

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin  
I. Medizinische Klinik und Poliklinik  
&  
Ambulanzzentrum des UKE GmbH  
Sektion Infektiologie

Direktor Prof. Dr. med. Ansgar Lohse  
Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. med. Jan van Lunzen

**Analyse der Frequenz und des Phänotyps regulatorischer T-Zellen in der HIV-1  
Infektion: Die CD39 Expression der FoxP3<sup>+</sup>T-Zellen korreliert mit  
dem progressiven Krankheitsverlauf**

Dissertation

zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades dem  
Fachbereich der Universität vorgelegt von

vorgelegt von:  
Adriana Thomssen  
aus München

Hamburg 2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.09.2013

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. J. van Lunzen

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Stellbrink

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. R. Ganschow

---

<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>I</b>
I.1.  DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZ VIRUS	1
I.1.1.  Aufbau und Replikation des HI-Virus	1
I.1.2.  Pathogenese und Krankheitsverlauf	2
I.1.3.  Therapeutische Möglichkeiten	4
I.2.  IMMUNOPATHOGENESE DER HIV-INFEKTION	5
I.2.1.  HIV-induzierte adaptive Immunantwort	5
I.2.2.  Chronische Immunaktivierung und progredienter Verlust der CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen	7
I.2.3.  Regulation der adaptiven Immunantwort	8
I.2.3.1.  Identifikation der T <sub>regs</sub>	9
I.2.3.2.  Funktionelle Mechanismen der T <sub>regs</sub>	10
I.3.  ZIELSETZUNG	12
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
II.1.  MATERIAL	14
II.1.1.  Reagenzien und Verbrauchsmaterial	14
II.1.1.1.  Verbrauchsmaterialien	14
II.1.1.2.  Reagenzien	14
II.1.1.3.  Puffer, Medien und Lösungen	15
II.1.1.4.  monoklonale Antikörper	15
II.1.1.5.  Native und rekombinante Proteine	16
II.1.2.  Geräte und Software	16
II.2.  METHODEN	17
II.2.1.  Kohorte	17
II.2.2.  Probenkonservierung und - aufbereitung	18
II.2.2.1.  Isolierung von PBMC	18
II.2.2.2.  Isolierung von LNMC	18
II.2.2.3.  Zählen von PBMC	18
II.2.2.4.  Einfrieren von PBMC	18
II.2.2.5.  Probenaufbereitung tiefgefrorener PBMC	19
II.2.3.  Immunophänotypische Analysen	19
II.2.3.1.  Oberflächenfärbung	19
II.2.3.2.  Intrazelluläre FoxP3-Färbung	20
II.2.4.  Funktionelle Assays	20
II.2.4.1  Depletion der T <sub>reg</sub> - Population	20
II.2.4.2  CFSE - Proliferationsassay	21

---

II.2.5	Auswertung	22
II.2.5.1.	Multicolor Durchflusszytometrie	22
II.2.5.2.	Statistische Analysen	22
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>23</b>
III.1.	CHARAKTERISTIKA DER STUDIENKOHORTE	23
III.2.	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ERFASSUNG DER T <sub>REGS</sub>	23
III.3.	RELATIVER ANSTIEG UND ABSOLUTER RÜCKGANG DER T <sub>REG</sub> FREQUENZ MIT DER KRANKHEITSPROGRESSION.	24
IV.4.	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER T <sub>REGS</sub> : DIE EXPRESSION VON CD39 AUF T <sub>REGS</sub> KORRELIERT MIT DEM KRANKHEITSPROGRESS DER HIV-INFEKTION.	26
IV.5.	ERHÖHTE RELATIVE FREQUENZEN AN T <sub>REGS</sub> IN LYMPHATISCHEM GEWEBE VERGLICHEN MIT PERIPHEREM BLUT VON HIV <sup>+</sup> PATIENTEN.	28
IV.6.	LONGITUDINALE UNTERSUCHUNGEN DER T <sub>REGS</sub> IN DER HIV-INFEKTION UND DES EINFLUSSES DER ANTIRETROVIRALEN THERAPIE.	29
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>39</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>47</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>48</b>
<b>VII.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>53</b>
<b>VIII.</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>55</b>
<b>IX.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>57</b>

Abb.	Abbildung	ICAM-3	Intercellular adhesion molecule 3
AICD	Activation induced cell death	ICOS	Inducible costimulator
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
AMP	Adenosinmonophosphat	IL	Interleukin
ANOVA	Analysis of Variance	IoT	Interruption of Treatment
APC	Allophycocyanin	iT <sub>regs</sub>	Inducible T <sub>regs</sub>
ATP	Adenosintriphosphat	LNMC	Lymph node mononuclear cells
bp	Basenpaare	LTNP	Long-Term Nonprogressor
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor	LTR	Long terminal repeat
CD	Cluster of Differentiation	MACS	Multicenter AIDS cohort study
CDC	Clinical Disease Classification	MFI	Mean fluorescence intensity
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester	MHC	Major Histocompatibility Complex
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester	NF-AT	Nuclear factor of activated T cells
CLA	Common Leukocyte Antigen	NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
CMV	Cytomegalievirus	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
CPT	Cell Preparation Tube	NTPDase	Nucleosid triphosphat diphosphohydrolase
CRP	C-reaktives Protein	nT <sub>regs</sub>	Natural T <sub>regs</sub>
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte	PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4	PBS	Phosphate buffered saline
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4	PD-1	Programmed death 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PE	Phycocerythrin
DC	Dendritic cell	PercP	Peridiniumchlorophyll
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin	PFA	Paraformaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid	RANTES	"Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted"
EC	Elite controller	RNA	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacid	RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt im Roswell Park Memorial Institute)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	r <sub>s</sub>	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
FACS	Fluorescence activated cell sorter	RT	Reverse Transkriptase
FCS	Fetales Kälber Serum	SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	SIV	Simianes Immundefizienz Virus
FoxP3	Forkhead box Protein 3	Sp1	Specificity Protein 1
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor family related gene	STI	Sexually transmitted infection
HAART	Highly active antiretroviral therapy	Tab.	Tabelle
HIV	Humanes Immundefizienz Virus	TCR	T cell receptor
HLA	Humanes Leukozytenantigen	TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
HSV	Herpes simplex Virus	Th1	T-Helferzelle 1
		TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
		Tr1	T regulatory 1
		T <sub>regs</sub>	regulatorische T-Zellen
		VL	Viruslast

## I. Einleitung

### I.1. Das humane Immundefizienz Virus

Im Jahre 1981 wurden erstmals Fälle der bis dahin ätiologisch unklaren erworbenen Immunschwäche AIDS bei homosexuellen Männern in den USA beobachtet und beschrieben<sup>44</sup>. Nur wenige Jahre später gelang es französischen und amerikanischen Wissenschaftlern ein Retrovirus, das humane Immundefizienz Virus, zunächst als LAV (lymphadenopathy associated virus)<sup>9,73</sup> oder HTLV III (human T-lymphotropic virus)<sup>36,89</sup> beschrieben, als ätiologisches Agens für AIDS nachzuweisen. Bis heute forderte die HIV-Pandemie etwa 25 Millionen Menschenleben. Laut WHO Angaben waren 2009 mehr als 33 Millionen Menschen mit HIV-1 infiziert, 2.6 Millionen Menschen infizierten sich neu und nahezu 1.8 Millionen Menschen verstarben an den Folgen der Infektion. Im Vergleich zu den Vorjahren liegt die Prävalenz der Infektion auf einem gleichbleibendem Niveau, während die Inzidenz aufgrund der vermehrten Prävention und Aufklärung zurückgegangen ist, dennoch bleibt die HIV-Pandemie eine große Herausforderung für die globale Gesundheit<sup>110</sup>.

#### I.1.1. Aufbau und Replikation des HI-Virus

Das etwa 100nm große HIV-1 ist ein Lentivirus und gehört zu der Familie der Retroviren. In die das Virus umgebende Lipoproteinhülle sind *env*-Glykoproteinkomplexe eingebettet, die als Bindungsstellen an die Wirtszellen dienen, bestehend aus einem externen Anteil (gp120) und einem Transmembranprotein (gp41). Die Virusform wird durch das Matrixprotein p17 aufrechterhalten, während das Kapsidprotein p24 das virale Genom, bestehend aus einer einzelsträngigen RNA sowie den Proteinen p66 (reverse Transkriptase), p11 (Protease) und p32 (Integrase), im Inneren des Virus umgibt<sup>118</sup>. Das etwa 9kb umfassende retrovirale Genom (5'LTR-*gag-pol-env*-LTR 3') wird bei der Integration beidseitig über LTR („long terminal repeat“) –Regionen mit der zellulären DNA verbunden. Die strukturellen Gene *gag*, *env* und *pol* kodieren die Zusammensetzung der einzelnen Viruspartikel; die für die Virusreplikation nicht essentiellen „akzessorischen“ Gene (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) kodieren für regulatorische Proteine<sup>38,113</sup>. Zielzellen von HIV-1 sind CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten sowie weitere Zellen des Immunsystems (Monozyten, DC, Makrophagen u.a.), die das CD4-Molekül und für den erfolgreichen Viruseintritt notwendige Chemokinrezeptoren als Korezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dabei gelang es 1996 CCR5 als Korezeptor makrophagotroper (M-troper/R5) HIV-Isolate nachzuweisen<sup>29</sup>, während CXCR4 als Korezeptor lymphotroper (T-troper/X4) HIV-Isolate identifiziert werden konnte<sup>34</sup>. HIV-1 bindet diese

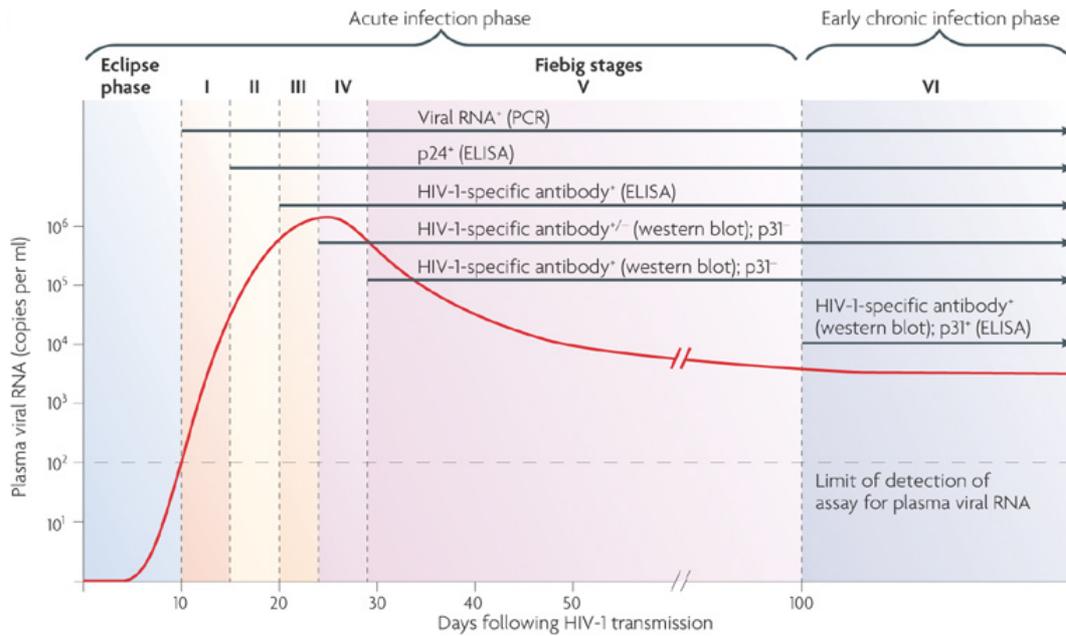
Rezeptoren über gp120 und bedingt damit eine Konformationsänderung des gp41, die zur Fusion des Virus mit der Wirtszelle führt<sup>23</sup>. Mit dem Eintritt in das Zytoplasma zerlegt sich das HIV-Kapsid. Das Virus ist während dieser Phase anfällig für intrinsische zelluläre antivirale Mechanismen (sogenannte Restriktionsfaktoren) wie tripartite motif protein 5a (TRIM5α)<sup>108</sup> und Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme catalytic polypeptide like 3G (APOBEC3G)<sup>77</sup>. Mithilfe der viralen reversen Transkriptase (RT) wird das virale RNA-Genom im Zytoplasma in doppelsträngige DNA umgeschrieben, anschließend in den Nukleus transportiert und nach Aktivierung der CD4<sup>+</sup>T-Zelle mithilfe der viralen Integrase in die Wirts-DNA integriert<sup>120</sup>. Das so entstandene Provirus wird von der zellulären RNA-Polymerase II unter Beteiligung zellulärer Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, NF-AT und Sp1 transkribiert, die virale RNA aus dem Zellkern geschleust und die viralen Proteine im Zytoplasma translatiert<sup>68,113</sup>. Nach Spaltung der großen Präkursorproteine durch die virale Protease kann nun die Ausknospung („budding“) infektiöser Partikel erfolgen<sup>113</sup>.

### **I.1.2. Pathogenese und Krankheitsverlauf**

Die Infektion mit HIV erfolgt in mehr als 80% der Fälle über Schleimhautkontakte (genital, rektal, oral), der Rest verteilt sich auf die intravenöse oder in utero bzw. peripartale Übertragung<sup>110</sup>. Unabhängig vom Übertragungsweg findet die virale Replikation innerhalb der initialen Phase in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes und dem drainierenden lymphoretikulären Gewebe statt, da sich vor allem hier für die ungestörte virale Replikation bevorzugte ruhende CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>Zellen finden<sup>25</sup>. Nach dieser „Eclipse“-Phase, die mit der systemischen Disseminierung des Virus endet, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Plasmavirämie mit Viruslasten bis zu  $1 \times 10^7$  Kopien/ml. Um den 21.-28. Tag folgt eine konsekutive irreversible Zerstörung der CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen und die Etablierung von Virusreservoirs in ruhenden CD4<sup>+</sup>T-Zellen<sup>70</sup>. Der initiale Abfall der Virämie steht in engem zeitlichen Zusammenhang zum ersten Nachweis HIV-1 spezifischer CD8<sup>+</sup>T-Zellen, gekennzeichnet durch eine Inversion der CD4/CD8-Ratio auf unter 1<sup>25</sup>. Ein konstantes Niveau der Virämie, der sogenannte „virale setpoint“, wird etwa 3 bis 6 Monate nach der Primärinfektion erreicht<sup>71</sup>. Dabei gelten als wichtige Determinanten für einen niedrigen viralen setpoint, sowie eine langsame Krankheitsprogression, neben immunologischen Faktoren wie z.B. der Einschränkung der viralen Replikationsfähigkeit (Fitness) durch unter Selektionsdruck entstandene virale Quasispezies oder bestimmte HLA-I-Allele (HLA B27, B57), auch genetische Faktoren wie z.B. eine Deletion am Gen des CCR5-Rezeptors<sup>25,107</sup>. Nach Fiebig kann diese akute Phase der HIV-Infektion in Stadien VI kategorisiert werden basierend auf einer sequentiellen

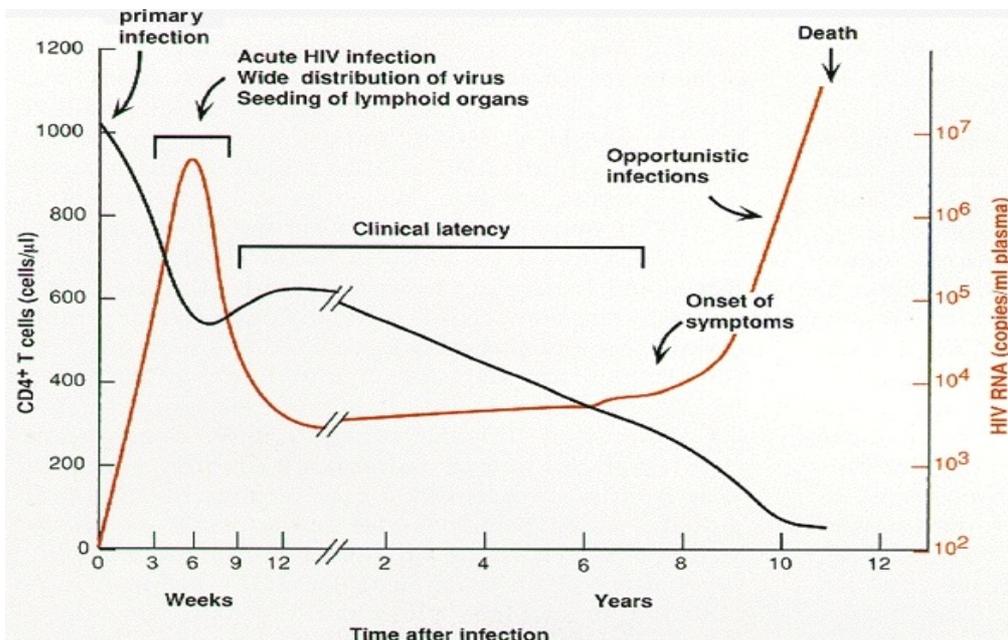
Steigerung an positiven Ergebnissen diagnostischer Assays (PCR, ELISA, Western Blot) (**Abb. 1a**)<sup>70</sup>. Die akute HIV-Infektion ist dabei definiert durch eine hohe Viruslast bei negativem anti-HIV-1 ELISA. In 40-90% der Fälle zeigen sich vorübergehend grippeähnliche Symptome mit Fieber, ein makulo-papulöses Exanthem und eine generalisierte Lymphadenopathie<sup>107</sup>.

A.



AJ McMichael *et al.*, Nature Reviews Immunology 2010

B.



JM Coffin *et al.*, Retroviruses 1997

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufs der HIV-Infektion.

**A.** Einteilung der akuten Infektion nach Fiebig-Stadien I-VI. **B.** Fundamentale pathophysiologische Ereignisse in der HIV-Infektion.

Anschließend folgt die nahezu asymptomatische Phase der klinischen Latenz, deren Dauer hauptsächlich durch den Verlust der CD4<sup>+</sup>Lymphozyten bestimmt wird und ohne Therapie mehrere Monate bis zu 10 Jahren betragen kann. Der kontinuierliche Verlust der CD4<sup>+</sup>Lymphozyten führt zu einer zunehmenden Schwächung des Immunsystems, wodurch der Körper anfälliger für opportunistische Erkrankungen wird. Je nach virologischen und immunologischen Voraussetzungen entwickelt der Großteil der HIV-Infizierten bei einer Unterschreitung des kritischen Schwellenwertes von 200 Zellen/ $\mu$ l nach 4 bis 12 Jahren AIDS mit Auftreten opportunistischer Infektionen (u.a. Candidosen, Pneumocystis-Pneumonien, cerebraler Toxoplasmose, HSV/CMV-Encephalitiden), Malignomen und neurologischer Symptomatik (**Abb. 1b**)<sup>117</sup>. Diese Zeitspanne variiert interindividuell stark; so werden auf der einen Seite Verläufe beobachtet, die rapide innerhalb von 2 bis 3 Jahren zum Vollbild AIDS führen („Fastprogressoren“), andererseits gibt es auch solche, bei denen die Patienten über Jahre mit relativ stabiler CD4<sup>+</sup>Zahl leben, ohne jegliche Symptome aufzuweisen (CDC=A), sogenannte „Nonprogressoren“. In dieser Patientengruppe unterscheidet man solche, die ohne Therapie für mindestens 5 Jahre eine stabile CD4<sup>+</sup> Zahl (>500/ $\mu$ l) und niedrige Viruslasten (<2000 Kopien/ml) aufweisen (LTNP, „Long-Term Nonprogressor“), und solche, die ohne Therapie bei stabiler CD4<sup>+</sup> Zahl die Viruslast unter der Nachweisgrenze halten (EC, „elite controller“)<sup>27,58</sup>.

### **I.1.3. Therapeutische Möglichkeiten**

Trotz intensiver Forschung gibt es bis heute keinen wirksamen prophylaktischen und therapeutischen Impfstoff gegen eine HIV-Infektion. Mit dem Einsatz antiretroviraler Kombinationstherapien (HAART, „highly active antiretroviral treatment“), wobei diese neben den klassischen RT-Inhibitoren (Nukleosidische-/Nukleotidische- RTI und Nicht- NRTI) und Protease-Inhibitoren seit kurzer Zeit auch Entry-Inhibitoren (Korezeptorantagonisten und Fusionsinhibitoren) und Integrase-Inhibitoren zusätzlich enthalten, konnte die HIV bedingte Mortalität seit 1996 drastisch gesenkt werden<sup>43,110</sup>. Eine Heilung im mikrobiologischen Sinne einer Erregereliminierung gelingt jedoch momentan noch nicht. Erschwert wird die Eradikation des Virus zum einen durch ruhende latent infizierte Zellen, die ein lebenslanges Reservoir bilden. In diesem kann selbst nach Jahren suffizienter HAART nach Reaktivierung der Zelle wieder virale Transkription stattfinden<sup>83</sup>; Zudem wird die Eradikation des Virus durch Resistenzentwicklung erschwert, welche durch die hohe Mutationsrate ( $3.4 \times 10^{-5}$ /bp pro Replikationszyklus bei einer Genomgröße von circa 104bp) bedingt ist, wobei vor allem unter starkem Selektionsdruck, wie er durch antivirale Medikamente und die körpereigene Immunantwort ausgeübt wird, die Entwicklung viraler „Escapemutanten“,

begünstigt wird<sup>24</sup>. Über diese Zeit sind zudem mit dem Lipodystrophie-Syndrom, Dyslipidämien und mitochondraler Toxizität auch potentielle Nebenwirkungen der HAART zu verzeichnen<sup>8,43,113</sup>. Trotz heutzutage nahezu normaler Lebenserwartung unter lebenslanger HAART ergeben sich somit ungelöste Probleme mit dem Bedarf nach weiterführender Forschung. Die Suche nach neuen Therapieansätzen, hat dazu geführt, dass vermehrt auch genetische und immunologische Auffälligkeiten untersucht werden, die besonders bei HIV-Nonprogressoren aufgefallen sind<sup>8,87,113</sup>. Zu den genetischen Variationen, welche die Anfälligkeit für eine HIV-1 Infektion und die Krankheitsprogression beeinflussen, gehören u.a. Mutationen der Korezeptoren (z.B. CCR5Δ32<sup>60,99</sup>, CCR2 V641<sup>3</sup>, CXCR1-Ha Haplotyp<sup>111</sup>), Chemokin-Varianten (z.B. quantitativ erhöhtes CCL3L1<sup>41</sup>, CCL5 (RANTES)<sup>59</sup>), ausgedehnte HLA-Polymorphismen (z.B. HLA B57/B27<sup>19,24</sup>), die mit einer effizienteren Immunantwort gegen HIV assoziiert sind, da sie durch ein ausgedehntes Repertoire an Antigenen „Escape“-Mutanten zum einen reduzieren und zum anderen die virale Fitness einschränken, und intrazelluläre Wirtsfaktoren (APOBEC3G<sup>21</sup>, TRIM5α<sup>80</sup>), welche „post-entry events“ der HIV Replikation modulieren<sup>87</sup>. Die immunologischen Mechanismen, die eine potentielle Kontrolle der HIV-Infektion unterstützen, stellen ein komplexes Zusammenspiel aus angeborener und adaptiver Immunantwort dar. Entscheidend für die Kontrolle der HIV-Infektion scheinen die frühzeitige Eliminierung infizierter Zellen durch NK-Zellen zu sein sowie adaptive Vorgänge mit Initiation und Aufrechterhaltung der Aktivierung von cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und der Produktion von neutralisierenden Antikörpern durch Plasmazellen. Die adaptive Immunantwort unterliegt dabei der Koordination durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und wird somit durch HIV, welches die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen infiziert, beeinträchtigt<sup>8,66,86,114</sup>. Die T-Zellaktivierung und -homeostase sind heute zunehmend Gegenstand intensiver Untersuchungen, da sie wesentlich zur Pathogenese der HIV-Infektion beizutragen scheinen.

## **I.2. Immunopathogenese der HIV-Infektion**

### **I.2.1. HIV-induzierte adaptive Immunantwort**

Bis zu 60% der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>T-Zellen in der intestinalen Lamina propria können in der Frühphase der SIV-Infektion am Gipfel der Virusreplikation infiziert sein. Durch direkte oder indirekte Zerstörung gehen davon innerhalb nur weniger Tage die meisten verloren. Von zentraler Bedeutung für den Krankheitsverlauf scheint dabei die Fähigkeit des Immunsystems zu sein, diesen Pool an CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>T-Zellen wiederherzustellen<sup>88</sup>. In der Lamina propria der Mukosa sitzen dendritische Zellen (DC), die über ihren DC-SIGN-Rezeptor gp120 binden können<sup>48</sup>. Rezeptorgebunden werden die Virionen in regionäre Lymphknoten transportiert, um dort mit dem ICAM-3-Rezeptor auf

CD4<sup>+</sup>Lymphozyten in Kontakt zu treten und so den Fusionsrezeptoren auf den CD4<sup>+</sup>Lymphozyten angeboten zu werden. Zudem präsentieren DCs das Antigen nach Prozessierung auf HLA-Molekülen und initiieren auf diesem Wege eine HIV-spezifische adaptive Immunantwort<sup>39,48</sup>. Der Hauptort der Replikation des Virus ist im gesamten Verlauf der HIV-Infektion das lymphatische Gewebe<sup>49,84</sup>. Zum einen werden in Form von Immunkomplexen dabei Virionen im Netzwerk der follikulären DC retiniert, zum anderen etablieren sich ruhende CD4<sup>+</sup> Zellen schnell als Virusreservoir und können somit potentiell weitere Zellen infizieren<sup>22,83</sup>. Der initial rasche Anstieg der VL begleitet von der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, allen voran IFN- $\alpha$  und IL-15, begünstigt eine antivirale Immunantwort, birgt jedoch auch die Gefahr der überschießenden schädlichen Immunaktivierung einhergehend mit dem Verlust an CD4<sup>+</sup>Zellen<sup>25</sup>. Die HIV-spezifische zelluläre Immunantwort durchläuft ihre primäre Reifung vornehmlich in der T-Zellzone der Lymphknoten. Die dort selektierten Klone unterstützen anschließend die B-Zellreifung für die HIV-spezifische humorale Immunantwort in den Keimzentren der Sekundärfollikel. Auf sekundäre Signale hin beginnen aktivierte T-Zellen zu proliferieren und zu Effektor- und Gedächtniszellen zu differenzieren. CD4<sup>+</sup> Lymphozyten reifen zu T-Helferzellen heran. Diese unterteilen sich in T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen. T<sub>H1</sub>-Zellen bewirken über IL-2 und IFN- $\gamma$  eine Stimulation der zellulären Immunantwort mit Reifung und Aktivierung von Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. T<sub>H2</sub>-Zellen dagegen stimulieren mittels IL-4, IL-5, IL-10 u.a. insbesondere die Reifung von B-Zellen. Naive CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten reifen durch die Antigenpräsentation zu zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit zytolytischen Effektormolekülen (z.B. Perforin, Granzyme) heran, die zudem die stark inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$  produzieren<sup>50</sup>. Im Laufe der Differenzierung wird die CLA („Common leucocyte antigen“-Isoform gewechselt, CD45RA herunterreguliert und dafür vornehmlich CD45RO und als Aktivierungsmarker frühzeitig CD69, später CD25, HLA-DR und auf CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten CD38 exprimiert. Durch die Veränderungen des Phänotyps kommt es zu einer Migration präferenziell in parenchymatöse Organe. Physiologischerweise gehen die Effektorzellen nach der Elimination eines Antigens in Apoptose (AICD, „activation induced cell death“) zugrunde, lediglich die Minderheit wird zu Gedächtniszellen<sup>49,50</sup>. Zur Kontrolle der viralen Replikation tragen verschiedene Komponenten der HIV-spezifischen Immunantwort bei. Zum einen HIV-spezifische CTL, deren Nachweis mit der Suppression der Plasmavirämie sowohl in der akuten HIV-Infektion als auch während Therapiepausen korreliert<sup>42</sup>. Im Laufe der Erkrankung lässt diese temporär effektive CTL-Antwort jedoch aufgrund der Bildung von „Escape“-Mutanten<sup>24</sup>, der Suszeptibilität der CTL für HIV<sup>96</sup>, der mangelnden Stimulation der CTL bei progredientem T<sub>H1</sub>-Verlust<sup>12</sup> sowie der Hochregulation des auf CTL inhibitorisch wirkenden PD-1 Moleküls

(„programmed death“) nach<sup>112</sup>. Zum anderen vermindern sich HIV-spezifische CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen, NK-Zellen über KIR („killer-immunglobulin-like“-Rezeptoren)<sup>69</sup>, neutralisierende Antikörper und weitere humorale Faktoren (RANTES, Typ-I IFN, IFN- $\gamma$ ) im Laufe der Infektion<sup>109</sup>. Im Folgenden soll auf die somit einsetzende chronische Immunaktivierung und die CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten, welche eine zentrale Rolle in der Koordination dieser Mechanismen spielen, sowie deren Verlust näher eingegangen werden.

### **1.2.2. Chronische Immunaktivierung und progrediente Depletion der CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen**

HIV verursacht eine persistierende Infektion, die mit einer chronischen Immunaktivierung und einer progredienten Depletion von CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen einhergeht<sup>86,109</sup>. Dabei werden nicht nur HIV-spezifische und HIV-infizierte T-Zellen aktiviert sondern auch „bystander“ T-Zellen, die über Mediatoren und Oberflächenmoleküle der HIV-spezifischen T-Zellen auf unterschiedlichste Antigene reagieren. Folge ist eine gesteigerte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, eine erhöhte Expression von Chemokinrezeptoren bei gleichzeitig erhöhter Apoptoserate einhergehend mit einem gesteigerten Zellumsatz<sup>6,88</sup>. Diese Hyperaktivierung des Immunsystems ist hinsichtlich der Infektionskontrolle zum einen von Vorteil, jedoch geht sie auch mit verheerenden Folgen einher: so nimmt die Immunaktivierung direkten Einfluss auf die virale Replikation einerseits über neu geschaffene Zielzellen durch die starke Proliferation von CD4<sup>+</sup>Zellen, andererseits über vermehrt sezernierte proinflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-6), welche Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, NF-AT) aktivieren, die das HI-Virus für die virale Replikation benutzt<sup>109,83</sup>. Des Weiteren kann die dauernde Hyperregeneration der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten in zellulärer Hypofunktionalität sowie Modifizierung der Reifung von Effektor- und Gedächtniszellen und des Repertoires an CTL-Epitopen resultieren<sup>88</sup>. Zudem konnte unter Verwendung mathematischer Modelle für die chronische HIV-Infektion ein bis zu 70-fach (bis zu 10<sup>9</sup> Zellen/Tag) erhöhter Umsatz von CD4<sup>+</sup>Lymphozyten im Rahmen der Hyperaktivierung beschrieben werden, womit zumindest ein Teil der progredienten Depletion der CD4<sup>+</sup>T-Zellen zu erklären wäre<sup>47,116</sup>. Zusammengefasst führt die chronische Hyperaktivierung des Immunsystems zur Freisetzung von Faktoren, die mit der Entwicklung eines progredienten Krankheitsverlaufs einhergehen. Der Verlust der CD4<sup>+</sup>Lymphozyten spielt dabei eine entscheidende Rolle in der HIV-1 Pathogenese. In einer SIV-infizierten Affenkohorte konnte unabhängig vom weiteren Krankheitsverlauf in der akuten Infektion eine Depletion der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>T-Zellen nachgewiesen werden. Entscheidend nun für den weiteren Krankheitsverlauf scheint dabei die Erholung und Aufrechterhaltung der CD4<sup>+</sup>T-Zellantwort in der chronischen Phase zu sein<sup>88</sup>. Neben der chronischen Immunaktivierung werden

weitere Mechanismen für den progredienten Verlust der CD4<sup>+</sup>Lymphozyten verantwortlich gemacht: Zum einen werden CD4<sup>+</sup>Lymphozyten direkt durch die Infektion mit HIV-1 geschädigt und gehen in Apoptose über. Die Zahl der infizierten T-Helferzellen ist jedoch in der chronischen HIV-Infektion mit 0,1% zu klein, um diesen zytopathischen Effekt alleine für die CD4 Depletion verantwortlich zu machen. In der akuten Infektion dagegen, wo bis zu 60% der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>T-Zellen infiziert sind, proliferieren die CD4<sup>+</sup> Zellen trotz der ungehemmten Virusreplikation und es werden nicht nur die bevorzugt infizierten CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>T-Zellen zerstört<sup>88,109</sup>. Des Weiteren töten HIV-1 spezifische CTL gezielt HIV-infizierte CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ab<sup>16,116</sup>. CTL jedoch sind hinsichtlich ihrer Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen abhängig, die sie im Laufe der Infektion im Rahmen der antiviralen Immunantwort jedoch zerstören und somit ihre eigene Aktivierung verhindern<sup>12</sup>. Auch die Umverteilung der Lymphozyten aus dem peripheren Blut in lymphatisches Gewebe, das sogenannte Lymphozyten-„Trapping“ kann in der chronischen Phase der Infektion einen Beitrag zu reduzierten Zellzahlen im Blut liefern, ohne einen erhöhten Zellumsatz annehmen zu müssen<sup>46,94</sup>. Trotz intensiver Forschung ist unklar, wie das Immunsystem auf die chronische Hyperaktivierung und den progredienten CD4<sup>+</sup>T-Zellverlust reagiert. Die Rolle der Immunregulation, insbesondere durch regulatorische T-Zellen wird daher zunehmend wichtig in der Pathogenese der HIV Infektion..

### 1.2.3. Regulation der adaptiven Immunantwort

Eine angemessene Immunantwort sollte die Balance zwischen maximaler Erkennung und Eliminierung eines Antigens und minimalem immunbedingtem Gewebeschaden und Autoimmunität aufrechterhalten. Das Immunsystem verfügt zur Herstellung dieser Balance über unterschiedliche Mechanismen. Zu den wohl Wichtigsten dabei zählen neben Anergie und Ignoranz der T-Zellen die regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>)<sup>54,105</sup>. Sakaguchi *et al* (1995) gelang es in den 90er Jahren erstmals, die schon fast 2 Jahrzehnte zuvor vermutete, regulatorische T-Zellpopulation anhand der CD4CD25-Koexpression (CD25=IL-2Rezeptor,  $\alpha$ -Kette) zu identifizieren, welche die Effektorzellen zu unterdrücken scheinen<sup>40,98</sup>. Heute ist bekannt, dass diese T<sub>regs</sub> von enormer Wichtigkeit für die periphere Toleranz sind und damit eine bedeutende Rolle bei Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen, in der Schwangerschaft und nicht zuletzt auch bei viralen Infektionserkrankungen spielen<sup>54</sup>. T<sub>regs</sub> unterdrücken die Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktion vieler Zelltypen, einschließlich der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen sowie dendritischer Zellen und kontrollieren damit die Immunantworten gegen Autoantigene, Pathogene und Tumorzellen<sup>54,65</sup>. Dabei wird diese

Population klassischerweise in zwei Subtypen unterteilt: zum einen die natürlichen  $T_{\text{regs}}$  ( $nT_{\text{regs}}$ ), die sich im Thymus entwickeln und hochaffine autospezifische TCRs tragen. Sie entkommen der negativen Selektion wahrscheinlich durch intermediäre affine Interaktionen mit Autoantigenen. Diese Affinität ist zu gering für die negative Selektion, jedoch zu hoch, um in der Peripherie als Effektorzelle zu wirken<sup>105</sup>. Zum anderen die peripher induzierbaren  $T_{\text{regs}}$  ( $iT_{\text{regs}}$ ), die sowohl autospezifische als auch xeno-/allospezifische TCRs tragen und in T regulatory 1 ( $T_{\text{r1}}$ ) und T helper 3 ( $T_{\text{H3}}$ )-Zellen unterteilt werden.  $iT_{\text{regs}}$  scheinen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz im humanen gastrointestinalen Trakt zu spielen und überschießende Immunantworten gegenüber mit der Nahrung aufgenommenen Antigenen zu unterdrücken<sup>65,97,105</sup>. Auf die Rolle der  $nT_{\text{regs}}$  (im Folgenden allgemein als  $T_{\text{regs}}$  bezeichnet) soll in dieser Arbeit näher eingegangen werden.

### ***1.2.3.1. Identifikation der $T_{\text{regs}}$***

Wie bereits erwähnt, wurden  $T_{\text{regs}}$  seit den 90er Jahren mit dem rationalen Hintergrund, dass  $T_{\text{regs}}$  zur Expansion und Aktivierung stark abhängig sind von der Stimulation durch IL-2, als  $CD4^+CD25^+$ T-Zellen identifiziert<sup>64,98</sup>. CD25 jedoch wird generell auf aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen exprimiert, sodass man bei als  $CD4^+CD25^+$  definierten  $T_{\text{regs}}$  immer von einer Kontamination mit konventionellen aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen ausgehen musste. Um diese Kontamination zu minimieren, beschränkte man sich bei Untersuchungen von  $T_{\text{regs}}$  auf solche  $CD4^+$ T-Zellen, die besonders hohe Level an CD25 exprimieren<sup>5</sup>. Eine zuverlässigere Identifikation der  $T_{\text{reg}}$ -Population wurde mit der Entdeckung der erhöhten intrazellulären Expression des Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead Box Protein 3) in  $CD4^+CD25^{\text{high}}$  Zellen möglich<sup>93,119</sup>. In knock-out Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass es nach knock-out des FoxP3-Gens vermehrt zu schweren Autoimmunerkrankungen kommt<sup>101,105</sup>. FoxP3 scheint eine wichtige Rolle in der Regulation diverser Membranproteine inklusive IL-2, CD25, CD152 und GITR zu spielen, die von funktioneller Bedeutung für  $T_{\text{regs}}$  sind<sup>64</sup>. Kurze Zeit später gelang es jedoch diversen Arbeitsgruppen nachzuweisen, dass auch die FoxP3-Expression nicht spezifisch für die  $T_{\text{reg}}$ -Population ist, sondern auch auf aktivierten T-Zellen sowie auf Tumorzellen zu finden ist<sup>75,121</sup>. Inzwischen werden  $T_{\text{regs}}$  mit diversen Molekülen in Verbindung gebracht, die zwar nicht spezifisch für diese Subgruppe der T-Zellen sind, sich jedoch aufgrund der Höhe und Uniformität der Expression auf  $CD4^+CD25^{\text{high}}$  Zellen als zusätzliche Marker eignen könnten (Tab. 1). Diese Moleküle beinhalten unter anderem zwei Familien kostimulatorischer Moleküle: die CD28 Superfamilie<sup>51</sup>, repräsentiert durch CTLA4 („cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4“) und ICOS („inducible costimulator protein“), und die TNF-Rezeptor Superfamilie („tumour necrosis

factor“)<sup>100,103</sup>, repräsentiert durch CD27 und GITR („glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related protein“). Zusätzlich erfolgt die Unterteilung nach Differenzierungsstatus anhand der Expression von CD45RA (naive T<sub>regs</sub>) und CD45RO (ausgereifte T<sub>regs</sub>)<sup>33,103</sup>. In letzter Zeit wurde eine Vielzahl weiterer Moleküle mit T<sub>regs</sub> in Verbindung gebracht. Keiner der genannten Marker scheint jedoch spezifisch für die T<sub>reg</sub>-Population zu sein. Erst kürzlich gelang es nun im Mausmodell und im Menschen zunächst CD127<sup>61</sup>, den IL-7 Rezeptor, der invers mit der FoxP3-Expression zu korrelieren scheint, und nun auch die Ektonuklease CD39 („nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1“, [NTPDase-1])<sup>15</sup>, die generell erhöht von T<sub>regs</sub> exprimiert zu werden scheint, als mögliche spezifischere Marker für T<sub>regs</sub> zu identifizieren. Die Charakterisierung durch CD39 Expression birgt dabei den Vorteil, dass es T<sub>regs</sub> möglicherweise nicht rein phänotypisch sondern auch funktionell definieren würde.

**Tabelle 1:** Phänotypische Marker der humanen T<sub>reg</sub>

Marker	Humane T <sub>regs</sub>	Referenz	Bedeutung
CD4	CD4 <sup>+</sup>	[53]	konventionelle CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
CD25	CD25 <sup>high</sup>	[53, 54, 55]	unspezifisch, Aktivierungsmarker konventioneller CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
FoxP3	FoxP3 <sup>+</sup>	[105, 109]	essentieller Transkriptionsfaktor für suppressive Funktion der T <sub>regs</sub>
CD127	CD127 <sup>low</sup>	[58,102]	extrazellulär, IL-7 Rezeptor, Apoptosehemmung von T-Lymphozyten
CTLA4	CTLA4 <sup>high</sup>	[38,109]	hemmt Aktivierung von NF-κB, NF-AT und AP-1, Immunsuppression
ICOS	ICOS <sup>+</sup>	[55]	Immunregulation u.a. via IL-10-Produktion, Apoptosehemmung
CD39	CD39 <sup>+</sup>	[15,26,64]	Immunsuppression via Degradation von ATP, Produktion von Adenosin
GITR	GITR <sup>+</sup>	[100,103]	supprimiert T <sub>reg</sub> -Aktivität
CD45RA	CD45RA <sup>+</sup>	[33,103]	naive T <sub>regs</sub>
CD45RO	CD45RO <sup>+</sup>	[33,103]	ausdifferenzierte reife T <sub>regs</sub>

### 1.2.3.2. Funktionelle Mechanismen der T<sub>regs</sub>

T<sub>regs</sub> scheinen eine sehr geringe proliferative Aktivität aufzuweisen. Ihr Lebenszyklus und ihre funktionelle Aktivität sind stark von der IL-2-Produktion durch andere T-Zellen abhängig, da sie dazu nicht selbst imstande sind<sup>109</sup>. Unser heutiges Wissen über die funktionellen Mechanismen der T<sub>regs</sub> *in vivo* stammt bislang hauptsächlich aus Mausmodellen. Die immunsupprimierende Funktion konnte hier sowohl über die Freisetzung von Zytokinen (TGFβ, IL-10), als auch über Zellkontakt-

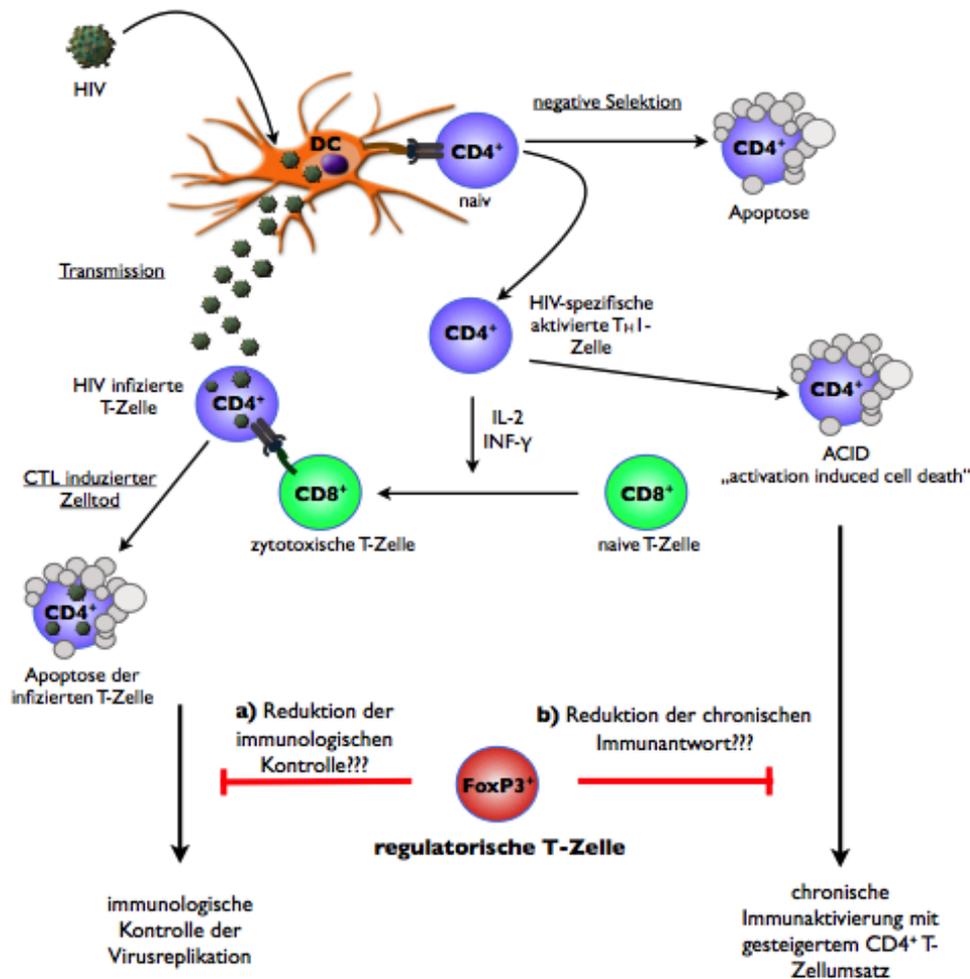
abhängige Mechanismen wie CD152 (CTLA4) durch Inhibition der T-Zellstimulation oder CD95 (Fas-Rezeptor), Perforin oder Granzym B, durch induzierten Zelltod nachgewiesen werden<sup>4,64,67,91</sup>. Humane T<sub>regs</sub> scheinen ebenso TGF $\beta$  und IL-10 freizusetzen, jedoch benötigen sie *in vitro* den Zellkontakt, um ihrer Funktion vollends nachzukommen<sup>33</sup>. Neueste Veröffentlichungen zeigen, dass die Ektonuklease CD39, ursprünglich als Aktivierungsmarker auf B-Zellen und anderen Zellen des lymphoiden Formenkreis beschrieben<sup>63,95</sup>, ein funktionelles immunsuppressives Molekül auf der Oberfläche von T<sub>regs</sub> darstellt<sup>15,76,64</sup>. Die immunsuppressiven Eigenschaften sind dabei vor allem auf zwei Mechanismen zurückzuführen: zum einen durch den direkten Abbau des bei erhöhten Zellumsatz anfallenden proinflammatorisch wirkenden ATP und ADP zu AMP, zum anderen über die enzymatische Degradation des AMP zu anti-inflammatorischen Adenosin via CD73, einer Ekto-5'-Nukleotidase, die sowohl löslich als auch membranständig vorliegen kann. Adenosin wirkt als inhibitorischer Ligand des Adenosin-2a-Rezeptors (A<sub>2A</sub>) auf Immunzellen und steigert durch Bindung die zytoplasmatische cAMP-Konzentration und konsekutiv die Proliferation und Zytokinproduktion der Zellen. Zusammen mit der Adenosin-Deaminase (ADA), die Adenosin zu inaktiven Inosin abbaut, regulieren CD39 und CD73 somit den perizellulären Adenosinhaushalt<sup>15,26,64</sup>.

### I.3. Zielsetzung

Frequenz, Phänotyp sowie Mechanismen der funktionellen Aktivität von  $T_{\text{regs}}$  in der HIV-1 Pathogenese sind bislang kontrovers diskutierte Themen. Lange Zeit fand sich die Ursache hierfür in der ungenauen Definition von  $T_{\text{regs}}$  als  $CD4^+CD25^{\text{high}}$  T-Zellen und die dadurch bedingte Kontamination durch konventionelle  $CD4^+$  T-Zellen<sup>98,115</sup>. So konnten diverse Forschungsgruppen einen Verlust der  $T_{\text{regs}}$  mit zunehmender Krankheitsprogression nachweisen<sup>31,105</sup>. Unterstützt werden diese Befunde auch durch Chase *et al* (2008), die hohe  $T_{\text{reg}}$  Frequenzen in EC und LTNP fanden<sup>20</sup>. Diese Befunde sprechen für einen vorteilhaften Effekt der  $T_{\text{regs}}$  in der HIV-1 Pathogenese durch Unterdrückung der chronischen Hyperaktivierung des Immunsystems. Auf der anderen Seite konnte nachgewiesen werden, dass  $T_{\text{regs}}$  von HIV-infizierten Patienten, HIV-spezifische  $CD4^+$  T-Zellantworten *ex vivo* unterdrücken<sup>1,115</sup>, und dass die *in vitro* Depletion von  $T_{\text{regs}}$  zu gesteigerten HIV-spezifischen T-Zellantworten führt<sup>101</sup>. Beide Befunde werden unterstützt durch Befunde, die eine Expansion der  $T_{\text{regs}}$  im Verlauf der Krankheitsprogression zeigen<sup>17,115</sup>. Zusammengefasst sprechen diese Befunde eher für einen unvorteilhaften Effekt der  $T_{\text{regs}}$  auf die HIV-Pathogenese durch Unterdrückung der antiviralen Immunantwort. Unklar ist zudem die Suszeptibilität der  $CD4^+$   $T_{\text{regs}}$  für eine Infektion mit HIV-1 selbst. Auch hier zeigen sich diskrepante Befunde. So wiesen diverse Arbeitsgruppen nach, dass  $T_{\text{regs}}$  für HIV anfällig zu sein scheinen und somit mit fortschreitender Erkrankung eher verloren gehen<sup>74,82</sup>, andere konnten jedoch im Gegensatz zu non- $T_{\text{regs}}$  keine nennenswerte Infektion der  $T_{\text{regs}}$  mit HIV-1 finden<sup>20</sup>. Theoretisch können  $T_{\text{regs}}$  einerseits HIV-spezifische Immunantworten unterdrücken und somit dem Virus die Replikation erleichtern, andererseits die Hyperaktivierung des Immunsystems einschränken, wodurch der  $CD4^+$  T-Zellverlust begrenzt wäre und die virale Replikation in Maßen gehalten werden könnte (Abb. 2). Das Ziel dieser Arbeit ist es die dargestellten diskrepanten Befunde zu  $T_{\text{regs}}$  bei der HIV-1 Infektion zu untersuchen. Es ergeben sich folgende Zielsetzungen:

1. Rekrutierung einer großen und gut charakterisierten Kohorte von HIV-infizierten Patienten in unterschiedlichen Stadien der HIV-Infektion: Nonprogressoren (EC, LTNP), avirämische HAART-therapierte Patienten, Progressoren.
2. Exakte phänotypische Charakterisierung der  $T_{\text{regs}}$ .
3. Analyse der relativen Frequenz sowie der absoluten Anzahl der  $T_{\text{reg}}$ -Population.
4. Analyse der Expression spezifischer funktioneller Marker: CTLA4, ICOS, CCR5, CD39.
5. Durchführung von CFSE-Proliferationsassays nach Depletion der  $T_{\text{reg}}$ -Population zur Untersuchung der immunsupprimierenden Eigenschaften der  $T_{\text{regs}}$ .

6. Longitudinale Analysen zur Ermittlung des Einflusses der HAART auf die Frequenz der  $T_{regs}$ .
7. Untersuchung von Lymphknoten-Proben zur Analyse der Verteilung der  $T_{regs}$  im Gewebe.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Einflusses der  $T_{regs}$  auf die HIV-Immunopathogenese. Bis jetzt ist nicht klar, ob  $T_{regs}$  einen vorteilhaften oder eher ungünstigen Einfluss auf die HIV-Pathogenese haben. So könnten sie einerseits (a) HIV-spezifische Immunantworten unterdrücken und somit dem Virus die virale Replikation erleichtern, andererseits (b) könnten sie die Hyperaktivierung des Immunsystems einschränken, wodurch der  $CD4^+$  T-Zellverlust begrenzt und somit auch die Möglichkeit der immunologischen Kontrolle der virale Replikation gegeben wäre.

## II. Material und Methoden

### II.1. Material

#### II.1.1. Reagenzien und Verbrauchsmaterial

##### II.1.1.1. Verbrauchsmaterialien

Kunststoff-Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

##### II.1.1.2. Reagenzien

**Tabelle 2:** Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
BDTMCompBeads, neg. control/anti-mouse Ig, 6ml	BD Biosciences (CA, USA)
Fast Immune™ EDTA Solution, 20mM, 2.5ml	BD Biosciences (CA, USA)
Paraformaldehyd 1kg	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol 96%	Merck (Darmstadt, D)
Fötales Kälber Serum, Charge 370FF, 500ml	Biochrom (Berlin, D)
Dimethylsulfoxid, 500ml	Fluka SIGMA-Aldrich (Seelze, D)
CFDA-SE Cell Tracer Kit	Vybrant Invitrogen (Karlsruhe, D)
FoxP3 Fix/Perm, Concentration and Diluent Kit	eBiosciences
Hepes Puffer 1M, 100ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)
Histopaque, 500ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)
MEM NEA 100x, 100ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)
2-Mercaptoethanol 50MM, 60ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)
PBS Dulbecco's 1x, 500ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)
PBS Dulbecco's 10x, 500ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)
Penicillin-Streptomycin, 100ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)
RPMI mit L-Glutamin, 500ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypan Blau 0.4%, 100ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)
Dynabeads, CD25 4x 10 <sup>8</sup> /ml, 5ml	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)

### II.1.1.3. Puffer, Medien und Lösungen

**Tabelle 3:** Puffer, Medien und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfriermedium	25ml FCS (inaktiviert) + 15ml RPMI + 10ml DMSO
FCS, inaktiviert	500ml FCS 30min bei 56°C im Wasserbad inaktivieren
Fix/Perm-Puffer	Fixation/Permeabilization Concentrate : Diluent = 1 : 4
PBS, unsteril	100ml 10x PBS + 900ml Aqua dest.
Perm-Puffer	10x Permeabilization Buffer : H <sub>2</sub> O = 1 : 10
PFA-Gebrauchslösung	0.5% und 2% aus 10% Stocklösung gelöst in PBS (unsteril)
PFA-Stocklösung	20g PFA in 200ml PBS lösen bei 56°C, pH 7.2-7.4 filtrieren
Zellkulturmedium	440ml RPMI + 50ml FCS + 5ml Penicillin Streptomycin + 5ml NEA + 0.2ml Mercaptoethanol
CFSE-Gebrauchslösung	0.5mg Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFDA-SE) in 90µl DMSO lösen; 1 : 20 Verdünnung mit PBS (steril)

### II.1.1.4. monoklonale Antikörper

**Tabelle 4:** monoklonale Antikörper

Spezifität	Fluoreszenzfarbe	Klon
<u>Extrazellulär</u>		
CD3	PerCP	SK7
CD4	FITC	SK3
	APC	SK3
CD25	PE-Cy7	2A3
CD127	Biotin + Strepatvidin APC-Cy7	hIL-7R-M21
CD195 (CCR5)	PE	2D7/CCR5
CD152 (CTLA4)	PE	BNI3
CD278 (ICOS)	PE	DX29
CD39	PE	TU66
<u>Intrazellulär</u>		
FoxP3	Alexa Fluor® 647	259D/C7

Es wurden die in Tabelle 4 aufgeführten monoklonalen antihumanen Antikörper zur Darstellung der Zellpopulationen verwendet. Diese sind gekoppelt an die Fluoreszenzfarbstoffe APC (Allophycocyanin), FITC (Fluoresceinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridiniumchlorophyll), APC-Cy7 und PE-Cy7. Die Antikörper wurden einheitlich vom Hersteller BD Biosciences<sup>TM</sup> (Pharmingen) bezogen.

### II.1.1.5. Native und rekombinante Proteine

**Tabelle 5:** monoklonale Antikörper

Protein	Spezifität	Konzentration	Hersteller
p17 (gag)	HIV-1	1.0 mg/ml PBS	TEBU (Columbia-Maryland, USA)
p24 (gag)	HIV-1	1.0 mg/ml PBS	TEBU (Columbia-Maryland, USA)
gp41 (env)	HIV-1	1.0 mg/ml PBS	TEBU (Columbia-Maryland, USA)
gp160 (env)	HIV-1	1.0 mg/ml PBS	TEBU (Columbia-Maryland, USA)

Native und rekombinante Proteine wurden zur *in vitro* Stimulation infizierter PBMC verwendet (Tab. 5). Zusätzlich wurde mit viralem Lysat des Cytomegalievirus (1.0mg/ml PBS) als Positivkontrolle und mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 1.0mg/ml PBS) stimuliert.

### II.1.2. Geräte und Software

**Tabelle 6:** Geräte

Bezeichnung	Hersteller
FACSTM Canto, Cell Quest Version 3.1.3	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Gefrierschrank -80°C	Kryosafe (Hamburg, D)
Hera-Cell Wärmeschrank, 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	Heraeus (Hannover, D)
Lichtmikroskop	Zeiss (Göttingen, D)
Neubauer Zählkammer	Carl Roth (Karlsruhe, D)
StrataCooler	Stratagene (Waldbronn, D)
Zentrifuge 4K15, Rotor-Nr. 11150	SIGMA Aldrich (Taufkirchen, D)
Magnetic Particle Concentrator, Dynal MPC <sup>TM</sup> -I	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, D)

Zur Auswertung und Analyse der Messungen wurde FlowJo Version 8.0 Software (TreeStar, Ashland, OR) und Prism 5 Software (GraphPad Software, San Diego, CA) verwendet. Es wurde jeweils die geeignete Software für Macintosh (Mac OS X, Version 10.6.8) herangezogen.

## **II.2. Methoden**

### **II.2.1. Patientenkohorte**

PBMC und LNMC wurden aus Blutproben bzw. Lymphknoten von HIV<sup>+</sup> Patienten isoliert. Die Patienten wurden im Ambulanzzentrum für Infektiologie (Prof. Dr. med. Jan van Lunzen) des im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE) rekrutiert. Durch enge Zusammenarbeit mit der medizinischen Hochschule Hannover (PD Dr. med. Dirk Meyer-Olson), der Universitätsklinik Köln (Prof. Dr. med. Gert Fätkenheuer), der Universitätsklinik Bonn (Prof. Dr. med. Jürgen Rockstroh) und der Universitätsklinik Frankfurt (Prof. Dr. med. Schlomo Staszewski) war es möglich die Patientenkohorte entsprechend zu erweitern. Proben für die Gruppe der Nonprogressoren (EC und LTNP) wurden vornehmlich von HIV-infizierten Probanden der NaVic („Natural Virus Controller“) Studiengruppe bezogen, welche aus Patienten besteht, die in einer detaillierten Datenbank von mehr als 6000 Individuen eines deutschen Netzwerkes von klinischen HIV-Zentren (s.o.) erfasst sind. Die Patienten wurden über den Zweck der Blutentnahme und die Studie ausführlich informiert und gaben alle ihr mündliches und schriftliches Einverständnis. Die dafür eingesetzte Einverständniserklärung wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt. Untersucht wurden PBMC von 131 HIV<sup>+</sup> Patienten und 20 gesunden Kontrollen zur Validierung der immunologischen Versuche. Zusätzlich wurden von 10 Patienten aus Lymphknoten isolierte mononukleäre Zellen analysiert.

#### ***II.2.1.1. Bestimmung der klinischen Parameter***

Die Bestimmung der klinischen Parameter erfolgte in Einrichtungen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Bestimmt wurden Viruslasten von HIV-1, Antikörper gegen HIV-1, CD4<sup>+</sup> Zahl und CD4/CD8-Ratio. Zusätzlich wurden die Patientendaten im longitudinalen Verlauf beobachtet. Dabei wurde besonderer Wert auf Therapie, Dauer der Infektion, CDC-Stadium, CD4<sup>+</sup> Nadir und die Stabilität von Viruslast und CD4<sup>+</sup> Zahl im Laufe der Jahre gelegt. Im Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene wurden die HIV-1-Antikörpertests mittels ELISA und Westernblot sowie die Bestimmung der HIV-1-Viruslasten mittels COBAS<sup>®</sup> AMPLICOR<sup>®</sup> Monitor von Roche durchgeführt. Die Bestimmung der absoluten Lymphozytenzahl wurde im Routinelabor im Institut für Immunologie mittels FACS<sup>™</sup>-Analyse durchgeführt.

## **II.2.2. Probenkonservierung und –aufbereitung**

### ***II.2.2.1. Isolierung von PBMC***

Die Isolierung und Gewinnung der PBMC erfolgte durch Zentrifugation über Dichtegradienten unter der Verwendung von CPT Mononuclear Cell Präparationsröhrchen. Diese Vacutainer, die je 8ml Natriumcitrat-Blut eines Patienten fassen, sind mit einer Gelmatrix zur Zellseparation ausgestattet und werden direkt bei 1999xg bei 20°C für 20 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugation gelangen Erythrozyten und Granulozyten durch die Gelmatrix hindurch, während sich oberhalb der Gelmatrix die Plasma- und Interphase mit Lymphozyten und Monozyten absetzen. Von der Plasmaphase wurden Plasmaproben auf 4 Cryotubes á 2ml verteilt und bei -80°C eingefroren. Die Interphase wurde im nächsten Schritt mit sterilem PBS gewaschen und zentrifugiert (430- 450xg bei 4°C für 8 Minuten). Nach einem weiteren Waschgang mit 10ml RPMI wurde das Zellpellet nun zum Zählen in 1ml warmen RPMI gelöst und mit Trypanblau angefärbt.

### ***II.2.2.2. Isolierung von LNMC***

Mononukleäre Zellen aus Lymphknoten wurden mittels Zellseparation durch ein Zellsieb isoliert und gewonnen. Die Zellen wurden dafür mit einem Skalpell aus der Kapsel des Lymphknotens geschabt und in RPMI aufgenommen. Es wurde keine Kollagenase verwendet um labile Oberflächenmoleküle nicht zu zerstören. Die Zellsuspension wurde nun durch das Zellsieb gegeben, das Filtrat wurde gewaschen und nach dem Einfrierprotokoll in II.2.2.4 kryokonserviert.

### ***II.2.2.3. Zählen von PBMC***

Die Zellzählung erfolgte nach Trypanblaufärbung. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch defekte Zellmembranen ins Zellinnere eindringen kann, dort an Zellproteine bindet und somit tote Zellen blau anfärbt. Vitale Zellen erscheinen im Mikroskop leuchtend hell. Für die Färbung wurden 10µl der in 1ml warmen RPMI aufgenommenen Zellen mit 90µl Trypanblau 1:10 verdünnt und auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Insgesamt wurden 4x16 Felder ausgezählt und anschließend der Mittelwert berechnet. Durch Verrechnung von Höhe und Tiefe der Neubauerkammer sowie die Verdünnung der zu zählenden Zellen konnte anhand der Formel ( $MW \times 10^4 \times 10^1 \times 10^1$ ) die Gesamtzellzahl berechnet werden. Durch Verdünnung konnte die gewünschte Zellzahl nun eingestellt werden.

### ***II.2.2.4. Einfrieren von PBMC***

Zum Einfrieren frischer PBMC wurde nach erfolgter Zellzählung das RPMI bei 450xg bei 4°C für 8 Minuten abzentrifugiert. Ein bereits vorgekühlter Stratacooler wurde mit je 5 Cryotubes á 2ml

bereitgestellt. Das Zellpellet wurde in je 5ml Einfriermedium und RPMI aufgenommen und resuspendiert. Je 2ml der Zellsuspension wurden in die gekühlten Cryotubes überführt und bei -80°C eingefroren, um nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff umgelagert zu werden. Das sich im Einfriermedium befindende DMSO wirkt toxisch auf Zellen. Aus diesem Grund musste schnell und auf Eis bzw. mit vorgekühlten Stratacooler und Cryotubes gearbeitet werden.

#### ***II.2.2.5. Probenaufbereitung tiefgefrorener PBMC***

Zur Aufbereitung tiefgefrorener Zellen wurden die Cryotubes für eine Minute in einem Becher mit 37°C warmen Wasser zum Antauen geschwenkt. Die in RPMI, DMSO und FCS eingefrorenen PBMC wurden anschließend direkt im Cryotube durch Resuspension mit RPMI aufgetaut und in ein 50ml Falcon Tube mit 45ml RPMI überführt. Nach Zentrifugation (430-450xg bei 4°C für 8 Minuten) wurde das Zellpellet in 500µl PBS gelöst. Im nächsten Schritt wurde zur Beseitigung von Verklebungen und DNA-Fragmenten für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 50µl EDTA inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang wurden die Zellen in 1ml RPMI aufgenommen und nach Trypanblaufärbung gezählt.

### **II.2.3. Immunophänotypische Analysen**

Die Anfärbung der PBMC zur Phänotypisierung und Frequenzierung der T<sub>regs</sub> erfolgte aus cryokonservierten Proben. Das zur Verfügung stehende Zytometer FACS<sup>TM</sup> Canto konnte maximal 6 Farben gleichzeitig messen. Daher wurde zunächst als Basis folgendes Panel aufgestellt: CD3-PerCP, CD4-FITC, CD25-PE-Cy7, CD127-Biotin-SA-APC-Cy7 und FoxP3-APC. Die verbleibende sechste Farbe (PE) sollte jeweils für die ko-exprimierten funktionellen Marker (CCR5, CTLA4, ICOS und CD39) verwendet werden. So wurden letztendlich pro Blutprobe 4 FACS-Tubes gefärbt.

#### ***II.2.3.1. Oberflächenfärbung***

Für die Färbung der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD25, CCR5, CTLA4, ICOS und CD39 wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte Antikörper verwendet (Tab. 5). Zur Anfärbung von CD127 wurde ein biotinylierter Antikörper verwendet, der mit an Streptavidin gekoppeltem APC-Cy7 fluoreszent gemacht wurde. Die zu färbenden Proben wurden wie in II.2.2.5 beschrieben aufbereitet. Die in 1ml RPMI gelösten Zellen wurden gewaschen, abzentrifugiert (430-450xg bei 4°C für 8 Minuten) und in 400µl PBS gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 4 FACS-Tubes verteilt (100µl/Tube), die den Antikörpermastermix aus 7.5µl CD3 PerCP, 7.5µl CD4 FITC, 5µl CD25 PE-Cy7, 10µl CD127 Biotin und je 7.5µl eines PE-markierten Antikörpers (CCR5,

CTLA4, ICOS und CD39) enthielten. Die Zellsuspension wurde nun für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch einen weiteren Waschgang beseitigt. Im nächsten Schritt wurden 5µl Streptavidin-APC-Cy7 hinzugegeben, um das biotinylierte CD127 zu binden und es so fluoreszent zu machen. Nach weiterer Inkubation für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln, wurde nun auch das überschüssige Streptavidin-APC-Cy7 abgewaschen und die Zellsuspension für die anschließende intrazelluläre Färbung von FoxP3 in 1ml frisch zubereitetem Fix/Perm-Puffer resuspendiert und für weitere 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

### **II.2.3.2. Intrazelluläre FoxP3-Färbung**

Die in 1ml Fix/Perm-Puffer resuspendierten PBMC wurden nach der erfolgten Inkubation erneut gewaschen und bei 850xg (erhöhte Drehzahl!) für 8 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 2ml 1x Perm-Puffer gewaschen und erneut mit erhöhter Drehzahl zentrifugiert. Die erhöhte Drehzahl zusammen mit den Puffern diente dazu, die Zellen für die folgende intrazelluläre Färbung zu fixieren und die Zellmembran zu permeabilisieren. Das Zellpellet wurde nun in 100µl PBS gelöst und 10µl FoxP3-APC dazugegeben. Die Suspension musste für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubieren. Im nächsten Schritt wurde der überschüssige Antikörper durch einen doppelten Waschgang mit je 2ml 1x Perm-Puffer bereinigt. Das Zellpellet wurde mit 300µl 0,5%igen PFA fixiert. Die Proben konnten nun direkt am FACS Canto™ Flow Zytometer gemessen werden.

### **II.2.4. Funktionelle Assays**

Um im Anschluss an die Analyse der Frequenz und Phänotypisierung der T<sub>regs</sub> die Aktivität und Funktionalität dieser Population darzustellen, wurden frische PBMC von diversen Patienten mit funktionellen Assays analysiert. Anhand eines Proliferationsassays mit CFSE-Markierung der Zellen wurde die Zellproliferation nach *in vitro* Stimulation mit unterschiedlichen HIV-Antigenen dargestellt. Dabei wurde die HIV-spezifische Proliferation mit und ohne Depletion der T<sub>reg</sub>-Population untersucht.

#### **II.2.4.1 Depletion der T<sub>reg</sub> - Population**

Die Depletion der T<sub>regs</sub> erfolgte vor der Färbung mit CFSE. Dafür wurden frische PBMC verwendet, die wie in II.2.2.1 beschrieben, aufgearbeitet worden waren. Nach erfolgter Zellzählung wurde die Zellsuspension auf 2 Tubes aufgeteilt. Ein Tube wurde beiseite gestellt, während die Zellen aus dem anderen Tube mittels magnetischer Antikörper gegen CD25 wie folgt depletiert wurden. Das Zellpellet musste dafür gelöst in 1ml PBS vorliegen. Für die Depletion sollten

mindestens  $4 \times 10^7$  Zellen/ml vorliegen, da teilweise nahezu ein Drittel der Zellen verloren ging. Für das weitere Vorgehen wurden die für die Depletion der  $T_{\text{regs}}$  verwendeten CD25 DynaBeads zunächst gewaschen. Bei einer Zellzahl von  $4 \times 10^7$  Zellen/ml wurden nach Protokoll 50  $\mu\text{l}$  DynaBeads eingesetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln kam das Tube mit der Zellsuspension für 2 Minuten in einen Magnet, sodass die DynaBeads, an welche nun die  $\text{CD}25^{\text{high}}$ -Zellen gebunden waren, magnetisch angezogen wurden. Die somit depletierte restliche Zellsuspension wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Tube überführt. Zum Nachweis der Depletion der  $\text{CD}25^{\text{high}}$ -Zellen wurden vor und nach der Depletion Oberflächenfärbungen nach Protokoll II.2.3.1. durchgeführt.

#### **II.2.4.2 CFSE - Proliferationsassay**

Mithilfe des CFSE-Proliferationsassays kann die T-Zellproliferation gegen verschiedene Proteine nachgewiesen werden. CFDA-SE ist ein farbloser lipophiler Ester der von Zellen aufgenommen und durch die Spaltung von zellulären Esterasen als fluoreszierendes Reaktionsprodukt CFSE in den Zellen eingelagert wird. Bei jeder Zellteilung wird CFSE in gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben. Die Intensität der Fluoreszenz verringert sich folglich mit jeder Zellteilung. Die Teilungsrate kann dementsprechend durchflusszytometrisch ermittelt werden. Für die Färbung wurden die zu untersuchenden Zellen in 1ml PBS resuspendiert. 2,5  $\mu\text{l}$  der frisch zubereiteten CFDA-SE Gebrauchslösung wurde hinzugegeben und anschließend im Dunkeln unter gelegentlichem Schwenken für 4 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Resuspension mit 9ml Zellkulturmedium gestoppt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS wurde das Zellpellet mit Zellkulturmedium auf die benötigte Menge aufgefüllt. Die Zellen wurden auf 24-well Platten ausplattiert. Pro well wurde 1ml Zellsuspension mit mindestens  $2 \times 10^6$  Zellen/ml ausplattiert und mit 1ml Zellkulturmedium aufgefüllt. Für die Stimulation wurden HIV-1 Proteine (gp41, gp160, p24, p17) und das virale Lysat des Zytomegalievirus verwendet, zusätzlich wurde je eine Negativkontrolle (ohne Stimulation) und eine Positivkontrolle (mit SEB-Stimulation) durchgeführt. Es wurden je 1.5  $\mu\text{l}$  der in Tabelle 5 dargestellten Proteine eingesetzt. Die 24-well Platte kam anschließend für 7 Tage in den Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ . An Tag 7 erfolgte die Messung und Auswertung. Dafür wurden die Zellen nach Protokoll II.2.3.1 gefärbt. Gemessen und ausgewertet wurde am FACS Canto<sup>TM</sup> Flowzytometer.

## II.2.5 Auswertung

### II.2.5.1. Multicolor Durchflusszytometrie

Die Messung und Auswertung der Färbungen erfolgte mittels Multicolor Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie basiert auf der Messung der physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in Suspension auf Grundlagen der Fluoreszenz und Streulichteigenschaften. Dabei wird die zu untersuchende Zellsuspension über eine Kapillare der Trägerflüssigkeit des Zytometers zugeführt. Aufgrund der höheren Geschwindigkeit der Trägerflüssigkeit vereinzeln die Zellen, werden am Laser vorbeigeführt und emittieren Streulicht, das Zellgröße und Struktur widerspiegelt. Die Vorwärtsstreuung („Forward Scatter“) entspricht dabei der Zellgröße und die Seitwärtsstreuung („Side Scatter“) der Granularität der Zelle. Mit fluoreszierenden Antikörpern können Oberflächenrezeptoren oder intrazelluläre Moleküle markiert werden. Als Farbstoffe werden APC (Allophycocyanin), FITC (Fluorescein -5-isothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und PerCP (Peridiniumchlorophyll-Protein), PE-Cy7 und APC-Cy7 verwendet. Die Unterscheidung der Farbstoffe durch das Gerät erfolgt anhand ihrer unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsmaxima. Die Signale werden über den Photomultiplier verstärkt, von Detektoren gemessen und auf den Computer übertragen. Auf dem Computer können so die Zellen anhand ihrer Bindung an die fluoreszierenden Antikörper in unterschiedlichen Plots oder Histogrammen dargestellt werden. Die Plots wurden mit FlowJo bearbeitet und anschließend mit GraphPads Prism ausgewertet.

### II.2.5.2. Statistische Analysen

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden mit FlowJo analysiert und statistische Analysen wurden mit Prism durchgeführt. Zur Überprüfung der Normalverteilung der metrischen Daten wurde der Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. Aufgrund der vorliegenden Normalverteilung nach Gauss wurde die statistische Signifikanz mit parametrischen Tests analysiert. Verwendet wurde der *t*-Test für unabhängige Stichproben sowie für abhängige Stichproben bei paarigen Vergleichen und der Rangkorrelations-Koeffizient nach Spearman für bivariate Korrelationsanalysen. Anschließend erfolgte die univariate Varianzanalyse (ANOVA) mithilfe des F-Tests. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0.05$ . Die Bonferroni-Korrektur wurde durchgeführt zur Verrechnung der multiplen paarweisen Vergleiche und damit zur Minderung des Fehlers erster Art. Nach Bonferroni-Korrektur befand sich das Level der statistischen Signifikanz bei  $\alpha_{\text{Bonf}} = 0.001$ <sup>14</sup>.

### III. Ergebnisse

#### III.1. Charakteristika der Studienkohorte

Das Ziel dieser Arbeit, die Frequenz und den Phänotyp der regulatorischen T-Zellen bei der HIV-1 Infektion zu messen, sollte mithilfe einer großen und gut charakterisierten Kohorte umgesetzt werden. Diese sollte Patienten in unterschiedlichen Stadien der chronischen Erkrankung beinhalten sowie eine große Anzahl an Individuen, die ohne HAART eine spontane Kontrolle der Virusreplikation erreicht haben. Ausgeschlossen aus der Studienkohorte wurden Patienten mit einer akuten entzündlichen Erkrankung (CRP > 5 mg/l) sowie solche, die positive serologische Marker für eine mögliche begleitende chronische Hepatitis B oder C Infektion aufwiesen. Insgesamt wurden 131 HIV<sup>+</sup> und 20 gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen. Die klinischen und immunologischen Charakteristika der Kohorte werden in Tabelle 6 detailliert aufgeführt. Um Korrelationen zwischen den immunologischen Ergebnissen und dem klinischen Krankheitsprogress der HIV-Infektion aufstellen zu können, wurde die Kohorte wie folgt nach weltweit anerkannten Kriterien eingeteilt<sup>27,85</sup>:

- Avirämische Probanden unter HAART: n=31, >1 Jahr HAART, VL < 50 Kopien/ml, CD4= 208 Zellen/ $\mu$ l [95-906]
- Virämische Probanden: n=43, VL= 50-1x10<sup>5</sup> Kopien/ml, CD4= 523 Zellen/ $\mu$ l [12-1023]
- Progressoren: n=21, CDC = B/C, VL > 1x10<sup>5</sup> Kopien/ml; CD4= 105 Zellen/ $\mu$ l [3-544]
- 36 klinische Nonprogressoren wurden weiter unterteilt in 2 Gruppen: 15 Long Term Non Progressor (LTNP) mit CDC=A, stabiler VL < 2000 Kopien/ml und CD4 Count > 500 Zellen/ $\mu$ l, mehr als 5 Jahre ohne Therapie sowie 21 Elite Controller (EC) mit CDC=A, einem stabilen CD4 Count und Viruslasten unter der Nachweisgrenze (VL < 50 Kopien/ml) ohne Therapie.

#### III.2. Durchflusszytometrische Erfassung der T<sub>regs</sub>

Die Abgrenzung der T<sub>regs</sub> von gewöhnlichen aktivierten CD4<sup>+</sup>Zellen, also der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Population erfolgte mittels Antikörperfärbung und anschließender Durchflusszytometrie. Bei der Auswahl der Marker wurde die aktuelle Studienlage herangezogen. Diese empfiehlt einerseits den intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3 als herausragenden Marker zur Charakterisierung der T<sub>regs</sub>, weist andererseits ebenso auf den extrazellulären -und somit einfacher darzustellenden- IL7-Rezeptor, CD127, als möglichen Marker für T<sub>regs</sub> hin<sup>61,93,119</sup>.

**Tabelle 6:** Klinische, immunologische und virologische Charakteristika der Patientenkohorte

Einteilung	Geschlecht <sup>a</sup>	Alter <sup>b</sup> (Jahre)	CD4 <sup>+</sup> Zahl <sup>b</sup> (Zellen/ $\mu$ l)	Viruslast <sup>b</sup> (Kopien/ml)	Therapie <sup>c</sup> (Anzahl)
HAART > 1 Jahr (n = 31)	27 M, 4 W	50 (33-73)	208 (95-906)	<50	HAART 31
VL 50-10 <sup>5</sup> Kopien/ml (n = 43)	37 M, 6 W	42 (19-78)	523 (12-1023)	1.5 x 10 <sup>4</sup> (84-7.9 x 10 <sup>4</sup> )	naiv 28; HAART 8; IoT 7
Progressoren (n = 21)	19 M, 2 W	39 (23-72)	105 (3-544)	2.9 x 10 <sup>5</sup> (1 x 10 <sup>5</sup> - 3 x 10 <sup>6</sup> )	naiv 16; HAART 1; IoT 5
Nonprogressoren (n = 36)	22 M, 14 W	44 (23-81)	689 (265-1622)	1055 (<50-8600)	naiv 36; LTNP 15; EC 21

<sup>a</sup>M männlich; W weiblich

<sup>b</sup>Median (range)

<sup>c</sup>LTNP Long-Term Nonprogressor (>5 Jahre stabile Viruslast und CD4<sup>+</sup>Zahl ohne Therapie); EC Elite Controller (VL <50 Kopien/ml, CD4<sup>+</sup>Zahl stabil ohne Therapie)

Um die Population der regulatorischen T-Zellen so genau wie möglich darzustellen und zu definieren, wurden beide Marker herangezogen und analysiert. Dabei zeigte sich eine fast vollständige Übereinstimmung zwischen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Population und der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Population (Abb. 3A/B). Im Gegensatz zu erst kürzlich veröffentlichten Daten konnten wir diese Korrelation sowohl in avirämischen als auch in virämischen Patientengruppen nachweisen<sup>28</sup>.

### III.3. Relativer Anstieg und absoluter Rückgang der T<sub>reg</sub> Frequenz mit der Krankheitsprogression.

Insgesamt konnten wir einen signifikanten Anstieg der Frequenz der T<sub>regs</sub> innerhalb des CD4<sup>+</sup> Kompartiments der gesamten HIV<sup>+</sup> Kohorte (7.4%  $\pm$  5.2%) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (3.2%  $\pm$  1.7%) beobachten. Zudem zeigten sich auch signifikante Unterschiede in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums (Abb. 4A-G). So wiesen Patienten mit hoher HIV-Virämie und zudem progredientem Krankheitsverlauf eine signifikante Erhöhung der relativen T<sub>reg</sub>-Frequenz auf (p<0.0001; 11.9%  $\pm$  8.5%). Interessanterweise zeigten sowohl LTNP (3.9%  $\pm$  1.5%) als auch EC (4.1%  $\pm$  1.5%) relative T<sub>reg</sub>-Frequenzen, die vergleichbar mit denen der gesunden Kontrollgruppe waren (p>0.05). Patienten, die für mehr als 1 Jahr erfolgreich mit antiretroviraler

Medikation therapiert werden konnten (VL <50 Kopien/ml), wiesen immer noch eine im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe leicht erhöhte relative T<sub>reg</sub>-Frequenz auf (p<0.0001), jedoch signifikant niedriger als HIV-Progressoren (p<0.0001; 7.8% ± 3.5%) (Abb. 4B). Auch ließ sich eine positive Korrelation zwischen relativer T<sub>reg</sub>-Frequenz und der HIV VL (p<0.0001, r<sub>s</sub>= 0.54) darstellen, ebenso wie eine umgekehrte Korrelation zur CD4<sup>+</sup>Zahl (p<0.0001, r<sub>s</sub>= -0.56) (Abb. 4C/D). Interessanterweise wiesen regulatorische T-Zellen von HIV-infizierten Patienten unabhängig von dem klinischen Stadium der Erkrankung eine erhöhte Expression an FoxP3 auf (gemessen als MFI, „mean fluorescence intensity“), wobei diese MFI auch positiv mit der VL und umgekehrt proportional mit der CD4<sup>+</sup>Zahl korrelierte (Abb. 5A-C). Dabei stellt sich die Frage, ob eine erhöhte FoxP3-Expression (MFI) mit der T<sub>reg</sub>-Aktivierung zusammenhängt<sup>17,102</sup>. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Ergebnisse unserer funktionellen Untersuchungen. Eine erhöhte Proliferationsrate von HIV-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen nach *in vitro* Depletion der CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>high</sup> T<sub>regs</sub> ließ sich für Patienten mit progressiver HIV-Erkrankung (relative T<sub>reg</sub>-Frequenz 10.5%) nachweisen (ohne Depletion: 20.4%; nach CD25<sup>high</sup>-Depletion: 47.4%). Die CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen bei Elite Controllern dagegen zeigten bei einer relativen T<sub>reg</sub>-Frequenz von 0.6% unabhängig von der Depletion der CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>high</sup> T<sub>regs</sub> eine hohe HIV-spezifische Proliferationsrate (ohne Depletion: 90.6%; nach CD25<sup>high</sup>-Depletion: 92.6%) (Abb. 6A-C). Da die CD4<sup>+</sup>Zahl bei der Mehrheit der HIV-infizierten Patienten im Verlauf der Erkrankung signifikant abnimmt<sup>2,30</sup>, adjustierten wir im nächsten Schritt, wie zuvor von Cao *et al* (2009) beschrieben<sup>16</sup>, den Anteil der T<sub>regs</sub> an den gesamten CD3<sup>+</sup>T-Zellen an die CD4<sup>+</sup>Zahl (Zellen/μl), um die „absolute“ Anzahl der T<sub>regs</sub> im peripheren Blut zu erhalten. Die absolute Anzahl an T<sub>regs</sub> im peripheren Blut unserer HIV<sup>+</sup>Kohorte (p<0.0001; 8.8 ± 8.3 T<sub>regs</sub>/μl) zeigte sich deutlich erniedrigt, dies gilt auch für die Subgruppe der LTNP (p<0.0001; 11.9 ± 11.56 T<sub>regs</sub>/μl). Allein in der Gruppe der Elite Controller konnten wir absolute T<sub>reg</sub>-Zahlen vergleichbar mit denen der gesunden Kontrollgruppe (p>0.05; 32 ± 14 T<sub>regs</sub>/μl) finden (Abb. 4E). Die absolute Anzahl an T<sub>regs</sub> korrelierte positiv mit der absoluten CD4<sup>+</sup>Zahl (p<0.0001; r<sub>s</sub>= 0.70) und umgekehrt mit der HIV VL (p<0.0001; r<sub>s</sub>= -0.52) (Abb. 4F/G). Interessanterweise konnten wir hier eine signifikante Korrelation der T-Zellaktivierung, gemessen anhand der HLA-DR-Expression, von non-T<sub>regs</sub> (alle CD4<sup>+</sup>Zellen ausgenommen der T<sub>regs</sub>) und dem Verlust der absoluten T<sub>reg</sub>-Zahl vermerken (p<0.0006; r<sub>s</sub>= -0.46) (Abb. 7F). In der Gruppe der avirämischen Patienten unter HAART konnten wir lediglich verglichen mit den HIV-Progressoren leicht erhöhte absolute T<sub>reg</sub>-Zahlen beobachten (p>0.05; 11.6 ± 7.2 T<sub>regs</sub>/μl), die allerdings keine statistische Signifikanz erreichten. Nach Einleitung der Therapie scheinen sich die absoluten T<sub>reg</sub>-Zahlen also nicht komplett zu erholen. Die Abweichung zwischen

dem relativen Anteil und der absoluten Anzahl der regulatorischen T-Zellen scheint von Relevanz zu sein und möglicherweise zu helfen, die widersprüchlichen Ergebnisse anderer Studien hinsichtlich der Rolle der  $T_{\text{regs}}$  in der HIV-Infektion zu erklären<sup>1,17,20,31,105,101,115</sup>. Unsere Daten weisen indirekt darauf hin, dass  $T_{\text{regs}}$  insgesamt langsamer im Krankheitsverlauf abzunehmen scheinen als (Gedächtnis-)  $CD4^+$  T-Zellen.

#### **III.4. Phänotypische Charakterisierung der $T_{\text{regs}}$ : Die Expression von CD39 auf $T_{\text{regs}}$ korreliert mit dem Krankheitsprogress der HIV-Infektion.**

Bis heute wurde in verschiedenen Studien die Gesamtpopulation der regulatorischen T-Zellen bei  $HIV^+$  Patienten charakterisiert, jedoch haben nur wenige systematisch und umfassend die Expression weiterer Moleküle auf der Oberfläche der  $T_{\text{regs}}$  analysiert<sup>51,100,103,15</sup>. In dieser Arbeit, konzentrierten wir uns gezielt auf die Expression von drei Oberflächenmarkern, welche eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des adaptiven Armes der Immunantwort und in der Funktion der  $T_{\text{regs}}$  zu spielen scheinen. Dabei handelt es sich um zwei Mitglieder der CD28-Rezeptorfamilie, das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA-4) und den induzierbaren T-Zellkostimulator (ICOS), sowie CD39, ein Mitglied der E-NTPDasen (Ectonucleosid Triphosphat Diphosphohydrolasen). Die Bindung von CTLA-4 scheint die T-Zellaktivierung zu unterdrücken durch Reduktion der IL-2 Produktion und Blockierung des Zellzyklus<sup>53</sup>, ICOS soll die Induktion von IL-10 stimulieren<sup>55</sup> und CD39 wird vermehrt mit suppressiven immunmodulatorischen Funktionen durch die Spaltung von pro-inflammatorischem ATP und der Produktion von anti-inflammatorischem Adenosin in Verbindung gebracht<sup>15</sup>. In unserer Studie konnten wir im Vergleich zu konventionellen  $CD4^+$  T-Zellen höhere Level der Oberflächenexpression dieser Moleküle auf regulatorischen T-Zellen beobachten unabhängig vom Stadium der HIV-Infektion (Abb. 8A/C, Abb. 9B). Auch ließ sich ein signifikanter Anstieg der Level von CTLA-4 ( $9.2\% \pm 8.4\%$ ;  $p < 0.0007$ ), ICOS ( $21.6\% \pm 16.3\%$ ;  $p < 0.0002$ ) und CD39 ( $46.5\% \pm 20.2\%$ ;  $p < 0.0011$ ) auf  $T_{\text{regs}}$  der  $HIV^+$  Probanden verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe (CTLA-4:  $2.9\% \pm 2.0\%$ ; ICOS:  $9.9\% \pm 6.2\%$ ; CD39:  $30.5\% \pm 17.0\%$ ) nachweisen. Einen Zusammenhang der Expression von CTLA-4 und ICOS auf  $T_{\text{regs}}$  mit der HIV-Viruslast oder der  $CD4^+$ Zahl in HIV-infizierten Patienten konnten wir nicht beobachten. Jedoch unterschieden sich die Expressionslevel hinsichtlich des Krankheitsstadiums, so zeigten  $T_{\text{regs}}$  der Subgruppe der Elite Controller erhöhte Level von CTLA-4 und ICOS verglichen mit den Progressoren (ICOS:  $31.9\% \pm 23.0\%$ ,  $p < 0.0314$ ; CTLA-4:  $15.9\% \pm 7.8\%$ ,  $p < 0.0043$ ) (Abb. 8B/D), auch wenn diese Trends keine statistische

Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur erreichten. Wegen einer begrenzten Anzahl von Proben war es für uns lediglich möglich diese Marker in einer Minderheit der HIV-Nonprogressoren anzufärben. Diese eingeschränkten Analysen zeigen vergleichbare Level der CTLA-4- und ICOS-Expression wie bei Elite Controllern. Wir untersuchten zusätzlich noch die Oberflächenexpression des viralen Korezeptors CCR5 um die Infektionsanfälligkeit regulatorischer T-Zellen mit HIV beurteilen zu können. In der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich eine leichte Erhöhung der Expression von CCR5 auf T<sub>regs</sub> im Vergleich mit anderen CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen. Insgesamt fanden wir eine signifikante Induktion der CCR5-Expression auf T<sub>regs</sub> in HIV-infizierten Patienten (10.3% ± 7.6%; p<0.0091) verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe (5.1% ± 3.3%), jedoch ließ sich kein Zusammenhang mit der HIV-Viruslast nachweisen (Abb. 8E/F)). Interessanterweise zeigten die Probanden der Subgruppe der Elite Controller die höchsten Level an CCR5 (19.4% ± 7.7%), und unterschieden sich damit signifikant von den HIV-Progressoren (p<0.0001). Es ist gut vorstellbar, dass die Anreicherung von CCR5<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in Elite Controllern lediglich eine Folge der supprimierten Infektion ist. Man sollte jedoch auch bedenken, dass CCR5 als „Homing Faktor“ die Migration der T<sub>regs</sub> ins Gewebe beeinflussen kann, was möglicherweise zur viralen Kontrolle in diesen Patienten beiträgt. Von besonderem Interesse für uns war die Oberflächenexpression des CD39-Moleküls auf T<sub>regs</sub>, da diese von dem Expressionsmuster der anderen Marker (ICOS, CTLA-4 und CCR5) abwich. Auch hier beobachteten wir einen signifikanten Anstieg der Expression auf T<sub>regs</sub> bei HIV-infizierten Patienten (p<0.0001). Im Gegensatz zu der Expression der anderen Marker jedoch fanden wir eine starke Assoziation zwischen der Induktion von CD39 mit der Krankheitsprogression. So korrelierte die CD39-Expression umgekehrt mit der CD4<sup>+</sup> Zahl (p<0.0003; r<sub>s</sub>= -0.38) und direkt mit der HIV VL (p<0.0003; r<sub>s</sub>= 0.41) (Abb. 9D-F). Interessanterweise zeigte sich in unseren Experimenten eine streng auf T<sub>regs</sub> beschränkte Expression von CD39. So konnten wir auf der Oberfläche von non-T<sub>regs</sub> nur eine sehr niedrige Expression von CD39 nachweisen (Abb. 9A/B). Übereinstimmend mit den Daten von Borsellino *et al* (2007) beobachteten wir eine direkte Korrelation zwischen der CD39-Expression und dem Aktivierungsstatus der regulatorischen T-Zellen, ermittelt anhand der HLA-DR und Ki67-Expression<sup>15</sup>. Bis jetzt gibt es kaum veröffentlichte Daten über die Funktion CD39<sup>+</sup> T-Zellen. Um diese zu untersuchen, sortierte unsere Arbeitsgruppe CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC gesunder Probanden anhand ihrer Expression von CD25 und/oder CD39 und führten anschließend Proliferationsassays mit CFSE-gefärbten PBMC und jeweils gesorteten CD39<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>/CD39<sup>-</sup>CD25<sup>high</sup> und CD39<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>/CD39<sup>-</sup>CD25<sup>low</sup> Zellen durch. In diesen Experimenten zeigte sich, dass die Fähigkeit

der Suppression der Proliferation von PBMC auf die CD39<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Zellen begrenzt zu sein scheint (Daten nicht abgebildet).

### III.5. Erhöhte relative Frequenzen an T<sub>regs</sub> in lymphatischem Gewebe verglichen mit peripherem Blut von HIV<sup>+</sup> Patienten.

Für unsere Untersuchungen hatten wir die Möglichkeit die Frequenzen der T<sub>regs</sub> im peripheren Blut mit jeweils korrespondierenden Proben von Lymphknoten zu vergleichen, welche zu einem frühen Zeitpunkt der HIV-Infektion von 10 Patienten, die zuvor in eine STI Kohorte („sexually transmitted infection“) eingeschrieben waren, gesammelt worden waren (Tab. 7).

**Tabelle 7:** Klinische Charakteristika der Patienten der Lymphknotenproben

Charakteristika	Werte
Geschlecht <sup>a</sup>	10 M, 0 W
Alter <sup>b</sup> (Jahre)	53 (33-78)
Viruslast <sup>b</sup> (Kopien/ml)	<50 (<50-9500)
CD4 <sup>+</sup> Zahl <sup>b</sup> (Zellen/ $\mu$ l)	418 (140-1691)
Therapie <sup>c</sup>	HAART

<sup>a</sup>M männlich, W weiblich

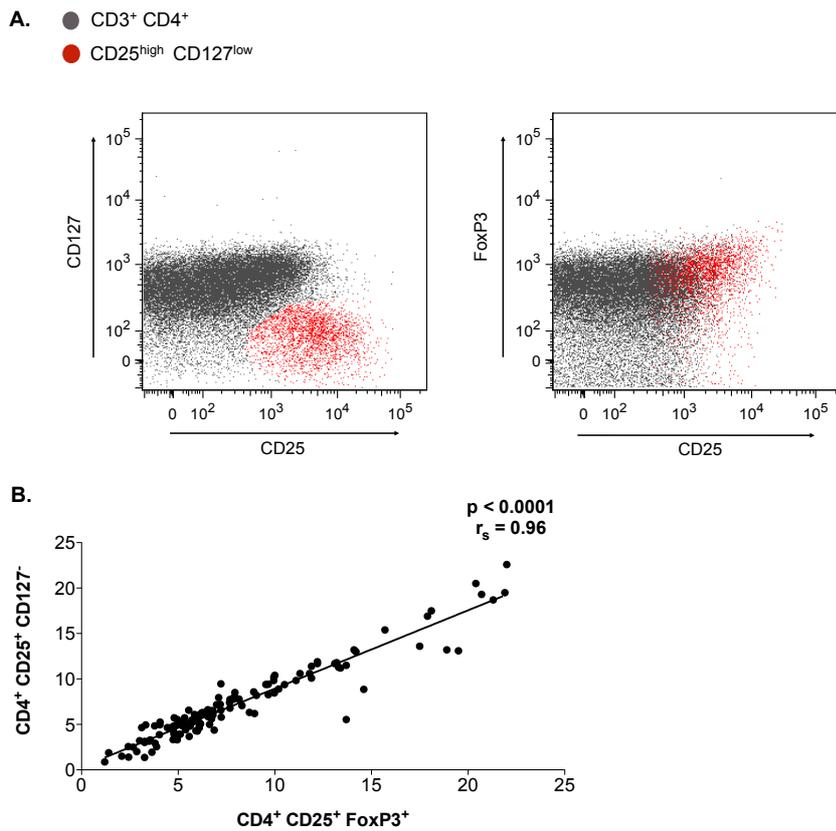
<sup>b</sup>Median (range)

<sup>c</sup>Daten von 3 Patienten fehlen

Wir fanden signifikant höhere relative T<sub>reg</sub>-Frequenzen ( $10.8\% \pm 3.1\%$ ) und FoxP3 MFI ( $1514 \pm 272$ ) in den Lymphknoten verglichen mit PBMC (T<sub>regs</sub>:  $7.6\% \pm 3.0\%$ ,  $p < 0.0028$ ; FoxP3 MFI:  $1095 \pm 199$ ,  $p < 0.0001$ ) (Abb. 10A-C). Diese ersten Analysen sind noch limitiert, da wir keine passenden LNMC („lymph node mononuclear cells“) der gesunden Kontrollen zur Verfügung hatten. Jedoch zeigen diese gravierenden Unterschiede bei HIV<sup>+</sup> Patienten, wie wichtig es für weitere Studien der T<sub>regs</sub> ist lymphatisches und anderes Gewebe näher zu untersuchen. Detailliertere Analysen der Kinetik, Dynamik, des Phänotyps und der Gewebeverteilung dieser Zellen im Verlauf der unbehandelten HIV- Infektion und unter Therapie sollten durchgeführt werden<sup>79</sup>.

### **III.6. Longitudinale Untersuchungen der T<sub>regs</sub> in der HIV-Infektion und des Einflusses der antiretroviralen Therapie.**

Um den Einfluss der antiretroviralen Therapie auf die Frequenz und den Phänotyp der regulatorischen T-Zellen zu determinieren, untersuchten wir PBMC von 7 Patienten vor und mehr als 1 Jahr nach Beginn der antiretroviralen Therapie mit erfolgreicher Suppression der Virämie, (Abb. 11A-H). Wie erwartet korrelierten steigende Zahlen konventioneller CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $p < 0.0064$ ) mit einem Abfall der relativen T<sub>reg</sub>-Frequenz (naiv:  $16.5\% \pm 5.5\%$ ; nach  $>1$  Jahr HAART:  $7.9\% \pm 3.0\%$ ,  $p < 0.0044$ ). Ebenso konnten wir einen signifikanten Anstieg der absoluten T<sub>reg</sub>-Zahlen nach HAART beobachten (naiv:  $3.6 \pm 2.7$  Zellen/ $\mu$ l, nach  $>1$  Jahr HAART:  $24.2 \pm 13.0$  Zellen/ $\mu$ l;  $p < 0.0031$ ). Die Oberflächenexpression von CTLA-4, ICOS, CCR5 und CD39 auf T<sub>regs</sub> zeigte keinen Abfall nach Initiierung der HAART. Daher lässt sich lediglich vermuten, dass diese phänotypischen Veränderungen irreversibel sind, oder sich nur langsam in Abwesenheit der Virämie zurückbilden.



**Abbildung 3:** Durchflusszytometrische Erfassung von T<sub>regs</sub>. (A) Von der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Population wurden CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Zellen gated (rot). Im Overlay zeigt sich eine Konkordanz mit den CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Zellen. (B) Unabhängig vom Infektionsstadium der HIV<sup>+</sup> Patienten zeigt sich eine eindeutig positive Korrelation der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> und der CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Population.

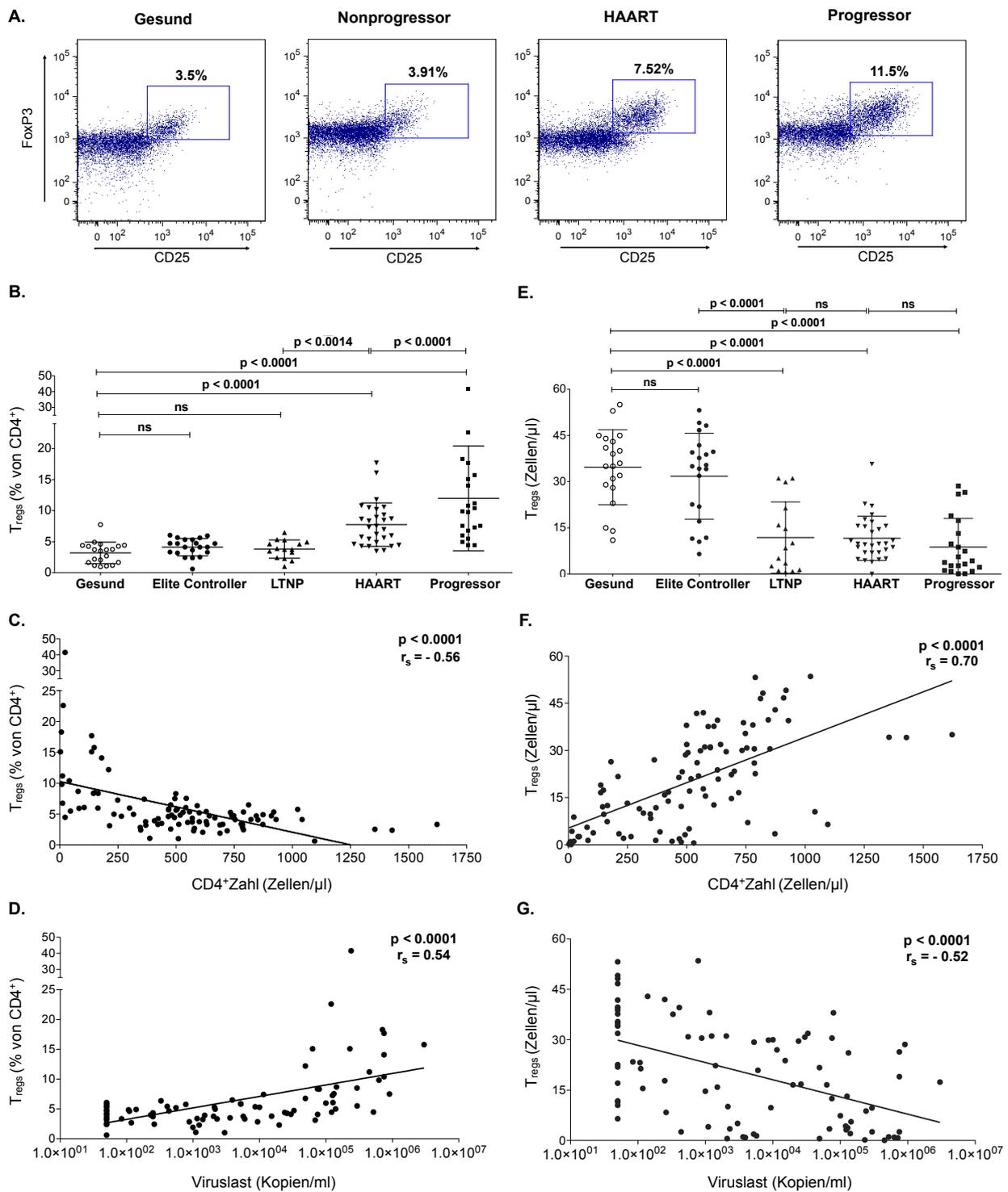
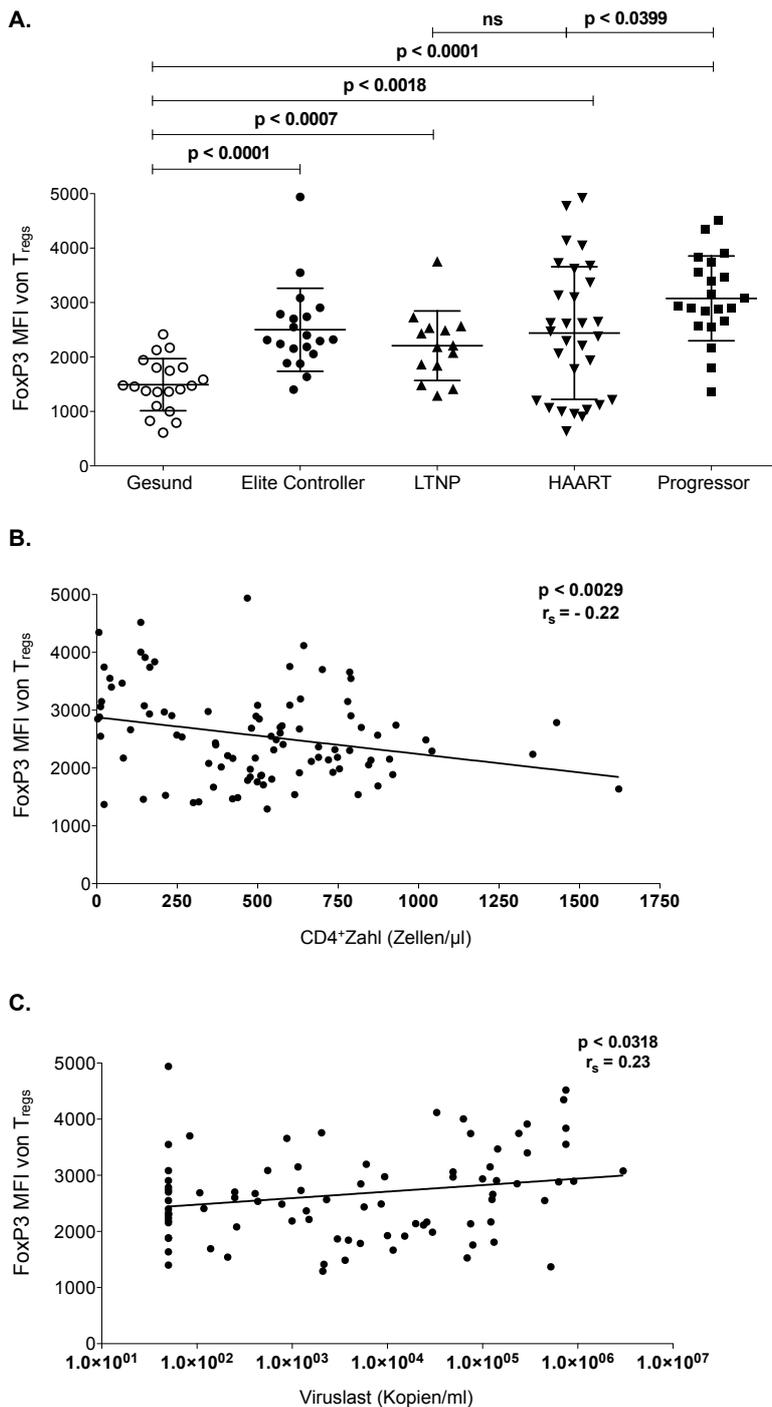


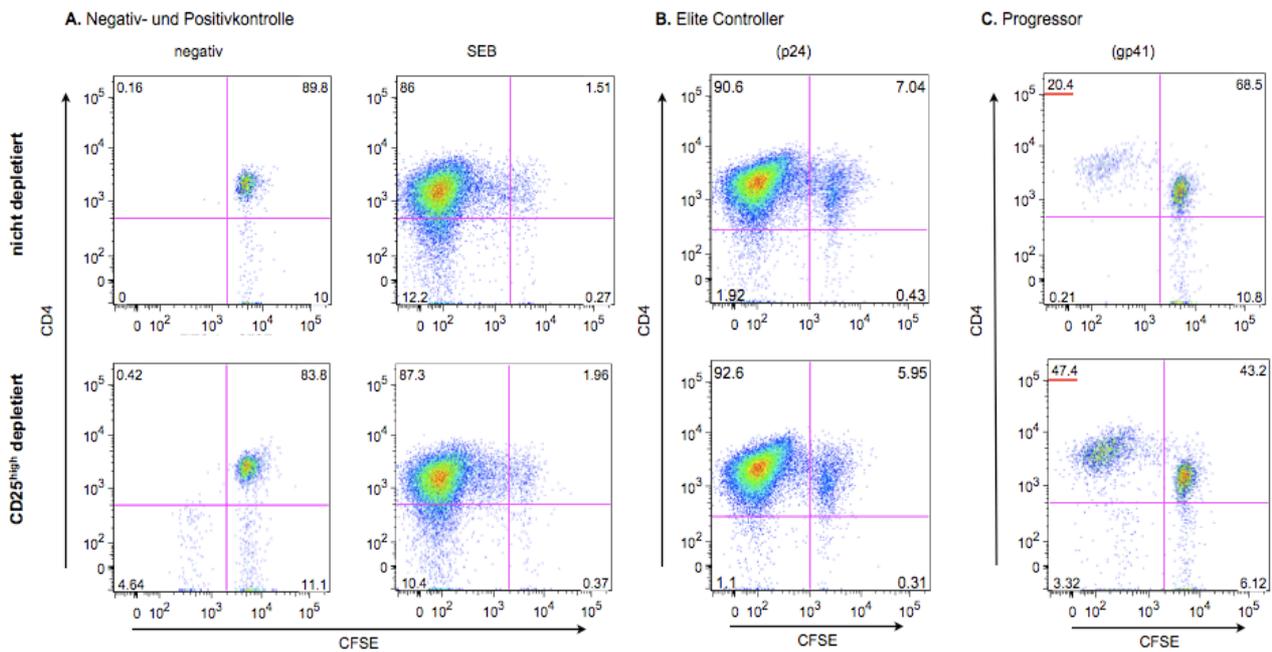
Abbildung 4: Relativer, jedoch absoluter Abfall der Treg-Frequenz mit der HIV-Krankheitsprogression. (A) Repräsentative Treg Plots (CD25highCD127lowFoxP3high) von Patienten in unterschiedlichen Stadien der HIV-Infektion. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben gefärbt und auf CD3+CD4+CD25highCD127lowFoxP3high gated. (B) während LTNP und EC ähnliche relative Frequenzen an Tregs zeigten wie die gesunde Kontrollgruppe, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der relativen Frequenzen bei Progressoren. Selbst nach mehr als 1 Jahr HAART konnten keine normalen Level erreicht werden. (C) Die relative Treg-Frequenz korreliert invers mit der CD4+Zahl und

(D) direkt mit der HIV VL (nur Patienten mit nachweisbarer Viruslast einbezogen). (E) Wurden dagegen die absoluten Zahlen der Tregs (Tregs/ $\mu$ l) im Vergleich dargestellt, so zeigte sich ein Abfall der Frequenz mit der HIV-Krankheitsprogression. Interessanterweise hatten lediglich die Elite Controller vergleichbare Level mit der gesunden Kontrollgruppe. (F/G) Die absolute Anzahl an Tregs korreliert direkt mit der CD4+Zahl und umgekehrt mit der HIV VL.

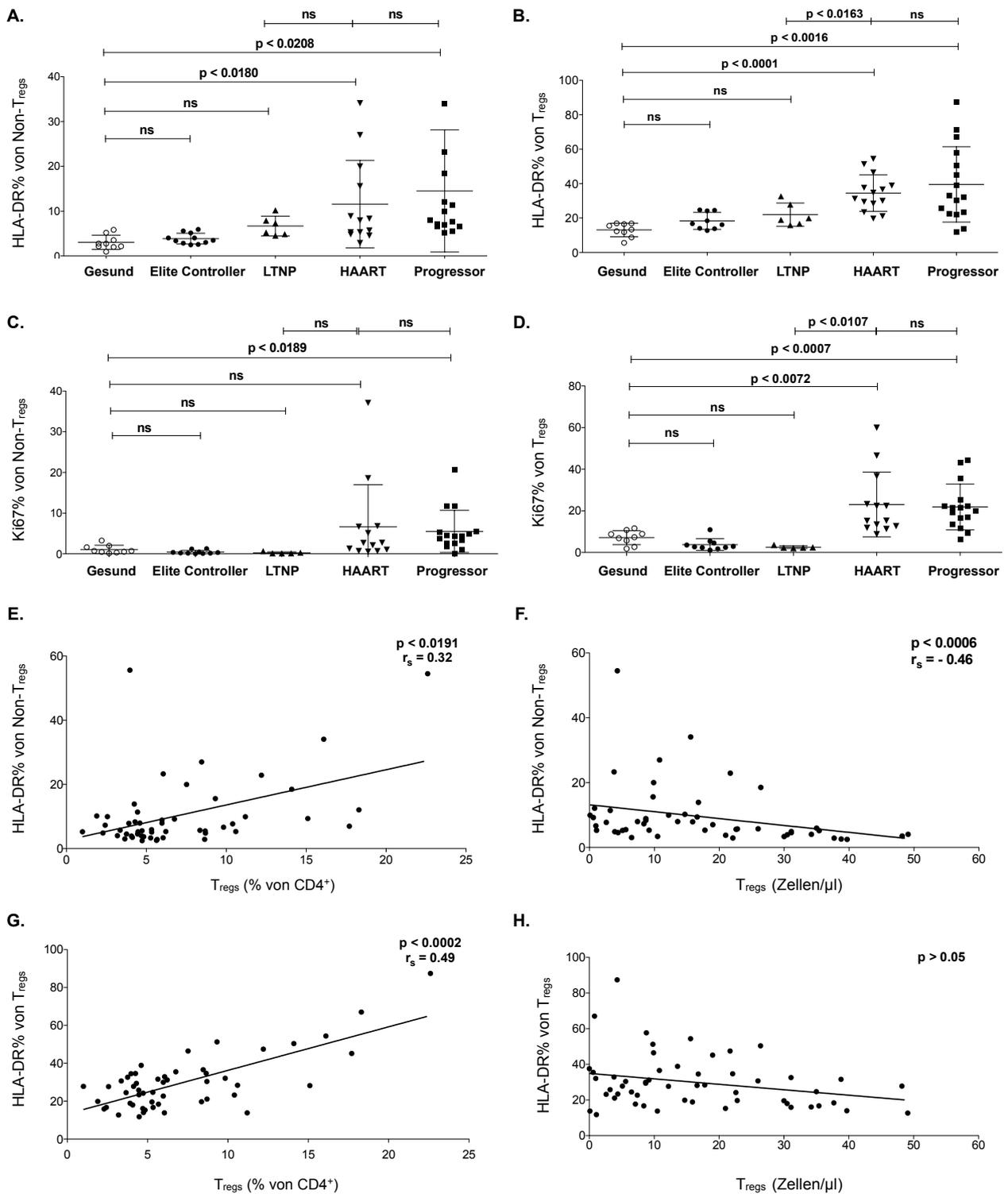


**Abbildung 5:** FoxP3 MFI der T<sub>regs</sub> in HIV-infizierten Patienten erhöht.

(A) Unabhängig von dem klinischen Stadium der HIV-Erkrankung fanden wir eine signifikant erhöhte Expression an FoxP3 (gemessen als MFI, „mean fluorescence intensity“) auf regulatorischen T-Zellen in HIV-infizierten Patienten ( $2573 \pm 972$ ) im Gegensatz zu der gesunden Kontrollgruppe ( $1492 \pm 478$ ; p < 0.0001). Dabei zeigte sich auch eine inverse Korrelation der FoxP3 MFI mit der CD4<sup>+</sup>Zahl (B) und eine positive Korrelation mit der VL (C), wobei diese keine statistische Signifikanz erlangte (p > 0.05).

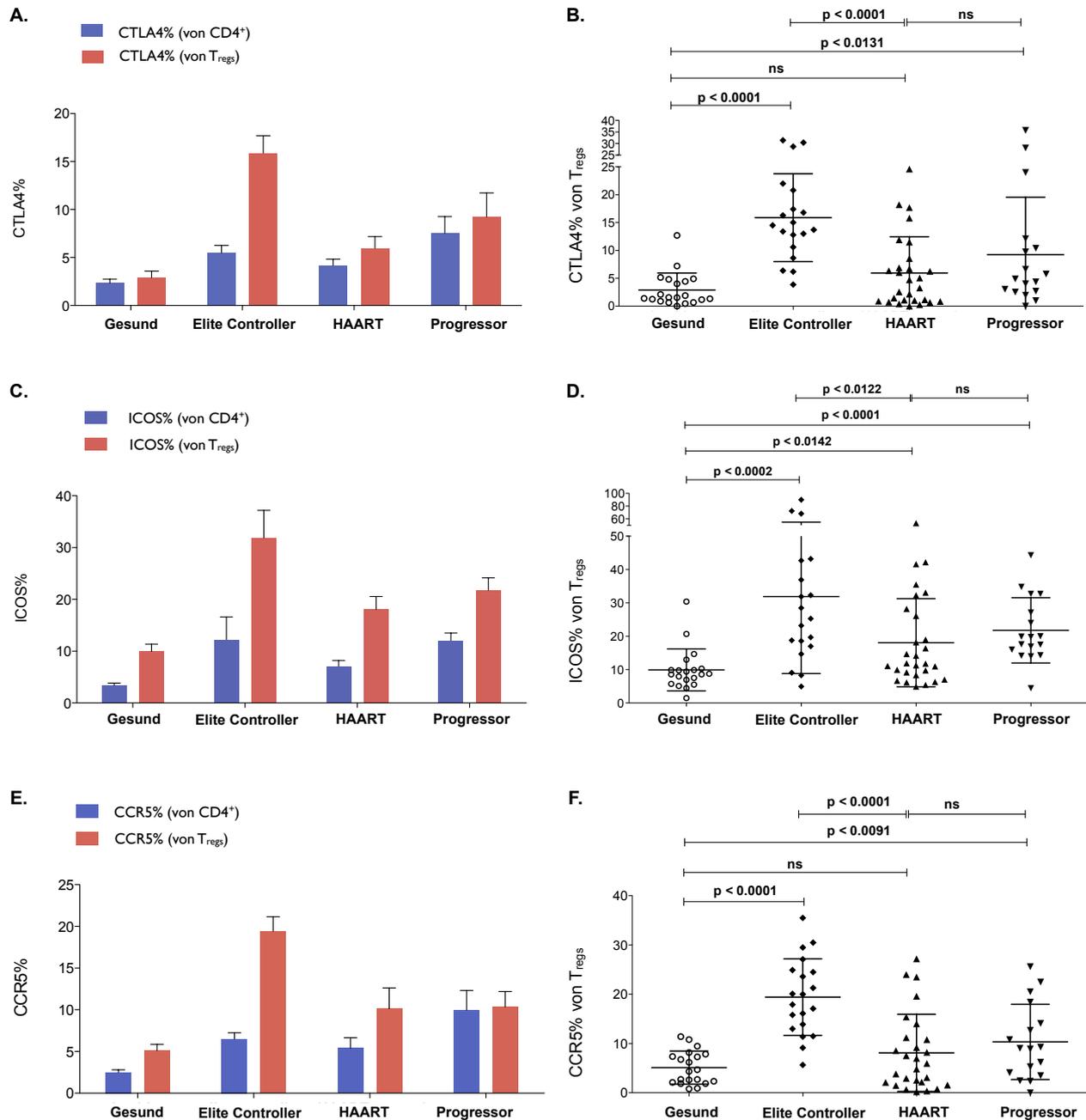


**Abbildung 6:** Erhöhte Proliferationsrate von HIV-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen nach Depletion der T<sub>regs</sub>. (A) Nach 7 Tagen Inkubation bei 37°C zeigte sich bei der Negativkontrolle (ohne jegliche Stimulation) mit und ohne Depletion der T<sub>regs</sub> (CD25<sup>high</sup>-Population) keine Proliferation. Die mit Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) als Positivkontrolle stimulierten Zellen dagegen waren mit und ohne Depletion der T<sub>regs</sub> bis zu 90% proliferiert. (B/C) Repräsentative Plots von HIV<sup>+</sup> Patienten nach Stimulation mit HIV-Proteinen (p24, p17, gp41, gp161). (B) Die CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen der Elite Controller (relative T<sub>reg</sub>-Frequenz 0.6%) zeigten unabhängig von der Depletion eine hohe HIV-spezifische Proliferationsrate (ohne Depletion: 90.6%; nach CD25<sup>high</sup>-Depletion: 92.6%). (C) Eine erhöhte Proliferationsrate von HIV-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen nach Depletion der T<sub>regs</sub> dagegen ließ sich für den Patienten mit progressiver HIV-Erkrankung (relative T<sub>reg</sub>-Frequenz 10.5%) nachweisen (ohne Depletion: 20.4%; nach CD25<sup>high</sup>-Depletion: 47.4%).

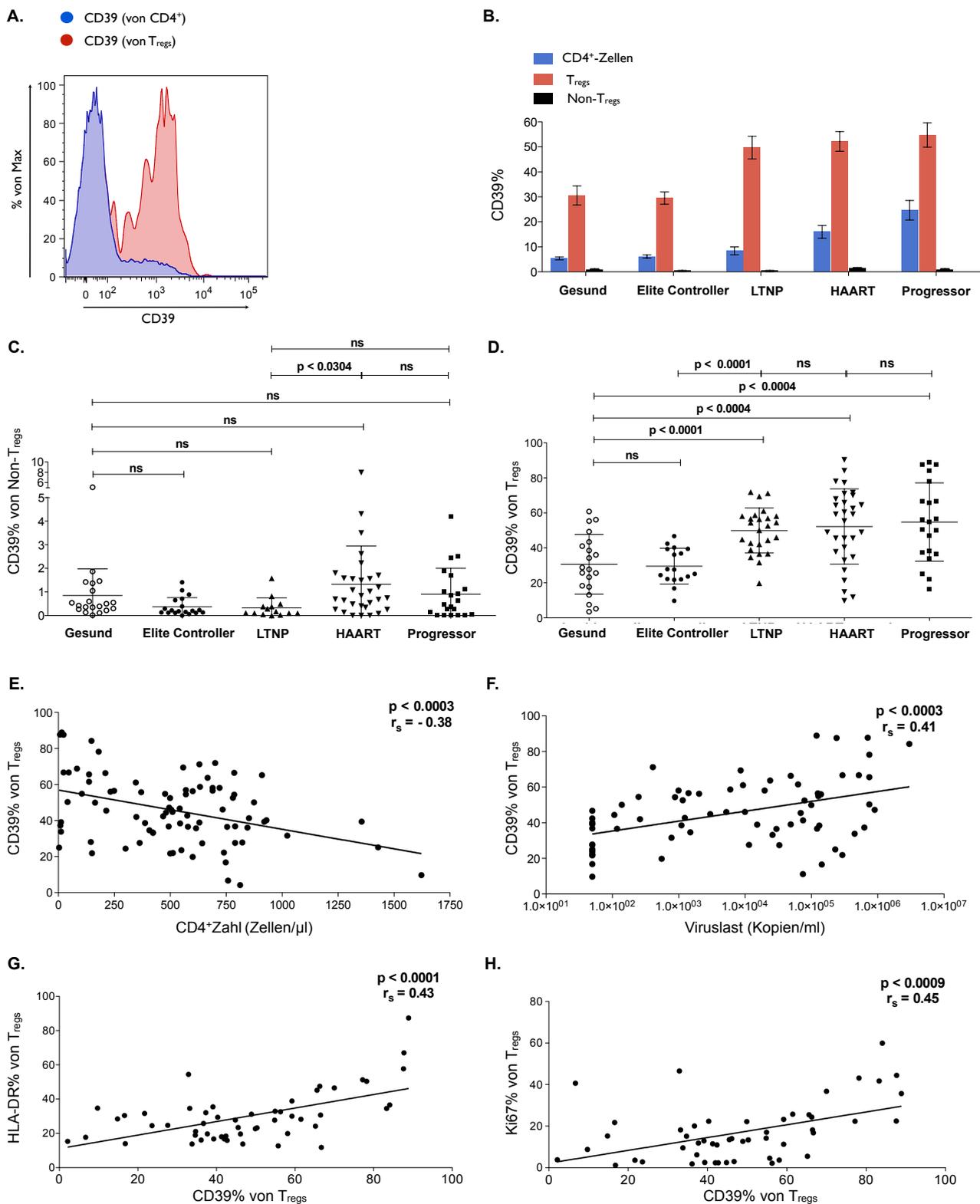


**Abbildung 7:** Der Aktivierungsstatus (HLA-DR) von T<sub>regs</sub> ist stark mit der Krankheitsprogression der HIV-Infektion assoziiert. Bei einem Teil der HIV<sup>+</sup> Patienten in unterschiedlichen Krankheitsstadien wurden die Expressionslevels von HLA-DR (A/B) und Ki67 (C/D) auf non-T<sub>regs</sub> und T<sub>regs</sub> gemessen. Beide Marker waren erhöht bei Patienten mit progredienter Erkrankung zu beiden Zellpopulationen, was eine generalisierte Immunaktivierung verdeutlicht. (E/F) Relative und absolute T<sub>reg</sub>-Frequenzen zeigen signifikante Korrelationen mit der generalisierten Immunaktivierung. So nimmt die absolute Anzahl an T<sub>regs</sub> signifikant mit der generalisierten Immunaktivierung ab ( $p < 0.0006$ ,  $r_s = -0.46$ ).

(G/H) Diese Abbildungen zeigen die Korrelation zwischen Aktivierungsstatus der  $T_{reg}$ -Zelle und der relativen/absoluten Frequenz.

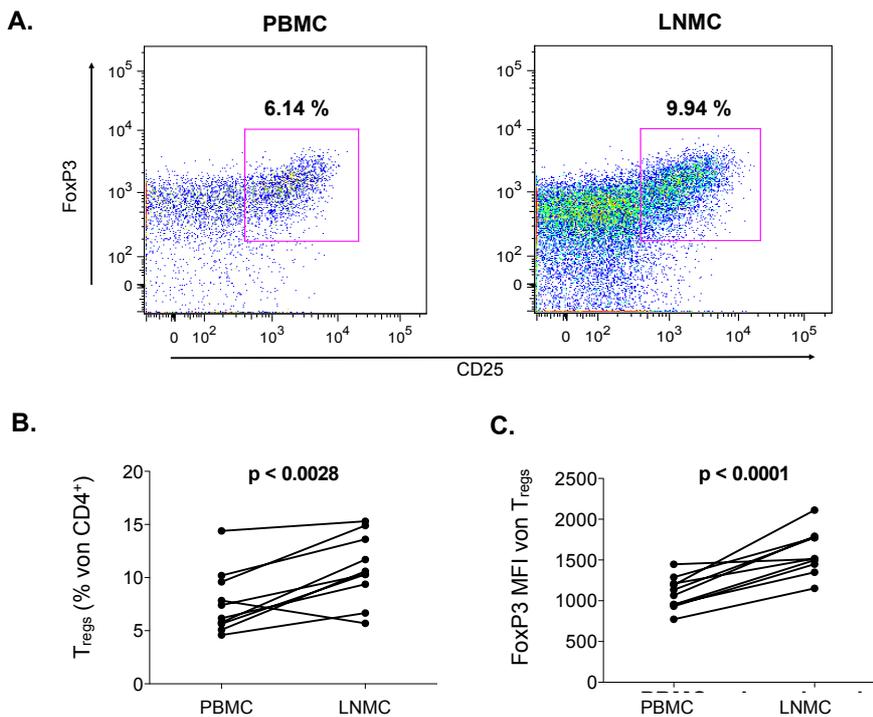


**Abbildung 8:** Die Expression von CTLA-4, ICOS und CCR5 auf  $T_{reg}$ s bei HIV-infizierten Patienten. Die Oberflächenexpression von CTLA-4 (A/B) und ICOS (C/D) war signifikant höher auf  $T_{reg}$ s der HIV<sup>+</sup> Kohorte (CTLA-4:  $9.2\% \pm 8.4\%$ ,  $p < 0.0007$ ; ICOS:  $21.6\% \pm 16.3\%$ ,  $p < 0.0002$ ) verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe (CTLA-4:  $2.9\% \pm 2.0\%$ ; ICOS:  $9.9\% \pm 6.2\%$ ). Elite Controller zeigen im Vergleich zu Progressoren signifikant höhere Level an ICOS und CTLA-4 (ICOS:  $31.9\% \pm 23.0$ ,  $p < 0.0314$ ; CTLA4:  $15.9\% \pm 7.8\%$ ,  $p < 0.0043$ ). (E/F) Die Oberflächenexpression von CCR5 war signifikant höher auf CD4<sup>+</sup>T-Zellen und  $T_{reg}$ s bei HIV-infizierten Patienten ( $10.3\% \pm 7.6\%$ ,  $p < 0.0091$ ) als in der gesunden Kontrollgruppe ( $5.1\% \pm 3.3\%$ ). Die höchste CCR5-Expression fand sich auf  $T_{reg}$ s bei Elite Controllern ( $19.4\% \pm 7.7\%$ ).

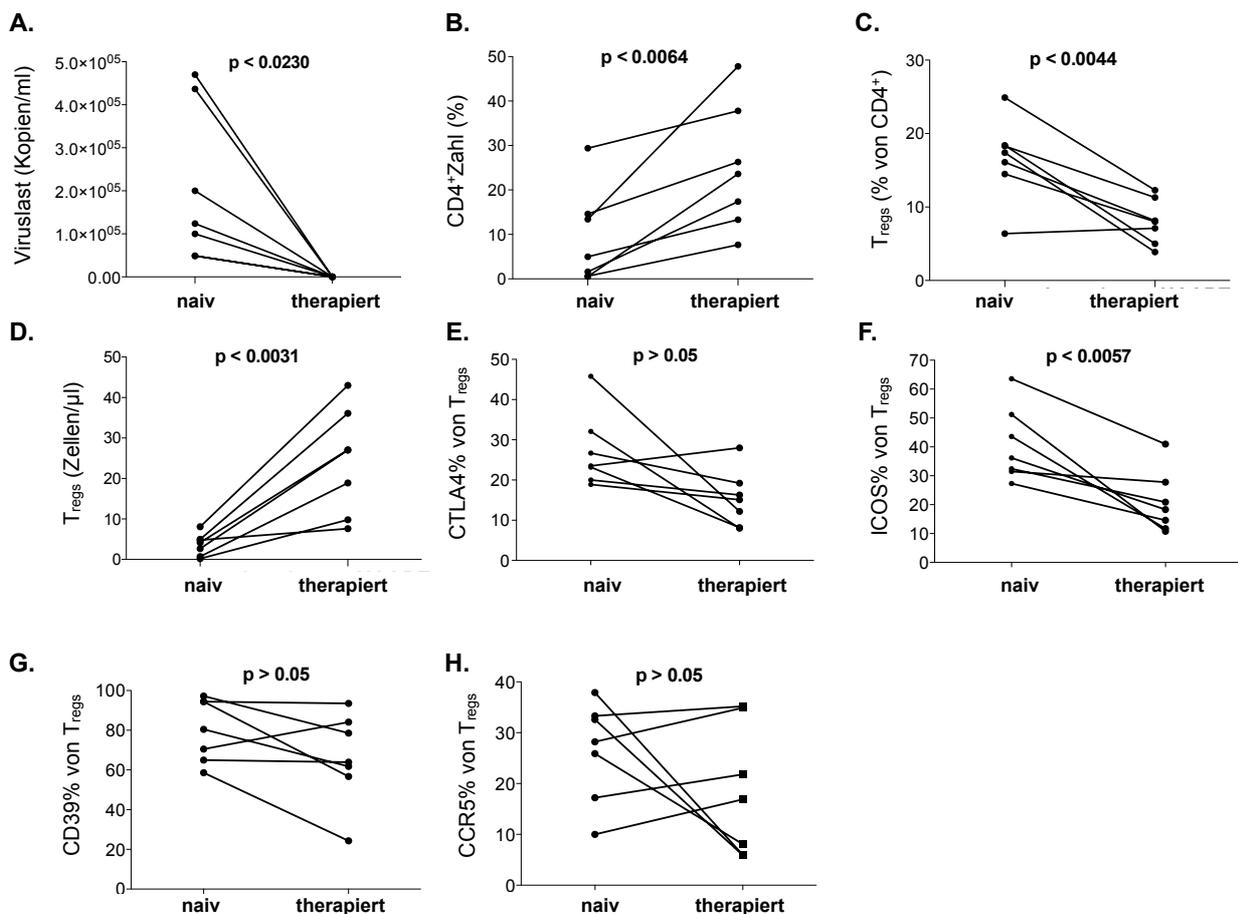


**Abbildung 9:** Die Oberflächenexpression von CD39 auf T<sub>regs</sub> korreliert mit der HIV-Krankheitsprogression. (A) Der repräsentative FACS Plot zeigt die Oberflächenexpression von CD39 auf CD4<sup>+</sup>T-Zellen (blau) und auf T<sub>regs</sub> (rot). (B) Die CD39-Expression scheint hauptsächlich begrenzt auf T<sub>regs</sub> zu sein. (D) Die Oberflächenexpression von CD39 auf T<sub>regs</sub> korreliert mit der HIV-Krankheitsprogression und zeigte unabhängig vom Krankheitsstadium erhöhte Levels auf T<sub>regs</sub> bei HIV<sup>+</sup> Patienten (46.5% ± 20.2%) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (30.5% ± 17.0%, p<0.0011) mit

Ausnahme der Elite Controller ( $p > 0.05$ ). (E/F) Die CD39-Expression korrelierte umgekehrt mit der CD4<sup>+</sup>Zahl ( $p < 0.0003$ ,  $r_s = -0.38$ ) und positiv mit der HIV VL ( $p < 0.0003$ ,  $r_s = 0.41$ ). (G/H) Eine deutliche Korrelation zeigte sich zudem zwischen der Expression von CD39 auf T<sub>regs</sub> und dem Aktivierungsstatus eben dieser Zellen, gemessen anhand der HLA-DR-Expression ( $p < 0.0001$ ,  $r_s = 0.43$ ) und der Ki67-Expression ( $p < 0.0009$ ,  $r_s = 0.45$ ).



**Abbildung 10:** Vergleich der relativen T<sub>reg</sub> Frequenz in LNMC und PBMC. (A) Repräsentative FACS-Plots zeigen T<sub>reg</sub>-Populationen eines Patienten zu einem Zeitpunkt in LNMC rechts und in PBMC links. (B/C) Es fanden sich signifikant höhere relative T<sub>reg</sub>-Frequenzen ( $10.6\% \pm 3.1\%$ ) und FoxP3 MFI ( $1514 \pm 272$ ) in Lymphknoten als im peripheren Blut (T<sub>regs</sub>:  $7.6\% \pm 3.0\%$ ,  $p < 0.0028$ ; FoxP3 MFI:  $1095 \pm 199$ ,  $p < 0.0001$ ).



**Abbildung 11:** Longitudinale Analysen der T<sub>regs</sub> unter HAART. Sieben Patienten wurden longitudinal verfolgt (zu Beginn therapienaiv, später 1 Jahr nach HAART). (A) Unter HAART befand sich die Viruslast bei allen Patienten unter der Nachweisgrenze ( $<50 \pm 0$  Kopien/ml,  $p > 0.0230$ ). (B) Die anfängliche CD4<sup>+</sup>Zahl ( $9.3\% \pm 8.6\%$ ) erholte sich unter HAART ( $24.8\% \pm 14.4\%$ ;  $p < 0.0064$ ). (C/D) Während die relativen T<sub>reg</sub>-Frequenzen unter HAART abnahmen (naiv:  $16.5\% \pm 5.5\%$ ; therapiert:  $7.9\% \pm 3.0\%$ ;  $p < 0.0044$ ), fand sich ein signifikanter Anstieg der absoluten T<sub>reg</sub>-Zahlen unter HAART (naiv:  $3.6 \pm 2.7$  Zellen/ $\mu$ l; therapiert:  $24.2 \pm 13.0$  Zellen/ $\mu$ l,  $p < 0.0031$ ). (E-H) Die Expression der Oberflächenmarker CTLA-4, ICOS, CCR5 und CD39 wies unter HAART einen Trend zu niedrigeren Leveln hin auf, dieser erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

## IV. Diskussion

Als führende Ereignisse in der HIV-1 Pathogenese werden die generalisierte chronische Hyperaktivierung des Immunsystems sowie der progrediente numerische und funktionelle Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten gesehen<sup>86,109</sup>. Verschiedenen Studien konnten inzwischen überzeugend darlegen, dass regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Balance zwischen Induktion und Suppression der Immunaktivierung spielen<sup>11,52</sup>. Jedoch ist die genaue Funktion der T<sub>regs</sub> in der HIV-1 Pathogenese noch immer ein kontrovers diskutiertes Thema<sup>31,105,17,115</sup>. Einerseits bewahren T<sub>regs</sub> vor einer chronischen Hyperaktivierung des Immunsystems und haben somit einen vorteilhaften Einfluss auf den Erhalt der CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Andererseits jedoch dämpfen regulatorische T-Zellen die HIV-spezifischen Immunantworten und nehmen somit durch die unterdrückte immunologische Kontrolle der Virusreplikation eine ungünstige Rolle in der Abwehr des Virus ein. Frühere Daten, die dieses Thema behandelten, wurden unter nur sub-optimaler Charakterisierung der T<sub>regs</sub> und/oder mit zu kleinen, heterogenen oder unzureichend charakterisierten HIV-Patientenkohorten durchgeführt<sup>17,20,98</sup>. Eben diese Einschränkungen sollten nun durch diese Arbeit gezielt durch Analyse der Frequenz und des Phänotyps einer genau definierten T<sub>reg</sub>-Population in einer großen und gut charakterisierten Kohorte von HIV-infizierten Patienten korrigiert werden. Eine besondere Stellung in der HIV-Forschung nimmt die Gruppe der Nonprogressoren und hier insbesondere der Elite Controller ein, da diese ohne Therapie durch Kontrolle der viralen Replikation einen asymptomatischen Verlauf mit Erhalt der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erreichen. Diese Mechanismen der spontanen Kontrolle der HIV-Replikation zu verstehen, könnte möglicherweise helfen, die entscheidenden Faktoren der HIV-1 Pathogenese zu determinieren<sup>20,27,85</sup>. Daher war es für uns von besonderer Bedeutung eine große Anzahl an Nonprogressoren mit Long-Term Nonprogressoren und Elite Controllern in unsere Untersuchungen mit einzubeziehen. Zusätzlich standen uns zur Untersuchung des Einflusses der antiretroviralen Therapie longitudinale PBMC-Proben sowie zur Untersuchung der Verteilung der Zellen im Gewebe Lymphknoten-Proben zur Verfügung. Alle Ergebnisse wurden mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Die Abgrenzung der T<sub>regs</sub> von gewöhnlichen aktivierten CD4<sup>+</sup>T-Zellen, also der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Population erfolgte unter Hinzunahme von FoxP3 und CD127 als spezifischeren Markern. Unabhängig vom Infektionsstadium der HIV<sup>+</sup> Patienten zeigte sich entgegen erst kürzlich veröffentlichter Beschreibungen eine eindeutig positive Korrelation der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> und der

CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Population<sup>28</sup>, sodass für die weiteren Analysen die T<sub>reg</sub>-Population als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> definiert wurde. Diese Übereinstimmung der CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> und der CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Population ist von Bedeutung für das „Sorting“ von T<sub>regs</sub> zur Durchführung funktioneller Assays, da dieses zuvor mit dem intrazellulären Marker FoxP3 nicht möglich war. Zudem gelang es uns durch Einbeziehung von CD127 als weiteren T<sub>reg</sub> Marker, die Genauigkeit der Eingrenzung der T<sub>reg</sub>-Population zu steigern, da auch die FoxP3-Expression, die zugleich auf aktivierten T-Zellen sowie auf Tumorzellen zu finden ist, nicht spezifisch für die T<sub>reg</sub>-Population zu sein scheint<sup>75,121</sup>.

Obwohl wir einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg der T<sub>reg</sub>-Frequenz innerhalb des CD4<sup>+</sup>T-Zellkompartiments und der Krankheitsprogression von HIV finden konnten, vermuten wir, dass dieser relative Anstieg am ehesten auf den Verlust der gesamten CD4<sup>+</sup>T-Zellen zurückzuführen ist, nicht aber auf eine wahrhaftige Zunahme der absoluten Zahl der T<sub>regs</sub>. Unsere Berechnungen zeigen in der Tat, dass die absolute Zahl an T<sub>regs</sub> im Laufe der Krankheitsprogression abfällt und mit einer Zunahme der Immunaktivierung und der Viruslast im Plasma korreliert. Diese Ergebnisse bestätigen jüngste Studien einer Forschungsgruppe, die Patienten der MACS-Kohorte untersucht haben, jedoch keine Daten der HIV-Viruslasten zur Verfügung hatten<sup>17</sup>. Insbesondere konnten wir auch die Beobachtungen früherer Studien um die Untersuchung einer großen Zahl an Long-Term Nonprogressoren und Elite Controllern erweitern<sup>17,13</sup>. Auffallend ist, dass diese Individuen normale bis nur leicht erhöhte absolute Zahlen von T<sub>regs</sub> haben. Diese Unterschiede in der peripheren relativen T<sub>reg</sub>-Frequenz und absoluten T<sub>reg</sub>-Anzahl, die zum Teil sicherlich auch zu den kontroversen Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen beigetragen haben<sup>17,20,30,115</sup>, können durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Zum einen durch eine mögliche Umverteilung dieser Zellen in andere Gewebe. Unser Vergleich von Lymphknoten und peripherem Blut mit deutlich erhöhten T<sub>reg</sub>-Frequenzen im lymphatischen Gewebe als Hauptort der viralen Replikation lässt in der Tat vermuten, dass T<sub>regs</sub> vorzugsweise ins Lymphgewebe wandern und daher im peripheren unterrepräsentiert sind. Zum anderen eben auch durch eine mögliche Anfälligkeit der CD4<sup>+</sup>T<sub>regs</sub> für eine Infektion mit HIV, wodurch eben auch diese Zellpopulation im Krankheitsverlauf depletiert würde, nur eben aufgrund unterschiedlicher Mechanismen langsamer als konventionelle CD4<sup>+</sup>T-Zellen.

Unter anderem zur Untersuchung dieser „Schutzmechanismen“ erfolgte in dieser Arbeit als nächstes eine umfassende Analysen weiterer phänotypischer Marker. Elite Controller zeigten in

diesen Untersuchungen nicht nur vergleichbare Level an  $T_{\text{regs}}$  (relative Frequenzen und absolute Zahlen) mit der gesunden Kontrollgruppe, sondern wiesen zudem abweichende phänotypische Expressionsmuster auf. So konnten wir die höchsten Expressionslevel von CCR5, FoxP3 MFI und CTLA-4 auf  $T_{\text{regs}}$  in der Gruppe der Elite Controller beobachten. Weiterführende Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um die Funktion und „Homing“-Eigenschaften dieser Zellen in Elite Controllern zu untersuchen und um im Folgenden zu sehen, ob diese von der Funktion der  $T_{\text{regs}}$  in einer gesunden Kontrollgruppe und bei HIV-infizierten mit chronisch progredienter Erkrankung abweicht. Zudem stellt sich die Frage, ob eine erhöhte FoxP3-Expression (MFI) mit der  $T_{\text{reg}}$ -Aktivierung zusammenhängt<sup>17,102</sup>. Unsere funktionellen Daten unterstützen diese Hypothese, da wir nach *in vitro* Depletion der  $CD25^{\text{high}}\text{FoxP3}^{\text{high}}T_{\text{regs}}$  bei Progressoren zwar eine erhöhte Proliferationsrate von HIV-spezifischen  $CD4^+$  T-Helferzellen messen konnten, nicht jedoch in Elite Controllern. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass ein solcher Phänotyp möglicherweise zum einen mit mangelnder Aktivität einhergeht sowie zum anderen die Suszeptibilität von  $T_{\text{regs}}$  für die Infektion mit dem HI-Virus beeinflusst<sup>79,81,82,90</sup>. Beide Mechanismen könnten zur spontanen Kontrolle der Virusreplikation beitragen. Auf einer „per cell basis“ konnte gezeigt werden, dass die HIV-Replikation in  $T_{\text{regs}}$  langsamer ist als bei konventionellen  $CD4^+$ T-Zellen, fraglich bleibt jedoch weiterhin ob  $T_{\text{regs}}$  als produzierende Zielzellen für HIV *in vivo* verantwortlich sind. Bei früheren *in vitro* Untersuchungen konnte eine erhöhte Anfälligkeit der  $T_{\text{regs}}$  für eine HIV-Infektion beobachtet werden<sup>18,82</sup>, aber solche *in vitro* Untersuchungen verändern möglicherweise den  $T_{\text{reg}}$ -Phänotyp und repräsentieren somit nicht vollständig eine *in vivo* Situation<sup>104</sup>. Die Beobachtungen von Moreno-Fernandez *et al* (2009) lassen vermuten, dass  $T_{\text{regs}}$  infizierbar sind, die Suszeptibilität und Replikationsrate jedoch abhängig vom viralen Tropismus (R5, X4) ist, sowie von Wirtsfaktoren, wobei hier insbesondere Faktoren mit direktem Einfluss auf die virale Replikation, d.h. unter anderem der Transkriptionsfaktor FoxP3<sup>45</sup>, das immunsupprimierende CTLA-4<sup>35</sup> sowie die Restriktionsfaktoren TRIM5 $\alpha$ <sup>80</sup> und APOBEC3G<sup>21</sup>, eine wichtigen Rolle zu spielen scheinen<sup>74</sup>. Dabei scheinen  $T_{\text{regs}}$  weniger anfällig für R5-trope Viren zu sein als Effektorzellen, bei im Vergleich jedoch höherer Suszeptibilität für X4-trope Viren<sup>74</sup>. In der vorliegenden Arbeit ermittelten wir die Expression von CCR5 auf  $T_{\text{regs}}$  *ex vivo* und fanden höhere Level von CCR5 auf  $T_{\text{regs}}$  von HIV-infizierten verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe, die höchsten Level dabei in der Gruppe der Elite Controller. Diese Konstellation lässt vermuten, dass für  $CCR5^+$   $T_{\text{regs}}$  ein relativer Schutz vor der Infektion mit R5-tropen HI-Virus besteht. Zu Bedenken ist dabei, dass inzwischen auch  $CD4^+CCR5^+$  Gedächtnis-Subpopulationen beschrieben wurden, die resistent gegen das R5-trope Virus sind. Besondere Bedeutung kommt hierbei der akuten Phase der HIV-Infektion

zu, in der die Erholung und Aufrechterhaltung eben dieser Zellpopulation nach der initialen Infektion und Depletion von besonderer Bedeutung für den viralen Setpoint und somit für den weiteren Krankheitsverlauf ist<sup>81,88</sup>. Die Aufrechterhaltung einer CCR5<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Antwort könnte möglicherweise die im Rahmen dieser akuten Phase überschießende Immunantwort unter Kontrolle halten. Zur Untersuchung dieser Hypothese sind jedoch weitere Experimente insbesondere in der akuten HIV-Infektion und von lymphatischen Geweben und der intestinalen Mukosa, den primären Orten der Virusreplikation, nötig. Die niedrige Rate der viralen Replikation, die in T<sub>regs</sub> beobachtet wurde, ist möglicherweise erklärbar durch die potentielle Interaktion von FoxP3, NF-κB und den HIV-LTR<sup>104</sup>. NF-κB ist ein essentieller Faktor für die virale Replikation<sup>37</sup>, wobei beobachtet werden konnte, dass FoxP3 mit der NF-κB Aktivierung interferiert und so die HIV-1 LTR-spezifische Transkription unterdrückt<sup>45</sup>. Selliah *et al* (2008) konnten jedoch in ähnlichen Experimenten eine gesteigerte HIV-1 LTR-spezifische Transkription durch Interaktion mit FoxP3 nachweisen<sup>82,104</sup>. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass möglicherweise signifikante Variationen der LTR-Sequenz in unterschiedlichen HIV-Stämmen zu diesen Abweichungen der Interaktion mit FoxP3 beitragen<sup>74,104</sup>. Es konnte zudem gezeigt werden, dass CTLA-4, welches auf T<sub>regs</sub> hochreguliert ist, die NF-κB Aktivierung zu reduzieren scheint<sup>35</sup>. TRIM5α und APOBEC3G determinieren die Suszeptibilität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen für HIV<sup>21,80</sup>. Zur Expression dieser Restriktionsfaktoren in T<sub>regs</sub> liegen bisher keine Untersuchungsbefunde vor, aber man kann vermuten, dass auch sie in T<sub>regs</sub> zur Regulation der Suszeptibilität beitragen. Diese Mechanismen könnten somit die Infektionsrate verringern und beachtlich das Ausmaß der viralen Replikation beeinflussen. Dies könnte zum Überleben und zur Aufrechterhaltung der Funktion der T<sub>regs</sub> bei der HIV-Infektion beitragen. Bislang sind dies jedoch nur Hypothesen, die durch weitere Studien über die Infektionsrate der T<sub>regs</sub> *in vivo* in unterschiedlichen Krankheitsstadien bestätigt werden müssen<sup>74,79</sup>.

Im Allgemeinen ist die bisher beschriebene Funktion von CD39 bei T<sub>regs</sub> umstritten. Auch gibt es nur wenige Studien, welche die Expression von CD39 auf T<sub>regs</sub> bei der HIV-Infektion analysiert haben<sup>57</sup>. Soweit es uns bekannt ist, ist dies die erste Arbeit, die eine signifikante Korrelation der Expression von CD39 auf T<sub>regs</sub> mit der progredienten HIV-Infektion demonstrieren kann. Während die Expression von CD39 bisher häufig als unspezifischer Marker der Immunaktivierung lymphoider Zellen interpretiert wurde, lassen neueste Studien eine funktionelle Rolle von CD39 in der HIV-1 Pathogenese vermuten<sup>7,15,56,76</sup>. CD39 funktioniert als eine Nukleosid Triphosphat Diphosphohydrolase-1 (NTPDase-1), welche pro-inflammatorisches ATP zu AMP konvertiert,

und damit die allgemeine ATP-induzierte Immunaktivierung unterdrückt<sup>10,32</sup>. Auch wenn die Funktion von CD39 in der Immunregulation noch nicht umfassend erforscht ist, scheint doch der Gesamteffekt per saldo immunsuppressiv zu sein, da es nicht nur einen wichtigen pro-inflammatorischen Stimulus beseitigt, sondern auch die Produktion von Adenosin, einem Nukleosid mit inhibitorischen und anti-inflammatorischen Effekten, über ko-exprimiertes CD73 induzieren kann<sup>15</sup>. Adenosin kann CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen direkt durch Bindung an den Adenosin-2a-Rezeptor (A<sub>2A</sub>) unterdrücken, über diesen Mechanismus scheint auch die Ko-expression von CD39 und CD73 auf T<sub>regs</sub> zu einer Dysfunktion der T-Zellen zu führen<sup>26,64</sup>. Erst kürzlich berichteten Borsellino *et al* (2007), dass CD39 grundlegend auf FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen exprimiert wird<sup>15</sup>. Die gleiche Arbeitsgruppe beschreibt zudem eine Assoziation zwischen dem Aktivierungsstatus der murinen T<sub>reg</sub>-Zelle und der CD39-Expression. Wir konnten diese Beobachtungen in humanen PBMC bestätigen und zudem zeigen, dass die hohe Expression von CD39 auf FoxP3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> beschränkt zu sein scheint und mit der Immunaktivierung und Krankheitsprogression ansteigt (Abb. 8A-H). Auch hier nimmt die Gruppe der Elite Controller wieder eine besondere Stellung ein, da sie ähnliche Level an CD39 auf T<sub>regs</sub> aufweisen wie die gesunde Kontrollgruppe und selbst Long-Term Nonprogressor mit niedriger Viruslast signifikant höhere Level an CD39 auf T<sub>regs</sub> zeigen. Dies unterstreicht die Sensitivität von CD39 in der Immunregulation und die wichtige Rolle als funktionelles Molekül auf T<sub>regs</sub>, welches zukünftig potentiell als prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf dienen könnte. Den von uns (und anderen Arbeitsgruppen) durchgeführten funktionellen Experimenten zufolge, scheinen T<sub>regs</sub> HIV-spezifische Immunantworten in der chronischen HIV-Infektion durch supprimierende Eigenschaften zu unterdrücken, die allein auf das CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> Kompartiment zurückzuführen sind<sup>72,78</sup>. Nikolova *et al* (2011) haben erst kürzlich (nach Abschluss dieser Arbeit) nun den von uns vermuteten Einfluss des CD39/Adenosin-Signalweges durch T<sub>regs</sub> auf Effektorzellen in der HIV-1 Infektion in funktionellen Analysen darlegen können. Dabei konnten sie zeigen, dass nicht nur die CD39-Expression auf T<sub>regs</sub> in HIV-infizierten Probanden hochreguliert ist, sondern *in vitro* auch die Sensitivität von Adenosin gegen den T-zellständigen A<sub>2A</sub>-Rezeptor. Die Stimulation mit dem A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Agonist CGS21680 führte dabei zur Suppression HIV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten sowie auch zur Inhibition der Zytokinproduktion durch HIV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>78</sup>. Somit scheinen CD39<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> nicht nur von großer Bedeutung für die Suppression der antiviralen CD4<sup>+</sup> Immunantwort zu sein, sondern auch zumindest teilweise die Ineffektivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der chronischen HIV-Infektion zu verantworten. Im Moment ist es noch rein spekulativ inwiefern CD39 als „switch“-Molekül für T<sub>regs</sub> in ihren funktionsfähigen

Phänotyp beteiligt ist. Diesem Modell zufolge wären  $T_{\text{regs}}$  selbst bei minimaler Virämie aktiv, d.h. auch in Long-Term Nonprogressoren, während sie in der gesunden Kontrollgruppe sowie in der Gruppe der Elite Controller im inaktiven Status ruhen. Die CD39-Expression auf  $T_{\text{regs}}$  könnte dabei durch die extrazelluläre Beseitigung des pro-inflammatorischen ATP den  $T_{\text{regs}}$  die Infiltration in inflammatorisches Gewebe erleichtern. Die daraus resultierende ATP-Depletion kann möglicherweise das Überleben und die lokale Akkumulation der  $T_{\text{regs}}$  durch fehlende proapoptische Eigenschaften des ATP steigern<sup>78</sup>. Dieses Modell würde wiederum den zuvor beschriebenen absoluten Verlust an  $T_{\text{regs}}$  im Blut mit der Krankheitsprogression durch Lymphozyten-„Trapping“, d.h. die Umverteilung in inflammatorisches Gewebe, erklären. Paradoxerweise, wurde erst kürzlich in einer Publikation die Subpopulation der  $CD4^+CD25^+CD39^+$  T-Zellen, eine Subpopulation, die in unserer Kohorte auch mit zunehmender HIV-Viruslast ansteigt, als induzierende T-Zellen ( $T_{\text{ind}}$ ) beschrieben, welche die T-Zellproliferation stimulieren<sup>72,76</sup>. Hypothetisch denkbar wäre, dass die Absenz beziehungsweise Präsenz von CD73, und damit die Produktion von immunsuppressivem Adenosin, über die Differenzierung zu  $T_{\text{ind}}$  oder  $T_{\text{reg}}$  entscheidet<sup>76</sup>. Das Zusammenspiel von  $T_{\text{ind}}$  und  $T_{\text{reg}}$  könnte von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase sein. Ob eine erhöhte Ratio an  $T_{\text{ind}}/T_{\text{reg}}$  die HIV-Pathogenese beeinflusst, ist ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Studien. Insgesamt geben unsere Daten neue Wegweisungen, die weitere funktionelle Untersuchungen bezüglich der Rolle von CD39 in der HIV-Infektion anregen, mit dem Ziel zukünftige immunmodulatorische Interventionen zu evaluieren, indem man z.B. *in vivo* das CD39 Molekül mit spezifischen Inhibitoren hemmt<sup>57,106</sup>.

Zusammenfassend erklären unsere Ergebnisse die Diskrepanzen von früheren Publikationen über die Rolle der  $T_{\text{regs}}$  in der HIV-Infektion. So konnten wir einen Anstieg der relativen  $T_{\text{reg}}$ -Frequenz innerhalb des  $CD4^+$  Kompartiments bei gleichzeitigem absoluten Verlust der  $T_{\text{regs}}$  im Krankheitsverlauf der HIV-Infektion beobachten. Dies deutet darauf hin, dass regulatorische T-Zellen ebenso wie konventionelle  $CD4^+$  T-Zellen im Verlauf der progredienten HIV-Infektion verloren gehen, wenn auch mit einer langsameren Abfallrate. Dabei ist der Verlust der  $T_{\text{regs}}$  zum Teil unter HAART reversibel. Beachtenswert ist die Abweichung der Frequenz und des Phänotyps der  $T_{\text{regs}}$  in der Gruppe der Elite Controller. Diese weisen die höchsten Level an absoluten  $T_{\text{regs}}$  auf und gleichzeitig deutlich abweichende phänotypische Expressionsmuster, welche womöglich mit spezifischen Immuneigenschaften assoziiert sind. Von besonderer Relevanz sind dabei die deutlich

erhöhten Level von CCR5, CTLA-4 und FoxP3 MFI mit möglichen Einfluss auf die Suszeptibilität der  $T_{\text{regs}}$  und die spontane Kontrolle der Virusreplikation, sowie die niedrigen der gesunden Kontrollgruppe entsprechenden Level an CD39, welches unseren funktionellen Analysen zu Folge für die suppressiven Eigenschaften und damit für die Unterdrückung der HIV-spezifischen antiviralen Immunantwort verantwortlich zu sein scheint. Zusammen gesehen mit unseren funktionellen Ergebnissen, in denen wir nach *in vitro* Depletion der  $CD25^{\text{high}}FoxP3^{\text{high}}$   $T_{\text{regs}}$  bei Progressoren zwar eine erhöhte Proliferationsrate von HIV-spezifischen  $CD4^+$ T-Helferzellen messen konnten, nicht jedoch bei Elite Controllern, lassen diese Beobachtungen vermuten, dass ein solcher Phänotyp mit mangelnder funktioneller Aktivität einhergeht. Insofern deuten unsere Daten indirekt auf eine unvorteilhafte und komplexe Rolle der  $T_{\text{regs}}$  in der Regulation der Immunantwort in der HIV-Infektion hin. Diese immunmodulierenden Fähigkeiten der  $T_{\text{regs}}$  scheinen aus gegenwärtiger Sicht vor allem die adaptive antivirale Immunantwort zu unterdrücken. Die Schwächen dieser Arbeit sind vor allem in den beschränkten funktionellen Assays, der ausstehenden Analyse von mukosalen T Zellen und im Mangel an Proben von akut HIV-infizierten Probanden zu suchen. Um die Rolle der regulatorischen T-Zellen in der HIV-1 Pathogenese umfassend zu erfassen, sind intensivere funktionelle und longitudinale Analysen der  $T_{\text{regs}}$  unabdingbar. Im Vordergrund stehen dabei weiterführende Analysen des CD39/Adenosin-Signalweges und vor allem der Rolle von CD73 im Rahmen der Differenzierung von T-Zellen zu  $T_{\text{ind}}$  oder  $T_{\text{reg}}$  sowie deren Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase in der HIV-1 Pathogenese. Im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie konnte erst kürzlich eine mit der Downregulation der CD39-Expression assoziierte genetische Variante des CD39-Gens identifiziert werden. Träger dieses CD39-C-Allels würden damit niedrigere Level an CD39 aufweisen, wodurch die Suppression der antiviralen Immunantwort deutlich beeinträchtigt wäre und somit sich die Krankheitsprogression verlangsamen würde<sup>62,78</sup>. Diese Befunde unterstützen die Wichtigkeit des CD39/Adenosin-Signalweges. Ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Studien wäre hier eine Untersuchung der Elite Controller auf eben diese Genvariante, als möglicher Faktor der durch unbeeinträchtigte antivirale Immunantwort zur spontanen Viruskontrolle beiträgt. Zudem scheint die Analyse weiterer Mechanismen, die Suszeptibilität und Replikationsrate in  $T_{\text{regs}}$  beeinflussen können von großer Bedeutung zu sein. Dabei sei vor allem auch auf die gezielte Untersuchung der Restriktionsfaktoren TRIM5 $\alpha$  und APOBEC3G hingewiesen, die wie zuvor beschrieben in  $CD4^+$  T-Zellen die Suszeptibilität für HIV determinieren.

Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes und das lymphoretikuläre Gewebe scheinen Hauptort der viralen Replikation zu sein, da sich vor allem hier für die ungestörte virale Replikation bevorzugte

ruhende  $CD4^+CCR5^+$ Zellen finden<sup>25</sup>. Unsere Ergebnisse der Analysen von  $T_{regs}$  im lymphatischen Gewebe deuten auf eine erhöhte Infiltration dieses Gewebes mit  $T_{regs}$  hin, was möglicherweise mit dem erhöhten Anfall an ATP im inflammatorischen Gewebe zusammenhängt. Leider stand uns nur eine ausgewählte kleine unzureichend charakterisierte Menge an Lymphknoten-Proben zu Verfügung, sodass weitere experimentelle Untersuchungen auch hier entscheidend sind. Um die Pathogenese der HIV-1 Infektion vollständig zu erfassen, ist es zudem wichtig, zum einen die Funktion der  $T_{regs}$  in der akuten HIV-Infektion zu untersuchen, da hier entscheidende Grundsteine für den weiteren Krankheitsverlauf gelegt werden, zum anderen um die Rolle der  $CD8^+ T_{regs}$  zu analysieren. Insofern tragen die dargestellten Ergebnisse nicht nur zum besseren Verständnis der Rolle von  $T_{regs}$  in verschiedenen Stadien der HIV-Infektion bei, sondern dienen auch als Grundlage für die Planung weiterer Untersuchungen.

## V. Zusammenfassung

Die Frequenz und phänotypischen Eigenschaften der regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ) im Krankheitsverlauf der HIV-Infektion sind bis heute ein kontrovers diskutiertes Thema. In dieser Arbeit wurde peripheres Blut von einer großen Kohorte HIV-infizierter Patienten ( $n=131$ ) in unterschiedlichen Krankheitsstadien, inklusive 15 Long-Term Nonprogressoren und 21 Elite Controller, analysiert, um die Frequenz und den Phänotyp der  $T_{\text{regs}}$ , definiert als  $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}FoxP3^{\text{high}}$  Zellen, zu bestimmen. Es konnte ein signifikanter Anstieg der relativen  $T_{\text{reg}}$ -Frequenz im  $CD4^+$  Kompartiment der  $HIV^+$  Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ( $p<0.0001$ ) beobachtet werden. Zudem korrelierte die relative Frequenz der  $T_{\text{regs}}$  direkt mit der HIV Viruslast und umgekehrt mit der  $CD4^+$ Zahl. Die absolute Anzahl der  $T_{\text{regs}}$  jedoch war bei HIV-infizierten Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ( $p<0.0001$ ) reduziert, mit Ausnahme der Elite Controller ( $p>0.05$ ). Der Verlust der absoluten Anzahl der  $T_{\text{regs}}$  ging einher mit erhöhten Parametern der Immunaktivierung ( $p<0.0006$ ). Durch eine antiretrovirale Therapie kann die absolute Anzahl der  $T_{\text{regs}}$  wieder signifikant rekonstituiert werden ( $p<0.0031$ ), erreicht jedoch nicht Normalwerte. Bei der Analyse der phänotypischen Eigenschaften der  $T_{\text{reg}}$ -Population fiel insbesondere auf, dass die Expression von CD39, einer erst vor kurzem neu definierten Ektonukleotidase mit immunmodulatorischen Funktionen, auf  $T_{\text{regs}}$  mit der Krankheitsprogression, der HIV Viruslast und der Immunaktivierung korrelierte. Dabei zeigte sich überraschenderweise bei *in vitro* Assays mit PBMC von Gesunden eine auf die  $CD4^+CD25^{\text{high}}CD39^+$  T-Zellpopulation beschränkte Fähigkeit der Suppression der T-Zellproliferation. Interessanterweise zeigten  $T_{\text{regs}}$  in Elite Controllern nicht nur die höchsten Level an CCR5, CTLA-4 und ICOS, sondern auch die niedrigste Expression an CD39. Dies weist auf eine entscheidende regulatorische Bedeutung dieses Moleküls über die Beeinflussung des ATP->AMP->Adenosin Stoffwechsels hin. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten klären die kontrovers erscheinenden Ergebnisse früherer Studien hinsichtlich  $T_{\text{regs}}$  in der HIV-Infektion und unterstreichen die Komplexität der  $T_{\text{reg}}$ -gesteuerten Immunregulation bei humanen viralen Infektionen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2011 im Journal of Virology publiziert:

Schulze zur Wiesch J, Thomssen A et al\* (2011): „*Comprehensive Analysis of Frequency and Phenotype of T Regulatory Cells in HIV Infection: CD39 expression on FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells in HIV infection correlates with disease progression.*” Journal of Virology, Vol. 85, No. 3

\*geteilte Erstautorenschaft

## VI. Literaturverzeichnis

1. Aandahl EM, J Michaelsson, WJ Moretto *et al.*: „Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens.“ *Journal of Virology* 2004, 78, 2454-2459.
2. Alimonti JB, TB Ball and KR Fowke: “Mechanisms of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS.” *J Gen Virol* 2003, 84, 1649-1661.
3. Arenzana-Seisdedos F, M Parmentier: „Genetics of resistance to HIV infection: role of coreceptors and coreceptor ligands.“ *Semin Immunol* 2006,18, 387-403.
4. Asseman C, S Mauze, MW Leach *et al.*: „An essential role for Interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation.“ *J Exp Med* 1999, 190, 995-1003.
5. Baecher-Allan C, JA Brown, GJ Freeman, DA Hafler: „CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood.“ *J Immunol* 2001, 167, 1245-1253.
6. Bangs SC, AJ McMichael, XN Xu: „Bystander T cell activation - implications for HIV infection and other diseases.“ *Trends Immunol* 2006, 27, 518-524.
7. Barat C, G Martin, AR Beaudoin *et al.*: “The nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1/CD39 is incorporated into human immunodeficiency type 1 particles, where it remains biologically active.” *J Mol Biol* 2007, 371, 269-282.
8. Barré-Sinoussi F: „HIV: a discovery opening the road to novel scientific knowledge and global health improvement (nobel lecture).“ *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 2-8.
9. Barré-Sinoussi F, JC Chermann, F Rey *et al.*: „Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).“ *Science* 1983, 220,868-871.
10. Beigi RD, SB Kertesy, G Aquilina, GR Dubyak: “Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms.” *Br J Pharmacol*2003,140, 507-519.
11. Belkaid Y, BT Rouse: „Natural regulatory T cells in infectious disease.“ *Nat Immunol* 2005, 6, 353-360.
12. Bevan MJ: „Helping the CD8<sup>+</sup> T-cell response.“ *Nat Rev Immunol* 2004, 4, 595-602.
13. Bi X, Y Suzuki, H Gatanaga, S Oka: „High frequency and proliferation of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T<sub>regs</sub> in HIV-1 infected patients with low CD4 counts.“ *Eur J Immunol* 2009, 39, 301-309.
14. Bland, J.M., and D.G. Altman: “Multiple significance tests: the Bonferroni Method. *BMJ* 1995, 310, 170.
15. Borsellino G, M Kleinewietfeld, D Di Mitri *et al.*: „Expression of ectonucleotidase CD39 by FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression.“ *Blood* 2007,110, 1225-1232.
16. Brodie SJ, DA Lewinsohn, BK Patterson *et al.*: „In vivo migration and function of transferred HIV-1 specific cytotoxic T cells.“ *Nature medicine* 1999, 5, 34-41.
17. Cao W, BD Jamieson, LE Hultin *et al.*: „Regulatory T cell expansion and immune activation during untreated HIV Type 1 infection are associated with disease progression.“ *AIDS Research and Human Retroviruses* 2009, 25, 183-191.
18. Card CM, PJ McLaren, C Wachihi *et al.*: „Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory cells.“ *J Infect Dis* 2009, 199, 1318-1322.
19. Carrington M, SJ O’Brien: „The influence of HLA genotype on AIDS.“ *Annu Rev Med* 2003, 54, 535-551.
20. Chase AJ, HC Yang, H Zhang *et al.*: „Preservation of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected elite suppressors correlates with low CD4<sup>+</sup>T-cell activation.“ *Journal of Virology* 2008, 82, 8307-8315.

21. Chiu YL, WC Greene: „The APOBEC3G cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements.“ *Annu Rev Immunol* 2008, 26, 317-353.
22. Chun TW, L Carruth, D Finzi *et al.*: „Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection.“ *Nature* 1997, 387, 183-188.
23. Clapham PR, A McKnight: „Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses.“ *J Gen Virol* 2002, 83, 1809-1985.
24. Coffin JM: „HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy.“ *Science* 1995, 267, 483-489.
25. Cohen MS, MS Shaw, AJ McMichael *et al.*: „Acute HIV-1 Infection.“ *N Engl J Med* 2011, 364, 1943-1954.
26. Deaglio S, KM Dwyer, W Gao *et al.*: „Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression.“ *J Exp Med* 2007, 204, 1257-1265.
27. Deeks SG, BD Walker: „Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy.“ *Immunity* 2007, 27, 406-416.
28. Del Pozo-Balado MdM, M Leal, G Mendez-Lagares *et al.*: „CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+/hi</sup>CD127<sup>lo</sup> phenotype does not accurately identify regulatory T cells in all populations of HIV-infected persons.“ *J Infect Dis* 2010, 201, 331-335.
29. Deng H, R Liu, W Ellmeier *et al.*: „Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1.“ *Nature* 1996, 381, 661-666.
30. Douek DC: „Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease.“ *AIDS Rev* 2003, 5, 172-177.
31. Eggena MP, B Barugahare, N Jones *et al.*: „Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation.“ *J Immunol* 2005, 174, 14169-14178.
32. Elliott MR, FB Chekeni, PC Trampont *et al.*: „Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance.“ *Nature* 2009, 461, 282-286.
33. Fazekas de St Groth B, AL Landay: „Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response?“ *AIDS* 2008, Editorial Review, 22, 671-683.
34. Feng Y, CC Broder, PE Kennedy *et al.*: „HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.“ *Science* 1996, 272, 872-877.
35. Fraser JH, M Rincon, KD McCoy, G Le Gros: „CTLA-4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells.“ *Eur J Immunol* 1999, 29, 838-844.
36. Gallo RC, SZ Salahuddin, M Popovic *et al.*: „Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses HTLV-III from patients with AIDS and at risk for AIDS.“ *Science* 1984, 224, 500-503.
37. Ganesh L, E Burstein, A Guha-Niyogi *et al.*: „The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4<sup>+</sup> lymphocytes.“ *Nature* 2003, 426, 853-857.
38. Garber ME, P Wei, VN KewalRamani *et al.*: „The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin TI requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycTI protein.“ *Genes Dev* 1998, 12, 3512-3527.
39. Geijetenbeek TB, DS Kwon, R Torensma *et al.*: „DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances trans-infection of T-cells.“ *Cell* 2000, 100, 587-597.
40. Gershon RK: „A disquisition on suppressor T cells.“ *Transplant review* 1975, 26, 170-185.
41. Gonzales E, H Kulkarni, H Bolivar *et al.*: „The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility.“ *Science* 2005, 307, 1434-1340.
42. Goonetilleke N, MK Liu *et al.*: „The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection.“ *J Exp Med* 2009, 206, 1253-1272.
43. Gottlieb MS: „AIDS - Past and Future.“ *NEJM* 2001, 344, 1788-1791.

44. Gottlieb MS, R Schroff, HM Schanker *et al.*: „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.
45. Grant C, U Oh, K Fugo *et al.*: “Foxp3 represses retroviral transcription by targeting both NF- $\kappa$ B and CREB pathways.” *PLoS Pathog* 2006, 2, e33.
46. Grossmann Z, RB Herberman: „T cell homeostasis in HIV infection is neither failing nor blind: modified cell counts reflect an adaptive response of the host.“ *Nat Med* 1997, 3, 486-490.
47. Ho D, A Neumann, A Perelson *et al.*: „Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.“ *Nature* 1995, 373, 123-126.
48. Hu J, MB Gardner, CJ Miller: „Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells.“ *J Virol* 2000, 74, 6087-6095.
49. Hufert FT, J van Lunzen, G Janossy *et al.*: „Germinal centre CD4<sup>+</sup> T cells are an important site of HIV replication in vivo.“ *AIDS* 1997, 11, 849-857.
50. Janeway CA, P Travers, M Walport: „Immunologie“ *Spektrum Akademischer Verlag* 2002, Heidelberg.
51. Jonuleit H, E Schmitt, M Stassen *et al.*: „Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood.“ *J Exp Med* 2001, 193, 1285-1294.
52. Kassiotis G, A O'Garra: „Immunology. Immunity benefits from a little suppression.“ *Science* 2008, 320, 1168-1169.
53. Kaufmann DE, BD Walker: “PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention.” *J Immunol* 2009, 182, 5891 - 5897.
54. Keynan Y, CM Card, PJ McLaren *et al.*: „The role of regulatory T cells in chronic and acute viral infections.“ *Clinical Infectious Diseases* 2008, 46, 1046-1052.
55. Kohyama M, D Sugahara, S Sugiyama *et al.*: “Inducible costimulator-dependent IL-10 production by regulatory T cells specific for self-antigen.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101, 4192-4197.
56. Kumar V, A Sharma: “Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential.” *Eur J Pharmacol* 2009, 616, 7-15.
57. Leal DB, CA Streher, M Bertoncheli Cde *et al.*: “HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes.” *Biochim Biophys Acta* 2005, 1746, 129-134.
58. Lifson A: „Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexuell and bisexuell men with normal CD4<sup>+</sup> lymphocyte counts: Immunological and virological characteristics.“ *J Infect Dis* 1991, 163, 959-965.
59. Liu H, D Chao, EE Nakayama *et al.*: „Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96, 4581-4585.
60. Liu R, WA Paxton, S Choe *et al.*: „Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.“ *Cell* 1996, 86, 367-377.
61. Liu W, A Putman, Z Xu-yu *et al.*: „CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> cells.“ *J Exp Med* 2006, 203, 1701-1711.
62. Loeuillet C, S Deutsch, A Ciuffi *et al.*: „In vitro whole genome analysis identifies a susceptibility locus for HIV.“ *Plos Biol* 2008, 6, e32.doi:10.1371.
63. Maliszewski CR, GJ Delespesse, MA Schoenborn *et al.*: “The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization.” *J Immunol* 1994, 153, 3574-3583.
64. Mandapathil M, B Hilldorfer, MJ Szczepanski *et al.*: “Generation and Accumulation of Immunosuppressive Adenosine by Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells.“ *J Biol Chem* 2010, 285, 7176-7186.

65. Manigold T, V Racanelli: „T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies.“ *Lancet Infect Dis* 2007, 7, 804-813.
66. Maplanka C: „AIDS: Is there an answer to the global pandemic? The immune system in HIV infection and control.“ *Viral Immunology* 2007, 20:3, 331-341.
67. Marie JC, JJ Letterio, M Gavin *et al*: „TGF $\beta$  1 maintains suppressor function and FoxP3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells.“ *J Exp Med* 2005, 201, 1061-1067.
68. Marshall NF, DH Price: „Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes.“ *Mol Cell Biol* 1992, 12, 2078-2090.
69. Martin MP, Y Qi, X Gao *et al*: „Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1.“ *Nat Genet* 2007, 39, 733-740.
70. McMichael AJ, P Borrow, GD Tomaras *et al*: „The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development.“ *Nature Reviews Immunology* 2010, 10, 11-23.
71. Mellors JW, LA Kingsley, CR Rinaldo *et al*: „Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion.“ *Annals of Internal Medicine* 1995, 122:8, 573-579.
72. Moncrieffe H, K Nistala *et al*: „High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population.“ *J Immunol* 2010, 185, 134-143.
73. Montagnier L, JC Chermann, F Barrè-Sinoussi *et al*: „A new human T-lymphotropic retrovirus: Characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes.“ *New York: Cold Spring Harbor Laboratory*, 1984.
74. Moreno-Fernandez ME, W Zapata, JT Blackard *et al*: “Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain.” *J Virol* 2009, 83, 12925-12933.
75. Morgan ME, JHM van Bilsen, AM Bakker *et al*: “Expression of FoxP3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T regulatory cells in humans.” *Human Immunology* 2005, 66, 13-20.
76. Ndhlovu LC, FE Leal, IG Eccles-James *et al*: “A novel human CD4<sup>+</sup> T-cell inducer subset with potent immunostimulatory properties.” *Eur J Immunol* 2010, 40, 134-141.
77. Newman EN, RK Holmes, HM Craig *et al*: „Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity.“ *Curr Biol* 2005, 15, 166-170.
78. Nikolova M, M Carriere, MA Jenabian *et al*: „CD39/Adenosine pathway is involved in AIDS progression.“ *Plos Pathog* 2011, 7, e1002110.doi:10.1371.
79. Nilsson J, A Boasso, PA Velilla *et al*: „HIV-1 driven regulatory T cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS.“ *Blood* 2006, 108, 3808-3817.
80. Nisole S, JP Stoye, A Saïb: „TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence.“ *Nat Rev Microbiol* 2005, 3, 799-808.
81. Oswald-Richter K, SM Grill, M Leelawong *et al*: „Identification of a CCR5<sup>-</sup> expressing T cell subset that is resistant to R5-tropic HIV infection.“ *PloS Pathog* 2007, 3, e58.
82. Oswald-Richter K, SM Grill, N Shariat *et al*: „HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T cells.“ *PLoS Biology* 2004, 2, 0955-0966.
83. Pace MJ, L Agosto, EH Graf, U O’Doherty: „HIV reservoirs and latency models.“ *Virology* 2011, 411, 344-354.
84. Pantaleo G, C Graziosi, J Demarest *et al*: „HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinical latent stage of disease.“ *Nature* 1993, 362, 355-358.
85. Pereyra.F, MM Addo *et al*: “Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy.” *J Infect Dis* 2008, 197, 563-571.
86. Piantoni L, C Fenizia, V Naddeo *et al*: „Not just sheer luck! Immune correlates of protection against HIV-1 infection.“ *Vaccine* 2008, 26, 3002-3007.

87. Piacentini L, M Biasin, C Fenizia, M Clerici: „Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within.“ *Journal of Internal Medicine* 2008, 265, 110-124.
88. Picker LJ, IH Shokoet *al*: „Insufficient Production and Tissue Delivery of CD4<sup>+</sup>Memory T Cells in Rapidly Progressive Simian Immunodeficiency Virus Infection.“ *J Exp Med* 2004, 200, 1299-1314.
89. Popovic M, MG Sarngradharan, E Read, RC Gallo: „Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.“ *Science* 1984, 224, 497-500.
90. Prendergast A, JG Prado, YH Kang *et al*: „HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161<sup>+</sup> Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells.“ *Aids*.
91. Read S, V Malmstrom, F Powrie: „Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation.“ *J Exp Med* 2000, 192, 303-309.
92. Riley JL, CH June and BR Blazer: „Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning.“ *Immunity* 2009, 30, 656-665.
93. Roncador G, PJ Brown, L Maestre *et al*: „Analysis of FoxP3 protein expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells at the single-cell level.“ *Eur J Immunol* 2005, 35, 1681-1691.
94. Rosenberg Y, A Anderson, R Pabst: „HIV-induced decline in blood CD4/CD8 ratios: viral killing or altered lymphocyte trafficking.“ *Immunology Today* 1998, 19, 10-16.
95. Rowe M, Hildreth JE, Rickinson AB, Epstein MA: „Monoclonal antibodies to Epstein-Barr virus-induced, transformation-associated cell surface antigens: binding patterns and effect upon virus-specific T-cell cytotoxicity.“ *Int J Cancer* 1982, 29, 373-381.
96. Saha K, Zhang J, Gupta A *et al*: „Isolation of primary HIV-1 that target CD8<sup>+</sup> T lymphocytes using CD8 as a receptor.“ *Nat Med* 2001, 7, 65-72.
97. Sakaguchi S: „Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses.“ *Annu Rev Immunol* 2004, 22, 531-562.
98. Sakaguchi S, N Sakaguchi, M Asano *et al*: „Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.“ *J Immunol* 1995, 155, 1151-1164.
99. Samson M, F Libert, BJ Doranz *et al*: „Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene.“ *Nature* 1996, 382, 722-725.
100. Scotto L, AJ Naiyer, S Galluzzo *et al*: „Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and antigen specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T suppressor cells.“ *Hum Immunol* 2004, 65, 1297-1306.
101. Seddiki N, AD Kelleher: „Regulatory T cells and HIV infection: who's suppressing what?“ *Curr HIV/AIDS Rep.* 2008, 5:1, 20-26.
102. Seddiki N, B Santner-Nanan, J Martinson *et al*: „Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells.“ *J Exp Med* 2006, 203, 1693-1700.
103. Seddiki N, B Santner-Nanan, SG Tangye *et al*: „Persistence of naive CD45RA<sup>+</sup> regulatory T cells in adult life.“ *Blood* 2006, 107, 2830-2838.
104. Selliah N, M Zhang, S White *et al*: „FoxP3 inhibits HIV-1 infection of CD4 T cells via inhibition of LTR transcriptional activity.“ *Virology* 2008, 381, 116-117.
105. Sempere JM, V Soriano, JM Benito: „T regulatory cells and HIV infection.“ *AIDS Review* 2007, 9, 54-60.
106. Sitkovsky M, D Lukashev, S Deaglio *et al*: „Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells.“ *Br J Pharmacol* 2008, 153, Suppl1, 457-464.
107. Streeck H, JS Jolin, Y QI *et al*: „Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4<sup>+</sup> T cells.“ *J Virol* 2009, 83, 7641-7648.

108. Stremlau M, CM Owens, MJ Perron *et al*: „The cytoplasmatic body component TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in Old World monkeys.“ *Nature* 2004, 427, 848-853.
109. Terzieva V: „Regulatory T cells and HIV-1 Infection.“ *Viral Immunology* 2008, 21:3, 285-291.
110. UNAIDS „2010 AIDS Epidemic Update“  
[www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/Epidemiology/epidemiologySlidesAuto.asp](http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/Epidemiology/epidemiologySlidesAuto.asp)
111. Vasilescu A, Y Terashima, M Enomoto *et al*: „A haplotype of the human CXCR1 gene protective against rapid disease progression in HIV-1<sup>+</sup> patients.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104, 3354-3359.
112. Velu V, K Titanji, B Zhu *et al*: „Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade.“ *Nature* 2009, 458, 206-210.
113. Wainberg MA, KT Jeang: „25 years of HIV-1 research , progress and perspectives.“ *BMC Medicine* 2008, 6:31, doi:10.1186/1741-7015/6/31.
114. Walker BD, DR Burton: „Toward an AIDS vaccine.“ *Science* 2008, 320, 760-764.
115. Weiss L, V Donkova-Petrini, L Caccavelli *et al*: „Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients.“ *Blood* 2004, 104, 3249-3256.
116. Wei X, SK Ghosh, ME Taylor *et al*: „Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.“ *Nature medicine* 1995, 373, 117-122.
117. White DO, FJ Fenner: „Medical Virology“ *Academic Press* 1994, San Diego.
118. Wong-Staal F: *Fundamental Virology*, „HIVs and their replication.“ *Raven Press* 1991, Ltd, New York.
119. Yagi H, T Nomura, K Nakamura *et al*: „Crucial role of FoxP3 in the development and function of human CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells.“ *Int Immunol* 2004, 16, 1643-1656.
120. Zack JA, SJ Arrigo, SR Weitsman *et al*: „HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure.“ *Cell* 1990, 61, 213-222.
121. Ziegler SF: „FoxP3: of mice and men.“ *Annu Rev Immunol* 2006, 24, 209-226.

## **VII. Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Jan van Lunzen und meinem Betreuer Dr. Julian Schulze zur Wiesch für das interessante Thema, die finanzielle und intellektuelle Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit und ihre Geduld mit mir. Für ihre technische Hilfe in der Ausführung der Experimente, bei der Analyse der Ergebnisse und ihren emotionalen Beistand danke ich Kristina Colberg, Silke Kummer und Philip Hartjen. Joachim und Ilona Hauber sowie den restlichen MitarbeiterInnen der Abteilung für Zellbiologie und Virologie des Heinrich-Pette-Institutes für experimentelle Virologie und Immunologie danke ich für die Kooperation und Unterstützung meiner Arbeit und für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die angenehme Arbeitsatmosphäre, Janine Mohn danke ich für ihre Hilfe beim Rekrutieren der Patientenproben und Arne Düsedau sowie der Firma BectonDickensen danke ich für die Schulung in der Durchflußzytometrie. Insbesondere danke ich allen Patienten und den sie betreuenden Ärzten in Hamburg, Hannover, Köln, Bonn, Frankfurt und Düsseldorf für die Unterstützung meiner Arbeit, sowie Frau Katharina Wasmus und den Mitarbeitern des Ambulanzentrums für Blutentnahmen und Koordination der Patiententermine. Zudem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre unermessliche Geduld und Nachsicht.

## Curriculum vitae

Name: Adriana Magdalena Thomssen  
Geburtsdatum: 19. August 1986  
Geburtsort: München  
Wohnhaft: Isestraße 2, 20144 Hamburg  
Familienstand: ledig

### Beruflicher Werdegang

Seit 2011 Assistentärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

### Schulbildung und Studium

2011 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation  
2010 - 2011 Praktisches Jahr (Wahlfach Pädiatrie)  
2008 - 2010 Dissertation: „Analyse regulatorischer T-Zellen in der HIV-1 Infektion: Die CD39 Expression der FoxP3<sup>+</sup> T regulatorischen Zellen korreliert mit dem progressiven Krankheitsverlauf.“<sup>1</sup>. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg (Betreuung: Prof. Dr. med. J. van Lunzen, Dr. med. J. Schulze zur Wiesch)  
2006 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2004 Immatrikulation an der Universität Hamburg, Fachbereich Medizin  
1996 - 2004 Gelehrtenschule des Johanneums, Hamburg  
1992 - 1996 Grundschule am Schererplatz, München

### Praktika

2010/2011 Praktisches Jahr:  
Asklepios Klinik Altona, Hamburg: Innere Medizin  
Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg: Pädiatrie  
Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg: Chirurgie  
2009 Famulatur: Internistische Notaufnahme, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg  
2007 Famulatur: Pädiatrie, Provincial Hospital, Stanger, Südafrika  
2007 Famulatur: Infektiologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

Publikation

Schulze zur Wiesch J, Thomssen A et al (2011): „*Comprehensive Analysis of Frequency and Phenotype of T Regulatory Cells in HIV Infection: CD39 expression on FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells in HIV infection correlates with disease progression.*” Journal of Virology, Vol. 85, No. 3 (geteilte Autorenschaft)

Vorträge und Poster

- 2011 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) Boston, USA. Poster: „*CD39 expression of FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells correlates with progressive HIV disease.*”
- 2010 American Association for the study of Liver Diseases (AASLD), The Liver Meeting, Boston, USA. Poster: „*Imbalance of regulatory T cell (T<sub>reg</sub>) frequencies in HIV-1/HCV coinfection correlates mainly with HIV disease progression.*”
- 2010 Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT), Köln, Deutschland. Vortrag: „*Die Expression des immunmodulatorischen Moleküls CD39 auf regulatorischen T-Zellen korreliert mit der Krankheitsprogression in der HIV Infektion.*“
- 2009 Deutsch-Schweiz-Österreichischer AIDS Kongress (SÖDAK), St Gallen, Schweiz. Vortrag: „*Frequency and phenotype of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells are associated with disease progression in HIV-1 infected patients.*”

Preis

- 2010 Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, Köln, Deutschland: 1. Preis für den besten wissenschaftlichen Beitrag: „*Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression on FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells in HIV infection correlates with disease progression.*”

**IX. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 22. November 2012

Adriana Magdalena Thomssen