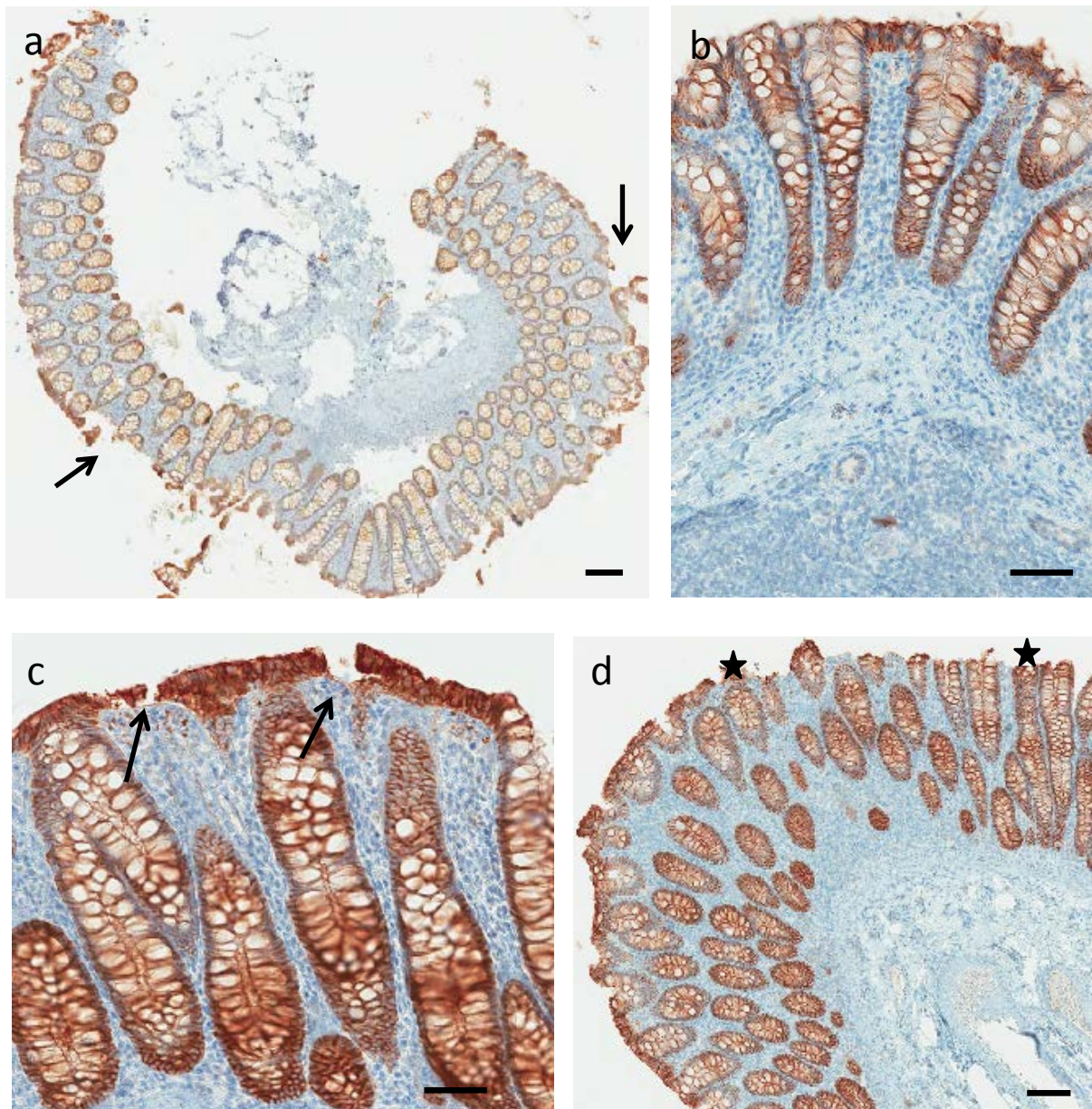


Abbildung 63: Immunhistochemischer Nachweis von Claudin-3 im Colonepithel, SABC-Methode, DAB. Dargestellt sind Proben von repräsentativen SIV-negativen Tieren, FC und Progressoren: a) 2232: Colonbiopsie von einem SIV-negativen Tier; Brüche im Epithel die mit der Entnahme der Biopsie assoziiert sind (schwarze Pfeile), Balken = 100 μm , b) 15257: Sektionsmaterial von einem SIV-negativen Tier mit intaktem Epithel, Balken = 50 μm , c) 12672: Sektionsmaterial von einem FC mit Hinweise auf Brüche im Epithel (Pfeile), Balken = 50 μm , d) 14892: Sektionsmaterial von einem Progressor mit Hinweise auf Verlust des Epithels (Sterne), Balken=100 μm . FC = failing Controller.

9.3.10 Immunhistochemischer Nachweis von SIV in Colonbiopsien und Colonresektaten

Für den immunhistochemischen Nachweis von SIV wurde der primäre Antikörper AG3.0 benutzt. Dieser Antikörper ist gegen das virale Coreprotein p24 (bzw. p27 bei SIV) gerichtet. In Colonbiopsien von LTNPs wurden bei Verwendung AG3.0 keine gefärbten Zellen beobachtet. Hingegen wurde in Colonresektaten, die von Progressoren und FC während der Sektion entnommen wurden, ein positives Signal hauptsächlich im Bereich der Lymphfollikel und spezifisch in den Keimzentren (engl. *germinal centers*) nachgewiesen. An Sektionsmaterial der Progressoren und der obduzierten FC wurde zusätzlich SIV mit Hilfe des KK75 Antikörpers (gerichtet gegen das Nef-Protein) nachgewiesen. Es zeigten sich Unterschiede zwischen den immunhistochemischen Signalen, die die beiden Antikörper erzeugten. Der Antikörper KK75 färbte hauptsächlich einzelne Zellen in der LP sowie im Cortexbereich der Lymphfollikel (Abb.64a), während der Antikörper AG3.0 eher ein flächiges Signal induzierte (Abb.64c). Hervorzuheben ist das unterschiedliche Reaktionsverhalten bei mehrkernigen Riesenzellen. Wie das Beispiel von Tier 2342, einem Progressor mit gastrointestinaler Symptomatik, zeigt, wurden die Riesenzellen in der LP diffus mit KK75 gefärbt (Abb. 64b), während der Antikörper AG3.0 ein eher zellmembranspezifisches randständiges Signal erzeugte (Abb. 64d).

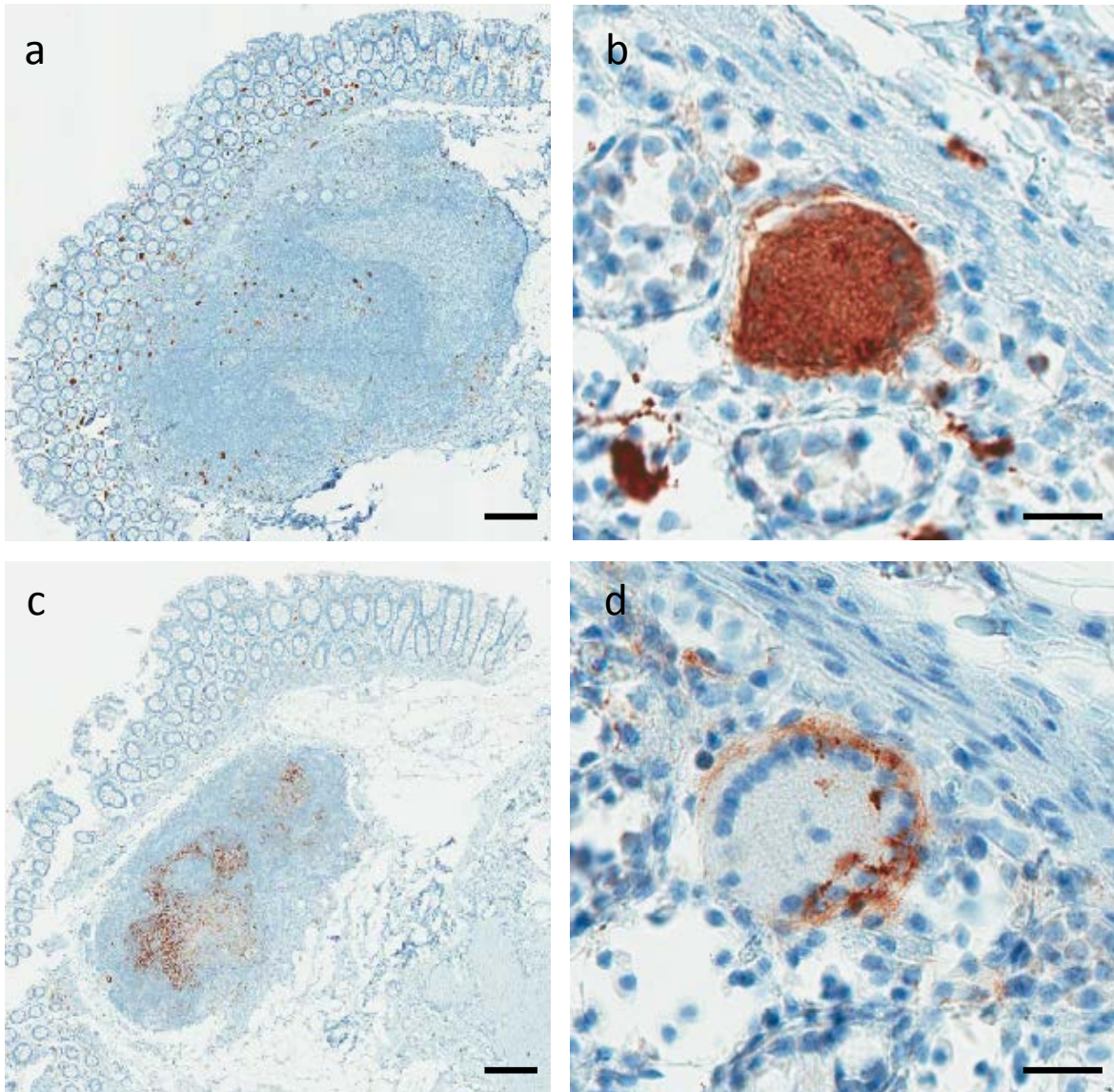


Abbildung 64: Immunhistochemischer Nachweis von SIV in der LP und in Lymphfollikel eines Progressors, SABC-Methode, DAB. Dargestellt ist das Signal, das im Sektionsmaterial von Tier Nr. 2342 nach der Applikation von KK75 und AG3.0, erzeugt wurde: a) KK75: positive Einzelzellen in einem Lymphfollikel und in der LP gefärbt, Balken = 200 μm , b) KK75: gefärbte Riesenzelle in der LP, Balken = 20 μm , c) AG3.0: großflächiges positives Signal in einem Lymphfollikel, Balken= 200 μm , d) AG3.0: gefärbte Riesenzelle in der LP, Balken = 20 μm . LP = Lamina propria.

10. Klinischer Verlauf und Pathologie zum Zeitpunkt der Sektion bei den obduzierten Langzeit-infizierten Rhesusaffen

In der vorliegenden Arbeit wurden Rhesusaffen untersucht, die mindestens fünf Jahre (bis auf Tier Nr. 13906, das 213 wpi euthanasiert wurde) mit SIV infiziert waren und keine klinischen Symptome aufwiesen. Allerdings kann das Immunsystem jederzeit die Kontrolle über die Infektion verlieren, sodass ein stetiger Anstieg der Viruslast möglich ist. Derartige Tiere entwickelten schließlich eine AIDS-ähnliche Erkrankung und wurden als FC bezeichnet. Aus der initialen Tierkohorte von insgesamt 21 Tieren, die für diese Studie vorgesehen waren, kamen acht Tiere im Beobachtungszeitraum in ein finales Krankheitsstadium. Der Todeszeitpunkt nach Infektion, die klinischen Symptome und die pathomorphologischen Befunde aller obduzierten Tiere sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die FC wiesen sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe und pathologische Befunde auf. Beachtenswert ist, dass bei den meisten Tieren intestinale Symptome und Veränderungen festgestellt wurden.

Tabelle 12: Tabellarische Auflistung der klinischen und histopathologischen Befunde zum Zeitpunkt der Sektion

Tier Nr.	wpi	Klinische Symptome	Makroskopische Befunde und Diagnosen	Extraintestinale histologische Diagnosen	Intraintestinale histologische Diagnosen
9794	487	schuppig-blutige Hautveränderungen, Pruritus	diffuse Lichenifikation und multifokale Exkoration, Hyperplasie der peripheren Lymphknoten	multifokale chronische hyperplastische Dermatitis	
13906	213	anhaltendes Nasenbluten	Auftreibung im Bereich der Mitralklappe (Abb. 65a) multifokale weiße Verfärbung des Myocards	hgr. Endocarditis valvularis thromboticans der Mitralklappe (Abb. 65b)	chronisch aktive Enteritis
12672	514	Inappetenz, Durchfall, Gewichtsverlust		interstitielle Pneumonie, SV40 positiv (Abb. 66a, b)	CMV-Colitis
2201	459	Blepharitis (Abb. 67a), Konjunktivitis, Automutilation	Hautläsionen im unteren temporalen Winkel des linken Auges (Abb. 67a), Umfangsvermehrung an der Schädelbasis (Abb. 67b) und in der linken Nasenmuschel (Abb. 67d)	B-Zell Lymphom (Abb. 67e-f)	chronisch aktive Enteritis
2153	587	Inappetenz, Durchfall, Gewichtsverlust	hgr. hyperplastische Mesenteriallymphknoten, Umfangsvermehrung im Magen und im Colon	hgr. chronisch aktive Gastritis mit Ausbildung eines Spindelzelltumors im Antrumbereich	chronisch aktive Colitis
2219	562	Inappetenz, Durchfall, Gewichtsverlust	hgr. hyperplastische Mesenteriallymphknoten. Umfangsvermehrung im Colon	multifokale granulomatöse Pneumonie, chronisch aktive Gastritis	hgr. chronische Enteritis, Nachweis von säurefesten Stäbchen (<i>Mycobacterium intracellulare</i>) in Dün- und Dickdarm, Kaposi-Sarkom ähnliche Fibromatose im <i>Colon sigmoideum</i>
13909	339	Inappetenz, Durchfall, Gewichtsverlust		chronische interstitielle Pneumonie (Nachweis von <i>Pneumocystis jirovecii</i>)	chronisch-aktive Enteritis
8644	526	Inappetenz, Durchfall, Gewichtsverlust	Umfangsvermehrung an der linken Wange	Sialozele, mgr. aktivierte Lymphknoten	chronische lymphoplasmazelluläre Enteritis

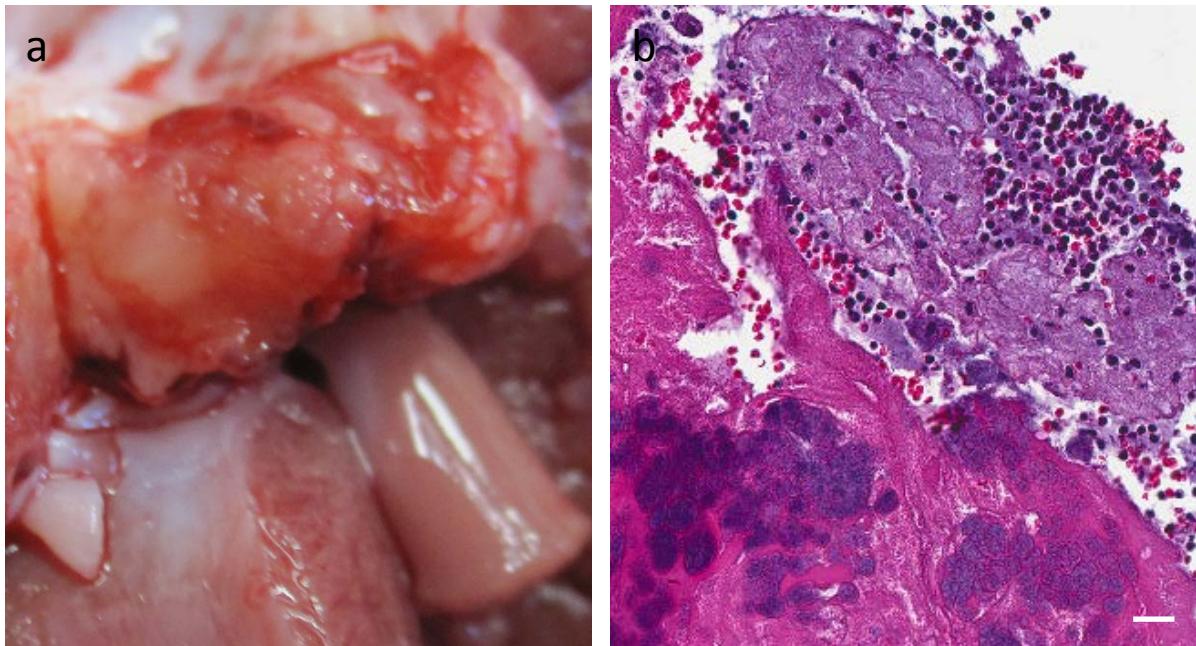


Abbildung 65: Makroskopische und mikroskopische Herzveränderungen eines failing Controllers (Tier Nr. 13906) zum Zeitpunkt der Sektion.

a) Blumenkohlartige Auftreibung im Bereich der Mitralklappe b) Endocarditis valvularis thromboticans der Mitralklappe, in Organisation befindlicher Thrombus, durchsetzt von neutrophilen Granulozyten, Erythrozyten und Bakterienkolonien, HE Färbung, Balken = 20 µm.

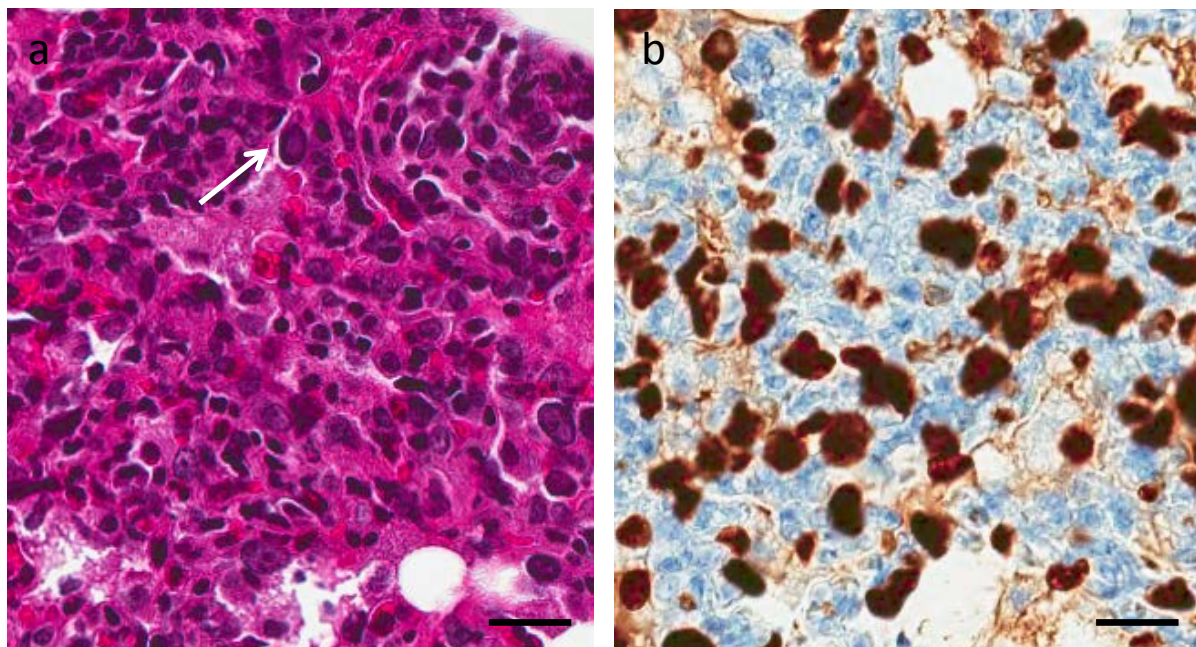


Abbildung 66: Einschlusskörper in der Lunge eines failing Controllers (Tier Nr. 12672) mit SV40-Infektion zum Zeitpunkt der Sektion.

a) SV40 Einschlusskörper in der Lunge, HE Färbung (weißer Pfeil), Balken = 20 µm, b) Immunhistochemischer Nachweis (SABC-Methode, DAB) des SV40 Antigens im Lungenparenchym, Balken = 20 µm.

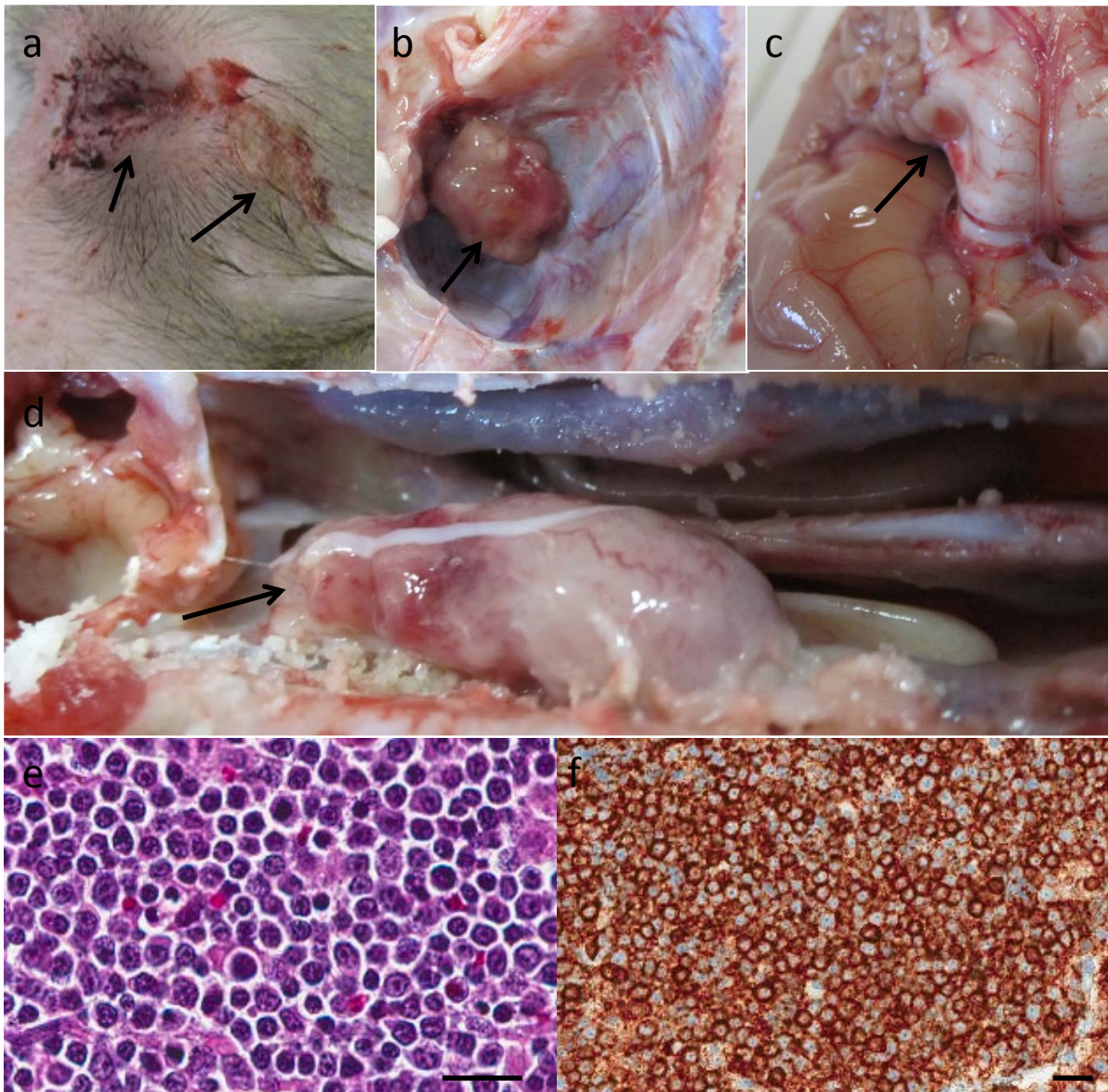


Abbildung 67: Makroskopische und mikroskopische Veränderungen eines failing Controllers (Tier Nr. 2201) zum Zeitpunkt der Sektion.

a) Blepharitis und Hautläsionen durch Automutilation, b) Umfangsvermehrung an der Schädelbasis, c) Kompression des Hirnstammes durch die Umfangsvermehrung, d) Umfangsvermehrung in der Nasenmuschel, e) HE Färbung der Umfangsvermehrung, erhöhte Mitoserate, Anisozytose und Anisokaryose, Balken = 20 μm , f) Immunhistochemischer Nachweis von CD20 (SABC-Methode, DAB), 95 % der Zellen sind positiv, B-Zell Lymphom, Balken = 20 μm .

V. Diskussion

In den letzten zehn Jahren wurde im Rahmen der HIV-Forschung eine Vielzahl von Ergebnissen veröffentlicht, die zur Aufklärung der Pathogenese und zur Entwicklung verbesserter und gut verträglicher therapeutische Strategien beigetragen haben. Jedoch gibt es bei Studien mit HIV-Patienten zahlreiche Einschränkungen. Der Zeitpunkt der Infektion, die Infektionsroute und der genaue Virusstamm sind bei den meisten HIV-Infektionen nicht bekannt und können nur teilweise nachträglich eruiert werden. Deshalb ist die Notwendigkeit eines geeigneten Tiermodells unbestreitbar. Das SIV-Makaken-Modell für AIDS ist nach wie vor essentiell für die Erforschung der Pathogenese der HIV-Infektion, da die Möglichkeit einer kontrollierten und detaillierten Verfolgung der Infektion besteht. Darüber hinaus wurde das Modell erfolgreich zur Entwicklung von Therapeutika und Impfstoffen eingesetzt.

Menschen bzw. Affen, die ohne antiretrovirale Therapie über lange Zeit eine HIV-/SIV-Infektion kontrollieren, werden als „Long-Term Non-Progressors“ (LTNPs) bezeichnet. Insbesondere in der westlichen Welt wird mittlerweile sofort nach der Diagnose der HIV-Infektion eine antiretrovirale Therapie eingeleitet, die im Optimalfall nicht unterbrochen wird. Daraus ergibt sich die Schwierigkeit, potentielle LTNPs beim Menschen überhaupt zu erkennen. Organentnahmen bei HIV-infizierten Patienten sind aus ethischen und sozialen Gründen stark eingeschränkt. Vor allem HIV-Infizierte, bei denen kein Virus nachweisbar ist, stehen für regelmäßige Probenentnahmen zu wissenschaftlichen Zwecken nicht zur Verfügung. Bei der experimentellen Infektion von Rhesusaffen ist es hingegen möglich, den Krankheitsverlauf detailliert zu verfolgen. Proben von diversen Organen können zu festgelegten Zeitpunkten *ex vivo* entnommen werden und nach dem Tod der Tiere ist der Zugriff auf alle Organe gewährleistet.

Die Untersuchung mukosaler Kompartimente, insbesondere der intestinalen Mukosa, steht seit langer Zeit im Vordergrund bei der HIV-Infektion. Die mukosalen Gewebe repräsentieren die wesentliche Eintrittspforte des Virus in den Körper [162]. Zudem beherbergt der Darm den größten Anteil an Immunzellen im ganzen Körper. Zahlreiche Immunzellen befinden sich in der LP und in den lymphoiden Follikeln des

Dickdarmes, in denen das Virus zu hohen Titern repliziert. Merkmal der HIV-/SIV-Infektionen ist der generalisierte Verlust an CD4⁺ T-Zellen, der in den mukosalen Geweben besonders ausgeprägt ist [163]. Nach der akuten Phase der Infektion erholen sich die CD4⁺ T-Zellen im Blut teilweise, während der Verlust in der Darmschleimhaut ein kontinuierlicher Prozess zu sein scheint [6] [8]. Schäden der Darmbarriere führen zur Translokation von Bakterien und -produkten in die Blutzirkulation und nachfolgend zur generalisierten Immunaktivierung [118] [135]. Außerdem wurden HIV-assoziierte Enteritiden und opportunistische intestinale Infektionen bei HIV-Patienten beschrieben [154].

Es wurde schon frühzeitig erkannt, dass der Darmtrakt bei der HIV-Infektion stark betroffen ist [9]. In den letzten Jahren hat er eine immer zentralere Rolle in der Erforschung der Pathogenese eingenommen, da er eine potentielle Eintrittspforte und den wesentlichen Replikationsort für das Virus repräsentiert [59]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab sich die Möglichkeit, eine seltene Kohorte SIV-infizierter Rhesusaffen zu untersuchen, die sich dadurch auszeichnete, dass die Tiere trotz einer SIV-Infektion über mehrere Jahre keine AIDS-ähnlichen klinischen Symptome entwickelten und das unabhängig davon, ob die Virusreplikation kontrolliert wurde oder nicht. Diese Tiere wurden als LTNPs definiert, wobei es drei Untergruppen gab. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag im Vergleich immunologischer, virologischer und histopathologischer Parameter im Colon der LTNP-Gruppen, und wie diese Parameter zur klinischen Unauffälligkeit bzw. Krankheitsprogression der Tiere beitragen. Dazu wurden Colonbiopsien und parallel Blutproben von SIV-negativen Tieren, LTNPs und Progressoren durchflusszytometrisch und bezüglich ihrer Viruslast analysiert. Darüber hinaus wurden die Colonbiopsien histologisch und immunhistochemisch untersucht. Es wurden teilweise signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt, die möglicherweise zur unterschiedlichen Entwicklung der Krankheit führten.

1. Unterschiede der Definition von Langzeit-Infizierten beim Menschen und NHP aufgrund der unterschiedlichen Krankheitsverläufe

Die Definition von menschlichen HIV-infizierten LTNPs ist sehr heterogen und variiert hinsichtlich der Dauer der Infektion, der viralen Kopien im Plasma und der Anzahl an CD4⁺ T-Zellen [164]. Allgemein werden LTNPs als seltene Individuen beschrieben, die chronisch infiziert sind und deren CD4⁺ T-Zellzahlen sich mindestens sieben Jahre auf einem physiologischen Niveau ohne antiretrovirale Therapie halten. LTNPs repräsentieren ca. 10 % der Infizierten und sind sehr divers. Sie können in zwei große Gruppen unterteilt werden: (i) Patienten mit physiologischen CD4⁺ T-Zellen und vergleichsweise hoher Viruslast, die als virämische Nicht-Progressoren definiert werden und (ii) Elite Controller, die die Virusreplikation kontrollieren und meistens kein Virus im Plasma aufweisen. Diese Gruppe repräsentiert nur 0,5 % der infizierten Population [12]. Eine der am häufigsten verwendete Definitionen ist die, dass EC weniger als 75 virale Kopien/ml Plasma für mindestens ein Jahr aufweisen [165].

Der Verlauf der SIV-Infektion von Rhesusaffen unterscheidet sich von der HIV-Infektion des Menschen aufgrund einer früheren und höheren Spitzenvirämie, einem früheren und höheren viralen „set point“ und einer schnelleren Progression zu einer AIDS-ähnlichen Krankheit innerhalb von ca. zwei Jahren [11]. Aus diesem Grund kann die für den Menschen benutzte Definition der LTNPs nicht auf das Makaken-Modell übertragen werden. In dieser Arbeit wurden als LTNPs SIV-infizierte Rhesusmakaken definiert, die mindestens fünf Jahre keinerlei AIDS-ähnliche klinische Symptome aufwiesen. Anhand der Viruslast im Plasma wurden die LTNPs in drei Gruppen klassifiziert: Elite Controller (EC), bei denen die Viruslasten unter 10² viralen Kopien/ml Plasma lagen, virämische Controller (VC), die konstant eine moderate Virusbelastung zwischen 10² und 10⁴ viralen Kopien/ml Plasma aufwiesen und failing Controller (FC), die nach einer längeren symptomfreien Phase und Kontrolle der Virusreplikation das AIDS-Stadium erreichten. Bei EC wurden seltene Ausreißer der Viruslast nach oben beobachtet, die sich bei der nächsten Messung wieder normalisierten. Bei HIV-Patienten unter ART wurden auch Anstiege der

Viruslast beschrieben, die vermutlich auf Artefakte in Labormessungen zurückzuführen sind und meistens keine klinische Relevanz haben [166].

Der Controller-Status ist jedoch eine dynamische Situation, die veränderlich ist. So musste die initiale Klassifizierung der Tiere im Laufe der Anfertigung der Arbeit des Öfteren angepasst werden. EC zeigten im Gegensatz zu VC und FC ein stabiles klinisches, virologisches und immunologisches Bild. Beide Tiere, die zum Anfang der Studie als FC klassifiziert waren, mussten im Laufe dieser Arbeit euthanasiert werden. Darüber hinaus entwickelten sich mehrere VC zu FC. Diese Tiere waren durch kontinuierlich ansteigende Viruslasten im Blut charakterisiert und wiesen final auch AIDS-assoziierte Symptome auf. Aus welchem Grund diese Tiere den Controller-Status verloren, ist nicht bekannt. Vermutlich spielen die geschädigte intestinale Barriere und die Reaktivierung viraler Reservoirs, die sich in sekundären lymphoiden Organen wie z. B. im GALT befinden, eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Krankheit.

2. Möglicher Einfluss des Alters auf das Immunsystem der Versuchstiere

Das Alter der untersuchten LTNP-Kohorte lag zwischen zehneinhalb und zwanzig Jahren, hingegen waren SIV-negative Tiere und Progressoren, von denen Vergleichsmaterial entnommen wurde, größtenteils jünger. Das Alter der Kontrolltiere lag zwischen drei und zwanzig Jahren und das der Progressoren zwischen viereinhalb und neuneinhalb.

Der nachteilige Einfluss des Alters auf das Immunsystem ist unbestritten [167]. Ältere Individuen sind anfälliger für Infektionen, und altersassoziierte Veränderungen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind gut dokumentiert [168]. Zellen des angeborenen Immunsystems, darunter neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, DCs und NK-Zellen sind weniger aktiv und funktional. Hingegen ist belegt, dass die Anzahl der mDCs im Alter steigt [168]. Das adaptive Immunsystem ist jedoch stärker von altersassoziierten Veränderungen betroffen. Dies äußert sich in Form von Depletion der B- und T-Zellen, insbesondere der Subpopulation von naiven B- und T-Zellen [169] [170]. Beim Menschen wurde außerdem eine Erhöhung der

Anzahl und der Funktionalität der regulatorischen T-Zellen im Alter beschrieben [171].

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, eine adäquate Anzahl von SIV-negativen Tieren im Alter der LTNPs zu beproben. Das Alter der Kontrolltiere erstreckte sich auf drei bis zwanzig Jahre, jedoch war die Mehrzahl davon deutlich jünger als die LTNPs. Diese große Alterspanne steht eventuell mit den großen Abweichungen, die teilweise innerhalb der Kontrollgruppe beobachtet wurden, im Zusammenhang.

Die erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen und mDCs sowie die dezimierte Anzahl an NK-Zellen in allen LTNP-Gruppen hängt möglicherweise nicht nur mit der chronischen SIV-Infektion, sondern auch mit dem höheren Alter der Tiere zusammen.

3. Vergleich zwischen Colonbiopsien und Resektaten: Die Entnahme von Colonbiopsien repräsentiert einen minimal invasiven Eingriff

Die Entnahme intestinaler Biopsien wird bei HIV-Patienten routinemäßig durchgeführt [172]. Im Zuge dieser Arbeit wurde das Colon von Langzeit-infizierten Rhesusmakaken histologisch und immunhistochemisch untersucht. Das Colongewebe wurde in Form von kleinen Gewebestücken (Colonbiopsien) endoskopisch gewonnen. Eine Alternative zur Gewinnung von Colongewebe ist die Entnahme von Resektaten nach Eröffnung der Bauchhöhle. Auf der einen Seite ist die endoskopische Gewinnung minimal-invasiv und kann relativ oft in kurzen Abständen durchgeführt werden, ohne dass es bei den Tieren zu größeren Belastungen kommt. Nachteil dieser Methode ist jedoch die geringe Menge an gewonnenem Gewebe, sodass nicht immer alle gewünschten Untersuchungen durchgeführt werden können. Zudem kann der Darmschleimhaut nicht angesehen werden, wo sich Lymphfollikel befinden, sodass diese wichtigen Strukturen häufig unterrepräsentiert im Untersuchungsmaterial vertreten sind. Demgegenüber bietet die Entnahme von Resektaten reichlich Material, stellt aber für die Tiere aufgrund der erforderlichen Laparotomie eine deutlich größere Belastung dar und kann mit post-

operativen Komplikationen assoziiert sein. Daher war in der vorliegenden Arbeit die endoskopische Biopsieentnahme die Methode der Wahl für regelmäßige bzw. wiederholte Analysen. Aus diesem Grund wurde bei den histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen nur die LP in den Biopsien beurteilt, da nicht bei allen Biopsien Lymphfollikel vorhanden waren. Resektate wurden ausschließlich während der Sektion der Tiere entnommen.

4. Immunhistochemischer Nachweis von SIV: Applikation der Antikörper AG3.0 und KK75 erzeugt unterschiedliche Signale

Der immunhistochemische Nachweis des SIV-Antigens in Colonbiopsien erfolgte durch die Verwendung zweier monoklonaler Antikörper. Der AG3.0 Antikörper ist gegen das Protein p24 von HIV-1 gerichtet, das sich im Virion befindet und mit p27, dem Coreprotein von SIV, kreuzreagiert. Der zweite Antikörper, KK75 ist gegen das SIV Nef Protein gerichtet. Das Signal, das die beiden Antikörper erzeugten, war sehr unterschiedlich bezüglich Intensität und Lokalisation. AG3.0 färbte größere Bereiche in Follikeln des GALT, aber kaum Zellen in der LP. Die Zellen, die in den Lymphfollikeln angefärbt wurden, sind aufgrund ihrer Lokalisation vermutlich follikuläre T-Helferzellen und follikuläre dendritische Zellen. Hingegen färbte KK75 großflächig Riesenzellen und histiozytäre Zellen, wahrscheinlich Makrophagen, in der LP und nur wenige Zellen in den Lymphfollikeln. Dies kann damit erklärt werden, dass die beiden Antikörper gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind. p27 von SIV stellt das Coreprotein dar und findet sich ausschließlich im Virion. Im Gegensatz dazu wird das Nef Protein kontinuierlich während der Virusreplikation exprimiert und ist nicht im Virion zu finden [173]. Die Bereiche der Follikel, die von dem AG3.0 gefärbt werden, repräsentieren die Keimzentren, in denen sich follikuläre CD4⁺ T-Zellen und dendritische Zellen befinden, und stellen Areale dar, in denen das Virus persistierend repliziert und wo sich virale Reservoirs etablieren [174]. Womöglich handelt es sich hier um defektes Virus, das jedoch zur Aktivierung von T-Zellen führen kann [175].

5. Unterschiede im SIV-Nachweis mittels PCR und IHC

In dieser Arbeit wurde die Viruslast in Darmbiopsien mittels PCR gemessen. Darüber hinaus wurde das Virus immunhistochemisch nachgewiesen. Die Ergebnisse der beiden Methoden stimmten nicht in allen Fällen überein. Biopsien von allen Gruppen der LTNPs wurden immunhistochemisch mittels des AG3.0 Antikörpers untersucht, jedoch war bei keinem Tier ein positives Signal zu beobachten. Bei der geringen Größe einer Darmbiopsie ist es zufallsbedingt eher unwahrscheinlich, dass Lymphfollikel zu finden sind. Isolierte Lymphfollikel, in denen das Virus größtenteils residiert und repliziert, waren in mehreren Proben nicht vorhanden. Allerdings war mittels PCR bei Tieren, die immunhistochemisch negativ für SIV waren, virale RNA nachweisbar. Dies könnte an den oft fehlenden Lymphfollikeln in den Biopsien liegen, in denen der verwendete AG3.0-Antikörper präferentiell Zellen anfärbt, oder auch an der unterschiedlichen Sensitivität der beiden Methoden. Darüber hinaus wurde Sektionsmaterial von FC und Progressoren immunhistochemisch analysiert. Bei dem FC 12672 wurde kein positives Signal beobachtet, jedoch wurde mittels PCR virale RNA im Darm nachgewiesen. Es ist in der Literatur dokumentiert, dass Gewebe von virämischen Patienten immunhistochemisch negativ sein können [176]. Verantwortlich dafür könnten eine *post mortem* oder durch die Fixierung mit Formaldehyd entstandene Zerstörung von Epitopen im Gewebe sein.

Das lymphatische Gewebe im Darm, insbesondere im Colon, gilt als wesentliches virales Reservoir bei SIV-Langzeit-Infizierten, in dem vermutlich eine persistierende Virusreplikation stattfindet [13]. Dazu passt, dass bei einigen unserer untersuchten EC mittels PCR virale Kopien in Colonbiopsien nachweisbar waren, obwohl bei diesen Tieren keine virale RNA im Plasma zu finden war. Dies wurde auch bei HIV-Controllern [14] und HIV-Patienten unter antiretroviraler Therapie beobachtet [177].

6. Vergleich der immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Methode

In dieser Arbeit wurden verschiedene Zellpopulationen im Darm sowohl durchflusszytometrisch als auch immunhistochemisch untersucht. Dies traf auf IL-17-

, FoxP3-, CD4- und Ki67-positive Zellen zu. Die immunhistochemische Analyse ermöglicht es, die Lokalisation und das zelluläre Umfeld der betreffenden Zellen im Darm darzustellen. Im Gegensatz dazu erlaubt die Durchflusszytometrie die gleichzeitige Analyse mehrerer extra- und intrazellulärer Marker, sodass eine Zuordnung von bestimmten Markern zu verschiedenen Immunzelltypen möglich ist. Der Vorteil der gleichzeitigen Messung von bis zu zehn Markern geht allerdings zu Lasten der Organstruktur, da die Zellen aus ihrem physiologischen Kontext herausgelöst werden. Hingegen bietet die in dieser Arbeit angewendete immunhistochemische Methode nur die gleichzeitige Untersuchung zweier Marker an. Es können mit Hilfe der Durchflusszytometrie kaskadenartig sehr kleine Populationen analysiert werden, z. B. als Th17 Zellen werden IL-17-exprimierende CD4⁺ T-Zellen definiert. Im Gegensatz dazu kann immunhistochemisch nur die Gesamtheit der Immunzellen, die IL-17 exprimieren, analysiert werden. Im Fall des Proliferationsmarkers Ki67 konnte immunhistochemisch nur die gesamte Proliferation im Dickdarm gemessen werden, also die Proliferation von Immunzellen und Enterozyten, wobei letztere aufgrund ihrer Lokalisation von den Immunzellen abgegrenzt werden können. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurden signifikante Unterschiede bezüglich der Depletion der CD4⁺ T-Zellen im Darm zwischen den Gruppen festgestellt. Die immunhistochemische Untersuchung ergab keine Signifikanz zwischen den Gruppen. Diese Unterschiede könnten darin begründet sein, dass immunhistochemisch CD4⁺CD8⁺ Zellen nicht abgegrenzt werden können und daher zusammen mit CD4⁺ Zellen gefärbt werden. Eine Methode, die sowohl die Lokalisation der Zellen als auch die Bestimmung mehrerer Marker ermöglicht, wäre deswegen von Vorteil. Die Kombination beider Methoden in der Form der „flow histometry“ scheint dafür vielversprechend zu sein [178].

7. Histologische Veränderungen, Kollagenablagerungen und opportunistische Infektionen im Colon von FC und Progressoren

Im Jahr 1984 untersuchten KOTLER *et al.* Jejunum- und Colonbiopsien von homosexuellen HIV-positiven Männern und beobachteten histologische

Veränderungen in beiden Darmabschnitten. Hier wurde zum ersten Mal von einer HIV-assoziierten Enteropathie gesprochen [179]. Dies wurde auch bei nicht-humanen Primaten beschrieben [180]. Histologische intestinale Abnormalitäten, die vermutlich durch HIV und/oder chronischen Durchfall induziert werden, ohne den Nachweis von infektiösen Erregern, wurden als HIV-Enteropathie definiert [9] [154]. Während der HIV-Infektion werden Zellen des Immunsystems von dem Virus infiziert und depletiert. Die Depletion betrifft insbesondere die CD4⁺ T-Lymphozyten, die in den mukosalen Geweben residieren [8] [57] [58]. Im Makaken-Modell wurde nachgewiesen, dass die Depletion bereits wenige Tage nach Infektion in den mukosalen Geweben stattfindet [181]. Auch im lymphatischen Gewebe wird im Verlauf der HIV- und SIV-Infektion eine hochgradige Depletion von CD4⁺ T-Helferzellen beobachtet, insbesondere von naiven CD4⁺ T-Zellen [146] [182]. In den Lymphknoten wird das Gewebe durch Kollagen ersetzt, das keine immunologische Funktion besitzt. Dieses Phänomen wurde auch als „fibrotic scarring“ beschrieben [183]. Kollagenablagerungen wurden auch in der LP und in den Lymphfollikeln des GALT beobachtet, selbst bei Individuen, die unter ART standen [147]. Allerdings werden bei natürlichen Wirten wie grünen Meerkatzen, die keine AIDS-ähnliche Krankheit entwickeln, keine Kollagenablagerungen in den Lymphknoten beobachtet [73].

Initial sollte in dieser Arbeit die Kollagendeposition in Colonbiopsien der LTNP analysiert werden und mit der bei SIV-negativen Tieren verglichen werden. Colonbiopsien waren nicht das geeignete Material für diese Untersuchung, da das Gewebe stichprobenartig entnommen wurde und in Bezug auf Anschnitt und das Vorhandensein von Follikeln sehr unterschiedlich war. Darum wurde für diese Untersuchungen nur Sektionsmaterial benutzt, um die Dicke des subepithelialen Kollagenbandes zu messen. Es wurde Material von SIV-negativen Tieren, FC und Progressoren analysiert, indem das Gewebe mit der Standardfärbung Masson-Goldner gefärbt wurde. Im Vergleich zu SIV-negativen Tieren wurde bei den infizierten Tieren eine signifikante Verdickung des Kollagenbandes im Darm festgestellt. Bei einem Progressor (Tier Nr. 2342) war auch eine deutliche Kollagenablagerung in der LP ersichtlich, die mit Verlust der normalanatomischen

Darmmorphologie einherging. Es scheint, dass bei diesen Tieren ein Teil der LP durch Kollagen ersetzt und die Erholung der Immunzellen verhindert wurde. Von EC war nur Biopsiematerial vorhanden, sodass bei diesen Tieren die Untersuchung nicht durchgeführt wurde. Man könnte spekulieren, dass die Banddicke bei diesen Tieren vergleichbar zu der von nicht infizierten ist, da nur ein geringer bis moderater Verlust der Immunzellen im Darm beobachtet wurde.

Durch die immunpathogene Wirkung des Virus und die permanente Immunaktivierung wird vor allem das mukosale Immunsystem geschädigt, sodass HIV-Patienten bzw. SIV-infizierte Makaken für opportunistische Mikroorganismen anfällig sind. Diarrhoe, die von Bakterien, Viren oder Parasiten verursacht wird, kommt im AIDS-Stadium regelmäßig vor [151] [154]. Bei den untersuchten Biopsien der LTNPs, die zu Zeitpunkten entnommen wurden, an denen die Tiere klinisch unauffällig waren, konnten keine pathogenen intestinalen Erreger, außer dem Parasiten *Balantidium coli*, nachgewiesen werden. Solange sich der Parasit im Darmlumen befindet, wird er als apathogen betrachtet. Erst nach der Einwanderung in die LP schreibt man ihm Pathogenität zu [184]. *Balantidium coli* wurde auch bei SIV-negativen Tieren nachgewiesen und wird als Zufallsbefund bei Rhesusmakaken in Gefangenschaft betrachtet [185]. Dies änderte sich zum Zeitpunkt der Sektion, zu dem die meisten FC histologische Auffälligkeiten im Colon zeigten. Eindeutige gemischtzellige Infiltrate in der LP waren bei den meisten Tieren präsent. Bei einem FC (Tier Nr. 12672) wurde eine CMV-Colitis diagnostiziert. Bei den Progressoren wurden wesentliche Veränderungen, darunter Riesenzellen und Kryptabszesse, beobachtet, während das Colon der LTNPs in der symptomfreien Phase keinerlei histologische Veränderungen aufwies. Veränderungen im Colon waren eindeutig mit dem Auftreten von AIDS-ähnlichen Symptomen assoziiert, das bedeutet, Progression zu AIDS geht mit histologischen Veränderungen im Darm einher.

Non-Hodgkin-Lymphome gelten ebenfalls als AIDS-definierende Entitäten, die oft beim Menschen und NHP beschrieben wurden [152] [153]. Extranodale Lymphome, die theoretisch in jedem Organ vorkommen können, sind häufig im Gastrointestinaltrakt, aber auch in dem zentralen Nervensystem und der Haut zu finden [186]. Das diffuse B-Zell Lymphom ist das am häufigsten diagnostizierte AIDS-

assoziierte Lymphom [187]. Während der Anfertigung dieser Arbeit musste ein FC (Tier Nr. 2201) aufgrund von neurologischen Symptomen eingeschläfert werden. Es wurden ein B-Zell Lymphom innerhalb der Schädelkalotte und ein weiteres in der Nasenmuschel diagnostiziert. Im Tumorgewebe konnte das EBV-Antigen EBNA (Epstein-Barr-nuclear antigen)-2 immunhistochemisch nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass die Immundefizienz die unkontrollierte Replikation des EBV, das beim Rhesusaffen als Lymphocryptovirus bezeichnet wird, begünstigte und folglich zur Entstehung eines Lymphoms führte. Das neurologische klinische Bild wurde vermutlich von dem Druck, den der Tumor auf den *Nervus trigeminus* ausübte, verursacht. Non-Hodgkin-Lymphome treten bei 4 %-15 % der SIV-infizierten Rhesusaffen auf, vor allem bei den Tieren, die einen längeren Krankheitsverlauf aufweisen [188]. Bei keinem der Progressoren konnte ein Tumor nachgewiesen werden, was sehr wahrscheinlich mit der kürzeren Lebenszeit der Tiere dieser Gruppe zusammenhängt.

Darüber hinaus wurde eine *Endocarditis valvularis thromboticans* der Mitralklappe mit Bakterienkolonien bei dem FC 13906 festgestellt. Dies könnte womöglich auch das Resultat mikrobieller Translokation durch eine geschädigte Darmbarriere sein [189]. Außerdem wurde in der Lunge des FC 12672 eine Pneumonie diagnostiziert, ausgelöst durch das Affenvirus 40 (engl. *simian virus 40*, SV40). Eine Erkrankung durch SV40 wird häufig bei SIV-infizierten Rhesusaffen beobachtet und stellt eine typische opportunistische Infektion dar [190].

8. Hinweise auf eine weitestgehend intakte intestinale Barriere bei EC

Der Darm stellt mit ca. 200 m² die größte Kontaktfläche des Körpers mit der äußeren Welt dar [131]. Außer der Aufnahme von Nahrungsmittel und Flüssigkeit fungiert der Darm auch als Barriere, die das Eindringen von Erregern verhindern soll. Andererseits ist es auch wichtig, dass die körpereigenen Antigene toleriert werden [136]. Brüche in der intestinalen Barriere führen dazu, dass Bakterien und ihre Abbauprodukte, die sich im Darmlumen befinden, die Blutzirkulation erreichen. Die intestinale Barriere kann in drei unterschiedliche Kompartimente eingeteilt werden: (i)

die extrazelluläre Barriere, die aus dem Mukus besteht, (ii) die mechanische Barriere, die aus den Epithelzellen des Darms und den „tight junctions“ (dichte Verbindungen) zwischen den Zellen besteht, und (iii) die funktionelle oder immunologische Barriere, die von den Immunzellen in der LP gebildet wird [118] [132]. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass etwa 70 % der gesamten Immunzellen des Körpers im Darm residieren [124]. Bei HIV-/SIV-infizierten Individuen scheinen strukturelle und immunologische Schäden in der intestinalen Barriere, die in der akuten Phase der Infektion entstehen, mit der Immunaktivierung und der Progression zu AIDS in der chronischen Phase zusammenzuhängen [191]. STOCKMANN wies *in vitro* nach, dass HIV-infizierte Immunzellen aus dem Colon Zytokine wie TNF- α oder IFN- α produzieren, welche die Barriere direkt angreifen [192]. Die Ergebnisse wurden durch die Messung von Zytokinen bei HIV-Patienten im peripheren Blut unterstützt [193].

In der vorliegenden Arbeit wurde die extrazelluläre Barriere (Mucus) nicht untersucht. Die mechanische Barriere, also die Epithelzellen und ihre „tight junctions“ wurden mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen Claudin-3 bewertet. Claudine sind Proteine, die sich im Epithel und Endothel befinden und eine herausragende Rolle in der Bildung von Zellverbindungen spielen. Sie wurden im Jahr 1998 zum ersten Mal beschrieben. Heute sind beim Menschen 26 Claudin-Gene bekannt. Es gibt zwei Kategorien von Claudinen: (i) diejenigen, die die Porenbildung fördern, u. a. Claudin-2 und -15 und (ii) diejenigen, die zur Bildung von Barrieren beitragen wie Claudin-1 und -3. Es wurde beschrieben, dass die Expression von Claudin-2, -3, -7, und -15 im intestinalen System dominiert [194]. In der HIV-Infektion wurde ein veränderter Aufbau der Zellverbindungen im Darm nachgewiesen. Dabei wird das Barriere-bildende Claudin-1 herabreguliert und die Expression des Poren-bildenden Claudin-2 erhöht [195]. ESTES *et al.* und CANARY *et al.* zeigten mittels einer immunhistochemischen Färbung des Darms gegen Claudin-3, dass SIV-infizierte Rhesusaffen und Schweinsaffen Brüche oder großflächige Verluste des Darmepithels aufwiesen, die mit der SIV-Infektion assoziiert waren [196] [197]. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Colonbiopsien als auch Colonresektate von SIV-negativen und positiven Tieren untersucht. Das Biopsiematerial war für diese Untersuchung nicht geeignet, da durch die Art der Entnahme das Darmepithel

teilweise beschädigt wurde. In Colonresektaten von FC und Progressoren wurden Hinweise auf Brüche und Verluste des Epithels festgestellt. Jedoch schienen aufgrund des histologischen Bildes auch diese Befunde Artefakte zu sein und nicht mit der SIV-Infektion in Verbindung zu stehen.

Darüber hinaus wurde durch eine immunhistochemische Färbung gegen aktivierte Caspase-3 die Apoptoserate der Epithel- und Immunzellen in der LP analysiert. In der akuten Phase der SIV-Infektion wurde eine erhöhte Caspase-Expression auf Epithelzellen beschrieben, die nachfolgend zu einer regenerativen Villusatrophie führte [140]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Colon von Controllern in der chronischen Phase der SIV-Infektion untersucht. Bei FC und Progressoren war im Vergleich zu SIV-negativen Tieren und EC eine eindeutig erhöhte Apoptoserate im Colon zu beobachten. Diese erhöhte Apoptose bei FC und Progressoren lässt eine geschädigte epitheliale Barriere vermuten, was zur mikrobiellen Translokation und darauffolgend zur chronischen Immunaktivierung geführt haben könnte. Darüber hinaus sollte als ein weiterer apoptotischer Mechanismus die Pyroptose, die ausschließlich durch Caspase-1 vermittelt wird, immunhistochemisch im Colon der LTNPs bestimmt werden. Da in der HIV-Infektion ein großer Anteil der CD4⁺ T-Zellen durch Caspase-1 vermittelten Zelltod depletiert wird [121], sollte untersucht werden, ob Pyroptose im Darm von Langzeit-Infizierten eine Rolle beim Zelltod von Immunzellen spielt. Es wurden diverse Antikörper gegen Caspase-1 ausgetestet, von denen jedoch keiner eine Kreuzreaktivität im Gewebe von Rhesusaffen aufwies.

Einen weiteren wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung von epithelialen Barrieren leisten Th17 Zellen. Sie entstehen aus naiven T-Helferzellen in Folge von Antigenstimulierung [198]. Ihre Funktion bei der Einleitung der Abwehr gegen Bakterien und Pilzen ist schon länger bekannt [199]. Jedoch wird auch ihre Rolle in der Entstehung von chronischen und Autoimmunerkrankungen, wie Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis und Psoriasis, diskutiert [92]. Diese Zellen dominieren insbesondere im gastrointestinalem System, weisen eine starke proinflammatorische Wirkung auf, rekrutieren neutrophile Granulozyten, induzieren die Expression von Claudinen und sind in die Regenerierung von Epithelien involviert [98]. RAFFATELLU *et al.* beschrieben 2008, dass SIV-infizierte Rhesusaffen eine geringe

Anzahl an Th17 Zellen in der LP aufwiesen, was mit einer Schädigung der intestinalen Barriere einherging, und bei einem *ex vivo* Experiment mit Darmschlingen wiederum zur Verbreitung von Salmonellen führte [200]. Auch bei HIV-Patienten wurde ein präferentieller Verlust von Th17 Zellen im Intestinaltrakt festgestellt [201]. In Übereinstimmung mit der bisherigen Literatur war bei den FC und Progressoren die Prozentzahl von Th17 Zellen im Blut und insbesondere im Colon herabgesetzt. Im Gegensatz dazu bewegten sich bei den EC die Spiegel dieser Zellen im Blut im physiologischen Bereich und waren im Colon nur leicht vermindert. Daher ist davon auszugehen, dass ein normaler Anteil an Th17 Zellen in der Gruppe der EC zur Aufrechterhaltung der Darmbarriere beigetragen hat.

Diese Funktion scheint auch von weiteren Zellpopulationen wie regulatorischen CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺Tregs) und invarianten natürlichen Killer-T-Zellen (iNKTs) übernommen zu werden. CD4⁺Tregs haben eine immunmodulatorische, suppressive Wirkung und sollen zur Eindämmung der chronischen Immunaktivierung beitragen [102]. iNKTs können sowohl IL-17 sezernieren als auch FoxP3 exprimieren und sind somit ebenfalls in der Regulierung von Immunantworten involviert. Bei gesunden Rhesusaffen waren die Spiegel an Th17, CD4⁺Tregs, iNKTs in den mukosalen Kompartimenten im Vergleich zum peripheren Blut erhöht. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SIV-infizierten Tieren war das Verhältnis umgekehrt, da offensichtlich eine präferentielle Depletion dieser Zellen in den mukosalen Geweben stattgefunden hatte. Im Darm der EC war nur ein geringer Verlust dieser Zellen zu beobachten im Vergleich zu FC und Progressoren, bei denen diese Zellen hochgradig dezimiert waren. Korrelationsanalysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wiesen eine signifikante inverse Korrelation dieser Zellen im Blut und im Colon mit der Viruslast im Blut und im Colon nach, was ein Hinweis auf die pathogene Wirkung des Virus auf diese Zellen ist. Der Verlust dieser Zellen stellt einen weiteren Hinweis dar, dass die Funktion der intestinalen Barriere, in diesem Fall der immunologischen Barriere, bei FC und Progressoren beeinträchtigt war, nicht aber bei den EC.

Darüber hinaus wurde die Entzündung im Darm beurteilt. In der akuten Phase einer Infektion werden zur Bekämpfung der Erreger chemotaktisch Immunzellen angelockt.

Wenn sich jedoch das Entzündungsgeschehen nicht begrenzt und in die chronische Phase übergeht, führt es zur chronischen Immunaktivierung. Das Myxovirus Resistance Protein 1 (Mx1) ist ein Interferon- α induziertes Protein, das antivirale Eigenschaften aufweist und in der akuten Phase einer Infektion zur Bekämpfung der Erreger beiträgt. Eine persistierende Expression nach der akuten Phase ist ein Zeichen der chronischen Immunaktivierung. Grüne Meerkatzen als natürliche Wirte einer SIV-Infektion besitzen die Fähigkeit, Mx1 schnell nach der akuten Phase der Infektion herabzuregulieren, was bei Rhesusaffen nicht der Fall ist [110]. Zudem wurde bei HIV-Patienten eine erhöhte Expression von Mx1 in der akuten Phase der Infektion im Darm beschrieben, die sich nach antiretroviraler Therapie wieder normalisierte [202]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Mx1 im Colon von LTNPs in der chronische Phase der SIV-Infektion immunhistochemisch untersucht. Die Werte der EC waren mit denen von SIV-negativen Tieren vergleichbar. Im Gegensatz dazu zeigten VC mittlere bis hohe und FC und Progressoren eine sehr hohe Expression des Mx1 Proteins im Colon. Dies belegt eindeutig eine hochgradige Inflammation des Dickdarmes bei FC und Progressoren, die ein Indikator für eine geschädigte Darmbarriere darstellt und womöglich zur Erschöpfung des Immunsystems und zur Progression der Krankheit beigetragen hat.

9. Generalisierte Immunaktivierung durch mikrobielle Translokation in allen infizierten Gruppen

Die Aktivierung des Immunsystems stellt die normale Reaktion des Körpers nach dem Kontakt mit Bakterien, Viren oder Parasiten dar. Die erste Abwehrlinie besteht aus dem angeborenen Immunsystem, das unspezifisch jedes als fremd erkannte Antigen bekämpft. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Populationen des angeborenen Immunsystems untersucht, jedoch ergaben sich nur marginale Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Die Rolle von pDCs scheint in der HIV-Infektion sehr wichtig zu sein, da hauptsächlich pDCs INF- α produzieren und zur Etablierung der chronischen Immunaktivierung beitragen können [203]. Auch NK-Zellen spielen eine entscheidende Rolle, indem sie infizierte Zellen töten. Allerdings wurde eine verminderte Funktionalität dieser Zellen in chronischen Krankheiten wie

der HIV-Infektion festgestellt [204]. Hinsichtlich der Prozentzahl dieser Zellpopulationen wurden in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede festgestellt, jedoch ist nicht klar, ob diese Zellen ihre Funktionalität beibehalten haben und ob es diesbezüglich Unterschiede in den untersuchten Gruppen gab. Die geringe Anzahl dieser Zellen insbesondere im Darm stellt eine wesentliche Hürde dar, die bei Funktionsanalysen überwunden werden muss.

Danach wird durch die antigenpräsentierenden Zellen das adaptive Immunsystem aktiviert, das selektiv gegen verschiedene Antigene spezielle Zellen und das humorale Immunsystem aktiviert. Nach der erfolgreichen Bekämpfung des Antigens wird die Antwort des Immunsystems normalerweise gestoppt. Bei der HIV-Infektion können Antigen-spezifische T-Zellantworten gegen das Virus zur Kontrolle der Virusreplikation führen und werden deshalb als vorteilhaft für den Wirt betrachtet im Gegensatz zur HIV-vermittelten generalisierten T-Zell Aktivierung, die zur massiven Virusreplikation und CD4⁺T-Zell Depletion führt [205]. Die anhaltende Aktivierung scheint durch die erhöhte Expression von PD-1 zur Erschöpfung und Funktionsstörung von B- und T-Zellen zu führen [206]. Eine persistierende generalisierte Immunaktivierung wurde bei der HIV- und SIV-Infektion festgestellt [1] [117] [207] [208].

Als Ursache der persistierenden Immunaktivierung wird das Virus selbst angesehen. Darüber hinaus muss das Immunsystem noch weitere Pathogene bekämpfen (z. B. CMV), deren Reaktivierung durch den Verlust der CD4⁺ T-Zellen stattfindet. Zudem wird die Immunaktivierung durch HIV-Proteine und mikrobielle Translokation verstärkt. Dadurch wird weiterhin die Replikation des Virus begünstigt, sodass es letztlich zu einem „vicious cycle“ kommt [209]. Bei HIV-Patienten lassen sich im Blut mikrobielle Bestandteile wie LPS und Flagellin nachweisen [210]. Dies weist darauf hin, dass Bakterien oder ihre Abbauprodukte die systemische Zirkulation erreichen und weiterhin zur Erhaltung der Aktivierung beitragen. Allerdings wurde bei Patienten unter HAART eine Reduzierung des LPS-Spiegels im Plasma beobachtet, er blieb jedoch signifikant höher als bei gesunden Individuen [135].

Als nächstes musste die Frage beantwortet werden, woher diese Abbauprodukte stammen und wie sie die Blutzirkulation erreichen. Der Darm, insbesondere der

Dickdarm, beherbergt eine immense Anzahl an Bakterien. In der HIV-Infektion wurde festgestellt, dass durch die hohe Virusreplikation, die im Darm stattfindet, Schäden in der intestinalen Barriere entstehen [4]. Eine durchlässige Darmbarriere führt dazu, dass Bakterien und ihre metabolischen Produkte die Blutzirkulation erreichen und zur chronischen Immunaktivierung beitragen [135]. Die Translokation mikrobieller Abbauprodukte scheint schon in der sehr frühen Phase der Infektion stattzufinden. Im Makaken-Modell konnte sie bereits vor der Spitzenvirämie festgestellt werden [211].

In diversen Studien wurde der Grad der Immunaktivierung nach Anwendung verschiedener therapeutischer Ansätze gemessen. Eine Langzeit-kombinierte antiretrovirale Therapie trug zur Dämpfung der Immunaktivierung bei, wobei die Virusreplikation viel schneller als die Immunaktivierung unterdrückt wurde [212]. Sowohl bei HIV-Patienten unter ART als auch bei EC wurde konstant eine minimale bis moderate Immunaktivierung nachgewiesen [213]. Auch bei SIV-infizierten Schweinsaffen führte die Verabreichung einer antibiotischen und entzündungshemmenden Therapie zur Begrenzung der generalisierten Entzündung in der akuten Phase der Infektion, allerdings konnte kein Effekt bei chronisch infizierten Tieren festgestellt werden [214]. Im Gegensatz dazu ist bei natürlichen Wirten von SIV (wie Rußmangaben und grünen Meerkatzen) in der chronischen Phase der Infektion keine Immunaktivierung nachweisbar [73] [215]. Dies weist auf die zentrale Rolle der Immunaktivierung in der Pathogenese der HIV-/SIV-Infektion hin. Mittlerweile wird sie als der zuverlässigste Marker für die Entwicklung der Krankheit betrachtet, der sogar der Virusbelastung oder der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Blut vorgezogen wird [1] [117]. Jedoch beobachtete VAN DEN DRIES in seiner Studie von 2017, dass eine Langzeit-kombinierte antiretrovirale Therapie die Immunaktivierung bei HIV-Patienten auf physiologische Spiegel reduzierte [216].

In dieser Arbeit wurde die Immunaktivierung durch die Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR und des Proliferationsmarkers Ki67 auf CD4⁺ T-Helferzellen bewertet. Alle infizierten Gruppen wiesen eine erhöhte Prozentzahl von CD4⁺ T-Helferzellen mit einem aktivierten Phänotyp (CD4⁺Ki67⁺) in Blut und Colon auf. EC tendierten zwar zu niedrigeren Werten, die jedoch im Vergleich zu SIV-

negativen Tieren immer noch eindeutig erhöht waren. Zudem war bei allen infizierten Gruppen in Blut und Colon eine erhöhte Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen zu beobachten, die anhand der Expression von HLA-DR beurteilt wurde. Während stark erhöhte Werte bei den FC und Progressoren gemessen wurden, waren die der EC nur leicht erhöht. Der Verlust der CD4⁺T-Zellen, der im Blut und in der Darmmukosa vor allem bei FC und Progressoren zu beobachten ist, scheint mit der erhöhten Aktivierung der Zellen zusammenzuhängen, die als Ausdruck der chronischen Immunaktivierung betrachtet werden kann.

Die Applikation eines Wirkstoffes, der LPS im Darm bindet, führte im Makaken-Modell zu einem hochgradigem Abfall der Immunaktivierung, was darauf hinweist, dass es eine direkte Verbindung zwischen Immunaktivierung und mikrobieller Translokation gibt [217]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Akkumulation von LPS in Colonbiopsien als Indikator für mikrobielle Translokation [196] gemessen. SIV-negative Tiere wiesen eine geringgradige Ansammlung von LPS in der LP auf. Hingegen war in allen infizierten Gruppen eine erhöhte Akkumulation zu beobachten, die in der Gruppe der VC signifikant war, doch auch FC und die meisten Progressoren wiesen erhöhte Werte auf. Auch in der Gruppe der EC wurde eine Erhöhung festgestellt, die mit der beschriebenen Immunaktivierung zusammenzuhängen scheint.

Bei EC lag die Viruslast im Plasma unter der Nachweisgrenze. Zudem waren bei diesen Tieren im Colon normale Spiegel von CD4⁺T-Zellen und Th17 und niedrige Apoptoserate und geringe Mx1 Expression zu beobachten, was auf eine intakte Darmbarriere hinweist. Jedoch wurde eine leicht erhöhte Prozentzahl an CD4⁺ T-Zellen mit Aktivierungs- und Proliferationsphänotyp und eine leichte Akkumulation von LPS beobachtet. Im Vergleich zu den anderen infizierten Gruppen waren diese Werte geringer verändert, was darauf schließen lässt, dass die intestinale Barriere bei EC weitestgehend intakt war.

Um den allgemeinen Mechanismus der chronischen Immunaktivierung abzuklären, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, da es sich um ein multifaktorielles Phänomen handelt. Der Nachweis von LPS im Blut und in Lymphknoten würde Hinweise auf das Ausmaß der Translokation geben. Die

Kombination pathogener Wirkung des Virus und Translokation mikrobieller Abbauprodukte in den Blutkreislauf scheinen eine entscheidende Rolle bei dem Verlust des Controller-Status zu spielen.

10. Erhaltene CD4⁺ und CD4⁺CD195⁺ T-Zellen im Colon der EC

CD4⁺ T-Helferzellen gehören zu den Zellen der erworbenen Immunität. Ihre Hauptrolle besteht darin, das Signal von antigenpräsentierenden Zellen aufzunehmen und anschließend weitere Komponenten des adaptiven Immunsystems durch die Expression von Zytokinen zu mobilisieren.

Das Hauptmerkmal einer HIV-/SIV-Infektion ist die hochgradige Depletion von CD4⁺ T-Helferzellen, insbesondere in der Darmmukosa [8] [58] [59] [218]. Im Makaken-Modell wurde nachgewiesen, dass der Verlust dieser Zellen bereits sieben Tage nach Infektion beginnt [181]. Während der Abfall der CD4⁺ T-Zellen in der Mukosa schon frühzeitig nach der Infektion auftritt, erfolgt die Depletion dieser Population im Blut erst später und ist nicht so massiv [8] [58]. Im Fall von Controllern wurde eine Erholung der CD4⁺ T-Zellzahlen im Blut und in mukosalen Gewebe beschrieben, die fast die physiologischen Werte erreichte [219]. Auch die Initiierung einer antiretroviralen Therapie in der chronischen Phase der Infektion führte zur partiellen Erholung von CD4⁺ T-Zellen [58]. Wiederum ist das finale AIDS Stadium durch einen hohen Verlust an CD4⁺ T-Zellen, deren Funktion gegen Pathogene oft gestört ist, charakterisiert und kann zu tödlichen opportunistischen Infektionen führen [61].

In dieser Arbeit wurde im Rahmen von Querschnittsanalysen die Prozentzahl der CD4⁺ T-Zellen in der chronischen Phase der Infektion bei LTNPs in Blut und Colon analysiert und mit der von SIV-negativen Tieren und Progressoren verglichen. Während in der Gruppe der EC vergleichsweise hohe CD4⁺ T-Zellen in beiden Organen beobachtet wurden, die den physiologischen Werten sehr ähnlich waren, war bei FC und Progressoren ein massiver Verlust, der insbesondere im Colon ausgeprägt war, zu sehen. Longitudinal betrachtet blieben die Spiegel dieser Zellen bei den EC in beiden Kompartimenten relativ konstant, wohingegen bei VC und FC ein stetiger Verlust in der Darmmukosa beobachtet wurde, der mit der Entwicklung einer AIDS-ähnlichen Erkrankung assoziiert war. Bei VC, die in das Stadium der FC

übergangen, war eine deutliche Abnahme der CD4⁺ T-Zellzahlen besonders in der Mukosa zu sehen. Darüber hinaus wurde eine inverse Korrelation zwischen der CD4⁺ T-Zellen in Blut und Colon und der Viruslast in Blut und Colon festgestellt, die einen Hinweis auf die zytopathogene Wirkung des Virus auf diese Zellen gibt.

Aufgrund dieser Ergebnisse ergaben sich zwei Fragen: zum einen, wie EC ohne antiretrovirale Therapie weitestgehend physiologische CD4⁺ T-Zellzahlen aufweisen, und zum anderen, wie VC und insbesondere FC über mehrere Jahre trotz niedriger CD4⁺ Prozentzahlen und teilweise hoher Viruslast symptomlos bleiben und nicht zu AIDS progredieren. Um diese Fragen zu beantworten, müssen funktionelle immunologische Untersuchungen in der akuten Phase der Infektion durchgeführt werden, um festzustellen, ob es sich bei EC um eine Erholung der Zellen handelt oder ob die Depletion der CD4⁺ T-Zellen von vornherein geringer ist. Da es kaum Unterschiede bezüglich der Spitzenvirämie zwischen den untersuchten Gruppen gab, ist davon auszugehen, dass eine Depletion bei allen Tieren in der akuten Phase stattgefunden hat. Deshalb muss abgeklärt werden, wann und unter dem Einfluss welcher Mechanismen die Erholung von CD4⁺ T-Zellen erfolgt. Darüber hinaus wäre es aufschlussreich, die Funktionalität der CD4⁺ T-Zellen in den verschiedenen Gruppen zu analysieren.

Zudem wurden die Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen anhand der Expression von CD28 und CD95 analysiert. Die Spiegel der naiven CD4⁺ T-Zellen waren bei allen Gruppen in Blut und Colon niedrig, was womöglich mit der Dauer der Infektion und der niedrigen Regenerationskapazität dieser Zellen zusammenhängt [220]. Die kurzlebigen CD4⁺T_{EM} waren in Blut und Colon bei EC erhöht und stehen eventuell mit einer besseren Abwehr gegen Pathogene in Verbindung. Die Prozentzahl an T_{CM} war in den Gruppen der VC, FC und Progressoren in Blut und Colon reduziert, was dadurch erklärt werden kann, dass in der chronischen Phase der Infektion das Virus hauptsächlich in diesen Zellen repliziert [221]. In der Gruppe der EC waren die Spiegel der CD4⁺T_{CM} im Blut und im Colon mit denen von gesunden Tieren vergleichbar, was für ein weitestgehend intaktes Immunsystem bei EC spricht und womöglich mit der niedrigen Viruslast bei diesen Tieren zusammenhängt.

Das CCR5-Molekül (CD195) ist ein Transmembranprotein, das als primärer Korezeptor für HIV und SIV fungiert. Zellen, die CCR5 exprimieren, residieren hauptsächlich in der Darmmukosa und stellen die bevorzugten Zielzellen für das Virus dar [8] [59] [218]. In der akuten Phase der Infektion werden diese Zellen depletiert. Eine Repopulation der intestinalen Mukosa mit CD4⁺CD195⁺ T-Zellen in der chronischen Phase wurde mit der Kontrolle der Infektion assoziiert [68]. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass bei immunisierten Rhesusaffen die Anzahl der proliferierenden CD4⁺CD195⁺ T-Zellen in der rektalen Mukosa vor der Infektion mit der Viruslast in der akuten Phase korrelierte. Obwohl der Mechanismus, der die Vermehrung der Zellen anregt, noch nicht klar ist, scheint der Grad der Aktivierung und Proliferation vor der Infektion eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Krankheit zu spielen [222]. Zudem belegten Studien in natürlichen Wirten von SIV, die keine AIDS-ähnliche Erkrankung entwickeln, dass in Blut, Lymphknoten und mukosalen Geweben weniger CD4⁺ T-Zellen, die den CCR5-Rezeptor exprimieren, vorhanden waren [223] [224].

Bei den LTNPs, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurde der Anteil der CD4⁺CD195⁺ Zellen an CD3⁺ T-Zellen in den verschiedenen Kompartimenten bestimmt. Darüber hinaus wurde die CD195-Expression auf CD4⁺T_{CM} analysiert. Bei FC und Progressoren war ein dramatischer Abfall im Blut und im Colon zu sehen, was im Einklang mit dem allgemeinen Verlust von CD4⁺ T-Zellen bei diesen Gruppen steht und für die präferentielle Infektion dieser Zellen spricht. Im Gegensatz dazu zeigten EC Prozentzahlen vergleichbar zu SIV-negativen Tieren, während die Expression von CD195 auf T_{CM} im Colon signifikant erhöht war im Vergleich zu den übrigen infizierten Gruppen. Dieses Ergebnis war unerwartet, könnte jedoch mit einer optimalen Stimulierung durch APCs zusammenhängen. Eine Bestimmung der CCR5-positiven Zellen bevor und während der akuten Phase der Infektion würde weitere Hinweise darauf geben, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Controller-Staus und der Anzahl dieser Zellen gibt.

11. Erhöhte Expression der Korezeptoren GPR-15 und $\alpha 4\beta 7$ im Colon der FC

Neben dem primären Korezeptor CCR5 werden diverse weitere Moleküle als sekundäre Korezeptoren diskutiert, wie beispielsweise GPR-15 (BOB), Bonzo [225], CCR3, CCR9 [226] oder $\alpha 4\beta 7$ [227], deren Funktion jedoch nicht vollständig abgeklärt ist. Es wurde beschrieben, dass Rußmangaben mit einem genetischen Defizit im CCR5-Rezeptor mit SIVsmm infiziert werden konnten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in diesem Fall CCR5 nicht essentiell für die Infektion ist und GPR-15 als effizienter Korezeptor fungieren kann [228]. Jedoch scheint seine Rolle bei der SIV-Infektion in Anwesenheit des CCR5 Korezeptors in den Hintergrund zu treten [229]. Allerdings wurde in der akuten Phase der SIV-Infektion die Expression des GPR-15 Korezeptors im Darm mit der massiven Apoptose von Epithelzellen in Verbindung gebracht [140]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von GPR-15 in Colonbiopsien immunhistochemisch nachgewiesen. Die Expression war bei SIV-negativen Tieren sehr gering, bei EC und VC mäßig und bei FC erhöht. Bei Progressoren war kein Anstieg an GPR-15 positiven Zellen zu verzeichnen, die Verteilung dieser Zellen entsprach der von SIV-negativen Tieren. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen berechnet werden. Dies lag möglicherweise an dem Zeitpunkt der Entnahme, da sich alle Tiere in der chronischen Phase der Infektion befanden und eine erhöhte Expression in der akuten Phase beschrieben ist. Auch der Anschnitt des Gewebes könnte eine Rolle spielen, da GPR-15 eher auf der basolateralen Fläche des Epithels exprimiert wird [140]. Es ist ebenfalls zu beachten, dass die Expression des Rezeptors gering ist und daher die Untersuchung an Sektionsmaterial ein übersichtlicheres Bild bezüglich der Expression des GPR-15 Korezeptors bieten könnte.

Als ein weiterer Korezeptor für HIV wurde das Integrin- $\alpha 4\beta 7$ beschrieben. Es handelt sich um einen „homing“-Rezeptor, der die Einwanderung von Immunzellen in die intestinale Mukosa fördert und an das HIV-Glykoprotein gp120 bindet [227] [230] [231]. Insbesondere $CD4^+ \alpha 4\beta 7^{hi}$ -Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der HIV-Infektion. *In vitro* Untersuchungen belegen, dass HIV zu signifikant höheren Titern in $CD4^+ \alpha 4\beta 7^{hi}$ -Zellen im Vergleich zu $CD4^+ \alpha 4\beta 7^{low}$ -Zellen repliziert [115]. BYRAREDDY

et al. belegten in ihrer Studie, dass verschiedene Affenspezies eine unterschiedliche Expression von $\alpha 4\beta 7$ auf $CD4^+$ T-Zellen aufwiesen. Nachweislich exprimieren natürliche Wirte für SIV das Integrin in niedrigeren Prozentzahlen als Rhesusaffen [232]. Da SIV an das Integrin bindet, kann die SIV-Infektion möglicherweise zu einem Abbau der Immunzellen in der LP, die $\alpha 4\beta 7$ exprimieren, führen [233]. Um weiterhin die Rolle des Integrins in der SIV-Infektion zu untersuchen, wurde bei SIV-infizierten Rhesusaffen die Applikation eines monoklonalen Antikörpers gegen $\alpha 4\beta 7$ ausgetestet, die zusammen mit ART zu einer langanhaltenden Unterdrückung der Virusreplikation auch nach Abbruch der Therapie führte [234].

Anscheinend spielt das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin eine entscheidende Rolle in der akuten Phase der SIV-Infektion. Wie die Situation in Blut und Darm von SIV-Langzeit-infizierten Rhesusaffen ist, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Deshalb wurde in dieser Studie die Expression auf Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems untersucht. Zu diesem Zeitpunkt stand kein Probenmaterial von Progressoren zur Verfügung.

Hinsichtlich der Spiegel der $\alpha 4\beta 7$ positiven Zellen der angeborenen Immunität wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den infizierten Gruppen oder zwischen gesunden und infizierten Tieren beobachtet. Ausschließlich die Expression auf mDCs im Blut war bei VC und FC signifikant vermindert. Dies spricht dafür, dass die Rolle des angeborenen Immunsystems in der chronischen Phase in den Hintergrund zu Rücken scheint.

Von den Zellen des adaptiven Immunsystems wurden $CD3^+$, $CD4^+$, Gedächtnis- $CD4^+$ ($CD4^+CD95^+$) T-Zellen und iNKTs hinsichtlich der Expression von $\alpha 4\beta 7$ in Blut und Colon untersucht. Darüber hinaus wurde auf diesen Zellpopulationen die gleichzeitige Expression der Korezeptoren $\alpha 4\beta 7$ und CCR5 im Blut bestimmt. Es wurde festgestellt, dass im Blut die Expression des Integrins bei allen Zelltypen bei VC und FC dezimiert war, was möglicherweise mit der Depletion dieser Zellpopulationen oder der Einwanderung in den Darm zusammenhängt. Die Werte der EC waren mit denen der SIV-negativen Tieren vergleichbar. Im Einklang mit der bisher bestehenden Literatur [233] war im Darm die gesamte Anzahl von T-Zellen, die $\alpha 4\beta 7$ exprimieren, bei VC und FC geringer. Interessanterweise war der

Prozentsatz der $\alpha 4\beta 7$ exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen, $CD4^+$ Gedächtnis T-Zellen und iNKTs im Colon von FC signifikant erhöht, obwohl die Spiegel dieser Zellen reduziert waren. Auch die Proliferation dieser Zellen war im Blut erhöht. Dies deutet womöglich darauf hin, dass diese Zellen dauerhaft von der Blutbahn in den Darm rekrutiert werden. Das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin könnte auch die Bindung und den Eintritt des Virus in die Zelle ermöglichen bzw. vereinfachen und möglicherweise hängt die höhere Viruslast im Darm der VC und FC mit der erhöhten Expression von $\alpha 4\beta 7$ auf den Zielzellen zusammen.

Darüber hinaus ergab sich die Frage, wie sich die Verteilung der Zellen, die gleichzeitig den CCR5 Rezeptor und das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin exprimieren, in den verschiedenen Gruppen darstellte. Dies wurde auf den oben genannten Zelltypen im Blut analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab Werte, die bei EC und VC vergleichbar mit denen von gesunden Tieren waren. Im Gegensatz dazu wurden bei FC erhöhte Werte festgestellt. Daher hat das Virus bei diesen Zellen mehrere Bindungsmöglichkeiten, was vermutlich mit der Infektion der Zellen verbunden ist. Zudem werden mehr Zellen, die den primären Korezeptor CCR5 exprimieren, in die Darmmukosa gelockt, wo sie möglicherweise infiziert und lysiert werden. Jedoch handelt es sich hier um sehr kleine Populationen. Weitere Analysen sind erforderlich, um die Rolle dieser Zellen abzuklären.

12. Korrelationsanalysen zwischen Viruslasten und T-Zellen

Im Zuge dieser Arbeit wurden Korrelationsanalysen zwischen diversen Zellpopulationen (in Blut und Colon) sowie der Viruslast im Blut und im Colon durchgeführt. Alle infizierten Tiere wurden einbezogen und es ergaben sich hochsignifikante Korrelationen. Eine steigende Viruslast sowohl im Blut als auch im Colon korrelierte mit Depletion der $CD4^+$ T-Zellen im Blut und im Intestinaltrakt. Auch die $CD4^+$ T-Zellsubpopulationen Th17, $CD4^+$ Tregs und $CD4^+$ iNKTs im Blut und im Colon korrelierten invers mit der Viruslast in beiden Organsystemen. Daraus ist zu schließen, dass diese Zellpopulationen im Laufe der SIV-Infektion depletiert werden und dies möglicherweise zur Progression bzw. zum Verlust des Controller-Staus beiträgt.

Im Gegensatz dazu korrelierten die Prozentzahlen der CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺Tregs hochsignifikant mit der Viruslast im Blut und im Colon. Die Prozentzahl der CD8⁺ T-Zellen war zwar erhöht, jedoch wurde die Funktionalität dieser Zellen nicht analysiert. Daten aus früheren Studien belegen, dass im Laufe einer HIV-Infektion die zytotoxische Kapazität dieser Zellen abnimmt [86]. Ein Anstieg an CD8⁺Tregs wurde in der SIV-Infektion beschrieben und mit der Progression der Krankheit assoziiert [104]. Hier wurde auch eine signifikante Korrelation dieser Zellen in beiden untersuchten Organen mit den Viruslasten sowohl im Blut als auch im Colon nachgewiesen.

13. Mildere Veränderungen in der Mukosa der oberen Atemwege im Vergleich zu der Darmmukosa

In dieser Arbeit lag die Untersuchung des Dickdarms von Langzeit-SIV-infizierten Rhesusaffen im Mittelpunkt. Es ergab sich die Möglichkeit, ein weiteres mukosales Kompartiment zu untersuchen: die Schleimhaut der oberen Atemwege mit Hilfe einer bronchoalveolären Lavage (BAL). Zum Zeitpunkt der Untersuchung standen drei SIV-negative Tiere, EC und VC dafür zur Verfügung. Bei den untersuchten Zellen des angeborenen Immunsystems ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bis auf die Prozentzahl der Monozyten, die in der Gruppe der EC signifikant erhöht war. Monozyten können von dem Virus infiziert werden, jedoch werden sie nicht von den CD8⁺ T-Zellen getötet [235]. Daher muss abgeklärt werden, ob bei EC diese Zellen infiziert sind und als Reservoir dienen, oder ob sie für eine bessere Abwehr in dieser Gruppe sprechen. Eine weitere Studie belegte, dass in der chronischen Phase der HIV-Infektion im Gegensatz zu dem Verlust der CD4⁺ T-Zellen in der Darmmukosa kein massiver Verlust an CD4⁺ T-Zellen in der BAL zu beobachten ist [236]. Auch in dieser Arbeit wurden keine Unterschiede hinsichtlich der CD4⁺ T-Zellen in den verschiedenen Gruppen festgestellt. Allerdings war die Prozentzahl der Th17 Zellen in der Gruppe der VC signifikant reduziert. Bei HIV-Patienten wurde wiederum kein Verlust dieser Zellpopulation in der BAL festgestellt [201]. Das abweichende Ergebnis liegt womöglich an der konstanten mittleren Viruslast bei den hier untersuchten Tieren. iNKTs und deren Subpopulationen waren in beiden Gruppen

nicht signifikant verändert. Weiterhin waren in der Gruppe der VC die Anteile an $CD4^+CD195^+$ und $CD4^+CD195^+$ T_{CM} Zellen signifikant reduziert. Auch in diesem mukosalen Kompartiment werden die Zellen von dem Virus infiziert, jedoch ist die Infektionsfrequenz der $CD4^+$ T-Zellen im Blut und im Intestinaltrakt höher [236]. Darüber hinaus wies ein Anstieg Ki67 positiver $CD4^+$ T-Zellen in den infizierten Gruppen auf eine erhöhte Proliferation hin, die auf die generalisierte Immunaktivierung zurückzuführen sein könnte. Obwohl die Atemwege nicht weiter mittels IHC oder hinsichtlich Virusreplikation untersucht wurden, weisen die vorliegenden Ergebnisse im Vergleich zur Darmmukosa auf mildere Veränderungen aufgrund der SIV-Infektion in diesem mukosalen Kompartiment hin. Nichtsdestotrotz war die Anzahl der untersuchten Tiere begrenzt und es war nicht möglich, Daten bei FC und Progressoren zu erheben. Möglicherweise waren die von der Literatur abweichenden Ergebnisse auf die geringe Anzahl der untersuchten negativen Tiere zurückzuführen.

VI. Zusammenfassung

Maria Daskalaki (2018)

Analysen zu intestinalen Immunparametern und zur Darmbarriere bei Langzeit-SIV-infizierten Rhesusaffen

LTNPs (Long-Term Non-Progressors) repräsentieren eine besondere Gruppe bei HIV-infizierten Patienten. Sie sind in der Lage, die Infektion über einen langen Zeitraum zu kontrollieren. Darüber hinaus zeigen diese Patienten unterschiedliche Viruslasten im Blut und können darauf basierend in Untergruppen unterteilt werden. Dieses Phänomen ist auch bei SIV-infizierten Rhesusaffen zu beobachten, die ein hervorragendes Tiermodell für die Erforschung der HIV-Infektion des Menschen darstellen. Der Intestinaltrakt und insbesondere der Dickdarm können als Eintrittspforte dienen und stellen immer den bevorzugten Replikationsort für das Virus dar. Zudem residiert eine hohe Anzahl an Immunzellen im Darm. Bisher ist die Rolle des Darms in der Pathogenese der HIV-Infektion noch nicht vollständig abgeklärt.

Ziel dieser Arbeit war intestinale Immunparameter und die Integrität der Darmbarriere bei Langzeit-SIV-infizierten Rhesusaffen zu analysieren. Initial wurden die Versuchstiere aufgrund ihrer Viruslast im Blut in drei Gruppen unterteilt: Elite Controller (EC), virämische Controller (VC) und failing Controller (FC). Darüber hinaus wurden sowohl Tiere mit klassischem Infektionsverlauf (Progressoren) als auch SIV-negative Tiere untersucht, die als Kontrollen dienten. Die Viruslast im Blut und in *ex vivo* gewonnenen Colonbiopsien wurde bestimmt und die Spiegel diverser Immunzellen in beiden Kompartimenten analysiert. Darüber hinaus lag ein besonderes Interesse in der Bestimmung der Immunaktivierung in den beiden genannten Organbereichen. Colonbiopsien wurden auch histologisch und immunhistochemisch untersucht, um die Integrität der Darmbarriere zu bewerten. Nachstehend folgt die Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit:

1. EC wiesen physiologische Spiegel an CD4⁺ T-Zellen in Blut und Colon auf.
2. Die Spiegel der Th17 und CD4⁺CD195⁺ Zellen waren bei EC in beiden untersuchten Kompartimenten mit denen von SIV-negativen Tieren weitestgehend vergleichbar.
3. Eine erhöhte Immunaktivierung war in Blut und Colon aller infizierten Gruppen zu sehen, am ausgeprägtesten war sie bei FC und Progressoren.
4. Histologische Veränderungen wurden im Colon von Progressoren festgestellt. Hingegen war das Colon der LTNPs in der Zeit ihrer Symptombefreiheit weitestgehend unauffällig.
5. Die Expression des Mx1 Proteins war im Colon der EC vergleichbar mit der bei SIV-negativen Tieren und signifikant erhöht bei FC und Progressoren.
6. EC wiesen im Vergleich zu den anderen infizierten Gruppen eine niedrigere Apoptose im Colon auf, die im Wesentlichen der von nicht infizierten Tieren entsprach.
7. Die Akkumulierung von LPS war im Colongewebe der EC niedriger als bei den übrigen infizierten Gruppen, allerdings leicht, wenn auch nicht signifikant erhöht im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen.
8. Es wurde eine erhöhte Viruslast im Colon von FC und Progressoren festgestellt. Zudem korrelierte die Viruslast im Blut signifikant mit der im Colon.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben deutliche Unterschiede zwischen Langzeit-SIV-Infizierten Tieren und Progressoren, aber auch zwischen den einzelnen Gruppen der Langzeit-Infizierten hinsichtlich der untersuchten Parameter. Die Viruslast in der Gruppe der EC blieb über die Zeit stabil und die immunologischen Untersuchungswerte dieser Gruppe waren in den meisten Fällen den Werten SIV-negativer Tiere sehr ähnlich. Die intestinale Barriere von EC war im Vergleich zu FC und Progressoren nur geringgradig geschädigt. Dies legt den Schluss nahe, dass eine intakte Darmbarriere entscheidend für die Kontrolle der HIV-/SIV Infektion zu sein scheint.

VII. Summary

Maria Daskalaki (2018)

Analysis of intestinal immune parameters and the gut barrier in long-term SIV-infected rhesus macaques

LTNPs (long-term non-progressors) represent a particular group in HIV-infected patients. They are able to control the infection for a long period of time. Based on their different plasma viral loads, these patients can be classified into subgroups. This phenomenon also occurs in SIV-infected rhesus macaques, which are an excellent animal model for studies on the human HIV-infection. The gastrointestinal tract, and in particular the large intestine, can serve as a portal of entry and are the preferential replication site of the virus. In addition, a high number of immune cells reside in the intestine. So far, the role of the intestine in the pathogenesis of HIV-infection has not been fully understood.

The purpose of this thesis was to analyze intestinal immune parameters and the integrity of the gut barrier in long-term SIV-infected rhesus macaques. The LTNP-cohort was divided into three groups based on their viral load in blood: elite controllers (EC), viremic controllers (VC) and failing controllers (FC). In addition, both animals with a typical course of infection (progressors) and SIV-negative animals were examined for comparative reasons. The viral loads in blood and colon biopsies collected *ex vivo* were determined and the levels of various immune cell populations were analyzed in both compartments. Moreover, determination of the immune activation in both these localities was of particular interest. Colon biopsies were also examined histologically and immunohistochemically in order to assess the integrity of the intestinal barrier. Main findings of this thesis can be summarized as follows:

1. EC showed physiological levels of CD4⁺ T cells in blood and colon.
2. The levels of Th17 and CD4⁺CD195⁺ in EC were almost comparable to those of SIV-negative animals in both investigated compartments.
3. Increased immune activation was observed in blood and colon of all infected groups and was especially pronounced in FC and progressors.

4. Histological changes were noted in the colon of progressors. On the contrary, the microscopic structures of the colon of the LTNPs remained normal as long as the animals did not exhibit any clinical signs.
5. Expression of the Mx1 protein in the colon of EC was comparable to that in SIV-negative animals and significantly increased in FC and progressors.
6. EC showed lower apoptosis in the colon compared to the other infected groups.
7. The accumulation of LPS in gut tissue was lower in EC than in the other infected groups and only slightly elevated compared to levels in uninfected controls.
8. Viral load was raised in the colon of FC and progressors and the plasma viral loads correlated significantly with those in the colon.

The results of this thesis demonstrated significant differences between LTNPs and progressors but also between the groups of the LTNPs regarding the analyzed parameters. The plasma viral load in EC remained stable over time and the analyzed immune parameters of this group were mostly comparable to those of SIV-negative animals. The intestinal barrier of EC remained almost normal when compared to that of FC and progressors. This suggests that an intact gut barrier seems to play a critical role in contributing to the control of HIV/SIV infection.

VIII. Literaturverzeichnis

- 1 HAZENBERG MD, OTTO SA, VAN BENTHEM BH, ROOS MT, COUTINHO RA, LANGE JM, HAMANN D, PRINS M, MIEDEMA F: **Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS.** AIDS 2003; 17:1881-1888.
- 2 PAIARDINI M, MULLER-TRUTWIN M: **HIV-associated chronic immune activation.** Immunol Rev 2013; 254:78-101.
- 3 BOASSO A, SHEARER GM, CHOUGNET C: **Immune dysregulation in human immunodeficiency virus infection: know it, fix it, prevent it?** J Intern Med 2009; 265:78-96.
- 4 BRENCHLEY JM, PRICE DA, DOUEK DC: **HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?** Nat Immunol 2006; 7:235-239.
- 5 KLATT NR, FUNDERBURG NT, BRENCHLEY JM: **Microbial translocation, immune activation, and HIV disease.** Trends Microbiol 2013; 21:6-13.
- 6 PAIARDINI M, FRANK I, PANDREA I, APETREI C, SILVESTRI G: **Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis.** AIDS Rev 2008; 10:36-46.
- 7 REDD AD, GRAY RH, QUINN TC: **Is microbial translocation a cause or consequence of HIV disease progression?** J Infect Dis 2011; 203:744-745; author reply 746.
- 8 BRENCHLEY JM, SCHACKER TW, RUFF LE, PRICE DA, TAYLOR JH, BEILMAN GJ, NGUYEN PL, KHORUTS A, LARSON M, HAASE AT, DOUEK DC: **CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract.** J Exp Med 2004; 200:749-759.
- 9 ZEITZ M, ULLRICH R, SCHNEIDER T, KEWENIG S, HOHLOCH K, RIECKEN EO: **HIV/SIV enteropathy.** Ann N Y Acad Sci 1998; 859:139-148.
- 10 SHARP PM, HAHN BH: **Origins of HIV and the AIDS pandemic.** Cold Spring Harb Perspect Med 2011; 1:a006841.
- 11 SHEDLOCK DJ, SILVESTRI G, WEINER DB: **Monkeying around with HIV vaccines: using rhesus macaques to define 'gatekeepers' for clinical trials.** Nat Rev Immunol 2009; 9:717-728.
- 12 SAEZ-CIRION A, JACQUELIN B, BARRE-SINOUSSE F, MULLER-TRUTWIN M: **Immune responses during spontaneous control of HIV and AIDS: what is the hope for a cure?** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2014; 369:20130436.
- 13 LING B, MOHAN M, LACKNER AA, GREEN LC, MARX PA, DOYLE LA, VEAZEY RS: **The large intestine as a major reservoir for simian immunodeficiency virus in macaques with long-term, nonprogressing infection.** J Infect Dis 2010; 202:1846-1854.
- 14 HATANO H, SOMSOUK M, SINCLAIR E, HARVILL K, GILMAN L, COHEN M, HOH R, HUNT PW, MARTIN JN, WONG JK, DEEKS SG, YUKL SA: **Comparison of HIV DNA and RNA in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected controllers and noncontrollers.** AIDS 2013; 27:2255-2260.

- 15 NARAYAN O, CLEMENTS JE: **Biology and pathogenesis of lentiviruses**. J Gen Virol 1989; 70:1617-1639.
- 16 CLEMENTS JE, ZINK MC: **Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections**. Clin Microbiol Rev 1996; 9:100-117.
- 17 GOTTLIEB MS, SCHROFF R, SCHANKER HM, WEISMAN JD, FAN PT, WOLF RA, SAXON A: **Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency**. N Engl J Med 1981; 305:1425-1431.
- 18 CDC: **Current Trends Acquired Immune Deficiency Syndrome AIDS: Precautions for Clinical and Laboratory Staffs** Morbidity and Mortality Weekly Reports 1982; 31:577-580.
- 19 BARRE-SINOSSI F, CHERMANN JC, REY F, NUGEYRE MT, CHAMARET S, GRUEST J, DAUGUET C, AXLER-BLIN C, VEZINET-BRUN F, ROUZIOUX C, ROZENBAUM W, MONTAGNIER L: **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome AIDS**. Science 1983; 220:868-871.
- 20 ALIZON M, SONIGO P, BARRE-SINOSSI F, CHERMANN JC, TIOLLAIS P, MONTAGNIER L, WAIN-HOBSON S: **Molecular cloning of lymphadenopathy-associated virus**. Nature 1984; 312:757-760.
- 21 CLAVEL F, GUETARD D, BRUN-VEZINET F, CHAMARET S, REY MA, SANTOS-FERREIRA MO, LAURENT AG, DAUGUET C, KATLAMA C, ROUZIOUX C, ET AL.: **Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS**. Science 1986; 233:343-346.
- 22 COFFIN J, HAASE A, LEVY JA, MONTAGNIER L, OROSZLAN S, TEICH N, TEMIN H, TOYOSHIMA K, VARMUS H, VOGT P, ET AL.: **Human immunodeficiency viruses**. Science 1986; 232:697.
- 23 GUYADER M, EMERMAN M, SONIGO P, CLAVEL F, MONTAGNIER L, ALIZON M: **Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2**. Nature 1987; 326:662-669.
- 24 ANCELLE R, BLETRY O, BAGLIN AC, BRUN-VEZINET F, REY MA, GODEAU P: **Long incubation period for HIV-2 infection**. Lancet 1987; 1:688-689.
- 25 ROBERTSON DL, ANDERSON JP, BRADAC JA, CARR JK, FOLEY B, FUNKHOUSER RK, GAO F, HAHN BH, KALISH ML, KUIKEN C, LEARN GH, LEITNER T, MCCUTCHAN F, OSMANOV S, PEETERS M, PIENIAZEK D, SALMINEN M, SHARP PM, WOLINSKY S, KORBER B: **HIV-1 nomenclature proposal**. Science 2000; 288:55-56.
- 26 SIMON F, MAUCLERE P, ROQUES P, LOUSSERT-AJAKA I, MULLER-TRUTWIN MC, SARAGOSTI S, GEORGES-COURBOT MC, BARRE-SINOSSI F, BRUN-VEZINET F: **Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O**. Nat Med 1998; 4:1032-1037.

- 27 PLANTIER JC, LEOZ M, DICKERSON JE, DE OLIVEIRA F, CORDONNIER F, LEMEE V, DAMOND F, ROBERTSON DL, SIMON F: **A new human immunodeficiency virus derived from gorillas**. *Nat Med* 2009; 15:871-872.
- 28 DE PINA-ARAUJO II, GUIMARAES ML, BELLO G, VICENTE AC, MORGADO MG: **Profile of the HIV epidemic in Cape Verde: molecular epidemiology and drug resistance mutations among HIV-1 and HIV-2 infected patients from distinct islands of the archipelago**. *PLoS One* 2014; 9:e96201.
- 29 LETVIN NL, EATON KA, ALDRICH WR, SEHGAL PK, BLAKE BJ, SCHLOSSMAN SF, KING NW, HUNT RD: **Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:2718-2722.
- 30 DANIEL MD, LETVIN NL, KING NW, KANNAGI M, SEHGAL PK, HUNT RD, KANKI PJ, ESSEX M, DESROSIERS RC: **Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques**. *Science* 1985; 228:1201-1204.
- 31 KANKI PJ, ALROY J, ESSEX M: **Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-III/LAV from wild-caught African green monkeys**. *Science* 1985; 230:951-954.
- 32 FULTZ PN, MCCLURE HM, ANDERSON DC, SWENSON RB, ANAND R, SRINIVASAN A: **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*)**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:5286-5290.
- 33 TSUJIMOTO H, COOPER RW, KODAMA T, FUKASAWA M, MIURA T, OHTA Y, ISHIKAWA K, NAKAI M, FROST E, ROELANTS GE, ET AL.: **Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses**. *J Virol* 1988; 62:4044-4050.
- 34 PEETERS M, HONORE C, HUET T, BEDJABAGA L, OSSARI S, BUSSI P, COOPER RW, DELAPORTE E: **Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon**. *AIDS* 1989; 3:625-630.
- 35 VANDEWOUDE S, APETREI C: **Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses**. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:728-762.
- 36 MULLER-TRUTWIN MC, CORBET S, TAVARES MD, HERVE VM, NERRIENET E, GEORGES-COURBOT MC, SAURIN W, SONIGO P, BARRE-SINOUSSE F: **The evolutionary rate of nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIVagm) is in agreement with a rapid and continuous replication in vivo**. *Virology* 1996; 223:89-102.
- 37 APETREI C, ROBERTSON DL, MARX PA: **The history of SIVS and AIDS: epidemiology, phylogeny and biology of isolates from naturally SIV infected non-human primates (NHP) in Africa**. *Front Biosci* 2004; 9:225-254.
- 38 GAO F, BAILES E, ROBERTSON DL, CHEN Y, RODENBURG CM, MICHAEL SF, CUMMINS LB, ARTHUR LO, PEETERS M, SHAW GM, SHARP PM, HAHN BH: **Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes***. *Nature* 1999; 397:436-441.

- 39 HRDY DB: **Cultural practices contributing to the transmission of human immunodeficiency virus in Africa.** Rev Infect Dis 1987; 9:1109-1119.
- 40 HIRSCH VM, OLMSTED RA, MURPHEY-CORB M, PURCELL RH, JOHNSON PR: **An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2.** Nature 1989; 339:389-392. RAMBAUT A, POSADA D, CRANDALL KA, HOLMES EC: **The causes and consequences of HIV evolution.** Nat Rev Genet 2004; 5:52-61.
- 42 KWONG PD, WYATT R, ROBINSON J, SWEET RW, SODROSKI J, HENDRICKSON WA: **Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.** Nature 1998; 393:648-659.
- 43 GELDERBLOM HR, HAUSMANN EH, OZEL M, PAULI G, KOCH MA: **Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins.** Virology 1987; 156:171-176.
- 44 FRIEDLAND GH, SALTZMAN BR, ROGERS MF, KAHL PA, LESSER ML, MAYERS MM, KLEIN RS: **Lack of transmission of HTLV-III/LAV infection to household contacts of patients with AIDS or AIDS-related complex with oral candidiasis.** N Engl J Med 1986; 314:344-349.
- 45 JAFFE HW, BREGMAN, D. J., AND SELIK, R. M.: **Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases.** J Infect Dis 1983; 148:339-345.
- 46 SHAW GM, HUNTER E: **HIV transmission.** Cold Spring Harb Perspect Med 2012; 2:a006965.
- 47 DALGLEISH AG, BEVERLEY PC, CLAPHAM PR, CRAWFORD DH, GREAVES MF, WEISS RA: **The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.** Nature 1984; 312:763-767.
- 48 SATTENTAU QJ: **The role of the CD4 antigen in HIV infection and immune pathogenesis.** AIDS 1988; 2 Suppl 1:S11-16.
- 49 VEAZEY RS, THAM, I. C., MANSFIELD, K. G., DEMARIA, M., FORAND, A. E., SHVETZ, D. E., CHALIFOUX, L. V., SEHGAL, P. K., LACKNER, A. A.: **Identifying the target cell in primary simian immunodeficiency virus (SIV) infection: highly activated memory CD4+ T cells are rapidly eliminated in early SIV infection in vivo.** J Virol 2000; 74:57-64.
- 50 DENG K, SILICIANO RF: **HIV: Early treatment may not be early enough.** Nature 2014; 512:35-36.
- 51 DORANZ BJ, RUCKER J, YI Y, SMYTH RJ, SAMSON M, PEIPER SC, PARMENTIER M, COLLMAN RG, DOMS RW: **A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors.** Cell 1996; 85:1149-1158.
- 52 FENG Y, BRODER, C. C., KENNEDY, P. E., BERGER, E. A.: **HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.** Science 1996; 272:872-877.

- 53 FREED EO, DELWART, E. L., BUCHSCHACHER, G. L., JR. PANGANIBAN, A. T.: **A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity.** Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89:70-74.
- 54 PRESTON BD, POIESZ, B. J., AND LOEB, L. A.: **Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase.** Science 1988; 242:1168-1171.
- 55 WILLIAMS SA, AND GREENE, W. C.: **Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation.** Cytokine 2007; 39:63-74.
- 56 PANTALEO G, AND FAUCI, A. S.: **Immunopathogenesis of HIV infection.** Annu Rev Microbiol 1996; 50:825-854.
- 57 LIM SG, CONDEZ A, LEE CA, JOHNSON MA, ELIA C, POULTER LW: **Loss of mucosal CD4 lymphocytes is an early feature of HIV infection.** Clin Exp Immunol 1993; 92:448-454.
- 58 GUADALUPE M, REAY E, SANKARAN S, PRINDIVILLE T, FLAMM J, MCNEIL A, DANDEKAR S: **Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy.** J Virol 2003; 77:11708-11717.
- 59 MEHANDRU S, POLES MA, TENNER-RACZ K, HOROWITZ A, HURLEY A, HOGAN C, BODEN D, RACZ P, MARKOWITZ M: **Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract.** J Exp Med 2004; 200:761-770.
- 60 COOPER DA, GOLD, J., MACLEAN, P., DONOVAN, B., FINLAYSON, R., BARNES, T. G., MICHELMORE, H. M., BROOKE, P., PENNY, R.: **Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion.** Lancet 1985; 1:537-540.
- 61 OKOYE AA, PICKER LJ: **CD4+ T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure.** Immunol Rev 2013; 254:54-64.
- 62 GROSSMAN Z, MEIER-SCHELLERSHEIM M, PAUL WE, PICKER LJ: **Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys.** Nat Med 2006; 12:289-295.
- 63 POOROLAJAL J, HOOSHMAND E, MAHJUB H, ESMAILNASAB N, JENABI E: **Survival rate of AIDS disease and mortality in HIV-infected patients: a meta-analysis.** Public Health 2016; 139:3-12.
- 64 SAEZ-CIRION A, PANCINO G, SINET M, VENET A, LAMBOTTE O, GROUP AEHCS: **HIV controllers: how do they tame the virus?** Trends Immunol 2007; 28:532-540.
- 65 OLSON AD, GUIGUET M, ZANGERLE R, GILL J, PEREZ-HOYOS S, LODI S, GHOSN J, DORRUCCI M, JOHNSON A, SANNES M, MORENO S, PORTER K, FOR CCIE: **Evaluation of rapid progressors in HIV infection as an extreme phenotype.** J Acquir Immune Defic Syndr 2014; 67:15-21.

- 66 KESTLER H, KODAMA T, RINGLER D, MARTHAS M, PEDERSEN N, LACKNER A, REGIER D, SEHGAL P, DANIEL M, KING N, ET AL.: **Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus.** Science 1990; 248:1109-1112.
- 67 DEGHANI H, PUFFER BA, DOMS RW, HIRSCH VM: **Unique pattern of convergent envelope evolution in simian immunodeficiency virus-infected rapid progressor macaques: association with CD4-independent usage of CCR5.** J Virol 2003; 77:6405-6418.
- 68 LING B, VEAZEY RS, HART M, LACKNER AA, KURODA M, PAHAR B, MARX PA: **Early restoration of mucosal CD4 memory CCR5 T cells in the gut of SIV-infected rhesus predicts long term non-progression.** AIDS 2007; 21:2377-2385.
- 69 STREMLAU M, OWENS CM, PERRON MJ, KIESSLING M, AUTISSIER P, SODROSKI J: **The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys.** Nature 2004; 427:848-853.
- 70 EVANS DT, SILVESTRI G: **Nonhuman primate models in AIDS research.** Curr Opin HIV AIDS 2013; 8:255-261.
- 71 POLICICCHIO BB, PANDREA I, APETREI C: **Animal Models for HIV Cure Research.** Front Immunol 2016; 7:12.
- 72 CARRYL H, SWANG M, LAWRENCE J, CURTIS K, KAMBOJ H, VAN ROMPAY KK, DE PARIS K, BURKE MW: **Of mice and monkeys: can animal models be utilized to study neurological consequences of pediatric HIV-1 infection?** ACS Chem Neurosci 2015; 6:1276-1289.
- 73 CHAHROUDI A, BOSINGER SE, VANDERFORD TH, PAIARDINI M, SILVESTRI G: **Natural SIV hosts: showing AIDS the door.** Science 2012; 335:1188-1193.
- 74 VAN ROMPAY KKA: **Tackling HIV and AIDS: contributions by non-human primate models.** Lab Anim NY 2017; 46:259-270.
- 75 FAURIAT C, LONG EO, LJUNGGREN HG, BRYCESON YT: **Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition.** Blood 2010; 115:2167-2176.
- 76 MURPHY KM, TRAVERS, P., WALPORT, M. In: **Janeway Immunologie.** Springer pp. 123-124, 2009.
- 77 MELA CM, STEEL A, LINDSAY J, GAZZARD BG, GOTCH FM, GOODIER MR: **Depletion of natural killer cells in the colonic lamina propria of viraemic HIV-1-infected individuals.** AIDS 2007; 21:2177-2182.
- 78 WITHERDEN DA, HAVRAN WL: **Molecular aspects of epithelial gammadelta T cell regulation.** Trends Immunol 2011; 32:265-271.
- 79 LAWAND M, DECHANET-MERVILLE J, DIEU-NOSJEAN MC: **Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications.** Front Immunol 2017; 8:761.

- 80 LI Z, LI W, LI N, JIAO Y, CHEN D, CUI L, HU Y, WU H, HE W: **gd T cells are involved in acute HIV infection and associated with AIDS progression.** PLoS One 2014; 9:e106064.
- 81 BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, DAVOUST J, LEBECQUE S, LIU YJ, PULENDRAN B, PALUCKA K: **Immunobiology of dendritic cells.** Annu Rev Immunol 2000; 18:767-811.
- 82 COLLIN M, MCGOVERN N, HANIFFA M: **Human dendritic cell subsets.** Immunology 2013; 140:22-30.
- 83 DERBY N, MARTINELLI E, ROBBIANI M: **Myeloid dendritic cells in HIV-1 infection.** Curr Opin HIV AIDS 2011; 6:379-384.
- 84 ALLERS K, PUYSKENS A, EPPLE HJ, SCHURMANN D, HOFMANN J, MOOS V, SCHNEIDER T: **The effect of timing of antiretroviral therapy on CD4+ T-cell reconstitution in the intestine of HIV-infected patients.** Mucosal Immunol 2016; 9:265-274.
- 85 WALKER CM, MOODY DJ, STITES DP, LEVY JA: **CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication.** Science 1986; 234:1563-1566.
- 86 ROBERTS ER, CARNATHAN DG, LI H, SHAW GM, SILVESTRI G, BETTS MR: **Collapse of Cytolytic Potential in SIV-Specific CD8+ T Cells Following Acute SIV Infection in Rhesus Macaques.** PLoS Pathog 2016; 12:e1006135.
- 87 PAHAR B, LACKNER AA, VEAZEY RS: **Intestinal double-positive CD4+CD8+ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines.** Eur J Immunol 2006; 36:583-592.
- 88 VEAZEY RS, MANSFIELD KG, THAM IC, CARVILLE AC, SHVETZ DE, FORAND AE, LACKNER AA: **Dynamics of CCR5 expression by CD4+ T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection.** J Virol 2000; 74:11001-11007.
- 89 SUNDARAVARADAN V, MIR KD, SODORA DL: **Double-negative T cells during HIV/SIV infections: potential pinch hitters in the T-cell lineup.** Curr Opin HIV AIDS 2012; 7:164-171.
- 90 GUGLANI L, KHADER SA: **Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation.** Curr Opin HIV AIDS 2010; 5:120-127.
- 91 HUNDORFEAN G, NEURATH MF, MUDTER J: **Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease.** Inflamm Bowel Dis 2012; 18:180-186.
- 92 UENO A, GHOSH A, HUNG D, LI J, JIJON H: **Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease.** World J Gastroenterol 2015; 21:12283-12295.
- 93 STOCKINGER B, OMENETTI S: **The dichotomous nature of T helper 17 cells.** Nat Rev Immunol 2017; 17:535-544.
- 94 KLATT NR, ESTES JD, SUN X, ORTIZ AM, BARBER JS, HARRIS LD, CERVASI B, YOKOMIZO LK, PAN L, VINTON CL, TABB B, CANARY LA, DANG Q, HIRSCH VM, ALTER G, BELKAID Y, LIFSON JD, SILVESTRI G, MILNER JD, PAIARDINI M, HADDAD EK,

- BRENCHLEY JM: **Loss of mucosal CD103+ DCs and IL-17+ and IL-22+ lymphocytes is associated with mucosal damage in SIV infection.** *Mucosal Immunol* 2012; 5:646-657.
- 95 RYAN ES, MICCI L, FROMENTIN R, PAGANINI S, MCGARY CS, EASLEY K, CHOMONT N, PAIARDINI M: **Loss of Function of Intestinal IL-17 and IL-22 Producing Cells Contributes to Inflammation and Viral Persistence in SIV-Infected Rhesus Macaques.** *PLoS Pathog* 2016; 12:e1005412.
- 96 BIXLER SL, MATTAPALLIL JJ: **Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection.** *Clin Dev Immunol* 2013; 2013:852418.
- 97 NIGAM P, KWA S, VELU V, AMARA RR: **Loss of IL-17-producing CD8 T cells during late chronic stage of pathogenic simian immunodeficiency virus infection.** *J Immunol* 2011; 186:745-753.
- 98 KLATT NR, BRENCHLEY JM: **Th17 cell dynamics in HIV infection.** *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5:135-140.
- 99 MORENO-FERNANDEZ ME, PRESICCE P, CHOUGNET CA: **Homeostasis and function of regulatory T cells in HIV/SIV infection.** *J Virol* 2012; 86:10262-10269.
- 100 MALOY KJ, POWRIE F: **Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease.** *Nature* 2011; 474:298-306.
- 101 BELKAID Y, ROUSE BT: **Natural regulatory T cells in infectious disease.** *Nat Immunol* 2005; 6:353-360.
- 102 VIGNALI DA, COLLISON LW, WORKMAN CJ: **How regulatory T cells work.** *Nat Rev Immunol* 2008; 8:523-532.
- 103 CHAPUT N, LOUAFI S, BARDIER A, CHARLOTTE F, VAILLANT JC, MENEGAUX F, ROSENZWAJG M, LEMOINE F, KLATZMANN D, TAIEB J: **Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue.** *Gut* 2009; 58:520-529.
- 104 NIGAM P, VELU V, KANNANGANAT S, CHENNAREDDI L, KWA S, SIDDIQUI M, AMARA RR: **Expansion of FOXP3+ CD8 T cells with suppressive potential in colorectal mucosa following a pathogenic simian immunodeficiency virus infection correlates with diminished antiviral T cell response and viral control.** *J Immunol* 2010; 184:1690-1701.
- 105 OPASAWATCHAI A, MATANGKASOMBUT P: **iNKT Cells and Their Potential Lipid Ligands during Viral Infection.** *Front Immunol* 2015; 6:378.
- 106 VAN DER VLIET HJ, VON BLOMBERG BM, HAZENBERG MD, NISHI N, OTTO SA, VAN BENTHEM BH, PRINS M, CLAESSEN FA, VAN DEN EERTWEGH AJ, GIACCONE G, MIEDEMA F, SCHEPER RJ, PINEDO HM: **Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection.** *J Immunol* 2002; 168:1490-1495.
- 107 COUZIN-FRANKEL J: **Inflammation bares a dark side.** *Science* 2010; 330:1621.
- 108 SADLER AJ, WILLIAMS BR: **Interferon-inducible antiviral effectors.** *Nat Rev Immunol* 2008; 8:559-568.

- 109 HALLER O, KOCHS G: **Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity.** *Traffic* 2002; 3:710-717.
- 110 FURUYA AK, SHARIFI HJ, DE NORONHA CM: **The Curious Case of Type I IFN and MxA: Tipping the Immune Balance in AIDS.** *Front Immunol* 2014; 5:419.
- 111 JOCHEMS SP, PETITJEAN G, KUNKEL D, LIOVAT AS, PLOQUIN MJ, BARRE-SINOUSI F, LEBON P, JACQUELIN B, MULLER-TRUTWIN MC: **Modulation of type I interferon-associated viral sensing during acute simian immunodeficiency virus infection in African green monkeys.** *J Virol* 2015; 89:751-762.
- 112 UTAY NS, DOUEK DC: **Interferons and HIV Infection: The Good, the Bad, and the Ugly.** *Pathog Immun* 2016; 1:107-116.
- 113 ZENT R, SRICHAJ M.B.: **Integrin Structure and Function.** In: **Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer.** Springer, New York, NY 19-41, 2010.
- 114 ARORA Z, SHEN B: **Biological therapy for ulcerative colitis.** *Gastroenterol Rep Oxf* 2015; 3:103-109.
- 115 CICALA C, MARTINELLI E, MCNALLY JP, GOODE DJ, GOPAUL R, HIATT J, JELICIC K, KOTTILIL S, MACLEOD K, O'SHEA A, PATEL N, VAN RYK D, WEI D, PASCUCCIO M, YI L, MCKINNON L, IZULLA P, KIMANI J, KAUL R, FAUCI AS, ARTHOS J: **The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:20877-20882.
- 116 BYRAREDDY SN, KALLAM B, ARTHOS J, CICALA C, NAWAZ F, HIATT J, KERSH EN, MCNICHOLL JM, HANSON D, REIMANN KA, BRAMEIER M, WALTER L, ROGERS K, MAYNE AE, DUNBAR P, VILLINGER T, LITTLE D, PARSLOW TG, SANTANGELO PJ, VILLINGER F, FAUCI AS, ANSARI AA: **Targeting alpha4beta7 integrin reduces mucosal transmission of simian immunodeficiency virus and protects gut-associated lymphoid tissue from infection.** *Nat Med* 2014; 20:1397-1400.
- 117 GIORGI JV, HULTIN LE, MCKEATING JA, JOHNSON TD, OWENS B, JACOBSON LP, SHIH R, LEWIS J, WILEY DJ, PHAIR JP, WOLINSKY SM, DETELS R: **Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage.** *J Infect Dis* 1999; 179:859-870.
- 118 MARCHETTI G, TINCATI C, SILVESTRI G: **Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS.** *Clin Microbiol Rev* 2013; 26:2-18.
- 119 FINK SL, COOKSON BT: **Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells.** *Infect Immun* 2005; 73:1907-1916.
- 120 SHALINI S, DORSTYN L, DAWAR S, KUMAR S: **Old, new and emerging functions of caspases.** *Cell Death Differ* 2015; 22:526-539.

- 121 DOITSH G, GALLOWAY NL, GENG X, YANG Z, MONROE KM, ZEPEDA O, HUNT PW, HATANO H, SOWINSKI S, MUNOZ-ARIAS I, GREENE WC: **Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection.** *Nature* 2014; 505:509-514.
- 122 SOMSOUK M, ESTES JD, DELEAGE C, DUNHAM RM, ALBRIGHT R, INADOMI JM, MARTIN JN, DEEKS SG, MCCUNE JM, HUNT PW: **Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection.** *AIDS* 2015; 29:43-51.
- 123 LEVINE DS, HAGGITT RC: **Normal histology of the colon.** *Am J Surg Pathol* 1989; 13:966-984.
- 124 PABST R, RUSSELL MW, BRANDTZAEG P: **Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut.** *Trends Immunol* 2008; 29:206-208; author reply 209-210.
- 125 PABST R: **The anatomical basis for the immune function of the gut.** *Anat Embryol Berl* 1987; 176:135-144.
- 126 ZEITZ M, SCHIEFERDECKER HL, ULLRICH R, JAHN HU, JAMES SP, RIECKEN EO: **Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes.** *Immunol Res* 1991; 10:199-206.
- 127 GUY-GRAND D, VASSALLI P: **Gut intraepithelial T lymphocytes.** *Curr Opin Immunol* 1993; 5:247-252.
- 128 N. U: *Kurzlehrbuch Histologie*: Thieme, 2011.
- 129 PEREZ-LOPEZ A, BEHNSEN J, NUCCIO SP, RAFFATELLU M: **Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria.** *Nat Rev Immunol* 2016; 16:135-148.
- 130 KOCH S, NUSRAT A: **The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut.** *Annu Rev Pathol* 2012; 7:35-60.
- 131 DUCHMANN D, HOFFMANN, J., MARTH, T., SCHNEIDER, T., STALLMACH, A., UND ZEITZ, M.: **Mukosales Immunsystem im Darm - Immunologische Grundlagen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie.** *Magazin Forschung der Universität des Saarlandes* 1999; 1:47-64.
- 132 TURNER JR: **Intestinal mucosal barrier function in health and disease.** *Nat Rev Immunol* 2009; 9:799-809.
- 133 FINDLEY MK, KOVAL M: **Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins.** *IUBMB Life* 2009; 61:431-437.
- 134 BHATTACHARYYA S, BORTHAKUR A, PANT N, DUDEJA PK, TOBACMAN JK: **Bcl10 mediates LPS-induced activation of NF-kappaB and IL-8 in human intestinal epithelial cells.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293:429-437.
- 135 BRECHLEY JM, PRICE DA, SCHACKER TW, ASHER TE, SILVESTRI G, RAO S, KAZAZ Z, BORNSTEIN E, LAMBOTTE O, ALTMANN D, BLAZAR BR, RODRIGUEZ B, TEIXEIRA-JOHNSON L, LANDAY A, MARTIN JN, HECHT FM, PICKER LJ, LEDERMAN MM, DEEKS SG, DOUEK DC: **Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.** *Nat Med* 2006; 12:1365-1371.

- 136 MOWAT AM, VINEY JL: **The anatomical basis of intestinal immunity**. Immunol Rev 1997; 156:145-166.
- 137 DI MASCIO M, PAIK CH, CARRASQUILLO JA, MAENG JS, JANG BS, SHIN IS, SRINIVASULA S, BYRUM R, NERIA A, KOPP W, CATALFAMO M, NISHIMURA Y, REIMANN K, MARTIN M, LANE HC: **Noninvasive in vivo imaging of CD4 cells in simian-human immunodeficiency virus (SHIV) -infected nonhuman primates**. Blood 2009; 114:328-337.
- 138 ANTON PA, ELLIOTT J, POLES MA, MCGOWAN IM, MATUD J, HULTIN LE, GROVIT-FERBAS K, MACKAY CR, CHEN ISY, GIORGI JV: **Enhanced levels of functional HIV-1 co-receptors on human mucosal T cells demonstrated using intestinal biopsy tissue**. AIDS 2000; 14:1761-1765.
- 139 SATTENTAU Q: **HIV's gut feeling**. Nat Immunol 2008; 9:225-227.
- 140 LI Q, ESTES JD, DUAN L, JESSURUN J, PAMBUCCIAN S, FORSTER C, WIETGREFE S, ZUPANCIC M, SCHACKER T, REILLY C, CARLIS JV, HAASE AT: **Simian immunodeficiency virus-induced intestinal cell apoptosis is the underlying mechanism of the regenerative enteropathy of early infection**. J Infect Dis 2008; 197:420-429.
- 141 CLAYTON F, KOTLER DP, KUWADA SK, MORGAN T, STEPAN C, KUANG J, LE J, FANTINI J: **Gp120-induced Bob/GPR15 activation: a possible cause of human immunodeficiency virus enteropathy**. Am J Pathol 2001; 159:1933-1939.
- 142 KIM SV, XIANG WV, KWAK C, YANG Y, LIN XW, OTA M, SARPEL U, RIFKIN DB, XU R, LITTMAN DR: **GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine mucosa**. Science 2013; 340:1456-1459.
- 143 WIGHT TN, POTTER-PERIGO S: **The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2011; 301:G950-955.
- 144 YEN EF, PARDI DS: **Review of the microscopic colitides**. Curr Gastroenterol Rep 2011; 13:458-464.
- 145 YEN EF, PARDI DS: **Review article: Microscopic colitis--lymphocytic, collagenous and 'mast cell' colitis**. Aliment Pharmacol Ther 2011; 34:21-32.
- 146 ESTES JD: **Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues**. Immunol Rev 2013; 254:65-77.
- 147 ESTES J, BAKER JV, BRENCHLEY JM, KHORUTS A, BARTHOLD JL, BANTLE A, REILLY CS, BEILMAN GJ, GEORGE ME, DOUEK DC, HAASE AT, SCHACKER TW: **Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut**. J Infect Dis 2008; 198:456-464.
- 148 ROSEN FS: **The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)** . J Clin Invest 1985; 75:1-3.
- 149 LETVIN NL, DANIEL MD, SEHGAL PK, DESROSIERS RC, HUNT RD, WALDRON LM, MACKEY JJ, SCHMIDT DK, CHALIFOUX LV, KING NW: **Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III**. Science 1985; 230:71-73.

- 150 MOORE RD, CHAISSON RE: **Natural history of opportunistic disease in an HIV-infected urban clinical cohort.** *Ann Intern Med* 1996; 124:633-642.
- 151 WACHTMAN LM, MANSFIELD KG: **Opportunistic infections in immunologically compromised nonhuman primates.** *ILAR J* 2008; 49:191-208.
- 152 TIRELLI U, ERRANTE D, CARBONE A, GLOGHINI A, VACCHER E: **Malignant lymphomas in patients with HIV infection.** *Leuk Lymphoma* 1996; 22:245-257.
- 153 MATZ-RENSING K, PINGEL S, HANNIG H, BODEMER W, HUNSMANN G, KUHN EM, TIEMANN M, KAUP FJ: **Morphologic and immunophenotypic characteristics of malignant lymphomas in SIV-infected rhesus macaques.** *J Med Primatol* 1999; 28:318-328.
- 154 CELLO JP, DAY LW: **Idiopathic AIDS enteropathy and treatment of gastrointestinal opportunistic pathogens.** *Gastroenterology* 2009; 136:1952-1965.
- 155 KUHN EM, MATZ-RENSING K, STAHL-HENNIG C, MAKOSCHEY B, HUNSMANN G, KAUP FJ: **Intestinal manifestations of experimental SIV-infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) : a histological and ultrastructural study.** *Zentralbl Veterinarmed B* 1997; 44:501-512.
- 156 HO-YEN C, CHANG F, VAN DER WALT J, LUCAS S: **Gastrointestinal malignancies in HIV-infected or immunosuppressed patients: pathologic features and review of the literature.** *Adv Anat Pathol* 2007; 14:431-443.
- 157 KAUP F, MATZ-RENSING K, KUHN E, HUNERBEIN P, STAHL-HENNIG C, HUNSMANN G: **Gastrointestinal pathology in rhesus monkeys with experimental SIV infection.** *Pathobiology* 1998; 66:159-164.
- 158 JAVED A, LEUCHTE N, NEUMANN B, SOPPER S, SAUERMAN U: **Noncytolytic CD8+ Cell Mediated Antiviral Response Represents a Strong Element in the Immune Response of Simian Immunodeficiency Virus-Infected Long-Term Non-Progressing Rhesus Macaques.** *PLoS One* 2015; 10:e0142086.
- 159 GUADALUPE M, REAY, E., SANKARAN, S., PRINDIVILLE, T., FLAMM, J., MCNEIL, A., DANDEKAR, S.: **Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy.** *J Virol* 2003; 77:11708-11717.
- 160 DYKHUIZEN M, CEMAN J, MITCHEN J, ZAYAS M, MACDOUGALL A, HELGELAND J, RAKASZ E, PAUZA CD: **Importance of the CD3 marker for evaluating changes in rhesus macaque CD4/CD8 T-cell ratios.** *Cytometry* 2000; 40:69-75.
- 161 VEAZEY RS, ROSENZWEIG M, SHVETZ DE, PAULEY DR, DEMARIA M, CHALIFOUX LV, JOHNSON RP, LACKNER AA: **Characterization of gut-associated lymphoid tissue (GALT) of normal rhesus macaques.** *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 82:230-242.
- 162 XU H, WANG X, VEAZEY RS: **Mucosal immunology of HIV infection.** *Immunol Rev* 2013; 254:10-33.

- 163 VEAZEY RS, MARX PA, LACKNER AA: **The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS.** Trends Immunol 2001; 22:626-633.
- 164 GRABAR S, SELINGER-LENEMAN H, ABGRALL S, PIALOUX G, WEISS L, COSTAGLIOLA D: **Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV.** AIDS 2009; 23:1163-1169.
- 165 OLSON AD, MEYER L, PRINS M, THIEBAUT R, GURDASANI D, GUIGUET M, CHAIX ML, AMORNKUL P, BABIKER A, SANDHU MS, PORTER K, EUROCOORD CCI: **An evaluation of HIV elite controller definitions within a large seroconverter cohort collaboration.** PLoS One 2014; 9:e86719.
- 166 LEE PK, KIEFFER TL, SILICIANO RF, NETTLES RE: **HIV-1 viral load blips are of limited clinical significance.** J Antimicrob Chemother 2006; 57:803-805.
- 167 AKBAR AN, HENSON SM: **Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity?** Nat Rev Immunol 2011; 11:289-295.
- 168 ASQUITH M, HABERTHUR K, BROWN M, ENGELMANN F, MURPHY A, AL-MAHDI Z, MESSAOUDI I: **Age-dependent changes in innate immune phenotype and function in rhesus macaques (*Macaca mulatta*)** . Pathobiol Aging Age Relat Dis 2012; 2.
- 169 ZHENG HY, ZHANG MX, PANG W, ZHENG YT: **Aged Chinese rhesus macaques suffer severe phenotypic T- and B-cell aging accompanied with sex differences.** Exp Gerontol 2014; 55:113-119.
- 170 HAYNES L, MAUE AC: **Effects of aging on T cell function.** Curr Opin Immunol 2009; 21:414-417.
- 171 LAGES CS, SUFFIA I, VELILLA PA, HUANG B, WARSHAW G, HILDEMAN DA, BELKAID Y, CHOUGNET C: **Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation.** J Immunol 2008; 181:1835-1848.
- 172 BHAIJEE F, SUBRAMONY C, TANG SJ, PEPPER DJ: **Human immunodeficiency virus-associated gastrointestinal disease: common endoscopic biopsy diagnoses.** Patholog Res Int 2011; 2011:247923.
- 173 GEYER M, FACKLER OT, PETERLIN BM: **Structure-function relationships in HIV-1 Nef.** EMBO Rep 2001; 2:580-585.
- 174 DIMOPOULOS Y, MOYSI E, PETROVAS C: **The Lymph Node in HIV Pathogenesis.** Curr HIV/AIDS Rep 2017.
- 175 FINZI D, PLAEGER SF, DIEFFENBACH CW: **Defective virus drives human immunodeficiency virus infection, persistence, and pathogenesis.** Clin Vaccine Immunol 2006; 13:715-721.
- 176 MOONIM MT, ALARCON L, FREEMAN J, MAHADEVA U, VAN DER WALT JD, LUCAS SB: **Identifying HIV infection in diagnostic histopathology tissue samples-the role of HIV-1 p24 immunohistochemistry in identifying clinically unsuspected HIV infection: a 3-year analysis.** Histopathology 2010; 56:530-541.

- 177 BELMONTE L, OLMOS M, FANIN A, PARODI C, BARE P, CONCETTI H, PEREZ H, DE BRACCO MM, CAHN P: **The intestinal mucosa as a reservoir of HIV-1 infection after successful HAART.** AIDS 2007; 21:2106-2108.
- 178 PETROVAS C, FERRANDO-MARTINEZ S, GERNER MY, CASAZZA JP, PEGU A, DELEAGE C, COOPER A, HATAYE J, ANDREWS S, AMBROZAK D, DEL RIO ESTRADA PM, BORITZ E, PARIS R, MOYSI E, BOSWELL KL, RUIZ-MATEOS E, VAGIOS I, LEAL M, ABLANEDO-TERRAZAS Y, RIVERO A, GONZALEZ-HERNANDEZ LA, MCDERMOTT AB, MOIR S, REYES-TERAN G, DOCOBO F, PANTALEO G, DOUEK DC, BETTS MR, ESTES JD, GERMAIN RN, MASCOLA JR, KOUP RA: **Follicular CD8 T cells accumulate in HIV infection and can kill infected cells in vitro via bispecific antibodies.** Sci Transl Med 2017; 9:eaag2285.
- 179 KOTLER DP, GAETZ HP, LANGE M, KLEIN EB, HOLT PR: **Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome.** Ann Intern Med 1984; 101:421-428.
- 180 HEISE C, VOGEL P, MILLER CJ, HALSTED CH, DANDEKAR S: **Simian immunodeficiency virus infection of the gastrointestinal tract of rhesus macaques. Functional, pathological, and morphological changes.** Am J Pathol 1993; 142:1759-1771.
- 181 VEAZEY RS, DEMARIA M, CHALIFOUX LV, SHVETZ DE, PAULEY DR, KNIGHT HL, ROSENZWEIG M, JOHNSON RP, DESROSIERS RC, LACKNER AA: **Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection.** Science 1998; 280:427-431.
- 182 ZENG M, SMITH AJ, WIETGREFE SW, SOUTHERN PJ, SCHACKER TW, REILLY CS, ESTES JD, BURTON GF, SILVESTRI G, LIFSON JD, CARLIS JV, HAASE AT: **Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections.** J Clin Invest 2011; 121:998-1008.
- 183 ESTES JD: **Role of collagen deposition in lymphatic tissues and immune reconstruction during HIV-1 and SIV infections.** Curr HIV/AIDS Rep 2009; 6:29-35.
- 184 SCHUSTER FL, RAMIREZ-AVILA L: **Current world status of Balantidium coli.** Clin Microbiol Rev 2008; 21:626-638.
- 185 SESTAK K, MERRITT CK, BORDA J, SAYLOR E, SCHWAMBERGER SR, COGSWELL F, DIDIER ES, DIDIER PJ, PLAUCHE G, BOHM RP, AYE PP, ALEXA P, WARD RL, LACKNER AA: **Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques.** Infect Immun 2003; 71:4079-4086.
- 186 ZUCCA E, CAVALLI F: **Extranodal lymphomas.** Ann Oncol 2000; 11 Suppl 3:219-222.
- 187 BRUNNBERG U, HENTRICH M, HOFFMANN C, WOLF T, HUBEL K: **HIV-Associated Malignant Lymphoma.** Oncol Res Treat 2017; 40:82-87.
- 188 CARVILLE A, MANSFIELD KG: **Comparative pathobiology of macaque lymphocryptoviruses.** Comp Med 2008; 58:57-67.

- 189 PANDREA I, CORNELL E, WILSON C, RIBEIRO RM, MA D, KRISTOFF J, XU C, HARET-
RICHTER GS, TRICHEL A, APETREI C, LANDAY A, TRACY R: **Coagulation biomarkers
predict disease progression in SIV-infected nonhuman primates**. *Blood* 2012; 120:1357-1366.
- 190 SIMON MA: **Polyomaviruses of nonhuman primates: implications for research**. *Comp Med*
2008; 58:51-56.
- 191 BRENCHLEY JM, DOUEK DC: **The mucosal barrier and immune activation in HIV
pathogenesis**. *Curr Opin HIV AIDS* 2008; 3:356-361.
- 192 STOCKMANN M, SCHMITZ H, FROMM M, SCHMIDT W, PAULI G, SCHOLZ P, RIECKEN
EO, SCHULZKE JD: **Mechanisms of epithelial barrier impairment in HIV infection**. *Ann N Y*
Acad Sci 2000; 915:293-303.
- 193 ABAD LW, SCHMITZ HR, PARKER R, ROUBENOFF R: **Cytokine responses differ by
compartment and wasting status in patients with HIV infection and healthy controls**. *Cytokine*
2002; 18:286-293.
- 194 GUNZEL D, YU AS: **Claudins and the modulation of tight junction permeability**. *Physiol Rev*
2013; 93:525-569.
- 195 BARMEYER C, SCHULZKE JD, FROMM M: **Claudin-related intestinal diseases**. *Semin Cell*
Dev Biol 2015; 42:30-38.
- 196 ESTES JD, HARRIS LD, KLATT NR, TABB B, PITTALUGA S, PAIARDINI M, BARCLAY GR,
SMEDLEY J, PUNG R, OLIVEIRA KM, HIRSCH VM, SILVESTRI G, DOUEK DC, MILLER CJ,
HAASE AT, LIFSON J, BRENCHLEY JM: **Damaged intestinal epithelial integrity linked to
microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections**. *PLoS Pathog*
2010; 6:e1001052.
- 197 CANARY LA, VINTON CL, MORCOCK DR, PIERCE JB, ESTES JD, BRENCHLEY JM,
KLATT NR: **Rate of AIDS progression is associated with gastrointestinal dysfunction in simian
immunodeficiency virus-infected pigtail macaques**. *J Immunol* 2013; 190:2959-2965.
- 198 KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO VK: **IL-17 and Th17 Cells**. *Annu Rev Immunol*
2009; 27:485-517.
- 199 MIOSSEC P, KORN T, KUCHROO VK: **Interleukin-17 and type 17 helper T cells**. *N Engl J*
Med 2009; 361:888-898.
- 200 RAFFATELLU M, SANTOS RL, VERHOEVEN DE, GEORGE MD, WILSON RP, WINTER SE,
GODINEZ I, SANKARAN S, PAIXAO TA, GORDON MA, KOLLS JK, DANDEKAR S,
BAUMLER AJ: **Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency
promotes Salmonella dissemination from the gut**. *Nat Med* 2008; 14:421-428.
- 201 BRENCHLEY JM, PAIARDINI M, KNOX KS, ASHER AI, CERVASI B, ASHER TE,
SCHEINBERG P, PRICE DA, HAGE CA, KHOLI LM, KHORUTS A, FRANK I, ELSE J,
SCHACKER T, SILVESTRI G, DOUEK DC: **Differential Th17 CD4 T-cell depletion in
pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections**. *Blood* 2008; 112:2826-2835.

- 202 DELEAGE C, SCHUETZ A, ALVORD WG, JOHNSTON L, HAO XP, MORCOCK DR, RERKNIMITR R, FLETCHER JL, PUTTAMASWIN S, PHANUPHAK N, DEWAR R, MCCUNE JM, SERETI I, ROBB M, KIM JH, SCHACKER TW, HUNT P, LIFSON JD, ANANWORANICH J, ESTES JD: **Impact of early cART in the gut during acute HIV infection.** JCI Insight 2016; 1:e87065.
- 203 O'BRIEN M, MANCHES O, BHARDWAJ N: **Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection.** Adv Exp Med Biol 2013; 762:71-107.
- 204 SCHAFFER JL, MULLER-TRUTWIN MC, REEVES RK: **NK cell exhaustion: bad news for chronic disease?** Oncotarget 2015; 6:21797-21798.
- 205 DEEKS SG, WALKER BD: **The immune response to AIDS virus infection: good, bad, or both?** J Clin Invest 2004; 113:808-810.
- 206 ESTES JD: **Enhancing immune responses to limit chronic immune activation during SIV.** J Clin Invest 2012; 122:1611-1614.
- 207 KESTENS L, VANHAM G, VEREECKEN C, VANDENBRUAENE M, VERCAUTEREN G, COLEBUNDERS RL, GIGASE PL: **Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection.** Clin Exp Immunol 1994; 95:436-441.
- 208 SOPPER S, SAUER U, MULLER JG, STAHL-HENNIG C, TER MEULEN V: **Early activation and proliferation of T cells in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys.** AIDS Res Hum Retroviruses 2000; 16:689-697.
- 209 APPAY V, SAUCE D: **Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences.** J Pathol 2008; 214:231-241.
- 210 SVARD J, PAQUIN-PROULX D, BUGGERT M, NOYAN K, BARQASHO B, SONNERBORG A, NOWAK P: **Role of translocated bacterial flagellin in monocyte activation among individuals with chronic HIV-1 infection.** Clin Immunol 2015; 161:180-189.
- 211 ERICSEN AJ, LAUCK M, MOHNS MS, DINAPOLI SR, MUTSCHLER JP, GREENE JM, WEINFURTER JT, LEHRER-BREY G, PRALL TM, GIEGER SM, BUECHLER CR, CROSNO KA, PETERSON EJ, REYNOLDS MR, WISEMAN RW, BURWITZ BJ, ESTES JD, SACHA JB, FRIEDRICH TC, BRENCHLEY JM, O'CONNOR DH: **Microbial Translocation and Inflammation Occur in Hyperacute Immunodeficiency Virus Infection and Compromise Host Control of Virus Replication.** PLoS Pathog 2016; 12:e1006048.
- 212 KLATT NR, CHOMONT N, DOUEK DC, DEEKS SG: **Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection.** Immunol Rev 2013; 254:326-342.
- 213 HUNT PW, BRENCHLEY J, SINCLAIR E, MCCUNE JM, ROLAND M, PAGE-SHAFFER K, HSUE P, EMU B, KRONE M, LAMPIRIS H, DOUEK D, MARTIN JN, DEEKS SG: **Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with**

- undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy.** J Infect Dis 2008; 197:126-133.
- 214 PANDREA I, XU C, STOCK JL, FRANK DN, MA D, POLICICCHIO BB, HE T, KRISTOFF J, CORNELL E, HARET-RICHTER GS, TRICHEL A, RIBEIRO RM, TRACY R, WILSON C, LANDAY AL, APETREI C: **Antibiotic and Antiinflammatory Therapy Transiently Reduces Inflammation and Hypercoagulation in Acutely SIV-Infected Pigtailed Macaques.** PLoS Pathog 2016; 12:e1005384.
- 215 BOSINGER SE, SODORA DL, SILVESTRI G: **Generalized immune activation and innate immune responses in simian immunodeficiency virus infection.** Curr Opin HIV AIDS 2011; 6:411-418.
- 216 VAN DEN DRIES L, CLAASSEN MAA, GROOTHUISMINK ZMA, VAN GORP E, BOONSTRA A: **Immune activation in prolonged cART-suppressed HIV patients is comparable to that of healthy controls.** Virology 2017; 509:133-139.
- 217 KRISTOFF J, HARET-RICHTER G, MA D, RIBEIRO RM, XU C, CORNELL E, STOCK JL, HE T, MOBLEY AD, ROSS S, TRICHEL A, WILSON C, TRACY R, LANDAY A, APETREI C, PANDREA I: **Early microbial translocation blockade reduces SIV-mediated inflammation and viral replication.** J Clin Invest 2014; 124:2802-2806.
- 218 MATTAPALLIL JJ, DOUEK DC, HILL B, NISHIMURA Y, MARTIN M, ROEDERER M: **Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection.** Nature 2005; 434:1093-1097.
- 219 SCHULTHEISS T, SCHULTE R, SAUERMAN U, IBING W, STAHL-HENNIG C: **Strong mucosal immune responses in SIV infected macaques contribute to viral control and preserved CD4+ T-cell levels in blood and mucosal tissues.** Retrovirology 2011; 8:24.
- 220 NISHIMURA Y, IGARASHI T, BUCKLER-WHITE A, BUCKLER C, IMAMICHI H, GOEKEN RM, LEE WR, LAFONT BA, BYRUM R, LANE HC, HIRSCH VM, MARTIN MA: **Loss of naive cells accompanies memory CD4+ T-cell depletion during long-term progression to AIDS in Simian immunodeficiency virus-infected macaques.** J Virol 2007; 81:893-902.
- 221 MANNIOUI A, BOURRY O, SELLIER P, DELACHE B, BROCHARD P, ANDRIEU T, VASLIN B, KARLSSON I, ROQUES P, LE GRAND R: **Dynamics of viral replication in blood and lymphoid tissues during SIVmac251 infection of macaques.** Retrovirology 2009; 6:106.
- 222 CARNATHAN DG, WETZEL KS, YU J, LEE ST, JOHNSON BA, PAIARDINI M, YAN J, MORROW MP, SARDESAI NY, WEINER DB, ERTL HC, SILVESTRI G: **Activated CD4+CCR5+ T cells in the rectum predict increased SIV acquisition in SIVGag/Tat-vaccinated rhesus macaques.** Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112:518-523.
- 223 PANDREA I, APETREI C, GORDON S, BARBERCHECK J, DUFOUR J, BOHM R, SUMPTER B, ROQUES P, MARX PA, HIRSCH VM, KAUR A, LACKNER AA, VEAZEY RS,

- SILVESTRI G: **Paucity of CD4+CCR5+ T cells is a typical feature of natural SIV hosts.** Blood 2007; 109:1069-1076.
- 224 PAIARDINI M, CERVASI B, REYES-AVILES E, MICCI L, ORTIZ AM, CHAHROUDI A, VINTON C, GORDON SN, BOSINGER SE, FRANCELLA N, HALLBERG PL, CRAMER E, SCHLUB T, CHAN ML, RIDDICK NE, COLLMAN RG, APETREI C, PANDREA I, ELSE J, MUNCH J, KIRCHHOFF F, DAVENPORT MP, BRENCHLEY JM, SILVESTRI G: **Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD4+ T cells are associated with limited CCR5 expression.** Nat Med 2011; 17:830-836.
- 225 DENG HK, UNUTMAZ D, KEWALRAMANI VN, LITTMAN DR: **Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses.** Nature 1997; 388:296-300.
- 226 CHOE H, FARZAN M, KONKEL M, MARTIN K, SUN Y, MARCON L, CAYABYAB M, BERMAN M, DORF ME, GERARD N, GERARD C, SODROSKI J: **The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1.** J Virol 1998; 72:6113-6118.
- 227 ARTHOS J, CICALA C, MARTINELLI E, MACLEOD K, VAN RYK D, WEI D, XIAO Z, VEENSTRA TD, CONRAD TP, LEMPICKI RA, MCLAUGHLIN S, PASCUCCHIO M, GOPAUL R, MCNALLY J, CRUZ CC, CENSOPLANO N, CHUNG E, REITANO KN, KOTTILIL S, GOODE DJ, FAUCI AS: **HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells.** Nat Immunol 2008; 9:301-309.
- 228 RIDDICK NE, HERMANN EA, LOFTIN LM, ELLIOTT ST, WEY WC, CERVASI B, TAAFFE J, ENGRAM JC, LI B, ELSE JG, LI Y, HAHN BH, DERDEYN CA, SODORA DL, APETREI C, PAIARDINI M, SILVESTRI G, COLLMAN RG: **A novel CCR5 mutation common in sooty mangabeys reveals SIVsmm infection of CCR5-null natural hosts and efficient alternative coreceptor use in vivo.** PLoS Pathog 2010; 6:e1001064.
- 229 POHLMANN S, STOLTE N, MUNCH J, TEN HAAFT P, HEENEY JL, STAHL-HENNIG C, KIRCHHOFF F: **Co-receptor usage of BOB/GPR15 in addition to CCR5 has no significant effect on replication of simian immunodeficiency virus in vivo.** J Infect Dis 1999; 180:1494-1502.
- 230 BERLIN C, BERG EL, BRISKIN MJ, ANDREW DP, KILSHAW PJ, HOLZMANN B, WEISSMAN IL, HAMANN A, BUTCHER EC: **Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1.** Cell 1993; 74:185-195.
- 231 WOODHAM AW, SKEATE JG, SANNA AM, TAYLOR JR, DA SILVA DM, CANNON PM, KAST WM: **Human Immunodeficiency Virus Immune Cell Receptors, Coreceptors, and Cofactors: Implications for Prevention and Treatment.** AIDS Patient Care STDS 2016; 30:291-306.

- 232 BYRAREDDY SN, SIDELL N, ARTHOS J, CICALA C, ZHAO C, LITTLE DM, DUNBAR P, YANG GX, PIERZCHALSKI K, KANE MA, MAYNE AE, SONG B, SOARES MA, VILLINGER F, FAUCI AS, ANSARI AA: **Species-specific differences in the expression and regulation of alpha4beta7 integrin in various nonhuman primates.** J Immunol 2015; 194:5968-5979.
- 233 VAJDY M, VEAZEY RS, KNIGHT HK, LACKNER AA, NEUTRA MR: **Differential effects of simian immunodeficiency virus infection on immune inductive and effector sites in the rectal mucosa of rhesus macaques.** Am J Pathol 2000; 157:485-495.
- 234 BYRAREDDY SN, ARTHOS J, CICALA C, VILLINGER F, ORTIZ KT, LITTLE D, SIDELL N, KANE MA, YU J, JONES JW, SANTANGELO PJ, ZURLA C, MCKINNON LR, ARNOLD KB, WOODY CE, WALTER L, ROOS C, NOLL A, VAN RYK D, JELICIC K, CIMBRO R, GUMBER S, REID MD, ADSAY V, AMANCHA PK, MAYNE AE, PARSLOW TG, FAUCI AS, ANSARI AA: **Sustained virologic control in SIV+ macaques after antiretroviral and alpha4beta7 antibody therapy.** Science 2016; 354:197-202.
- 235 AVALOS CR, PRICE SL, FORSYTH ER, PIN JN, SHIRK EN, BULLOCK BT, QUEEN SE, LI M, GELLERUP D, O'CONNOR SL, ZINK MC, MANKOWSKI JL, GAMA L, CLEMENTS JE: **Quantitation of Productively Infected Monocytes and Macrophages of Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques.** J Virol 2016; 90:5643-5656.
- 236 BRENCHLEY JM, KNOX KS, ASHER AI, PRICE DA, KOHLI LM, GOSTICK E, HILL BJ, HAGE CA, BRAHMI Z, KHORUTS A, TWIGG HL, 3RD, SCHACKER TW, DOUEK DC: **High frequencies of polyfunctional HIV-specific T cells are associated with preservation of mucosal CD4 T cells in bronchoalveolar lavage.** Mucosal Immunol 2008; 1:49-58.

IX. Anhang

Protokolle für Histologie und Immunhistochemie

Paraffin-Einbettungsprotokoll

Wasser (entmineralisiert) für 2 h bei Zimmertemperatur
 aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 96 %, 100 %, 100 %)
 für jeweils 45 min. bzw. 1 h bei 35 °C und Vakuum
 3 x Isopropanol für 1 h bei 35 °C bzw. 45 °C und Vakuum
 3 x Paraplast für jeweils 1 h bei 62 °C und Vakuum

4 %iges neutral gepuffertes Formalin

35 %ige Formaldehydlösung	114 ml
Aqua bidest.	386 ml
Stammlösung A (Phosphatpuffer)	100 ml
Stammlösung B (Phosphatpuffer)	400 ml

Phosphatpuffer

Stammlösung A (0,2 M):

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, (Fa. Merck, Darmstadt)	27,6 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Stammlösung B (0,2 M):

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, (Fa. Merck, Darmstadt)	35,6 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Gebrauchslösung (0,1 M; ph 7,4):

Stammlösung A	10 ml
Stammlösung B	40 ml
Aqua bidest.	50 ml

Hämatoxylin-Eosin Färbung

Xylol	5 min
Xylol	2 min
Xylol	2 min
100 % Ethanol	2 min
96 % Ethanol	2 min
80 % Ethanol	1 min
70 % Ethanol	1 min
Aqua dest.	1 min
Kernfärbung mit Hämalan nach Mayer (Fa. Merck, Darmstadt) für 3 min	
Zum Bläuen 10 min fließend Wasser	
Gegenfärbung mit wässrigem Eosin (Fa. Thermo Fisher Scientific, Dreieich) für 5 min	
Fließend wässern für 5 sec	
70 % Ethanol	1 min
80 % Ethanol	1 min
96 % Ethanol	1 min
100 % Ethanol	1 min
100 % Ethanol	2 min
Xylol	1 min
Xylol	3 min
Xylol	3 min

Eindecken der Schnitte mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg)

Eosin

Eosin	0,3 g
Aqua dest.	300 ml
Eisessig	30 µl

Trichromfärbung nach Masson-Goldner

100 % Ethanol	2 min
96 % Ethanol	2 min
80 % Ethanol	1 min
70 % Ethanol	1 min
Aqua dest.	1 min
Hämatoxylin nach Weigert	2 min
Fließend wässern	10 min
Azophloxin	5 min
Essigsäure 1 %	30 sec
Phosphormolybdänsäure-Orange	2 min
Essigsäure 1 %	30 sec
Lichtgrün	5 min
Essigsäure 1 %	30 sec
96 % Ethanol	2 min
100 % Ethanol	2 min
100 % Ethanol	2 min
Xylol	2 min
Xylol	2 min
Xylol	2 min

Eindecken der Schnitte mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg)

Weigerts Hämatoxylin**Stammlösung A**

96 % Ethanol	100 ml
Hämatoxylin	1 g

Stammlösung B

Eisen(III)chlorid (FeCl ₃ ·6H ₂ O)	2,48 g
Konz. HCL	1 ml
Aqua dest.	100ml

Gebrauchslösung

Stammlösung A:Stammlösung B	1:1
-----------------------------	-----

Azophloxin

Azophloxin	0,5 g
Eisessig	0,2 ml
Aqua dest.	100 ml

1 %ige Essigsäure

Eisessig	1 ml
Aqua dest.	100 ml

Phosphormolybdänsäure-Orange

Phosphormolybdänsäure	4 g
Orange G	2 g
Aqua des.	100 ml

Lichtgrün

Lichtgrün	0,2 g
Eisessig	0,2 ml
Aqua dest.	100 ml

Protokoll für die immunhistochemische Reaktion

- Barcode-Etiketten drucken, auf die Objektträger kleben und Schnitte in den Discovery XT einspannen
- Pufferlösungen (Reaction Buffer, EZ Prep, LCS, RiboWash und CC) auffüllen und Abfallbehälter kontrollieren
- Reagenzienkarussell bestücken
- Lauf starten, die immunhistochemische Reaktion wird mit einem Streptavidin-Biotin-System (DISCOVERY DAB Map Detection Kit (RUO) Fa. Roche, Mannheim) vollautomatisch im Discovery XT (Fa. Roche) durchgeführt
- Aufheizen auf 75 °C und Entparaffinierung durch EZ Prep (Fa. Roche, Mannheim)
- Epitop-Demaskierung mit Aufheizen bis 100°C und Cell Conditioner 1 (CC1, Fa. Roche, Mannheim, Tris-Puffer, pH 7,6) oder Cell Conditioner 2 (CC2, Fa. Roche, Mannheim, Citratpuffer, pH 6)
- 4 min Inhibitor D (3 % H₂O₂) zur Hemmung der endogenen Peroxidase Aktivität
- 8 min Option 1 (Ziegen Serum, 1:5 mit PBS verdünnt) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
- 32 min Primärantikörperinkubation bei Raumtemperatur
- 4-8 min Fixative 1 (20 µl Glutardialdehyd in 10 ml 0,9 % NaCl)
- 24 min biotinylierter Sekundärantikörper (DISCOVERY Universal Secondary Antibody (RUO), Fa. Roche, Mannheim)
- 4 min Blocker D zur Blockierung von endogenem Biotin
- 16 min SA-HRP (konjugierte Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Lösung)
- 8 min DAB (Diaminobenzidin, Chromogen) und H₂O₂ (0,04 - 0,08 %)
- 4 min Copper D (Kupfersulfat Lösung)
- 4 min Gegenfärbung mit Hämalaun
- 4 min Bluing Reagent zum Bläuen
- Allen Inkubationsschritten folgten definierte Waschschrte mit Reaktionspuffer (Fa. Roche, Mannheim), anschließend wurden die Schnitte mit LCS (Liquid Coverslip, Fa. Roche, Mannheim) bedeckt um das Austrocknen zu verhindern
- Nach Ende des Laufes wurden die Schnitte in eine Küvette mit destilliertem Wasser und Spülmittel überführt, um das im verwendete Öl (LCS) zu entfernen
- Aufsteigende Alkoholreihe und Eindecken der Objektträger mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg)

Bei dem Antikörper CD4 wurde nach dem Fixierungsschritt ein Amplifikationskit benutzt (Amplification Kit, Fa. Roche, Mannheim), um die Intensität des Signals zu verstärken, Ampifier A und B für jeweils 8 min

Tabelle 13: Auflistung der Primärantikörper, der Verdünnung und der Vorbehandlung für die immunhistochemischen Untersuchungen

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Vorbehandlung	Herkunft
KK75	SIV-Nef-Protein mouse monoclonal	1:100	CC1, 44 min	NIBSC
AG3.0	HIV-1 p24 mouse monoclonal	1:100	CC1, 44 min	NIBSC
Mx1	M143 mouse monoclonal	1:100	CC, 44 min	Uni Freiburg
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E)	rabbit monoclonal	1:200	CC1, 28 min	Cell signaling
Monoclonal antibody to Lipopolysaccharide core	clone WN1 222-5 mouse monoclonal	1:50	CC1, 60 min	Hycult biotech
IL-17 ab79056	rabbit polyclonal	1:400	CC2, 44 min	abcam
FoxP3 ab20034	clone 236A/E7 mouse monoclonal	1:100	CC1, 44 min	abcam
Anti-GPCR GPR15 antibody - C-terminal ab150607	SIV co-receptor rabbit polyclonal	1:100	CC1, 44 min	abcam
Claudin-3 RB-9251-R7	transmembrane protein rabbit polyclonal	ready -to-use	CC1, 60 min	Thermo scientific
Ki67	clone MIB-1 mouse monoclonal	1:50	CC1, 60 min	Dako
CD4	clone 1F6 mouse monoclonal	1:20	CC1, 44 min	Leica biosystems
Anti-Caspase-1 antibody (ab1872)	polyclonal	diverse getestet	CC1, CC2, Protease	abcam Cell signaling
SV-40	mouse monoclonal	1:50	CC1, 60 min	Santa Cruz
CD20	mouse monoclonal	1:300	CC1, 60 min	Dako

Tierfassung

**Tabelle 14: Tiererfassung
SIV-infizierte Tiere**

Tiernummer	Geschlecht	Alter in Jahren	Virus	Infektionsroute	Immunisierung/ Controller-Status	bis wpi	Sektion	FACS	VLC	IHC/HE/MG
LTNPs										
2139	m	14	SIVmac239	tonsillär	Ja/EC	598		+	+	+
2151	m	14	SIVmac239	tonsillär	Ja/EC	598		+	+	+
2172	m	14	SIVmac239	tonsillär	Ja/EC	601		+	+	+
2219	m	14.5	SIVmac251	i.v.	Ja/VC-FC	529	15.12.16	+	+	+
12671	m	15	SIVmac239	tonsillär	Ja/EC	601		+	+	+
2153	m	15.5	SIVmac239	tonsillär	Ja/VC-FC	587	13.12.16	+	+	+
2155	m	14	SIVmac239	tonsillär	Ja/EC	597		+	+	+
2201	m	13	SIVmac252	i.v.	Ja/FC	459	20.08.15	+	+	+
12672	m	15	SIVmac239	tonsillär	Nein/FC	514	21.07.15	+	+	+
2284	m	11	SIVmac251	rektal	Nein/EC	344		+	+	+
13906	m	10.5	SIVmac251	rektal	Nein/FC	213	23.09.14	-	-	+
13907	m	11	SIVmac251	rektal	Nein/VC	339		+	+	+
13909	m	12.5	SIVmac251	rektal	Ja/VC-FC	338	23.12.16	+	+	+
13913	m	11	SIVmac251	rektal	Nein/EC	348		+	+	+
13919	m	11	SIVmac251	rektal	Ja/VC-FC	345		+	+	+
13923	w	12	SIVmac251	rektal	Ja/EC	308		+	+	+
13926	w	11	SIVmac251	rektal	Nein/VC	341		+	+	+
13929	w	11	SIVmac251	rektal	Ja/VC	308		+	+	+
13930	w	11	SIVmac251	rektal	Ja/VC	312		+	+	+
8644	m	22	SIVmac251	tonsillär	Nein/VC-FC	907	05.01.17	+	+	+
9794	m	14	SIVmac239	tonsillär	Ja/FC	486	11.06.13	-	-	-
Progressoren										
2428	w	8	SIVmac251	rektal	nein	49	07.05.15	+	+	+
14893	m	6	SIVmac239	i.v.	nein	51	17.03.15	+	-	+
14960	m	7	SIVmac239	rektal	nein	53	12.05.15	+	+	+
2342	m	9.5	SIVmac239	rektal	nein	33	08.12.14	+	-	+
15226	m	4.5	SIVmac239	i.v.	nein	35	24.11.14	+	-	+
2374	w	9	SIVmac251	rektal	nein	53	24.11.14	+	+	+
2410	m	8	SIVmac239	rektal	nein	52	03.06.15	+	+	+
14892	w	6	SIVmac239	i.v.	nein	70	30.07.15	+	+	+

w: weiblich, m: männlich, i.v.: intravenös, EC = Elite Controller, VC = virämische Controller, FC = failing Controller, wpi: Wochen nach Infektion, FACS: Durchflusszytometrische Analyse, VLC: Viruslast im Colon, IHC: Immunhistochemie, HE: Hämatoxylin-Eosin Färbung, MG: Masson-Goldner-Färbung.

SIV-negative Tiere

Tiernummer	Geschlecht	Alter in Jahren	Virus	Infektionsroute	Immunisierung/ Controller-Status	bis wpi	Sektion	FACS	VLC	IHC/HE/MG
2512	m	7	-	-	-	-	-	+	-	-
2522	m	7	-	-	-	-	-	+	-	-
2528	m	7	-	-	-	-	-	+	-	-
2548	m	6	-	-	-	-	-	+	-	-
2573	m	6	-	-	-	-	-	+	-	-
2574	m	6	-	-	-	-	-	+	-	-
2601	m	6	-	-	-	-	-	+	-	-
2606	m	6	-	-	-	-	-	+	-	-
2612	m	6	-	-	-	-	-	+	-	-
2627	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2665	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2702	m	4	-	-	-	-	-	+	-	-
2726	m	4	-	-	-	-	-	+	-	-
15854	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
15913	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
15985	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2581	m	6	-	-	-	-	-	+	-	-
2663	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2232	m	12	-	-	-	-	-	+	-	+
2363	m	9	-	-	-	-	-	+	-	+
2564	m	5	-	-	-	-	-	+	-	+
2136	w	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2432	m	8	-	-	-	-	-	+	-	-
2443	m	7	-	-	-	-	-	+	-	-
2472	m	7	-	-	-	-	-	+	-	-
2511	m	6	-	-	-	-	-	+	-	-
2577	m	5	-	-	-	-	-	+	-	+
14954	m	6	-	-	-	-	-	+	-	-
16132	m	16	-	-	-	-	-	+	-	-
2621	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2562	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2586	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2609	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2594	m	5	-	-	-	-	-	+	-	-
2715	w	3	-	-	-	-	-	+	-	-
2413	m	8	-	-	-	-	-	+	-	-
2146	w	14	-	-	-	-	-	+	-	-

Tiernummer	Geschlecht	Alter in Jahren	Virus	Infektionsroute	Immunisierung/ Controller-Status	wpi	Sektion	FACS	VLC	IHC/HE/MG
2774	m	3.5	-	-	-	-	-	+	-	+
2783	m	3.5	-	-	-	-	-	+	-	+
9406	w	20	-	-	-	-	-	+	-	-
2709	m	4	-	-	-	-	-	+	-	-
2712	m	4	-	-	-	-	-	+	-	-
2733	m	4	-	-	-	-	-	+	-	-
2752	m	4	-	-	-	-	-	+	-	-
16906	m	4	-	-	-	-	-	+	-	-
2730	m	4	-	-	-	-	-	+	-	-
2428	w	7	-	-	-	-	-	-	-	+
2374	w	8	-	-	-	-	-	-	-	+
2744	m	4	-	-	-	-	-	+	-	-
2443	m	8	-	-	-	-	-	+	-	-
2472	m	8	-	-	-	-	-	+	-	-
2511	m	7	-	-	-	-	-	+	-	-
15200	m	5	-	-	-	-	09.03.15	-	-	+
2571	m	5	-	-	-	-	09.03.15	-	-	+
15257	m	5	-	-	-	-	10.03.15	-	-	+
15265	m	5	-	-	-	-	10.03.15	-	-	+
2636	m	4	-	-	-	-	11.03.15	-	-	+
2681	m	4	-	-	-	-	11.03.15	-	-	+
2635	m	4	-	-	-	-	23.03.15	-	-	+
2549	m	5	-	-	-	-	25.03.15	-	-	+

w: weiblich, m: männlich, wpi: Wochen nach Infektion, FACS: Durchflusszytometrische Analyse, VLC: Viruslast im Colon, IHC: Immunhistochemie, HE: Hämatoxylin-Eosin Färbung, MG: Masson-Goldner-Färbung.

X. Abkürzungsverzeichnis

°C	Celsius
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
Abt.	Abteilung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> , erworbenes Immunschwächesyndrom
APC	Allophycocyanin
APCs	<i>antigen presenting cells</i> , Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ART	antiretrovirale Therapie
ARV	AIDS-assoziiertes Retrovirus
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BC	Beckmann Coulter
BD	Becton Dickinson
BL	BioLegend
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cART	<i>combined antiretroviral therapy</i> , kombinierte antiretrovirale Therapie
casp.	<i>caspase</i> , Caspase
CCR5	<i>C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungsgruppen
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i> , Zytomegalievirus
CXCR4	<i>CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4</i>
DAB	<i>Diaminobenzidin</i>
DC	<i>dendritic cells</i> , dendritische Zellen
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	<i>elite controllers</i> , Elite Controller
ECD	<i>Energy Coupled Dye</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
et al.	<i>et alii</i>
EU	Europäische Union
FA	Formaldehyd
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FC	<i>failing controller</i> , failing Controller
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>Forkhead-box-protein P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulichtdetektor
G	Gauge
g	Gramm
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i> , darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
gd	gamma delta
ggr.	geringgradig
GMI	Göttinger Mischung II

h	<i>hour</i> , Stunde
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i> , hochwirksame antiretrovirale Therapie
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
hgr.	hochgradig
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNKT	<i>invariant natural killer T cells</i> , invariante natürliche Killer-T-Zellen
kDA	kiloDalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
LAV	Lymphadenopathie-assoziiertes Virus
LP	Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharide
LTNP	<i>long-term non-progressor</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i> , Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
mg	Milligramm
mgr.	mittelgradig
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mol	<i>mole</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Mx1	<i>myxovirus resistance protein 1</i>
n	Probengröße
ng	Nanogramm
NHP	nicht-humane Primaten
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NK	<i>natural killer</i> , natürliche Killer
nm	Nanometer
p	Signifikanzniveau
P	Protein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PD-1	<i>programmed cell death protein-1</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanin5.5
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
wpi	<i>weeks post infection</i> , Wochen nach Infektion
PO	<i>Pacific Orange</i>
Pol, pol	Polymerase
Prog.	Progressor
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> , Rotationen pro Minute
r_s	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient

RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
SABC	<i>Strept-Avidin-Biotin-Complex</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler um den Mittelwert
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i> , Affenimmundefizienzvirus
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulichtdetektor
STLV	<i>simian T-lymphotropic virus</i>
SV40	<i>simian virus 40</i> , Affenvirus 40
T	Thymus
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tregs	regulatorische T-Zellen
u. a.	unter anderem
UNAIDS	<i>United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
VC	<i>viremic controller</i> , virämischer Controller
VL	Viruslast
wpi	<i>weeks post infection</i> , Wochen nach Infektion
z. B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Analysen zu intestinalen Immunparametern und zur Darmbarriere bei Langzeit-SIV-infizierten Rhesusaffen“ selbstständig verfasst habe. Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

- Redaktionelle Überarbeitung durch Leiter und wissenschaftliche Mitarbeiter der Abteilungen Infektionsmodelle und Infektionspathologie des Deutschen Primatenzentrums (DPZ) Göttingen.
- Technisch-methodische Einweisung durch technische Assistentinnen der Abteilungen Infektionsmodelle und Infektionspathologie des DPZ.
- Beratung bei der Zusammenstellung des Antikörpergemisches und der Definition der Zellpopulationen im Durchflusszytometer durch Dr. Berit Neumann, Abteilung Infektionsmodelle, DPZ.
- Bereitstellung der Rohdaten der SIV-RNA-Beladung im Plasma der untersuchten Tiere durch Dr. Ulrike Sauermann, Abteilung Infektionsmodelle, DPZ.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Abteilungen Infektionsmodelle und Infektionspathologie unter der Leitung von Prof. Dr. F.-J. Kaup und Frau Dr. Christiane Stahl-Hennig angefertigt und bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Maria Daskalaki

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Franz-Josef Kaup für die Übernahme der Betreuung dieser Doktorarbeit und die uneingeschränkte Unterstützung bedanken.

Frau Dr. Christiane Stahl-Hennig danke ich herzlich für die Vergabe des sehr interessanten Themas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Abteilung Infektionsmodelle des Deutschen Primatenzentrums. Sie gab mir die Gelegenheit meine eigenen Ideen in die Dissertation einzubringen und ermöglichte die Teilnahme an vielen Kongressen.

Bei Frau Dr. Kerstin Mätz-Rensing möchte ich mich für die Unterstützung, die Durchsicht der Arbeit und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft herzlich bedanken.

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

Frau Dr. Ulrike Sauermann, Nicole Leuchte und Heidi Meyer danke ich für die Bereitstellung der Daten zur Plasmaviruslast.

Ein herzliches Dankeschön an die Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeiter der Abteilung für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima, allen voran Dr. Antonina Klippert, Dr. Li Lin Gan, Dr. Matthias Mietsch, Dr. Bianka Mussil, Dr. Nicole Stolte-Leeb und Ahmad Kotb. Antonina Klippert danke ich auch für die Einarbeitung in die tierexperimentelle Arbeit und ihre enorme Hilfe bei der Probenentnahme im Tierhaus.

Herzlichen Dank an Shereen Petersen für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die Korrektur der englischen Zusammenfassung.

Großer Dank gilt den technischen Mitarbeiterinnen der Abteilung Infektionsmodelle Sandra Heine, Judith Hampe, Kerstin Eckelmann, Sebastian Schimkowiak und Kristina Paque für die Einarbeitung und Hilfe im Labor. Ein herzliches Dankeschön an die technischen Mitarbeiterinnen der Abteilung Infektionspathologie Nadine Schminke, Larissa Hummel, Corinna Boike und Verena Arndt für die Unterstützung bei den histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen.

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

Den Mitarbeitern der Abteilung Infektionspathologie Dr. Kerstin Mätz-Rensing, Dr. Martina Bleyer, Dr. Karen Lampe, Wolfgang Henkel und Daniel Aschoff danke ich für ihre unschätzbare Hilfe bei den Sektionen.

Ein großes Dankeschön an Dr. Stefanie Heiduck für die unmittelbare Bereitstellung von Literatur.

Herzlichen Dank an Karin Peinemann für die redaktionelle Bearbeitung des Textes.

Vielen Dank an Daniel Reckel für die Unterstützung bei technischen Fragen.

Herzlichen Dank an meine Eltern, meine Geschwister, meine Tante und meine Oma für die bedingungslose Unterstützung! Ohne euch hätte ich es nie geschafft!!!

