

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II

Schwerpunkt Infektiologie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

Funktionelle Lücken zytotoxischer T-Zellen im Laufe einer HIV Infektion - Untersuchung der Zytokinproduktion und diverser Effektorfunktionen CD8+ T-Lymphozyten bei HIV-Infizierten in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung.

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Heike Brackmann

aus Würzburg

Würzburg, Mai 2009

Referent : Prof. Dr. H. Klinker

Medizinische Klinik und Poliklinik II

Universitätsklinikum Würzburg

Koreferent : Prof. Dr. A. Rethwilm

Institut für Virologie und Immunologie

der Universität Würzburg

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung :

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie der HIV-Infektion	1
1.2	Viruspathogenese.....	1
1.3	Immunantwort und Immunpathogenese.....	3
1.4	T-Zell-vermittelte Zytotoxizität.....	3
1.4.1	Sekretion von Interferon gamma (IFN γ), Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin 2 (IL-2) durch CD8+ T-Zellen	4
1.4.2	HIV-assoziierte Apoptose der T-Lymphozyten	5
1.4.3	Lytische Granula und ihre Hauptkomponenten Granzyme und Perforin .	6
1.5	Chronische Immunaktivierung als typisches Merkmal der HIV-Infektion	7
1.6	Proliferationsverhalten und verfrühte klonale Erschöpfung in Rahmen einer HIV-Infektion.....	8
1.7	Zielsetzung.....	9
2	Patienten, Materialien und Methoden.....	11
2.1	Patienten	11
2.2	Peptide	13
2.3	Antikörper	13
2.3.1	Antikörper für den INF γ -ELISpot	13
2.3.2	Antikörper für die Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS).....	13
2.3.3	Tetramere und Antikörper für die Tetramerfärbung.....	14
2.4	Zellbiologische Methoden	15
2.4.1	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut (PBMC) über einen Ficoll-Gradienten	15
2.4.2	Zellzahlbestimmung	15
2.4.3	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	16
2.5	Immunologische Methoden.....	17
2.5.1	INF γ -ELISpot	17
2.5.2	Durchflusszytometrie.....	18
2.5.3	Intrazelluläre Zytokin Färbung (ICS)	19
2.5.4	Tetramerfärbung	20
2.6	Statistische Methoden	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Screening der Patienten auf CD8+ T-Zellantworten mittels INF γ -Elispot.	22
3.2	Untersuchung HIV-spezifischer CD8+ T-Zellen auf die Produktion der Zytokine TNF α und IL-2	24

3.3	Untersuchung HIV-spezifischer CD8+T-Zellen auf Apoptoseanfälligkeit, Lysefähigkeit, Aktivierungsgrad und Proliferationsfähigkeit.....	28
4	Diskussion	38
4.1	Produktion der Zytokine INF γ , TNF α und IL-2 und deren Bedeutung für den Funktionsverlust zytotoxischer T-Lymphozyten.....	38
4.2	Charakterisierung zytotoxischer T-Zellen mittels Tetramerstaining zur Untersuchung HIV spezifischer CD8+ T-Lymphozyten.....	40
4.2.1	Vor- und Nachteile der Tetramerfärbung	41
4.2.2	Apoptoseanfälligkeit als mögliche Ursache für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf zwischen Controllers und Progressors	42
4.2.3	Verminderte zytolytische Fähigkeit CD8+ T-Zellen als Ursache für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf bei Progressors und Controllers...	43
4.2.4	Hyperaktivierung des Immunsystems als mögliche Ursache für das Fortschreiten der Infektion.....	44
4.2.5	Eingeschränkte Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten durch frühzeitige Zellalterung und Proliferationsverlust	46
5	Zusammenfassung.....	48
6	Abkürzungsverzeichnis	50
7	Literatur.....	52

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der HIV-Infektion

1983 konnten Luc Montagnier und seine Mitarbeiter am Louis-Pasteur-Institut in Paris ein Virus isolieren und identifizieren, mit dem heute mehr als 33 Mio. Menschen infiziert sind (UNAIDS. AIDS epidemic update, Dezember 2007). Bereits ein Jahr später wurde von Robert C. Gallo der Zusammenhang zwischen dem neu entdeckten Virus, welches seit 1986 als humanes Immunschwäche-Virus (human immunodeficiency virus, HIV) bekannt ist und zur Retrovirengruppe der Lentiviren gehört, und dem Immunschwächesyndrom (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) belegt [1]. Seither sind über 20 Jahre HIV-Forschung vergangen, in denen eine antiretrovirale Therapie entwickelt wurde und das Virus zu einem der best erforschten avanciert ist. Dennoch gibt es bis heute weder einen Impfstoff noch eine Therapie, die zur Heilung des Patienten führt, so dass AIDS in der Regel unweigerlich zum Tode führt. Die Zahl der Infizierten vor allem in Afrika, Asien und Osteuropa nimmt weiter zu. Weiterhin wurden alleine im vergangenen Jahr 2,5 Mio. Neuinfektionen und 2,1 Mio. Tote gezählt. Seit der Entdeckung des Virus sind bereits über 20 Mio. Menschen an AIDS gestorben. (UNAIDS. AIDS epidemic update, Dezember 2007)

1.2 Viruspathogenese

Eine Infektion mit HIV erfolgt durch die Übertragung von Körperflüssigkeiten von einer infizierten auf eine nicht infizierte Person. Das Virus befindet sich entweder intrazellulär in befallenen CD4+ T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen oder frei im Blut, in der Samenflüssigkeit, den Vaginalsekreten oder der Muttermilch [2]. Nach dem Eindringen in einen neuen Wirtsorganismus wird das Virus von dendritischen Zellen und Langerhanszellen in die primären Lymphorgane transportiert und an CD4+ T-Helferzellen durch Zell-Zell-Kontakt weitergegeben. Hiermit beginnt die akute Phase der HIV-Infektion, in der es zu einer massiven Virusproduktion durch aktivierte T-Zellen in den befallenen Lymphknoten kommt und der gesamte Körper von Virionen überschwemmt wird [1]. Während dieser Zeit kann ein sehr hoher Virustiter von bis zu 10^7 Viren/ml Blut bei Infizierten nachgewiesen werden und die Anzahl der

CD4+ T-Zellen kann vorübergehend stark abnehmen. Klinisch geht die Virämie mit einer grippeähnlichen Symptomatik und einer Lymphadenopathie einher, kann aber auch unbemerkt verlaufen. Bei allen Patienten ist diese akute Virämie mit der Entstehung von viruspezifischen CD8+ T-Zellen gekoppelt, welche HIV-infizierte Zellen eliminieren können. Erst im Anschluss daran kommt es zur Produktion von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV. Trotz einer starken Immunantwort entwickelt sich jedoch eine chronisch persistierende Infektion. An die akute Infektion schließt sich die asymptomatische Latenzphase an, in der jedoch kein vollständiger Stillstand der Virusreplikation vorliegt. Das Virus vermehrt sich kontinuierlich in geringen Mengen in den lymphatischen Organen und die Zahl der CD4+ T-Zellen nimmt leicht ab. Nach durchschnittlich 6-8 Jahren kommt es zur Progression der Erkrankung. Die Viruslast steigt stark an und die CD4-Zellzahl nimmt rasch ab, bis sie Werte unter 200 Zellen/ μ l erreicht. In dieser Situation ist die Abwehr opportunistischer Infektionen durch das geschwächte Immunsystem oft nicht mehr möglich. Das klinische Bild dieser Erkrankung wird unter dem Begriff AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) zusammengefasst und endet unbehandelt immer mit dem Tod [3]. Der Verlauf einer unbehandelten HIV-1-Infektion ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

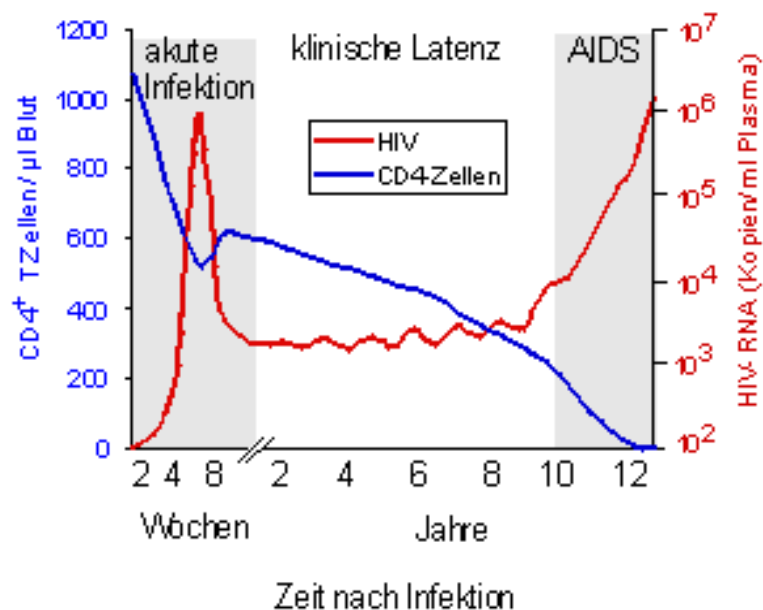


Abbildung 1: Der klinische Verlauf der unbehandelten HIV-Infektion [4]

1.3 Immunantwort und Immunpathogenese

Die unspezifische Immunantwort ist die erste Verteidigungsmöglichkeit des Organismus gegen eindringende Krankheitserreger. Sowohl lösliche (Zytokine, Chemokine, Komplementfaktoren, Mannose bindendes Lektin, Defensin) als auch zelluläre (Dendritische Zellen, Makrophagen, Natürliche Killerzellen, CD8+ T-Zellen ohne zytotoxische Aktivität) Faktoren tragen dazu bei, eine Infektion zu verhindern oder, falls das nicht gelingt, ausreichend Zeit für eine adäquate spezifische Immunantwort zu schaffen [5]. Im Falle der HIV- Infektion ist vor allem die adaptive, zelluläre Immunität von Bedeutung, um das Virus zu kontrollieren, wobei CD8+ T-Zellen die Hauptrolle zu spielen scheinen. Der beste Beweis für die schützende Funktion HIV spezifischer, zytotoxischer T-Lymphozyten wurde im Tiermodell der Rhesusaffen erbracht, in dem die Tiere durch Depletion der CD8+ T-Zellen zum Zeitpunkt der Infektion nicht mehr in der Lage waren, die Virämie zu kontrollieren [6, 7]. Bei HIV-1 infizierten Personen wurde bereits 1987 eine virusspezifische CD8+ T-Zellantwort nachgewiesen [8]. Seither wurde mehrfach ein Zusammenhang zwischen dem Erscheinen einer CD8+ T-Zellantwort und dem Abfall der Viruslast im Plasma im Rahmen der primären HIV Infektion [9, 10] oder einem günstigeren Krankheitsverlauf [11] nachgewiesen. Aufgrund der hohen Mutationsrate des HI-Virus innerhalb eines Wirtes entstehen im Laufe einer Infektion diverse Virusvarianten, sogenannte „Escape Mutanten“, welche einer Erkennung durch das Immunsystem des Wirts immer wieder entgehen können. Dies scheint einer der Gründe dafür zu sein, dass die Virusreplikation nicht dauerhaft und effektiv unterdrückt werden kann [12]. Außerdem wurden zahlreiche virale „Escape“-Mutationen in definierten CD8-Epitopen in der akuten HIV-Infektion beschrieben, was auf einen starken Immundruck durch spezifische CD8+ T-Zellantworten hinweist [13-15].

1.4 T-Zell-vermittelte Zytotoxizität

Der erste Schritt der erworbenen Immunantwort ist die Aktivierung naiver T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen. Dies geschieht durch dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Die Aktivierung der T-Zellen führt zur Proliferation, sowie zur Differenzierung zu Effektorzellen [2]. Naive CD8+ T-Zellen differenzieren zu

zytotoxischen T-Zellen [16]. Diese spielen eine wesentliche Rolle bei der Verteidigung des Wirts gegen Krankheitserreger, die im Zytosol leben – vor allem Viren. Befinden sie sich erst einmal im Inneren der Zelle, werden sie von Antikörpern nicht mehr erreicht. Sie können nur noch dadurch eliminiert werden, dass die infizierten Zellen, von denen sie abhängig sind, zerstört werden [2]. Zytotoxische T-Zellen erkennen virale Antigene, die an HLA(humanes Leukozytenantigen)-Klasse-I-Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Der so hergestellte Kontakt zu einer virusinfizierten Zielzelle löst Effektorfunktionen aktivierter CD8+ T-Zellen aus. Während die direkte Zerstörung HIV-infizierter Zellen mittels Zytolyse, ausgelöst durch die Freisetzung zytotoxischer Granula (Perforin/Granzyme) oder über Rezeptor-Liganden-Kontakt (fas/CD95-fasL/CD95-Ligand) (siehe Abschnitt 1.5), die Hauptfunktion zytotoxischer T-Zellen darstellt, spielt auch die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und anderen löslichen Faktoren eine bedeutende Rolle bei der Hemmung der Virusreplikation [17].

1.4.1 Sekretion von Interferon gamma (IFN γ), Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin 2 (IL-2) durch CD8+ T-Zellen

Erkennen zytotoxische T-Zellen ein virales Antigen auf der Oberfläche einer infizierten Zelle, so schütten sie Zytokine und Chemokine aus, die auf unterschiedliche Weise zur Verteidigung des Wirts beitragen können. IFN γ beispielsweise hemmt die virale Replikation und führt zu einer verstärkten Expression antiviral wirksamer Proteine, wie auch HLA-Klasse-I-Moleküle. Eine bessere Erkennung infizierter Zellen durch CD8+ T-Zellen ist so möglich. Zudem lockt die Sekretion von IFN γ Makrophagen zu den Infektionsherden und aktiviert diese, so dass sie als Effektor- oder Antigen-präsentierende Zellen fungieren können [2]. Bisher diente der Nachweis der IFN γ Produktion CD8+ T-Zellen auf einen spezifischen Stimulus hin als Nachweis für eine HIV-spezifische Immunantwort. Die Produktion von IFN γ HIV-spezifischer CD8+ T-Zellen lässt sich jedoch auch noch in weit fortgeschrittenen Krankheitsstadien nachweisen [18] und lässt sehr wahrscheinlich keine Aussage über die Effektivität zytotoxischer T-Zellen zu.

Neben $\text{INF}\gamma$ produzieren T-Lymphozyten auch $\text{TNF}\alpha$, ein potentes proinflammatorisches Zytokin, welches zudem von aktivierten Makrophagen, natürlichen Killerzellen und epithelialen Zellen exprimiert wird. Seine wichtigste Funktion ist es, die Aktivität verschiedener Immunzellen zu regulieren. $\text{TNF}\alpha$ kann die Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine anregen [19] und zusätzlich die virale Genexpression und Replikation hemmen [20].

IL-2 ist ebenfalls ein Produkt aktivierter T-Lymphozyten und ein wichtiger Regulator der T-Zellfunktion und -überlebensdauer. IL-2 induziert die Proliferation und Aktivierung CD4^+ und CD8^+ T-Zellen, potenziert die Zytotoxizität CD8^+ T-Lymphozyten und natürlicher Killerzellen und stimuliert die B-Zellfunktion. Somit spielt dieses Zytokin eine wesentliche Rolle bei der Eindämmung viraler Infektionen [21]. Bei HIV-Infizierten wurde bereits eine verminderte IL-2-Produktion von CD4^+ T-Zellen [22] aber auch CD8^+ T-Zellen [23] beschrieben, was ebenfalls zu dem Funktionsverlust HIV spezifischer Zellen beitragen könnte.

1.4.2 HIV-assozierte Apoptose der T-Lymphozyten

Die Apoptose ist eine sehr gut regulierte Form des Zelltodes, die eigentlich dazu dient, eine konstante Lymphozytenzahl aufrecht zu erhalten im Hinblick auf die stetige Erneuerung und Proliferation vorhandener Zellen und um übermäßige Immunreaktionen im Rahmen von Infektionen zu verhindern [24]. Viren wie HIV sind in der Lage, diese regulatorischen Mechanismen zu ihren Gunsten zu missbrauchen. Einiges deutet darauf hin, dass eine gesteigerte Apoptoserate lymphatischer Zellen im Rahmen einer HIV-Infektion eine große Bedeutung bei der Zerstörung des Immunsystems und somit beim Kontrollverlust über das HI-Virus hat. Neben der physiologisch gesteigerten Apoptoserate, als Folge des gesteigerten Zellumsatzes im Rahmen der chronischen Immunaktivierung bei HIV, hat dieses Virus diverse Strategien, um den programmierten Zelltod sowohl in infizierten als auch nichtinfizierten Zellen zu induzieren [24, 25]. Zu den bedeutendsten Mechanismen hierbei gehören die folgenden zwei Hauptpfade der Apoptose: „activation-induced cell death“ (AICD), der über den Rezeptor CD95 (Fas) und seinen Liganden vermittelt wird [26], und „activated T-cell autonomous death“ (ACAD), der mit Bcl-2 assoziiert ist [27].

Der Fas-Ligand (Fas-L/CD95-L) befindet sich in den Membranen von aktivierten zytotoxischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen und bindet an den Fas-Rezeptor (Fas/CD95) in der Membran der antigenpräsentierenden Zielzelle [28]. Dadurch werden Caspasen aktiviert, die den programmierten Zelltod auslösen. Das Fas/Fas-L System spielt nicht nur bei den antiviralen Wirtsmechanismen eine Rolle, sondern auch bei der Kontrolle der Immunantwort. Der Fas-Rezeptor wird zum einen von antigenpräsentierenden Zellen, aber auch von aktivierten Lymphozyten exprimiert, so dass sich aktivierte T-Zellen über diesen Apoptosepfad selbst eliminieren können und somit eine Überreaktion des Immunsystems verhindern können [29]. Im Rahmen einer HIV-Infektion werden Genprodukte kodiert, wie gp120, Nef und Tat, die sowohl zu einer gesteigerten Expression von CD95 als auch seines Liganden führen und somit eine gesteigerte Apoptoserate nach sich ziehen [24].

Der Pfad ACAD wird auch als intrinsischer Apoptosepfad bezeichnet und wird über intrazelluläre Sensoren, wie beispielsweise das Tumorsuppressorgen p53, initiiert. Es folgt die Zusammensetzung proapoptotischer Moleküle, welche zur Familie von bcl-2 gehören, und oligomerische Poren in der Mitochondrienmembran bilden. Das Resultat ist die Freisetzung proapoptotischer Substanzen, wie Cytochrom C, SMAC(second mitochondria-derived activator of caspase) und HtrA2/OMI in den zytoplasmatischen Raum, was wiederum mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials einhergeht und durch antiapoptotische Proteine wie bcl-2/bcl-XL geblockt werden kann [24]. Diverse Genprodukte, unter anderem kodiert in den Regionen Env, Vpr, Tat, des HIV Genoms, greifen in dieses System ein und führen zu einer eingeschränkten Produktion oder Funktion des antiapoptotischen Proteins bcl-2 und somit zu einer gesteigerten Apoptoserate in HIV-infizierten Individuen [24, 25].

1.4.3 Lytische Granula und ihre Hauptkomponenten Granzyme und Perforin

Die Wirkung einer zytotoxischen T-Zelle beruht vor allem darauf, dass sie calciumabhängig lytische Granula freisetzt, sobald sie auf der Zielzelle einen spezifischen Peptid-HLA-Komplex erkennt. Die Granula sind modifizierte Lysosomen, welche zytotoxische Effektorproteine enthalten. Eines davon, das Perforin, polymerisiert in der Membran der Zielzelle und bildet dadurch Poren, welche das

Eindringen von Granzymen, einer weiteren Gruppe von Effektorproteinen, ermöglichen. Vor allem Granzym B wurde in den Granula von Zellen mit zytotoxischer Aktivität nachgewiesen. Bei den Granzymen handelt es sich um Serinproteasen, die im Inneren der Zielzelle eine Enzymkaskade von Caspasen aktivieren und somit den programmierten Zelltod, die Apoptose initiieren [30]. Es gibt Studien, die zeigen, dass sowohl die Expression von Perforin als auch von Granzym B in Zellen, die ihre Proliferationsfähigkeit als Folge eines gesteigerten Zellumsatzes verloren haben, vermindert ist [31]. Dies könnte eine mögliche Ursache für den Funktionsverlust von CD8+ T-Zellen im Laufe einer chronischen Infektion sein [31].

1.5 Chronische Immunaktivierung als typisches Merkmal der HIV-Infektion

Die HIV-Infektion ist charakterisiert durch den fortschreitenden Abfall der CD4+ T-Zellen und eine chronische Überaktivierung des Immunsystems. Es wird vermutet, dass hier ein enger Zusammenhang besteht, da man mit zunehmender Viruslast gleichzeitig einen gesteigerten Zellumsatz und ein Abfallen der CD4-Zellzahl beobachtet hat [32]. Tatsächlich besteht sogar ein enger Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der T-Zell-Aktivierung und dem klinischen Verlauf einer HIV-Infektion. Der Nachweis einer erhöhten Immunaktivierung scheint ebenso wie die CD4-Zellzahl oder die Viruslast ein zuverlässiger, ja vielleicht sogar besserer prädiktiver Parameter über das Fortschreiten der HIV-Infektion in das Stadium AIDS zu sein [33]. Besonders interessant in diesem Zusammenhang sind HIV infizierte Schimpansen, die sich als einzige Spezies neben dem Menschen mit HIV infizieren lassen, jedoch nicht an AIDS erkranken. Bei ihnen lässt sich keine Überaktivierung der T-Lymphozyten nachweisen [34]. Scheinbar kommt es hierbei durch Nef Genprodukte zu einer verminderten Expression von TCR-CD3 (T-Zell Rezeptor CD3) und somit zu einer Verminderten T-Zell-Aktivierung. Diese Funktion ist wohl im Laufe der Virusevolution verloren und somit unter Umständen die erhöhte Pathogenität des Virus beim Menschen verursacht [35], [36]

Verschiedene Oberflächenproteine und Serumparameter, wie CD38, HLA-DR, CD25, CD69, CD70, Neopterin, Tumornekrosefaktor Rezeptor-Typ II und β_2 -Mikroglobulin, werden zur Quantifizierung der T-Zell-Aktivierung herangezogen. Als aussagekräftigster Parameter unter den Aktivierungsmarkern gilt die Expression von

CD38. Dabei handelt es sich um ein multifunktionales transmembranes Glykoprotein, dessen Expression schon in den frühesten Stadien der T-Zell-Aktivierung gesteigert ist. Physiologisch ist die Expression von CD38 assoziiert mit vermehrten Zell-Zell-Kontakten, einer gesteigerten Zytokinproduktion und einer beschleunigten CD4+ T-Zell-Proliferation [32]. Man findet diesen Marker bei HIV-negativen Individuen vor allem auf der Oberfläche naiver T-Lymphozyten, während im Rahmen einer HIV-Infektion vor allem CD8+ Memory-T-Zellen CD38 exprimieren [37]. Die Höhe der Expression von CD38 auf CD8+ T-Zellen generell korreliert stark mit der Viruslast und lässt vermuten, dass CD38 als Aktivierungsmarker auch ein Indikator der fortlaufenden Virusreplikation sein kann [37].

Allerdings sollte man nicht vergessen, dass eine Immunaktivierung Grundlage einer jeden gesunden Immunantwort ist. Abzugrenzen hiervon ist jedoch die übermäßige Immunaktivierung im Rahmen einer HIV-Infektion. Ihr wird eine prognostische Bedeutung im Bezug auf die Entwicklung von AIDS und dem Verlust der CD4+ T-Zellen zugesprochen [33, 38]. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass HIV eine beschleunigte Proliferation, Expansion und einen verfrühten Zelltod der T-Lymphozyten nach sich zieht. Der erhöhte Zellumsatz, aufgrund einer unkontrollierten Aktivierung, könnte zu einer Erschöpfung der regenerativen Fähigkeiten des Immunsystems führen und auf diesem Wege eine Abnahme der Zellzahl und Funktionsfähigkeit verursachen [39, 40].

1.6 Proliferationsverhalten und verfrühte klonale Erschöpfung in Rahmen einer HIV-Infektion

Eine chronische Aktivierung von T-Zellen, wie man sie im Rahmen einer HIV-Infektion findet, kann zur Entstehung HIV-spezifischer, CD8+ T-Zellen führen, die zwar in der Lage sind, Zytokine wie $\text{INF}\gamma$ (Interferon gamma) zu produzieren, aber unfähig sind, sich weiter zu teilen [41]. Der Verlust der Proliferationsfähigkeit stellt das Stadium der sog. „replikative senescence“ dar und kann eventuell Folge einer andauernden Antigenstimulation sein [42]. Als besonderes Merkmal dieses Stadiums gelten stark verkürzte Telomere.

Als Telomere bezeichnet man die genetischen Sequenzen an den Enden der Chromosomen, welche von großer Bedeutung für die Stabilität der Chromosomen sind. Bei jeder durchlaufenen Zellteilung werden die Telomere verkürzt, bis keine weitere Zellteilung mehr möglich ist. Sie dienen somit auch als Schutzmechanismus gegen unlimitiertes Wachstum [43]. Es gibt einzelne Berichte, dass HIV-infizierte Personen, CD8⁺ T-Zellen mit reduzierter proliferativer Kapazität und verkürzten Telomeren besitzen, möglicherweise als Folge einer chronischen Immunaktivierung und verfrühten klonalen Erschöpfung [44]. Der genaue Phänotyp solcher Zellen ist noch nicht sicher identifiziert, jedoch findet man gehäuft eine Expression von CD57 auf der Zelloberfläche [41]. Weiterhin kann das Kernantigen Ki67 als Proliferationsmarker verwendet werden, da es nur von Zellen exprimiert wird, die sich im Replikationszyklus befinden [33]. Ein inadäquates Proliferationsverhalten HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen könnte ebenfalls eine Ursache für den Kontrollverlust des Immunsystems über das HI-Virus sein.

1.7 Zielsetzung

HIV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten spielen eine bedeutende Rolle in der Immunantwort gegen HIV-1 und der Kontrolle der Virämie. Trotz allem kommt es jedoch im Verlauf der Infektion bei den meisten Betroffenen zum Anstieg der Viruslast, zum Abfall der CD4-Zellzahl und zum Ausbruch von AIDS, obwohl auch in diesem fortgeschrittenen Stadium der Infektion CD8⁺ T-Zellantworten mittels INF- γ -Produktion nachgewiesen werden können [18, 45-47]. Einen statistisch signifikanten Unterschied der INF γ -Produktion durch CD8⁺ T-Zellen bei HIV-Infizierten, die in der Erkrankung fortschreiten, und solchen, die das Virus über Jahre hinweg spontan kontrollieren, ließ sich nicht nachweisen [47]. Es ist also davon auszugehen, dass CD8⁺ T-Zellen im fortgeschrittenen, chronischen Stadium der Infektion funktionelle Lücken aufweisen, die sich nicht durch INF γ -basierte Untersuchungsmethoden nachweisen oder durch „Escape“ Mechanismen erklären lassen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, weitere Effektorfunktionen CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen. Wir haben HIV-spezifische CD8⁺ T-Zellen von 28 Patienten mit einer HIV- Infektion auf deren Fähigkeit, weitere Zytokine zu synthetisieren (TNF α und IL-

2), untersucht. Weiterhin haben wir unser Augenmerk auf die Effektorfunktion Zytolyse (mittels Perforin und Granzyme B), die Proliferationsfähigkeit (mittels CD57 und Ki67), den Aktivierungszustand (mittels CD38 und HLA-DR) und die Empfänglichkeit für Apoptose (mittels bcl-2 und CD95) gelegt. Die publizierten Studien zu Immunaktivierung, Apoptose und Proliferationsgeschichte beschränken sich zur Zeit der Durchführung dieser Arbeit auf die Gesamtheit der CD4+ und CD8+ Zellen. Viel wichtiger für eine konkrete Beurteilung im Verlauf einer HIV-Infektion scheint jedoch die Untersuchung HIV spezifischer, CD8+ T-Zellen Zellen, was in der chronischen, fortschreitenden Infektion bisher noch nicht geschehen ist. Um eine bessere Aussage treffen zu können, wurde zum Vergleich eine Gruppe aus sechs HIV Infizierten untersucht, die ohne antiretrovirale Therapie in der Lage sind, die Virämie zu kontrollieren.

2 Patienten, Materialien und Methoden

2.1 Patienten

Für die vorliegende Studie wurden 28 HIV-infizierte Patienten des Massachusetts General Hospital (MGH) und des Lemuel Shattuck Hospital in Boston, Massachusetts/USA untersucht. 22 von ihnen befanden sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Infektion und wurden zur Kohorte der Progressors gezählt. Als Kontrollgruppe wurden sechs Patienten mit asymptomatischer HIV-1 Infektion, sogenannte Controllers, in die Studie mit einbezogen, deren Viruslast über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren ohne antiretrovirale Therapie unter 10000 RNA-Kopien/ml lag und deren CD4-Zellzahl nicht abfiel (klinisch relevante Daten sind Tabelle 1 zu entnehmen). Für die Kohorte der Progressors musste mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt sein. Viruslast > 45000 RNA-Kopien/ml (Roche Amplicor Assay Version 1.0), CD4-Zellzahl < 350/ μ l oder das Auftreten einer opportunistischen Infektion als eindeutiges Kriterium für das Stadium AIDS. Die Obergrenze der Viruslast lag Assay-bedingt am Lemuel Shattuck Hospital bei >500000 RNA-Kopien/ml und am MGH bei >750000 RNA-Kopien/ml. Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme waren alle in diese Kohorte eingeschlossenen Patienten für mindestens 3 Monate unbehandelt, hatten also keine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) erhalten.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission des Massachusetts General Hospital und des Lamuel Shattuk Hospital genehmigt. Alle beteiligten Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme.

	ID	VL	CD4	HLA A	HLA B	HLA C	Tetramer
C (Controller)	C1	8130	559	02;68	57;-	06;07	A2 SI9 B57 KF11
	C2	4970	709	01;24	13;57	06;-	B57 KF11
	C3	1190	468	03;-	08;18	06;07	B8 EI8 B8 FL8
	C4	49	837	02;30	44;57	05;18	B57 KF11
	C5	1290	945	02;74	44;53	04;07	B8 FL8
	C6	1210	602	02 ;-	14;40	03;08	A2 SL9
	ID	VL	CD4	HLA A	HLA B	HLA C	Tetramer
PI (Progressor Gruppe I)	P1	12900	12	0301 ;0201	35 ;44	0401;0704	A2 SL9 A3 QK10
	P2	7670	992	0101 ;0301	5101 ;5701	0602 ;1502	B57 KF11
	P3	43000	162	0201;33	35;57	04;07	A2 SL9 B57 KF11
	P4	45700	571	26;30	18;38	05;12	A2 SL9
	P5	48700	400	03;25	42;5701	03;-	A3 QK10
	P6	49900	320	01;68	08;57	07;18	B8 EI8 B8 FL8
PII (Progressor Gruppe II)	P7	58000	460	0201;24	15;52	03;12	A2 SL9
	P8	67600	447	0201;3	4001;51	01;03	A3 QK10
	P9	83400	316	01;32	08;18	07;-	B8 EI8 B8 FL8
	P10	94500	592	01;24	08;18	07;12	B8 EI8 B8 FL8
	P11	138000	182	0201;24	18;35	02;04	A2 SL9
	P12	160000	60	01;-	0801;5701	06;07	B8 FL8
	P13	173000	151	01;03	07;-	07;-	A3 QK10
PIII (Progressor Gruppe III)	P14	225000	414	02;11	35;44	04;05	A2 SL9
	P15	269000	220	0201;68	07;44	0704;0702	A2 SL9
	P16	278000	58	01;02	18;2703	02;12	A2 SL9
	P17	287000	231	0201;11	3502;4001	03;04	A2 SL9
	P18	292000	129	0201;26	0802;44	07;05	B8 EI8 B8 FL8
	P19	376000	3	02;26	44;45	05;06	A2 SL9
PIV (Progressor Gruppe IV)	P20	500001	17	0201;24	18;3501	04;07	A2SL9
	P21	565000	282	03;26	07;44	05;07	A3QK10
	P22	750001	24	01;03	07;5701	06;07	B57KF11

Tabelle 1: Klinisch relevante Patientendaten der Controllers (C) und der Progressors (PI-PIV)
(ID: Identifikation der Patienten; VL: Viruslast; HLA: Humanes Leukozytenantigen)

2.2 Peptide

Die von uns zur Stimulierung von PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) verwendeten synthetischen Peptide waren zwischen 16 und 19 Aminosäuren lang und überlappten um 10 Aminosäuren. Die insgesamt 410 Peptide deckten alle von HIV exprimierte Proteine (Gag, Nef, Rev, Tat, Vpu, Vpr, Pol, Env und Vif) ab und wurden entsprechend der Consensus-Sequenz Stamm B 2001 [35, 36] hergestellt. Ihre Synthese erfolgte mit Hilfe eines automatischen Peptidsynthesizers (MBS 396; Advanced Chemtech, Louisville, Ky.) unter der Verwendung der Fluorenylmethoxycarbonyl-Methode.

Um Immunantworten gegen einzelne Epitope nachzuweisen, wurde zunächst eine Matrix eingesetzt, die verschiedene Peptidpools enthielt. Jedes einzelne Peptid war hierbei immer in zwei verschiedenen Pools vertreten. Bei sich überschneidenden positiven Ergebnissen konnte in einem zweiten Elispotversuch gezielt die Immunantwort gegen ein einzelnes Peptid bestätigt werden [47].

2.3 Antikörper

2.3.1 Antikörper für den $\text{INF}\gamma$ -ELISpot

Antikörper $\text{INF}\gamma$ -ELISpot	Firma
1. Anti-human $\text{IFN-}\gamma$	MABTECH AB
2. Biotin (Anti-human $\text{IFN-}\gamma$)	MABTECH AB
3. Streptavidin-ALP-PG	MABTECH AB

Tabelle 2: Antikörper $\text{INF}\gamma$ -ELISpot

2.3.2 Antikörper für die Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS)

Oberflächenantikörper	Markierung	Firma
Anti human CD8	PerCP	BD Bioscience

Tabelle 3: Oberflächenantikörper

Intrazelluläre Antikörper	Markierung	Firma
Anti-Human INF γ	APC	BD Pharmingen
Anti-Human TNF α	FITC	BD Pharmingen
Anti-Human IL-2	PE	BD Pharmingen

Tabelle 4: Intrazelluläre Antikörper

2.3.3 Tetramere und Antikörper für die Tetramerfärbung

Class I iTagTM MHC Tetramers	BECKMAN COULTER
B8 EI8	HLA-B*0801-APC
B8 FL8	HLA-B*0801-APC
B57 KF11	HLA-B*0801-APC
A2 SL9	HLA-A*0201-APC
A3QK10	HLA-A*0201-APC

Tabelle 5: Tetramere

Antikörper für Oberflächenfärbung	Markierung	Firma
Anti human CD8	PerCP	BD
Anti human CD38	PE	BD Pharmingen
Anti human CD57	FITC	BD Pharmingen
Anti human CD95	PE	Pharmingen
Anti-HLA-DR	PE	Becton Dickinson

Tabelle 6: Oberflächenantikörper Tetramerfärbung

Antikörper für intrazelluläre Färbung	Markierung	Firma
Anti human Perforin	FITC	Pharmingen
Anti human Ki67	FITC	BD Pharmingen
Anti human Granzyme B	PE	Caltag Laboratories
Anti human Bcl-2	FITC	Caltag Laboratories

Tabelle 7: Intrazelluläre Antikörper Tetramerfärbung

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut (PBMC) über einen Ficoll-Gradienten

Mit Hilfe des Ficoll-Gradienten wurden PBMC aus dem Blut von HIV infizierten Patienten isoliert. Dazu wurde EDTA-Blut gleichmäßig in etwa 15ml Portionen auf 50ml Zentrifugenröhrchen verteilt und 1:1 mit raumtemperierten Medium verdünnt. Hierfür wurde R10 Medium verwendet. Anschließend wurde das verdünnte Blut vorsichtig mit Ficoll (Histopaque-1077, SIGMA) unterschichtet und für 30 Min bei 1500 rpm (Raumtemperatur, 120s Anlaufzeit, ohne Bremse) zentrifugiert.

Nach der Ficoll-Histopaque-Zentrifugation entstand folgende Verteilung: Aufgrund der höheren Dichte sammelten sich Erythrozyten und Granulozyten am Grund des Zentrifugenröhrchens. Als zweite Lage folgte die Ficollschicht. Die weniger dichten mononukleären Zellen wie Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten), NK-Zellen und Monozyten sammelten sich oberhalb der Ficollschicht und unterhalb des Mediums und konnten abgesaugt werden.

Das abgesaugte Gemisch aus PBMC, Medium und Ficoll wurde mit Medium verdünnt und danach für 10 min bei 1500 rpm (Raumtemperatur, mit Bremse) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in ausreichend Medium resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde noch weitere zwei Mal wiederholt.

Das zuletzt erhaltene Zellpellet wurde in R10 Medium resuspendiert. Die Zellen konnten dann gezählt werden und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt werden.

2.4.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines Plastik-Hemocytometer. Dafür wurden die Zellen gut resuspendiert und ein Aliquot davon in einem geeigneten Verhältnis mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Cellgro Mediatech Inc.) und Trypanblau (0,4% Lösung, Cellgro Mediatech Inc.) verdünnt (in der Regel eine Verdünnung um den Faktor 10, 50 oder 100). Da nur tote Zellen durch Trypanblau

angefärbt werden, ermöglichte diese Färbung die Bestimmung der Zelldichte, sowie der Vitalität der Zellen.

Jede Zählkammer enthielt neun Großquadranten, die wiederum alle in weitere neun Quadranten unterteilt waren. Zur Zelldichtebestimmung wurden jeweils zwei Großquadranten gezählt. Die dabei erhaltene Zellzahl N wurde mit dem Maß der Verdünnung V multipliziert und durch die Anzahl der gezählten Quadranten Q geteilt. Dabei erhielt man die Anzahl der Zellen $\times 10^4$ /ml. Die Formel lautete also:

$$\text{PBMC/ml} = N \times V/Q \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

2.4.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden zunächst gezählt und anschließend bei 1500rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ausreichend Lösung vorbereitet, in welche die Zellen vor dem Einfrieren aufgenommen wurden. Diese bestand aus FCS (Fetal Bovine Serum, SIGMA) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid (CH₃)₂SO, Fisher Biotech). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in einem kleinen Volumen resuspendiert. Anschließend wurde die Einfrierlösung langsam hinzu pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden mit jeweils 1ml der Suspension befüllt und tiefgefroren. Anschließend konnten die Zellen in Flüssigstickstoff bei -190°C beliebig lange gelagert werden. Ein Röhrchen enthielt in der Regel zwischen 10 und 20 Millionen Zellen.

Um kryokonservierte Zellen wieder für Experimente zu verwenden, wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad oder in der Hand kurz aufgetaut und sofort zweimal mit Medium (R10) gewaschen.

Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO zytotoxisch ist, wurden die Zellen stets zügig bearbeitet. Dies galt sowohl für das Einfrieren, als auch für das Auftauen.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 INF γ -ELISpot

Zur Detektion HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zell-Immunantworten wurde ein INF- γ -Elispot verwendet. Hierbei wurden frische oder am Vortag aufgetaute PBMC HIV infizierter Patienten durch Zugabe der zuvor bereits beschriebenen Peptide stimuliert. Dabei produziertes INF γ wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper auf einer Membran gebunden und konnte im weiteren Verlauf durch Anfärben sichtbar gemacht werden.

Hierzu musste zunächst am Vortag eine 96-well-Elispotplatte mit INF- γ -Antikörper (Anti-Human mAb 1-DK1) beschichtet werden. Pro Platte wurden 5 μ l Antikörper und 10ml steriles DPBS mit einer Multikanalpipette aufgetragen. Anschließend wurde diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte vor Gebrauch sechsmal mit 1% FCS haltigem DPBS gewaschen und jedes Well mit 30 μ l R10 (RPMI 1640 mit 10% FCS) befüllt. Danach wurden jeweils 10 μ l der einzelnen Peptidpools oder Peptide (Konzentration 200 μ g/ml) dazu pipettiert. Als letztes wurden dann zwischen 0,5 und 1x10⁵ PBMC pro Well hinzu gegeben. Es folgte eine 14- bis 16-stündige Inkubationsphase bei 37°C und 5%CO₂.

Als Negativkontrolle wurden PBMC ohne Zugabe stimulierender Peptide und als Positivkontrolle PBMC mit Phytohemagglutinin (PAH) inkubiert.

Am dritten Tag wurde der Elispot entwickelt. Dazu wurden die Platten zunächst erneut sechsmal mit DPBS gewaschen. Das produzierte INF- γ haftete nun an der Membran, gebunden an den ersten Antikörper. Als nächstes wurde dann 5 μ l des zweiten anti-INF γ -Antikörpers (anti-humanes INF- γ mAb 7 B6-1-Biotin) in 10ml DPBS verdünnt und mit Hilfe einer Multikanalpipette auf die Platte aufgetragen. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut sechsmal gewaschen und es wurden 5 μ l Streptavidin in 10ml DPBS zur Platte dazugegeben. Die Platten wurden damit für 45min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang mit DPBS wurden die Platten gefärbt. Dazu wurden pro Platte von den beiden Farbreagenzien jeweils 100 μ l NBT (Nitroblau Tetrazolium) und BCIP (Bromochloroindolyl-Phosphat) in 10ml TRIS-Puffer (pH 9,5) verdünnt und mit einer Multikanalpipette aufgetragen. Bereits nach wenigen Minuten wurden einzelne

dunkle Punkte sichtbar. Das endgültige Ergebnis konnte nach ca. 20min abgelesen werden.

Anschließend wurden die Platten mit 0,05% Tween20 (Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonolaurat, Fisher Biotech) in DPBS desinfiziert und der Färbungsprozess durch Waschen der Platten unter fließendem Leitungswasser unterbrochen. Vor der Auswertung mussten die Platten getrocknet werden.

Die IFN- γ Produktion wurde mit Hilfe eines Elispotplattenlesegeräts direkt visualisiert und gezählt und in Form von SFC (spot forming cells) pro 1×10^6 eingesetzte Zellen ausgedrückt.

Die Negativkontrollen lagen immer bei < 30 SFC pro 1×10^6 eingesetzte Zellen. Ein Well wurde dann als positiv gewertet wenn mindestens 50 SFC/ 1×10^6 PBMC gezählt wurden und dieser Wert mindestens dreimal höher als der Hintergrundwert war. Als obere Grenze hatten wir 200 Punkte pro Well gesetzt, da ein Zählen darüber hinaus nicht mehr reproduzierbar war.

2.5.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) konnten wir die Expression bestimmter Antigene auf zellulärer Ebene analysieren. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die sich an das gesuchte Antigen anlagerten.

2.5.3 Intrazelluläre Zytokin Färbung (ICS)

Um die Zytokinproduktion CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, verwendeten wir die Methode der intrazellulären Färbung. Wir untersuchten die INF γ -, TNF α - und IL2-Produktion. Indem wir die Zellen für alle drei Zytokine in demselben Ansatz färbten, war im weiteren Verlauf eine Aussage darüber möglich, ob die CD8⁺ T-Zellen des jeweiligen Patienten nur ein bestimmtes Zytokin oder mehrere zur gleichen Zeit produzierten.

Für diesen Versuch wurden sowohl frische als auch am Vortag aufgetaute Zellen verwendet, die in R10-Medium aufgenommen wurden.

Die zu untersuchenden PBMC wurden in einem Volumen von 1ml in die FACS-Röhrchen gegeben. Die ideale Zellzahl hierbei betrug 1-2 Millionen Zellen pro FACS-Röhrchen. Dazu wurden dann 20 μ l Peptid (Konzentration 200 μ l/ml) pipettiert. Als kostimulatorische Faktoren wurden noch jeweils 1 μ l CD28 und CD49d (Konzentration 1 μ g/ml) dazugegeben. Daraufhin wurden die PBMC für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ (Kohlendioxid) inkubiert. Anschließend wurde Brefeldin A dazugegeben, um die Zytokinsekretion zu hemmen. Darauf folgt eine sechsstündige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1% FCS haltigem DPBS gewaschen und dabei jeweils 10min bei 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet.

Als erster Antikörper wurden daraufhin der Oberflächenantikörper anti-CD8-PerCP (5 μ l) dazu gegeben. Zellen und Antikörper wurden für 30min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschgang mit 1% FCS haltigem DPBS wurden die Zellen mit jeweils 100 μ l Fix/Perm Solution A (Caltag) fixiert. Die FACS-Röhrchen wurden daraufhin zur Inkubation über Nacht im Kühlraum aufbewahrt.

Am zweiten Tag wurden die Zellen erneut mit 1% FCS haltigem DPBS gewaschen und für 10min bei 1700rpm und 4°C zentrifugiert. Ab hier sollten möglichst alle Waschschrte bei 4°C ablaufen.

Um die Zellen permeabel zu machen, wurden sie für 15min mit jeweils 100 μ l Fix/Perm Solution B (Caltag) bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Pro FACS-Röhrchen wurden 7 μ l IFN- γ -APC, 10 μ l TNF- α -FITC und 15 μ l IL2-PE dazupipettiert. Nach weiteren 30min bei 4°C wurden die Zellen noch zweimal mit 1% FCS haltigem DPBS gewaschen und in DPBS resuspendiert.

Als Negativkontrolle diente ein Röhrchen mit der gleichen Anzahl PBMC, welches kein Peptid erhielt, ansonsten jedoch gleich prozessiert wurde. Somit ließ sich eine falsch positive Zytokinproduktion ausschließen.

Es erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung am FACS-Calibur. Anschließend konnten die erhobenen Daten mit Hilfe der entsprechenden Software (Cellquest) bearbeitet und gesichert werden.

2.5.4 Tetramerfärbung

T-Zellen erkennen Antigene, die an HLA-Molekülen auf der Oberfläche einer Zielzelle gebunden sind. Diese Erkennung durch den T-Zellrezeptor ist spezifisch für das präsentierte Epitop und ein bestimmtes HLA-Allel eines Individuums. Die Tetramerfärbung macht sich dies zu Nutze und ermöglicht eine hoch sensible und spezifische Identifizierung antigenspezifischer Zellen durch deren Bindung an lösliche Peptid-HLA-Komplexe, die mit einem entsprechenden Farbstoff (Streptavidin) gekoppelt sind. Da monomerische Komplexe erfahrungsgemäß nur schwach binden, werden in der Regel Tetramere verwendet.

Bei der Verwendung dieser Methode in unserem Experiment wurden die zu untersuchenden PBMCs eines Patienten auf fünf FACS-Röhrchen verteilt (ca. 1 Mio. Zellen/Röhrchen) und einmal mit 1%FCS haltigem DPBS gewaschen, anschließend bei 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Als Negativkontrolle enthielt ein Röhrchen nur den CD8-Oberflächenantikörper und kein Tetramer. Dann wurden je 2 µl des jeweiligen Tetramers (abhängig vom HLA-Typ des Patienten und dem zu untersuchenden Epitop) in die einzelnen Röhrchen gegeben und für 30 min. mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden erneut in DPBS/1%FCS gewaschen. Als nächster Schritt wurden die Oberflächenantikörper (CD8-PerCP, CD57-FITC, HLA-DR-PE, CD38-PE, CD95-PE) dazu gegeben. Es folgte eine Inkubation von weiteren 30 min. bei 4°C. Die Zellen wurden erneut mit 1% FCS/DPBS gewaschen und mit je 100µl Fix/Perm A zur Fixation mindestens 15 min bei Raumtemperatur oder 4°C inkubiert.

1	2	3	4	5
Negativkontrolle ohne Tetramer				
	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Granzyme-B-PE (GB)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Perforin-FITC	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Class I iTAg TM MHC Tetramere	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
HLA-DR-PE	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Ki67-FITC	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Class I iTAg TM MHC Tetramere	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
CD38-PE	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
CD57-FITC	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Class I iTAg TM MHC Tetramere	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
CD95-PE	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Bcl2-FITC	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Class I iTAg TM MHC Tetramere	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Abbildung 2: Pipettierungsmuster der Tetramerfärbung

Nach einem weiteren Waschgang mit 1% FCS/DPBS wurden pro Röhrchen 100µl Fix/Perm B dazugefügt und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die anschließende 30-minütige Inkubation mit den intrazellulären Antikörpern bei 4°C folgte eine zweimalige Waschung mit 1%FCS/DPBS, sowie die Auswertung am FACS-Calibur. Die Verteilung der extra- und intrazellulären Antikörper auf die einzelnen FACS-Ansätze geht aus Abb. 2 hervor.

2.6 Statistische Methoden

Die Auswertung, Analyse und graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism 3.0. Für den Vergleich der untersuchten Patientengruppen miteinander wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Zur Untersuchung einer möglicherweise bestehenden Korrelation der erhobenen Daten zu Viruslast beziehungsweise CD4-Zellzahl diente die lineare Regressionsanalyse.

3 Ergebnisse

3.1 Screening der Patienten auf CD8+ T-Zellantworten mittels INF γ -Elispot

HIV-spezifische, INF γ positive CD8+ T-Zellantworten sind stark und breit gefächert in Patienten mit fortgeschrittener HIV-Infektion.

Untersucht wurden 22 HIV-infizierte Patienten, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium ihrer Erkrankung befanden und die Viruslast im Blut nicht unterdrücken konnten. Diese wurden mit zunehmender Viruslast in vier Untergruppen (Progressors; PI-PIV in Tabelle 1) aufgeteilt. Die mittlere Viruslast der Progressors aller vier Gruppen lag bei 205653 Kopien/ml (variierte von 7670 bis 750001 Kopien/ml); die mittlere CD4 Zahl war 275/ μ l (variierte von 3 bis 992 / μ l). Mittels INF γ Elispot wurden, unter Verwendung eines Peptidsets, das alle von HIV exprimierten Proteine abdeckte, sowohl Breite als auch Höhe der CD8+ T-Zellantworten untersucht (siehe Abbildung 3). In allen untersuchten HIV-Infizierten ließen sich zelluläre Immunantworten gegen mindestens zwei verschiedene immunogene Regionen nachweisen, wobei die genetischen Regionen des HI-Virus Gag, Pol, Nef und Env am häufigsten eine CD8+ T-Zellantwort hervorriefen (siehe Abbildung 3). Die schwächsten CD8+ T-Zellantworten wurden in Patient P1, mit einer Viruslast von nur 12900 und einer CD4-Zellzahl von 12 nachgewiesen. Bei ihm wurden nur drei CD8+ T-Zellantworten mit einer Gesamtstärke von 710 SFC/10⁶ PBMC. Breite oder Stärke der CD8+ T-Zellantworten variierten stark und auch nach gründlicher Auswertung ließ sich kein Zusammenhang zur Viruslast oder CD4-Zellzahl herstellen (Daten hierzu bereits veröffentlicht [18]). Zum Beispiel zeigte der Untersuchte P16 (VL: 278000 Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 58/ μ l) eine deutlich stärkere zelluläre Immunantwort als P2 (VL: 7670 Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 992/ μ l). Als wir nun die CD8+ T-Zellantworten dieser Patienten mit denen einer Gruppe aus Long Term Non Progressors verglichen, so ließ sich weder in der Stärke noch in der Breite der Antworten ein signifikanter Unterschied feststellen (Daten hierzu bereits veröffentlicht [47]). Die INF γ Produktion der CD8+ T-Zellen schien also keine Aussage über die Wirksamkeit dieser Immunantworten zu machen. Es stellte sich also die Frage, worin sich diese beiden Patientengruppen dennoch unterscheiden.

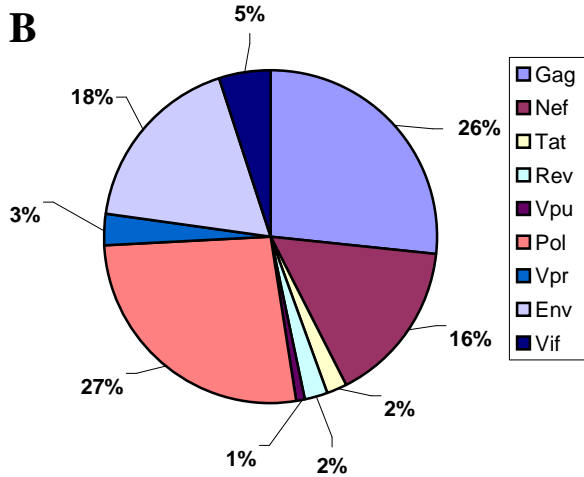
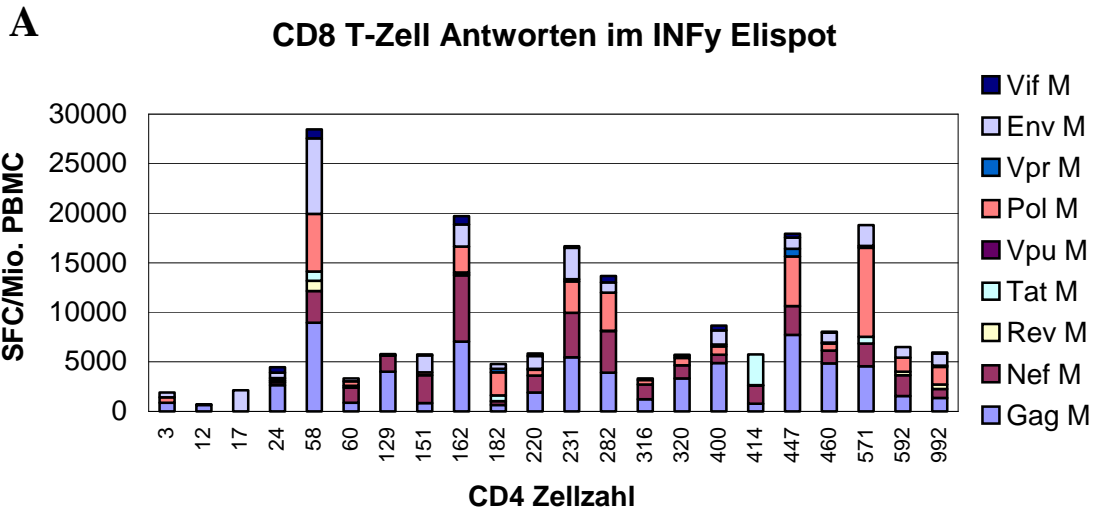


Abbildung 3: CD8 T-Zell Antworten im INFy Elispot

(A) Gesamtheit der CD8+ T-Zellantworten gemessen mittels INF-y Elispot für jedes HIV Protein und jeden der 22 Progressors in Verbindung mit der jeweiligen CD4-Zellzahl. (B) Prozentualer Anteil eines einzelnen HIV-Proteins an der gesamten Breite der HIV-spezifischen CD8+ T-Zellantworten aller untersuchten Personen.

3.2 Untersuchung HIV-spezifischer CD8+ T-Zellen auf die Produktion der Zytokine TNF α und IL-2

Die Mehrzahl der antigenspezifischen Zellen hat die Fähigkeit, zusätzlich zu INF γ auch TNF α zu produzieren.

Alle Peptide, die im Elispot (siehe 3.1) eine Immunantwort > 350 SFC/Mio. PBMC hervorriefen, dienten der anschließenden Stimulation der CD8+ T-Zellen in der ICS.

In diesem Experiment wurden nur 26 Patienten untersucht, da von P3 und P18 nicht genügend Zellen vorhanden waren. Bei den Versuchen stellte sich heraus, dass zusätzlich zur INF γ Produktion, die bei den HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden konnte, alle CD8+ T-Zellen auch TNF α produzierten und diese Fähigkeit, trotz weit fortgeschrittener Infektion, nicht verloren. Durchschnittlich ließ sich in 53% (6-71%) der CD8+ T-Lymphozyten, die INF γ produzierten, zusätzlich eine TNF α Produktion nachweisen (Abbildung 4A). Siehe hierzu mit Progressor P9 ein typisches Patientenbeispiel in Abbildung 5. Die Ausnahme bildeten zwei Versuchspersonen aus der Gruppe der Progressors, bei denen nur eine geringe TNF α Produktion, mit 12% bei P1 und 6% bei P8 (siehe Abbildung 4A und Abbildung 6), nachgewiesen werden k. Dabei handelte es sich jedoch nicht um Patienten mit der höchsten Viruslast oder der geringsten CD4-Zellzahl (siehe Tabelle 1). Ein Beispiel dafür, dass sich keine Korrelation zwischen TNF α Produktion und CD4-Zellzahl ($R^2=0,0017$; $p=0,8616$) oder Viruslast ($R^2=0,0333$; $p=0,4416$) finden ließ, ist Patient P19, bei dem sich, trotz niedrigster CD4-Zellzahl von 3/ μ l in, 58% der INF γ positiven Zellen TNF α nachweisen ließ. Auch bei P22, mit der höchsten Viruslast von >750000/ml, ließ sich in 55% der INF γ positiven Zellen TNF α nachweisen (siehe Abbildung 4B und C).

In der Vergleichsgruppe, bestehend aus sechs Controllern, fand sich das gleiche Ergebnis. Auch hier ließ sich in den CD8+ T-Zellen aller Versuchspersonen, zusätzlich zu INF γ auch TNF α nachweisen. Der Durchschnittswert lag bei 58% (Verteilung: 24-78%) für den Anteil TNF α produzierender Zellen von den INF γ positiven Zellen (siehe Abbildung 4A). Auch hier ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu Viruslast und CD4-Zellzahl ermitteln (siehe Abbildung 4B und C).

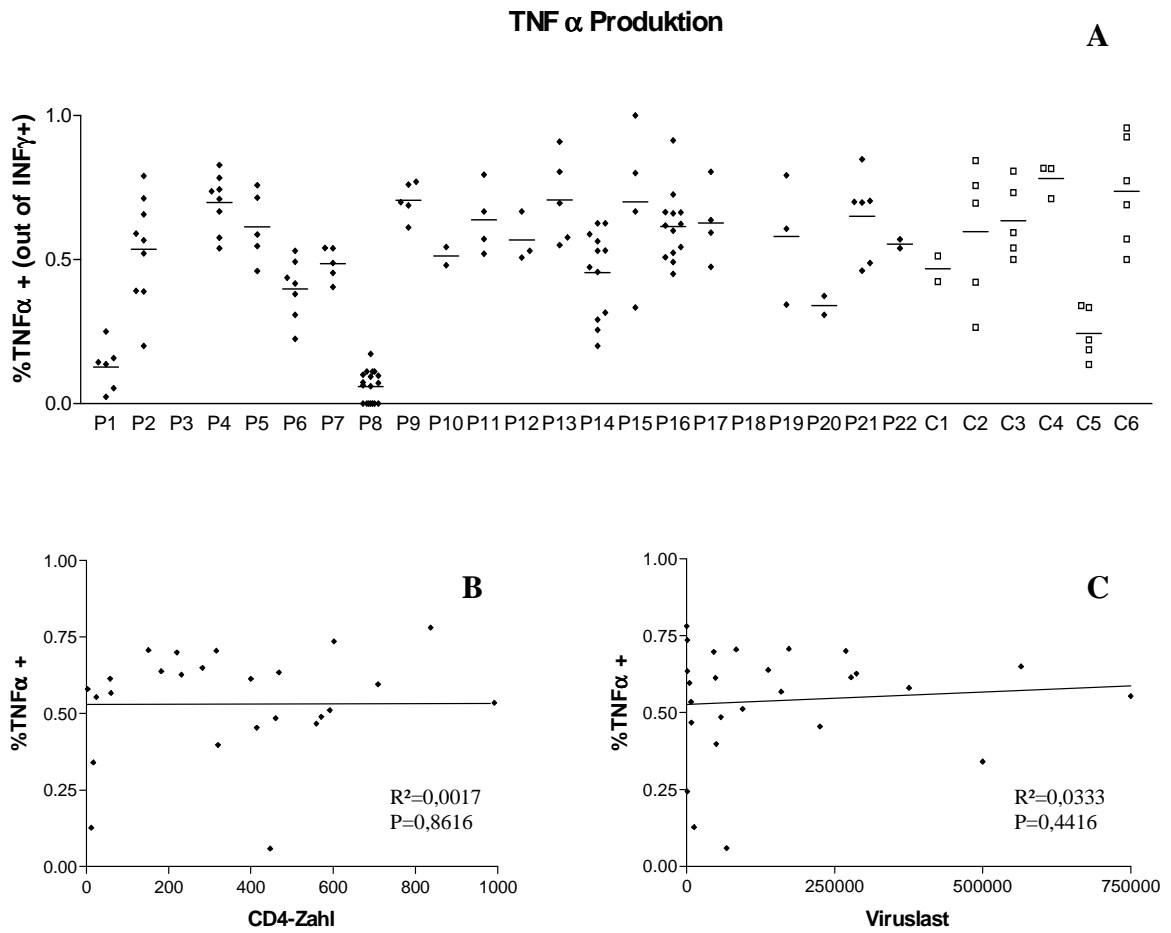


Abbildung 4: TNF α Produktion

(A) Anteil TNF α produzierender Zellen unter den INF γ positiven CD8 $^+$ T-Zellen aller Probanden

(B) Keine Korrelation zwischen TNF α -Produktion und CD4-Zellzahl($R^2=0,0017$; $p=0,8616$); (C)

Keine Korrelation zwischen TNF α -Produktion und Viruslast($R^2=0,0333$; $p=0,4416$);

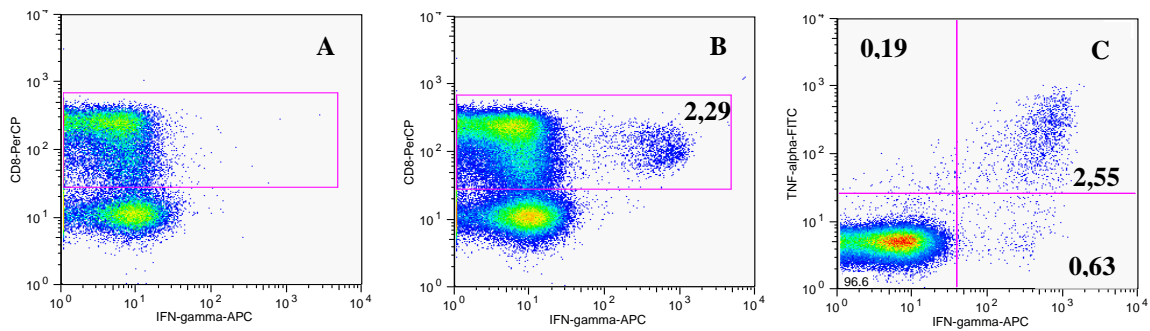


Abbildung 5: Beispiel für eine ausgeprägte $\text{INF}\gamma$ - und $\text{TNF}\alpha$ - Produktion bei Progressor P9 (VL: 83400Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 316/ μl);

(A) Negativkontrolle CD8+ T-Zellen unter den Lymphozyten im eingblendeten Gate; (B) $\text{INF}\gamma$ -Produktion CD8+ T-Zellen nach Stimulation durch Peptid 44 in %; (C) Darstellung ausschließlich CD8+ T-Zellen: Im rechten oberen Quadranten Produktion von $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ durch CD8+ T-Zellen in %;

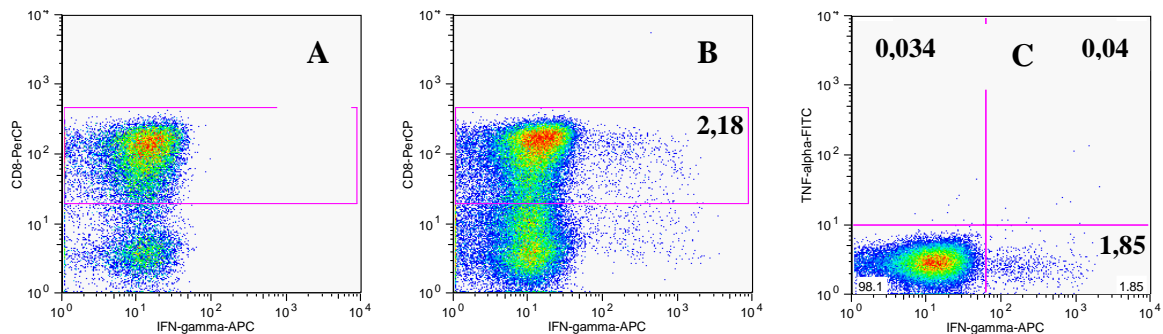


Abbildung 6: Ausnahmebeispiel für eine geringe $\text{TNF}\alpha$ -Produktion: Progressor P1 (VL: 12900Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 12/ μl)

(A) Negativkontrolle: CD8+ T-Zellen unter den Lymphozyten im eingblendeten Gate ohne $\text{INF}\gamma$ Produktion; (B): $\text{INF}\gamma$ -Produktion CD8+ T-Zellen nach Stimulation durch Peptid B44 AW11; (C) Darstellung ausschließlich CD8+ T-Zellen. Im rechten unteren Quadranten sieht man CD8+ T-Zellen, die $\text{INF}\gamma$ produzieren; eine $\text{TNF}\alpha$ Produktion lässt sich hier kaum nachweisen, wie man in den oberen Quadranten sieht (C)

Die Produktion von IL-2 ließ sich hingegen nur bei wenigen HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen nachweisen. Bei den Progressors P2, P7, P11 und P21 war dies beispielsweise der Fall (siehe Abbildung 7). Durchschnittlich wiesen 25,3% (Verteilung:13%-31%) der $\text{INF}\gamma$ positiven CD8+ T-Zellen dieser vier Patienten eine zusätzliche IL-2 Produktion

auf. In der Gruppe der Controller ließ sich eine IL-2 Produktion INF γ positiver Zellen bei zwei Patienten (C1 und C4) nachweisen (siehe Abbildung 7). Hier produzierten durchschnittlich sogar nur 13,2% (Verteilung 12%-14%) INF γ positiver Zellen IL-2. Ein Zusammenhang zu klinischem Verlauf, Viruslast($R^2=0,0867$; $p=0,5712$) und CD4-Zellzahl($R^2=0,00003$; $p=0,9910$) bestand nicht (siehe Abbildung 8).

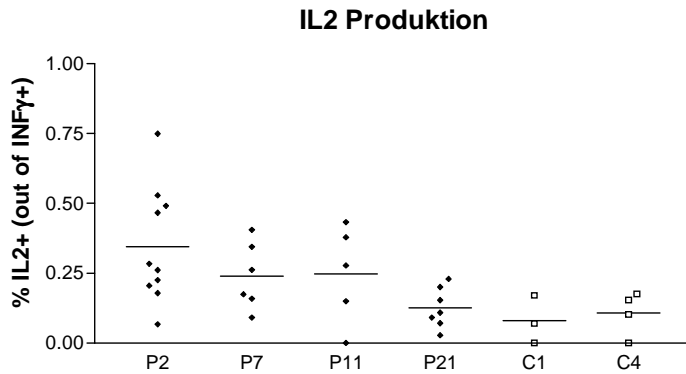


Abbildung 7: Anteil IL-2 produzierender Zellen unter den INF γ positiven CD8+ T-Zellen einzelner Progressors (P2, P7, P11, P21) und Controllers (C1, C4);

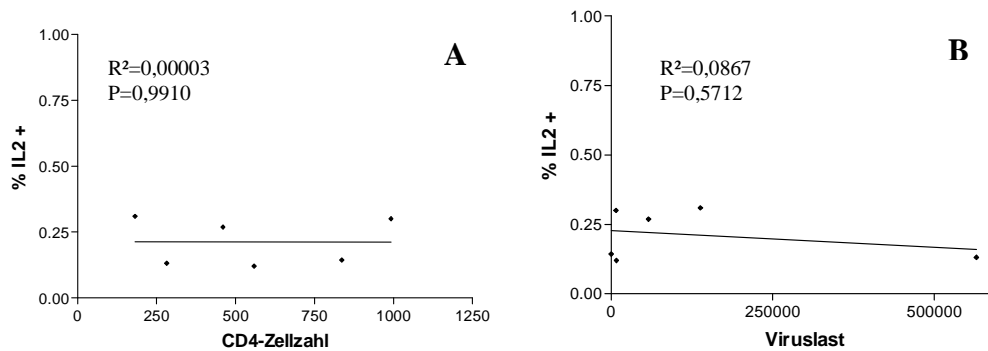


Abbildung 8: (A) Keine Korrelation zwischen IL-2-Produktion und CD4-Zellzahl ($R^2=0,00003$; $p=0,9910$); (B) Keine Korrelation zwischen IL-2-Produktion und Viruslast ($R^2=0,0867$; $p=0,5712$);

3.3 Untersuchung HIV-spezifischer CD8+T-Zellen auf Apoptoseanfälligkeit, Lysefähigkeit, Aktivierungsgrad und Proliferationsfähigkeit

Scheinbar keine vermehrte Anfälligkeit für Apoptose bei Progressors im Vergleich zu Controllern.

In T-Lymphozyten von HIV-infizierten Personen konnte eine vermehrte Expression von CD95 auf der Zelloberfläche [48] und eine verminderte Expression von bcl-2 nachgewiesen werden [25]. Deswegen untersuchten wir die HIV-spezifischen Zellen unserer Patienten auf die Expression dieser Moleküle, um heraus zu finden, ob möglicherweise ein Unterschied in der Apoptoseanfälligkeit zwischen Patienten in einem weit fortgeschrittenen oder gut kontrollierten Stadium der Infektion besteht.

Wir stellten fest, dass in allen fünf Versuchsgruppen im Mittel 98,85% (Verteilung 88,9%-100%) der HIV-spezifischen, tetramerpositiven Zellen CD95 exprimieren. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (siehe Abbildung 9A). Betrachtete man die Gesamtheit der CD8+ T-Zellen, und nicht nur die HIV spezifischen CD8+ T-Zellen, so bot sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 9B). Abbildung 10A zeigt mit Progressor P17 einen typischen Patienten. Die Expression von CD95 ließ sich hier bei 99% aller CD8+ T-Zellen nachweisen und bei 100% der tetramerpositiven Zellen. Die einzige Ausnahme bildete Patient P14, bei dem nur 53,4% der CD8+ T-Zellen CD95 exprimierten (siehe Abbildung 10B).

Auch bei der Untersuchung der bcl-2 Expression kamen wir zu einem ähnlichen Ergebnis. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Controllern und den Gruppen der Progressors feststellen. Für die bcl-2 Expression fanden sich höhere Werte für die Gruppe der Controller verglichen mit den vier Gruppen der Progressors. Dieser Unterschied bildete jedoch nur einen Trend und war nicht statistisch signifikant, auch nicht für den größten sich darstellenden Unterschied zwischen der Gruppe der C und PIV ($p=0,1939$) (siehe Abbildung 11A und B).

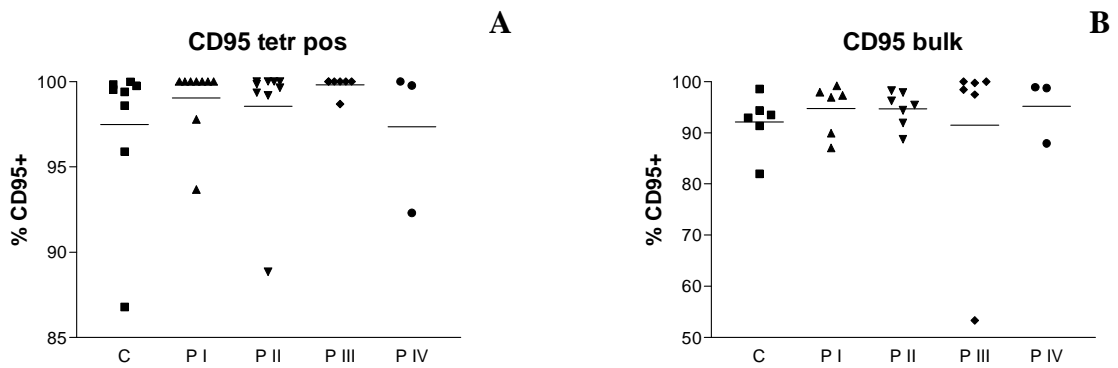


Abbildung 9: Anteil CD95 positiver T-Zellen von allen CD8+ T-Lymphozyten (Abb. 9 (B), CD95 bulk) und von spezifischen tetramerpositiven Zellen (Abb. 9 (A), CD95 tetr pos), jeweils in den untersuchten Patientengruppen.

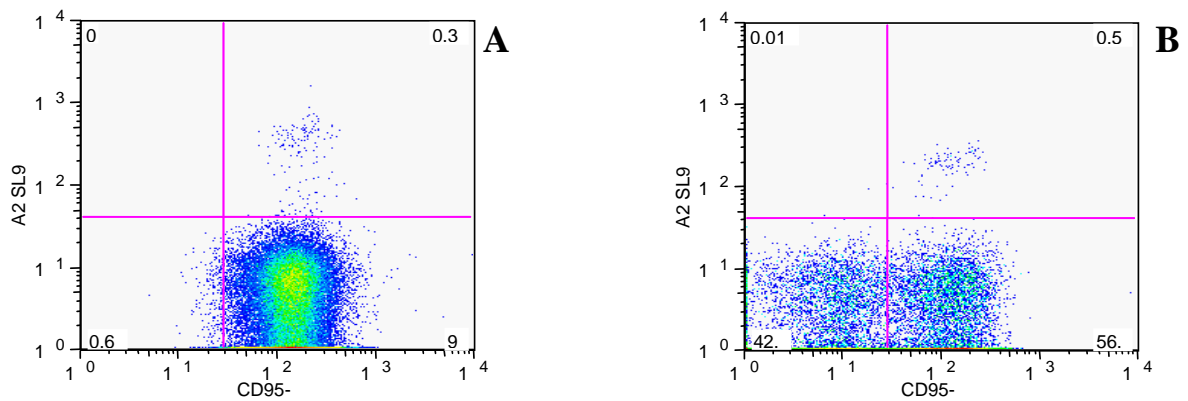


Abbildung 10: Beispiel für eine ausgeprägte CD95 Expression bei Progressor P17 (VL: 287000 Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 231/ μ l);

(A) Nahezu alle CD8+ T-Zellen dieses Patienten exprimieren CD95; unter den tetramerpositiven sind es sogar 100% (rechter oberer Quadrant) (B) Patientenbeispiel P14 (VL: 225000 Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 414/ μ l) Bei diesem Patienten exprimieren als einzige Ausnahme nur 56% der CD8+ T-Zellen CD95, unter den tetramerpositiven und somit HIV spezifischen sind es jedoch 99,9% (rechter oberer Quadrant).

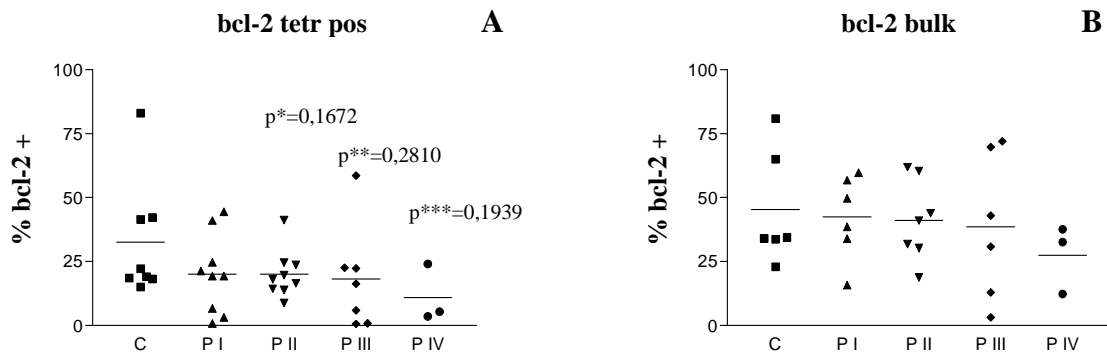


Abbildung 11: Anteil bcl-2 positiver T-Zellen von allen CD8+ T-Lymphozyten (Abb. 11 (B), bcl-2 bulk) und von spezifischen tetramerpositiven Zellen (Abb. 11 (A), bcl-2 tetr pos), jeweils in den untersuchten Patientengruppen. Kein statistisch signifikanter Unterschied, lediglich ein Trend im Vergleich zu C: $p^*=0,1272$; $p^{}=0,2810$; $p^{***}=0,1939$;**

Keine verminderte Perforin oder Granzym B Produktion bei Progressors im Vergleich zu Controllern

Perforin und Granzym B sind als wichtige Mediatoren der CD8+ T-Zelltoxizität bekannt [49] und ihre mangelhafte Expression im Verlauf einer progredienten HIV-Infektion wurde in der Literatur diskutiert [20, 46, 50]. Die bisherigen Studien lieferten jedoch widersprüchliche Daten, weswegen wir auch unsere Kohorte auf diese Marker untersuchten.

Wir konnten in unseren Patientengruppen keine unterschiedliche Perforinexpression zeigen. Im Durchschnitt der sechs Controller zeigten 28,97% (Verteilung 15,1%-54,3%) der HIV spezifischen T-Lymphozyten eine Perforinproduktion. Bei den Gruppen der Progressors variierten die Durchschnittswerte von Gruppe zu Gruppe mit 23,4% (Verteilung 12,2%-43,3%) für PI, 20,5% (Verteilung 3,4%-33,96%) für PII, 58,1% (Verteilung 37,3%-76,7%) für PIII und 52,9% (Verteilung 8,9%-91,3%) für PIV. Die beiden Patientengruppen mit den höchsten Viruslasten wiesen also sogar die meisten Perforin produzierenden Zellen auf (siehe Abbildung12).

Auch beim Vergleich der Gruppen im Hinblick auf die Granzym B Expression ließt sich kein Unterschied zwischen Progressors und Controllern feststellen. Unter den Controllern ließt sich bei durchschnittlich 73,6% (Verteilung 57,3%-81,7%) der HIV-spezifischen Zellen eine Granzym B Expression nachweisen. Mit durchschnittlich

79,3% (Verteilung 64,9%-92,5%) für PI, 73,5% (Verteilung 32,2%-90,99%) für PII, 85,2% (Verteilung 72,3%-95,7%) für PIII und 70,4% (Verteilung 64,6%-77,1%) für PIV an Granzym B exprimierenden Zellen, lagen die Werte der Progressors und Controller sehr nahe bei einander (siehe Abbildung 13). Auch exprimierten ein hoher Anteil der tetramerpositiven Zellen bei Patienten mit chronisch progredienter Infektion sowohl Perforin als auch Granzyme B (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13), so dass sich eine eingeschränkte Zytotoxizität gegenüber den CD8+ T-Zellen eines Controllers mit unseren Daten nicht belegen ließ. Siehe hierzu auch zwei Patientenbeispiele in Abbildung 14.

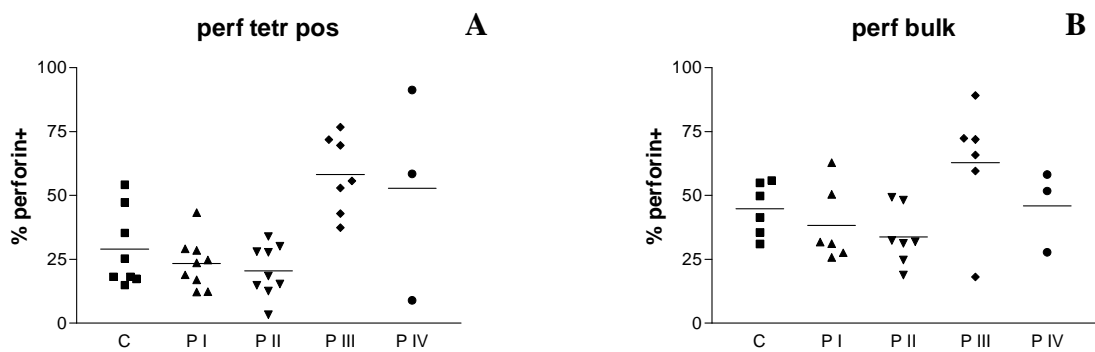


Abbildung 12: Anteil Perforin positiver T-Zellen von allen CD8+ T-Lymphozyten (Abb. 12 (B), perf bulk) und von spezifischen tetramerpositiven Zellen (Abb. 12 (A), perf tetr pos), jeweils in den untersuchten Patientengruppen.

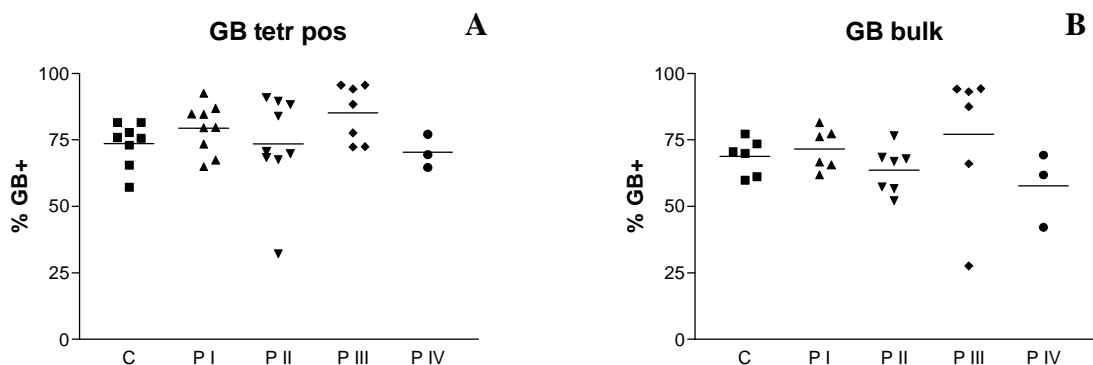


Abbildung 13: Anteil Granzyme B positive T-Zellen von allen CD8+ T-Lymphozyten (Abb.13 (B), GB bulk) und von spezifischen tetramerpositiven Zellen (Abb. 13 (A), GB tetr pos), jeweils in den untersuchten Patientengruppen ohne signifikanten Unterschied untereinander.

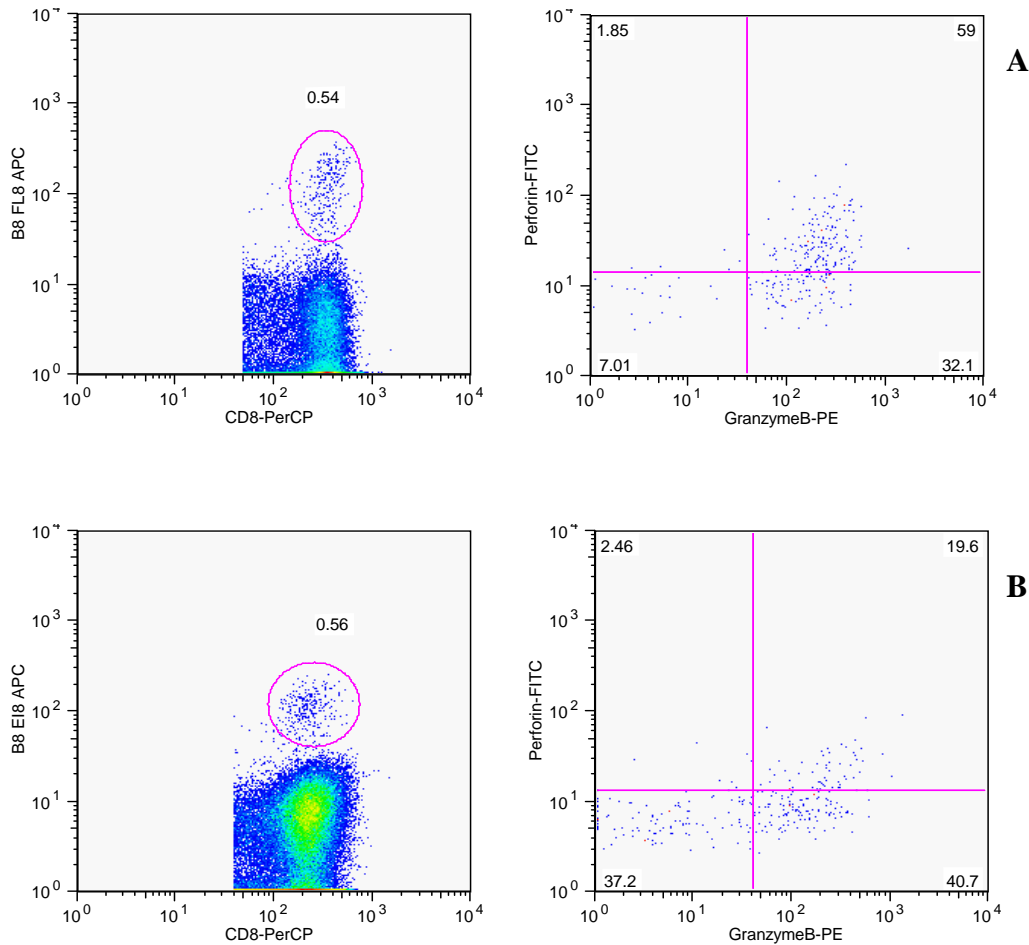


Abbildung 14: Beispiel für die Granzyme B Expression des Progressors P6 (VL: 49900 Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 320/ μ l)

(A) linkes Bild: 0,54% aller CD8+ T-Zellen dieses Patienten sind spezifisch für das getestete HIV-Epitop; rechtes Bild: 91,1% der HIV spezifischen tetramerpositiven T-Zellen exprimieren Granzyme B, 60,85% exprimieren Perforin und 59% exprimieren beide lytischen Komponenten; (B) Patientenbeispiel P10 (VL: 94500 Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 592/ μ l) linkes Bild: 0,56% aller CD8+ T-Zellen dieses Patienten sind spezifisch für das getestete HIV-Epitop; rechtes Bild: 60,3% der HIV spezifischen tetramerpositiven T-Zellen exprimieren Granzyme B, 22,1% exprimieren Perforin und 19,6% exprimieren beide lytischen Komponenten.

Signifikant höhere Expression des Aktivierungsmarkers CD38 bei allen vier Gruppen der Progressors, verglichen zur Gruppe der Controllers.

Da eine verstärkte Immunaktivierung bei HIV-Infizierten beschrieben wurde [32, 33], untersuchten wir zunächst die Expression der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR auf HIV spezifischen CD8+T-Zellen.

In der Gruppe PI zeigte sich im Mittel eine CD38 Expression von 65,7% (Verteilung 49,3%-99,2%), in der Gruppe PII 52,5% (Verteilung 16,2%-92,2%), in der Gruppe PIII 86,8% (Verteilung 71,1%-94,8%) und in der Gruppe PIV 78,5% (Verteilung 57,9%-94,6%) (siehe Abbildung 15).

Bei P1, einem Patienten mit sehr niedriger Viruslast und CD4-Zellzahl (siehe Tabelle 1), fand sich der höchste Anteil CD38+ Zellen unter den tetramerpositiven CD8+ T-Zellen (siehe Abbildung 16). Dennoch wurde deutlich, dass die beiden Patientengruppen mit der größten Virusbelastung auch am meisten CD38 exprimierten (siehe Abbildung 15). Durchschnittlich exprimierten also 71% der tetramerpositiven Zellen der Probanden aus den Gruppen PI-PIV CD38 (siehe P1 als Beispiel hierfür in Abbildung 16). Betrachtete man hingegen die Gruppe der Controller, so stellte man fest, dass nur 21,9% der tetramerpositiven Zellen den Aktivierungsmarker CD38 exprimierten. Am deutlichsten wurde dies bei Patient C4, dessen Viruslast unter der Nachweisgrenze von 50 RNA-Kopien/ml lag und dessen HIV-spezifische T-Lymphozyten nur zu 2,4% den Aktivierungsmarker CD38 exprimierten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir eine deutliche Korrelation der CD38 Expression mit steigender Viruslast ($R^2=0,51$; $p=0,0001$) und abnehmender CD4 Zellzahl ($R^2=0,5153$; $p<0,0001$) nachweisen konnten (siehe Abbildung 17A und B).

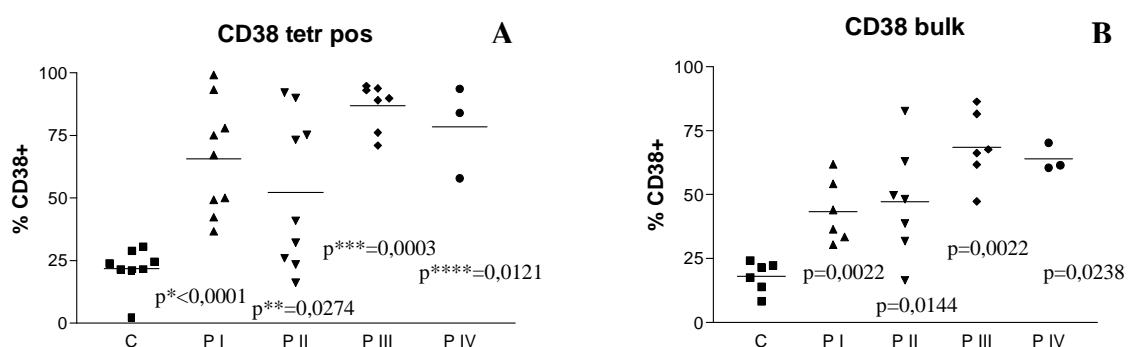


Abbildung 15: Anteil CD38 positiver T-Zellen von allen CD8+ T-Lymphozyten (Abb. 15 (B), CD38 bulk) und von tetramerpositiven Zellen (Abb. 15 (A), CD38 tetr pos), jeweils in den untersuchten Patientengruppen. Signifikant mehr CD38 Expression tetramerpositiver Zellen bei PI-PIV im Vergleich zu C: $p^*=<0,0001$; $p^{}=0,0274$; $p^{***}=0,0003$; $p^{****}=0,0121$ (A). Signifikant ist der Unterschied auch bei Betrachtung der Gesamten CD38+ T-Zellen (B).**

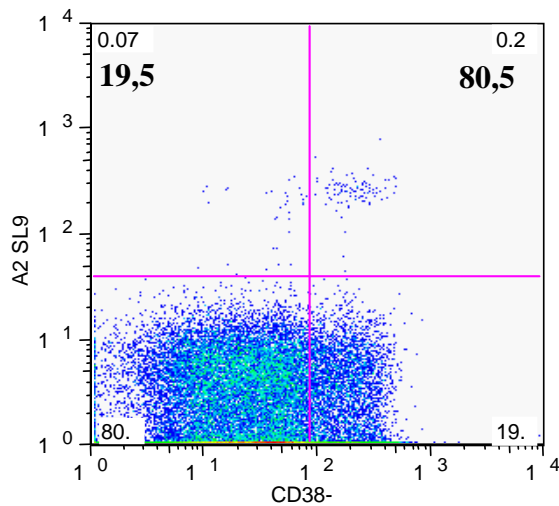


Abbildung 16: Beispiel für die CD38 Expression des Progressors P1 (VL: 12900 Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 12/ μ l)

80,5 % der tetramerpositiven Zellen sind hier CD38 positiv (rechter oberer Quadrant)

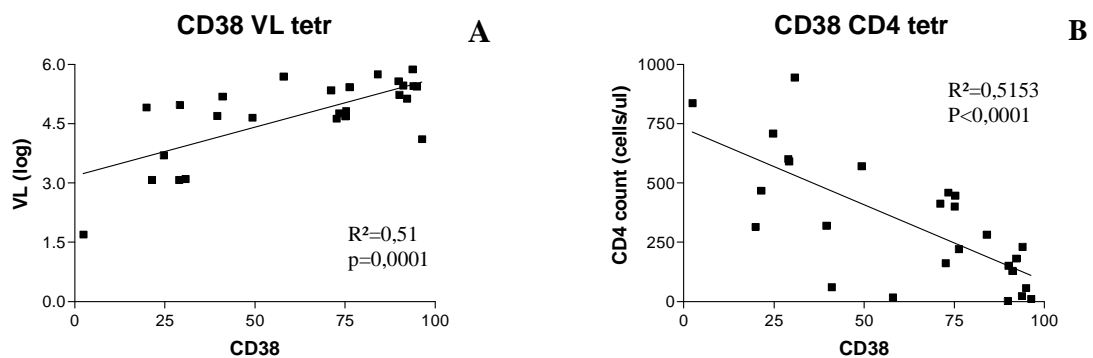


Abbildung 17: Korrelation der CD38 Expression mit der Viruslast und der CD4-Zellzahl (A) Auftragung der CD38 Produktion HIV spezifischer Zellen gegen die Viruslast der untersuchten Patienten. Es zeigt sich eine deutliche positive Korrelation ($R^2=0,51$; $p=0,0001$). (B) Auftragung der CD38 Produktion HIV spezifischer Zellen gegen die CD4-Zellzahl der untersuchten Patienten. Es zeigt sich eine deutliche negative Korrelation, d.h. je höher die CD4-Zellzahl ist, umso geringer ist die CD38 Expression ($R^2=0,5153$; $p<0,0001$).

Diese Ergebnisse ließen sich durch Untersuchung des zweiten Aktivierungsmarkers, HLA-DR, nicht wiederholen. Hier fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Controllern und Progressors. Unter den Progressors exprimierten

durchschnittlich 85,7% und unter den Controllern 86,2% der tetramerpositiven Zellen HLA-DR (siehe Abbildung 18A und B).

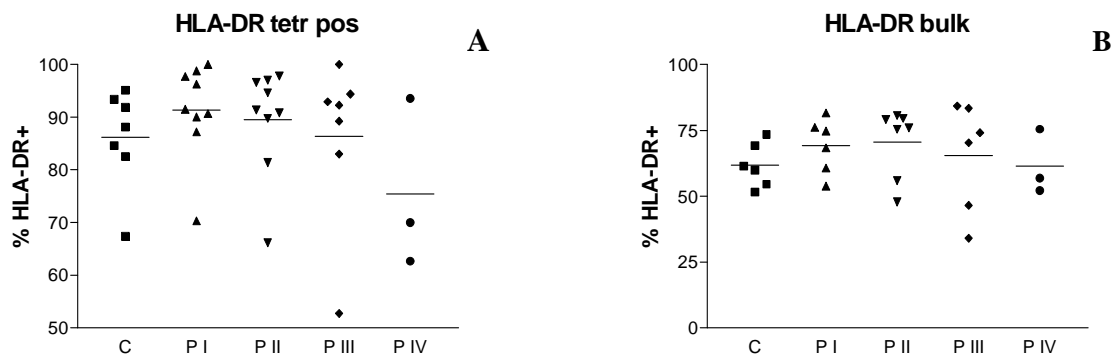


Abbildung 18: Anteil HLA-DR positiver CD8+ T-Zellen von allen CD8+T-Lymphozyten (Abb. 18 (B), HLA-DR bulk) und von tetramerpositiven Zellen (Abb. 18 (A), HLA-DR tetr pos), jeweils in den untersuchten Patientengruppen ohne statistisch signifikanten Unterschied.

Keine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit anhand der verwendeten Marker CD57 und Ki67.

Im Folgenden untersuchten wir mögliche Auswirkungen der nachgewiesenen Immunaktivierung. Eine chronische Aktivierung der CD8+ T-Zellen, wie man sie bei HIV nachgewiesen hat, könnte zu einer verfrühten proliferativen Erschöpfung der Zellen führen.

Wir untersuchten die Expression des Proliferationsmarkers CD57 und stellten fest, dass die HIV-spezifischen Zellen der Controllergruppe etwas mehr CD57 exprimierten als die der Progressors (siehe Abbildung 19A). Der deutlichste Unterschied zeigte sich für die HIV spezifischen, tetramerpositiven Zellen zwischen den Gruppen C und PI ($p=0,0745$). Der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant ($p=0,0745$). Im Durchschnitt ließ sich der Marker bei 58,7% der tetramerpositiven Zellen der Gruppe C nachweisen und bei 47, 2% der Gruppen PI-PIV. Abbildung 20 zeigt beispielhaft einen Patienten aus der Gruppe der Progressors. Hier exprimierten 61,4% der tetramerpositiven Zellen CD57. Betrachtete man vergleichsweise die CD57 Expression in allen CD8+ T-Zellen, und nicht nur in den HIV-spezifischen Zellen, so ließ sich ein Unterschied nicht mehr ausmachen (siehe Abbildung 19B). Somit konnten wir in den

verschiedenen untersuchten Patientengruppen keinen Zusammenhang der CD57 Expression mit der Viruslast der Patienten zeigen.

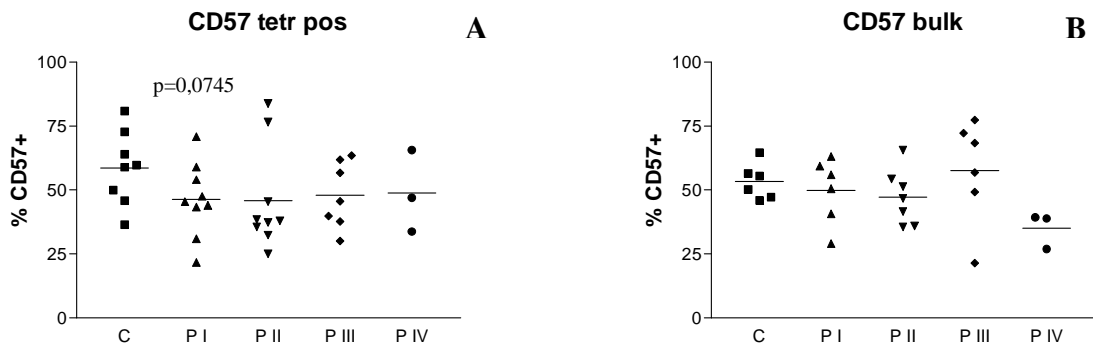


Abbildung 19: Anteil CD57 positiver T-Zellen von allen CD8+ T-Lymphozyten (Abb. 19 (B), CD57 bulk) und von tetramerpositiven Zellen (Abb.19 (A), CD57 tetramer pos), jeweils in den untersuchten Patientengruppen. Kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu C allerdings ein erkennbarer Trend der tetramerpositiven T-Zellen hin zu einer geringeren CD57 Expression.

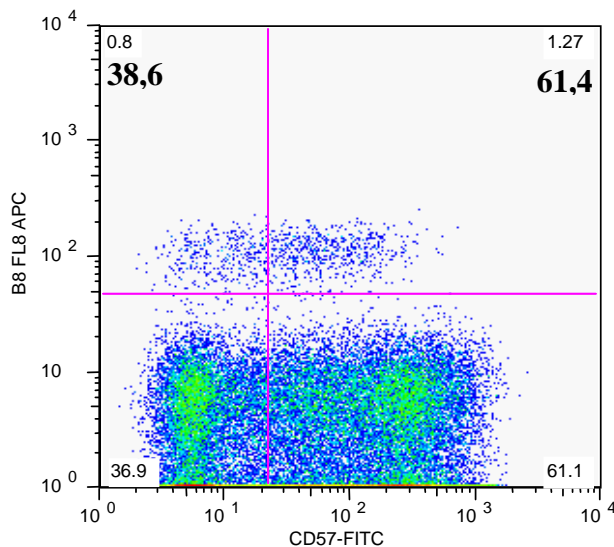


Abbildung 20: Beispiel für die CD57 Expression des Progressors P9 (VL: 83400 Kopien/ml; CD4-Zellzahl: 316/µl). Im rechten oberen Quadranten befinden sich die tetramerpositiven Zellen, welche CD57 exprimieren, in diesem Fall 61,4%.

Auch bei dem Nachweis des Kernantigens Ki67 ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Es ließ sich kein deutlicher Unterschied zwischen Progressors und Controllern zeigen.

(siehe Abbildung 21A und B). Das Kernantigen, das von replizierenden Zellen exprimiert wird, ließ sich durchschnittlich in 3,7 % (Variation zw. 1,52% und 4,75%) der tetramerpositiven CD8+T-Lymphozyten der Controller nachweisen und in 6,5% der tetramerpositiven Zellen der Progressors. Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant. Es fand sich in der Gruppe PI mit 10,1 % im Mittel der größte Anteil Ki67 positiver Zellen im Vergleich zu PII mit 4,7%, PIII mit 5,9% und PIV mit 5,1%. Vereinzelt Patienten unter den Progressors fielen aus der Reihe und wiesen eine vermehrte Ki67 Expression auf, wie zum Beispiel P3 mit 25,6%, P11 mit 17,6%, P1 mit 15,4% und P15 mit 13,9% der HIV spezifischen Zellen. Eine Korrelation mit Viruslast oder CD4 Zahl gab es nicht. Allerdings wurden diese erhöhten Expressionen alle durch die Färbung mit demselben Tetramer erreicht, nämlich durch das Epitop A2 SL9.

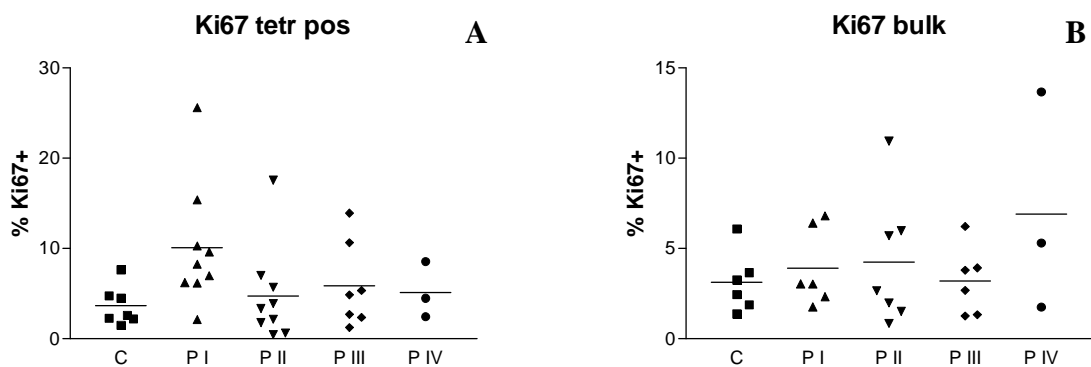


Abbildung 21: Anteil Ki67 positiver T-Zellen von allen CD8+ T-Lymphozyten (Abb. 21 (B), Ki67 bulk) und von spezifischen tetramerpositiven Zellen (Abb. 21 (A), Ki67 tetr pos), jeweils in den untersuchten Patientengruppen.

4 Diskussion

CD8⁺ T-Zellen werden für die Kontrolle der HIV-Infektion als besonders wichtig angesehen [6, 7, 51]. Dies wird am besten durch die Depletion der CD8⁺ T-Zellen im Tierversuch an Makaken belegt. Entfernt man durch einen monoklonalen Antikörper alle CD8⁺ T-Lymphozyten, sind die Tiere nicht mehr in der Lage, die Virämie zu kontrollieren [6]. Im akuten Stadium der HIV-Infektion beim Menschen ist der Anstieg HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mit einem massiven Abfall der Viruslast assoziiert [9, 51, 52]. Für diesen Zeitpunkt der Infektion wurden zudem zahlreiche virale Escape-Mutationen beschrieben - sowohl beim Affen als auch beim Menschen -, was einen starken Immundruck durch CD8⁺ T-Zellen belegt [10, 13, 15]

Die genaue Bedeutung HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt einer weit fortgeschrittenen Infektion ist noch größtenteils ungeklärt. Nach Durchlaufen der Plateauphase kommt es bei fast allen Patienten zu einem erneuten Anstieg der Viruslast. Dies geschieht trotz fortbestehender virusspezifischer CD8⁺ T-Zellantworten und ohne Escape-Mutationen, was darauf schließen lässt, dass diese CD8⁺ T-Zellantworten das Virus weiterhin erkennen [18]. Obwohl also im Anfangsstadium einer Infektion funktionstüchtige Effektor-T-Zellen generiert werden, verlieren diese im Laufe eines chronischen Infektionsverlaufes ihre Effektivität. Diese Ermüdung virusspezifischer Zellen wurde als erstes bei Mäusen mit persistierender LCMV(Lymphozytäre Choriomeningitisvirus)-Infektion beobachtet [53], wurde jedoch bald auch für chronische Infektionen beim Menschen, wie HCV(Hepatitis C Virus), HBV(Hepatitis B Virus) und HIV vermutet [54, 55].

4.1 Produktion der Zytokine $INF\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-2 und deren Bedeutung für den Funktionsverlust zytotoxischer T-Lymphozyten

Wir untersuchten zusätzlich zu $INF\gamma$ die Produktion von $TNF\alpha$ und IL-2. Studien an anderen chronisch persistierenden Viren, wie z.B. LCMV, zeigen einen zunehmenden Funktionsverlust zytotoxischer T-Lymphozyten und zwar in Korrelation mit einer ansteigenden Viruslast. Hierbei verlieren die CD8⁺ T-Zellen als erstes die Fähigkeit IL-2 zu produzieren, als nächstes die Fähigkeit der $TNF\alpha$ Produktion während sich zuletzt eine $INF\gamma$ Produktion nachweisen ließ. Wir stellten fest, dass sich HIV in diesem Punkt

anders verhält, da wir bei allen untersuchten Patienten (Controllers und Progressors) eine fortbestehende Produktion von $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ fanden. Eine IL-2-Produktion ließ sich zum Zeitpunkt unserer Untersuchung nur vereinzelt nachweisen, wobei sich Controllers und Progressors auch hierbei nicht unterschieden haben. Desweiteren konnten wir für keines der untersuchten Zytokine eine Korrelation zu Viruslast oder CD4-Zellzahl feststellen.

In zahlreichen Studien wurde bereits eine $\text{INF}\gamma$ Produktion HIV-spezifischer CD8+ T-Zellen nachgewiesen und hiermit die Breite und Stärke der HIV-spezifischen CD8+ T-Zellantwort untersucht [18, 47, 56]. Jedoch ist zwischenzeitlich in Frage gestellt worden, ob die $\text{INF}\gamma$ -Produktion der geeignete Parameter ist, um eine effektive Immunantwort nachzuweisen. Einige Studien zeigten keine Korrelation zwischen der Höhe und Breite durch $\text{INF}\gamma$ -Produktion nachgewiesener CD8+ T-Zellen und der CD4-Zellzahl oder Viruslast und ließen vermuten, dass diese Antworten im Verlauf der Erkrankung an Effektivität verlieren [18, 47, 57]. Andererseits haben neuere Studien wiederum gezeigt, dass eine relative Immundominanz Gag-spezifischer $\text{INF}\gamma$ -Antworten mit der Kontrolle der Virusreplikation korreliert sind [56, 58]. Dies läßt vermuten, dass unterschiedliche Epitope Immunantworten unterschiedlicher Effizienz hervorrufen können, auch wenn deren Quantität gleich zu sein scheint. Auch innerhalb eines Individuums scheint es Epitop-spezifische Immunantworten mit unterschiedlicher Funktionalität zu geben [59].

Neben dem Epitop, das eine Immunantwort induziert, scheint auch die Anzahl und Art der Zytokine, die eine HIV-spezifische CD8+ T-Zelle zusätzlich zu $\text{INF}\gamma$ produziert, von größter Bedeutung zu sein [17, 59]. An einem kleinen Kollektiv von Patienten in der chronischen Plateauphase der HIV-Infektion wurden Daten erhoben, die zeigen, dass HIV-spezifische CD8+ T-Zellen, die $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ produzieren, eher Zielzellen in vitro lysieren können, als solche, die nur $\text{INF}\gamma$ produzieren [60]. Weitere Studien haben bereits gezeigt, dass HIV-spezifische CD8+ T-Zellen beispielsweise im Vergleich zu CMV(Zytomegalievirus)-spezifischen Zellen, bei fortbestehender $\text{INF}\gamma$ -Produktion, signifikant weniger IL-2 produzieren [23, 61] und zusätzlich mit einem phänotypisch niedrigeren Differenzierungsgrad dieser Zellen korrelieren [23], was durchaus eine mögliche Ursache für eine eingeschränkte T-Zellfunktion sein könnte. Es würde also nicht überraschen, wenn Controllers im Vergleich zu Progressors keine oder

nur eine gering eingeschränkte IL-2-Produktion aufweisen, was wir jedoch mit unseren Daten nicht belegen konnten. Peretz et al. [57] haben hingegen erst vor kurzem gezeigt, dass Progressors signifikant weniger CD8+ T-Zellen besitzen, die sowohl INF γ als auch IL-2 produzieren, als sogenannte Slow Progressors, die ihre HIV-Infektion besser kontrollieren. Hingegen zeigte sich keine Differenz bei der Betrachtung der alleinigen INF γ -Produktion [59]. Mit unseren Ergebnissen konnten wir dies nicht bestätigen. Betts et al. [50] haben mittels polychromatischer Durchflusszytometrie fünf CD8-T-Zellfunktionen gleichzeitig untersucht, dazu gehörten Degranulation (CD107a), Zytokin- (INF γ , TNF α , IL-2) und Chemokinproduktion (MIP-1 β). Hierbei zeigte sich, dass HIV infizierte Nonprogressors eine qualitativ unterschiedliche und wahrscheinlich überlegene HIV spezifische CD8+ T-Zellantwort entwickeln im Gegensatz zu HIV infizierten Progressors. Überwiegend schien bei den Progressors die Expression von MIP-1 β gefolgt von CD 107a und dann INF γ erhalten zu sein. Die Produktion von IL-2 und TNF α war sehr gering. Erstaunlicherweise dominierte also die MIP-1 β -Produktion die HIV-spezifische CD8-T-Zellantwort und nicht INF γ . Möglicherweise hat man bisher die Frequenz HIV-spezifischer T-Zellantworten unterschätzt, indem man lediglich die Produktion von INF γ als Indikator hierfür betrachtete [52]. In der Gruppe der Nonprogressors fanden Betts et al. Zellpopulationen, die für alle fünf Funktionen positiv waren und hierbei auch eine deutlich Korrelation mit der Viruslast aufwiesen [52]. Unsere Daten hingegen zeigten keinerlei signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Das Sekretionsverhalten beider Gruppen war im Bezug auf alle drei Zytokine gleich und es zeigte sich auch keine Korrelation mit der Viruslast oder CD4-Zellzahl, so dass die genaue Bedeutung der von uns untersuchten Zytokine für den Infektionsverlauf weiterhin unklar bleibt.

4.2 Charakterisierung zytotoxischer T-Zellen mittels Tetramerstaining zur Untersuchung HIV spezifischer CD8+ T-Lymphozyten

Bisher publizierte Studien zu weiteren wichtigen Eigenschaften von CD8+ T-Zellen wie Immunaktivierung, Apoptoseneigung und Proliferation beschränken sich großteils auf die Untersuchung der Gesamtheit der CD4+ und CD8+ T-Zellen. Um deren genaue Bedeutung für den Verlauf einer HIV-Infektion beurteilen zu können, untersuchten wir

mittels Tetramerfärbung gezielt HIV-spezifische CD8+ T-Zellen in der chronischen Phase der Infektion.

4.2.1 Vor- und Nachteile der Tetramerfärbung

Im Laufe der letzten Jahre haben sich mit Entwicklung der Tetramerfärbung die Möglichkeiten, antigenspezifische CD8+ T-Zellen nachzuweisen, erweitert [62]. Sie bietet die Möglichkeit, direkt, hoch spezifisch und sensitiv bereits geringste Zellmengen durch oberflächliche Färbung sichtbar zu machen. Auch eine Kombination mit Funktionstests ist möglich [63]. Nicht alle antigenspezifischen, tetramerpositiven Zellen reagieren in den Funktionstests. Manchmal sezerniert nur ein Bruchteil HIV-spezifischer Zellen ein Zytokin [64], weshalb die Tetramerfärbung sehr viel genauer als ein Funktionstest alleine ist. Der wesentliche Nachteil der Tetramerfärbung ist, dass die Herstellung der Tetramere sehr aufwendig und teuer ist. Zudem muss für die Tetramerherstellung das genaue Epitop mit HLA-Restriktion bekannt sein, was nicht nötig ist, wenn man überlappende Peptide verwendet. Schlüsse für die Gesamtheit der HIV-spezifischen Zellen eines HIV-Infizierten kann man natürlich nicht ziehen. Man darf nicht außer Acht lassen, dass uns lediglich eine begrenzte Anzahl von Epitopen bei den von uns durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung stand. Dafür hat man allerdings die Möglichkeit, gezielt HIV-spezifische Zellen nachzuweisen, ohne sie zusätzlich zu stimulieren und unter Umständen ihren Phänotyp zu verändern. Im Rahmen der Tetramerfärbung kann bereits nach einer halbstündigen Inkubation mit dem jeweiligen zu untersuchenden Tetramer eine Antikörperfärbung erfolgen. Im Gegensatz hierzu werden die zu untersuchenden Lymphozyten bei der intrazellulären Zytokinfärbung für 6 Stunden gemeinsam mit den verwendeten Peptiden und zusätzlichen kostimulatorischen Faktoren inkubiert, bevor eine Färbung mit dem jeweiligen Antikörper möglich ist. Hierbei bleibt unklar, in wie weit die untersuchten Lymphozyten sich durch die Stimulation und lange Inkubation von ihrem ursprünglichen Phänotyp entfernt haben.

4.2.2 Apoptoseanfälligkeit als mögliche Ursache für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf zwischen Controllers und Progressors

Apoptose kann durch membranständige Rezeptoren induziert werden, die zur Gruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören. Sowohl auf der Oberfläche CD4+ als auch CD8+ T-Zellen HIV-positiver Probanden ist eine gesteigerte Expression von CD95 nachgewiesen worden [65]. Diese korrelierte mit einer stärkeren Anfälligkeit der Zellen für Apoptose und einem schwereren Krankheitsverlauf [34, 48, 65]. Die Beobachtung, dass T-Zellen aus dem peripheren Blut HIV-Infizierter in Kultur ohne jeden exogenen Stimulus am programmierten Zelltod zugrunde gehen, lässt vermuten, dass der intrinsische, bcl-2 abhängige Apoptosepfad ebenfalls an der HIV induzierten T-Zell Zerstörung beteiligt ist [66]. Beschrieben wurde eine deutliche Korrelation der gesteigerten Apoptoserate mit einer verminderten Expression von bcl-2, wie sie in HIV-positiven Individuen nachgewiesen werden konnte [25]. Mittlerweile ist auch in HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen HIV-infizierter Individuen im Gegensatz zu HIV-negativen Probanden eine deutlich verminderte Expression von bcl-2 und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber CD95 vermittelter Apoptose nachgewiesen worden [67]. Die erhöhte Empfindlichkeit der T-Zellen für Apoptose ist möglicherweise die Folge einer sowohl für CD4+, als auch CD8+ T-Zellen, beschriebenen überschießenden Immunaktivierung[32], die mit einer verminderten Expression von bcl-2 korreliert zu sein scheint [68]. Interessanterweise ist die harmlose Infektion von Schimpansen mit HIV-1 assoziiert mit einem Fehlen von Immunaktivierung und einer normalen Expression von bcl-2 [34]. Ähnliche Schlüsse lässt eine Untersuchung zu, die im Rahmen einer HIV-2-Infektion einen geringeren Aktivierungsgrad der Lymphozyten und eine niedrigere Apoptoserate im Vergleich zu HIV-1 zeigte [69]. Bereits vor einiger Zeit wurde auch bei der Untersuchung HIV-infizierter Controller eine geringere Apoptoserate festgestellt [70].

Erstaunlicherweise konnten wir keinen Unterschied ausmachen für die Expression von CD95 zwischen den von uns untersuchten Gruppen. Jedoch fand sich bei der Betrachtung der bcl-2-Expression HIV-spezifischer Zellen ein höherer Anteil in der Gruppe der Controller. Dieser Unterschied stellte nur einen Trend dar und war nicht statistisch signifikant. Vielleicht wurden hierfür die falschen Marker untersucht. Interessante Untersuchungen zu einem neuen Marker der Apoptoseinduktion, nämlich

programmed death 1 (PD-1), zeigten in mehreren Studien, dass dieser bei Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium erhöht ist [56, 71, 72].

4.2.3 Verminderte zytolytische Fähigkeit CD8+ T-Zellen als Ursache für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf bei Progressors und Controllers

Perforin und Granzyme B sind zytotoxische Effektormoleküle und spielen eine bedeutende Rolle in der zytotoxischen T-Zell-Aktivität [49, 73]. Diverse Studien deuten auf eine gestörte Expression lytischer Komponenten in der fortgeschrittenen HIV-Infektion hin [20, 46, 50]. Frühere Studien haben gezeigt, dass HIV spezifische CD8+ T-Zellen deutlich weniger Perforin exprimieren als beispielsweise CMV spezifische Zellen desselben Donors, obwohl in der Gesamtheit der CD8+ T-Zellen zahlreiche Zellen positiv waren für Perforin [20]. Hingegen zeigen neuere Untersuchungen, dass die meisten Zellen, die spezifisch sind für Viren, die chronische Infektionen hervorrufen, wenig Perforin exprimieren und zwar unabhängig davon, ob es sich um HIV-positive oder -negative Untersuchungspersonen handelt [50]. Hierzu fanden Migueles et al. [44,] dass obwohl sich in beiden Gruppen (Progressors und Controllers) eine Vielzahl HIV-spezifischer Zellen nachweisen ließ, nur Controllers eine hohe Perforinexpression aufwiesen, und diese war mit einer guten Proliferationskapazität gekoppelt [46].

Dies konnten wir mit unseren Untersuchungen nicht bestätigen. Unsere Daten zeigten, sowohl bei Controllers als auch bei Progressors eine annähernd gleiche Expression von Perforin und Granzyme B. Einen Unterschied zwischen virusspezifischen Zellen und der Gesamtheit der CD8+ T-Zellen konnten wir ebenfalls nicht ausmachen. Lediglich die beiden Gruppen der Progressors, die im Gruppenvergleich die Patienten mit den höchsten Viruslasten enthielten, zeigten die höchste Perforinexpression mit über 50% der HIV spezifischen Zellen. Eine mögliche Hypothese wäre, dass in diesen Patientengruppen die lytischen Granula nicht mehr entleert werden können. Es wäre andererseits auch möglich, dass die CD8+ T-Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt die Fähigkeit verloren haben, das Virus bzw. virusinfizierte Zellen zu erkennen, zum Beispiel aufgrund von viralen „Escape“-Mutationen. Die Zellen könnten somit nicht

aktiviert werden und eine daraufhin folgende Entleerung der lytischen Granula bliebe auch aus.

4.2.4 Hyperaktivierung des Immunsystems als mögliche Ursache für das Fortschreiten der Infektion.

Chronische Immunaktivierung ist ein Charakteristikum einer fortschreitenden HIV-Infektion. Schon länger konnte gezeigt werden, dass die chronische Hyperaktivität des Immunsystems ein unabhängiger prognostischer Marker für den Krankheitsfortschritt ist [32] und mit einem schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert ist, obwohl der zu Grunde liegende Mechanismus hierzu noch ungeklärt ist [33, 74]. Eine weit verbreitete These ist, dass die Hyperaktivität der T-Lymphozyten zu einer verstärkten Proliferation, gehäuften Zelltod und mit der Zeit zu einer Erschöpfung des Immunsystems führt [33]. Vor allem Untersuchungen an Schimpansen belegen die Bedeutung der Hyperaktivierung für die HIV-Infektion. Diese lassen sich zwar mit HIV infizieren, erkranken jedoch nicht an AIDS. Eine Hyperaktivität der T-Lymphozyten lässt sich bei ihnen nicht nachweisen. Ähnliches sieht man beispielsweise auch bei Mangabeyaffen, dem natürlichen Wirt von SIV (simian immunodeficiency virus), in denen man zwar eine hohe Viruslast, aber keine chronische Immunaktivierung und auch keine eingeschränkte Lebenserwartung der Tiere findet [75, 76]. Im Gegensatz dazu zeigen Rhesus Makaken, nach Infektion mit SIV eine deutliche Immunaktivierung und einen darmatischen Krankheitsverlauf bis hin zum Vollbild von AIDS und frühzeitigem Tod. Durch eine Behandlung dieser Affen mit monoklonalen Antikörpern versuchte man die zelluläre Immunaktivierung zu unterbinden und erhoffte sich dadurch möglicherweise einen benigneren Krankheitsverlauf [77]. Die Hemmung der Immunaktivierung konnte jedoch keinen milderen Krankheitsverlauf induzieren [78]. Der Grund hierfür könnte sein, dass jede physiologische Immunantwort einer gewissen Immunaktivierung bedarf. Da es sich im Rahmen einer HIV-Infektion aber vermutlich um eine überschießende Aktivierung des Immunsystems handelt, wäre es sehr interessant zu sehen, welche Folge eine teilweise Dämpfung einer Immunaktivierung hätte.

Arbeiten an akut infizierten HIV-Patienten zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen Viruslast und der Expression von Aktivierungsmarkern [32]. Untersucht

wurden hierbei jedoch die Gesamtheit der T-Lymphozyten. Es stellt sich jedoch die Frage, ob auch HIV-spezifische Zellen, die eine Bedeutung in der Kontrolle des Virus haben, von dieser Aktivierung betroffen sind. Papagno et al. haben gezeigt, dass durch die HIV Infektion sowohl HIV-spezifische CD8+ T-Zellen direkt, als auch nicht HIV-spezifische CD8+ T-Zellen (z.B. spezifisch für EBV (Epstein Barr Virus) oder CMV (Zytomegalievirus) aktiviert werden [79]. Unsere Daten ergaben, dass die Expression von CD38 auf der Gesamtheit der CD8+ T-Zellen hoch signifikant mit der Viruslast und negativ mit der CD4-Zellzahl korrelierte. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass diese Korrelation für HIV-spezifische CD8+ T-Zellen noch stärker war.

Es wäre möglich, dass die Immunaktivierung, induziert durch die steigende Viruslast, eine zu spät kommende Reaktion des Immunsystems ist, um das Virus wieder in den Griff zu bekommen. Die aktivierten HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen haben jedoch bereits im Verlauf der latenten Phase der Infektion wichtige Effektorfunktionen verloren und sind nicht mehr in der Lage, das Fortschreiten der Infektion zu verhindern. Weiter verbreitet ist jedoch die Theorie, dass die HIV-Infektion CD8+ T-Zellen aktiviert und diese aufgrund von gesteigerter Proliferation und verfrühter Alterung nach und nach ihre Funktionstüchtigkeit verlieren. Die chronische Aktivierung kann unserer Meinung nach jedoch nicht allein für den Funktionsverlust der HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen verantwortlich gemacht werden, denn funktionstüchtige Immunantworten gegen andere Viruserkrankungen (CMV, EBV, Influenza) bleiben schließlich trotz hoher Viruslasten in HIV-infizierten Patienten erhalten [52]. Außerdem müsste die Reduktion der Immunaktivierung, wie sie nach Beginn einer antiretroviralen Therapie auftritt, eine Funktionsverbesserung HIV-spezifischer CD8+ T-Zellen aufweisen, was jedoch nicht der Fall zu sein scheint [52].

Die Expression eines weiteren Aktivierungsmarkers, HLA-DR, war ausgeprägt in unserer Untersuchung, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Controllern und Progressors. Darüberhinaus war der Anteil HLA-DR exprimierender CD8+ T-Zellen unter den HIV-spezifischen Zellen um bis zu 25 % höher als in der Gesamtheit der CD8+ T-Zellen, und zwar sowohl in der Gruppe der Controllers, als auch in den Gruppen der Progressors. Es verwundert, dass die Expression von HLA-DR in allen untersuchten Gruppen annähernd gleich zu sein scheint, schließlich handelt es sich hierbei ja auch um einen Aktivierungsmarker und man würde ein ähnliches

Expressionsmuster erwarten wie wir es bei CD38 gesehen haben. Dies ließ uns annehmen, dass die Expression von HLA-DR auch durch andere Faktoren beeinflusst werden kann. Eine erhöhte Expression von HLA-DR in Kombination mit einer niedrigen Expression von CD38, wie wir sie in unserer Gruppe der Controllers fanden, wurde bereits in der Gesamtheit der CD8+ T-Zellpopulationen und mittlerweile auch bei HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen in asymptomatischen HIV-infizierten Individuen mit stabilen CD4+ T-Zellen beobachtet [80, 81]. Es wird vermutet, dass in diesem Fall eine hohe Expression von HLA-DR, trotz geringem Aktivierungsgrad der Zellen, einen Indikator für eine ausgeprägte Proliferationskapazität darstellt, da man bei diesen Zellen eine potente Proliferationskapazität und keine Expression von CD57, einem Marker für eine eingeschränkte Proliferation, nachweisen konnte [81].

4.2.5 Eingeschränkte Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten durch frühzeitige Zellalterung und Proliferationsverlust

Als weitere mögliche Folge der Überaktivierung und Ursache für den Funktionsverlust zytotoxischer T-Lymphozyten im Laufe einer fortschreitenden HIV-Infektion nimmt man eine frühzeitige Lymphozytenalterung und einen damit einhergehenden Proliferationsverlust der T-Zellen an [41, 43, 46]. Es gibt Studien, die bei HIV-infizierten Patienten ähnliche immunologische Eigenschaften nachweisen konnten, wie sie typischerweise in gesunden, jedoch gealterten Menschen zu finden sind [82]. Dies legt ebenfalls die Vermutung nahe, dass es durch ständige Immunaktivierung, wie sie bei HIV-Infizierten stattfindet, zu einer Art Verbrauch der Immunressourcen kommt. Man weiß, dass humane T-Lymphozyten die Eigenschaft haben, nur eine bestimmte Anzahl an Zellteilungen zu durchlaufen, bevor sie in das Stadium der sog. Replikativen Senescence eintreten. In diesem Stadium finden keine Zellteilung, sondern nur noch eine metabolische Grundaktivität statt [43, 83]. Eine mangelhafte Proliferationsfähigkeit der Zellen ist unter anderem gekennzeichnet durch eine gesteigerte Oberflächenexpression von CD57, welches ein genereller Marker für kurze Telomere und zahlreiche zurückliegende Zellteilungen ist [41]. Wir konnten jedoch anhand der Expression der Proliferationsmarker CD57 und Ki67 keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der Progressors und der Gruppe der Controller

feststellen, und zwar weder bei Betrachtung der Gesamtheit der CD8⁺ T-Lymphozyten noch bei dem gesonderten Vergleich HIV spezifischer Zellen. Dennoch fanden wir eine überraschende Tendenz: die Expression von CD57 auf HIV spezifischen Zellen war in der Gruppe der Controllers höher als in der Gruppe der Progressors. Virusspezifische CD8⁺ T-Zellen der Controllers würden somit eine noch geringere Proliferationskapazität besitzen als die der Progressors [41, 43]. Die Aktivierung des Immunsystems und die daraus resultierende Proliferationssteigerung der T-Zellen ist eine gesunde und notwendige Reaktion des Immunsystems, um eine Infektion zu bekämpfen. Möglicherweise liegt bei Controllern ein gesundes Aktivierungsmaß vor, das im Rahmen einer effektiveren Immunantwort gegen das HI-Virus zu einer physiologischen Proliferation von CD8⁺ T-Zellen führt.

Es wäre jedoch andererseits möglich, dass CD57 nicht nur als Indikator für die Replikative Senescence dient. Le Priol et al. [73] führten erst vor kurzem ausführliche Genanalysen zur Charakterisierung CD8⁺/CD57⁺ T-Zellen durch. Untersucht wurden 120 HIV-Infizierte, unabhängig vom Stadium der Erkrankung. Trotz eingeschränkter Proliferationskapazität hatten CD57 positive Zellen eine antigenspezifische, zytotoxische Funktion, eine intakte Zell-Zell-Interaktion mit der Umgebung und eine, zwar veränderte, aber sehr gute Migrationskapazität, vor allem in nichtlymphatische Gewebe. Diese Eigenschaften schienen unabhängig vom HIV-Status zu sein, denn HIV-positive Individuen unterschieden sich hierbei nicht von gesunden HIV-negativen Probanden [84].

5 Zusammenfassung

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der Immunantwort gegen HIV-1. Trotz allem kommt es jedoch im Verlauf der Infektion bei den meisten Betroffenen zum Anstieg der Viruslast und Abfall der CD4 Zellzahl, obwohl auch in diesem fortgeschrittenen Stadium der Infektion virusspezifische CD8⁺ T-Zellantworten mittels INF- γ -Produktion nachgewiesen werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, weitere funktionelle und phänotypische Merkmale von CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, um eine mögliche Ursache für die im Verlauf der Infektion ineffizient werdende Immunantwort zu finden.

Einen statistisch signifikanten Unterschied der INF- γ Produktion CD8⁺ T-Zellen zwischen Progressors und Controllers ließ sich mittels INF- γ Elispot bei den von uns untersuchten Patienten nicht nachweisen. Es ist also davon auszugehen, dass CD8⁺-T-Zellen im fortgeschrittenen, chronischen Stadium der Infektion funktionelle Lücken aufweisen, die sich nicht durch INF γ -basierte Untersuchungsmethoden nachweisen lassen.

Anhand intrazellulärer Zytokinfärbung ließ sich unabhängig vom Schweregrad der Infektion eine erhaltene Produktion der Zytokine INF γ und TNF α , nicht hingegen eine Produktion von IL-2 nachweisen.

Bei der Untersuchung HIV spezifischer CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe von Tetramerfärbungen zeigte sich in Bezug auf den Aktivierungsgrad, gemessen an der CD38-Expression, ein deutlicher Unterschied zwischen Progressors und Controllers, der innerhalb der HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur gesamten CD8⁺ T-Zellpopulation noch ausgeprägter zu erkennen war. Hier gab es eine signifikante positive Korrelation zur Viruslast und eine signifikante negative Korrelation zur CD4-Zellzahl der HIV-Infizierten. Anhand des Aktivierungsmarkers HLA-DR ließ sich dieser Unterschied nicht nachweisen.

Im Bezug auf die Proliferationsfähigkeit, Apoptoseempfindlichkeit und lytische Funktion HIV-spezifischer Zellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Progressors und Controllers ausgemacht werden.

Schlüsse für die Gesamtheit der HIV-spezifischen Zellen eines HIV-Infizierten kann man natürlich nicht ziehen. Man darf nicht außer Acht lassen, dass uns lediglich eine

begrenzte Anzahl von Epitopen bei den durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung stand.

Es wurde jedoch deutlich, dass es feine Unterschiede und Trends zu geben scheint, die eine gezielte weiterführende Untersuchung erfordern. Weiterhin ist auch zu bedenken, dass möglicherweise andere Faktoren, als die von uns untersuchten, für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf verantwortlich sein können.

Welche Faktoren nun tatsächlich die Ursache sind dafür, dass das menschliche Immunsystem gegen das HI-Virus in der Regel früher oder später verliert, bleibt weiterhin offen. Sehr wahrscheinlich handelt es sich hierbei um das Zusammenspiel mehrerer Mechanismen. Die gezielte Untersuchung HIV-spezifischer Zellen ist bei der weiteren Erforschung der genauen Zusammenhänge unerlässlich.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACAD	activated T-cell autonomous death
AICD	activation-induced cell death
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Apo-1	andere Bezeichnung für CD95 oder Fas
BCIP	Bromochloroindolyl-Phosphat
Bcl-2/Bcl-XL	antiapoptotische Proteine
C	Controller
CD95	Fas-Rezeptor, Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie; Bindung von Fas-L an Fas induziert den programmierten Zelltod;
CD95-L	Fas-Ligand, Mitglied der TNF-Familie membranständiger Cytokine; Bindung von Fas-L an Fas induziert den programmierten Zelltod;
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DMSO	Dimethylsulfoxid (CH ₃) ₂ SO
EBV	Epstein Barr Virus
Env	HIV-Gen, codiert für Transmembranglykoproteine, für die Fusion und das Einschleusen des Virus
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fas	CD95, Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie; Bindung von Fas-L an Fas induziert den programmierten Zelltod;
Fas-L	CD95-L, Mitglied der TNF-Familie membranständiger Cytokine; Bindung von Fas-L an Fas induziert den programmierten Zelltod;
FCS	Fetal Bovine Serum
HAART	high active antiretroviral therapy
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	humane Leukozytenantigene
HLA-DR	Aktivierungsmarker
HtrA2/OMI	proapoptotische Serinprotease
Gag	HIV-Gen, codiert Proteine für Viruskern und Matrix
gp120	Glykoprotein auf der Oberfläche des HI-Virus
ICS	Intrazelluläre Zytokinfärbung
ID	Identification
IL-2	Interleukin 2
INF γ	Interferon gamma
Ki67	Kernantigen, dient als Proliferationsmarker
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitisvirus
MGH	Massachusetts General Hospital
NBT	Nitroblau Tetrazolium

Nef	HIV-Gen, verstärkte Virusreplikation, Downregulation von CD4 und HLA-Klasse-II
PI	Progressor Gruppe I
PII	Progressor Gruppe II
PIII	Progressor Gruppe III
PIV	Progressor Gruppe IV
p53	Tumorsuppressorgen
PAH	Phytohemagglutinin
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
Pol	HIV-Gencodiert für die Reverse Transkriptase, Protease und Integrase
RNA	Ribonucleotid Acid
SFC	Spot Forming Cells
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SMAC	Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase
Tat	HIV-Gen, dient als Transkriptionsverstärker
TCR-CD3	T-Zell Rezeptor CD3
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
USA	United States of America
Vpr	HIV-Gen, verantwortlich für DNA-Transport in den Zellkern, Erhöhung der Virionenproduktion und das Anhalten des Zellzyklus
VL	Viruslast

7 Literatur

1. Fauci, A.S., *HIV and AIDS: 20 years of science*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 839-43.
2. Charles A. Janeway jr., P.T., Mark Walport, Mark J. Shlomchik, *Immunologie*. 5 ed. 2002, Heidelberg -Berlin: Spektrum Akademischer Verlag. 777.
3. Levy, J.A., *HIV and host immune responses in AIDS pathogenesis*. J Clin Apher, 1993. **8**(1): p. 19-28.
4. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, *New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. N Engl J Med, 1993. **328**(5): p. 327-35.
5. Levy, J.A., *The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease*. Trends Immunol, 2001. **22**(6): p. 312-6.
6. Schmitz, J.E., et al., *Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes*. Science, 1999. **283**(5403): p. 857-60.
7. Jin, X., et al., *Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques*. J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 991-8.
8. Walker, B.D., et al., *HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals*. Nature, 1987. **328**(6128): p. 345-8.
9. Koup, R.A., et al., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4650-5.
10. Borrow, P., et al., *Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 205-11.
11. Klein, M.R., et al., *Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1365-72.
12. Althaus, C.L. and R.J. De Boer, *Dynamics of immune escape during HIV/SIV infection*. PLoS Comput Biol, 2008. **4**(7): p. e1000103.
13. Price, D.A., et al., *Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1890-5.
14. Goulder, P.J., et al., *Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 212-7.
15. Allen, T.M., et al., *Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 386-90.
16. Bradley, L.M., et al., *Regulation of development and function of memory CD4 subsets*. Immunol Res, 2000. **21**(2-3): p. 149-58.
17. Lichterfeld, M., et al., *HIV-1-specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8(+) T cells producing both interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha*. Blood, 2004. **104**(2): p. 487-94.

18. Draenert, R., et al., *Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2004. **78**(2): p. 630-41.
19. Rahman, M.M. and G. McFadden, *Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens*. PLoS Pathog, 2006. **2**(2): p. e4.
20. Appay, V., *HIV-1 specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function*. J Exp Med, 2000. **192**: p. 63-65.
21. Alfano, M. and G. Poli, *Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection*. Mol Immunol, 2005. **42**(2): p. 161-82.
22. Klein, S.A., et al., *Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry*. Aids, 1997. **11**(9): p. 1111-8.
23. Nomura, L.E., et al., *IL-2 production correlates with effector cell differentiation in HIV-specific CD8+ T cells*. AIDS Res Ther, 2006. **3**: p. 18.
24. Gougeon, M.L., *Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 392-404.
25. Muro-Cacho, C.A., G. Pantaleo, and A.S. Fauci, *Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5555-66.
26. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
27. Martinou, J.C. and D.R. Green, *Breaking the mitochondrial barrier*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 63-7.
28. McMichael, A.J. and S.L. Rowland-Jones, *Cellular immune responses to HIV*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 980-7.
29. Goldberg, B. and R.B. Stricker, *Apoptosis and HIV infection: T-cells fiddle while the immune system burns*. Immunol Lett, 1999. **70**(1): p. 5-8.
30. Mahajan, K.N. and B.S. Mitchell, *Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10746-51.
31. Yang, O.O., et al., *Decreased perforin and granzyme B expression in senescent HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes*. Virology, 2005. **332**(1): p. 16-9.
32. Deeks, S.G., et al., *Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load*. Blood, 2004. **104**(4): p. 942-7.
33. Hazenberg, M.D., et al., *Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS*. Aids, 2003. **17**(13): p. 1881-8.
34. Gougeon, M.L., et al., *Lack of chronic immune activation in HIV-infected chimpanzees correlates with the resistance of T cells to Fas/Apo-1 (CD95)-induced apoptosis and preservation of a T helper 1 phenotype*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2964-76.
35. Schindler, M., et al., *Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1055-67.
36. Schindler, M., et al., *Inefficient Nef-mediated downmodulation of CD3 and MHC-I correlates with loss of CD4+T cells in natural SIV infection*. PLoS Pathog, 2008. **4**(7): p. e1000107.

37. Langford, S.E., J. Ananworanich, and D.A. Cooper, *Predictors of disease progression in HIV infection: a review*. *AIDS Res Ther*, 2007. **4**: p. 11.
38. Fahey, J.L., et al., *The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1*. *N Engl J Med*, 1990. **322**(3): p. 166-72.
39. Hazenberg, M.D., et al., *T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART)*. *Blood*, 2000. **95**(1): p. 249-55.
40. McCune, J.M., *The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease*. *Nature*, 2001. **410**(6831): p. 974-9.
41. Brenchley, J.M., et al., *Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells*. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2711-20.
42. Bestilny, L.J., et al., *Accelerated replicative senescence of the peripheral immune system induced by HIV infection*. *Aids*, 2000. **14**(7): p. 771-80.
43. Dagarag, M., et al., *Differential impairment of lytic and cytokine functions in senescent human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes*. *J Virol*, 2003. **77**(5): p. 3077-83.
44. Effros, R.B., et al., *Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis*. *Aids*, 1996. **10**(8): p. F17-22.
45. Betts, M.R., et al., *Analysis of Total Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific CD4(+) and CD8(+) T-Cell Responses: Relationship to Viral Load in Untreated HIV Infection*. *J Virol*, 2001. **75**(24): p. 11983-91.
46. Migueles, S.A., et al., *HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 1061-8.
47. Addo, M.M., et al., *Comprehensive analysis of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1)-specific T cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load*. *J Virol*, 2003. **77**(3): p. 2081-2092.
48. Sloan, E.M., et al., *Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication*. *Blood*, 1997. **89**(4): p. 1357-63.
49. Lieberman, J., et al., *Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection*. *Blood*, 2001. **98**(6): p. 1667-77.
50. Zhang, D., et al., *Most antiviral CD8 T cells during chronic viral infection do not express high levels of perforin and are not directly cytotoxic*. *Blood*, 2003. **101**(1): p. 226-35.
51. Borrow, P., et al., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. *J Virol*, 1994. **68**(9): p. 6103-10.
52. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. *Blood*, 2006. **107**(12): p. 4781-9.

53. Zajac, A.J., et al., *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function [see comments]*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2205-13.
54. Pantaleo, G. and R.A. Koup, *Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 806-10.
55. Letvin, N.L. and B.D. Walker, *Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 861-6.
56. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 350-4.
57. Peretz, Y., et al., *Human immunodeficiency virus (HIV)-specific gamma interferon secretion directed against all expressed HIV genes: relationship to rate of CD4 decline*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 4908-17.
58. Zuniga, R., et al., *Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 3122-5.
59. Peretz, Y., et al., *Functional T cell subsets contribute differentially to HIV peptide-specific responses within infected individuals: correlation of these functional T cell subsets with markers of disease progression*. Clin Immunol, 2007. **124**(1): p. 57-68.
60. Lichterfeld, M., G. Pantaleo, and M. Altfeld, *Loss of HIV-1-specific T cell proliferation in chronic HIV-1 infection: cause or consequence of viral replication?* Aids, 2005. **19**(11): p. 1225-7.
61. Zimmerli, S.C., et al., *HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(20): p. 7239-44.
62. Klenerman, P., V. Cerundolo, and P.R. Dunbar, *Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 263-72.
63. Dunbar, P.R., et al., *Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood*. Curr Biol, 1998. **8**(7): p. 413-6.
64. Goulder, P.J., et al., *Functionally inert HIV-specific cytotoxic T lymphocytes do not play a major role in chronically infected adults and children*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1819-32.
65. Estaquier, J., et al., *Fas-mediated apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists*. Blood, 1996. **87**(12): p. 4959-66.
66. Gougeon, M.L., et al., *Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993. **9**(6): p. 553-63.
67. Petrovas, C., et al., *HIV-specific CD8+ T cells exhibit markedly reduced levels of Bcl-2 and Bcl-xL*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4444-53.
68. Boudet, F., H. Lecoœur, and M.L. Gougeon, *Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potential cytotoxic CD8+ T lymphocytes during HIV infection*. J Immunol, 1996. **156**(6): p. 2282-93.
69. Michel, P., et al., *Reduced immune activation and T cell apoptosis in human immunodeficiency virus type 2 compared with type 1: correlation of T cell apoptosis with beta2 microglobulin concentration and disease evolution*. J Infect Dis, 2000. **181**(1): p. 64-75.

70. Gougeon, M.L., et al., *Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression.* J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3509-20.
71. Petrovas, C., et al., *PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection.* J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2281-92.
72. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction.* Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1198-202.
73. Shankar, P., Z. Xu, and J. Lieberman, *Viral-specific cytotoxic T lymphocytes lyse human immunodeficiency virus-infected primary T lymphocytes by the granule exocytosis pathway.* Blood, 1999. **94**(9): p. 3084-93.
74. Sousa, A.E., et al., *CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load.* J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3400-6.
75. Silvestri, G., et al., *Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia.* Immunity, 2003. **18**(3): p. 441-52.
76. Broussard, S.R., et al., *Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease.* J Virol, 2001. **75**(5): p. 2262-75.
77. Garber, D.A., et al., *Blockade of T cell costimulation reveals interrelated actions of CD4+ and CD8+ T cells in control of SIV replication.* J Clin Invest, 2004. **113**(6): p. 836-45.
78. Deeks, S.G. and B.D. Walker, *The immune response to AIDS virus infection: good, bad, or both?* J Clin Invest, 2004. **113**(6): p. 808-10.
79. Papagno, L., et al., *Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection.* PLoS Biol, 2004. **2**(2): p. E20.
80. Giorgi, J.V., et al., *CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38- CD8+ cells is associated with subsequent stable CD4+ cell levels.* The Multicenter AIDS Cohort Study Group. J Infect Dis, 1994. **170**(4): p. 775-81.
81. Saez-Cirion, A., et al., *HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6776-81.
82. Appay, V. and S.L. Rowland-Jones, *Premature ageing of the immune system: the cause of AIDS?* Trends Immunol, 2002. **23**(12): p. 580-5.
83. Bahbouhi, B., A. Landay, and L. Al-Harthi, *Dynamics of cytokine expression in HIV productively infected primary CD4+ T cells.* Blood, 2004. **103**(12): p. 4581-7.
84. Le Priol, Y., et al., *High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals.* J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5145-54.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. H. Klinker bedanken, der als mein Doktorvater die Vollendung meiner Doktorarbeit ermöglicht hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an PD Dr. Rika Draenert. Mit großer fachlicher Kompetenz und viel Engagement hat sie meine Arbeit betreut und maßgeblich zu ihrem Gelingen beigetragen. Sowohl während meines Forschungsaufenthaltes am Partners AIDS Research Center in Boston/USA, als auch bei der Auswertung und schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Eltern für die ausdauernde Unterstützung und Geduld bedanken, die sie mir stets entgegenbrachten. Sie haben mir mein Studium und diese Doktorarbeit erst ermöglicht.

Schließlich geht mein Dank an meinen Mann, der immer für mich da war und mich nach jedem Rückschlag wieder motiviert hat und zu Höchstleistungen angetrieben hat. Er hat mir stets den Rücken freigehalten und mich zur Fertigstellung der Arbeit angetrieben. Ihm und meiner kleinen Tochter Laura möchte ich diese Arbeit widmen.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

- Name: Heike Brackmann, geb. Tartler
- Geburtsdatum: 10.04.1981
- Geburtsort: Neumarkt/Rumänien
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Familienstand: verheiratet

BERUFSERFAHRUNG

- Seit 09/2007 Assistenzärztin der Kinderheilkunde
Kinderklinik und Poliklinik der Universitätsklinik Würzburg

AUSBILDUNG

- 1987 – 1989 Deutsche Grundschule Neumarkt/Rumänien
- 1989 – 1991 Goethe Grundschule Würzburg/Deutschland
- 1991 – 2000 Schönborn Gymnasium Würzburg/Deutschland
- 2000 – 2007 Julius Maximilian Universität Würzburg/Deutschland
Studium der Medizin
2002 Physikum Gesamtnote: 1,6
2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote:1,5) und
Approbation als Ärztin

DOKTORARBEIT

- `10/2003-`4/2004 Forschungsaufenthalt am
Partners AIDS Research Center
Harvard Medical School ,
Massachussets General Hospital Boston/USA

Thema: Funktionelle Lücken zytotoxischer T-Zellen im Laufe einer HIV Infektion -
Untersuchung der Zytokinproduktion und diverser Effektorfunktionen CD8+ T-Lymphozyten
bei HIV-Infizierten in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung.

FAMULATUREN UND PRAKTISCHES JAHR

- `02-`03/2001 Pflegepraktikum
Universitätsaugenklinik Würzburg/Deutschland
- `02/2003 Famulatur in der Kardiologie
St. Johann Spital Salzburg/Österreich
- `09/2004 Famulatur Allgemeinarztpraxis Würzburg/Deutschland
- `02/2005 Famulatur in der Orthopädie
König Ludwig Haus Würzburg/Deutschland
- `09/2005 Famulatur in der Pädiatrie
Nepean Hospital Sydney/Australien
- `03-`06/2006 1. Tertial
Universitätskinderklinik Würzburg/Deutschland
- `06-`09/2006 2. Tertial
Chirurgische Klinik der Universität Würzburg/Deutschland
- `10/2006-`01/2007 3. Tertial
Innere Medizin
Ospedale Civico Lugano/Schweiz

STIPENDIEN

- E-fellows-Interneerstipendium seit `06/2000
- Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes seit `01/2001

SPEZIELLE QUALIFIKATIONEN

- `11/2002-`11/2003 Laborerfahrung mit molekularbiologischen Methoden im
Virologischen Institut der Universitätsklinik Würzburg

SPRACHKENNTNISSE

- Deutsch: Muttersprache
- Englisch: sehr gut
- Rumänisch: sehr gut
- Italienisch: gut
- Latein