

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und  
Rheumatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkung von regulatorischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auf Monozyten in der  
HIV-Infektion

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mira Fehr

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.09.2015

# Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	6
Zusammenfassung.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1. Einleitung.....	11
1.1 Das Humane Immundefizienz-Virus.....	11
1.2 Pathogenese der HIV-Infektion.....	12
1.2.1 Infektion durch HIV.....	12
1.2.2 Chronische systemische Immunaktivierung im Rahmen der HIV-Infektion.....	12
1.2.3 Ursachen für die chronische Immunaktivierung in der HIV-Infektion.....	13
1.3 Monozyten und Makrophagen in der HIV-Infektion .....	15
1.3.1 Bedeutung von Monozyten und Makrophagen für die Immunabwehr.....	15
1.3.2 Intestinale Makrophagen .....	16
1.3.3 Monozyten und Makrophagen in der HIV-Infektion .....	16
1.4 Regulatorische T-Zellen in der HIV-Infektion.....	18
1.4.1 FOXP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen in der Regulation von Immunantworten.....	18
1.4.2 Treg in der HIV-Infektion.....	18
1.5 Geschlechtsspezifische immunologische Unterschiede in der HIV-Infektion.....	20
1.5.1 Immunologische Unterschiede zwischen Männern und Frauen .....	20
1.5.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der HIV-Infektion.....	20
1.6 Zielsetzung und Fragestellung.....	22
2. Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Technische Geräte.....	24
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3 Chemikalien.....	25
2.1.4 Puffer und Medien.....	25
2.1.5 Kommerzielle Komplettsysteme.....	26
2.1.6 Antikörper.....	27
2.2 Patientendaten.....	28
2.3 Zellisolierung.....	29
2.3.1 PBMC-Isolierung.....	29

2.3.2 Isolierung von Lamina propria Lymphozyten .....	30
2.3.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung.....	31
2.3.4 Magnetische Zellseparation.....	31
2.3.4.1 Magnetische Zellseparation, Miltenyi.....	31
2.3.4.2 Magnetische Zellseparation, StemCell .....	32
2.3.4.3 Kontrolle der Reinheit der magnetisch isolierten Zellen.....	32
2.4 Kultivierung mit Monozyten und T-Zellen.....	32
2.5 Durchflusszytometrie.....	34
2.5.1 Nachweis von Oberflächenmolekülen .....	34
2.5.2 Nachweis des intranukleären Moleküls FOXP3.....	34
2.5.3 Phänotypische Analyse kultivierter Zellen.....	35
2.6 Messung der Phagozytoserate von Monozyten und Makrophagen.....	35
2.6.1 Messung der Phagozytoserate von Monozyten aus Kokulturen mit Latexpartikeln...35	
2.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Phagozytostests mit Latexpartikeln.....	36
2.6.3 Messung der Phagozytoserate von Monozyten und Makrophagen mit pHrodo .....	37
2.7 Quantifizierung von Effektormolekülen im Überstand der Kokulturen.....	37
2.8 Statistik.....	38
3. Ergebnisse.....	39
3.1 Vergleich der magnetischen Zellseparation der Hersteller Miltenyi und StemCell .....	39
3.2 Kokulturen mit Monozyten und T-Zellen .....	40
3.2.1 Einfluss von Treg auf die Differenzierung von Monozyten .....	42
3.2.1.1 Expression des Differenzierungsmoleküls CD14 auf Monozyten.....	42
3.2.1.2 Expression der anti-inflammatorischen Differenzierungsmoleküle CD163 und CD206.....	43
3.2.1.3 Expression der pro-inflammatorischen Differenzierungsmoleküle HLA-DR und CD16.....	44
3.2.1.4 Expression des Aktivierungsmoleküls CD64 und des kostimulatorischen Moleküls CD86.....	45
3.2.1.5 Expression der inflammatorischen und intestinalen Migrations-Moleküle CXCR3, CX3CR1, CCR2 und Integrin- $\beta$ 7.....	46
3.2.1.6 Expression der HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4.....	48

3.2.2 Untersuchung der Zytokinkonzentration in den Zellkulturüberständen der Kokulturen mit Monozyten und T-Zellen .....	50
3.2.2.1 Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ und des regulatorischen Zytokins IL-10 in Zellkulturüberständen nach Kokultivierung mit Monozyten und T-Zellen.....	50
3.2.2.2 Konzentration der Chemokine CCL2, CCL4, CCL5 und CX3CL1 in Zellkulturüberständen nach Kokultivierung mit Monozyten und T-Zellen.....	52
3.3 Untersuchung der Phagozytoseaktivität von Monozyten im Blut und intestinalen Makrophagen von HIV-seropositiven Patienten und HIV-seronegativen Kontrollen.....	54
3.4 Einfluss von Treg auf die Phagozytoseleistung von Monozyten.....	55
3.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Phagozytoseleistung von Monozyten mit Latexpartikeln.....	55
3.4.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Phagozytoseleistung von Monozyten mit Latexpartikeln .....	56
3.5 Geschlechtsspezifische phänotypische und funktionelle Unterschiede von Monozyten nach Kokultivierung mit T-Zellen .....	57
3.5.1 Phänotypische geschlechtsspezifische Unterschiede.....	58
3.5.2 Funktionelle geschlechtsspezifische Unterschiede.....	61
4. Diskussion.....	64
4.1 Etablierung eines <i>in vitro</i> -Modells zur Wirkung von Treg auf Monozyten in der HIV-Infektion.....	64
4.2 Wirkung von Treg auf die Differenzierung von Monozyten in der HIV-Infektion.....	64
4.3 Wirkung von Treg auf die Expression von Chemokinrezeptoren und die Sekretion von Chemokinen durch Monozyten in der HIV-Infektion.....	68
4.4 Wirkung von Treg auf die Phagozytosefähigkeit von Monozyten und Makrophagen in der HIV-Infektion.....	69
4.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Wirkung von Treg auf die Differenzierung von Monozyten .....	70
4.6 Klinische Bedeutung.....	71
4.7 Ausblick.....	72
5. Literaturverzeichnis .....	74
6. Danksagung.....	83

7. Lebenslauf.....	84
8. Publikationsliste.....	86
9. Eidesstattliche Versicherung.....	87
10. Anteilserklärung .....	88

## Abstract

**Introduction:** Chronic immune activation is a hallmark of HIV infection. It is the best predictor of disease progression and contributes to overall increased morbidity and mortality. Intestinal barrier damage promotes microbial translocation and consequently immune activation. Intestinal macrophages are important for limiting microbial translocation. However, monocytes and macrophages are affected in HIV-infected persons. They show an inflammatory phenotype and produce an increased amount of inflammatory cytokines. Regulatory T cells (Treg) can induce an anti-inflammatory differentiation of monocytes. It is unclear, if they maintain this regulatory function in HIV infection.

**Methods:** Magnetic cell sorting was used to isolate CD14<sup>+</sup> monocytes, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T Cells (Teff) from the blood of healthy controls and treatment-naive or cART-treated HIV-infected patients. Monocytes were cocultured with autologous Treg or Teff. Using flow cytometry, monocytes were analysed phenotypically and supernatant cytokine concentration was assessed. Phagocytic capacity of cocultured monocytes, monocytes from the blood and duodenal macrophages was analyzed.

**Results:** The data indicates that Treg lose their ability to induce an anti-inflammatory differentiation of monocytes in HIV infection. Their regulatory capacity is only partially restored with cART. Phagocytic capacity of blood monocytes decreases in HIV infection but normalises with cART. Intestinal macrophages show a decreased phagocytic capacity. Treg have no effect on the phagocytic capacity of monocytes. Treg induce a stronger anti-inflammatory differentiation of monocytes in healthy men compared to healthy women.

**Conclusion:** This study is the first to show the inability of Treg to induce an anti-inflammatory differentiation of monocytes in HIV infection. The loss of their regulatory function is only partially restored with cART and might contribute to the chronic immune activation in HIV infection.

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Die chronische systemische Immunaktivierung ist charakteristisch für eine HIV-Infektion. Sie stellt den derzeit wichtigsten Marker für einen Krankheitsfortschritt dar und trägt zu der auch unter der Behandlung mit cART erhöhten Morbidität und Mortalität bei. Durch eine Schädigung der intestinalen Barriere kommt es zu einer mikrobiellen Translokation, welche die Immunaktivierung begünstigt. Intestinale Makrophagen können die mikrobielle Translokation normalerweise begrenzen. Allerdings zeigen Monozyten und Makrophagen in der HIV-Infektion vermehrt einen pro-inflammatorischen Phänotyp, eine verminderte Phagozytosefähigkeit und ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil. Regulatorische T-Zellen (Treg) können eine anti-inflammatorische Differenzierung von Monozyten induzieren. Es ist bisher nicht verstanden, ob Treg auch in der HIV-Infektion ihren regulatorischen Einfluss auf Monozyten ausüben können.

**Methodik:** Durch magnetische Zellseparation wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Effektor T-Zellen (Teff) aus dem Blut HIV-seronegativer gesunder Kontrollen sowie naiver und mit cART behandelter HIV-seropositiver Patienten isoliert. Die Monozyten wurden zusammen mit autologen Treg bzw. Teff kultiviert. Anschließend wurden die Monozyten phänotypisch sowie Zytokine im Zellkulturüberstand durchflusszytometrisch untersucht. Es erfolgten Phagozytostests mit kokultivierten Monozyten, Monozyten aus dem Blut und duodenalen Makrophagen.

**Ergebnisse:** Die erhobenen Daten deuten daraufhin, dass Treg die Fähigkeit einen anti-inflammatorischen Phänotyp und Zytokinprofil bei Monozyten zu induzieren in der HIV-Infektion verlieren und sich auch unter der Behandlung mit cART nur eine teilweise Wiederherstellung zeigt. Monozyten und Makrophagen von naiven HIV-seropositiven Patienten zeigten eine verminderte Phagozytosefähigkeit. Diese konnte durch Treg nicht beeinflusst werden. Treg bewirkten bei Monozyten von gesunden männlichen Probanden eine stärkere anti-inflammatorische Differenzierung im Vergleich zu gesunden weiblichen Probanden.

**Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Störung in der Treg-vermittelten Regulation der Monozytendifferenzierung in der HIV-Infektion gezeigt werden. Während Treg bei Monozyten von gesunden Kontrollen eine anti-inflammatorische

Differenzierung induzieren können, verlieren sie diese Fähigkeit in der HIV-Infektion und können sie unter der Behandlung mit cART nur teilweise wiedererlangen. Dieser Regulationsdefekt kann zu der systemischen Immunaktivierung in der HIV-Infektion beitragen.



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> , erworbenes Immunschwäche-syndrom
APC	Allophycocyanin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
cART	<i>combined antiretroviral therapy</i> , antiretrovirale Kombinationstherapie
°C	Grad Celsius
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> , CD-Marker
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Erdbeschleunigung
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , Humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
LPL	Lamina propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid
m	männlich
mAb	<i>monoclonal antibodies</i> , monoklonale Antikörper
ml	Milliliter
MACS	<i>magnetic cell separation</i> , magnetische Zellseparation
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
sCD14	<i>soluble CD14</i> , lösliches CD14
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulative T-Zellen
Teff	Effektor T-Zellen

u.w.	und weitere
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
$\mu$	Mikro

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Humane Immundefizienz-Virus

Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) wurde erstmals im Jahr 1983 beschrieben (1). Es kann über Körperflüssigkeiten wie Blut oder Sperma von Mensch zu Mensch übertragen werden, meist im Rahmen von sexuellen Kontakten oder durch kontaminierte Nadeln bei intravenösem Drogengebrauch. Es werden zwei verschiedene Typen des Virus unterschieden. Während sich HIV Typ 1 (HIV-1) pandemisch ausgebreitet und viele Millionen Leben gefordert hat, kommt HIV-2 primär in Westafrika vor und zeigt einen günstigeren klinischen Verlauf.

Der typische Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion beginnt mit einer starken, besonders intestinalen, CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Depletion und Anstieg der Plasma-Viruslast, der freien Viren im Blut. Nach einigen Wochen kommt es zu einem partiellen Wiederanstieg der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut und einem Absinken der Plasma-Viruslast. Über mehrere Jahre besteht nun eine asymptomatische chronische Phase, die schließlich in eine symptomatische Phase und das erworbene Immunschwächesyndrom (englisch: AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*) übergeht. Dieses ist durch das Auftreten opportunistischer Infektionen und maligner Erkrankungen gekennzeichnet.

Eine antivirale Immunität ist zwar bei den meisten HIV-seropositiven Personen in Form von z.B. spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und HIV-spezifischen Antikörpern nachweisbar. Die langfristige Kontrolle bzw. die Eradikation des Virus gelingt dem Immunsystem jedoch nicht.

Während in den ersten Jahren nach Entdeckung des HI-Virus ein positiver HIV-Test eine in der Regel infauste Prognose bedeutete, haben sich die Behandlungsmöglichkeiten in den letzten Jahren deutlich verbessert. Mit Hilfe der antiretroviralen Kombinationstherapie (cART) konnte die Lebenserwartung deutlich gesteigert (2) und die Ansteckungsgefahr reduziert werden (3). Die Patienten leiden jedoch weiterhin unter den Folgen der Infektion. Diese bestehen mittlerweile weniger in opportunistischen Infektionen sondern v.a. in HIV-assoziierten neurokognitiven Defiziten und kardiovaskulären sowie malignen Tumorerkrankungen nach langjähriger Infektion (4-8).

## **1.2 Pathogenese der HIV-Infektion**

### **1.2.1 Infektion durch HIV**

Als Retrovirus nutzt HIV zur Vermehrung CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, kann aber auch z.B. Monozyten oder dendritische Zellen infizieren. Das Oberflächenmolekül CD4 dient hierbei als Rezeptor für das Virus. Zusätzlich wird von dem Virus ein Korezeptor genutzt, dabei handelt es sich um eines der Oberflächenmoleküle CCR5 und CXCR4 (9). Sowohl durch die infektionsbedingten zytopathischen Effekte als auch durch aktivierungsinduzierte Apoptose und die Funktion von zytotoxischen T-Zellen kommt es zum Absterben von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen und somit zu einer progressiven Abnahme der CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl.

Mehr als die Hälfte aller CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen des Körpers befinden sich im Gastrointestinaltrakt (10), der deshalb den Hauptangriffsort für HIV darstellt (11, 12). Bereits in den ersten Wochen nach einer Infektion mit HIV kommt es zu einer massiven Depletion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Darm (12, 13) und zu einer Schädigung der intestinalen Barriere (10, 14). Dieser CD4<sup>+</sup>-T-Zellverlust im Darm erfolgt lange bevor ähnliche Veränderungen im Blut oder in den peripheren Lymphknoten beobachtet werden können (13) und das Ausmaß der intestinalen CD4<sup>+</sup>-T-Zell Depletion beeinflusst die Progression zum Krankheitsstadium AIDS (15).

### **1.2.2 Chronische systemische Immunaktivierung im Rahmen der HIV-Infektion**

Ein wichtiger Parameter des Krankheitsfortschritts einer HIV-Infektion ist die systemische Überaktivierung des Immunsystems, welche ein Fortschreiten der Erkrankung besser anzeigt als die Viruslast im Plasma (16, 17). Auch unter cART ist eine anhaltende Immunaktivierung mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert (5, 18).

Die Immunaktivierung ist gekennzeichnet durch eine polyklonale B-Zellaktivierung, eine erhöhte inflammatorische Aktivität von T-Zellen und Monozyten sowie, damit einhergehend, einer erhöhten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine (19). Aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen haben eine deutlich verkürzte Lebensdauer, sodass die chronische Immunaktivierung zum kontinuierlichen Verlust der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen beiträgt.

Ein serologischer Parameter der Immunaktivierung ist z.B. lösliches CD14 (sCD14) (10, 17). CD14 wird auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimiert und kann von aktivierten Monozyten in löslicher Form als sCD14 freigesetzt werden (17). Als Rezeptor für bakterielle Bestandteile, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), spielt CD14 eine wichtige Rolle für die Erkennung und Abwehr von Pathogenen. In HIV-infizierten Personen, auch unter cART,

weisen erhöhte sCD14-Plasmaspiegel auf eine bakteriell induzierte inflammatorische Aktivität von Monozyten hin (17).

Der andauernde Entzündungszustand kann zu Schäden an Blutgefäßen führen und somit kardiovaskuläre Erkrankungen begünstigen (20, 21). Es wird deshalb angenommen, dass die chronische Immunaktivierung eine wichtige Rolle für die erhöhte Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei HIV-seropositiven Patienten, auch unter cART, spielt.

### **1.2.3 Ursachen für die chronische Immunaktivierung in der HIV-Infektion**

Die Ursachen für die Entstehung der chronischen Überaktivierung des Immunsystems sind bis heute nicht vollständig verstanden. Eine mögliche Ursache ist die Aktivierung des Immunsystems durch das Virus. Weiterhin wurde eine Störung der Homöostasis von T-Zellen als mögliche Ursache für die Immunaktivierung beschrieben (22).

Als ein anderer wichtiger Auslöser der systemischen Immunaktivierung gilt die Beeinträchtigung der intestinalen Barrierefunktion, in deren Folge vermehrt mikrobielle Produkte aus dem Darmlumen in die Zirkulation gelangen und inflammatorisch wirken (10). Dies kann auch bei anderen Krankheiten, wie z.B. entzündlichen Darmerkrankungen oder Transplantat-Wirt-Reaktionen als Folge einer allogenen Stammzelltransplantation beobachtet werden (23, 24).

Im intestinalen Lumen befinden sich etwa  $10^{14}$  Bakterien - mehr als humane Zellen im gesamten Körper (25). Die Besiedlung des Darms mit kommensalen Mikroorganismen spielt eine wichtige Rolle für eine regelrechte Verdauung und ist essenziell für die Funktionalität und Entwicklung der Immunabwehr (25, 26). Treten die Mikroorganismen oder deren Bestandteile jedoch in den systemischen Kreislauf über, kann es fatale Folgen haben und z.B. zu einer Sepsis oder Immunaktivierung führen. Aus diesem Grund gibt es eine intestinale Barriere, die aus mehreren hintereinander geschalteten Systemen besteht und die mikrobielle Translokation verhindert. Luminale IgA, antimikrobiotische Defensine und die Schleimschicht über dem Epithel bilden die erste Schicht (27). Darunter befindet sich die epitheliale Barriere aus dicht aneinander sitzenden und über Verschlüsse, tight junctions, eng verbundenen Epithelzellen (25, 28). Unterhalb des intestinalen Epithels in der Lamina propria findet sich als immunologische Barriere die größte Anzahl von Immunzellen im Körper (29). Vor allem Makrophagen sind dafür verantwortlich, körperfremde Partikel zu beseitigen, sobald diese die epitheliale Barriere überwunden haben. Die hocheffiziente Phagozytose-Aktivität intestinaler Makrophagen kann den Übertritt mikrobieller Bestandteile in den systemischen Kreislauf verhindern.

Während die Schädigung der epithelialen Barriere, die die mikrobielle Translokation begünstigt, bereits in den ersten Wochen nach einer Infektion mit HIV auftritt (14), ist die chronische Immunaktivierung erst später im Verlauf der Krankheit nachweisbar (30). Beispielsweise ist der LPS-Spiegel im Plasma, der als Biomarker für die systemische Anreicherung gramnegativer bakterieller Bestandteile gilt, im Blut von HIV-infizierten Patienten erst in der chronischen Phase der Infektion signifikant erhöht (10).

Dies deutet darauf hin, dass neben dem epithelialen Barrieredefekt im Infektionsverlauf auch immunologische Veränderungen, wie z.B. eine abnehmende Abwehr von mikrobiellen Produkten eine bedeutende Rolle für die Entstehung der chronischen Immunaktivierung spielen.

## 1.3 Monozyten und Makrophagen in der HIV-Infektion

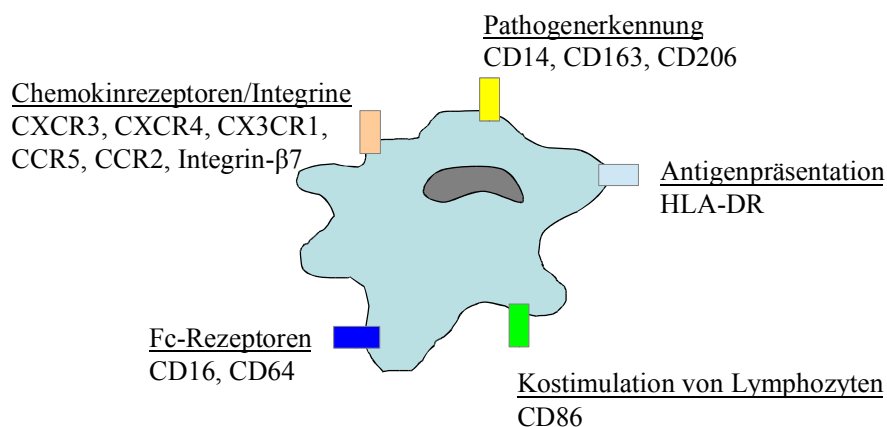
### 1.3.1 Bedeutung von Monozyten und Makrophagen für die Immunabwehr

Monozyten und Makrophagen spielen eine wichtige Rolle für die angeborene Immunabwehr. Mit Hilfe verschiedener Rezeptoren können sie Pathogene erkennen, diese durch Phagozytose eliminieren und über die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen andere Immunzellen aktivieren. Dabei sind Monozyten auch wichtig für die immunologische Homöostase, da sie sowohl inflammatorische Reaktionen einleiten wie auch anti-inflammatorisch wirken und überschießende Immunantworten verhindern können.

Monozyten werden im Knochenmark gebildet und zirkulieren im Blut bevor sie in ein bestimmtes Gewebe einwandern und abhängig von verschiedenen Einflüssen wie pro-inflammatorischen Zytokinen und anderen Immunzellen zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren (31). Man unterscheidet verschiedene Gewebemakrophagen wie z.B. Kupferzellen in der Leber, Mikrogliazellen im Gehirn, Langerhanszellen in der Haut und intestinale Makrophagen im Darm.

Monozyten und Makrophagen zeichnen sich durch eine große Heterogenität und Plastizität aus (32). Die Kombination und Expressionsdichte von verschiedenen Oberflächenmolekülen (Differenzierungsmoleküle, CD-Klassifikation) wie z.B. Chemokinrezeptoren und Integrine, Moleküle für die Erkennung und Präsentation von Antigenen und Kostimulation von T-Zellen kennzeichnen ihre Funktionalität (Abb. 1). Hieraus ergeben sich verschiedene Monozyten- und Makrophagensubtypen.

Abb. 1: Verschiedene Oberflächenmoleküle auf Monozyten und Makrophagen



Sowohl phänotypisch als auch funktionell kann zwischen pro- und anti-inflammatorischen Monozyten/Makrophagen unterschieden werden (33-35).

Während eine hohe Expression des Oberflächenmoleküls HLA-DR mit pro-inflammatorischer Differenzierung assoziiert ist, zeigt sich eine hohe Expression der Oberflächenmoleküle CD206 und CD163 bei anti-inflammatorischen Monozyten. Anti-inflammatorische Monozyten und Makrophagen zeigen eine höhere phagozytotische Kapazität und sind mit T-Helferantworten vom Typ 2 und der Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 assoziiert (36, 37). Eine anti-inflammatorische Differenzierung scheint die typische Differenzierung von Gewebemakrophagen zu sein (38, 39).

Die Abgrenzung von pro- und anti-inflammatorischen Makrophagen ist stark vereinfacht, da es ein komplexes Spektrum verschiedener funktioneller Zustände von Monozyten und Makrophagen zu geben scheint, welches darüber hinaus stark von Plastizität bzw. Wandlungsfähigkeit geprägt ist (40). Die Charakterisierung von Monozyten und Makrophagen anhand von phänotypischen und funktionellen Markern ist aber hilfreich, um eine eher pro-inflammatorische von einer eher anti-inflammatorischen Differenzierung abzugrenzen.

### **1.3.2 Intestinale Makrophagen**

Im Gegensatz zu anderen Gewebemakrophagen können intestinale Makrophagen Mikroorganismen phagozytotisch eliminieren ohne eine inflammatorische Reaktion auszulösen, da sie kein CD14 oder Fc-Rezeptoren für IgA oder IgG exprimieren und nicht auf Stimulation mit z.B. LPS mit der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine reagieren (41, 42). Diese sogenannte „inflammatorische Anergie“ ist wichtig, um eventuell die Barriere überquerende Mikroorganismen oder Fremdkörper zu entfernen ohne eine gewebeschädigende inflammatorische Immunreaktion auszulösen.

Im Rahmen von intestinalen Entzündungen zeigen Makrophagen phänotypische und funktionelle Veränderungen und eine vermehrte pro-inflammatorische Differenzierung neu eingewanderter Monozyten (42).

### **1.3.3 Monozyten und Makrophagen in der HIV-Infektion**

Makrophagen stellen ein bedeutendes Reservoir für das Virus dar, da sie in verschiedene Gewebe einwandern und somit das Virus im Körper verbreiten können (43). So scheinen aktivierte und HIV-infizierte Monozyten, die ins Gehirn einwandern, eine bedeutende Rolle für die HIV-



assoziierte Demenz zu spielen (44).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Monozyten im Blut HIV-Infizierter einen pro-inflammatorischen Phänotyp aufweisen und zur systemischen Immunaktivierung beitragen (45-47). Auch das Zytokinprofil von HIV-infizierten Monozyten ist verändert und durch eine vermehrte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  gekennzeichnet (48). Es konnte weiterhin eine verminderte Phagozytoseleistung von Monozyten bei HIV-Infizierten nachgewiesen werden (49). Die Population der inflammatorischen CD16<sup>+</sup>-Monozyten steigt bei einer HIV-Infektion stark an und eine vermehrte CD16-Expression korreliert mit einer erhöhten Suszeptibilität für HIV (7, 50).

Monozyten und Makrophagen scheinen auch eine Rolle für das vermehrte Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen in der HIV-Infektion, auch unter der Behandlung mit cART, zu spielen (7). Bei chronisch HIV-infizierten Männern konnte vermehrt lösliches CD163 (sCD163) nachgewiesen werden, das als Biomarker für aktivierte Monozyten dient und mit dem Auftreten von nicht-kalzifiziertem koronaren Plaque korreliert sowie möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für vaskuläre Erkrankungen einhergeht (51, 52).

Die genauen Ursachen für die phänotypischen und funktionellen Veränderungen von Monozyten in der HIV-Infektion sind noch nicht abschließend verstanden. Da Monozyten beim Einwandern in ein Gewebe auf eine Vielzahl von Einflüssen wie Zytokine, Pathogene aber auch andere Immunzellen, wie z.B. aktivierte oder regulatorische T-Zellen, treffen, kann eine Infektion mit HIV auf verschiedene Arten die Differenzierung von Monozyten beeinflussen.

## **1.4 Regulatorische T-Zellen in der HIV-Infektion**

### **1.4.1 FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Regulation von Immunantworten**

Regulatorische FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Treg) sind für die Begrenzung und Regulation von Immunantworten verantwortlich. Natürlicherweise verhindern Treg das Überschießen von Immunantworten und schützen das Immunsystem vor einer schädlichen Überaktivierung (53-55). Treg befinden sich in großer Zahl v.a. in inflammatorischem Gewebe (56) um hier Gewebeschäden zu begrenzen. Sie machen ca. 2 % der zirkulierenden T-Zellen aus und können sowohl durch direkten zellvermittelten Kontakt als auch durch Ausschüttung von Zytokinen wie IL-10 regulatorisch auf andere Immunzellen, wie z.B. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), B-Zellen und antigenpräsentierende Zellen wirken (57-59).

Ein Mangel an funktionellen Treg ist mit Autoimmunerkrankungen und Allergien assoziiert (59). Treg können den Verlauf von Infektionen maßgeblich beeinflussen. Sie können Immunantworten gegen verschiedene Erreger, wie z.B. Hepatitis-C-Virus und Herpes-Simplex-Virus supprimieren und so die virale Persistenz begünstigen, zugleich aber auch inflammatorisch bedingte Gewebeschäden verhindern (60).

Seit kurzem ist bekannt, dass Treg auch funktionelle Veränderungen von Monozyten induzieren können. So wurde z.B. gezeigt, dass Treg die Differenzierung von Monozyten zu anti-inflammatorischen Makrophagen herbeiführen, indem sie eine vermehrte Expression der anti-inflammatorischen Oberflächenproteine CD206 und CD163 sowie eine verminderte Expression des pro-inflammatorischen Oberflächenproteins HLA-DR auf Monozyten induzieren, die Phagozytoseleistung erhöhen und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6 und IL-1 $\beta$  herabregulieren (61, 62).

### **1.4.2 Treg in der HIV-Infektion**

Im Gegensatz zur CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Gesamtpopulation, die im Verlauf der Infektion abnimmt, liegen sowohl Daten vor die eine Zunahme als auch eine Abnahme von Treg im Blut zeigen (63, 64). Im Darm kommt es sowohl zu einer relativen als auch einer absoluten Zunahme der Treg (63, 65). Erhöhte Treg-Zahlen wurden auch in lymphatischem Gewebe wie Tonsillen und Lymphknoten HIV-Infizierter nachgewiesen (56). Unter cART konnte eine Abnahme bis zur Normalisierung der Treg in Tonsillen und in der duodenalen Mukosa gezeigt werden, wobei bislang unklar ist, ob die Abnahme der Viruslast oder der Inflammation hierfür ursächlich ist (56).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, HIV-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Immunantworten zu supprimieren, wird vermutet, dass Treg eine Rolle für die Persistenz des Virus spielen (66).

Es ist bisher nicht geklärt, ob Treg durch das Herabregulieren pro-inflammatorischer Immunreaktionen einen vorwiegend günstigen oder durch die Unterdrückung HIV-spezifischer Immunantworten einen eher ungünstigen Einfluss auf den Verlauf einer HIV-Infektion ausüben (58, 66). Auch der Einfluss von Treg auf den Phänotyp und die Funktionalität von Monozyten und Makrophagen in der HIV-Infektion ist weitgehend unbekannt. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass Treg von HIV-Infizierten die Produktion von IL-10 durch Makrophagen stimulieren können, welches die Proliferation HIV-spezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen blockiert (67).

## **1.5 Geschlechtsspezifische immunologische Unterschiede in der HIV-Infektion**

### **1.5.1 Immunologische Unterschiede zwischen Männern und Frauen**

Es ist mittlerweile gut belegt, dass es wesentliche immunologische Unterschiede zwischen den Geschlechtern gibt, die durch verschiedene Faktoren wie X-Inaktivierung, Sexualhormone, Anatomie und Lebensumstände bedingt zu sein scheinen (68). So zeigen Frauen im Allgemeinen eine stärkere zelluläre und humorale Immunantwort, sind weniger anfällig für Infektionskrankheiten als Männer (69, 70) und reagieren stärker auf Impfungen. Im Gegenzug zeigen Frauen aber auch ein erhöhtes Risiko für Autoimmunerkrankungen (71). Auch sind Frauen empfänglicher für sexuell übertragbare Erkrankungen (72). Viele der Unterschiede sind hormonell bedingt, eine maßgebliche Rolle spielt Östrogen (73), dessen Rezeptor auf vielen verschiedenen Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen exprimiert wird. Östrogen kann die Expression des Chemokinrezeptors CCR5 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (74) und die Frequenz von Treg beeinflussen (75). Östrogen kann auch die Expression von CD16 auf Monozyten (76) sowie deren Produktion bestimmter pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 vermindern (77). Insgesamt zeigen Makrophagen von Männern eine höhere Phagozytoseleistung und produzieren mehr pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-6 und TNF- $\alpha$  (73). Dies spricht dafür, dass Infektionen wie z.B. eine HIV-Infektion unterschiedliche Auswirkungen bei Männern und Frauen haben könnten.

### **1.5.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der HIV-Infektion**

Insbesondere in den ersten Jahren der beginnenden AIDS-Epidemie waren die Betroffenen in der Regel männlich. So wurden auch die meisten Studien mit männlichen Probanden, zumeist kaukasischer Herkunft, durchgeführt.

Betrachtet man jedoch die heutige Lage, so zeigt sich insbesondere in Afrika, dass der häufigste Transmissionsweg der zwischen heterosexuellen Partnern ist (78) und besonders Frauen betroffen sind (79). Frauen haben bei heterosexuellem Geschlechtsverkehr ein erhöhtes Risiko für eine Ansteckung mit dem Virus. Dieses Risiko kann weiter erhöht werden durch Geschlechtskrankheiten sowie eine bestimmte hormonelle Situation, also abhängig vom Zyklus und eventuell der Verhütungsmethode (72).

In der Planung von klinischen Studien zur Wirksamkeit von HIV-Medikamenten werden mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede selten betrachtet. Es gibt zwar einige Studien, die

dies auch berücksichtigen, aber eine weibliche Kontrollgruppe ist nicht immer vorgesehen (80). Es gibt Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Wirksamkeit, der Toxizität und Nebenwirkungen von antiretroviralen Medikamenten. So zeigen sich im Blut von Frauen häufig höhere Wirkstoffkonzentrationen der Medikamente (81).

Im Hinblick auf eine HIV-Infektion ist zwar der Endpunkt der Erkrankung bei Männern und Frauen vergleichbar. Aber insbesondere in den ersten Jahren nach Infektion gibt es wesentliche Unterschiede in den Blutwerten, die Basis einer Therapieentscheidung sind. So haben Frauen allgemein mehr CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (82) und zeigen so auch anfangs eine höhere CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl sowie eine geringere Viruslast, also prognostisch eigentlich günstige Werte, schreiten letztlich aber ähnlich schnell zum Krankheitsstadium AIDS fort (83, 84). Es konnte gezeigt werden, dass Frauen insgesamt vor und unter cART etwas bessere virologische, immunologische und klinische Parameter haben (85). Zugleich zeigen Frauen aber auch eine verstärkte Immunaktivierung, also einen prognostisch ungünstigen Marker (86).

Letztlich sind das genaue Ausmaß und die Bedeutung der geschlechtsspezifischen Unterschiede bei einer HIV-Infektion, insbesondere mit Hinblick auf verschiedene Therapieoptionen, noch nicht vollständig verstanden. Bei der Betrachtung immunologischer und HIV-spezifischer Fragestellungen scheint eine Differenzierung zwischen Männern und Frauen deshalb sinnvoll.

## 1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Bei einer HIV-Infektion führt die chronische Überaktivierung des Immunsystems zu einer Erschöpfung von Immunzellen und in der Folge zu einer unzureichenden Immunabwehr gegen ansonsten harmlose Pathogene. Auch unter cART bleibt die Immunaktivierung häufig erhöht und ist vermutlich mitverantwortlich für das Auftreten z.B. kardiovaskulärer Erkrankungen.

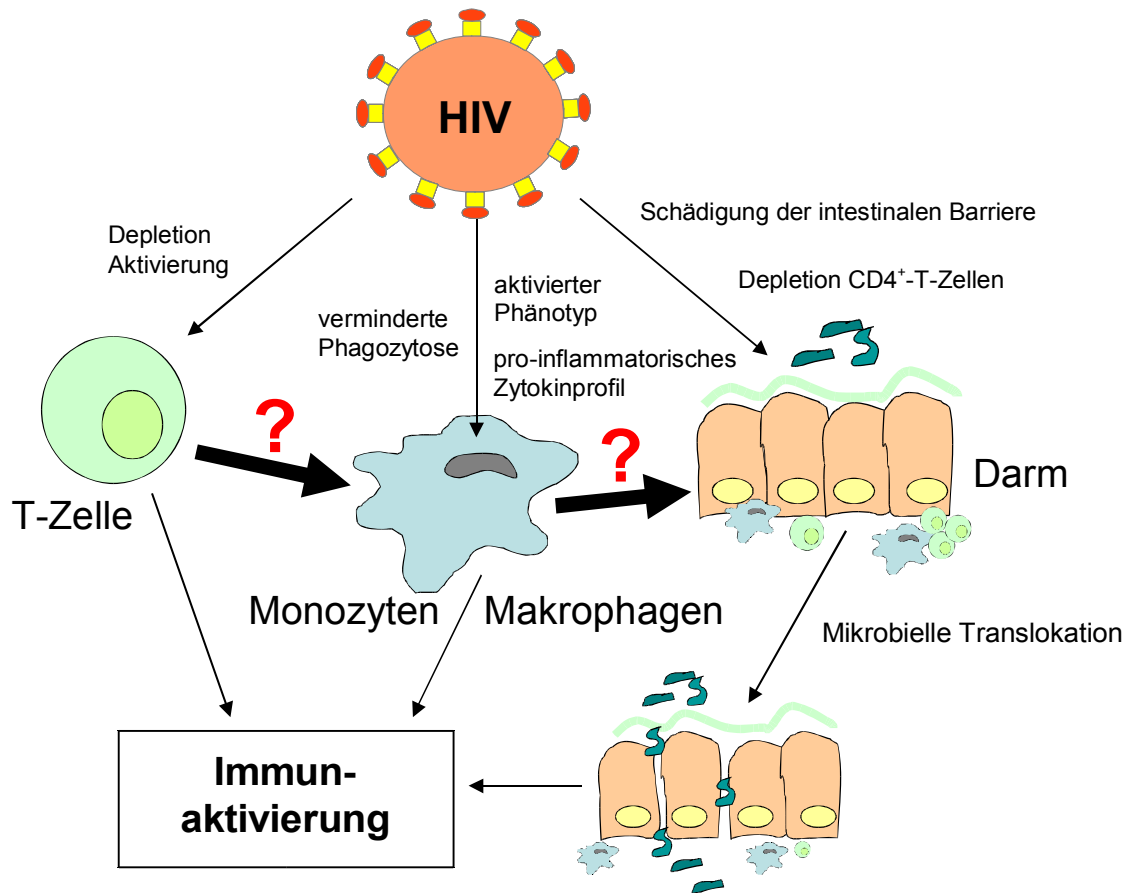
Als ein wichtiger Auslöser dieser chronischen Immunaktivierung gilt die systemische Anreicherung Darm-luminaler Produkte als Folge einer Schädigung der intestinalen Barriere.

Monozyten, die normalerweise körperfremde Partikel schnell und effizient beseitigen und so die systemische Verbreitung entzündungsfördernder Antigene verhindern, sind bei HIV-Infizierten funktionell beeinträchtigt. Eine reduzierte Phagozytosefähigkeit aber auch eine erhöhte pro-inflammatorische Aktivität dieser Zellen fördern die chronische Immunaktivierung. Die Ursachen für diese funktionellen Veränderungen der Monozyten von HIV-infizierten Personen sind bislang nicht verstanden.

Aus *in vitro*-Untersuchungen ist bekannt, dass Treg sowohl die Phagozytose- als auch die Effektorfunktion von Monozyten verändern können. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welche Bedeutung Treg für die Funktionalität von Monozyten in chronisch HIV-infizierten Patienten haben. Es soll außerdem nachgewiesen werden, ob auch intestinale Makrophagen, die die erste Linie der zellvermittelten Verteidigung gegen die mikrobielle Translokation aus dem Darmlumen bilden, bei HIV-Infizierten funktionell verändert sind. Folgende Ziele stehen im Mittelpunkt:

- Es soll ein *in vitro*-Modell für die Untersuchung der Wirkung von Treg auf Monozyten etabliert werden.
- Der Einfluss autologer Treg auf die phänotypische und funktionelle Differenzierung von Monozyten soll bei HIV-infizierten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden.
- Es soll nachgewiesen werden, ob eine Behandlung mit cART eine Wiederherstellung der Treg-Funktion hinsichtlich der Wirkung auf Monozyten bewirken kann.
- Die Phagozytoseleistung von Monozyten im Blut sowie von duodenalen Makrophagen soll bei HIV-infizierten Patienten erfasst und mit gesunden Kontrollpersonen verglichen werden.
- Es soll nachgewiesen werden, ob und welche geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Wirkung von Treg auf Monozyten bestehen.

Abb. 2: Schaubild Fragestellung



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Geräte

Brutschrank	BB15 functions line, Heraeus, Hanau, DE
FACS Calibur	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, DE
Gefrierschränke	-20 °C, -80 °C, ThermoScientific und Herasafe, DE
Kühlschrank	Bosch, DE
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, DE
Schüttler	KM-2 AKKU, Edmund Bühler, Hechingen, DE
Sterilbank	Herasafe, Heraeus, Hanau, DE
Stickstofftank Locator 6plus	Thermolyne, US
Wasserbad	Julabo TW8, Seelbach, DE
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, Megafuge 1.0, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, DE
Zytozentrifuge	Cytospin 2 Cytofuge, Thermo Shandon, Frankfurt, DE
EasySep™ Magnet	STEMCELL Technologies SARL, Köln, DE

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Einfrierröhrchen	1ml, NUNC, DK
Einfrierkisten	Nalgene, DE
Einwegpipetten	5, 10 und 25 ml, BD, Heidelberg, DE
Filterkarte	Whatman, Dassel, DE
Fülltrichter	Thermo Shandon, Frankfurt, DE
konische Röhrchen	15 ml, 50 ml, BD, Heidelberg, DE
Leucosep-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
LS-Säule	Miltenyi Biotech, Gladbach, DE
Objektträger	SuperFrost® Plus; Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäße	1500 µl Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe, DE



Vacutainerröhrchen	heparinbeschichtet, 10 ml, BD, Heidelberg, DE
Zählkammer	HYCOR Biomedical, Kassel, DE
Zellkulturplatten	12-, 24-, 48- und 96-Kavitäten, NUNC, DK
10 ml Spritze	BD, Heidelberg DE
18 G Kanüle, stumpf	BD, Heidelberg DE

### 2.1.3 Chemikalien

Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin, DE
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Darmstadt, DE
Beriglobin	Sigma, München, DE
BSA	Sigma, München, DE
destilliertes Wasser	Ampuwa, Fresenius, DE
EDTA	Sigma, München, DE
FKS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ficoll-Paque Plus ( <i>Natriumdiatrizoat, Dichte: 1,077 ± 0,001g/ml</i> )	GE Healthcare, München, DE
HEPES ( <i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i> )	PAA Laboratories, Pasching, AT
Latexpartikel	Sigma, München, DE
Lysepuffer für Durchflusszytometrie	BD, Heidelberg, DE
PBS	PAA, Pasching, AT
Penicillin-Streptomycin- Lösung	Biochrom, Berlin, DE
PFA	Sigma, München, DE
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
Trypanblau	Sigma, München, DE

### 2.1.4 Puffer und Medien

LPL-Medium	RPMI 1640; 25 mM HEPES; 4 mM L-Glutamin; 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin; 250 µg/ml Amphotericin B; 50 mM β- Mercaptoethanol
Kollagenase-Medium	LPL-Medium, 0,93 % (v/v) DNAase, 0,93 % (v/v) Trypsin-

	inhibitor, 4,67 % (v/v) Kollagenase
MACS-Puffer	90 mM (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O ; 140 mM NaCl; 27 mM KCL; 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 30 % (w/v) BSA; 1mM EDTA (v/v)
PBA (PBS+BSA+Natriumazid)	90 mM (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O; 140 mM NaCl; 27 mM KCL, 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 % (w/v) BSA; 0,02 % (v/v) NaN <sub>3</sub>
PBS, pH 7,6	90 mM (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O ; 140 mM NaCl; 27 mM KCL, 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;
PBS/BSA	90 mM (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O ; 140 mM NaCl; 27 mM KCL, 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 % (w/v) BSA;
Zellkulturmedium R10	RPMI 1640, 25 mM Hepes, 4 mM L-Glutamin; 10 % (v/v) FKS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
Puffermedium für magnetische Zellseparation mit StemCell	PBS, 2 % FBS (v/v), 1mM EDTA (v/v)
FOXP3 Staining Set	eBioscience
FixPerm-Puffer	25 % (v/v) <i>4x Fixation/Permeabilization Concentrate</i> , 75 % (v/v) <i>Fixation/Permeabilization Diluent</i>
1x Perm-Puffer:	Aq. dest., 10 % (v/v) 10x Permeabilization Buffer
FOXP3- Färbepuffer	1x Perm-Puffer, 2 % (v/v) Rattenserum

### 2.1.5 Kommerzielle Komplettsysteme

CBA Flex Set	BD, Heidelberg, DE
pHrodo™ BioParticles Phagocytosis Kit for Flow Cytometry	Molecular Probes (life technologies), Carlsbad, CA, USA
EasySep™ Human CD4+CD25+ T Cell Isolation Kit	STEMCELL Technologies SARL, Köln, DE
EasySep™ Human CD14 Positive Isolation Kit	STEMCELL Technologies SARL, Köln, DE
CD14 MicroBeads human, CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Regulatory T cell isolation kit human	Miltenyi Biotech, Gladbach, DE

## 2.1.6 Antikörper

Tab. 1: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Isotyp	Konjugation	Verdünnung	Klon	Herkunft	Hersteller
CD3	IgG1	PerCP	1:50	SK7	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD3	IgG1	APC	1:100	UCHT1	Maus	eBioscience, Frankfurt a.M. DE
CD3	IgG1	PE	1:50	SK7	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD4	IgG1	APC	1:100	MT310	Maus	Dako, Hamburg, DE
CD4	IgG1	Per-CP Cy5.5	1:100	SK3	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD14	IgG2a	PerCP Cy5.5	1:100	M5E2	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD14	IgG1	APC	1:10	61D3	Maus	eBioscience, Frankfurt a.M. DE
CD16	IgM	APC	1:10	VEP13	Maus	Miltenyi, Biotech, Gladbach, DE
CD25	IgG1	FITC	1:50	CD28.2	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD25	IgG1	APC	1:20	2A3	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD64	IgG1	FITC	1:5	10.1	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD80	IgG1	APC	1:10	MEM-233	Maus	Exbio, Prag, Cz
CD86	IgG1	FITC	1:10	2331(FUN-1)	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD163	IgG1	PE	1:10	GHI/61	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD206	IgG1	APC	1:20	19.2	Maus	BD, Heidelberg, DE
HLA-DR	IgG2a	FITC	1:10	G46-6	Maus	BD, Heidelberg, DE
FOXP3	IgG2a	APC	1:20	PCH101	Ratte	eBioscience, Frankfurt a.M. DE
FOXP3	IgG2a	PE	1:20	PCH101	Ratte	eBioscience, Frankfurt a.M. DE
CCR2	IgG2b	Alexa 647	1:10	48607	Maus	BD, Heidelberg, DE
CCR5	IgG2a	FITC	1:50	2D7/CCR5	Maus	BD, Heidelberg, DE
CXCR3	IgG1	PE	1:10	1C6/CXCR3	Maus	BD, Heidelberg, DE
CXCR4	IgG2a	PE	1:20	12G5	Maus	BD, Heidelberg, DE
CX3CR1	IgG2b	PE	1:20	2A9-1	Ratte	MBL International Woburn, USA
Integrin- $\beta$ 7	IgG2a	FITC	1:20	FIB504	Ratte	eBioscience, Frankfurt a.M. DE

Tab. 2: Antikörper für die Immunfluoreszenz

Spezifität	Name	Konjugation	Verdünnung	Hersteller
DNA	4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)		1:2000	Roche, Mannheim, DE
F-Aktin	Phalloidin	Alexa 647	1:500	Invitrogen, Karlsruhe, DE

Tab. 3: Antikörper für die Zellkultur

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Bezugsquelle
Anti-Human CD3 monoklonale Antikörper	IgG2a	OKT3	Maus	eBioscience, Frankfurt a.M. DE

## 2.2 Patientendaten

Die HIV-seropositiven Patienten sowie die HIV-seronegativen gesunden Kontrollpersonen wurden über die geplanten Untersuchungen informiert und hinsichtlich möglicher Risiken der Blutentnahme aufgeklärt. Als Kontrollen wurden nur gesunde Personen ohne chronische Vorerkrankungen ausgewählt.

Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Insgesamt wurde Blut von acht cART-naiven, d.h. Patienten, die noch nie mit antiretroviralen Medikamenten behandelt worden sind, und sieben mit cART behandelten Patienten untersucht. Die behandelten Patienten wurden nur dann eingeschlossen, wenn sie sich ohne vorherige Unterbrechung unter cART befanden und keine nachweisbare HI-Viruslast im Plasma hatten. Es bestand kein signifikanter Altersunterschied. Von den Patienten bzw. den gesunden Kontrollen wurde 50 ml peripheres venöses Blut entnommen. Das heparinisierte Blut wurde innerhalb von 24 Stunden verarbeitet.

Um den Phänotyp und die Funktionalität von Makrophagen des Gastrointestinal-Traktes zu untersuchen, wurden intestinale mononukleäre Zellen aus duodenalen Gewebeproben isoliert. Von gesunden Kontrollen oder HIV-seropositiven Patienten wurden hierfür jeweils 7-15 Biopsien aus dem Duodenum verwendet und innerhalb von zwei Stunden nach der Entnahme verarbeitet. Tab. 4 zeigt alle verwendeten Proben.

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt (EA/120/10).

Tab. 4: Untersuchte Proben von HIV-seropositiven Patienten und gesunden Kontrollen

Proben	HIV-seropositive Patienten	Gesunde Kontrollen
Heparinblut, Kokulturen Kap. 2.4, 3.2, 3.5	cART-naive Patienten 4 m, 4w, Alter Ø 45,4 (26-75) Jahre Viruslast: Ø 4,3 (3,1-5,7) log <sub>10</sub> Kopien/ml CD4 <sup>+</sup> -T-Zellzahl: Ø 398,5 (81-775) Zellen/ $\mu$ l	Vergleich HIV-seropositiv vs. HIV-seronegativ 3 w, 8 m, Alter Ø 40,6 (23-65) Jahre
	Patienten unter cART 7 m, Alter Ø 48,9 (36-65) Jahre Viruslast: unter der Nachweisbarkeitsgrenze ( $< 50$ RNA-Kopien/ml) CD4 <sup>+</sup> -T-Zellzahl: 720,1 (383-1320) Zellen/ $\mu$ l	Geschlechtsspezifische Unterschiede m vs. w 6 w, Alter Ø 31,8 (23-42) Jahre 8 m, Alter Ø 46 (25-65) Jahre
Heparinblut, Phagozytostest Kap. 2.6.3, 3.3	cART-naive Patienten 11 m, 4 w, Alter Ø 47 (20-75) Jahre Viruslast: 4,7 (2,1-6,2) log <sub>10</sub> Kopien/ml CD4 <sup>+</sup> -T-Zellzahl: 334 (12-626) Zellen/ $\mu$ l	25 m, 2 w, Alter Ø 39 (21-78) Jahre
	Patienten unter cART 16 m, 2 w, Alter Ø 47 (28-78) Jahre Viruslast: unter Nachweisbarkeitsgrenze CD4 <sup>+</sup> -T-Zellzahl: 571 (365-1320) Zellen/ $\mu$ l	
Duodenalbiopsien, Phagozytostest Kap. 2.6.3, 3.3	cART-naive Patienten 6 m, 1 w, Alter Ø 46 (20-75) Jahre Viruslast 5,8 (2,1-6,1) log <sub>10</sub> Kopien/ml CD4 <sup>+</sup> -T-Zellzahl: 109 (12-167) Zellen/ $\mu$ l	5 m, 3w, Alter Ø 49 (20-83) Jahre
	Patienten unter cART: keine verfügbar	

## 2.3 Zellisolierung

### 2.3.1 PBMC-Isolierung

Aus dem Spenderblut wurden zunächst periphere mononukleäre Zellen (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) isoliert. Da mononukleäre Zellen eine geringere Dichte aufweisen als Erythrozyten, Granulozyten oder polymorphkernige Lymphozyten, können sie mit Hilfe einer Dichtezentrifugation von diesen getrennt werden. Als Dichtegradientenmedium wurde das aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat bestehende *Ficoll-PaquePlus*® (Dichte =  $1,077 \pm 0,001$  g/ml) verwendet.

Ein 50 ml Leucosep<sup>TM</sup>-Röhrchen mit Trennscheibe wurde mit 15 ml Ficoll gefüllt und kurz zentrifugiert, um das Ficoll unterhalb der Trennscheibe zu schichten. Das Blut (15-30 ml) wurde anschließend oberhalb der Trennscheibe in das Röhrchen gefüllt und dieses bei Raumtemperatur

10 Minuten bei 950 x g und ausgeschalteter Zentrifugenbremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation zeigten sich drei separate Schichten. Am Boden des Röhrchens hatten sich Erythrozyten und tote Zellen angesammelt. Granulozyten befanden sich in der zweiten, der Ficoll-Schicht. Die PBMC hatten sich in der dritten Schicht, der Interphase gesammelt. Die in der Interphase angereicherten Lymphozyten und Monozyten wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt, dieses mit PBS/BSA aufgefüllt und zentrifugiert (4 °C, 7 min, 300 x g). Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen mit PBS/BSA resuspendiert, erneut wie beschrieben zentrifugiert und sofort weiter verarbeitet.

### **2.3.2 Isolierung von Lamina propria Lymphozyten**

Für die Isolierung von Lamina propria Lymphozyten (LPL) wurden die Duodenalbiopsien am Tag der Isolierung im Rahmen einer Ösophagogastroduodenoskopie entnommen und für den Transport ins Labor in Natriumchlorid gelagert.

Zum Waschen der Biopsien wurden drei Petrischalen mit PBS/BSA gefüllt und die Biopsien erst in die erste Schale, dann in die zweite und zuletzt in die dritte überführt. In einem Erlenmeyerkolben wurde das Kollagenasemedium für die LPL Isolierung angesetzt.

Die Biopsien wurden in das Kollagenasemedium überführt und für 15 Minuten bei 37 °C unter sanftem Schütteln inkubiert. Mit Hilfe einer 10 ml Spritze und einer stumpfen 18 G Kanüle wurden die Biopsien mehrmals aspiriert und zurück in den Erlenmeyerkolben gegeben.

Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (7 Minuten, 4 °C, 300 x g). Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in 10 ml Kollagenasemedium aufgenommen und wieder in den Erlenmeyerkolben überführt.

Nach einer weiteren Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C wurden die Zellen wieder mehrmals aspiriert und wie beschrieben zentrifugiert.

In ein 15 ml Röhrchen wurden 6 ml 60 % Percoll vorgelegt. Die Zellen wurden in 6 ml 35 % Percoll resuspendiert und vorsichtig auf das 60 % Percoll aufgeschichtet. Nach einer Zentrifugation für 25 Minuten bei 900 x g ohne Bremse bei 4 °C wurde die Interphase abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dieses wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 300 x g für 7 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in PBS resuspendiert und die Zellzahl ermittelt.

Die Isolierung der LPL wurde freundlicherweise zum Teil von Diana Bösel durchgeführt.

### 2.3.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Zur Zellzahl-Bestimmung wurden 0,2 Vol. der Zellsuspension mit 0,8 Vol. Trypanblau gemischt und von der Mischung wurden 10 µl luftblasenfrei in eine Zählkammer zur mikroskopischen Auszählung gegeben. Zur Vitalitätsbestimmung wurde Trypanblau verwendet, welches an intrazelluläre Proteine bindet und daher nur abgestorbene Zellen ohne intakte Zellmembran anfärbt. Blau angefärbte Zellen wurden deshalb nicht mitgezählt.

Vier der neun großen Quadrate der Zählkammer wurden mäanderförmig ausgezählt und aus diesen der Mittelwert für ein Quadrat gebildet. Zusammen mit dem Kammerfaktor ( $10^4$ ) sowie dem Verdünnungsfaktor konnte die Zellzahl anhand der folgenden Gleichung errechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Anzahl vitaler Zellen} / \text{Anzahl ausgezählter Quadrate}) \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

### 2.3.4 Magnetische Zellseparation

Für Kokultivierungen wurden aufgereinigte  $CD14^+$  Monozyten,  $CD4^+CD25^+$  Treg und  $CD4^+CD25^-$  Effektor T-Zellen (Teff) in definierter Anzahl benötigt. Da diese Zellen jeweils spezifische Oberflächenmoleküle aufweisen (CD14, CD4, CD25), wurden gegen diese Oberflächenmoleküle gerichtete monoklonale Antikörper verwendet, welche an magnetische Partikel (*MicroBeads*) gekoppelt sind. Das Fab-Ende der Antikörper bindet spezifisch an die Oberflächenmoleküle der zu isolierenden Zellen, während das Fc-Ende an die magnetischen Partikel gekoppelt ist. Nach einer Inkubationsphase können mit Hilfe eines Magneten die gebundenen Zellen isoliert werden.

Da sich im Blut nur eine geringe Anzahl Treg befindet und die  $CD4^+$ -T-Zellzahl bei den HIV-seropositiven Patienten ohnehin eher niedrig war, musste die Ausbeute optimiert werden. Hierfür wurden die Verfahren von zwei verschiedenen Herstellern hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit sowie der Reinheit und Anzahl der isolierten Zellen verglichen.

#### 2.3.4.1 Magnetische Zellseparation, Miltenyi

Für die Isolierung von Monozyten bzw. Treg aus PBMC wurden gegen CD14 bzw. CD4 und CD25 gerichtete Antikörper verwendet, die an magnetische Partikel (*MicroBeads*) gekoppelt sind. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung von konjugierten Antikörpern, Trennsäulen, Kits und Magneten der Firma Miltenyi nach den Angaben des Herstellers.

Da sich in vorhergehenden Versuchen gezeigt hatte, dass sich mit einer geringeren *MicroBeads*

Menge eine bessere Reinheit der isolierten CD14<sup>+</sup> Zellen erzielen lässt, wurden nur 50 % der vom Hersteller vorgeschlagenen Menge verwendet.

#### **2.3.4.2 Magnetische Zellseparation, StemCell**

Mit Hilfe des StemCell CD14 Isolationskits (*EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit*) wurden Monozyten über gegen CD14 gerichtete an magnetische Partikel (*MicroBeads*) gekoppelte Antikörper isoliert. Mit Hilfe des Treg Isolationskits (*CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit*) wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen isoliert.

Die Durchführung erfolgte weitestgehend nach Angaben des Herstellers. Da sich eine bessere Reinheit bei einer Verringerung der Beads-Menge zeigte, wurden nur 80 % der vom Hersteller vorgeschlagenen Menge verwendet.

#### **2.3.4.3 Kontrolle der Reinheit der magnetisch isolierten Zellen**

Zur Kontrolle der Reinheit der isolierten CD14<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen wurden diese hinsichtlich der Expression von zelltypischen Oberflächen- oder intranukleären Antigenen wie im *Kap. 2.5* beschrieben durchflusszytometrisch untersucht.

Hierfür wurden die Oberflächenmoleküle CD14, zur Kontrolle der Reinheit der isolierten Monozyten, bzw. CD4 und CD25 zur Kontrolle der isolierten T-Zellen gefärbt. Zur weiteren Bestimmung der Reinheit der Treg wurde neben CD25 auch das für Treg spezifische intranukleäre Antigen FOXP3 untersucht.

## **2.4 Kultivierung mit Monozyten und T-Zellen**

Um den Einfluss von regulatorischen und nicht-regulatorischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auf die Differenzierung und Funktion von Monozyten sowie mögliche Veränderungen bei einer HIV-Infektion im Vergleich zu HIV-seronegativen Kontrollen zu untersuchen, wurden Kokultivierungen mit Monozyten und den unterschiedlichen CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen durchgeführt.

Hierfür wurden aus peripher entnommenem venösem Blut zunächst mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert. Anschließend erfolgten nacheinander zwei magnetische Zellseparationen. Zunächst erfolgte die CD14<sup>+</sup>-Isolierung (Monozyten). Die CD14<sup>+</sup>-Zellen wurden weiter verwendet für die Isolierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg bzw. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff.

Als T-Zell-Stimulus wurden dem Kulturmedium monoklonale anti-CD3 Antikörper (anti-CD3



mAb) hinzugefügt.

Jeweils  $5 \times 10^5$  Monozyten in 500  $\mu\text{l}$  Medium wurden zusammen mit  $2,5 \times 10^5$   $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ -T-Zellen in 500  $\mu\text{l}$  Medium,  $2,5 \times 10^5$   $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ -T-Zellen in 500  $\mu\text{l}$  Medium oder 500  $\mu\text{l}$  Medium in einer 24-Loch-Platte kultiviert.

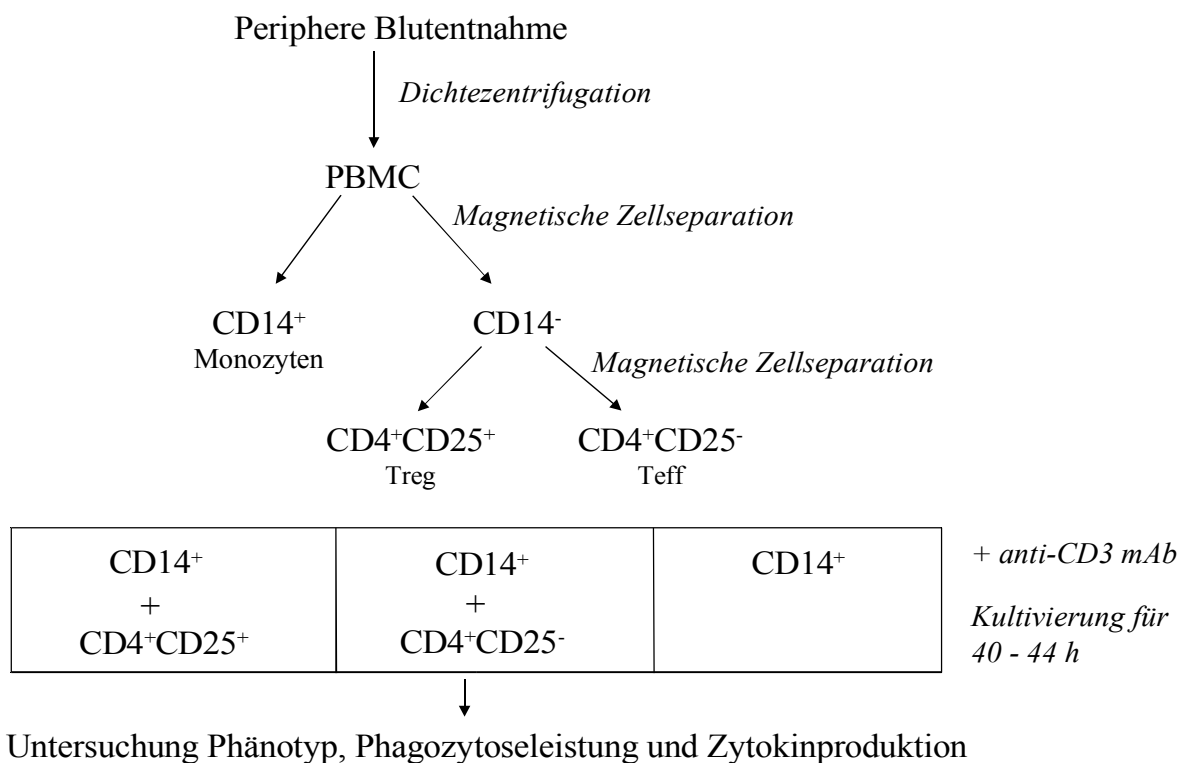
Da bei einigen Patienten nicht ausreichend  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ -T-Zellen isoliert werden konnten, wurden die Ansätze gegebenenfalls bei gleicher Konzentration verkleinert.

Nach einer 40-44-stündigen Kultivierung bei 37 °C und einer 5 %-CO<sub>2</sub>-Konzentration erfolgte die phänotypische und funktionelle Untersuchung der Monozyten.

Hierzu wurden die Monozyten hinsichtlich der Expression von Oberflächenmolekülen und der Phagozytoseleistung sowie die Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand untersucht.

Eine Übersicht der Durchführung ist in Abb. 3 dargestellt.

Abb. 3: Schema Versuchsaufbau Kokultivierung Monozyten und Treg bzw. Teff



## 2.5 Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung von Zellen hinsichtlich der Expression von Oberflächen- oder intranukleären Molekülen wurde ein Durchflusszytometer verwendet. Diese Technik ermöglicht die Untersuchung jeder einzelnen Zelle, indem diese einen Laserstrahl passiert. Abhängig von der Größe und der Granularität wird das Licht unterschiedlich gebrochen und von Detektoren ausgewertet. Zusätzlich können noch bis zu vier verschiedene Moleküle, sowohl auf der Oberfläche der Zelle wie auch intranukleär durch Bindung von gegen diese gerichtete fluoreszenzgekoppelte Antikörper vom Gerät detektiert werden. Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden verwendet: Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex (PerCP), Allophycocyanin (APC) und Alexa Fluor 647. Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer *FACS Calibur* (BD Heidelberg, DE). Die Analyse erfolgte mit den PC-Programmen *CellQuest Pro* (BD, Heidelberg, DE) und *FlowJo* (TreeStar, Ashland, USA).

### 2.5.1 Nachweis von Oberflächenmolekülen

Die Zellen wurden zunächst in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml PBS und Zentrifugation (10 Minuten, 4 °C, 250 x g) wurde der Überstand abgegossen, die Zellen in 50 µl Antikörperlösung aufgenommen und für 15 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbelösung enthielt neben den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern PBS zur Verdünnung und Beriglobin zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen. Nach der Inkubation wurde zum Waschen 1 ml PBS zugegeben und die Zellen zentrifugiert (10 Minuten, 4 °C, 250 x g). Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen wurden in 200 µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert. Die verwendeten Antikörper sind im *Kap. 2.1.6* aufgeführt.

### 2.5.2 Nachweis des intranukleären Moleküls FOXP3

Um das intranukleäre Molekül FOXP3 nachzuweisen, musste zunächst eine Permeabilisierung der Zellhülle erfolgen. Hierfür wurde das *FOXP3 Staining Set* von eBioscience verwendet.

Die Zellen wurden in 250 µl des FixPerm-Puffers für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es wurde 1 ml PBS zugegeben und zentrifugiert (10 Minuten, 4 °C, 250 x g). Die Zellen wurden nach dem Abgießen des Überstandes in der FOXP3-Antikörperlösung aufgenommen und für 30 Minuten bei 4 °C dunkel inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml 1 % Fixperm-Puffer gemischt und zentrifugiert (10 Minuten, 4 °C, 250 x g). Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen wurden in 200 µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

### **2.5.3 Phänotypische Analyse kultivierter Zellen**

Zur phänotypischen Untersuchung der Monozyten nach Kultivierung wurden, wie im *Kap. 2.5.1* beschrieben, durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst die Überstände der Kulturen abgenommen. Zur Lösung der semi-adhärenten Monozyten von der Platte wurde EDTA verwendet. Je Kavität wurden hierfür 500 µl 10 mM EDTA zugegeben und die Zellen für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 500 µl Medium gegeben und die Zellen durch auf- und abpipettieren von der Platte gespült. Die Zellsuspension wurde zu den jeweiligen Röhrchen mit den zuvor abgenommenen zellhaltigen Überständen überführt und die Platte zweimal mit je 500 µl Medium nachgespült. Die Röhrchen wurden bei 4 °C für 7 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Von den zellfreien Überständen wurden je drei Aliquote a 150 µl bei -20 °C eingefroren und später bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden unter Verwendung folgender Antikörper hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) analysiert: CD3, CD4, CD14, CD16, CD25, CD64, CD86, CD163, CD206, HLA-DR, CCR2, CCR5, Integrin-β7, FOXP3, CXCR3, CXCR4, CX3CR1.

## **2.6 Messung der Phagozytoserate von Monozyten und Makrophagen**

### **2.6.1 Messung der Phagozytoserate von Monozyten aus Kokulturen mit Latexpartikeln**

Pro Kavität einer 48-Loch-Platte wurden  $0,5 \times 10^5$  Monozyten entweder ohne oder zusammen mit  $0,25 \times 10^5$  Treg oder Teff in 100 µl Medium mit 50 ng/ml anti-CD3 mAb ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 40-44 Stunden inkubiert.

Um die Phagozytoseaktivität der Monozyten zu messen, wurden FITC-gekoppelte Latexpartikel zu den Zellen gegeben, welche zuvor für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Hierfür wurden 60 µl der Partikelsuspension mit 405 µl PBS vermischt und dann von dieser Mischung je Kavität 75 µl hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Latex-Partikeln auf Eis inkubiert und eine Negativkontrolle ohne Partikel bei 37 °C, ebenfalls für eine Stunde. Nach der Inkubation wurden die Platten auf Eis und die Überstände in Reaktionsgefäße überführt. Zu jeder Kavität wurden 200 µl eiskaltes PBS zugegeben und die Zellen aus der Platte gespült. Jede Kavität wurde zweimal mit je 200 µl PBS nachgespült und alles in die Reaktionsgefäße überführt. Um eine Hintergrundfluoreszenz zu vermindern, wurden 200 µl Trypanblau zugegeben. Nach Zentrifugation und Abgießen des Überstands wurden die Zellen in 1000 µl eiskaltem PBS resuspendiert und anschließend zentrifugiert (10 Minuten, 4 °C,

250 x g). Dieser Schritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Zur Unterscheidung von Monozyten und T-Zellen erfolgte, wie beschrieben, eine Oberflächenfärbung von CD3.

Umso mehr Partikel von den Monozyten aufgenommen wurden, d.h. umso höher die Phagozytoseleistung war, desto höher ist die gemessene MFI. Um eine mögliche Fluoreszenz durch an der Zelle von außen haftende nicht phagozytierte Partikel zu untersuchen, wurden Kontrollen auf Eis durchgeführt. Aus der gemessenen MFI bei 37 °C und der MFI bei 0 °C wurde ein Quotient gebildet, der Phagozytotische Index. Von diesem Quotienten wurde die relative Veränderung von mit Treg oder Teff kultivierten Monozyten bezogen auf Monozyten ohne T-Zell-Kontakt in Prozent dargestellt. Bei einigen Versuchen war die bei 0 °C gemessene Fluoreszenz größer als die bei 37 °C gemessene. Es scheint hier keine Phagozytose stattgefunden zu haben. Alle Quotienten mit einem Wert  $< 1$  wurden deshalb auf 1 gesetzt, was einer Phagozytoserate von 0 entspricht.

### **2.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Phagozytosetests mit Latexpartikeln**

Um eine Aufnahme der Latexpartikel von den Monozyten zu untersuchen, wurden isolierte Monozyten wie beschrieben kultiviert und ein Phagozytosestest mit Latexpartikeln durchgeführt. Anschließend wurde ein Zytospin durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür nach der Entnahme aus der Lochplatte in einen, mit einer Metallklammer auf einem Objektträger befestigten, Fülltrichter gegeben. Es erfolgte eine 7-minütige Zentrifugation in einer Zytocentrifuge bei Raumtemperatur und 100 x g. Hierdurch wurden die Zellen auf eine kleine kreisrunde Fläche auf dem Objektträger zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde von einer dem Objektträger aufliegenden Filterkarte aufgenommen.

Zum Fixieren wurden die Zellen mit einigen Tropfen 4 % PFA für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Objektträger vorsichtig mit PBS abgespült. Die Färbung der Zellkern-DNA erfolgte mit 1:2000 verdünntem 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Um das Zytoskelett und somit die Zellgrenzen im Mikroskop sichtbar zu machen, wurde F-Aktin mittels 1:500 verdünntem Alexa 647-markiertem Phalloidin angefärbt, einem Phallotoxin aus dem grünen Knollenblätterpilz.

Die Objektträger wurden erneut mit PBS abgespült und danach mit Deckgläschen abgedeckt um anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht zu werden.

### **2.6.3 Messung der Phagozytoserate von Monozyten und Makrophagen mit pHrodo**

Zur funktionellen Untersuchung der Monozyten und Makrophagen wurde deren Phagozytoseaktivität mit Hilfe des pHrodo Phagozytosekits der Firma Invitrogen gemessen.

Hierfür wurden pHrodo-gekoppelte Escherichia coli Partikel zum Vollblut oder den isolierten LPL hinzugefügt, um von phagozytierenden Zellen aufgenommen zu werden.

Während der Internalisierung in die Zelle und der damit verbundenen Abnahme des pH-Wertes, nimmt die Emissionsintensität des Fluoreszenzfarbstoffes pHrodo zu. Die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität steigt dementsprechend bei Phagozytose an, während die Hintergrundfluoreszenz gering ist.

Für die Messung im Vollblut erfolgte die Durchführung nach Angaben des Herstellers. Anschließend erfolgte eine Oberflächenfärbung von CD14 um die Gesamtpopulation der Monozyten zu identifizieren.

Für die Messung der Phagozytoseaktivität der isolierten LPL erfolgte die Durchführung weitestgehend nach den Angaben des Herstellers. Die Menge der eingesetzten Partikel wurde je Ansatz von 20 µl auf 50 µl erhöht und die Inkubationsdauer von 15 Minuten auf 60 Minuten erhöht.

Aus der gemessenen MFI bei 37 °C und der MFI bei 0 °C wurde ein Quotient gebildet, der Phagozytotische Index.

Die Messung der Phagozytoseaktivität mit dem pHrodo Phagozytosekit wurde freundlicherweise zum Teil von Diana Bösel durchgeführt.

## **2.7 Quantifizierung von Effektormolekülen im Überstand der Kokulturen**

Zur Quantifizierung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand wurde eine Multiplex-Analyse von Zytokinen mittels eines *Cytometric bead array* (CBA) der Firma BD durchgeführt. Hierbei binden fluoreszenzgekoppelte Partikel (*Beads*) unterschiedlicher Größe und Fluoreszenzintensität spezifisch an die nachzuweisenden Stoffe, die infolgedessen mittels durchflusszytometrischer Analyse unterschieden werden können.

Bei jeder Messung wurde zunächst mit Hilfe einer seriellen Verdünnung der entsprechenden Partikel in 11 Stufen mit dem Faktor 2 für jedes nachzuweisende Zytokin eine Standardkurve erstellt. Für jedes Zytokin wurde jede Verdünnung der Standardkurve doppelt hergestellt und gemessen. Mittels einer daraus abgeleiteten Korrelationskurve erfolgte die Quantifizierung der

Zytokinkonzentration in einer Probe.

Die bei -80 °C gelagerten Überstände wurden über Nacht bei -4 °C aufgetaut. Die Proben wurden bei 4 °C zunächst bei 1200 x g anzentrifugiert. Danach wurden 19 µl von jeder Probe in ein auf Eis gelagertes Reaktionsgefäß überführt. Pro Probe wurden 0,4 µl von jeder Partikelsorte (*Capture beads*) und 15,6 µl Verdünnungspuffer (*Bead diluent*) gemischt. Von dieser Partikelmischung wurden 19 µl zu jeder Probe hinzugefügt und 1 Stunde dunkel bei Raumtemperatur inkubiert.

Von der Farbstoffnachweislösung (*PE detection reagent*) wurden je Probe 0,4 µl mit 15,6 µl Verdünnungspuffer (*Detection diluent*) vermischt. Zu jeder Probe wurden 19 µl pipettiert. Es erfolgte eine 2-stündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer je Probe erfolgte eine Zentrifugation bei 550 x g für 5 Minuten. Die Partikel wurden mit 200 µl PBS je Probe resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen. Es wurden parallel zwei Mischungen von Partikeln gemessen.

Mit Mischung 1 wurden IL-1β, IL-2, IL-10, IL-12p70, CCL3, CCL5, CXCL8 und sCD14 gemessen. Mit Mischung 2 wurden IL-4, IL-6, IP-10, IFN-γ, TNF-α, CX3CL1, CCL2, CCL4 und CXCL9 gemessen.

Mit Hilfe der gemessenen MFI konnte die Menge der gemessenen Zytokine errechnet werden.

Hierfür wurde mit Hilfe der Standardwerte, von welchen die genaue Konzentration bekannt war, eine Regressionsanalyse durchgeführt. Mit der hierbei ermittelten Funktion konnten die entsprechenden Konzentrationen der Proben mit Hilfe der gemessenen MFI berechnet werden.

## 2.8 Statistik

Für die Berechnungen und Erstellung der Graphen wurden *OpenOffice 4.1.1* und *GraphPad Prism 5* (GraphPad, La Jolla, USA) verwendet. Alle Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand.

Für die statistische Prüfung von Unterschieden zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Prüfung abhängiger Daten wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Bei mehr als zwei zu untersuchenden voneinander unabhängigen Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test durchgeführt. Werte mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant definiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich der magnetischen Zellseparation der Hersteller Miltenyi und StemCell

Für die Kokultivierungen von Monozyten mit  $CD4^+CD25^+$  Treg bzw.  $CD4^+CD25^-$  Teff mussten diese Zellpopulationen mit einer möglichst hohen Reinheit aus dem Blut isoliert bzw. angereichert werden. Da Treg nur einen geringen Anteil der im Blut zirkulierenden Lymphozyten ausmachen und diese bei HIV-seropositiven Patienten abhängig vom Krankheitsverlauf quantitativ deutlich vermindert sein können, war die Anzahl der isolierten Treg ebenfalls von großer Bedeutung. Es wurden daher zunächst zwei verschiedene Verfahren der Hersteller Miltenyi und StemCell hinsichtlich der Reinheit der isolierten Zellpopulationen sowie der Anzahl an Treg verglichen.

Für den Vergleich der  $CD14^+$ -Zellisolierung wurden zunächst, wie in *Kap. 2.3.1* beschrieben, PBMC aus 20 ml Blut von einer gesunden Kontrollperson isoliert. Anschließend wurden jeweils  $2 \times 10^7$  Zellen für die  $CD14^+$ -Isolation mit den Kits von StemCell oder Miltenyi verwendet.

Für den Vergleich der beiden Verfahren zur Treg-Isolierung wurden unter Verwendung des Miltenyi Kits  $CD14^-$  PBMC aus 100 ml Blut einer gesunden Kontrollperson isoliert. Die Isolierung der  $CD4^+CD25^+$  bzw.  $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen erfolgte anschließend aus jeweils  $2 \times 10^7$   $CD14^-$  Zellen mit dem StemCell Kit bzw. dem Miltenyi-Kit (*Kap. 2.3.4*). Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt.

*Tab. 5: Vergleich der magnetischen Zellseparation von  $CD14^+$  und  $CD4^+CD25^+$  Zellen mit den Zellisolierungs-Kits der Firma Miltenyi und StemCell. Die Tabelle zeigt die jeweilige Anzahl der isolierten Zellen sowie deren Reinheit als prozentualen Anteil der Zellen in der jeweiligen Probe.*

Hersteller	Anzahl $CD14^+$	Reinheit $CD14^+$	Anzahl $CD4^+CD25^+$	Reinheit $CD4^+CD25^+$
Miltenyi	$3,0 \times 10^6$	92,10 %	$5,0 \times 10^5$	55,40 %
StemCell	$2,2 \times 10^6$	93,90 %	$8,8 \times 10^5$	65,50 %

Die Durchführung der Zellisolierung nach StemCell war im Vergleich zu Miltenyi anwenderfreundlicher, da keine durchgängige Arbeit bei Kühlschranktemperatur erforderlich und der Zeitaufwand geringer war. Zudem war sowohl die Reinheit als auch die Anzahl der isolierten Treg bei der Verwendung des StemCell Kits höher. Die magnetischen Zellseparationen wurden deshalb nach Möglichkeit mit dem StemCell Kit durchgeführt.

### 3.2 Kokulturen mit Monozyten und T-Zellen

In Kokulturen wurde untersucht, welche Wirkung Treg im Vergleich zu Teff auf den Phänotyp und die Funktion von Monozyten haben und ob diesbezüglich Unterschiede zwischen gesunden Kontrollpersonen und naiven oder mit cART behandelten HIV-seropositiven Patienten bestehen. Dazu wurden, wie in *Kap. 2.4.* beschrieben, CD14<sup>+</sup> Monozyten ohne T-Zellen sowie unter der Anwesenheit von autologen Treg oder Teff für 40-44 Stunden in anti-CD3-Antikörper-haltigem Zellkulturmedium kultiviert. Das Verhältnis zwischen Monozyten und T-Zellen betrug in allen Kokulturen 2:1.

Anschließend wurden der Phänotyp und die Phagozytoseleistung der Monozyten sowie Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen untersucht.

Die Monozyten-Kultur ohne die Anwesenheit von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen diente dabei dem Nachweis der basalen Funktion der Monozyten unter den verwendeten Bedingungen und diente der Erfassung von Ausgangswerten für die Berechnung der Treg- bzw. Teff-induzierten Veränderungen. Mögliche basale Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und HIV-infizierten Patienten wurden ebenfalls analysiert.

Die Reinheit der mit Hilfe der magnetischen Zellseparation gewonnenen Monozyten, Treg und Teff wurde durch durchflusszytometrischen Nachweis der Oberflächenmoleküle CD14, CD4 und CD25 überprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt.

*Tab. 6: Reinheit der isolierten Zellpopulation als prozentualer Anteil in der jeweiligen Probe. Die Daten sind angegeben als Mittelwert mit Standardabweichung.*

Immunzelltyp	Reinheit in %
CD14 <sup>+</sup>	85,44 ± 10,56
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	48,42 ± 12,41
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	87,65 ± 13,02

In allen Ansätzen waren die isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen angereichert mit entweder Treg oder Teff. Es kann angenommen werden, dass die tatsächliche Reinheit der Treg höher war als in Tab. 6 gezeigt, da die zur Zellisolierung verwendeten magnetischen Partikel die Bindung der zur Überprüfung der Reinheit eingesetzten Antikörper sterisch behindern und somit der CD25<sup>+</sup> Anteil der untersuchten Zellpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse nicht vollständig erkennbar ist.



Aufgrund der in den Zellkulturen eingesetzten anti-CD3 Antikörper bestand die Möglichkeit, dass eine dadurch ausgelöste T-Zell-Aktivierung den Anteil der Treg bzw. Teff innerhalb der isolierten Zellpopulation deutlich verändert. Deshalb wurden die CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen nach der Kultivierung mit Monozyten quantitativ und qualitativ untersucht.

Für die Überprüfung des relativen Anteils der Treg bzw. Teff in der jeweiligen CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulation wurden die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 sowie das intranukleäre Molekül FOXP3 in 18 der durchgeführten Experimente durchflusszytometrisch nachgewiesen.

Nach 40-44 Stunden waren in den Kokulturen von Monozyten mit Treg im Mittel 51,1 % der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. In den Kokulturen mit Teff zeigten sich hingegen im Mittel nur 2,33 % CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

Da Treg im Gegensatz zu Teff unter CD3-Stimulation kein IL-2 produzieren, wurde die IL2-Konzentration in den Zellkulturüberständen gemessen, um Treg bzw. Teff in den Kokulturen qualitativ zu überprüfen. Im Zellkulturüberstand von Monozyten, die in Abwesenheit von T-Zellen kultiviert wurden, war kein IL-2 nachweisbar. Bei drei gesunden Kontrollen und einem unbehandelten Patienten war IL-2 in der Kokultur mit Teff, aber nicht in der Kokultur mit Treg nachweisbar.

Bei einer gesunden Kontrolle konnte eine geringe Konzentration von IL-2 bei mit regulatorischen T-Zellen kultivierten Monozyten nachgewiesen werden, aber auch hier war die IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand der mit Teff kultivierten Monozyten deutlich höher.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nach der 40-44-stündigen Kultivierung die zu untersuchenden T-Zellpopulationen in den jeweiligen Experimenten noch deutlich angereichert waren und somit das verwendete *in vitro*-Modell für den differenzierten Nachweis der Wirkung von Treg und Teff auf Monozyten geeignet ist.

### 3.2.1 Einfluss von Treg auf die Differenzierung von Monozyten

#### 3.2.1.1 Expression des Differenzierungsmoleküls CD14 auf Monozyten

CD14 spielt eine wichtige Rolle für das Erkennen von pathogenen Strukturen, wie z.B. LPS gramnegativer Bakterien. Das Glykoprotein liegt membranständig auf Monozyten vor und kann auch als lösliches CD14 (sCD14) freigesetzt werden. Mit zunehmender Differenzierung sinkt die Expressionsdichte von CD14 auf der Zelloberfläche von Monozyten (87, 88).

Die untersuchten Monozyten wiesen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der basalen Expressionsdichte von CD14 zwischen der Kontrollgruppe und den HIV-seropositiven Patientengruppen auf.

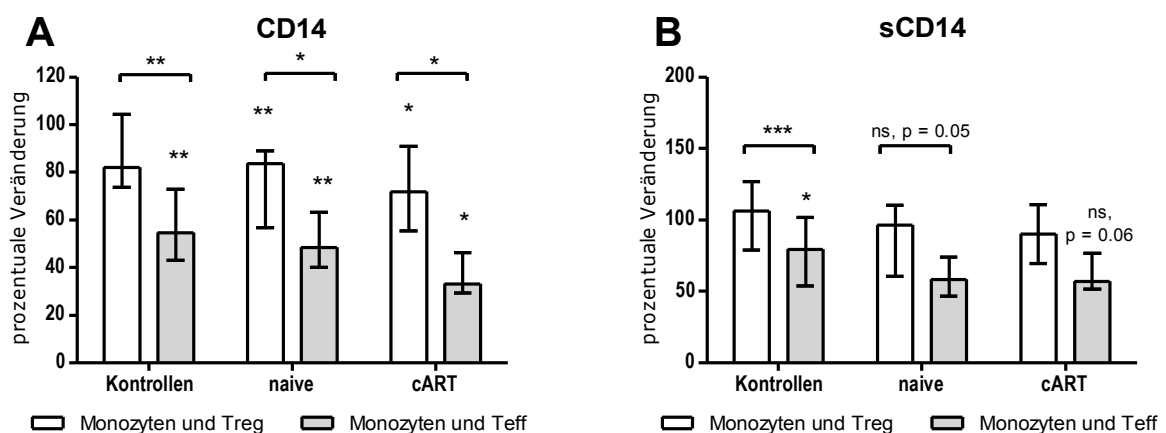


Abb. 4 zeigt die relative Veränderung der Expression (MFI) von CD14 auf Monozyten (A) bzw. der Konzentration von sCD14 in Zellkulturüberständen von Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden (B), bezogen auf die Expressionsdichte von CD14 bzw. die Konzentration von sCD14 im Zellkulturüberstand von Monozyten in Abwesenheit von T-Zellen (entspricht 100 %). Es wurden gesunde Kontrollen, naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten verglichen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Vergleiche zwischen den drei Gruppen erfolgten durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test. Signifikante Unterschiede in der Monozytenexpression nach Kultivierung mit Treg oder Teff sind über einer Säule dargestellt und wurden durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Unter Anwesenheit von Teff zeigte sich eine signifikante Abnahme der CD14-Expressionsdichte auf 33-55 % bei den Monozyten der Kontrollen und HIV-infizierten Patienten. Der Einfluss von Treg auf die CD14-Expression zeigte die gleiche Tendenz, war aber in allen Untersuchungsgruppen deutlich geringer (Abb. 4A). Zwischen der Kontrollgruppe und den HIV-seropositiven Patienten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Um nachzuweisen, ob es sich bei den beobachteten Veränderungen um eine Herabregulation der CD14-Oberflächenexpression auf Monozyten handelt oder/und um eine verstärkte Freisetzung

des membranständigen CD14, wurde die Konzentration von sCD14 in den Zellkulturüberständen quantifiziert. Weder die Anwesenheit von Treg noch von Teff führte zu einer erhöhten sCD14-Konzentration in den Zellkulturen. In den Ansätzen mit der stärksten Expressionsabnahme von CD14 befand sich auch die geringste Menge an sCD14 (Abb. 4B). Daraus folgt, dass die in Abb. 4A dargestellten Veränderungen tatsächlich aus einer Herabregulation der Oberflächenexpression resultieren. Im Vergleich zu Teff zeigten Treg eine geringere Wirkung auf die CD14-Oberflächenexpression von Monozyten und auf die Freisetzung von sCD14.

Die CD14-vermittelte Erkennung pathogener Strukturen auf Monozyten scheint demnach durch Treg weitestgehend aufrecht erhalten zu werden. Teff bewirken hingegen, unabhängig von einer HIV-Infektion, eine stärkere Differenzierung von Monozyten.

### 3.2.1.2 Expression der anti-inflammatorischen Differenzierungsmoleküle CD163 und CD206

Hämoglobin-Scavenger-Rezeptoren (CD163) und Mannose-Rezeptoren (CD206) sind von Bedeutung für das Erkennen von pathogenen Mikroorganismen und werden vermehrt auf der Oberfläche von anti-inflammatorischen Monozyten exprimiert (33, 89).

Hinsichtlich der basalen Expressionsdichte der anti-inflammatorischen Differenzierungsmarker CD163 und CD206 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

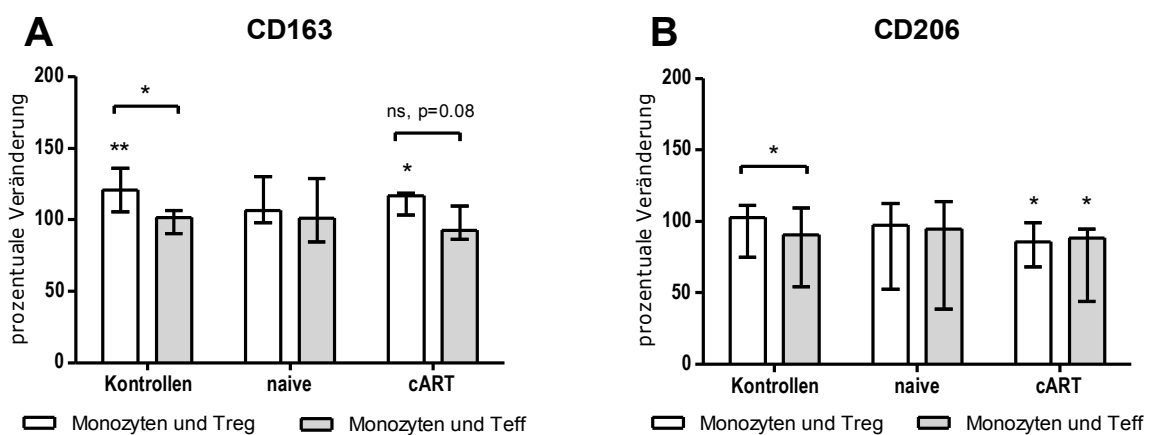


Abb. 5 zeigt die relative Veränderung der Expression (MFI) von CD163 (A) bzw. CD206 (B) auf Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden, bezogen auf die Expressionsdichte von CD163 bzw. CD206 auf Monozyten in Abwesenheit von T-Zellen (entspricht 100 %). Es wurden gesunde Kontrollen, naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten verglichen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Vergleiche zwischen den drei Gruppen erfolgten durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test. Signifikante Unterschiede in der Monozytenexpression nach Kultivierung mit Treg oder Teff sind über einer Säule dargestellt und wurden durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Treg bewirkten eine signifikante Zunahme der CD163-Expressionsdichte auf Monozyten auf 121 % in den Kontrollen und auf 117 % in behandelten HIV-seropositiven Patienten (Abb. 5A). Treg von naiven HIV-infizierten Patienten hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die CD163-Expression. Im Gegensatz zu den Treg hatten Teff keinen Einfluss auf CD163 in allen Gruppen. Sowohl Treg als auch Teff verursachten eine signifikante Abnahme der CD206 Expression auf Monozyten von behandelten HIV-infizierten Patienten, nicht aber auf Monozyten von naiven Patienten oder Kontrollpersonen (Abb. 5B).

Die Daten zeigen, dass Treg einen anti-inflammatorischen Phänotyp im Sinne einer erhöhten CD163 Expression bei Monozyten induzieren können. Diese Fähigkeit geht bei einer HIV-Infektion verloren. Unter cART können Treg die Expression von CD163 auf Monozyten zwar wieder erhöhen, führen aber auch zu einer verminderten CD206-Expression.

### 3.2.1.3 Expression der pro-inflammatorischen Differenzierungsmoleküle HLA-DR und CD16

CD16 ist ein Fc-Rezeptor, über den IgG-Antikörper gebunden werden können. HLA-DR spielt eine wichtige Rolle für die Antigenpräsentation. Beide Moleküle werden verstärkt auf pro-inflammatorischen Monozyten und Makrophagen exprimiert (31, 87, 90).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der basalen Expression von CD16 und HLA-DR.

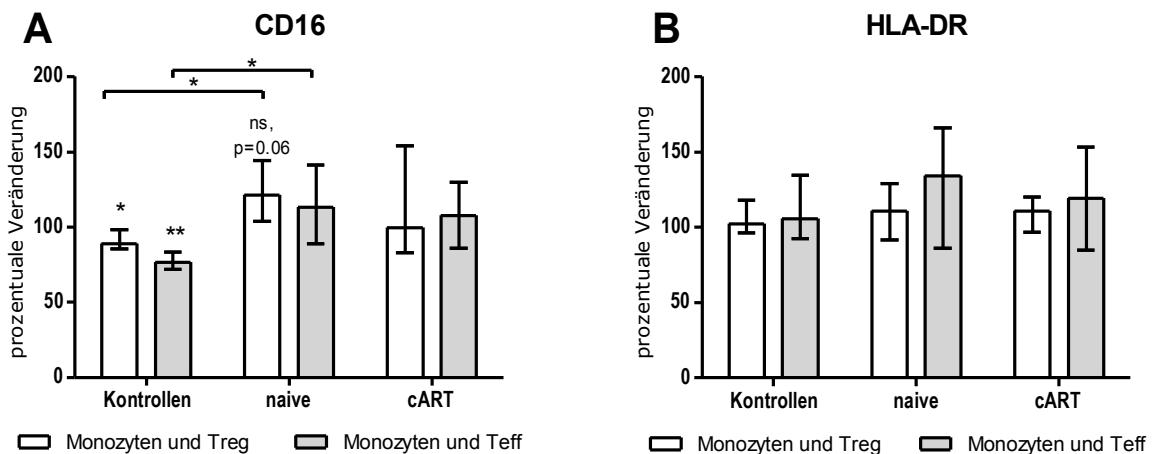


Abb. 6 zeigt die relative Veränderung der Expression (MFI) von CD16 (A) bzw. HLA-DR (B) auf Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden, bezogen auf die Expressionsdichte von CD16 bzw. HLA-DR auf Monozyten in Abwesenheit von T-Zellen (entspricht 100 %). Es wurden gesunde Kontrollen, naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten verglichen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Vergleiche zwischen den drei Gruppen erfolgten durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test. Signifikante Unterschiede in der Monozytenexpression nach Kultivierung mit Treg oder Teff sind über einer Säule dargestellt und wurden durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Unter Anwesenheit von Treg und Teff zeigte sich eine signifikante Verminderung der CD16-Expression auf Monozyten von gesunden Kontrollen um 11- 23 % (Abb. 6A). Hingegen hatten weder bei den unbehandelten noch bei den behandelten HIV-seropositiven Patienten Treg oder Teff einen vergleichbaren Einfluss auf die Expression von CD16 auf Monozyten.

Weder bei den gesunden Kontrollen noch bei den HIV-seropositiven Patienten veränderten Treg oder Teff die Expression von HLA-DR auf Monozyten (Abb. 6B).

Daraus folgt, dass in HIV-infizierten Patienten Treg keine Reduktion der Oberflächenexpression von CD16 induzieren können. Auch unter cART ist dieser Funktionsverlust nicht reversibel.

### 3.2.1.4 Expression des Aktivierungsmoleküls CD64 und des kostimulatorischen Moleküls CD86

CD64 führt als Fc-Rezeptor über die Bindung von IgG-Antikörpern zu einer Aktivierung von Monozyten und Makrophagen. CD86 spielt als kostimulatorisches Molekül eine wichtige Rolle für die Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung und wird vermehrt auf pro-inflammatorischen Monozyten exprimiert (31, 90).

Hinsichtlich der basalen Expression von CD64 und CD86 auf Monozyten waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen.

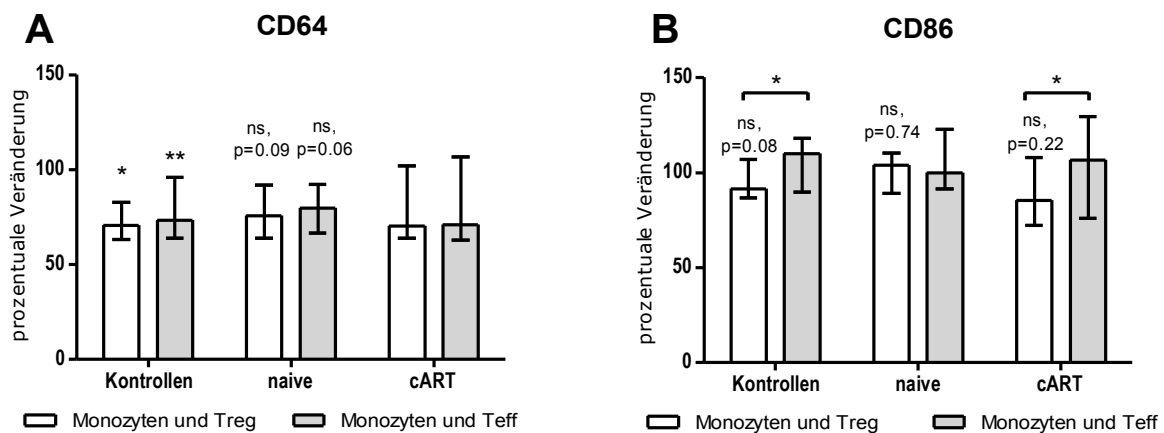


Abb. 7 zeigt die relative Veränderung der Expression (MFI) von CD64 (A) bzw. CD86 (B) auf Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden, bezogen auf die Expressionsdichte von CD64 bzw. CD86 auf Monozyten in Abwesenheit von T-Zellen (entspricht 100 %). Es wurden gesunde Kontrollen, naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten verglichen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Vergleiche zwischen den drei Gruppen erfolgten durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test. Signifikante Unterschiede in der Monozytenexpression nach Kultivierung mit Treg oder Teff sind über einer Säule dargestellt und wurden durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Die CD64-Expression auf Monozyten von gesunden Kontrollen zeigte sowohl unter Anwesenheit von Treg wie auch Teff eine signifikante Abnahme auf 71-73 % (Abb. 7A). Dieser Effekt zeigte sich tendenziell auch bei naiven HIV-seropositiven Patienten, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Treg oder Teff hatten in allen Untersuchungsgruppen keinen signifikanten Einfluss auf die Expressionsdichte von CD86 auf Monozyten, jedoch wiesen die mit Treg kultivierten Monozyten von Kontrollen und behandelten Patienten eine signifikant niedrigere Expression auf als die mit Teff kultivierten Monozyten (Abb. 7B). Tendenziell zeigte sich eine Treg-induzierte Herabregulation des Moleküls in diesen beiden Untersuchungsgruppen, nicht aber in naiven HIV-infizierten Patienten. Treg können bei gesunden Kontrollen die Oberflächenexpression von CD64 und tendenziell auch CD86 auf Monozyten vermindern, d.h. die Monozyten- und T-Zell-Aktivierung hemmen. Diese Wirkung scheint in naiven und behandelten HIV-infizierten Patienten eingeschränkt zu sein.

### 3.2.1.5 Expression der inflammatorischen und intestinalen Migrations-Moleküle CXCR3, CX3CR1, CCR2 und Integrin- $\beta$ 7

Die Chemokinrezeptoren CXCR3, CX3CR1 und CCR2 sowie der Transmembranrezeptor Integrin- $\beta$ 7 können, u.a. über die Bindung der Chemokine CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CX3CL1, eine Migration von Immunzellen in intestinale Regionen und inflammatorisches Gewebe vermitteln (91, 92).

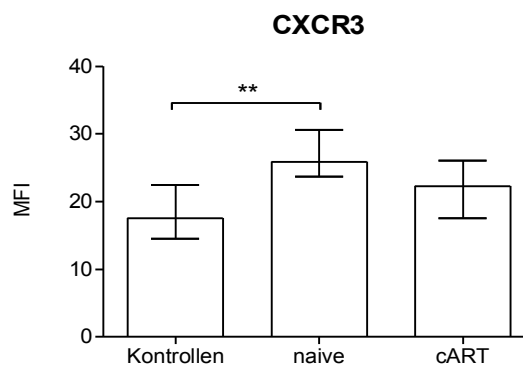


Abb. 8: Dargestellt ist die basale Expression (MFI) von CXCR3 auf 40-44 Stunden kultivierten Monozyten von gesunden Kontrollen, naiven und mit cART behandelten HIV-seropositiven Patienten. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Statistische Vergleiche wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn-Test durchgeführt.

\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Auf den Monozyten der naiven HIV-seropositiven Patienten zeigte sich eine basale MFI von CXCR3 von 26 (Abb. 8). Diese war 44 % höher als die basale Expression (MFI 18) der Monozyten der gesunden Kontrollen. Dies spricht dafür, dass in der unbehandelten HIV-Infektion CXCR3 an einer vermehrten Migration von Monozyten in entzündetes Gewebe beteiligt ist.

Die basale Expression von CX3CR1, Integrin- $\beta$ 7 und CCR2 zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den gesunden Kontrollen und den HIV-seropositiven Patienten.

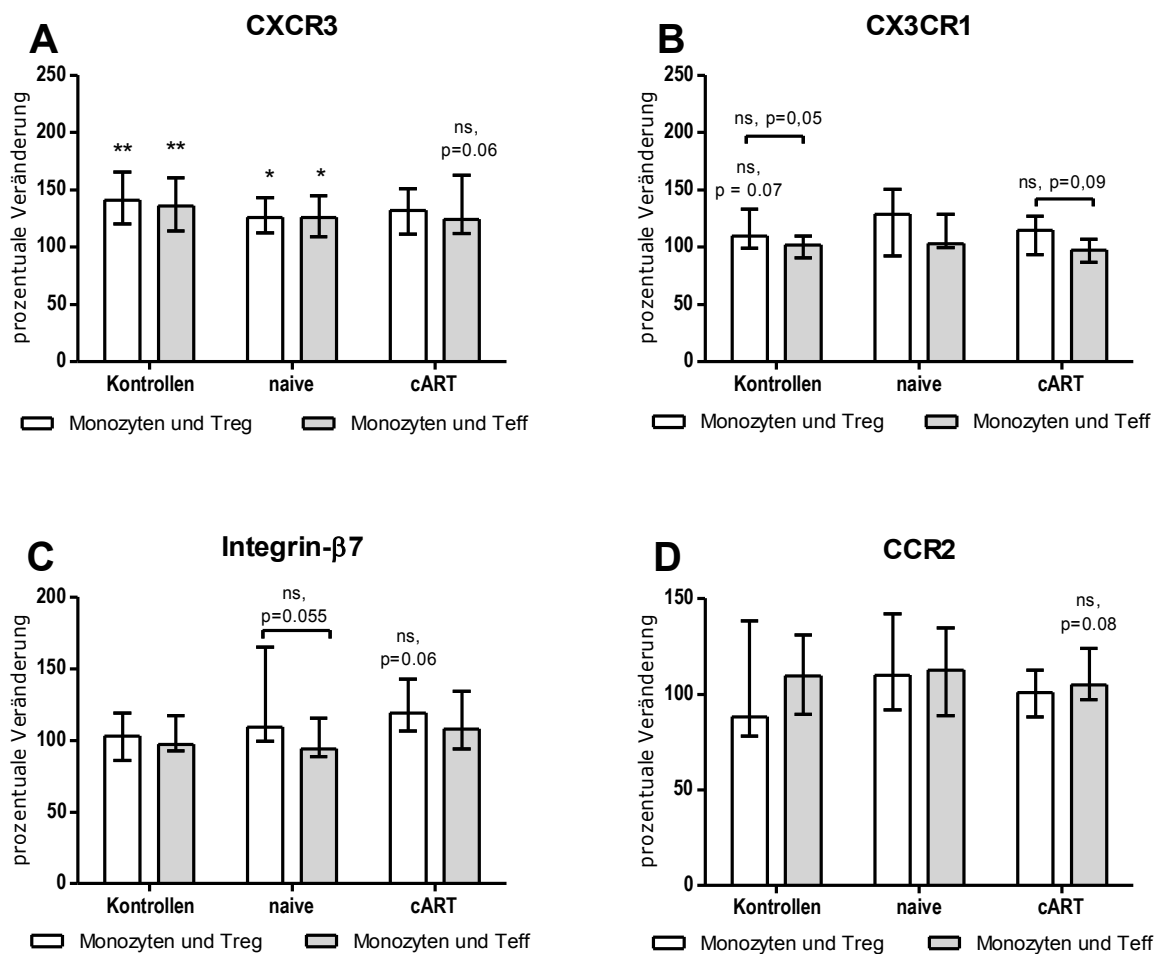


Abb. 9 zeigt die relative Veränderung der Expression (MFI) von CXCR3 (A), CX3CR1 (B), Integrin- $\beta$ 7 (C) bzw. CCR2 (D) auf Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden, bezogen auf die Expressionsdichte von CXCR3, CX3CR1, Integrin- $\beta$ 7 bzw. CCR2 auf Monozyten in Abwesenheit von T-Zellen (entspricht 100 %). Es wurden gesunde Kontrollen, naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten verglichen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Vergleiche zwischen den drei Gruppen erfolgten durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test. Signifikante Unterschiede in der Monozytenexpression nach Kultivierung mit Treg oder Teff sind über einer Säule dargestellt und wurden durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Sowohl bei den gesunden Kontrollen als auch bei den naiven HIV-seropositiven Patienten bewirkten Treg und Teff einen Anstieg der Expression von CXCR3 um 26-41 % (Abb. 9A). Dieser Effekt war tendenziell auch bei den behandelten Patienten bei Kultivierung mit Teff sichtbar, war jedoch statistisch nicht signifikant. Zwischen den Untersuchungsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Expression von CX3CR1 auf Monozyten von gesunden Kontrollen und den mit cART behandelten HIV-seropositiven Patienten war nach Kultivierung mit Treg tendenziell höher als nach Kultivierung mit Teff, es zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Patienten (Abb. 9B).

Treg oder Teff hatten in allen drei Untersuchungsgruppen keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression von CCR2 oder Integrin- $\beta$ 7 (Abb. 9C, 9D). Auf den Monozyten der behandelten HIV-seropositiven Patienten zeigte sich unter Anwesenheit von Treg lediglich eine tendenziell erhöhte Expression von Integrin- $\beta$ 7 (Abb. 9C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Treg und Teff von gesunden Kontrollpersonen und naiven HIV-infizierten Patienten die CXCR3-Expression auf Monozyten gleichermaßen erhöhen und unabhängig von einer HIV-Infektion keinen signifikanten Einfluss auf die Oberflächenexpression der Migrations-Moleküle CX3CR1, Integrin- $\beta$ 7 und CCR2 auf Monozyten haben.

### 3.2.1.6 Expression der HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4

CCR5 und CXCR4 sind als Chemokinrezeptoren an der Migration von Immunzellen beteiligt und stellen die beiden wichtigsten Korezeptoren für die HIV-Infektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Monozyten dar (93).

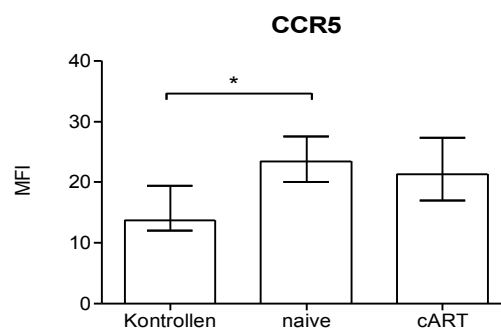


Abb. 10: Dargestellt ist die basale Expression (MFI) von CCR5 auf 40-44 Stunden kultivierten Monozyten von gesunden Kontrollen, naiven und mit cART behandelten HIV-seropositiven Patienten. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Statistische Vergleiche wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn-Test durchgeführt.

\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$



Basal zeigte sich eine um ca. 64 % signifikant höhere Expression von CCR5 auf Monozyten von naiven HIV-seropositiven Patienten verglichen mit den Monozyten der gesunden Kontrollen (Abb. 10). Hinsichtlich der CXCR4-Expression zeigte sich dies hingegen nicht.

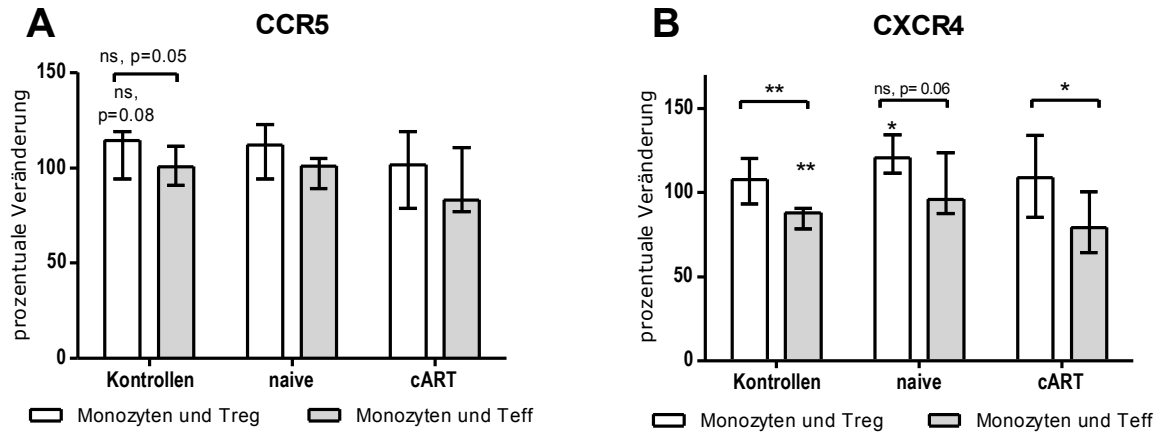


Abb. 11 zeigt die relative Veränderung der Expression von CCR5 (A) bzw. CXCR4 (B) auf Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden, bezogen auf die Expressionsdichte von CCR5 bzw. CXCR4 auf Monozyten in Abwesenheit von T-Zellen (entspricht 100 %). Es wurden gesunde Kontrollen, naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten verglichen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Vergleiche zwischen den drei Gruppen erfolgten durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test. Signifikante Unterschiede in der Monozytenexpression nach Kultivierung mit Treg oder Teff sind über einer Säule dargestellt und wurden durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Die Anwesenheit von Treg führte bei gesunden Kontrollen tendenziell zu einer vermehrten Expression von CCR5 auf Monozyten, welche jedoch nicht signifikant war (Abb. 11A). Zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Teff bewirkten auf Monozyten der gesunden Kontrollen eine signifikante Abnahme der Expression von CXCR4 um 12 % (Abb. 11B). Bei den naiven Patienten zeigte sich keine Abnahme der Expression nach Zugabe von Teff aber eine signifikante Zunahme der Expression von CXCR4 auf 121 % bei Anwesenheit von Treg.

Dies zeigt, dass Treg bei naiven HIV-seropositiven Patienten die Expression des HIV-Korezeptors CXCR4 auf Monozyten erhöhen können und sich dieser Einfluss unter cART wieder normalisiert.

### **3.2.2 Untersuchung der Zytokinkonzentration in den Zellkulturüberständen der Kokulturen mit Monozyten und T-Zellen**

Um den Einfluss von Treg im Vergleich zu Teff auf die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen von Monozyten zu bestimmen, wurden Multiplex-Analysen in den Zellkulturüberständen wie in *Kap. 2.7* beschrieben durchgeführt.

In den Monozyten-Monokulturen zeigten sich bei keinem der untersuchten Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, CCL2, CCL4, CCL5 und CX3CL1) signifikante Unterschiede zwischen den gesunden Kontrollen und den naiven oder mit cART behandelten HIV-seropositiven Patienten.

Die Konzentration der folgenden Zytokine konnte nicht ermittelt werden, da sich der gemessene Wert nicht im Bereich der Standardkurve befand: IFN- $\gamma$ , IP-10, IL-4, CXCL8, IL-12p70.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei Anwesenheit von Treg oder Teff zwischen den gesunden Kontrollen und den HIV-seropositiven Patienten hinsichtlich der Sekretion von CXCL9.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der untersuchten Zytokine dargestellt, für die eine Modulation durch Treg nachgewiesen werden konnte.

#### **3.2.2.1 Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ und des regulatorischen Zytokins IL-10 in Zellkulturüberständen nach Kokultivierung mit Monozyten und T-Zellen**

Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden von Monozyten und Makrophagen sezerniert, um entzündliche Immunantworten zu stimulieren. IL-10 kann ebenfalls von Monozyten und Makrophagen sezerniert werden und wirkt anti-inflammatorisch (90).

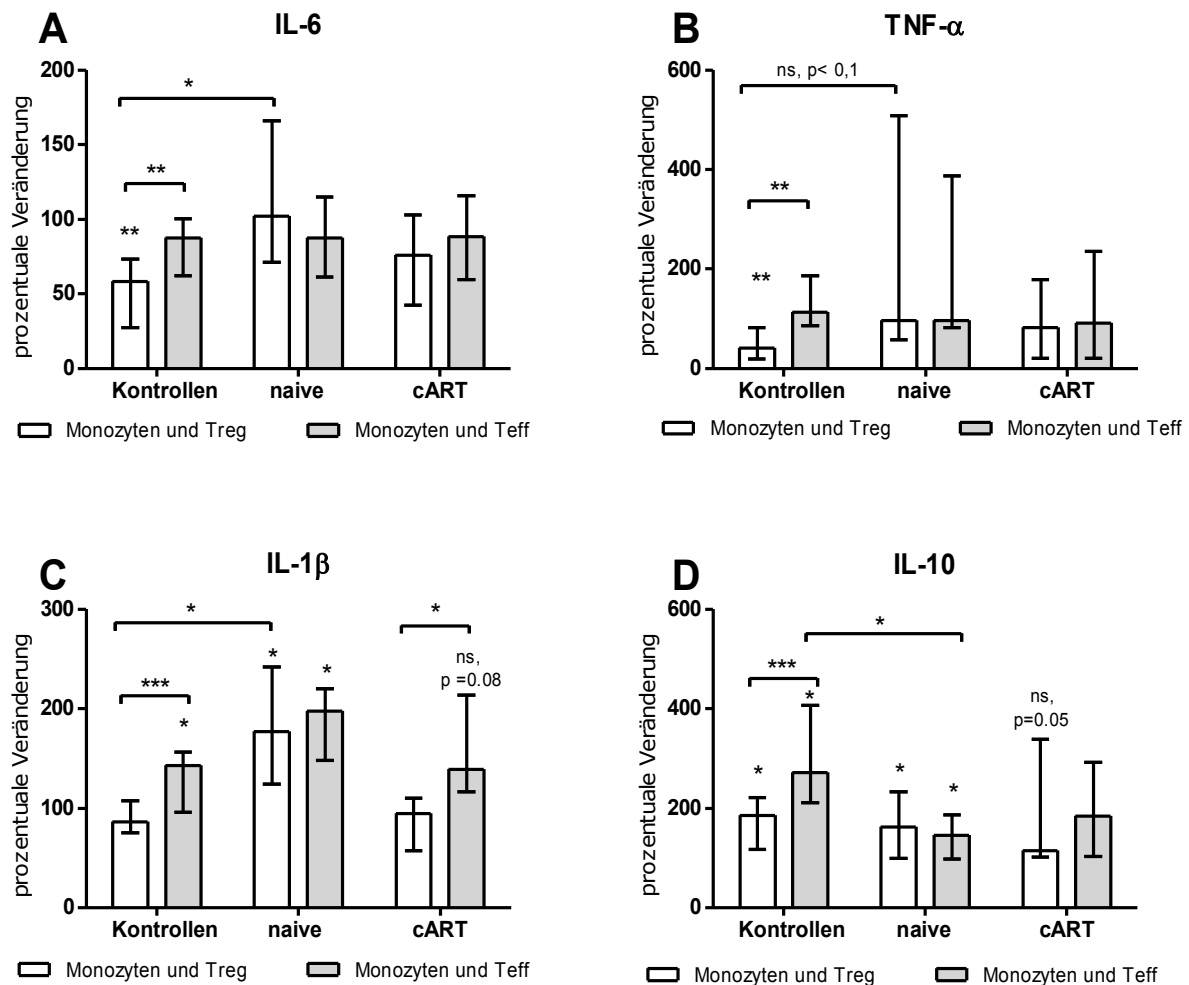


Abb. 12 zeigt die relative Veränderung der Konzentration der Zytokine IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und IL-10 (D) in Zellkulturüberständen von Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden bezogen auf Monozytenmonokulturen (entspricht 100 %). Es wurden gesunde Kontrollen, naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten verglichen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Vergleiche zwischen den drei Gruppen erfolgten durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test. Signifikante Unterschiede in der Monozytenexpression nach Kultivierung mit Treg oder Teff sind über einer Säule dargestellt und wurden durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

In gesunden Kontrollen erhöhten Teff sowohl die Sekretion des anti-inflammatorischen IL-10 (Abb. 12D) als auch die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  (Abb. 12C) und hatten dabei keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-6 oder TNF- $\alpha$  (Abb. 12A, B). Treg hingegen erhöhten die Sekretion von IL-10 (Abb. 12D) aber nicht die von IL-1 $\beta$  (Abb. 12C) und supprimierten gleichzeitig die Sekretion von IL-6 und TNF- $\alpha$  um 42 bzw. 48 % (Abb. 12A, B). Dies zeigt, dass Treg in gesunden Personen das inflammatorische Gleichgewicht von Monozyten in Richtung anti-inflammatorisches Zytokinprofil verändern. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter Einfluss von Treg aus naiven HIV-seropositiven Patienten keine Suppression der Sekretion

von IL-6 oder TNF- $\alpha$  bei zugleich verstärkter IL-1 $\beta$ -Sekretion (Abb. 12A, B, C). Dies deutet darauf hin, dass Treg in HIV-infizierten Patienten ihre anti-inflammatorische Wirkung auf Monozyten verlieren. Unter cART blieb dieser Defekt teilweise erhalten. Zwar normalisierte sich die Produktion von IL-1 $\beta$  (Abb. 12C) in den behandelten Patienten, Treg blieben aber unfähig die Sekretion von IL-6 und TNF- $\alpha$  herab zu regulieren (Abb. 12A, B).

### 3.2.2.2 Konzentration der Chemokine CCL2, CCL4, CCL5 und CX3CL1 in Zellkulturüberständen nach Kokultivierung mit Monozyten und T-Zellen

Die Chemokine CCL2, CCL4, CCL5 und CX3CL1 induzieren eine Migration von Immunzellen in entzündetes Gewebe und sind mit pro-inflammatorischen Immunreaktionen assoziiert (90).

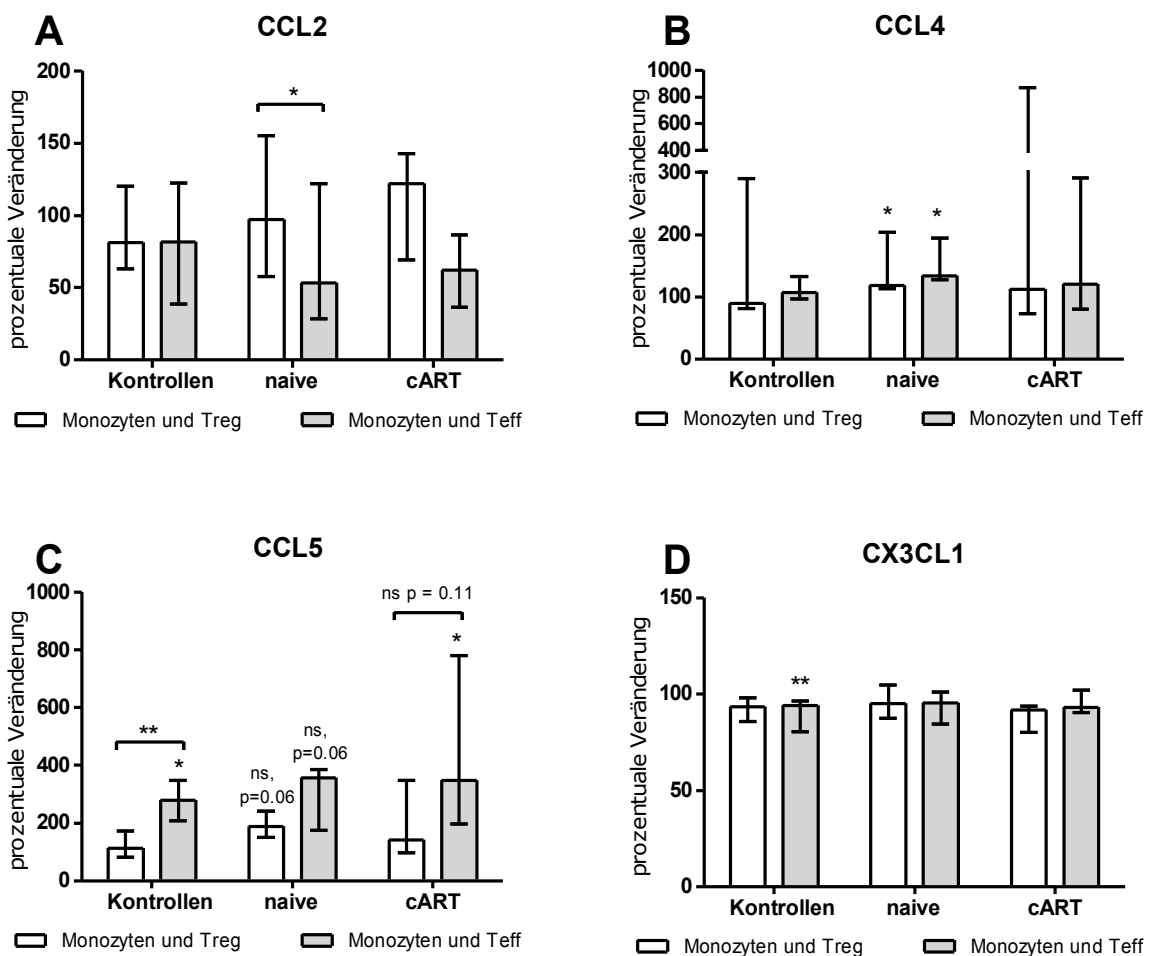


Abb. 13 zeigt die relative Veränderung der Konzentration der Chemokine CCL2 (A), CCL4 (B), CCL5 (C) und CX3CL1 (D) in Zellkulturüberständen von Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden bezogen auf Monozytenmonokulturen (entspricht 100 %). Es wurden gesunde Kontrollen, naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten verglichen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Vergleiche zwischen den drei Gruppen erfolgten durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test. Signifikante Unterschiede in der Monozytenexpression nach Kultivierung mit Treg oder Teff sind über einer Säule dargestellt und wurden durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Während Treg bei gesunden Kontrollen keinen Einfluss auf die Monozyten-Sekretion von CCL2, CCL4, CCL5 und CX3CL1 hatten (Abb. 13), induzierten sie bei unbehandelten HIV-infizierten Patienten die Sekretion von CCL4 und tendenziell CCL5 (Abb. 13B, C). Unter der Behandlung mit cART normalisierte sich dieser Effekt wieder (Abb. 13 B,C). Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.3 Untersuchung der Phagozytoseaktivität von Monozyten im Blut und intestinalen Makrophagen von HIV-seropositiven Patienten und HIV-seronegativen Kontrollen

Um Monozyten und Makrophagen von HIV-seropositiven Patienten funktionell zu untersuchen, wurde die Phagozytoseleistung gemessen. Es wurden naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten sowie gesunde Kontrollen verglichen. Zum einen erfolgte eine Messung der Phagozytoseleistung der Monozyten im Vollblut. Zum anderen wurden Makrophagen aus duodenalen Darmbiopsien isoliert und anschließend ein Phagozytostest mittels pHrodo wie im Kap. 2.3.2 und 2.6.3 beschrieben durchgeführt. Zur Auswertung wurde der Phagozytotische Index, der Quotient aus der gemessenen MFI bei 37 °C geteilt durch die MFI bei 0 °C, betrachtet. Es konnten keine Duodenalbiopsien von mit cART behandelten HIV-seropositiven Patienten gewonnen werden.

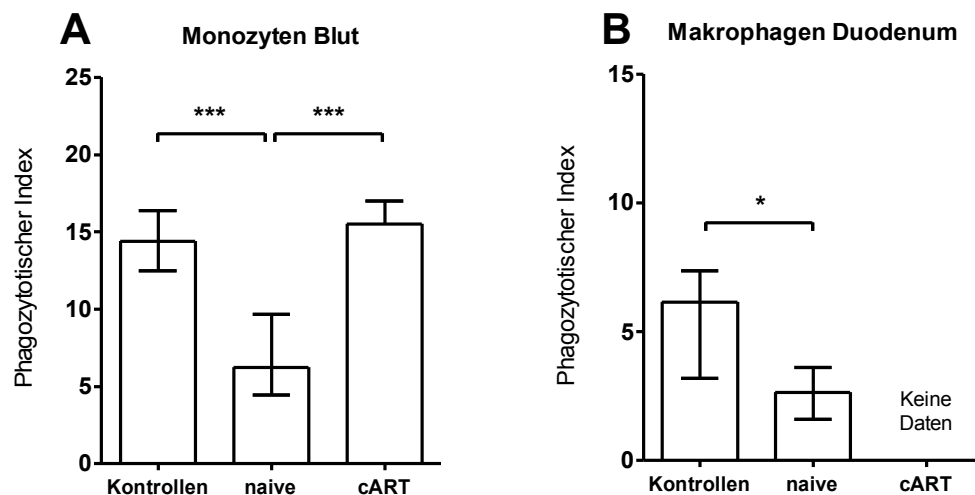


Abb. 14 zeigt die Phagozytoseleistung von Monozyten aus dem Blut (A) bzw. Makrophagen aus dem Duodenum (B) gesunder Kontrollen, naiver und mit cART behandelter HIV-seropositiver Patienten. Die Phagozytoseleistung ist angegeben als Phagozytotischer Index, dem Quotienten aus der gemessenen MFI bei 37 °C geteilt durch die MFI bei 0 °C. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test bzw. den Mann-Whitney-U-Test. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Bei der Untersuchung von Monozyten im Blut zeigte sich eine verminderte Phagozytosefähigkeit bei naiven HIV-seropositiven Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Unter cART normalisierte sich die Phagozytoseleistung wieder (Abb. 14A). Bei den naiven HIV-seropositiven Patienten zeigte sich ebenfalls eine verminderte Phagozytoseleistung der Makrophagen aus dem Duodenum im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Abb. 14B).

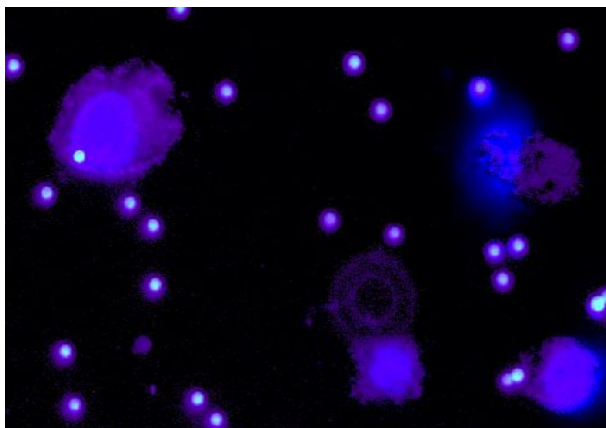
### 3.4 Einfluss von Treg auf die Phagozytoseleistung von Monozyten

Es sollte untersucht werden, ob Treg die Phagozytoseleistung von Monozyten beeinflussen und z.B. zu der in *Kap. 3.3* beschriebenen verringerten Phagozytose von Monozyten in HIV-infizierten Personen beitragen können. Für den Nachweis der Phagozytoseaktivität wurden fluoreszenzgekoppelte Latexpartikel eingesetzt, die im Gegensatz zu dem in *Kap. 3.3* verwendeten System, pHrodo, ihre Emissionsintensität im Verlauf des Phagozytoseprozesses nicht verändern. Im Rahmen der Etablierungsarbeiten wurde deshalb zunächst fluoreszenzmikroskopisch geprüft, ob die in *Kap. 2.6.1* beschriebene Versuchsdurchführung eine Phagozytose durch Monozyten gewährleistet.

#### 3.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Phagozytoseleistung von Monozyten mit Latexpartikeln

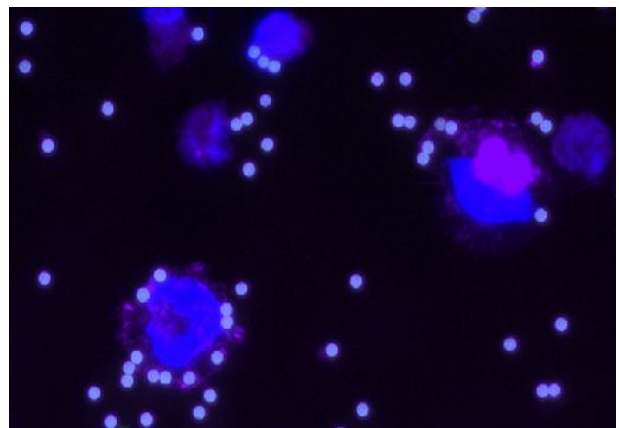
Nach der in *Kap. 2.6.1* beschriebenen Phagozytoseuntersuchung mit Latexpartikeln wurden Zytospins durchgeführt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops Bilder von Monozyten von HIV-seronegativen Kontrollen angefertigt. Monozyten phagozytieren bei Körpertemperatur, also 37 °C, sind auf Eis, bei 0 °C, aber inaktiv. Deshalb wurde als Negativkontrolle ein Versuch bei 0 °C durchgeführt.

**A**



0 °C

**B**



37 °C

*Abb. 15 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 40 Stunden lang kultivierten Monozyten nach der Durchführung eines Phagozytostests mit Latexpartikeln bei 0 °C (A) und bei 37 °C (B). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und das Zytoskelett über die Färbung von Aktin durch Phalloidin sichtbar gemacht.*

Im Gegensatz zum Kontrollansatz bei 0 °C fanden sich im Testansatz bei 37 °C Latexpartikel im zytoplasmatischen Bereich der Monozyten (*Abb. 15*). Da es sich um 2D-Aufnahmen handelt, kann optisch nicht unterschieden werden, ob die Partikel von den Monozyten aufgenommen

wurden oder von außen an deren Zellmembran haften. Im Kontrollansatz zeigten sich aber keine Partikel im zytoplasmatischen Bereich, was für eine aktive Aufnahme der Partikel durch die Monozyten bei 37 °C spricht. Zusätzlich wurden in beiden Ansätzen extrazelluläre Partikel gefunden. Diese stammen möglicherweise aus beschädigten Monozyten. Frühere Experimente unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass *in vitro*-kultivierte Monozyten während der Anfertigung von Zytospins zum Teil zerstört werden. Es ist aber auch möglich, dass nicht alle der nicht-internalisierten Partikel in den durchgeführten Waschschrritten entfernt wurden. Um die Ergebnisse zur Phagozytoseleistung durch solche freien Partikel nicht zu verfälschen, wurde der Quotient aus der gemessenen MFI bei 37 °C geteilt durch die MFI bei 0 °C gebildet, der Phagozytotische Index.

### 3.4.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Phagozytoseleistung von Monozyten mit Latexpartikeln

Um den Einfluss von Treg auf die Phagozytoseleistung von Monozyten zu untersuchen, wurde nach 40-44-stündiger Kokultivierung der Monozyten mit Treg oder Teff ein Phagozytostest mit Latexpartikeln durchgeführt. Da nicht immer eine ausreichende Anzahl Zellen, insbesondere Treg, aus dem Blut isoliert werden konnte, war die Durchführung eines Phagozytostests nicht bei jedem der in den vorherigen Abbildungen dargestellten Patienten möglich.

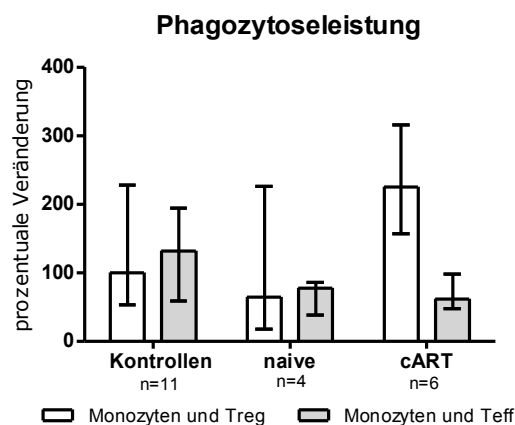


Abb. 16 zeigt die relative Veränderung der Phagozytoseleistung (angegeben als Phagozytischer Index = MFI bei 37 °C / MFI bei 0 °C) von Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden bezogen auf Monozytenmonokulturen (entspricht 100 %). Es wurden gesunde Kontrollen, naive und mit cART behandelte HIV-seropositive Patienten verglichen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Signifikanzen wurden innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test oder zwischen den drei Gruppen durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Unabhängig von einer HIV-Infektion hatte die Anwesenheit von Treg oder Teff keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytoseleistung der Monozyten (Abb. 16).



### **3.5 Geschlechtsspezifische phänotypische und funktionelle Unterschiede von Monozyten nach Kokultivierung mit T-Zellen**

Während der Durchführung dieser Arbeit deuteten einige Ergebnisse auf Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Kontrollpersonen hinsichtlich des Einflusses von Treg und Teff auf Monozyten hin.

Deshalb wurden die Daten von acht männlichen und sechs weiblichen gesunden Probanden verglichen um mögliche geschlechtsspezifische phänotypische und funktionelle Unterschiede in der Wirkung von Treg auf Monozyten zu untersuchen. Die Kultivierung der Monozyten erfolgte wie in *Kap 2.4* beschrieben ohne T-Zell-Kontakt oder mit autologen Treg bzw. Teff.

Im Folgenden sind die signifikanten phänotypischen und funktionellen Unterschiede dargestellt. Hinsichtlich der basalen Oberflächenexpression von CD14, CD206, HLA-DR, CD86, CCR2, CD64, CD16, CCR5 und CXCR3 auf Monozyten ohne T-Zellkontakt zeigten sich keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede. Nach Kultivierung mit Treg bzw. Teff zeigten sich hinsichtlich der Oberflächenexpression von HLA-DR, CD86, CD16, CD64, CX3CR1 und Integrin- $\beta$ 7 bzw. der Konzentration im Zellkulturüberstand von CCL2, CCL4 und CXCL9 keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede, die Ergebnisse sind nicht dargestellt.

### 3.5.1 Phänotypische geschlechtsspezifische Unterschiede

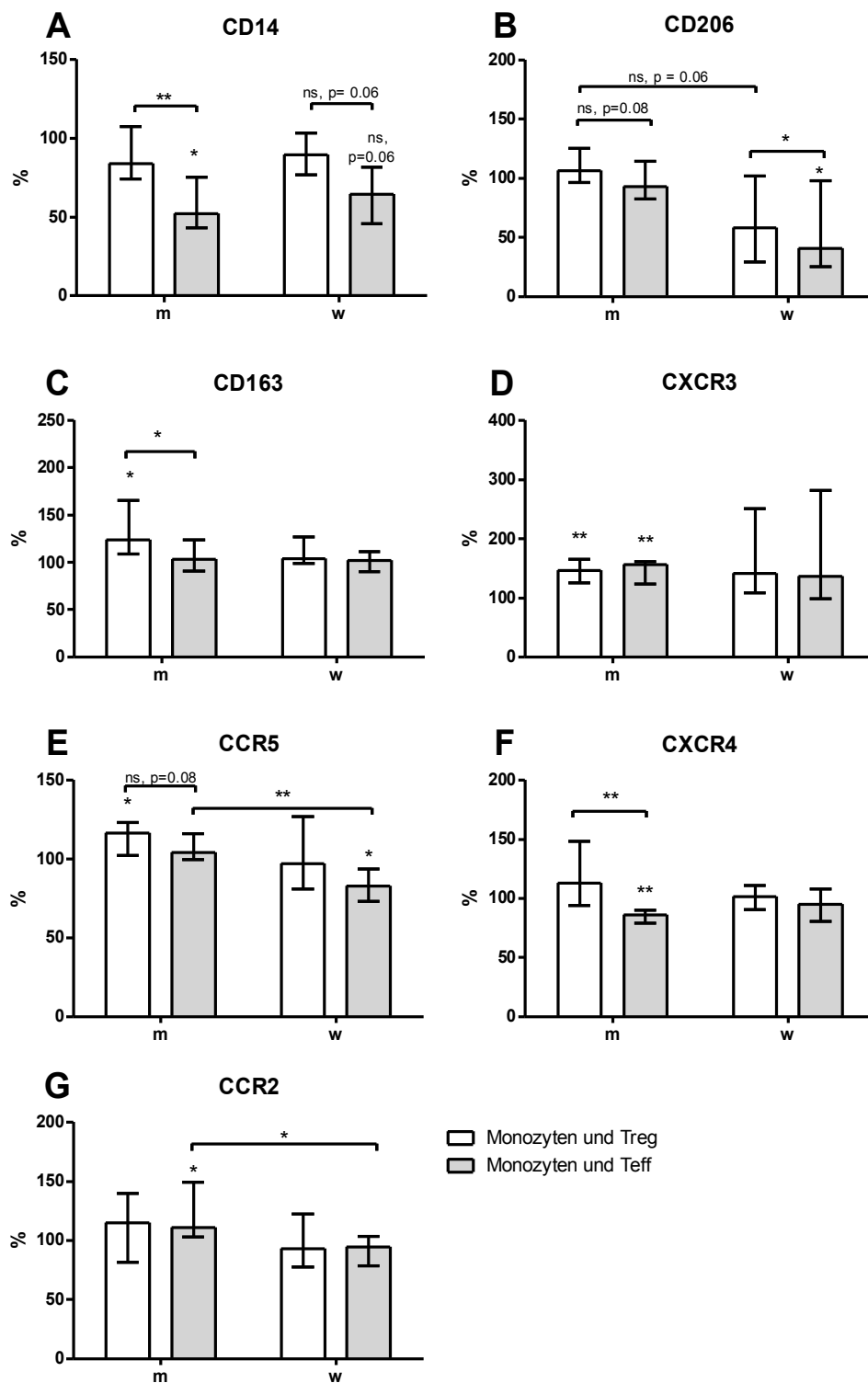


Abb. 17 zeigt die relative Veränderung der Expression der Oberflächenmoleküle CD14 (A), CD206 (B), CD163 (C), CXCR3 (D), CCR5 (E), CXCR4 (F) und CCR2 (G) auf Monozyten von Männern (m) bzw. Frauen (w) die mit autologen Treg oder Teff kultiviert wurden, bezogen auf Monozyten in Abwesenheit von T-Zellen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests (Vergleich zwischen zwei Gruppen) und des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Vergleich innerhalb einer Gruppe). \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

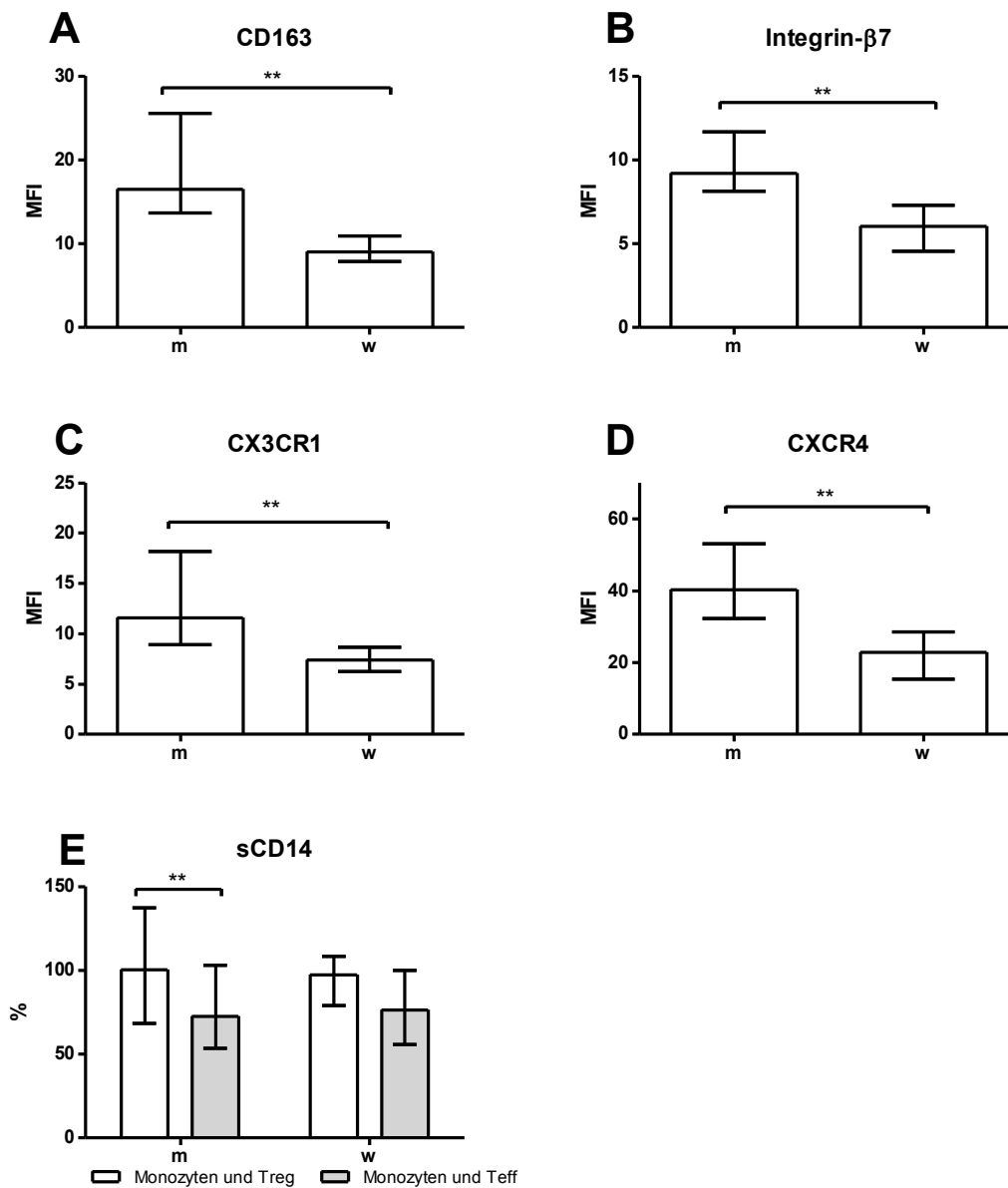


Abb. 18 zeigt die basale Expression (MFI) von CD163 (A), Integrin-β7 (B), CX3CR1 (C) und CXCR4 (D) auf Monozyten von Männern (m) bzw. Frauen (w) sowie die relative Veränderung der Konzentration von sCD14 in Zellkulturüberständen von Monozyten die mit autologen Treg oder Teff kultiviert wurden bezogen auf Monozytenmonokulturen (E). Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests (Vergleich zwischen zwei Gruppen) und des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Vergleich innerhalb einer Gruppe). \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Basal sowie unter Anwesenheit von Treg zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der CD14 Expression auf Monozyten von Männern und Frauen. Teff führten zu einer signifikant verminderten Expression von CD14 auf den Monozyten der männlichen und tendenziell auch der weiblichen Probanden (Abb. 17A).

Die in den Kulturüberständen nachgewiesenen sCD14-Konzentrationen sprechen dafür, dass dies in beiden Untersuchungsgruppen nicht durch eine verstärkte Freisetzung von membranständigem CD14 verursacht wurde, da weder Treg noch Teff zu einer erhöhten Konzentration von sCD14 führten (Abb. 18E).

Monozyten von männlichen Probanden zeigten eine fast doppelt so hohe basale Expression des anti-inflammatorischen Moleküls CD163 (Abb. 18A) sowie eine weitere signifikante Erhöhung der Expression auf Monozyten um 24 % durch Treg (Abb. 17C). Bei Frauen zeigte sich dieser Effekt nicht. Das deutet daraufhin, dass Treg bei Männern aber nicht bei Frauen eine anti-inflammatorische Differenzierung von Monozyten induzieren können.

Monozyten von Männern scheinen ein höheres Migrationspotential in inflammatorisches Gewebe zu haben, was sich in einer jeweils um etwa 50 % signifikant höheren basalen Expression von CX3CR1 und Integrin- $\beta$ 7 verglichen mit Monozyten von Frauen zeigt (Abb. 18B, C). Diese Expression konnte durch Treg nicht beeinflusst werden. Treg führten allerdings, wie Teff, zu einer vermehrten Expression des inflammatorischen Migrationsmoleküls CXCR3 bei Männern (Abb. 17D). Dieser Effekt war bei den Monozyten von Frauen nicht sichtbar.

Auch scheinen Unterschiede hinsichtlich der Expression und Regulation der HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4 zu bestehen. Die basale Expression von CXCR4 war signifikant höher bei Monozyten von Männern (Abb. 18D), hinsichtlich CCR5 zeigten sich keine basalen Unterschiede zwischen Männern und Frauen.

Während Treg von Männern die Monozyten-Expression von CCR5 erhöhten, hatten Treg von Frauen keinen Einfluss auf die Expression der HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4 (Abb. 17E, F). Teff von Männern regulierten die CXCR4-Expression auf Monozyten herab (Abb. 17F), Teff von Frauen hingegen reduzierten die Monozyten-Expression von CCR5 (Abb. 17E). Dies spricht dafür, dass zwischen Männern und Frauen Unterschiede bezüglich der Regulation dieser beiden Rezeptoren auf Monozyten existieren.

### 3.5.2 Funktionelle geschlechtsspezifische Unterschiede

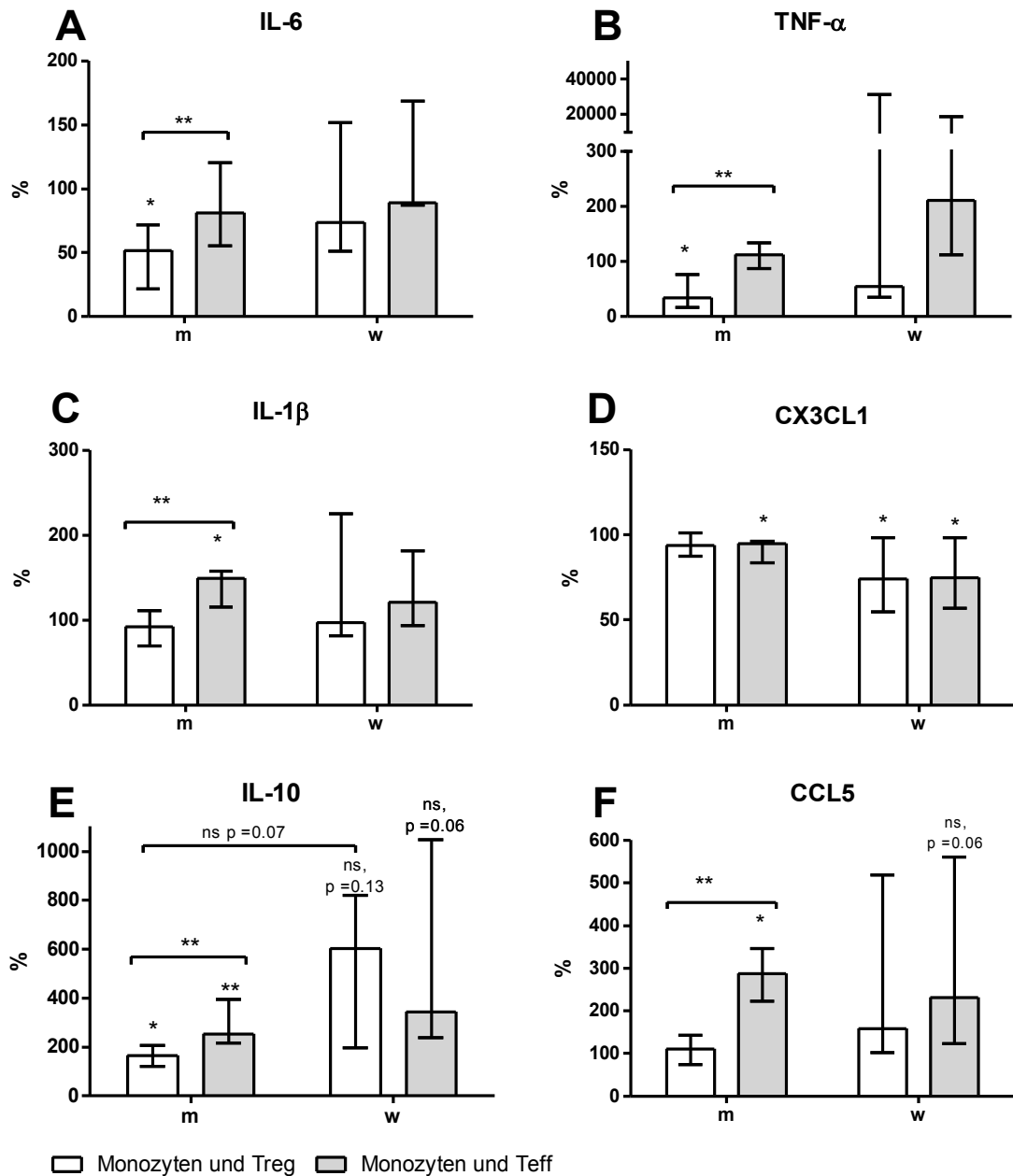


Abb. 19 zeigt die relative Veränderung der Konzentration der Zytokine IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C), CX3CL1 (D), IL-10 (E) und CCL5 (F) in Zellkulturüberständen von Monozyten von Männern (m) bzw. Frauen (w) die mit autologen Treg oder Teff kultiviert wurden, bezogen auf Monozytenmonokulturen. Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests (Vergleich zwischen zwei Gruppen) und des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Vergleich innerhalb einer Gruppe). \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

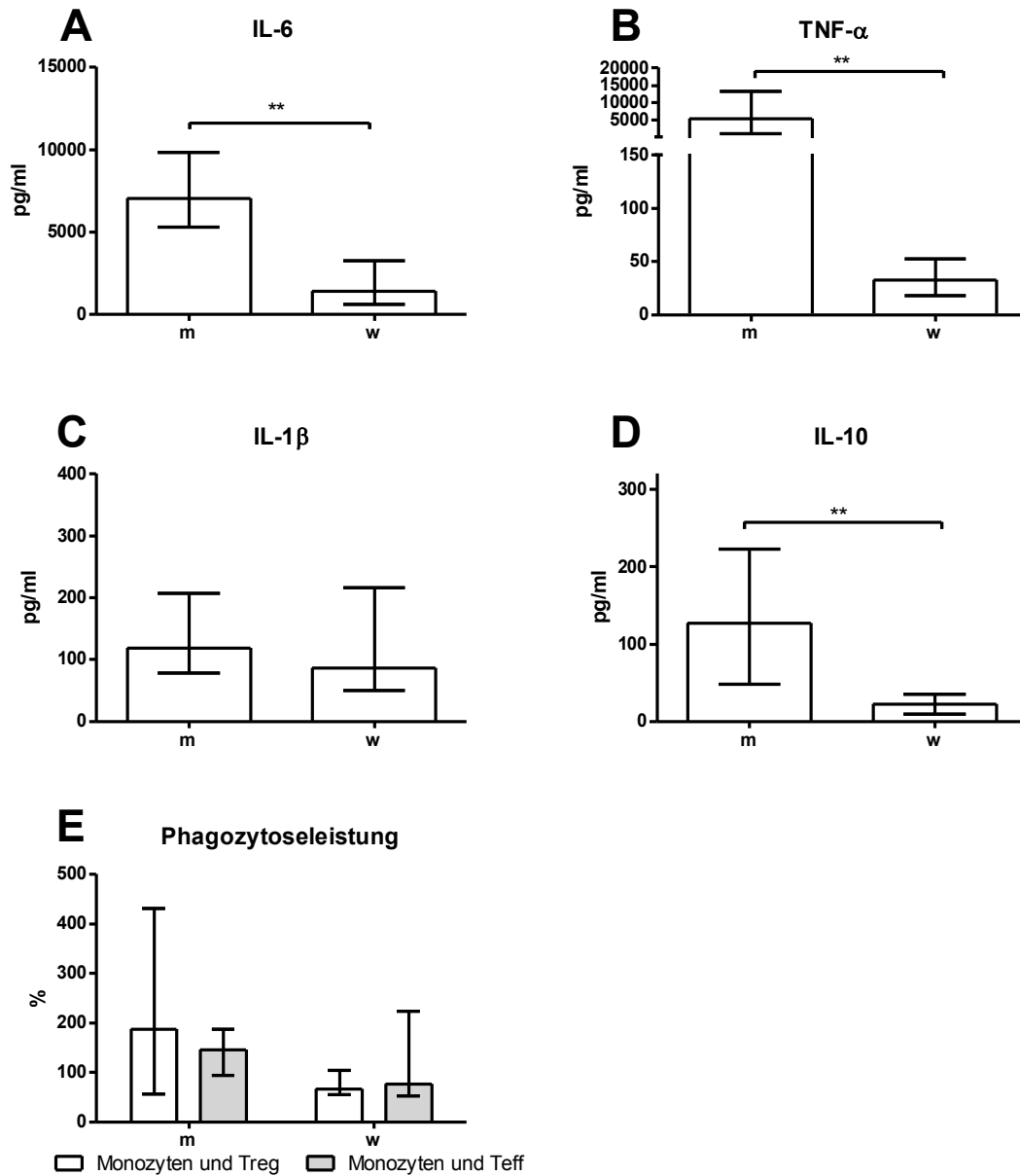


Abb. 20 zeigt die Konzentration der Zytokine IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und IL-10 (D) in Zellkulturüberständen von Monozytenmonokulturen sowie die relative Veränderung der Phagozytoseleistung (angegeben als Phagozytischer Index = MFI bei 37 °C / MFI bei 0 °C) von Monozyten die mit Treg oder Teff kultiviert wurden bezogen auf Monozytenmonokulturen (E). Die Daten sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests (Vergleich zwischen zwei Gruppen) und des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Vergleich innerhalb einer Gruppe). \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

In beiden Untersuchungsgruppen hatten Treg keinen Einfluss auf die CCL5-Sekretion (Abb. 19F), supprimierten jedoch wie auch Teff bei den weiblichen Probanden die Sekretion von CX3CL1 (Abb. 19D). Teff erhöhten bei männlichen Probanden die Sekretion von CCL5 (Abb. 19F).

Unabhängig vom Einfluss von T-Zellen wurden sowohl das regulatorische Zytokin IL-10 wie auch die beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  signifikant stärker von Monozyten von Männern als von Frauen sezerniert (Abb. 20A, B, D).

Treg induzierten bei Monozyten von männlichen Probanden die Sekretion des regulatorischen Zytokins IL-10 (Abb. 19E) und supprimierten zugleich die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  (Abb. 19A, B).

Bei den Monozyten der weiblichen Probanden wurde eine ähnliche Tendenz beobachtet, diese war statistisch jedoch nicht signifikant. Treg hatten bei beiden Geschlechtern keinen Einfluss auf die Konzentration von IL-1 $\beta$  (Abb. 19C).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Funktion der Treg, die inflammatorische Immunantwort der Monozyten zu regulieren, bei Frauen weniger ausgeprägt ist als bei Männern. Es zeigten sich keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Phagozytoseleistung von Monozyten nach alleiniger oder Kokultivierung mit Treg oder Teff.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Etablierung eines *in vitro*-Modells zur Wirkung von Treg auf Monozyten in der HIV-Infektion**

Die chronische HIV-Infektion ist gekennzeichnet durch eine systemische Immunaktivierung und das vermehrte Auftreten Entzündungs-assoziiierter Erkrankungen, auch unter der Behandlung mit cART. Hierfür scheinen Monozyten und Makrophagen, welche in der HIV-Infektion vermehrt eine inflammatorische Differenzierung aufweisen, eine bedeutende Rolle zu spielen. Die Monozyten von HIV-seropositiven Patienten produzieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 und zeigen eine erhöhte Expression der Aktivierungs-assoziierten Moleküle wie HLA-DR oder CD16. Diese Veränderungen sind unter cART nur teilweise reversibel (7, 94). Normalerweise können Treg immunregulatorisch wirken und überschießende Immunantworten begrenzen sowie eine anti-inflammatorische Differenzierung von Monozyten bewirken (61).

Es ist bisher allerdings noch nicht gezeigt worden, ob Treg auch in der HIV-Infektion ihre regulatorische Wirkung auf Monozyten ausüben können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein *in vitro*-Modell zum Nachweis der Wirkung von Treg auf Monozyten erfolgreich etabliert werden. In diesem Modell wird in Kokulturen eine deutliche Anreicherung bzw. Depletion von Treg erreicht, sodass Unterschiede in der Wirkung von Treg auf Monozyten im Vergleich zu Teff unter definierten Bedingungen nachgewiesen werden können.

### **4.2 Wirkung von Treg auf die Differenzierung von Monozyten in der HIV-Infektion**

In dem etablierten Modell wurde die Wirkung von Treg auf die Differenzierung von Monozyten bei gesunden HIV-negativen Probanden im Vergleich zu naiven und mit cART behandelten HIV-seropositiven Patienten anhand verschiedener phänotypischer und funktioneller Parameter untersucht.

Es ist bekannt, dass mit zunehmender Differenzierung von Monozyten die Expressionsdichte von CD14 sinkt, welches eine wichtige Rolle für das Erkennen von pathogenen Strukturen wie z.B. LPS spielt (87, 88). In den durchgeführten Kokulturen der gesunden HIV-negativen Kontrollen zeigte sich, dass Treg im Gegensatz zu Teff die Oberflächenexpression von CD14 weniger stark reduzieren (Abb. 4A). Dies deutet darauf hin, dass die CD14-vermittelte Monozyten-Erkennung pathogener Strukturen durch Treg aufrecht erhalten werden kann.



Anhand verschiedener Oberflächenmoleküle sowie der Zytokin-Sekretion können pro- und anti-inflammatorische Monozyten und Makrophagen unterschieden werden. Typisch für eine anti-inflammatorische Differenzierung ist die vermehrte Expression der Oberflächenmoleküle CD163 und CD206 (33, 89). CD16 und HLA-DR werden hingegen verstärkt auf pro-inflammatorischen Monozyten und Makrophagen (31, 87, 90) exprimiert. Monozyten und Makrophagen können über die Oberflächenproteine CD64 Makrophagen sowie über CD86 kostimulatorisch T-Zellen aktivieren und so pro-inflammatorisch wirken (31, 90).

In den durchgeführten Kokulturversuchen zeigte sich, dass Treg von gesunden Kontrollen einen anti-inflammatorischen Phänotyp im Sinne einer erhöhten CD163 sowie einer verminderten CD16 Expression induzieren können (Abb. 5A, 6A). Auch führten Treg zumindest in der Tendenz zu einer verringerten Expression von CD64 und CD86 auf den Monozyten (Abb. 7).

Zusätzlich verringerten Treg bei den Monozyten der gesunden Kontrollen die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  und induzierten zugleich eine vermehrte Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Abb. 12A, B, D).

Da die Zytokine nicht intrazellulär sondern in den zellfreien Kulturüberständen gemessen wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie auch zum Teil von den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sezerniert wurden. Für die hier untersuchten Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-10 ist jedoch bekannt, dass sie von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zu Monozyten nur geringfügig produziert werden (67). Darüber hinaus kann eine verminderte Zytokinkonzentration, wie sie für IL-6 und TNF- $\alpha$  in Anwesenheit von Treg nachgewiesen wurde, nur Folge einer verminderten Zytokinsekretion durch Monozyten sein, da die Daten immer relativ bezogen auf die Monozytenmonokulturen ausgewertet wurden. Es muss sich hier demnach um eine Treg-induzierte Suppression der pro-inflammatorischen Zytokinsekretion von Monozyten handeln. Die nachgewiesene erhöhte Konzentration von IL-10 hingegen kann teilweise auch auf eine Sekretion von Treg zurückzuführen sein.

Insgesamt zeigen die Befunde, dass Treg von HIV-seronegativen Kontrollpersonen die Fähigkeit haben Monozyten zu modulieren, indem sie einen anti-inflammatorischen Phänotyp induzieren und die pro-inflammatorische Zytokinsekretion supprimieren.

Die Ergebnisse bestätigen teilweise eine Arbeit von Tiemessen et al. (61). Neben der Steigerung der Expression von CD163 auf Monozyten durch Treg konnten Tiemessen et al. eine Verringerung der Expression von HLA-DR und CD86 sowie eine Steigerung der Expression von CD206 auf Monozyten durch Treg nachweisen. Diese Ergebnisse zeigten sich in den hier

gezeigten Daten nicht bzw. bei CD86 nur tendenziell (Abb. 7B). Möglicherweise spielt die Auswahl der Probanden, v.a. in Hinblick auf Geschlecht und Alter, oder methodische Unterschiede hierfür eine Rolle. Auch wurden von Tiemessen et al. in der Auswertung direkt die gemessenen MFI-Mittelwerte verglichen. Hingegen sind die hier gezeigten Daten immer als prozentuale Veränderung der mit autologen Treg bzw. Teff kultivierten Monozyten bezogen auf die Monozyten ohne Kontakt zu T-Zellen angegeben, wodurch die bei immunologischen Untersuchungen typischen interindividuellen Schwankungen reduziert werden.

Die Daten von Tiemessen et al. deuten ebenfalls daraufhin, dass Treg ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil mit einer verminderten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 und einer vermehrten Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 bei Monozyten induzieren. Eine Treg-vermittelte Zunahme der Sekretion von IL-10 durch Monozyten konnte ebenfalls von Kwon et al. gezeigt werden (67).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals umfassend der Einfluss von Treg auf Monozyten HIV-infizierter Personen untersucht. Die Expression von CD14 und damit wahrscheinlich die CD14-vermittelte Monozyten-Erkennung pathogener Strukturen konnte auch bei den HIV-seropositiven Patienten, unabhängig von einer antiretroviralen Therapie, durch Treg weitestgehend aufrecht erhalten werden (Abb. 4A). Im Gegensatz zu den Treg gesunder Kontrollen konnten Treg von naiven HIV-seropositiven Patienten aber weder die Expression des anti-inflammatorischen Oberflächenmoleküls CD163 erhöhen (Abb. 5A) noch die des pro-inflammatorischen Oberflächenmoleküls CD16 senken (Abb. 6A). Auch unter cART erhöhten Treg zwar die Expression des anti-inflammatorischen Moleküls CD163 (Abb. 5A), verminderten aber zugleich die CD206-Expression (Abb. 5B) und hatten keinen Einfluss auf die Expression von CD16 (Abb. 6A).

Auch deuten die Daten daraufhin, dass die pro-inflammatorische Fähigkeit der Monozyten T-Zellen mittels CD64 und CD86 zu stimulieren durch Treg in der HIV-Infektion nicht signifikant eingeschränkt wird sondern erhalten bleibt (Abb. 7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Treg die Fähigkeit einen anti-inflammatorischen Phänotyp zu induzieren in der HIV-Infektion verlieren. Gleichzeitig ist die Fähigkeit, die pro-inflammatorische Zytokinproduktion von Monozyten zu supprimieren in der HIV-Infektion eingeschränkt. So waren Treg in der unbehandelten HIV-Infektion nicht in der Lage, die Sekretion von IL-6 und TNF- $\alpha$  zu supprimieren und führten sogar ebenso wie Teff zu einer

vermehrten Sekretion von IL-1 $\beta$  (Abb. 12A, B, C). Unter cART normalisierte sich zwar die IL-1 $\beta$  Sekretion, IL-6 und TNF- $\alpha$  konnten aber weiterhin nicht supprimiert werden (Abb. 12A, B, C).

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Treg von HIV-infizierten Personen die Fähigkeit, die pro-inflammatorische Aktivität von Monozyten zu supprimieren, verlieren und diese auch unter cART nicht vollständig zurück erlangen. Dies kann von großer klinischer Bedeutung sein, da eine pro-inflammatorische Differenzierung von Monozyten und Makrophagen in der HIV-Infektion nicht nur zunimmt, sondern auch zu dem erhöhten kardiovaskulären Risiko beizutragen scheint (7).

Die genauen Pathomechanismen hierfür sind noch nicht vollständig verstanden. Es ist aber bekannt, dass aktivierte Monozyten von HIV-seropositiven Patienten denen von HIV-seronegativen Patienten mit akutem Koronarsyndrom ähneln und z.B. eine vermehrte Anzahl von CD16<sup>+</sup> Monozyten aufweisen, was wiederum mit einem erhöhten Plasmalevel des inflammatorischen Zytokins IL-6 korreliert (95). Es liegen auch Daten vor, die keine Korrelation zwischen dem Aktivierungsstatus von Monozyten und einem Marker für subklinische Gefäßerkrankungen (mittlere Intimadicke und Plaque in der Karotis) zeigen (96).

Es konnte aber weiterhin gezeigt werden, dass ein erhöhtes Plasmalevel von TNF- $\alpha$  mit einem erhöhten Kalziumspiegel in den Koronararterien, einem subklinischen Marker für Arteriosklerose, korreliert (20). Neben TNF- $\alpha$  sind auch erhöhte Konzentrationen von IL-6 und IL-1 $\beta$  mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie HIV-assoziierte Demenz verbunden (21).

Im Rahmen der HIV-assoziierten chronischen Immunaktivierung tragen Monozyten und Makrophagen zu dem verschobenem Gleichgewicht in der Zytokinproduktion bei, indem sie vermehrt pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  aber auch das anti-inflammatorische IL-10 sezernieren (97). Ein verschobenes Zytokingleichgewicht stellt einen Teufelskreis in der HIV-Infektion dar. So kann TNF- $\alpha$  die Replikation von HIV begünstigen, was wiederum zu einer vermehrten Produktion von TNF- $\alpha$  durch Monozyten führt (98). Während IL-6 einen ähnlichen Effekt verursacht, kann IL-10 die Replikation von HIV supprimieren (98). Da Treg in den durchgeführten Versuchen bei naiven Patienten die Sekretion von IL-10 durch Makrophagen zwar hochregulieren, die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-6 gleichzeitig aber nicht herabregulieren konnten (Abb. 12A, B, D), könnten sie so indirekt die Virusreplikation begünstigen.

Auch tragen TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  direkt durch T-Zellaktivierung sowie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  indirekt durch Senken des transepithelialen Widerstands und in der Folge vermehrter mikrobieller Translokation zu einer vermehrten Immunaktivierung bei (99).

Nicht nur im Blut scheint eine erhöhte pro-inflammatorische Zytokinsekretion durch Monozyten eine bedeutende Rolle in der HIV-Infektion zu spielen. Eine Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe hat kürzlich gezeigt, dass auch mukosale Makrophagen vermehrt pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und Chemokine wie CCL5, CXCL9 und CXCL10 bei unveränderter IL-10 Konzentration sezernieren (100).

Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass der Regulationsmechanismus der Treg in Bezug auf Monozyten in der HIV-Infektion gestört ist. In der HIV-Infektion verlieren Treg die Fähigkeit, eine anti-inflammatorische Differenzierung von Monozyten in Hinblick auf die Expression von Oberflächenproteinen und die Zytokinsekretion zu induzieren. Auch unter cART zeigt sich nur eine teilweise Wiederherstellung dieser Fähigkeit. Dieser Regulationsdefekt könnte zu der Immunaktivierung sowie dem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen in der HIV-Infektion beitragen.

#### **4.3 Wirkung von Treg auf die Expression von Chemokinrezeptoren und die Sekretion von Chemokinen durch Monozyten in der HIV-Infektion**

Chemokine und Chemokinrezeptoren spielen eine wichtige Rolle für inflammatorische Immunreaktionen, da sie die Migration von Monozyten und anderen Immunzellen in inflammatorisches Gewebe vermitteln können (91, 101).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Expression von CXCR3 auf den Monozyten der naiven HIV-seropositiven Patienten nachgewiesen (Abb. 8). Dies spricht dafür, dass in der unbehandelten HIV-Infektion CXCR3 an einer vermehrten Migration von Monozyten in entzündetes Gewebe beteiligt sein könnte. Bei den naiven HIV-seropositiven Patienten konnte wie bei den gesunden Kontrollen die CXCR3 Expressionsdichte auf den Monozyten durch Treg noch weiter erhöht werden (Abb. 9A). Die erhöhte Oberflächenexpression von CXCR3 auf Monozyten in der HIV-Infektion könnte durch Treg induziert oder noch verstärkt werden und somit die vermehrte Migration der Monozyten in inflammatorisches Gewebe und dort die Entzündungsreaktion verstärken.

Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss von Treg auf die Expression von CX3CR1, CCR2 oder Integrin- $\beta$ 7 auf Monozyten nachgewiesen werden (Abb. 9B, C, D).

Während Treg bei gesunden Kontrollen keinen Einfluss auf die Sekretion der Chemokine CCL2, CCL4, CCL5 und CX3CL1 durch Monozyten hatten (Abb. 13), induzierten sie bei unbehandelten HIV-infizierten Patienten die Sekretion von CCL4 und tendenziell auch CCL5 durch Monozyten (Abb. 13B, C). Unter Behandlung normalisierte sich dieser Effekt wieder. Durch die Freisetzung von CCL4 und CCL5 können Monozyten CCR5-exprimierende Immunzellen chemotaktisch anziehen und dadurch Entzündungsreaktionen fördern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass dieser Mechanismus in der unbehandelten HIV-Infektion durch Treg gefördert wird.

CCR5 und CXCR4 sind die wichtigsten Korezeptoren für HIV und werden neben CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auch auf Monozyten exprimiert (93). In der unbehandelten HIV-Infektion zeigte sich in den durchgeführten Versuchen auch ohne Anwesenheit von T-Zellen eine erhöhte Expression von CCR5 auf Monozyten (Abb. 10), was auf eine erhöhte Empfänglichkeit für eine Infektion durch HIV hindeutet. Treg bewirkten keine signifikante Veränderung in der Expression von CCR5, steigerten aber bei den naiven HIV-seropositiven Patienten die Expression von CXCR4 (Abb. 11). Unter cART konnten Treg weder die Expression von CCR5 noch von CXCR4 auf Monozyten erhöhen, sie verminderten die Expression der Korezeptoren aber auch nicht (Abb. 11).

Das zeigt, dass Treg in der HIV-Infektion die Expression der Korezeptoren CXCR4 und CCR5 auf Monozyten und somit die Empfänglichkeit für eine Infektion durch HIV aufrecht erhalten können. Dies könnte neben der Virusreplikation auch besonders für die Bildung von Reservoirs und die Verbreitung des Virus im Körper eine Rolle spielen.

#### **4.4 Wirkung von Treg auf die Phagozytosefähigkeit von Monozyten und Makrophagen in der HIV-Infektion**

Monozyten und Makrophagen spielen eine wichtige Rolle für das Erkennen und Eliminieren von Pathogenen durch Phagozytose. Insbesondere die Abwehrfunktion intestinaler Makrophagen ist aufgrund der hohen Exposition des Darms gegenüber Mikroorganismen wichtig, um eventuell die Darmbarriere übertretende Pathogene oder bakterielle Bestandteile abzufangen.

In HIV-infizierten Patienten scheint diese Abwehrfunktion systemisch verringert zu sein. So zeigten sowohl Monozyten im Blut als auch duodenale Makrophagen aus naiven HIV-seropositiven Patienten eine reduzierte Phagozytosekapazität (Abb. 14), (100). Dies spricht dafür, dass intestinale Makrophagen die für eine HIV-Infektion typische erhöhte mikrobielle

Translokation aus dem Darmlumen nicht effizient abwehren können und Monozyten die systemische mikrobielle Invasion nicht kompensieren können. Um nachzuweisen, ob Treg eine Rolle für diese reduzierte Abwehr spielen, wurde in dem *in vitro*-Modell der Einfluss von Treg auf die Phagozytoseaktivität von Monozyten untersucht.

Tiemessen et al. (61) konnten zeigen, dass Treg HIV-seronegativer Personen die Phagozytosekapazität von Monozyten erhöhen können. In den hier durchgeführten Kokulturversuchen zeigte sich dieser Effekt hingegen nicht. Weder bei den gesunden Kontrollen noch bei den HIV-seropositiven Patienten hatten Treg einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytoseleistung der Monozyten (Abb. 16). Möglicherweise sind für diese Diskrepanz methodische Aspekte ursächlich. So konnte auf Grund der niedrigen Zahl an isolierten Treg, insbesondere bei den HIV-seropositiven Patienten, nicht immer ein Phagozytostest durchgeführt werden. Auch wurde der Test immer mit Latexpartikeln durchgeführt, während Tiemessen et al. neben diesen auch Zymosanpartikel verwendet haben. Die Aufnahme der Latexpartikel durch Monozyten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwar einmal exemplarisch mit Monozyten einer gesunden Kontrolle mit dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt (Abb. 15). Hierbei wurde aber auch ein recht hoher Teil an fluoreszierenden Latexpartikeln um die Zellen herum sichtbar, der möglicherweise die Ergebnisse beeinflusst haben könnte.

Um den Einfluss von Treg auf die Phagozytose von Monozyten in der HIV-Infektion abschließend zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig.

#### **4.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Wirkung von Treg auf die Differenzierung von Monozyten**

Zwischen Männern und Frauen sind verschiedene immunologische Unterschiede bekannt, u.a. hinsichtlich der Empfänglichkeit und des Verlaufs von Infektionskrankheiten wie auch in der Regulation von Immunantworten (68). Interessanterweise zeigten sich bei der Durchführung dieser Arbeit geschlechtsspezifische Unterschiede in der Wirkung von Treg auf Monozyten.

So konnten Treg bei Männern aber nicht bei Frauen eine anti-inflammatorische Differenzierung von Monozyten im Sinne einer erhöhten CD163 Expression herbeiführen (Abb. 17C). Bereits basal, d.h. ohne den Einfluss von Treg, zeigten Monozyten von Männern eine höhere CD163 Expression (Abb. 18A). Diese kann scheinbar durch Treg noch weiter erhöht werden.

Auch in Hinblick auf die Sekretion von Zytokinen scheint die anti-inflammatorische Wirkung von Treg auf Monozyten bei Männern eine größere Bedeutung zu haben, wobei sich bei den

Frauen eine ähnliche Tendenz zeigte. So induzierten Treg bei männlichen Probanden die Monozyten-Sekretion des regulatorischen Zytokins IL-10 und supprimierten zugleich die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  (Abb. 19A, B, E). Allerdings zeigte sich bei den durchgeführten Versuchen bei den Monozyten der männlichen Probanden auch bereits basal eine höhere Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  (Abb. 20A, B). Es ist auch bekannt, dass Monozyten von Männern auf eine Stimulation mit LPS mit der vermehrten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine reagieren (102).

Die pro- bzw. anti-inflammatorische Differenzierung von Monozyten wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, bei Männern scheint die Funktion der Treg, die inflammatorische Immunantwort der Monozyten zu regulieren, stärker ausgeprägt zu sein als bei Frauen.

Die vermehrte basale Expression von CX3CR1 und Integrin- $\beta$ 7 auf Monozyten von Männern (Abb. 18B, C) deutet darauf hin, dass diese ein höheres Migrationspotential in inflammatorisches oder intestinales Gewebe aufweisen. Treg führten nicht zu einer Verminderung von CX3CR1 und Integrin- $\beta$ 7, erhöhten aber die Expression von CXCR3 auf Monozyten von Männern (Abb. 17D). Während Treg also keinen Einfluss auf das Migrationspotential von Monozyten von Frauen nehmen können, können sie dieses bei Männern noch weiter steigern.

Hinsichtlich der Expression der HIV-Korezeptoren CXCR4 und CCR5 scheint es verschiedene Regulationsmechanismen zwischen den Geschlechtern zu geben. Die erhobenen Daten zeigen eine basal erhöhte Expression von CXCR4 auf Monozyten von Männern (Abb. 18D) und eine Steigerung der CCR5-Expression auf deren Monozyten durch Treg (Abb. 17E). Treg zeigten keinen Einfluss auf die Expression der Korezeptoren bei Frauen.

Zwischen Männern und Frauen existieren verschiedene immunologische Unterschiede, auch in Hinblick auf die Wirkung von Treg auf Monozyten, wie hier gezeigt werden konnte. Deshalb wurde versucht, zu den untersuchten HIV-seropositiven Patienten passende gesunde Kontrollen einzuschließen. Es wurde die gleiche Anzahl von männlichen und weiblichen unbehandelten HIV-seropositiven Patienten untersucht. Es waren aber keine weiblichen, mit cART behandelten, HIV-seropositiven Patienten verfügbar.

#### **4.6 Klinische Bedeutung**

Die Ergebnisse der durchgeführten Kokulturversuche zeigen, dass Treg in der unbehandelten HIV-Infektion ihre Fähigkeit, eine anti-inflammatorische Differenzierung von Monozyten zu induzieren, verlieren. Auch unter cART ist diese Funktion nur teilweise reversibel.

Die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der anti-inflammatorischen Wirkung von Treg auf Monozyten deuten darauf hin, dass dieser Regulationsmechanismus bei Männern eine größere Rolle spielen könnte als bei Frauen.

Bei einer HIV-Infektion zeigen sich vermehrt pro-inflammatorische Monozyten, welche in inflammatorisches Gewebe, z.B. die intestinale Mukosa migrieren. Hier treffen und reagieren sie auf ein spezifisches Milieu, welches bei einer HIV-Infektion auch eine vermehrte Anzahl intestinaler Treg bedeutet. Wie gezeigt werden konnte, ist die Regulation von Monozyten durch Treg in der chronischen HIV-Infektion beeinträchtigt, sodass durch die Treg eine pro-inflammatorischen Differenzierung der Monozyten nicht mehr effizient gegenreguliert werden kann.

Die erhöhte Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen aus Monozyten und Makrophagen fördert die chronische Immunaktivierung und kann zu dem erhöhten kardiovaskulären Risiko von HIV-infizierten Patienten beitragen. Die gesteigerte Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine fördert zudem Entzündungsreaktionen, die die intestinale Barriere schädigen. In Kombination mit der nachgewiesenen reduzierten Phagozytoserate von Monozyten und intestinalen Makrophagen in der HIV-Infektion können hierdurch Darm-luminale Produkte systemisch angereichert werden, die ebenfalls immunaktivierend wirken. Hieraus ergibt sich ein Teufelskreis in der HIV-Infektion: Durch die chronische Immunaktivierung kommt es zu weiteren Fehlfunktionen von Immunzellen und Gewebezellen, welche wiederum die Immunaktivierung verstärken. Eigentlich sollten Treg diesen Kreislauf unterbrechen und z.B. eine anti-inflammatorische Differenzierung von Monozyten induzieren können. Da dieser Mechanismus in der HIV-Infektion gestört zu sein scheint, tragen Treg vielmehr zu der Immunaktivierung bei, anstatt regulierend einzugreifen.

#### **4.7 Ausblick**

Auch wenn die durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen nicht direkt auf die komplexe *in vivo*-Situation übertragen werden können, zeigen die durchgeführten Experimente eine grundsätzliche Störung des Regulationsmechanismus von Treg in Bezug auf die Differenzierung von Monozyten in der HIV-Infektion. Es ist allerdings nicht möglich abschließend zu sagen, ob die suppressive Wirkung der Treg vermindert oder die Kapazität der Monozyten auf die Treg zu reagieren gestört ist. Da Monozyten in der HIV-Infektion eine vermehrt pro-inflammatorische Differenzierung zeigen (90), scheint es möglich, dass sie nicht mehr adäquat auf weitere



Einflüsse wie z.B. Treg reagieren können.

Auch geht aus den gewonnenen Daten nicht hervor, ob die Wirkung von Treg auf Monozyten zellkontaktabhängig oder durch lösliche Faktoren vermittelt wird und wie genau der Defekt dieses Regulationsmechanismus bei HIV-seropositiven Patienten zustande kommt. Bei gesunden HIV-seronegativen Probanden scheint der Einfluss von Treg auf die Differenzierung von Monozyten sowohl durch direkten Zellkontakt als auch durch Zytokine vermittelt zu werden (61). Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob der Mechanismus in der HIV-Infektion vergleichbar oder gestört ist.

Auch wären weitere Experimente hinsichtlich der Phagozytosekapazität von Interesse, da diese auf Grund der geringen Zellzahl nicht immer untersucht werden konnte und die Daten von Tiemessen et al. einen steigernden Einfluss von Treg auf die Phagozytosekapazität von Monozyten zeigen (61).

Bei gesunden Männern scheint der Regulationsmechanismus von Treg auf Monozyten bedeutender zu sein als bei Frauen. Es wäre interessant, geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen HIV-seropositiven Männern und Frauen in Hinblick auf die Wirkung von Treg auf Monozyten zu untersuchen.

## 5. Literaturverzeichnis

- 1 Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J and Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983; 4599: 865-7.
- 2 Hogg R, Lima V, Sterne JA, Grabar S, Battegay M, Bonarek M, D'Arminio Monforte A, Esteve A, Gill MJ, Harris R, Justice A, Hayden A, Lampe F, Mocroft A, Mugavero MJ, Staszewski S, Wasmuth JC, van Sighem A, Kitahata M, Guest J, Egger M, May. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. 2008; 9635: 293-9.
- 3 De Cock KM, Jaffe HW and Curran JW. The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *AIDS*. 2012; 10: 1205-13.
- 4 Grulich AE. Cancer: the effects of HIV and antiretroviral therapy, and implications for early antiretroviral therapy initiation. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009; 3: 183-7.
- 5 Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, Ledergerber B, Lundgren J, Neuhaus J, Nixon D, Paton NI and Neaton JD. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med*. 2008; 10: e203.
- 6 Zanni MV and Grinspoon SK. HIV-specific immune dysregulation and atherosclerosis. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2012; 3: 200-5.
- 7 Crowe SM, Westhorpe CL, Mukhamedova N, Jaworowski A, Sviridov D and Bukrinsky M. The macrophage: the intersection between HIV infection and atherosclerosis. *J Leukoc Biol*. 2010; 4: 589-98.
- 8 Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, Mccutchan JA, Letendre SL, Leblanc S, Corkran SH, Duarte NA, Clifford DB, Woods SP, Collier AC, Marra CM, Morgello S, Mindt MR, Taylor MJ, Marcotte TD, Atkinson JH, Wolfson T, Gelman BB, Mearthur JC, Simpson DM, Abramson I, Gamst A, Fennema-Notestine C, Jernigan TL, Wong J and Grant I. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol*. 2011; 1: 3-16.
- 9 Moore JP, Kitchen SG, Pugach P and Zack JA. The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004; 1: 111-26.
- 10 Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG and Douek DC.

- Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006; 12: 1365-71.
- 11 Aziz S, Fackler OT, Meyerhans A, Muller-Lantzsch N, Zeitz M and Schneider T. Replication of M-tropic HIV-1 in activated human intestinal lamina propria lymphocytes is the main reason for increased virus load in the intestinal mucosa. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005; 1: 23-30.
  - 12 Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT and Douek DC. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004; 6: 749-59.
  - 13 Schneider T, Jahn HU, Schmidt W, Riecken EO, Zeitz M and Ullrich R. Loss of CD4 T lymphocytes in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 is more pronounced in the duodenal mucosa than in the peripheral blood. Berlin Diarrhea/Wasting Syndrome Study Group. *Gut.* 1995; 4: 524-9.
  - 14 Epple HJ, Allers K, Troger H, Kuhl A, Erben U, Fromm M, Zeitz M, Loddenkemper C, Schulzke JD and Schneider T. Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. *Gastroenterology.* 2010; 4: 1289-300.
  - 15 Picker LJ and Watkins DI. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol.* 2005; 5: 430-2.
  - 16 Giorgi JV, Hultin LE, Mckeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM and Detels R. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis.* 1999; 4: 859-70.
  - 17 Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, Pedersen C, Ruxrungtham K, Lewin SR, Emery S, Neaton JD, Brenchley JM, Deeks SG, Sereti I and Douek DC. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis.* 2011; 6: 780-90.
  - 18 Lichtfuss GF, Hoy J, Rajasuriar R, Kramski M, Crowe SM and Lewin SR. Biomarkers of immune dysfunction following combination antiretroviral therapy for HIV infection. *Biomark Med.* 2011; 2: 171-86.
  - 19 Klatt NR, Funderburg NT and Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013; 1: 6-13.
  - 20 Shikuma C, Barbour J, Ndhlovu L, Keating S, Norris PJ, Budoff M, Parikh N, Seto T, Gangcuangco LM, Ogata-Arakaki D and Chow D. Plasma MCP-1 and TNF-alpha Levels Predict the Presence of Coronary Artery Calcium in HIV-infected Individuals Independent of Traditional Cardiovascular Risk Factors. *AIDS Res Hum Retroviruses.*

- 2013;
- 21 Keating SM, Jacobs ES and Norris PJ. Soluble mediators of inflammation in HIV and their implications for therapeutics and vaccine development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012; 4-5: 193-206.
  - 22 Hunt PW. Th17, gut, and HIV: therapeutic implications. *Curr Opin HIV AIDS.* 2010; 2: 189-93.
  - 23 Klatt NR, Harris LD, Vinton CL, Sung H, Briant JA, Tabb B, Morcock D, McGinty JW, Lifson JD, Lafont BA, Martin MA, Levine AD, Estes JD and Brenchley JM. Compromised gastrointestinal integrity in pigtail macaques is associated with increased microbial translocation, immune activation, and IL-17 production in the absence of SIV infection. *Mucosal Immunol.* 2010; 4: 387-98.
  - 24 Lee PI, Ciccone EJ, Read SW, Asher A, Pitts R, Douek DC, Brenchley JM and Sereti I. Evidence for translocation of microbial products in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *J Infect Dis.* 2009; 11: 1664-70.
  - 25 Hooper LV, Littman DR and Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science.* 2012; 6086: 1268-73.
  - 26 Macpherson AJ and Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004; 6: 478-85.
  - 27 Macpherson AJ, Geuking MB and McCoy KD. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol.* 2012; 4: 160-7.
  - 28 Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, Barclay GR, Smedley J, Pung R, Oliveira KM, Hirsch VM, Silvestri G, Douek DC, Miller CJ, Haase AT, Lifson J and Brenchley JM. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog.* 2010; 8: e1001052.
  - 29 Mowat AM and Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev.* 1997; 145-66.
  - 30 Douek DC, Roederer M and Koup RA. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med.* 2009; 471-84.
  - 31 Gordon S and Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 12: 953-64.
  - 32 Stout RD and Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004; 3: 509-13.
  - 33 Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003; 1: 23-35.

- 34 Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003; 2: 209-12.
- 35 Benoit M, Desnues B and Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008; 6: 3733-9.
- 36 Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ and Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000; 12: 6166-73.
- 37 Mosmann TR and Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989; 145-73.
- 38 Murray PJ and Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11: 723-37.
- 39 Martinez FO, Gordon S, Locati M and Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006; 10: 7303-11.
- 40 Galli SJ, Borregaard N and Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011; 11: 1035-44.
- 41 Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF and Kubagawa H. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol.* 2001; 5: 2651-6.
- 42 Mowat AM and Bain CC. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J Innate Immun.* 2011; 6: 550-64.
- 43 Zhu T. HIV-1 in peripheral blood monocytes: an underrated viral source. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 3: 309-11.
- 44 Valcour VG, Shiramizu BT and Shikuma CM. HIV DNA in circulating monocytes as a mechanism to dementia and other HIV complications. *J Leukoc Biol.* 2010; 4: 621-6.
- 45 Chihara T, Hashimoto M, Osman A, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Suzu I, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Okada S and Suzu S. HIV-1 proteins preferentially activate anti-inflammatory M2-type macrophages. *J Immunol.* 2012; 8: 3620-7.
- 46 Brown JN, Kohler JJ, Coberley CR, Sleasman JW and Goodenow MM. HIV-1 activates macrophages independent of Toll-like receptors. *PLoS One.* 2008; 12: e3664.
- 47 Porcheray F, Samah B, Leone C, Dereuddre-Bosquet N and Gras G. Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production. *Virology.* 2006; 1: 112-20.

- 48 Kedzierska K and Crowe SM. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem.* 2002; 21: 1893-903.
- 49 Kedzierska K, Ellery P, Mak J, Lewin SR, Crowe SM and Jaworowski A. HIV-1 down-modulates gamma signaling chain of Fc gamma R in human macrophages: a possible mechanism for inhibition of phagocytosis. *J Immunol.* 2002; 6: 2895-903.
- 50 Ellery PJ, Tippett E, Chiu YL, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, Lewin SR, Gorry PR, Jaworowski A, Greene WC, Sonza S and Crowe SM. The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol.* 2007; 10: 6581-9.
- 51 Burdo TH, Lo J, Abbara S, Wei J, Delelys ME, Preffer F, Rosenberg ES, Williams KC and Grinspoon S. Soluble CD163, a novel marker of activated macrophages, is elevated and associated with noncalcified coronary plaque in HIV-infected patients. *J Infect Dis.* 2011; 8: 1227-36.
- 52 Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R and Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest.* 2007; 1: 195-205.
- 53 Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4: 330-6.
- 54 Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F and Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 1999; 9: 5317-26.
- 55 Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM and Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol.* 1998; 3: 1212-8.
- 56 Fazekas De St Groth B and Landay AL. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response? *AIDS.* 2008; 6: 671-83.
- 57 Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ and Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001; 3: 1245-53.
- 58 Chevalier MF and Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood.* 2013; 1: 29-37.
- 59 Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM and Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 7: 490-500.
- 60 Rouse BT, Sarangi PP and Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev.* 2006; 272-86.

- 61 Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, Van Herwijnen MJ, John S and Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 49: 19446-51.
- 62 Taams LS, Van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, De Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW and Lafeber FP. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol*. 2005; 3: 222-30.
- 63 Epple HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, Troger H, Maul J, Moos V, Berg E, Ullrich R, Schulzke JD, Stein H, Duchmann R, Zeitz M and Schneider T. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood*. 2006; 9: 3072-8.
- 64 Apoil PA, Puissant B, Roubinet F, Abbal M, Massip P and Blancher A. FOXP3 mRNA levels are decreased in peripheral blood CD4+ lymphocytes from HIV-positive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 4: 381-5.
- 65 Allers K, Loddenkemper C, Hofmann J, Unbehaun A, Kunkel D, Moos V, Kaup FJ, Stahl-Hennig C, Sauermann U, Epple HJ and Schneider T. Gut mucosal FOXP3+ regulatory CD4+ T cells and Nonregulatory CD4+ T cells are differentially affected by simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques. *J Virol*. 2010; 7: 3259-69.
- 66 Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, Planta M, Mcglaughlin M, Jackson R, Ziegler SF and Fauci AS. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med*. 2004; 3: 331-43.
- 67 Kwon DS, Angin M, Hongo T, Law KM, Johnson J, Porichis F, Hart MG, Pavlik DF, Tighe DP, Kavanagh DG, Streeck H, Addo MM and Kaufmann DE. CD4+ CD25+ regulatory T cells impair HIV-1-specific CD4 T cell responses by upregulating interleukin-10 production in monocytes. *J Virol*. 2012; 12: 6586-94.
- 68 Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008; 9: 737-44.
- 69 Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000; 6: 627-38.
- 70 Roberts CW, Walker W and Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 3: 476-88.
- 71 Lockshin MD. Sex differences in autoimmune disease. *Lupus*. 2006; 11: 753-6.
- 72 Kaushic C, Roth KL, Anipindi V and Xiu F. Increased prevalence of sexually transmitted viral infections in women: the role of female sex hormones in regulating susceptibility and immune responses. *J Reprod Immunol*. 2011; 2: 204-9.

- 73 Bouman A, Heineman MJ and Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*. 2005; 4: 411-23.
- 74 Mo R, Chen J, Grolleau-Julius A, Murphy HS, Richardson BC and Yung RL. Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes. *J Immunol*. 2005; 10: 6023-9.
- 75 Arruvito L, Sanz M, Banham AH and Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol*. 2007; 4: 2572-8.
- 76 Kramer PR, Winger V and Kramer SF. 17beta-Estradiol utilizes the estrogen receptor to regulate CD16 expression in monocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 1-2: 16-25.
- 77 Kramer PR, Kramer SF and Guan G. 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum*. 2004; 6: 1967-75.
- 78 Hladik F and Mcelrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol*. 2008; 6: 447-57.
- 79 Quinn TC and Overbaugh J. HIV/AIDS in women: an expanding epidemic. *Science*. 2005; 5728: 1582-3.
- 80 Soon GG, Min M, Struble KA, Chan-Tack KM, Hammerstrom T, Qi K, Zhou S, Bhore R, Murray JS and Birnkrant DB. Meta-analysis of gender differences in efficacy outcomes for HIV-positive subjects in randomized controlled clinical trials of antiretroviral therapy (2000-2008). *AIDS Patient Care STDS*. 2012; 8: 444-53.
- 81 Umeh OC and Currier JS. Sex differences in pharmacokinetics and toxicity of antiretroviral therapy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006; 2: 273-83.
- 82 Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, Clementi M and Chieco-Bianchi L. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med*. 1995; 12: 1279-83.
- 83 Prins M, Meyer L and Hessel NA. Sex and the course of HIV infection in the pre- and highly active antiretroviral therapy eras. *AIDS*. 2005; 4: 357-70.
- 84 Farzadegan H, Hoover DR, Astemborski J, Lyles CM, Margolick JB, Markham RB, Quinn TC and Vlahov D. Sex differences in HIV-1 viral load and progression to AIDS. *Lancet*. 1998; 9139: 1510-4.
- 85 Collazos J, Asensi V and Carton JA. Sex differences in the clinical, immunological and virological parameters of HIV-infected patients treated with HAART. *AIDS*. 2007; 7: 835-43.
- 86 McClelland EE and Smith JM. Gender specific differences in the immune response to



- infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011; 3: 203-13.
- 87 Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007; 3: 584-92.
- 88 Bullwinkel J, Ludemann A, Debarry J and Singh PB. Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells. *Epigenetics*. 2011; 1: 45-51.
- 89 Fabriek BO, Dijkstra CD and Van Den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*. 2005; 2-4: 153-60.
- 90 Cassol E, Cassetta L, Alfano M and Poli G. Macrophage polarization and HIV-1 infection. *J Leukoc Biol*. 2010; 4: 599-608.
- 91 Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A and Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004; 12: 677-86.
- 92 Gorfu G, Rivera-Nieves J and Ley K. Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med*. 2009; 7: 836-50.
- 93 Chatterjee A, Rathore A, Vidyant S, Kakkar K and Dhole TN. Chemokines and chemokine receptors in susceptibility to HIV-1 infection and progression to AIDS. *Dis Markers*. 2012; 3: 143-51.
- 94 Anzinger JJ, Butterfield TR, Angelovich TA, Crowe SM and Palmer CS. Monocytes as Regulators of Inflammation and HIV-Related Comorbidities during cART. *J Immunol Res*. 2014; 569819.
- 95 Funderburg NT, Zidar DA, Shive C, Lioi A, Mudd J, Musselwhite LW, Simon DI, Costa MA, Rodriguez B, Sieg SF and Lederman MM. Shared monocyte subset phenotypes in HIV-1 infection and in uninfected subjects with acute coronary syndrome. *Blood*. 2012; 23: 4599-608.
- 96 Longenecker CT, Funderburg NT, Jiang Y, Debanne S, Storer N, Labbato DE, Lederman MM and Mccomsey GA. Markers of inflammation and CD8 T-cell activation, but not monocyte activation, are associated with subclinical carotid artery disease in HIV-infected individuals. *HIV Med*. 2013; 6: 385-90.
- 97 Alfano M and Poli G. The cytokine network in HIV infection. *Curr Mol Med*. 2002; 8: 677-89.
- 98 Kedzierska K, Crowe SM, Turville S and Cunningham AL. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol*. 2003; 1: 39-56.
- 99 Appay V and Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes

- and consequences. *J Pathol.* 2008; 2: 231-41.
- 100 Allers K, Fehr M, Conrad K, Epple HJ, Schurmann D, Geelhaar-Karsch A, Schinnerling K, Moos V and Schneider T. Macrophages accumulate in the gut mucosa of untreated HIV-infected patients. *J Infect Dis.* 2014; 5: 739-48.
- 101 Liu L, Callahan MK, Huang D and Ransohoff RM. Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. *Curr Top Dev Biol.* 2005; 149-81.
- 102 Aulock SV, Deininger S, Draing C, Gueinzius K, Dehus O and Hermann C. Gender difference in cytokine secretion on immune stimulation with LPS and LTA. *J Interferon Cytokine Res.* 2006; 12: 887-92.

## 6. Danksagung

Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die ausgezeichneten Möglichkeiten es zu bearbeiten, die intensive Unterstützung und die hervorragende Betreuung der Doktorarbeit.

Mein größter Dank geht an Dr. Kristina Allers, für ihre uneingeschränkte und ausgezeichnete Unterstützung, die praktische und theoretische Anleitung, ihre Hilfe beim Verfassen der Arbeit und die intensive Förderung zum wissenschaftlichen Denken und Arbeiten.

Ein großer Dank geht an die gesamte AG Schneider: Kristina Conrad, Katina Schinnerling, Anika Geelhaar-Karsch, Diana Bösel, Martina Seipel, Nadine Gehrmann, Verena Moos und Julian Friebel. Vielen Dank für den täglichen Ansporn, die konstruktiven Debatten und die persönlichen und motivierenden Gespräche! Insbesondere möchte ich mich bei Diana Bösel und Martina Seipel für die exzellente Anleitung und Unterstützung im Labor bedanken.

Weiterhin möchte ich Ulrike Erben für die konstruktive Kritik und die hilfreichen Denkanstöße danken. Ein großer Dank geht auch an Dr. Anja Kühl für die Unterstützung mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Ich möchte mich bei allen Patienten sowie den Bekannten und Mitarbeitern bedanken, die sich als Kontrollpersonen zur Verfügung gestellt haben.

Des Weiteren möchte ich dem Graduiertenkolleg Immuco des SFB 633 der Charité – Universitätsmedizin Berlin sowie der Friedrich-Naumann-Stiftung für die Freiheit für die ideelle und finanzielle Unterstützung danken.

Ein großer Dank gilt meiner Mutter für die Liebe und Fürsorge, das Verständnis und die Unterstützung bei all meinen Vorhaben.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Johannes Klick für seine unermüdliche Unterstützung und Motivation bei meinem Staatsexamen und dem Anfertigen dieser Arbeit danken.

## **7. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 8. Publikationsliste

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

„Macrophages accumulate in the gut mucosa of untreated HIV-infected patients.“, Allers K, Fehr M, Conrad K, Epple HJ, Schürmann D, Geelhaar-Karsch A, Schinnerling K, Moos V, Schneider T. J Infect Dis. 2014 Mar 1;209(5):739-48.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Form eines Vortrags sowie eines Posters veröffentlicht:

„Functionally altered macrophages accumulate in the gut mucosa of untreated HIV-infected patients.“ Kristina Allers, Mira Fehr, Kristina Conrad, Hans-Jörg Epple, Dirk Schürmann, Anika Geelhaar-Karsch, Katina Schinnerling, Verena Moos, Thomas Schneider, Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Innsbruck 12.-15.06.2013.

Erste Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit folgendem Poster veröffentlicht:

„Effects of regulatory and effector T cells on monocytes in HIV-1 infected patients“, Mira Fehr, Kristina Allers, Katina Schinnerling, Anika Geelhaar-Karsch, Verena Moos, Thomas Schneider, Satellite Symposium of the 24<sup>th</sup> International Congress of the transplantation Society, SFBs 738, 621, 633, 650 "Cellular mechanism and therapeutic concepts in transplantation and chronic inflammation", Berlin 13.-14.07.2012

## 9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mira Fehr, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wirkung von regulatorischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auf Monozyten in der HIV-Infektion“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 10. Anteilserklärung

Mira Fehr hatte folgenden Anteil an den erfolgten Publikationen:

Publikation 1: Allers K, Fehr M, Conrad K, Epple HJ, Schürmann D, Geelhaar-Karsch A, Schinnerling K, Moos V, Schneider T, „Macrophages accumulate in the gut mucosa of untreated HIV-infected patients.“ J Infect Dis. 2014 Mar 1;209(5):739-48.

Publikation 2: „Functionally altered macrophages accumulate in the gut mucosa of untreated HIV-infected patients.“ Kristina Allers, Mira Fehr, Kristina Conrad, Hans-Jörg Epple, Dirk Schürmann, Anika Geelhaar-Karsch, Katina Schinnerling, Verena Moos, Thomas Schneider. Vortrag und Poster, Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Innsbruck 12.-15.06.2013.

Beitrag im Einzelnen zu Publikation 1 und 2: Mira Fehr hat die fertig aufbereiteten und immunhistochemisch markierten Duodenalbiopsien analysiert und ausgewertet. Sie hat die Isolierung und Phagozytoseuntersuchung von mukosalen mononukleären Zellen sowie einen Teil der Phagozytoseuntersuchungen im Blut durchgeführt und war an der Interpretation der Ergebnisse beteiligt.

Publikation 3: Mira Fehr, Kristina Allers, Katina Schinnerling, Anika Geelhaar-Karsch, Verena Moos, Thomas Schneider, "Effects of regulatory and effector T cells on monocytes in HIV-1 infected patients", Poster, Satellite Symposium of the 24<sup>th</sup> International Congress of the transplantation Society, SFBs 738, 621, 633, 650 "Cellular mechanism and therapeutic concepts in transplantation and chronic inflammation", Berlin 13.-14.07.2012

Beitrag im Einzelnen zu Publikation 3: Mira Fehr hat die Monozyten und T-Zellen aus dem Blut der Patienten bzw. der gesunden Kontrollen isoliert, kokultiviert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Sie hat die erhobenen Daten analysiert und das Poster verfasst.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin