

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg  
Vorstand:

Professor Dr. med. Lars Dölken

**Der Einfluss von niedrig-dosiertem Prednisolon auf die  
T-Zell-Aktivierung bei Patienten mit HIV-Infektion**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vorgelegt von

Nadja Mirjam Aeverbeck  
aus Pfaffenhofen a.d.Ilm

Würzburg, Juni 2019

# Referentenblatt

---

Referent: Prof. Dr. Carsten Scheller

Korreferent bzw. Korreferentin:

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin

*Widmung:*  
*Meinen beiden Letten*  
*Dem kleinen Madis und seinem Papa*

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
1.1	ÜBERBLICK ÜBER DIE HIV-INFEKTION	1
1.2	THERAPIESITUATION IN DEUTSCHLAND	2
1.3	IMMUNOLOGICAL NONRESPONDERS UND DIE NOTWENDIGKEIT DER THERAPIEOPTIMIERUNG DURCH IMMUNMODULATORARTEN	5
1.4	IMMUNPATHOGENESE DER HIV INFEKTION: IMMUNAKTIVIERUNG ALS PROGRESSIONSMARKER (CD38/HLADR, SUPAR, sCD14)	6
1.5	DIE PROCORT STUDIE	8
	ALLOCATION	10
	ENROLLMENT	10
	FOLLOW-UP (24 MONTHS)	10
	T CELL FLOW CYTOMETRY (MONTH 12)	10
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>12</b>
2.1	MATERIAL	12
2.1.1	LISTE DER GERÄTE	12
2.1.2	LISTE DER VERBRAUCHSMATERIALIEN	12
2.1.3	PUFFER UND LÖSUNGEN	13
2.1.4	ANTIKÖRPER	13
2.1.5	COMPUTERPROGRAMME	13
2.2	METHODEN	14
2.2.1	VORBEREITUNG DER PBMC	14
2.2.2	CD8/CD3/CD38/HLADR ANTIKÖRPERFÄRBUNG DER PBMC	14
2.2.3	CD8/CD3 ANTIKÖRPERFÄRBUNG DER PBMC	15
2.2.4	DURCHFÜHRUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	15
2.2.5	STATISTIK	16
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>35</b>
4.1	EFFEKTE VON PREDNISOLON AUF DAS IMMUNSYSTEM BEI PATIENTEN MIT HIV- INFEKTION	35

<b>4.2</b>	<b>LIMITATIONS</b>	<b>38</b>
4.2.1	FEHLEN DER BASELINE- PROBEN, DROP- OUT RATE UND LABORLASTIGER ENDPUNKT	38
4.2.2	LOGISTIK	39
4.2.3	POST- HOC ANALYSEN	40
<b>4.3</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>44</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick über die HIV-Infektion

„Der Anfang ist die Hälfte des Ganzen“ sagte einmal der bekannte Philosoph Aristoteles.

Als Anfang der HIV-Infektion könnte man die Entdeckung des HI-Virus in den achtziger Jahren als Auslöser der Epidemie AIDS bezeichnen. Als die Menschheit sich dieser Erkrankung bewusst wurde, kursierten in den Medien verschiedene Verschwörungstheorien: Den Weltmächten wurde die künstliche Entstehung des Virus im Labor vorgeworfen. Diese schreckliche Krankheit musste durch etwas Künstliches herbeigeführt worden sein. Heute, fast vierzig Jahre nach der Entdeckung des Virus, zweifelt man nicht mehr an seinem natürlichen Vorkommen. Man ist aber bei dem „Ganzen“, wie Aristoteles es nannte, noch immer nicht angekommen. Wäre die AIDS Epidemie besiegt, wenn man erfolgreich gegen eine Infektion mit HIV impfen könnte? Oder wäre das letztendlich Ganze erst erreicht, wenn man ein wirksames Medikament hätte, welches Infizierte durch Eliminierung des Virus heilen könnte? Eine ähnliche Erfolgsgeschichte zeigte sich kürzlich bei der Therapie der Hepatitis C Infektion. Hepatitis C ist jetzt bei einem hohen Prozentsatz der Patienten heilbar. Bei der Therapie von AIDS steht ein solcher Umbruch der Therapie jedoch noch in den Sternen. Es wäre dementsprechend schon ein großer Schritt die parenteralen und sexuellen Infektionen weltweit zu verhindern und somit die Epidemie AIDS zu beenden.

Die UNAIDS möchte dieses Ziel bis 2030 durch weltweite Präventionsmaßnahmen erreicht haben[1]. Wenn dieses Ziel erreicht werden wird, so bedeutet das jedoch nicht, dass die Menschheit sich mit dem Virus nicht mehr beschäftigen muss, sondern es bedeutet im Gegenteil, dass es viele Menschen in hohem Alter geben wird, die mit einer chronischen HIV- Infektion leben. Wie die genauen Zahlen aussehen werden, kann man sich ungefähr vorstellen, wenn man sich die Daten des Jahres 2016 vor Augen führt: In Deutschland lebten (im Jahr 2016) 88.400 HIV-Infizierte, 3.100 infizierten sich im

Laufe des Jahres neu und 460 starben an durch HIV aufgetretenen Krankheiten[2]. Die Zahlen variieren weltweit enorm. 3.100 Neuinfizierte im Jahr 2016 in Deutschland bei guter Aufklärung und Ausreichend Ressourcen mag enorm erscheinen. In Tansania allerdings, welches im Vergleich zu Deutschland nur circa 55 Millionen Einwohner hat, starben 33.000 an HIV-Folgen, es gab 55.000 Neuinfektionen und 1,4 Millionen Menschen lebten dort mit HIV [3].

Ein weiteres Ziel der UNAIDS, die 90-90-90 Regel, welche besagt, dass mindestens 90% der HIV- Infektionen diagnostiziert sein sollen, 90% davon antiretroviral therapiert und von diesen therapierten wiederum mindestens 90% kein HI-Virus mehr im Blut nachweisen, wird im ersten Punkt in Deutschland nicht erfüllt – diagnostiziert sind im Jahre 2017 nur circa 87% [4]. Bereits Deutschland hat also Probleme mit der Durchsetzung der von der UNAIDS formulierten Ziele. Auch wenn es im Jahre 2030 tatsächlich null Neuinfektionen geben sollte, so leben die 55.000 Tansanier und die 3.100 Deutschen, die sich im Jahre 2016 infiziert haben dann mit einer chronischen Infektion. Unabhängig von der Frage, ob sich die Zahl der Neuinfektionen mit Hilfe eines umfangreichen Screenings- und Therapieprogramms wirklich deutlich senken lassen, ist das klinische Management der HIV-Infektion inzwischen weltweit von einer Akutversorgung in die Therapie einer chronischen, lebenslangen Erkrankung übergegangen. Hier stehen jetzt insbesondere lebensqualitätsverbessernde Aspekte wie Langzeitverträglichkeit und Reduktion von Comorbiditäten im Vordergrund. Es ist also wichtige Aufgabe der Forschung herauszufinden, wie die Lebensqualität der Patienten mit chronischer HIV- Infektion verbessert werden kann.

## 1.2 Therapiesituation in Deutschland

Derzeit wird in Deutschland eine HIV-Infektion mit antiretroviraler Therapie behandelt. In der Regel sollte bei jeder nachgewiesenen Infektion behandelt werden; in jedem Fall aber, wenn eine symptomatische HIV Infektion vorliegt, die

Helferzellen unter 500 Zellen pro Mikroliter liegen oder eine Koinfektion oder Komorbidität besteht.

Die derzeitige ultimative Therapie bei HIV-Infektion lautet HAART, was hoch aktive antiretrovirale Therapie bedeutet, bei der in der Regel drei verschiedene Medikamenten gleichzeitig eingesetzt werden, um einer Resistenzentwicklung vorzubeugen. Die verschiedenen Substanzklassen, die zum Einsatz kommen sind unter anderem Nukleosidische Reverse-Transkriptaseinhibitoren und Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, welche beide das Enzym der Reversen Transkriptase ansetzen und somit die Virusreplikation hemmen. Des Weiteren gibt es Proteaseinhibitoren, Entry-Inhibitoren und Integrase-Inhibitoren. Bei den verschiedenen Medikamentenkombinationen treten unterschiedliche Nebenwirkungen auf, die unter Umständen zu einer Therapieanpassung führen können. Es gibt aber viele Alternativen und in einem guten Arzt-Patienten-Verhältnis kann das individuell passende Präparat gut herausgearbeitet werden. Genauso wichtig wie eine wirksame Therapie ist eine sehr gute Compliance der Patienten. Zum einen wirken die Medikamente nicht bei unkorrekter Einnahme und zum anderen wird die Entstehung resistenter Viren gefördert. Das HI-Virus ist ein sehr mutationsfreudiges Virus und wenn eine Mutationsvariante mit multiresistenten Genen durch die Medikamente aufgrund von inkorrekt er Einnahme nicht unterdrückt wird, so vermehrt und verbreitet es sich und die Behandlung kann sich dann als sehr schwierig gestalten. Derzeit nehmen resistente Formen des HI-Virus rasant zu und die WHO ruft die Länder dazu auf den Verlauf einer Therapie besser zu überwachen und bei Misserfolg schneller einzugreifen, um unter anderem die Weitergabe von resistenten Viren zu verhindern [5].

Es gibt viele Gründe, die dazu führen können, dass Medikamente nicht regelmäßig eingenommen werden. Wenn man durch andere Ereignisse im Alltag abgelenkt ist, zum Beispiel durch einen Umzug, durch einen Jobwechsel oder einfach nur durch einen spannenden Tag mit Freunden, passiert es leicht nicht an die Einnahme der Pillen zu denken. Gründe dieser Art sind harmlos und der Eigenverantwortung zuzuschreiben. Ärzte sollten an das

Verantwortungsbewusstsein der Patienten appellieren und sie auf die Risiken hinweisen.

Es gibt aber auch unangenehmere Gründe für die Non Compliance: Stigmatisierung [6]. Dass Menschen mit HIV in Deutschland stigmatisiert und diskriminiert werden, wird durch das Projekt „Positive Stimmen“, bei dem 1148 HIV Infizierte in Deutschland befragt wurden, deutlich: Medizinische Behandlungen werden verweigert, Arbeitnehmer verlieren den Job, Familien und Freunde distanzieren sich und das Selbstwertgefühl ist angegriffen [7].

Akzeptanz und Toleranz in der Bevölkerung ist wichtig, um Menschen, die mit HIV leben müssen gut aufzunehmen und sie nicht unrechtfertigt von sozialen Aktivitäten auszuschließen. Eine gute Schulung des Gesundheitspersonals ist auch sehr wichtig, um nicht aufgrund von unnötiger Angst die Infizierten übervorsichtig und damit stigmatisierend zu behandeln.

Eine relativ neue Therapieentwicklung ist die Präexpositionsprophylaxe. Man schützt sich durch die Einnahme von Pillen vor einer geplanten Exposition mit HIV. Dieses Präparat mit dem Handelsnamen Truvada ist in Deutschland seit Oktober 2016 erhältlich. Es ist verschreibungspflichtig und muss privat bezahlt werden. Der Wirkstoff in dem Präparat ist eine Kombination aus Tenofovir und Emtricitabin. In anderen Ländern, zum Beispiel in Norwegen und Frankreich ist Truvada auf Kassenrezept erhältlich. Je länger das Medikament dort auf dem Markt ist, desto häufiger wird es verschrieben.

PrEP mag sinnvoll sein für die Verbesserung der Lebensqualität von Betroffenen, allerdings sollte es der Durchsetzung des Zieles der UNAIDS bis 2030 weltweit HIV frei zu sein nicht im Wege stehen. Ein Medikament, welches unter Umständen zu ungeschütztem Geschlechtsverkehr mit einer HIV- infizierten Person motiviert sollte kontrovers diskutiert werden. Zusätzlich ist erwähnenswert, dass Truvada gegen eine HIV- Infektion schützen mag, aber natürlich nicht gegen andere Geschlechtskrankheiten. Hauptkritikpunkt des Medikaments bleibt aber, dass nach unbemerkter Infektion durch die Monotherapie der PrEP die Resistenzentwicklung und somit die Verbreitung resistenter Stämme zu großen Therapieschwierigkeiten führen kann.

Neben Fortschritten und erfreulichen Therapieerfolgen sind also immer auch neue Entwicklungen im Medikamentenmarkt zu beobachten und in die epidemiologischen Schätzungen miteinzubeziehen.

### 1.3 Immunological Nonresponders und die Notwendigkeit der Therapieoptimierung durch Immunmodulatoren

Immunologischer Therapieerfolg bedeutet, dass sich unter korrekter Medikamenteneinnahme die T-Helferzahl wieder annähernd normalisiert. Eine hohe T-Helferzahl kann das Auftreten von sowohl AIDS-spezifischen als auch AIDS-unspezifischen Krankheitsbildern bei HIV Infektion verhindern. Bei Therapieansprechen besteht dementsprechend eine fast normale Lebenserwartung.

Bei Therapieversagen muss zunächst nach den Ursachen geforscht werden. Stimmt die Compliance und ist die Medikamentenauswahl in Abstimmung auf mögliche Resistenzen erfolgt? Sind Medikamenteninteraktionen mit anderen Präparaten ausgeschlossen? Stimmt die Dosierung und ist die vollständige Absorption des Medikamentes durch die richtige Einnahme entweder zur Mahlzeit oder auf leeren Magen gegeben? Die Fehlerquellen sind vielzählig und nur in den wenigsten Fällen ist das Nichtansprechen der Therapie ein echtes immunologisches Versagen.

Wenn jedoch nach Ausschluss aller Störfaktoren trotz richtig angewandter antiretroviraler Therapie die CD4-Zellzahl nicht in einen akzeptablen Bereich ansteigt, haben die Patienten unabhängig von einer erfolgreichen Viruslastunterdrückung ein erhöhtes Sterberisiko [8]. Es gilt nun herauszufinden wie dies verringert werden kann, um auch denjenigen helfen zu können, bei denen die antiretrovirale Therapie nicht anspricht.

Die WHO warnt aufgrund der Zunahme therapieresistenter HI-Viren vor einer erschwert in den Griff zu bekommenden Problematik. Der Thymus ist ein wichtiges Organ für eine wirksame Immunantwort und einen adäquaten T-Zellanzstieg unter Therapie bei HIV- Infektion [9]. Im Alter nimmt die Funktion

des Thymus maßgebend ab [10]. Neben dem Alter ist auch ein später Therapiebeginn ein Risiko für das Nicht-Ansprechen der Therapie. Sind die T-Lymphozyten bereits vor Therapiebeginn stark abgefallen erholen sich diese nur schlecht [11]. Therapieversager im Allgemeinen weisen eine höhere T-Zellaktivierung, gemessen durch CD38/HLADR-Positivität der T-Zellen auf [12]. Die zum aktivierten Immunsystem dazugehörenden natürlichen Killerzellen sind ebenfalls gerade bei Therapieversagern erhöht [13]. Die Unterdrückung der erhöhten Immunaktivierung ist also dementsprechend ein Ansatzpunkt für eine zusätzliche, begleitende Behandlung. Hier kann bei allen Patienten angesetzt werden, unabhängig von den anderen durch Schulung beeinflussbaren Faktoren, wie Compliance, rechtzeitige Diagnosestellung und Resistenztestung vor Therapiebeginn.

Ein möglicher und viel diskutierter Therapieansatz und die somit potentielle Chance auf Heilung oder Impfung gegen HIV könnte der Einsatz von monoklonalen Antikörpern sein [14]. Eine wirksame Impfung gegen die Infektion mit dem HI-Virus würde natürlich die Therapie von Menschen mit einer Infektion irgendwann in ferner Zukunft unnötig machen. Aber bis dorthin ist es ein noch langer Weg und selbst eine erfolgreiche Impfung schafft es nicht die bereits Infizierten wieder virusfrei zu machen.

Die Unterdrückung der Immunaktivierung ist ein vielversprechender Ansatz, der als Modulation zur Therapieoptimierung eingesetzt werden könnte. Die ProCort Studie (s.u.) liefert gute Ergebnisse hierfür.

#### 1.4 Immunpathogenese der HIV Infektion: Immunaktivierung als Progressionsmarker (CD38/HLADR, SUPAR, sCD14)

Bei der Immunpathogenese der HIV- Infektion spielen verschiedene Komponenten eine wichtige Rolle. Die Offensichtlichste ist die Viruslast. Heutzutage haben Patienten, die unter ART-Therapie gut eingestellt sind eine Viruslast die nahezu null ist. Eine weitere Komponente stellt die CD4-Helfer Zellzahl dar, die bis vor Kurzem als Indikator für den Therapiebeginn genutzt

wurde, und aus der sich direkt das Maß der Schädigung des Immunsystems ablesen lässt. Wenn die Viruslast gegen null geht und die CD4-Helfer Zellzahl stabil ist, entspricht die Lebenserwartung der HIV-Infizierten der der Normalbevölkerung [15]. Wie im vorigen Kapitel herausgearbeitet gibt es dennoch die Problematik der Nonresponse. Immer mehr im Fokus der Wissenschaft steht hierfür als zusätzlicher Faktor die Immunaktivierung, die bei Chronifizierung dem Körper Schaden zufügt, was zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen offensichtlich wird. Aktueller Stand der Wissenschaft ist, dass bei HIV-infizierten Patienten, trotz gut eingestellter Therapie eine erhöhte Inflammation im Körper bleibt [16]. Während eine adäquate Immunreaktion wichtig ist, um das pathogene Agens loszuwerden, brennt eine anhaltende Immunreaktion die regenerativen Fähigkeiten des Immunsystems aus, was der Grund dafür sein kann, warum bei HIV Patienten (trotz guter Einstellung mit ART) überzufällig häufig altersspezifische Komorbiditäten auftreten [17].

Unterschiede in der T-Zell Aktivierung im Verlauf der HIV Infektion, gemessen durch die Marker HLADR und CD38, sind bereits 1992 aufgefallen [18]. Es stellte sich heraus, dass eine erhöhte T-Zell Aktivierung ein negativer Prognosefaktor ist und dass vor allem die erhöhte CD8 T-Zellaktivierung mit einem schnellerem Absinken der CD4 Zellzahl korreliert [19]. Auch durch mehrjährige antiretrovirale Therapie kann die T-Zell Aktivierung nicht auf Normwerte, entsprechend denen von nicht-HIV-infizierten Individuen gesenkt werden [20].

Überdies ist bekannt, dass nur einer kleiner Anteil an T-Zellen durch den HI Virus befallen ist [21]. Durch die antiretrovirale Therapie wird dieser HI Virus Anteil noch zusätzlich verringert, aber die zuvor erwähnte T-Zell Aktivierung wird nicht verändert. In einer Studie von Hunt et al. konnte 2003 nachgewiesen werden, dass ein 5 prozentiger Anstieg in der CD8 T-Zellaktivierung zu einem um 35 T-Zellen pro Kubikmillimeter geringeren Regeneration führt [22]. In der gleichen Studie wurde die T-Zell Aktivierung, ausgedrückt durch die Aktivierungsmarker CD38 und HLADR, zwischen Nicht-Therapierten, ART- Therapierten und Nicht - infizierten verglichen und es wurde festgestellt, dass auch, wenn unter ART die T-Zell Aktivierung geringer als ohne Therapie ausfällt, sie bei den gesunden

Kontrollen dennoch signifikant niedriger ist [22]. Es ist also sinnvoll an einem Therapieansatz zur Reduzierung der T-Zell Aktivierung zu forschen.

Außerdem werden in dieser Arbeit die Immunaktivierungsmarker sCD14 und supar betrachtet. SUPAR, soluble urokinase plasminogen activator receptor, ist ein unabhängiger Prognosefaktor für Herzinfarktereignisse bei HIV-Infizierten [23] und im allgemeinen ein Prognosefaktor für das Sterberisiko bei HIV-Infizierten und für die Entwicklung von NICHT-AIDS Komorbiditäten [24]. Auch unter Antiretroviraler Therapie und einer dadurch herbeigeführten Unterdrückung der Viruslast, ist supar ein Prognosefaktor für Nicht-AIDS Events [25]. Supar eignet sich also auch für diese Arbeit hervorragend um die Immunaktivierung zu messen und somit Aussagen über die Prognose zu machen.

Soluble CD14, das wahrscheinlich durch bakterielle Translokation aus der Darmmukosa vermehrt gebildet wird, ist ein Marker für Krankheitsprogression [26], der bereits während der Primärinfektion mit HIV ein erhöhtes Sterberisiko im weiteren Krankheitsverlauf anzeigt [27].

In einer Studie von Rajesh T. Ghandi konnte außerdem gezeigt werden, dass die Anzahl von Restviren und die Immunaktivierung unter ART- Therapie voneinander unabhängige Faktoren sind: Während ART erfolgreich die HI-Viren unterdrückt, wirkt sie nicht gegen die erhöhte Immunaktivierung [28]. Es muss also nach einem Mittel gesucht werden, wie diese Immunaktivierung gedämpft werden kann, ganz unabhängig von der Auswirkung auf die Viruslast. In dieser Laborarbeit sollten deshalb die Auswirkungen des Immunsuppressivums Prednisolon auf die chronische Immunaktivierung bei Patienten mit HIV-Infektion untersucht werden.

## 1.5 Die ProCort Studie

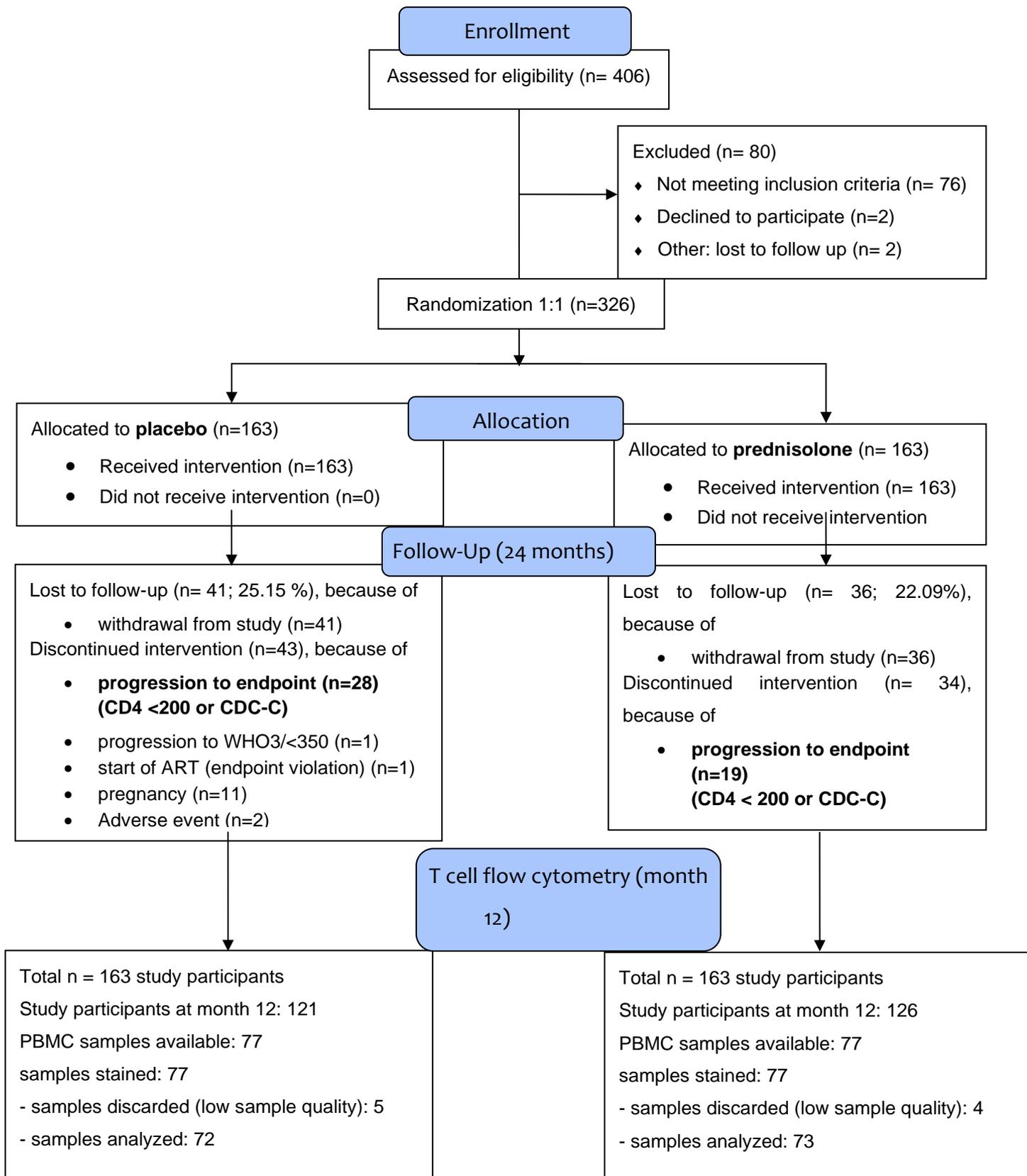
Die 2007 konzipierte ProCort Studie ist eine in Tansania über einen Zeitraum von zwei Jahren angelegte doppelblinde randomisierte klinische Studie [29]. Procort steht hierbei für „Progression of HIV-disease under low dose Prednisolon Therapy“. In der Studie sollte der Einfluss des Immunmodulators Prednisolon auf

die HIV-Progression untersucht werden. Die 326 HIV-positiven Teilnehmer wurden in zwei Studienarme randomisiert und entweder mit täglich 5mg Prednisolon oder Placebo behandelt. Das Besondere an der Studie ist, dass die Patienten niemals mit ART therapiert worden sind und somit die Ergebnisse der Prednisolontherapie isoliert von Störfaktoren der Antiretroviralen Therapie betrachtet werden können. Einschlusskriterium der Patienten in die Studie war eine CD4+ T-Lymphozytenzellzahl von über 300 pro Mikroliter. Weitere Kriterien, die ausschlaggebend für den Einschluss in die Studie waren sind: HIV positiv (bewiesen nach WHO Standards), keine vorliegende Schwangerschaft, kein Vorliegen AIDS-definierender Erkrankungen und ein Mindestalter von 18 Jahren [29]. Primärer Studienendpunkt war die Progression zu AIDS, definiert als ein Absinken der T-Helferzellzahl unter 200 c/µl, oder das Auftreten von AIDS-definierender Erkrankungen.

In der ProCort Studie wurde durch die Prednisolontherapie eine statistisch signifikante Verringerung der Immunaktivierung (gemessen durch sCD14, SUPAR, CD38/ HLADR/ CD8+) und eine statistisch signifikante Stabilisierung der CD4+ T-Zellen gezeigt [29]. In einer Post-hoc Analyse wurde die Ergebnisse in männlich und weibliche Studienteilnehmer differenziert und es stellte sich eine statistisch langsamere Progression zum Endpunkt der unter Prednisolon-Therapie stehenden Frauen da, während bei den Männern kein Unterschied in der Krankheitsprogression aufgezeigt werden konnte[29].

In 14 Visiten über den Zeitraum von zwei Jahren wurden Blutproben entnommen und Daten über Krankheitsprogression, Größe, Gewicht, Laborparameter, CD4- und CD8-Zellzahlen erhoben. Zu den Studienzeitpunkten 0 Monate (=Baseline), 3 Monate, 6 Monate, und 12 Monate und 24 Monate sind zusätzlich 8 Milliliter Vollblut entnommen worden, aus welchen PBMC (Peripher blood mononuclear cells) präpariert wurden [29]. In dieser Doktorarbeit wurden ausschließlich PBMC-Proben aus dem Studienzeitpunkt 12 Monate analysiert. Zum besseren Verständnis ist hier das Consort Flow Diagram der Studie aufgeführt.

## CONSORT Flow Diagram



*Quelle des Consort Flow Diagrams: Kasang, C., et al., Effects of Prednisolone on Disease Progression in Antiretroviral-Untreated HIV Infection: A 2-Year Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. PLoS One, 2016.*

Für die ProCort- Studie sind 406 Patienten, von welchen 80 direkt wieder ausgeschlossen worden sind, rekrutiert worden. 76 der 80 ausgeschlossenen Patienten haben die Einschlusskriterien nicht erfüllt. 2 Patienten haben abgelehnt an der Studie teilzunehmen und die Daten von 2 weiteren Patienten sind im Verlauf verloren gegangen. 326 Patienten wurden also in die Studie eingeschlossen und randomisiert. 163 Patienten erhielten demnach Placebo und 163 erhielten täglich niedrig dosiertes Prednisolon.

Nach 24 Monaten sind im Placeboarm 25,15%, also 41 Patienten und im Prednisolonarm 22,09%, entsprechend 36 Patienten aus unbekanntem Gründen ausgeschieden (loss to follow-up).

Im Placeboarm haben 43 Teilnehmer vorzeitig den Studienendpunkt erreicht. Von diesen 43 haben 28 mit der Studienmedikation aufgehört, weil sie den Studienendpunkt (T-Helferzellzahl < 200, AIDS) erreicht haben. 1 Patient erhielt HAART, weil seine T-Helferzellzahl auf <350 abgefallen waren, denn gegen Ende der Studie musste das T-Helferzellzahl Kriterium verändert werden, weil zwischenzeitlich neue Therapieleitlinien in Tanzania eingeführt worden sind, die eine HAART-Behandlung schon ab 350 T-Helferzellen erforderten, statt wie zuvor, erst ab 200 [29]. 1 Patient erhielt HAART aus nicht dokumentierten Gründen (endpoint violation). 11 Patientinnen wurden während der Studie schwanger und somit ausgeschlossen und 2 Teilnehmer wurden aufgrund von anderen Erkrankungen, die den Studienabbruch forderten (adverse event) ausgeschlossen.

Im Prednisolonarm wiesen 22 Patienten zu niedrigen T-Helferzellzahlen auf (19 CD4 <200 und 3 CD4 < 350), 2 Patienten erhielten HAART aus nicht dokumentierten Gründen, 8 Teilnehmerinnen wurden aufgrund von Schwangerschaft ausgeschlossen und 2 erlitten Erkrankungen (adverse events). Insgesamt sind es 34 Patienten unter Prednisolontherapie, die vorzeitig den Studienendpunkt erreichten.

Die Informationen des Consort Flow Diagrams die für diese Laborarbeit relevant sind, sind die zum Studienzeitpunkt 12 Monate (siehe Consort Flow Diagram T cell flow cytometry month 12):

121 Studienteilnehmer sind im Placeboarm eingeschlossen und 126 im Prednisolonarm. PBMC's sind jeweils 77 vorhanden (siehe Diskussion: 4.2 für genauere Information) und es werden demnach 154 PBMC's durchflusszytometrisch analysiert. Aufgrund schlechter Qualität und dadurch unplausiblen durchflusszytometrischen Ergebnissen werden im Placeboarm 5 und im Prednisolonarm 4 Proben aussortiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Liste der Geräte

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Durchflusszytometer	Becton & Dickinson	FACS Calibur
Vortexer	Hartenstein	
Gefrier- und Kühlschränke	Bosch	

#### 2.1.2 Liste der Verbrauchsmaterialien

Material	Volumen, (Ausmaß)	Firma, Lieferant
Pipetten aus Glas	10 ml	Brand
FACS-Röhrchen	5 ml	BD
FACS-Röhrchen Deckel	12 mm $\varnothing$	Hartenstein

Kunststoffpipetten	1ml, 2ml	Sarstedt
Kunststoffpipetten	5ml, 10ml	Greiner
Pipettenspitzen	2-1000µl	Gilson
Pipettenspitzen mit Filter	2-1000µl	Peqlab

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

FACS-Färbung-Puffer (FM)	0,1% BSA (v/v) und 0,1% Natriumazid (w/v) in PBS
RPMI R10 Medium	0,5ml Penicillin/ Streptomycin und 3,5 ml Glutamin

### 2.1.4 Antikörper

Antikörper	Konjugierter Farbstoff	Firma
CD8	FITC	BD Biosciences
CD3	PerCP – Cy 5.5	BD Biosciences
CD38	PE	BD Biosciences
HLA-DR	APC	BD Biosciences

### 2.1.5 Computerprogramme

Programm	Firma
Endnote 5.0	ResearchSoft
FlowJo Software	Tree Star Inc.
GraphPad Prism 4.00	© 1992-2003 GraphPad Software, Inc.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Vorbereitung der PBMC

Die bereits isolierten PBMCs der ProCort-Proben wurden bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, auf Trockeneis transportiert und auf Eis langsam aufgetaut. Jeweils  $50\mu\text{l}$  der vorher resuspendierten  $100\mu\text{l}$  Proben wurden in Pipettierröhrchen für die Färbung überführt.

### 2.2.2 CD8/CD3/CD38/HLADR Antikörperfärbung der PBMC

Für die Selektion der aktiven T-Lymphozyten wurden eine vierfache Färbung der PBMCs mit anti-CD3 (PerCP-Cy 5,5), anti-CD 8 (FITC), anti-CD 38 (PE) und HLA-DR (APC) durchgeführt.

Die ProCort Proben wurden hierbei mit einer Mastermix-Mischung aus anti-CD38 und anti-HLADR sowie gleichzeitig mit einem Mastermix aus anti-CD3 und anti-CD8 gefärbt.

Für die Mastermix-Mischung aus anti-CD3 und anti-CD8 wurde anti-CD8 in einer Konzentration von 1:10 und anti-CD3 in einer Konzentration von 1:40 verdünnt in R10 Medium eingesetzt.

Für die Mastermix-Mischung aus anti-CD38 und anti-HLADR wurde anti-CD38 in einer Konzentration von 1:5 und anti-HLADR in einer Konzentration von 1:10 in R10 Medium eingesetzt.

Nach Ansetzen der Mastermixe wurde gevortext und anschließend zu  $50\mu\text{l}$  der ProCort-Probe jeweils  $25\mu\text{l}$  Mastermix gegeben.

Die finale Verdünnung der Antikörper in der Probe betragen:

Anti-CD8: 1:40

Anti-CD3: 1:160

Anti-CD 38: 1:20

Anti-HLADR: 1:40

Die Färbung wurde für 20 min bei 4°C im Dunkeln im Kühlschrank durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 20min mit 2ml Formaldehyd inkubiert um eine sichere Überführung der Proben in den S2 Bereich zu ermöglichen.

Nach der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert und die Überstände verworfen.

### 2.2.3 CD8/CD3 Antikörperfärbung der PBMC

Die PBMC für die Isotypenkontrolle wurden mit markierten Antikörpern gegen CD3 (PerCP-Cy 5,5) und gegen CD8 (FITC) gefärbt und so für die Durchflusszytometrie vorbereitet.

Dafür wurde wie unter 2.2.2 beschrieben eine Mastermix-Mischung aus anti-CD3 und anti-CD8 genutzt. Um die finale Verdünnung der Färbung zu erreichen wurden anstelle des zweiten Mastermixes 25µl R10 hinzugefügt und somit die gleichen Antikörperkonzentrationen wie in 2.2.2 erreicht.

Die Färbung wurde entsprechend 2.2.2 durchgeführt.

### 2.2.4 Durchführung der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde mit dem Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson) erstellt.

Die PBMC- Proben wurden im FSC/SSC-*gate* analysiert und hier wurde ein Sammelgate für die Lymphozyten gewählt. CD3+/CD8+ Ereignisse aus diesem *gate* wurden als CD8+-Lymphozyten gewertet, CD3+/CD8-Ereignisse als CD4+-Lymphozyten. CD38+ und HLADR+-Ereignisse wurden anhand von Isotyp-Färbungen definiert.

### 2.2.5 Statistik

Die Statistik wird mit dem Programm GraphPad Prism, Version 4.0 erstellt. Zunächst werden die Daten mit dem D'Agostino Pearson Test auf Normalverteilung getestet. Dieser basiert auf einer Untersuchung der Schiefe und Wölbung der vorliegenden Daten und testet die Nullhypothese, dass die Daten einer Normalverteilung entsprechen. Sofern die Nullhypothese nicht verworfen werden kann ( $p > 5\%$ ), wird davon ausgegangen, dass die Werte annähernd normalverteilt vorliegen. In diesem Fall werden für den Vergleich von zwei Gruppen der student's t-Test und für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen die einfaktorielle ANOVA verwendet. Beide Tests setzen normalverteilte Daten voraus und testen die Nullhypothese, dass keine Unterschiede zwischen den unabhängigen Gruppen vorliegen. Wird die Nullhypothese verworfen ( $\leq 5\%$ ), liegen lokal statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vor. Hierbei ist zu beachten, dass die ANOVA für mehr als zwei Gruppen lediglich einen Unterschied zwischen mindestens zwei Gruppen feststellt, aber keine weiteren Auskünfte darüber gibt, zwischen welchen oder wie vielen Gruppen tatsächlich Unterschiede auftreten. Um dies zu untersuchen, müssten wiederum jeweils 2 Gruppen paarweise mit dem student's t-Test getestet werden.

Falls der D'Agostino Pearson Test die Nullhypothese normalverteilter Daten ablehnt ( $p \leq 5\%$ ), wird für den Vergleich von zwei Gruppen der Mann-Whitney U-Test und für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen der H-Test nach Kruskal Wallis herangezogen. Diese Tests sind voraussetzungsfrei und testen die Nullhypothese, dass keine Unterschiede zwischen den unabhängigen Gruppen vorliegen. Die Ergebnisse sind analog zu den Tests mit normalverteilten Daten zu interpretieren.

Bei der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Mayer werden die Unterschiede zwischen den Überlebenskurven mit Logrank Test nach Mantel-Cox getestet. Ist der p-Wert  $\leq 5\%$ , liegt ein lokal statistisch signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen vor.

Um die Korrelation von zwei metrischen Merkmalen zu untersuchen, wird ein lineares Regressionsmodell verwendet. Der Korrelationskoeffizient  $r$  beschreibt,

ob eine negative Korrelation ( $r < 0$ ; umso größer/desto kleiner), eine positive Korrelation ( $r > 0$ ; umso größer/desto größer) oder keine Korrelation ( $r \approx 0$ ) vorliegt.

### **3 Ergebnisse**

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung der CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten bei den Teilnehmern der Procort-Studie zum Zeitpunkt 12 Monate durch die Einnahme von niedrigdosiertem Prednisolon im Vergleich zur Placebo Einnahme reduziert war, wurde die Immunaktivierung in 154 PBMC Proben (77 von Patienten mit niedrigdosiertem Prednisolon und 77 von Patienten mit Placebo) durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 1). Als Marker der zellulären Immunaktivierung dient in dieser Untersuchung die Expression von CD38 und HLA-DR auf CD8+ und CD4+ T-Zellen.

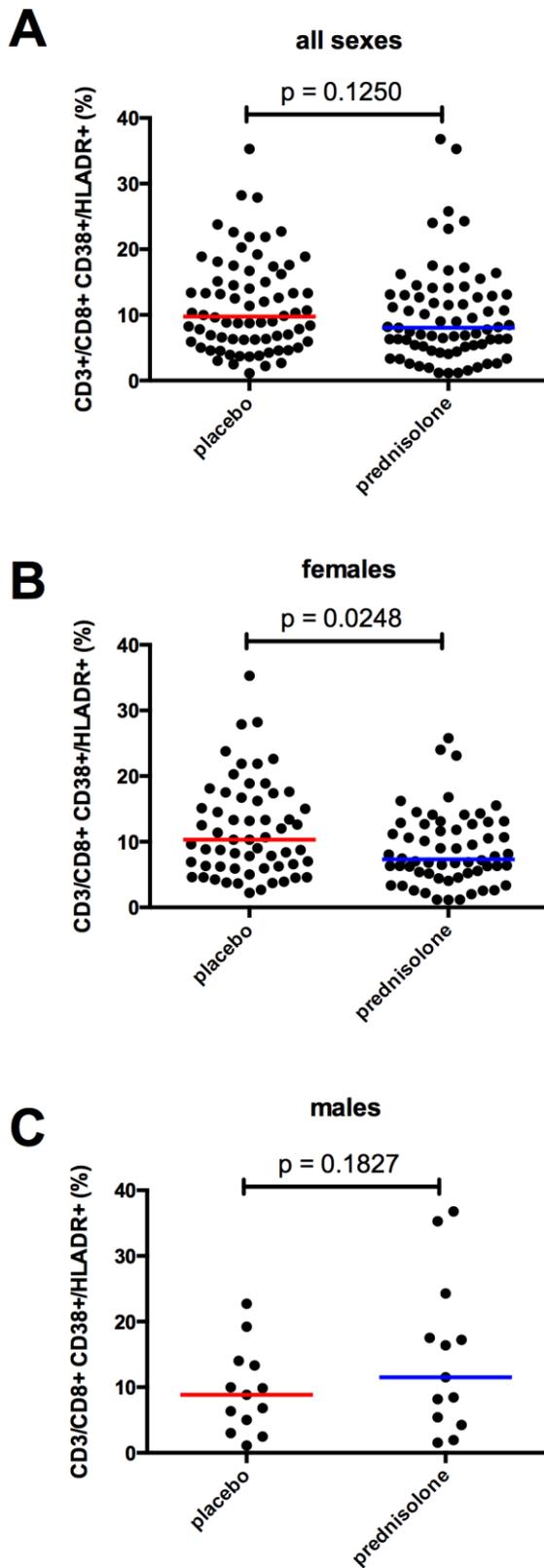


Abb1: Immunaktivierung der CD8+ T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression). PBMC aus der ProCort-Studie (insgesamt 154 Proben aus der 12-

Monats-Visite) wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3, CD8, CD38 und HLA-DR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. CD3/CD8-positive Zellen (Sammelgate für CTL) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur Gesamtmenge der CTL wurde als aktivierte CTL gewertet. **A:** Darstellung aller inkludierten Proben getrennt nach Studienbehandlung (Placebo versus Prednisolon). **(B)** Darstellung aller Proben aus A von weiblichen Studienteilnehmerinnen. **(C)** Darstellung aller Proben aus A von männlichen Studienteilnehmern. A-C: p für Mann-Whitney-Test für nicht-normalverteilte Proben. Ein  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

In der **Abbildung 1A** ist die Immunaktivierung aller 145 inkludierten PBMC-Proben dargestellt, unterteilt in Placebo- und Prednisolon-Behandlung. Der Median der Kontrollgruppe liegt mit 9,74 % über dem der Interventionsgruppe, welcher bei 8,04% liegt. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen erreicht jedoch keine statistische Signifikanz ( $p = 0,1250$ ). Wenn man das eben betrachteten Ergebnis nach Frauen (**Abb. 1B**) und Männern (**Abb. 1C**) stratifiziert, so ergibt sich ein interessantes Bild. Bei den Frauen zeigen die Prednisolon-behandelten Patienten ( $n = 60$ ) eine signifikant geringere Immunaktivierung als die Placebo-behandelten Patienten ( $n = 59$ ) (Median von 10,3% versus 7,3%,  $p = 0,0248$ ), bei Männern ( $n = 13$  vs.  $n = 13$ ) hingegen zeigt sich kein Unterschied in der Immunaktivierung.

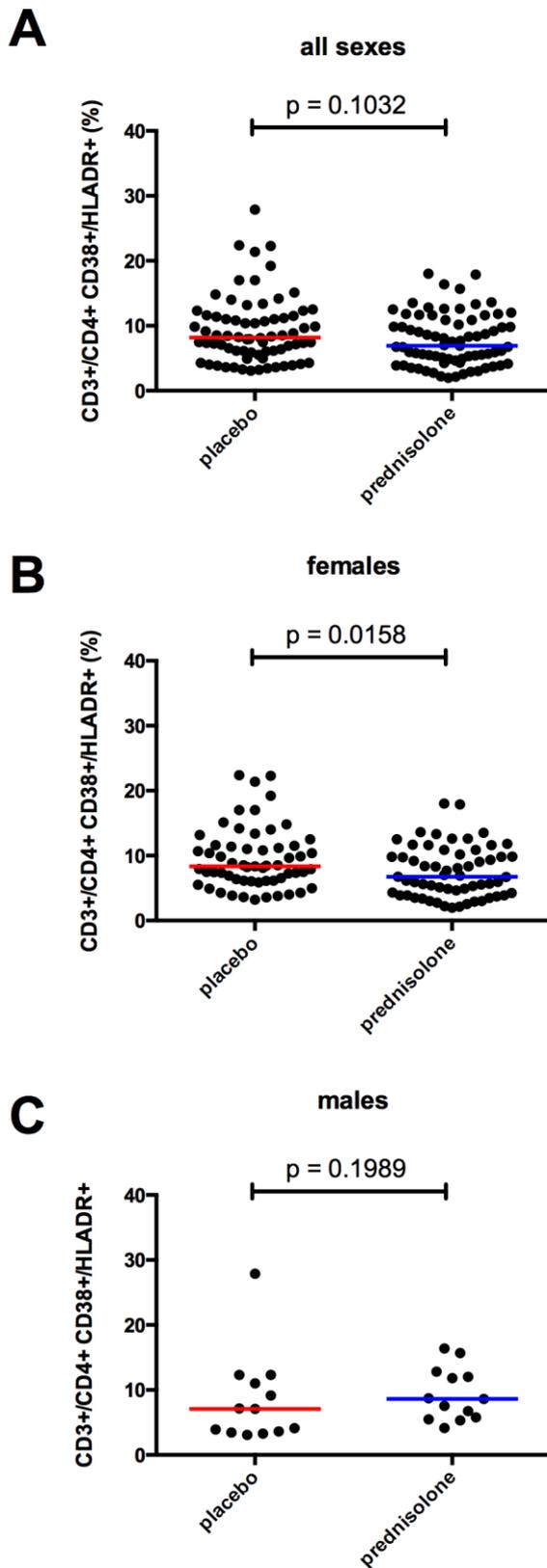
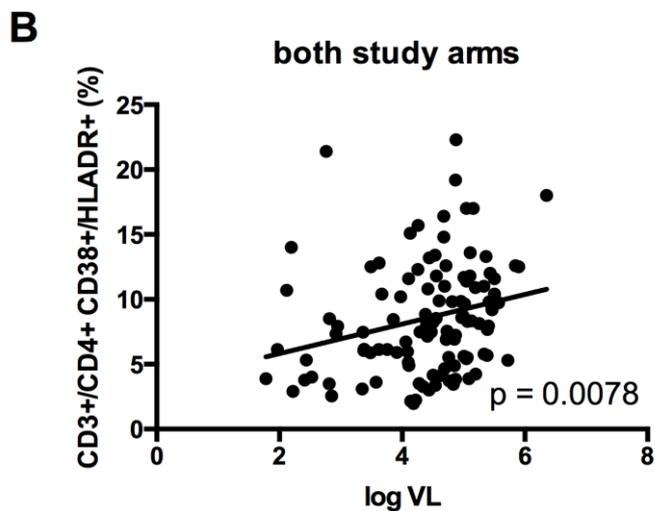
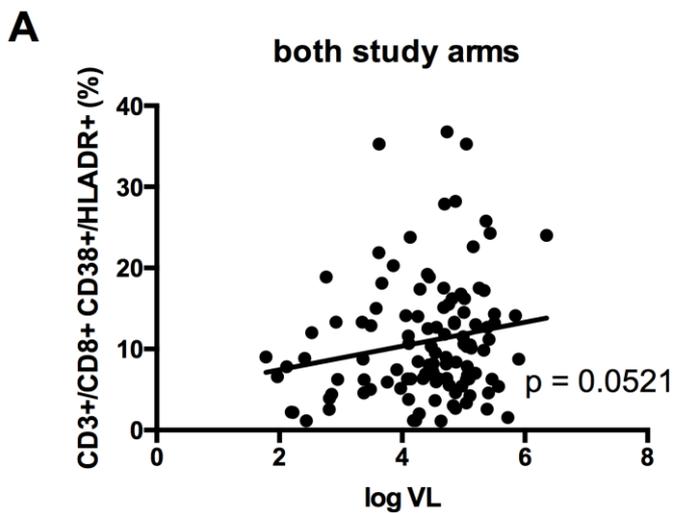


Abb2: Immunaktivierung der CD4+ T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression). PBMC aus der ProCort-Studie (insgesamt 154 Proben aus der 12-

Monats-Visite) wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3, CD8, CD38 und HLA-DR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. CD3-positive/CD8-negative Zellen (Sammelgate für CD4-positive T-Zellen) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur Gesamtmenge der CD4-Zellen wurde als aktivierte CD4-Zellen gewertet. **A:** Darstellung aller inkludierten Proben getrennt nach Studienbehandlung (Placebo versus Prednisolon). **(B)** Darstellung aller Proben aus A von weiblichen Studienteilnehmerinnen. **(C)** Darstellung aller Proben aus A von männlichen Studienteilnehmern. A-C: p für Mann-Whitney-Test für nicht-normalverteilte Proben. Ein  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

In **Abbildung 2A** werden die CD4+ Zellen der 145 inkludierten Patienten dargestellt und es ist wieder ein niedrigerer Median in der mit Prednisolon behandelten Patientengruppe zu sehen. Dieser liegt bei 6,910 %, während die Vergleichsgruppe einen Median von 8,185% aufweist. Auch hier reicht es allerdings nicht für statistische Signifikanz ( $p=0,1032$ ). Bei einer Stratifizierung nach Geschlecht erreicht der Unterschied zwischen der Placebo- und Interventionsgruppe bei Frauen wieder statistische Signifikanz (8,36% bei der Placebogruppe versus 6,735% bei der Interventionsgruppe,  $p = 0,0158$  statistisch ) (**Abb. 2B**), während bei Männern kein Unterschied beobachtet wird (**Abb. 2C**).

Die Behandlung mit niedrig-dosiertem Prednisolon führt also bei Frauen zu einer signifikanten Reduktion der HIV-induzierten Immunaktivierung der Lymphozyten um ca. 20% (bei CD4+ T Lymphozyten) bzw. 30% (bei CD8+ T-Lymphozyten), während bei Männern die Prednisolon-Behandlung keine Effekte zeigte.



**Abb3: Immunaktivierung der T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression) in Bezug zur Viruslast.** PBMC aus der ProCort-Studie (insgesamt 154 Proben aus der 12-Monats-Visite) wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3, CD8, CD38 und HLA-DR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

**A:** Darstellung aller inkludierten Proben und deren Immunaktivierung der CD8+ T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression) in Bezug zur Viruslast. CD3/CD8-positive Zellen (Sammelgate für CTL) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur Gesamtmenge der CTL wurde als aktivierte CTL gewertet. **B:** Darstellung aller inkludierten Proben und deren Immunaktivierung der CD4+ T-Lymphozyten

(CD38/HLADR-Expression) in Bezug zur Viruslast. CD3-positive/CD8-negative Zellen (Sammelgate für CD4-positive T-Zellen) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur Gesamtmenge der CD4-Zellen wurde als aktivierte CD4-Zellen gewertet. A-B: p für lineare Regression. Ein  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

In **Abbildung 3A** ist die Lymphozytenaktivierung, ausgedrückt durch die Aktivierungsmarker CD38/HLADR auf CD3/CD8-positiven Zellen in Bezug zur Viruslast dargestellt. Die positive Korrelation zur HIV – Viruslast ist mit einem P-Wert von 0,0521 (lineare Regressionsanalyse) fast statistisch signifikant. Die CD4-positiven Zellen, dargestellt in **Abbildung 3B**, welche in dieser Doktorarbeit per Definition die CD8-negativen Zellen sind, haben im Bezug zur HIV-Viruslast einen p-Wert von 0,0078.

In beiden Abbildungen ist eindeutig eine lineare Regression zu erkennen: Je höher die Viruslast im Plasma, desto höher ist die Immunaktivierung der CD4+ CD8+ T-Lymphozyten. Diese Korrelation wurde zur internen Überprüfung durchgeführt und zeigt, dass die Ergebnisse dieser Arbeit der allgemeinen Studienlage entsprechen und somit plausibel sind, da die Viruslast mit der Immunaktivierung in vielen Studien korreliert (s. dazu auch Diskussion Abschnitt 4.1).

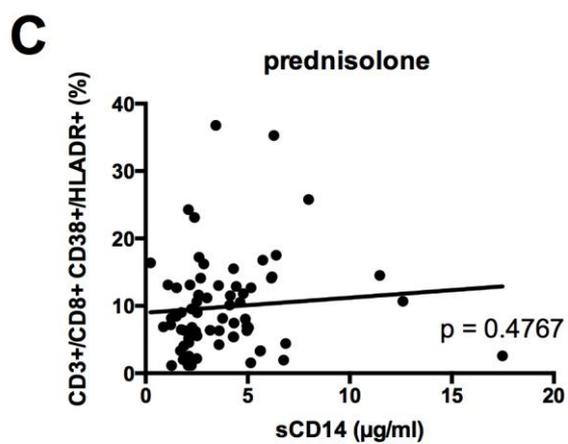
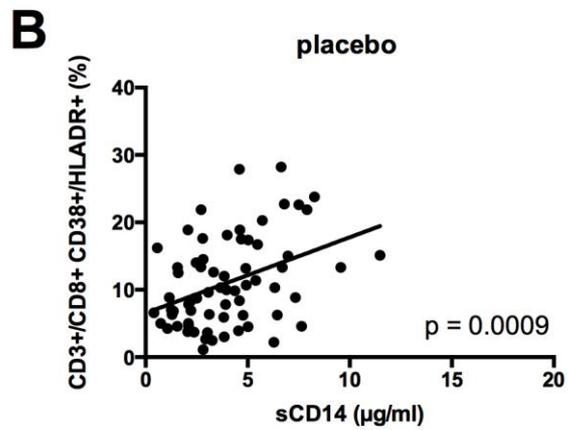
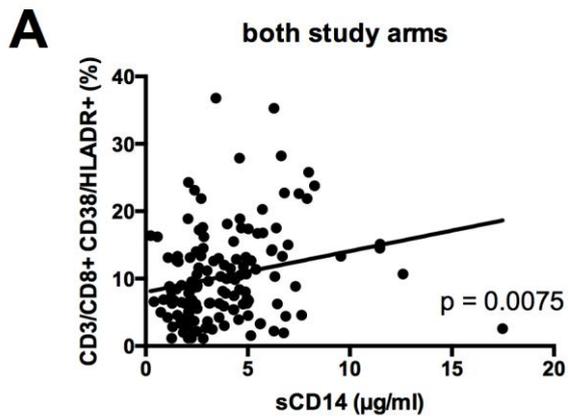


Abb 4: Korrelation der Immunaktivierung der CD8+ T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression) zum Immunaktivierungsmarker sCD14. PBMC aus der ProCort-Studie (insgesamt 154 Proben aus der 12-Monats-Visite)

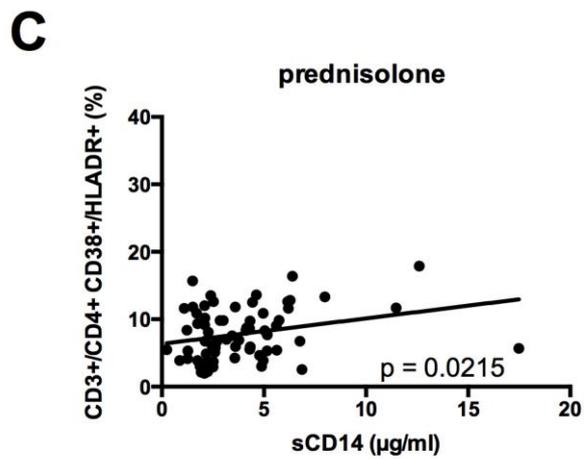
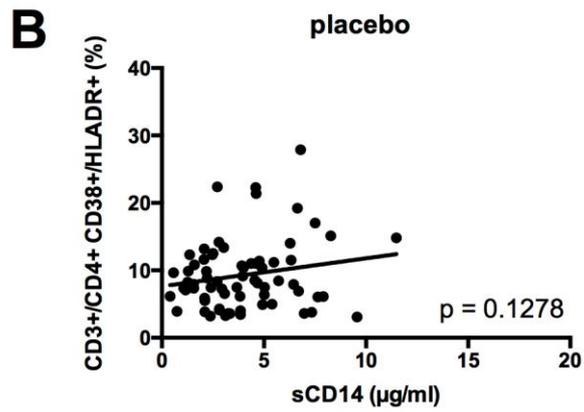
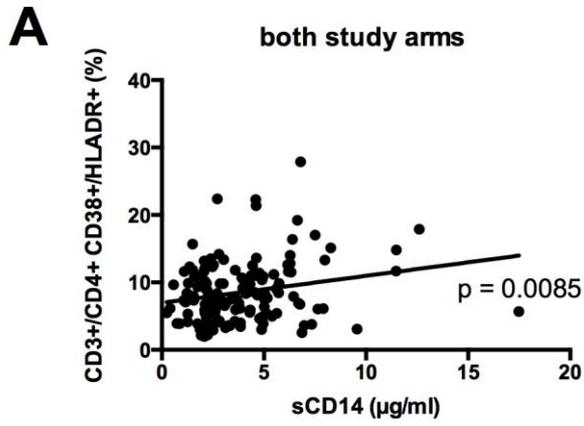
wurden mit Fluochrom-markierten Antikörper gegen CD3, CD8, CD 38 und HLA-DR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. CD3/CD8-positive Zellen (Sammelgate für CTL) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur Gesamtmenge der CTL wurde als aktivierte CTL gewertet. Diese wurde zum Immunaktivierungsmarker sCD14 korreliert. **A**: Darstellung aller inkludierten Proben in Bezug zu sCD14. Aufgeteilte Darstellung der Proben nach Studienbehandlung mit Placebo (**B**) und Prednisolon (**C**). A-C: p für lineare Regression. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

*Zur Anfertigung dieser Statistik durften die Daten zum Immunaktivierungsmarker sCD14 freundlicherweise aus der Doktorarbeit von Christa Kasang aus der eigenen Arbeitsgruppe genutzt werden.*

Das lösliche CD14 (soluble CD14, sCD14), welches ein weiterer Immunaktivierungsmarker ist, korreliert positiv mit der Aktivierung der der CD8-positiven T-Lymphozyten. In **Abbildung 4A** sind beide Studiengruppen gemeinsam dargestellt. Der p-Wert ist 0,0075 und es liegt eine lineare Korrelation vor. Wenn man die gesamten Studienteilnehmer in Placebo- und Prednisolon-behandelt unterteilt, so sieht man einen großen Unterschied im P-Wert. In **Abbildung 4B** bei den Placebo-Behandelten liegt dieser bei 0,0009 und unter Prednisolon, dargestellt in **Abbildung 4C** liegt er bei 0,4767. Der Verlust der Korrelation unter Prednisolon-Behandlung könnte auf unterschiedlich starke Effekte des Prednisolons auf die beiden unterschiedlichen Parameter zurückzuführen sein.

Unter Placebo-Behandlung ist also die lineare Regression statistisch signifikant. Die Immunaktivierung zeigt sich in ihrer vollen Ausprägung: Je mehr  $\mu\text{g}$  SCD14 je ml vorhanden ist, desto höher ist auch die Zahl der CD 8 positiven T-Lymphozyten. Wird jedoch mit Prednisolon therapiert und ist die lineare Regression deutlich weniger ausgeprägt. Bei viel löslichem CD14 sind viel weniger aktivierte CD8-positive T-Lymphozyten vorhanden. Die

Prednisolontherapie verändert also etwas. Die Immunaktivierung ist hinsichtlich der Lymphozytenaktivierung unter dieser weniger ausgeprägt.



**Abb5: Korrelation der Immunaktivierung der CD4+ T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression) zum Immunaktivierungsmarker sCD14.** PBMC aus der ProCort-Studie (insgesamt 154 Proben aus der 12-Monats-Visite) wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3, CD8, CD38 und HLA-DR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. CD3-positiv/CD8-negative Zellen (Sammelgate für CD4-positiv T-Zellen) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur Gesamtmenge der CD4-Zellen wurde als aktivierte CD4-Zellen gewertet. **A:** Darstellung aller inkludierten Proben in Bezug zu sCD14. Aufgeteilte Darstellung der Proben nach Studienbehandlung mit Placebo (**B**) und Prednisolon (**C**). A-C: p für lineare Regression. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

*Zur Anfertigung dieser Statistik konnten ebenfalls die Daten zum Immunaktivierungsmarker sCD14 freundlicherweise aus der Doktorarbeit von Christa Kasang aus der eigenen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt werden.*

Bei den CD4-positiven Lymphozyten zeigt sich ebenfalls eine lineare Regression zum Aktivierungsmarker sCD14. Insgesamt (**Abbildung 5A**) mit einem P-Wert von 0,0085. Aufgeteilt in den Placebozweig (**Abbildung 5B**) mit einem P gleich 0,1278 und in den Prednisolonzweig (**Abbildung 5C**) bei einem P von 0,0215.

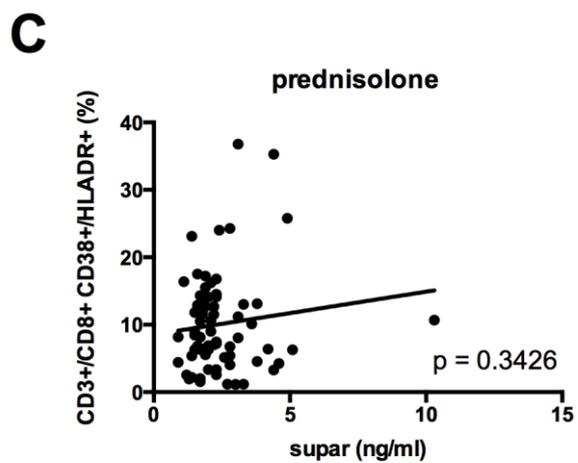
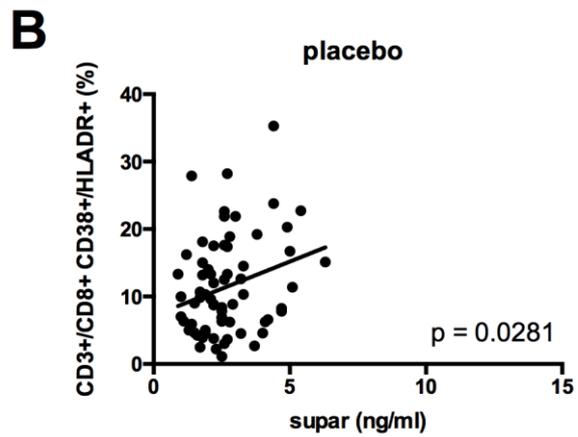
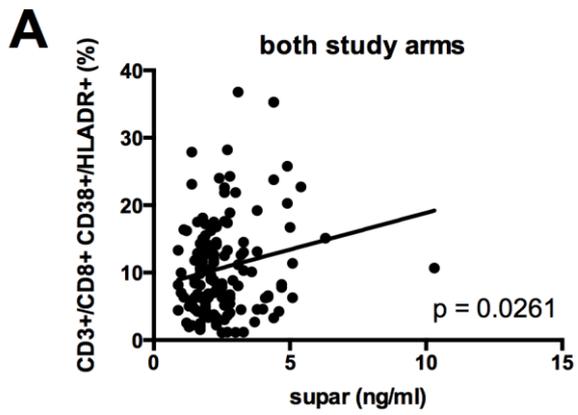


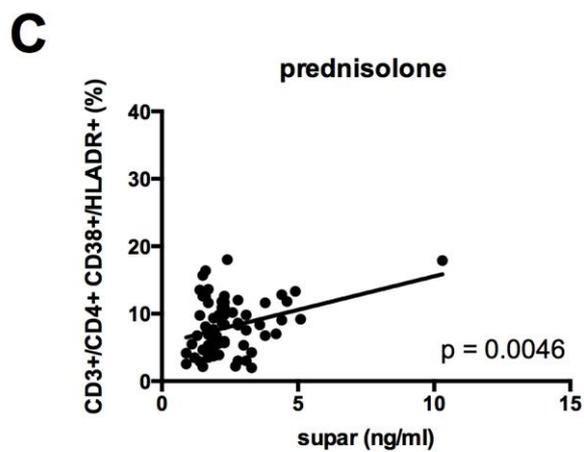
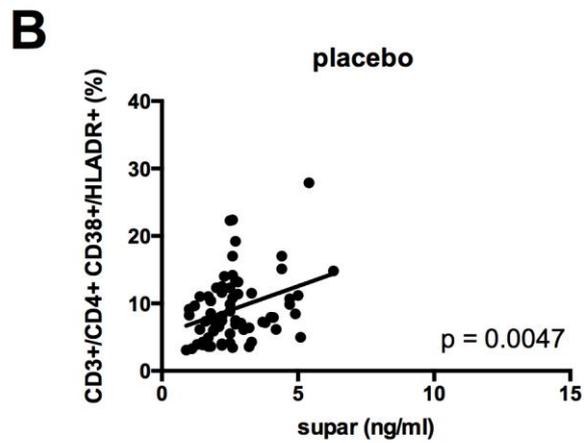
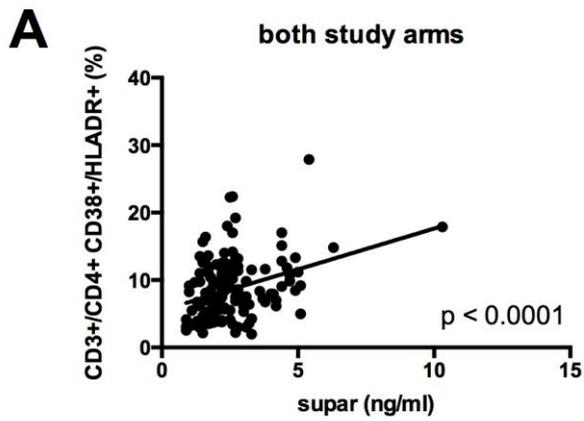
Abb 6: Korrelation der Immunaktivierung der CD8+ T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression) zum Immunaktivierungsmarker supar. PBMC

aus der ProCort-Studie (insgesamt 154 Proben aus der 12-Monats-Visite) wurden mit Fluochrom-markierten Antikörper gegen CD3, CD8, CD 38 und HLA-DR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. CD3/CD8-positive Zellen (Sammelgate für CTL) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur Gesamtmenge der CTL wurde als aktivierte CTL gewertet. Diese wurde zum Immunaktivierungsmarker *supar* korreliert. **A:** Darstellung aller inkludierten Proben in Bezug zu *supar*. Aufgeteilte Darstellung der Proben nach Studienbehandlung mit Placebo (**B**) und Prednisolon (**C**). A-C: p für lineare Regression. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

*Zur Anfertigung dieser Statistik konnten die Daten zum Immunaktivierungsmarker *supar* freundlicherweise aus der Doktorarbeit von Christa Kasang aus der eigenen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt werden.*

Die positive lineare Regression zum Aktivierungsmarker *supar* kann bei den CD8 positiven Zellen insgesamt (**Abbildung 6A**) mit einem P-Wert von 0,0261 bewiesen werden. In **Abbildung 6B** zeigt diese sich bei den Patienten, die nur mit Placebo therapiert worden sind und dementsprechend kein Einflussfaktor auf die Immunaktivierung eingewirkt hat mit einem P-Wert von 0,0281 statistisch signifikant.

Hingegen kann bei den immunsuppressiv behandelten Patienten in **Abbildung 6C** keine statistische Signifikanz (p-Wert: 0,3426) in der Korrelation gezeigt werden. Die Prednisolontherapie scheint die durch *supar* ausgedrückte Immunaktivierung abgeschwächt zu haben. Dies entspricht dem erwarteten Ergebnis.



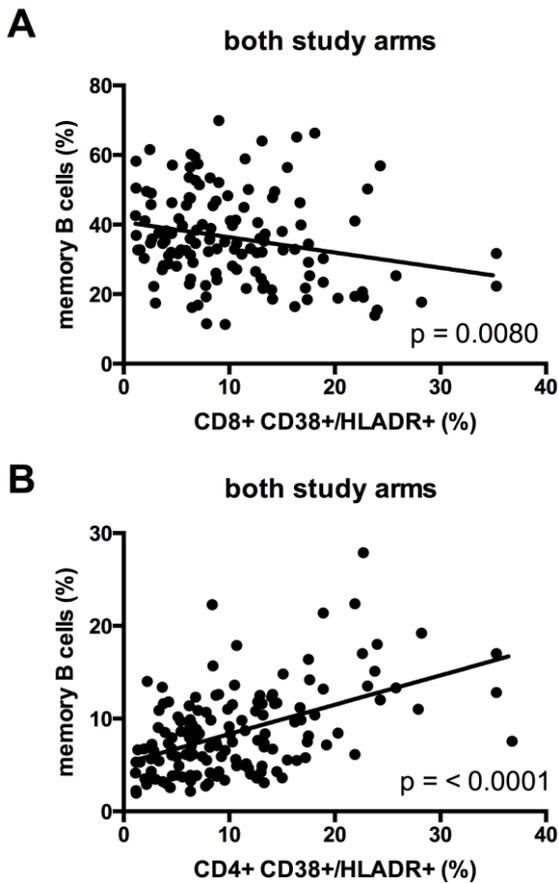
**Abb 7: Korrelation der Immunaktivierung der CD4+ T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression) zum Immunaktivierungsmarker supar. PBMC aus der ProCort-Studie (insgesamt 154 Proben aus der 12-Monats-Visite)**

wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3 , CD8, CD38 und HLA-DR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. CD3-positiv/CD8-negative Zellen (Sammelgate für CD4-positiv T-Zellen) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur Gesamtmenge der CD4-Zellen wurde als aktivierte CD4-Zellen gewertet. **A:** Darstellung aller inkludierten Proben in Bezug zu sCD14. Aufgeteilte Darstellung der Proben nach Studienbehandlung mit Placebo (**B**) und Prednisolon (**C**). A-C: p für lineare Regression. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

*Zur Anfertigung dieser Statistik durften ebenfalls die Daten zum Immunaktivierungsmarker supar freundlicherweise aus der Doktorarbeit von Christa Kasang entnommen werden.*

Die CD4-positiven Zellen korrelieren statistisch signifikant positiv zum Aktivierungsmarker supar unabhängig ihrer Aufteilung nach Behandlungstypus. Der P-Wert liegt in **Abbildung 7A** unter 0,0001, in **Abbildung 7B** bei 0,0047 und in **Abbildung 7C** bei 0,0046.

Per Definitionem sind die CD4 positiven Zellen ist in dieser Arbeit die CD8 negativen. Diese Ungenauigkeit könnte die Ergebnisse beeinflussen und wird im Diskussionsteil genauer analysiert.



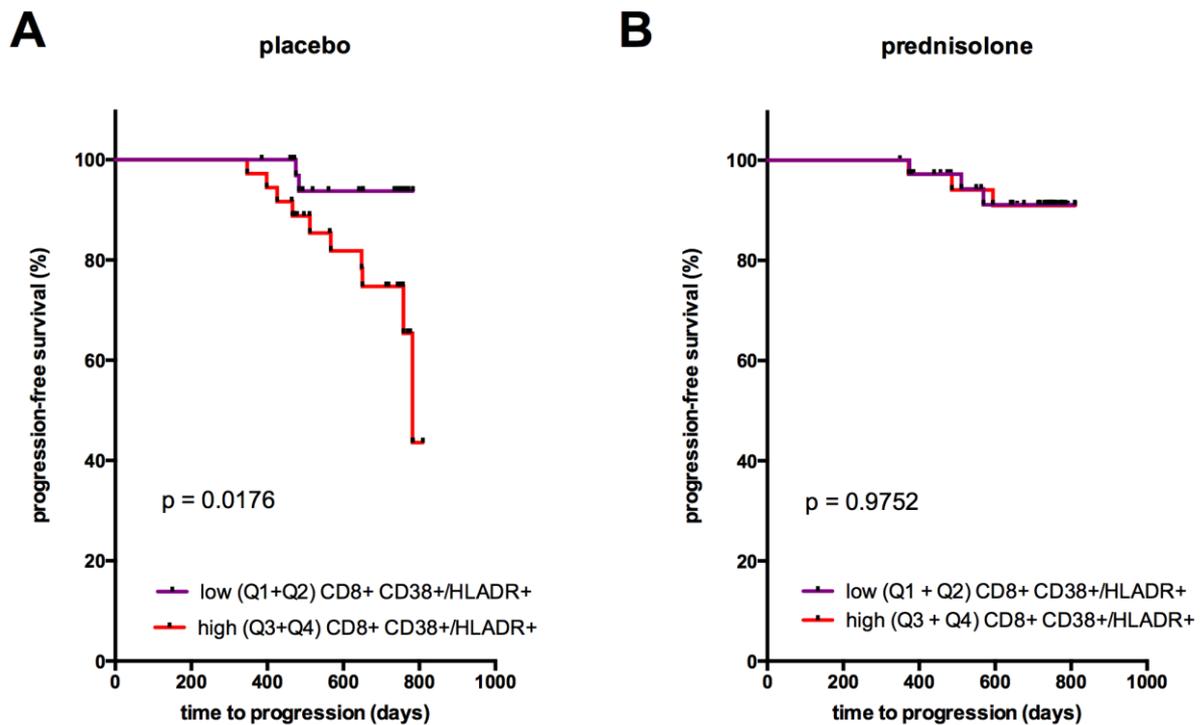
**Abb 8: Memory B Zellen in Bezug zur Immunaktivierung der T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression).** PBMC aus der ProCort-Studie (insgesamt 154 Proben aus der 12-Monats-Visite) wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3 , CD8, CD38 und HLA-DR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. **A:** Darstellung aller untersuchten Proben und deren Immunaktivierung der CD8+ T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression) in Bezug zu den Memory B Zellen. CD3/CD8-positive Zellen (Sammelgate für CTL) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur Gesamtmenge der CTL wurde als aktivierte CTL gewertet. **B:** Darstellung aller untersuchten Proben deren Immunaktivierung der CD4+ T-Lymphozyten (CD38/HLADR-Expression) in Bezug zu den Memory B Zellen. CD3-positive/CD8-negative Zellen (Sammelgate für CD4-positive T-Zellen) wurden auf Expression von CD38 und HLA-DR untersucht. Der Anteil an doppelt-positiven Ereignissen in Relation zur

Gesamtmenge der CD4-Zellen wurde als aktivierte CD4-Zellen gewertet. A-B: p für lineare Regression. Ein  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

*Die Daten der Memory B Zellen durften freundlicherweise aus den Ergebnissen der Laborarbeit von Benedikt Mann (geb. Anderle) aus der eigenen Arbeitsgruppe entnommen werden.*

Auf der y-Achse wird der Anteil der Memory B Zellen bezogen auf alle B-Zell-Populationen in Prozent angegeben und auf der x-Achse in **Abbildung 8A** die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen. Diese aktivierten CD8+ Zellen zeigen mit einem P-Wert von 0,0080 signifikant eine negative Korrelation zum Anteil an Memory B-Zellen. Je höher also der Anteil an memory B-Lymphozyten ist, desto weniger zeigen sich aktivierte CD8+ T Lymphozyten. HIV-Patienten zeigen gegenüber unifizierten Kontrollen eine geringeren Anteil an memory B-Zellen und im Verlauf der Infektion nimmt dieser Anteil stetig ab [30]. In der **Abbildung 8** wurde also versucht, einen Progressionsmarker (Aktivierung der CD8+ Zellen) mit einem Zustandsmarker (memory B Zellen) zu korrelieren. Die Bedeutung der gefundenen Korrelation ist noch offen.

In **Abbildung 8B** zeigt sich das Gegenteil. Die Aktivierung der CD4+ T-Lymphozyten korreliert positiv mit dem Anteil der Gedächtnis B-Lymphozyten. Hier gilt also: je höher der Anteil der memory B Zellen ist, desto höher der Anteil an aktivierten CD4+ T Zellen. Auch die Bedeutung dieser Korrelation ist noch offen.



**Abb. 9: Kaplan- Meyer- Analyse zur Progression der Krankheit zu AIDS aufgeteilt in hohe (Q3+4) und niedrige (Q1+2) Immunaktivierung der CD8+ T- Lymphozyten**

**A:** Placebo-therapierte Patienten. **B:** Prednisolon-behandelte Patienten.

Die blaue Linie stellt die CD8+ T- Lymphozyten der Quartilen 1 und 2, welche eine niedrige Immunaktivierung aufweisen, dar. Die rote Linie zeigt die Zellen mit hoher Immunaktivierung (Quartile 3 und 4) auf. Die Dauer der Krankheitsprogression in Tagen wird ins Verhältnis gesetzt zum progressionsfreien Überleben in Prozent. Die Punkte auf der Graphik stellt Patienten dar, die während der Studie ausgeschieden sind (zensierte Werte).

In **Abbildung 9A** wird sichtbar, dass es unter Placebo-Behandlung bei Patienten mit einer erhöhten Immunaktivierung der CD8+ T-Lymphozyten zu einer statistisch signifikanten (P-Wert von 0,0176) schnelleren Progression zu AIDS kam. Die Bedeutung der Aktivierung der CD8+-Zellen als Progressionsmarker der HIV-Infektion wird damit deutlich unterstrichen.

Unter Prednisolon- Therapie hingegen (**Abbildung 9B**) korreliert die Immunaktivierung nicht mehr mit der Progression (P-Wert liegt hier bei 0,9752).

Die beobachtete Dämpfung der CTL-Aktivierung unter Prednisolon (Abb. 1) führt also offenbar dazu, dass sich die Expression der Aktivierungsmarker CD38/HLADR nicht mehr als prognostischer Faktor für die Krankheitsprogression eignet. Das bedeutet aber auch, dass die CD38/HLADR-Expression auf CTL eher als Surrogatmarker der Krankheitsprogression aufzufassen ist und nicht etwa als kausaler Faktor. Ein direkter Zusammenhang zwischen der beobachteten Reduktion der CTL-Aktivierung und der Krankheitsprogression scheint demnach nicht zu bestehen.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Effekte von Prednisolon auf das Immunsystem bei Patienten mit HIV-Infektion**

Niedrig dosiertes Prednisolon bei bestehender HIV Infektion zu applizieren wird gut toleriert, senkt die Immunaktivität [31] und erhöht die CD4 Zellzahl [32]. Basierend auf diesen Beobachtungen sollten in dieser Arbeit die Effekte einer Behandlung mit Prednisolon auf das Immunsystem und auf weitere Immunaktivierungsmarker (sCD14 und supar) untersucht werden.

Das Ergebnis dieser Studie zeigt, dass bei den weiblichen Studienteilnehmerinnen durch die Einnahme von 5 mg Prednisolon pro Tag die T- Zell Aktivierung signifikant reduziert wird. Die T-Zell Aktivierung der Frauen wird sowohl bei den CD8+ als auch bei den CD4+ T-Zellen durch Prednisolon signifikant gesenkt. (Vergleiche Abb 1 und 2) Dies stimmt überein mit den Beobachtungen die von Christa Kasang in ihrer Arbeit gemacht wurden [29]. Die Unterdrückung der überschießenden Immunreaktion ist vor allem deswegen so wichtig, weil immer wieder bestätigt wird, dass eine erhöhte Immunaktivierung dem Körper Schaden zufügt und bei Infektion mit HIV schneller zum Tod führt [33]. Immunaktivierung muss im richtigen Maße geschehen: Weder eine überschießende, noch eine unzureichende Immunreaktion schützt den Körper [34]. Da besonders die erhöhte CD8-T-Zell-Aktivierung mit einer schlechteren

Wiederherstellung der CD4 Zellzahl, und somit einer schlechteren Prognose einhergeht [19], ist bei Unterdrückung dieser eine bessere Krankheitsbewältigung der HIV Infektion zu erwarten.

Um sicherzustellen, dass die in dieser Arbeit erhobenen Daten plausibel und somit aussagekräftig sind wurden interne Überprüfungen durchgeführt (siehe Abb 3). Die T-Zell Aktivierung korreliert sowohl bei den CD8+ als auch bei den CD4+ T-Zellen ebenso wie in früheren Studien positiv mit der Viruslast im Plasma [35, 36]. Eine erhöhte Viruslast in der HIV-Infektion führt prinzipiell zu erhöhter Immunaktivierung [37] und bei einer aktiven HIV Infektion mit hoher Viruslast wiederum sind CD38+ zytotoxische T-Zellen zahlreich, welche für eine schlechte Prognose sprechen, da sie durch ihre abnormale Immunaktivierung ihrer eigentlichen Funktion schlechter nachkommen können [38]. Es gibt auch Studien, die die Viruslast mit der Aktivierung von CD38 und HLADR auf CD8+ Lymphozyten gleichsetzen und aufzeigen, dass anstelle der Viruslast diese Immunaktivierung gemessen werden kann, um Kosten zu sparen [39]. Eine derartige Empfehlung hat sich allerdings in der Praxis nicht durchgesetzt und heute wird weltweit die Viruslastbestimmung als der Hauptparameter zur Therapiekontrolle durchgeführt.

Durch die Infektion mit dem HI-Virus wird die Barrierefunktion der Darmmukosa gestört [40] und durch die dadurch systemische Aufnahme von LPS und anderen mikrobiellen Bestandteilen wird die dauerhafte Immunaktivierung der CD8- und CD4-positiven T- Lymphozyten erklärt [41]. sCD14 repräsentiert diese bakterielle Translokation und die dadurch entstandene Immunaktivierung [40]. Allerdings ist eine Erhöhung von sCD14 nicht spezifisch für eine Infektion mit dem HI-Virus, sondern sie tritt auch bei anderen Erkrankungen auf. Hier ist das CVID (common variable immunodeficiency) Syndrom erwähnenswert, bei welchem die T-Zellaktivierung (HLADR/CD38) sowohl bei CD4+, als auch bei CD8+ Lymphozyten mit dem sCD14 Level korrelieren [42].

Eine signifikante positive Korrelation zwischen der Immunaktivierung der CD8+ Lymphozyten und dem Immunaktivierungsmarker sCD14 wie in dieser Arbeit in Abb.4A zu sehen ist, wird auch in der Studie von Chevalier et al dargestellt [43]. Eller et al. wiesen in ihrer Studie eine signifikante positive Korrelation zwischen

CD 4+/CD38+/HLADR+ T-Lymphozyten und sCD14 auf [44], entsprechend dem Ergebnis in Abb 5A.

Kasang et al. (aus der eigenen Arbeitsgruppe) konnte unter Prednisolontherapie eine signifikant niedrigere Konzentration von sCD14 im Vergleich zu Placebo nachweisen [45]. Bereits 1997 wurde dies von Nockher et al. gezeigt [46]. Wenn diese Inhibition von sCD14 durch Prednisolon so auch in unserem Versuch aufgetreten ist, so bleibt als Erklärungsansatz für den Verlust der Korrelation in Abb4C, dass Prednisolon einen unterschiedlich starken Effekt auf die CD8+ T-Lymphozytenaktivierung ausübte und sich dadurch die beiden Parameter unabhängig voneinander verhalten.

Die Korrelation in Abb 5B zeigt keine statistisch signifikante Korrelation, jedoch einen Trend in die Richtung, dass die CD4+ T-Lymphozytenaktivierung mit sCD14 zusammenhängt. Die relativ kleine Studienteilnehmerzahl könnte durch Messschwankungen so beeinflusst worden sein, dass ein signifikantes Ergebnis nicht zu Stande kam. Während sich bei den CD8+ Lymphozyten Prednisolon auf die beiden Parameter unterschiedlich auswirkt, scheint bei den CD4+ Lymphozyten eine statistisch signifikante positive Korrelation durch einen ähnlichen Einfluss auf beide Parameter erklärbar.

Es ist also davon auszugehen, dass CD4- und CD8-Lymphozyten sich in ihrem Verhaltensmuster insbesondere unter dem Einfluss von chronischer Immunaktivierung sehr stark unterscheiden. Ein Unterschied könnte sein, dass CD8+ T-Lymphozyten weniger sensitiv reagieren als CD4+ T-Lymphozyten in Anwesenheit von chronischer Immunaktivierung aufgrund ihrer unterschiedlichen Regenerationskapazität [47]. An weiteren Unterschieden sollte geforscht werden. Kasang et al. stellten fest, dass Prednisolon die Immunaktivierung, ausgedrückt durch supar, signifikant reduziert [29]. Dies spiegelt sich im Verlust der Korrelation zwischen den aktivierten CD8+ T-Lymphozyten wider (siehe Abb.6C). Bei den CD4+ Lymphozyten tritt dieser erwartete Korrelationsverlust jedoch nicht ein (siehe Abb.7C).

Eine Korrelation zwischen einem Progressionsmarker (Aktivierung der CD8+ Zellen, bzw. Aktivierung der CD4+ Zellen) mit einem Zustandsmarker (Gedächtnis B Zellen) wird in dieser Arbeit in Abbildung 8 dargestellt und zeigt

statistisch signifikante Ergebnisse. Je mehr Gedächtnis B-Zellen vorhanden sind, desto weniger aktivierte CD8+ T-Zellen sind auffindbar. Genau umgekehrt verhält es sich mit den CD4+ Zellen. Diese korrelieren positiv mit der Anzahl der *memory*-B-Zellen. Eine Einordnung dieser Ergebnisse in die aktuelle Studienlage erweist sich als schwierig, da nicht viele Ergebnisse zu solchen Korrelationen vorliegen.

In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die durch Prednisolon erzielte Reduktion der Immunaktivierung signifikant mit einer verlangsamten Krankheitsprogression korreliert (siehe Abbildung 9). Die HIV-Infektion führt bekannterweise zu einer Zunahme der aktivierten T-Zellen (CD8+ Zellen) im Blut [48]. Dieser Anteil im Blut korreliert mit der Krankheitsprogression [49]. Ebenso wie die Aktivierung der CD8+ Zellen ist auch die Plasmakonzentration von sCD14 ein Marker der Krankheitsprogression [27].

Ein weiterer Vorteil an einer Prednisolontherapie mit 5mg pro Tag ist, dass es unterhalb der Cushing- Schwelle liegt und somit keine starken Nebenwirkungen hervorruft. Wird eine Kortisontherapie von über 7,5 mg pro Tag angewendet, so erleiden die Patienten seriöse Nebenwirkungen[50].

## 4.2 Limitations

### 4.2.1 Fehlen der Baseline- Proben, Drop- Out Rate und laborlastiger Endpunkt

In dieser Doktorarbeit konnten nur die PBMC Proben zum Studienzeitpunkt 12 Monate ausgewertet werden, da Baseline-Proben aufgrund vorangegangener Untersuchungen in der Arbeitsgruppe nicht mehr zur Verfügung standen. Insbesondere wäre eine Betrachtung der Baseline, also der Ausgangswerte der T-Zellaktivierung interessant gewesen. Bei einer isolierten Betrachtung der Werte zum Zeitpunkt 12 Monate kann nur untereinander, also zwischen Prednisolon- und Placebotherapiertem Studienarm verglichen werden. Wie groß jedoch die

Unterschiede bereits zu Zeitpunkt null waren lässt sich nicht mehr rekonstruieren. Die bereits früher in der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen zeigen jedoch, dass sich beide Studienarme in den Baseline-Proben nicht signifikant voneinander unterscheiden [29]. Ein direkter Vergleich zwischen einer Quantifizierung der Immunaktivität der T-Lymphozyten zum Zeitpunkt null und zum Studienzeitpunkt 12 Monate würde eine noch genauere Aufschlüsselung der Wirkung des Immunsuppressivums Prednisolon liefern.

Ein zusätzlicher Kritikpunkt sind die hohen Drop-Out Raten in der ProCort Studie. (22,09% im Prednisolonarm versus 25,15% im Placeboarm). Da diese aber jeweils ähnlich hoch sind und da kein Verdachtsmoment besteht, dass diese mit der HIV-Infektion zusammenhängen, kann dies vernachlässigt werden [29].

Als Endpunkt der ProCort Studie wurden zwei Kriterien definiert: Laborergebnisse (CD4 *count*) und klinische Manifestation von AIDS. Bei der Mehrzahl der Studienteilnehmer wurde der Endpunkt über die Laborergebnisse erreicht und hieraus ergibt sich die Gefahr, dass es sich lediglich um eine Umverteilung und nicht um eine echte Erhöhung der CD4 Zellen handelt [29].

#### 4.2.2 Logistik

In Tansania sind die PBMC Proben bei -70 Grad Celcius kryokonserviert worden und halbjährlich auf Trockeneis nach Deutschland geflogen worden. In Deutschland sind die Zellen dann wieder bei -196 Grad Celcius gelagert worden. Inwieweit die Zellen durch die Einfrier- und Auftauvorgängen beeinflusst worden sind ist nicht ganz klar. Trotz Sicherheitsmaßnahmen ist es nicht auszuschließen, dass einige Proben unbeabsichtigt aufgetaut worden sind. In der Auswertung wurden im Placebo-Arm 5 Proben und im Prednisolon-Arm 4 Proben wegen schlechter Qualität aussortiert (siehe CONSORT Flow Diagram). Diese schlechte Qualität könnte daher kommen, dass die 9 Proben zwischenzeitlich nicht gekühlt waren. Dass weitere Proben durch Logistikfehler beeinflusst worden sind und

aufgrund geringerer Auffälligkeit nicht aus der Studie ausgeschlossen worden sind, aber dennoch die Ergebnisse verfälscht haben, ist nicht auszuschließen.

#### 4.2.3 Post- hoc Analysen

In dieser Arbeit wurde im Nachhinein aufgeteilt zwischen Männer und Frauen und nur durch die Trennung nach Geschlechtern konnte eine Reduzierung der Immunaktivierung durch Prednisolon gezeigt werden. Es ist kritisch zu sehen, dass eine solche Aufteilung nicht von Anfang an vorgesehen war, denn per Definition ist dadurch die Randomisierung aufgehoben. Dennoch sind solche Post-hoc Analysen wichtig, um alle möglichen Schlüsse der Studie in Betracht zu ziehen. Die Compliance der Studienteilnehmer wurde fortlaufend durch visuelle Kontrolle überwacht, da die Patienten ihre Medikamente zu jeder Medizinkontrolle mitbringen mussten und bei einer Compliance unter 80 Prozent wurde man aus der Studie ausgeschlossen [29]. Die geringe Anzahl von 13 männlichen Teilnehmern je Studiengruppe und die unbekanntenen Ausgangswerte der Immunaktivierung tragen zu einer geringeren Aussagekraft der Wirkung von Prednisolon auf die Immunaktivierung bei. Die eigentliche Problematik stellt sich aber durch die konstante Dosierung von 5 mg Prednisolon unabhängig des Körpergewichts dar. Prednisolon wird für verschiedene Verwendungszwecke in verschiedener Dosierung (niedrig, mittel oder hoch) gegeben, wird jedoch jeweils per Kilogramm Körpergewicht dosiert [51]. Es finden sich keine Daten zum Körpergewicht der Patienten der ProCort Studie, aber eine Unterdosierung bei den Männern kann angenommen werden. Unterschiede in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, wie zum Beispiel das geringere Verteilungsvolumen und die verzögerte *clearance* bei Frauen [52] hätte ebenfalls zu einem Dosierungsunterschied zwischen Frauen und Männern führen sollen.

#### 4.3 Schlussfolgerung

Die antiretrovirale Therapie senkt zwar die erhöhte Immunaktivierung, bringt diese aber nicht zum Ausgangswert zurück, weswegen es so wichtig ist nach Methoden zu forschen durch welche Therapien die antiretrovirale Therapie ergänzt werden könnte [53]. Die in dieser Arbeit beschriebene Unterdrückung der Immunaktivierung durch isolierte Prednisolontherapie kann als Grundlage dienen Prednisolon als Cotherapie zu ART bei HIV Infektion einzusetzen mit dem Ziel die erhöhte Morbidität durch die residuale Immunaktivierung zu senken. In einer Studie von Andrieu et al. wurde bereits 2004 bestätigt, dass der Einsatz von Prednisolon bei chronischer HIV-Infektion die CD4 Zellzahl erhöht [54]. Wallis et al. untersuchten die Sicherheit von parallel eingesetztem Prednisolon unter ART Therapie mit dem Ergebnis, dass asymptomatische Hüftnekrosen aufgetreten sind [55]. Es sollte weiter daran geforscht werden wie sicher diese Medikamentenkombination ist und wie sich der Einsatz von niedrigdosiertem Prednisolon auf die T-Zell Aktivierung bei parallel laufender antiretroviraler Therapie auswirkt.

Es gibt viele Ansätze für Cotherapien bei HIV- Infektion, aber wenige die einen positiven Effekt zeigen. Ernährungstherapien und Kräutertherapien weisen beispielsweise keinen Effekt auf [56, 57]. Massagen jedoch können die Lebensqualität der Patienten positiv beeinflussen, haben aber auf die Krankheitsprogression keinen direkten Einfluss [58].

Prednisolon hat einen Einfluss auf die Krankheitsprogression und könnte als Cotherapie helfen, das Ausbrennen der Zellen zu verlangsamen und somit dazu führen noch bessere Ergebnisse der Antiretroviralen Therapie zu erzielen.

## **5 Zusammenfassung**

Hintergrund: Die HIV-Infektion wird von einer allgemeinen Hyperimmunaktivierung begleitet, die wahrscheinlich eine treibende Kraft in der Pathogenese der Entwicklung von AIDS darstellt. Im Rahmen einer 24-monatigen, Placebo-kontrollierten, randomisierten Doppelblindstudie wurde in unserer Arbeitsgruppe der Einfluss von gering-dosiertem Prednisolon (5 mg/Tag)

auf die Progression der Erkrankung untersucht (ProCort-Studie, [clinicaltrials.gov NCT01299948](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01299948)). Es konnte gezeigt werden, dass gering-dosiertes Prednisolon bei weiblichen Studienteilnehmerinnen zu einer signifikant verlangsamten Progression hin zum Studienendpunkt AIDS geführt hat. Die immunologischen Grundlagen dieses Effektes sind noch nicht ausreichend verstanden. Es ist bekannt, dass die HIV-Infektion zu einer Zunahme der aktivierten T-Zellen im Blut führt und dass der Anteil dieser aktivierten T-Zellen mit der Krankheitsprogression korreliert. Diese T-Zell Hyperaktivierung wird unter antiretroviraler Behandlung wieder normalisiert. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Prednisolon-Behandlung auf die T-Zell-Aktivierung untersucht werden, um zu verstehen, ob die Prednisolon-Behandlung ähnliche positive Effekte auf das Immunsystem hat, wie die antiretrovirale Therapie.

Methoden: In dieser Studie wurden insgesamt 154 PBMC-Proben (77 Placebo, 77 Prednisolon) des Studienzeitpunktes 12 Monate untersucht. Die PBMC wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3 (PerCP-Cy 5.5), CD8 (FITC), CD38 (PE) und HLA-DR (APC) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Folgende Populationen wurden definiert: T-Zellen (CD3+), CD8-positive T Zellen (CD3+/CD8+), CD4-positive T Zellen (CD3+/CD8-), aktivierte T Zellen (CD38+/HLA-DR+). Eine statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Software.

Ergebnisse: Patienten mit Prednisolon-Behandlung zeigten im Vergleich zu Patienten mit Placebo-Behandlung eine geringere Aktivierung der CD8+ T Zellen (median 8.04 % [CI95% 8.158-11.54]) vs. median 9.74 % [CI95% 9.71-13.05] sowie der CD4+ T Zellen (median 6.910% [CI95% 6.862-8.721] vs. median 8.185 % [CI95% 8.088-10.49]). Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0.1250$  bzw.  $p=0.1032$ , U test). Bei einer Stratifizierung der Daten nach Geschlecht erreichten die festgestellten Unterschiede zwischen Placebo- und Prednisolonbehandlung bei weiblichen Studienteilnehmern statistische Signifikanz (CD8+ Aktivierung: median 7.3 % [CI95% 7.413-10.26] vs. median 10.3 % [CI95% 9.927-13.69],  $p = 0.0248$ , U-test), sowie der CD4+ T Zellen (median 6.735% [CI95% 6.448-8.476] vs. (median 8.36% [CI95% 8.274-10.72],  $p = 0.0158$ , U-test), während bei männlichen Studienteilnehmern kein

Unterschied auftrat. Die Lymphozytenaktivierung zeigte eine positive Korrelation zur HIV-Viruslast ( $p = 0.0521$  für CD8+ und  $p = 0.0078$  für CD4+, lineare Regression) und zum Immunaktivierungsmarker sCD14 ( $p = 0.0075$  für CD8+ und  $p < 0.0085$  für CD4+, lineare Regression) und zum Aktivierungsmarker super ( $p = 0.0261$  für CD8+ und  $p < 0.0001$  für CD4+, lineare Regression). Aktivierte CD4+ Zellen zeigten eine positive, aktivierte CD8+ Zellen eine negative Korrelation zum Anteil an memory-B-Zellen ( $p = 0.0080$  für CD8+ und  $p < 0.0001$  für CD4+, lineare Regression). In einer Kaplan-Meyer-Analyse innerhalb des Placebo-Arms zeigten Patienten mit einer höheren Immunaktivierung bei CD8+ T-Lymphozyten (Quartilen Q1 und Q2) eine signifikant schnellere Progression zu AIDS als Patienten mit einer niedrigen Immunaktivierung (Quartilen Q3 und Q4,  $p = 0.0176$ ).

Diskussion: In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Studienteilnehmerinnen mit Prednisolon-Behandlung zum Zeitpunkt 12 Monate eine signifikant niedrigere Lymphozytenaktivierung zeigen als Studienteilnehmerinnen mit Placebo-Behandlung. Die Prednisolon-vermittelte Reduktion der Immunaktivierung korrelierte mit verlangsamter Krankheitsprogression. Die HIV-induzierte Immunaktivierung ist damit ein treibender Faktor in der Progression der Erkrankung. Immunmodulatorische Therapien bei Patienten mit ungenügender Immunrekonstitution unter antiretroviraler Behandlung könnten daher möglicherweise einen positiven Behandlungseffekt erzielen.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Bestimmung der Aktivierung von CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten bei Teilnehmern eines RCT, in dem der Effekt von niedrig-dosiertem Prednisolon auf die Progression der HIV-Infektion untersucht werden sollte. Die Ergebnisse sollten mit der Art der Behandlung (Placebo oder Prednisolon), weiteren Markern der Immunaktivierung sowie der Viruslast korreliert werden und der Effekt auf die Krankheitsprogression untersucht werden. Aus diesen Ergebnissen sollten Rückschlüsse auf die Effekte von Prednisolon auf das Immunsystem, sowie ein besseres Verständnis der Immunpathogenese der Infektion gewonnen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. UNAIDS. *Fast-Track - Ending the AIDS epidemic by 2030*. 2014 November 2, 2018]; Available from: [https://www.unaids.org/en/resources/documents/2014/JC2686\\_WAD2014report](https://www.unaids.org/en/resources/documents/2014/JC2686_WAD2014report).
2. Institut, R.K. *Schätzung der Zahl der HIV-Neuinfektionen und der Gesamtzahl von Menschen mit HIV in Deutschland*. 2017 december 17,2017]; Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2017/47/Art\\_01.html?nn=2374210](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2017/47/Art_01.html?nn=2374210).
3. Avert. *HIV and AIDS in Tanzania*. 2016 december 17,2017]; Available from: <https://www.avert.org/professionals/hiv-around-world/sub-saharan-africa/tanzania#The%20future%20of%20HIV%20and%20AIDS%20in%20Tanzania>.
4. Robert Koch Institut. *Schätzung der Zahl der HIV-Neuinfektionen und der Gesamtzahl von Menschen mit HIV in Deutschland*. 2018 november 4,2018]; Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/47\\_18.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/47_18.pdf?__blob=publicationFile).
5. WHO. *WHO urges action against HIV drug resistance threat*. september 3,2018]; Available from: <https://www.who.int/en/news-room/detail/20-07-2017-who-urges-action-against-hiv-drug-resistance-threat>.
6. Kamaradova, D., et al., *Connection between self-stigma, adherence to treatment, and discontinuation of medication*. Patient Prefer Adherence, 2016. **10**: p. 1289-98.
7. Deutsche AIDS-Hilfe. *Positive Stimmen*. 2012 december 17,2017]; Available from: <https://www.aidshilfe.de/sites/default/files/documents/positive%20stimmen%20Doku.pdf>.
8. Kelly, C., et al., *Discordant Immune Response with Antiretroviral Therapy in HIV-1: A Systematic Review of Clinical Outcomes*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0156099.
9. Vigano, A., et al., *Thymus volume correlates with the progression of vertical HIV infection*. AIDS, 1999. **13**(5): p. F29-34.
10. Palmer, D.B., *The effect of age on thymic function*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 316.
11. Asfaw, A., et al., *CD4 cell count trends after commencement of antiretroviral therapy among HIV-infected patients in Tigray, Northern Ethiopia: a retrospective cross-sectional study*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0122583.
12. Rousseau, R., et al., *Immunologic non-response during HIV infection is characterized by systemic immune activation*. J Immunol, 2017. **198**(1): p. 125.3.
13. Luo, Z., et al., *Increased Natural Killer Cell Activation in HIV-Infected Immunologic Non-Responders Correlates with CD4+ T Cell Recovery*

- after Antiretroviral Therapy and Viral Suppression*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0167640.
14. Picker, L.J. and S.G. Deeks, *HIV: Antibodies advance the search for a cure*. Nature, 2013. **503**(7475): p. 207.
  15. May, M.T., et al., *Impact on life expectancy of HIV-1 positive individuals of CD4+ cell count and viral load response to antiretroviral therapy*. AIDS, 2014. **28**(8): p. 1193-202.
  16. Boulougoura, A. and I. Sereti, *HIV infection and immune activation: the role of coinfections*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(2): p. 191-200.
  17. Appay, V., et al., *Accelerated immune senescence and HIV-1 infection*. Exp Gerontol, 2007. **42**(5): p. 432-7.
  18. Kestens, L., et al., *Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection*. AIDS, 1992. **6**(8): p. 793-7.
  19. Bofill, M., et al., *Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients*. AIDS, 1996. **10**(8): p. 827-34.
  20. Valdez, H., et al., *Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease*. AIDS, 2002. **16**(14): p. 1859-66.
  21. Harper, M.E., et al., *Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(3): p. 772-6.
  22. Hunt, P.W., et al., *T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2003. **187**(10): p. 1534-43.
  23. Rasmussen, L.J., et al., *Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is a novel, independent predictive marker of myocardial infarction in HIV-1-infected patients: a nested case-control study*. HIV Med, 2016. **17**(5): p. 350-7.
  24. Kirkegaard-Klitbo, D.M., et al., *Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor Is a Predictor of Incident Non-AIDS Comorbidity and All-Cause Mortality in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection*. J Infect Dis, 2017. **216**(7): p. 819-823.
  25. Hoenigl, M., et al., *Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR) is predictive of Non-AIDS Events during Antiretroviral Therapy-mediated Viral Suppression*. Clin Infect Dis, 2018. **69**(4): p. 676-686.
  26. Negi, N., et al., *Comparative evaluation of microbial translocation products (LPS, sCD14, IgM Endocab) in HIV-1 infected Indian individuals*. Microb Pathog, 2017. **111**: p. 331-337.
  27. Krastinova, E., et al., *High Soluble CD14 Levels at Primary HIV-1 Infection Predict More Rapid Disease Progression*. J Infect Dis, 2015. **212**(6): p. 909-13.
  28. Gandhi, R.T., et al., *Levels of HIV-1 persistence on antiretroviral therapy are not associated with markers of inflammation or activation*. PLoS pathogens, 2017. **13**(4): p. e1006285.

29. Kasang, C., et al., *Effects of Prednisolone on Disease Progression in Antiretroviral-Untreated HIV Infection: A 2-Year Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146678.
30. Moir, S., et al., *B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy*. Blood, 2010. **116**(25): p. 5571-9.
31. McComsey, G.A., et al., *Placebo-controlled trial of prednisone in advanced HIV-1 infection*. AIDS, 2001. **15**(3): p. 321-7.
32. Andrieu, J.M., W. Lu, and R. Levy, *Sustained increases in CD4 cell counts in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients treated with prednisolone for 1 year*. J Infect Dis, 1995. **171**(3): p. 523-30.
33. Tian, R.R., et al., *High immune activation and abnormal expression of cytokines contribute to death of SHIV89.6-infected Chinese rhesus macaques*. Arch Virol, 2015. **160**(8): p. 1953-66.
34. Roider, J.M., M. Muenchhoff, and P.J. Goulder, *Immune activation and paediatric HIV-1 disease outcome*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(2): p. 146-55.
35. Orendi, J.M., et al., *Activation and cell cycle antigens in CD4+ and CD8+ T cells correlate with plasma human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA level in HIV-1 infection*. J Infect Dis, 1998. **178**(5): p. 1279-87.
36. Mollet, L., et al., *Dynamics of HIV-specific CD8+ T lymphocytes with changes in viral load. The RESTIM and COMET Study Groups*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1692-704.
37. Leligidowicz, A., et al., *Direct relationship between virus load and systemic immune activation in HIV-2 infection*. J Infect Dis, 2010. **201**(1): p. 114-22.
38. Tae-Wook Chun, J.S.J., Christina Sanford, Claire W. Hallahan, Marie A. Planta, Mona Loutfy, Shyam Kottlil, Susan Moir, Colin Kovacs. *Relationship between the frequency of HIV-specific CD8 T cells and the level of CD38 CD8 T cells in untreated HIV-infected individuals*. 2003; Available from: <https://www.pnas.org/content/pnas/101/8/2464.full.pdf>.
39. Han, Y., et al., *[The correlation of HIV-1 viral load to expression of CD8+ T lymphocyte activators CD38 and HLA-DR]*. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 2006. **45**(6): p. 459-62.
40. Estes, J.D., et al., *Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001052.
41. Brechley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
42. Litzman, J., et al., *Chronic immune activation in common variable immunodeficiency (CVID) is associated with elevated serum levels of soluble CD14 and CD25 but not endotoxaemia*. Clin Exp Immunol, 2012. **170**(3): p. 321-32.
43. Chevalier, M.F., et al., *The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence*

- of systemic microbial translocation. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003453.
44. Eller, M.A., et al., *Innate and adaptive immune responses both contribute to pathological CD4 T cell activation in HIV-1 infected Ugandans*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18779.
  45. Kasang, C., et al., *HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients*. BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 14.
  46. Nockher, W.A. and J.E. Scherberich, *Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro*. J Immunol, 1997. **158**(3): p. 1345-52.
  47. Douek, D.C., L.J. Picker, and R.A. Koup, *T cell dynamics in HIV-1 infection*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 265-304.
  48. Cao, W., et al., *Elevation and persistence of CD8 T-cells in HIV infection: the Achilles heel in the ART era*. J Int AIDS Soc, 2016. **19**(1): p. 20697.
  49. Liu, Z., et al., *Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997. **16**(2): p. 83-92.
  50. Chabre, O., *[Cushing syndrome: Physiopathology, etiology and principles of therapy]*. Presse Med, 2014. **43**(4 Pt 1): p. 376-92.
  51. Aliud Pharma. *Fachinformation 2017*; Available from: <http://fachinformation.srz.de/pdf/aliudpharma/prednisolon15mg-10mg-20mg-50mgtabletten.pdf>.
  52. Soldin, O.P. and D.R. Mattison, *Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Clin Pharmacokinet, 2009. **48**(3): p. 143-57.
  53. Bandera, A., et al., *Strategies to limit immune-activation in HIV patients*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2017. **15**(1): p. 43-54.
  54. Andrieu, J.M. and W. Lu, *Long-term clinical, immunologic and virologic impact of glucocorticoids on the chronic phase of HIV infection*. BMC Med, 2004. **2**: p. 17.
  55. Wallis, R.S., et al., *A study of the immunology, virology, and safety of prednisone in HIV-1-infected subjects with CD4 cell counts of 200 to 700 mm<sup>-3</sup>*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. **32**(3): p. 281-6.
  56. Visser, M.E., et al., *Micronutrient supplementation in adults with HIV infection*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017(5).
  57. Liu, J.P., E. Manheimer, and M. Yang, *Herbal medicines for treating HIV infection and AIDS*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2005(3).
  58. Hillier, S.L., et al., *Massage therapy for people with HIV/AIDS*. Cochrane database of systematic reviews, 2010(1).

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Carsten Scheller für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit, für die freundliche Hilfsbereitschaft während der experimentellen Phase und dem Verfassen dieser Arbeit, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Übernahme des Erstgutachtens der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Manfred Lutz danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ich bedanke mich bei den Arbeitsgruppen AG Scheller für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Mutter, meinem Vater, meinen Geschwistern, meiner Oma und bei meinem Verlobten für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums.

# **Curriculum Vitae**

## **Nadja Mirjam Averbeck**

### Akademische Berufsausbildung

1996 – 2000    Grundschule am Schwalbanger in Neuburg an der Donau  
2000 – 2010    Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen a.d.Ilm  
2012            Medizinstudium in Riga, Lettland  
2014            Medizinstudium in Würzburg  
Approbation zur Ärztin am 20.11.2018

### Tänzerische Berufsausbildung

1999 – 2004    Ballettakademie Heinz Bosl Stiftung in München  
2006 – 2007    Bolshoi Akademie in Moskau, Russland  
2010 – 2011    Iwanson in München: Erwerb des Tanzpädagogikdiploms

### Sprachkenntnisse

Deutsch, Englisch, Russisch, Italienisch, Lettisch, Norwegisch