

# **Zytotoxische-T-Lymphozyten (CTL)-vermittelte Zytolyse bei der HIV-Infektion**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Robert Ehret  
aus  
Gelsenkirchen

Würzburg 2003

## Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis .....	I
	Abkürzungen .....	IV
1.	Einleitung .....	1
	Zielsetzung der Arbeit .....	11
2.	Material .....	12
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	12
2.2	Feinchemikalien und Reagenzien .....	13
2.3	Peptide .....	15
2.4	Antikörper .....	15
2.5	Verwendete Zelllinien .....	16
2.6	CTL-Klone (nicht selbst klonierte) .....	17
2.7	Verwendete Viren .....	18
2.7.1	Vakzinia Viren .....	18
2.7.2	HIV .....	19
3.	Methoden .....	20
3.1	Medien und Kultur von Bakterien .....	20
3.2	Zellkultur .....	21
3.2.1	Passagieren von adhärennten Zelllinien .....	21
3.2.2	Passagieren von Suspensionszellen .....	22
3.2.3	Kultur von primären T-Zellen .....	22
3.2.4	Bestimmung der Zelldichte und -vitalität .....	23
3.2.5	Kryokonservierung .....	23
3.3	Gewinnung von monozytären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) .....	24
3.4	EBV-Transformation von B-Zellen .....	24
3.5	Selektion von primären polyklonalen CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen .....	25
3.6	Stimulation primärer T-Zellen .....	25
3.7	Gewinnung von klonalen primären CD8+ HIV-spezifischen T-Zelllinien mittels Klonierung in Grenzverdünnung .....	26
3.8	Viruskultur .....	27
3.8.1	Anzucht von Vakzinia-Viren .....	27
3.8.2	Virustiterbestimmung .....	27
3.9	Herstellung von rekombinanten Vakzinia-Viren durch homologe Rekombination .....	28
3.10	Infektion von Suspensionszellen mit Vakzinia-Virus .....	29

3.11	Infektion mit HIV .....	30
3.12	Durchflußzytometrie.....	30
3.13	Antikörpermarkierungen für die Durchflußzytometrie.....	31
3.13.1	Extrazelluläre Färbungen .....	31
3.13.2	Intrazelluläre Färbungen .....	32
3.14	Für die Immunfärbungen verwendete Antikörper und die eingesetzten Mengen .....	32
3.15	Indirekte intrazelluläre Immunfärbung von adhärenenten VV-infizierten Zellen .....	33
3.16	Western-Blot.....	33
3.16.1	Probengewinnung.....	34
3.16.2	Tricin-SDS-PAGE und Elektrophorese.....	34
3.16.3	Immunfärbung.....	35
3.17	Isolation niedermolekularer DNA und ihre Auftrennung in der Agarosegel- elektrophorese .....	35
3.18	Ermittlung der Zytotoxizität in <sup>51</sup> Chromfreisetzungsversuchen.....	36
4.	Ergebnisse .....	38
4.1	CD4+ HIV-spezifische CTL.....	38
4.1.1	Lyse von HIV-1 Glykoprotein exprimierenden autologen Zellen durch die Env-spezifischen Klone 414.5 und 414.45.....	38
4.1.2	Vergleich der CD4+ CTL-vermittelten Lyse im autologen und heterologen System.....	40
4.1.3	Spezifische, CD4+ CTL-vermittelte Lyse von Targetzellen, die mit rekombinantem HIV-Glykoprotein (r-gp120) sensitiviert wurden.....	41
4.2	CD8+ HIV-spezifische CTL.....	42
4.2.1	Zusammenfassung der Gewinnung von HIV-spezifischen CD8+ CTL .....	42
4.2.2	Nähere Beschreibung der verwendeten HIV-spezifischen CD8+ CTL.....	42
4.2.3	Vorbereitende Untersuchungen .....	45
4.2.3.1	Inhibition der CD95-induzierten Apoptose durch das Vakzinia-Virus B13R- Genprodukt .....	45
4.2.3.2	Homologe Rekombination von Vakzinia-Viren zum Einschleusen von HIV-Proteinen .....	47
4.2.3.3	Concanavalin A-vermittelte Zytolyse.....	48
4.2.3.3.1	Con A-vermittelte Lyse von autologen B-Lymphoblasten durch CD8+ HIV-spezifische T-Zellklone enthält einen deutlichen Kalzium-unabhängigen Anteil, der klonspezifisch in der Höhe schwankt .....	48
4.2.3.3.2	Die Höhe des Kalzium-unabhängigen Anteils an der Zytolyse ist auch von den verwendeten Targetzellen abhängig .....	49

---

4.2.3.3.3	Hemmstoffe der CD95-induzierbaren Apoptose inhibieren den Kalzium-unabhängigen Anteil der Con A-vermittelten Lyse .....	51
4.2.4	Mechanismen der Antigen-spezifischen Zytolyse CD8+ CTL.....	52
4.2.4.1	Lysekinetik mit dem HIV-Gag-spezifischen CTL-Klon 38a15 .....	52
4.2.4.2	Das B13R-Genprodukt des Vakzinia-Virus WR vermag sowohl die Peptid-induzierte als auch die durch virale HIV-Proteinexpression initiierte Antigen-spezifische Kalzium-unabhängige Zytolyse zu unterdrücken.....	53
4.2.4.3	Der Kalzium-unabhängige Anteil der CTL-vermittelten spezifischen Zytolyse ist ein apoptotischer Prozess, der über CD95 initiiert wird.....	54
4.2.4.4	Die spezifische Lyse der CD4+ Zelllinie AA2 wird ebenfalls über Perforin und CD95 vermittelt .....	55
4.2.4.5	Vergleichende Färbungen von Oberflächenmolekülen bei CD4-positiven primären Zellen und T-Zellklonen .....	57
4.2.4.6	Spezifische CTL-vermittelte Zytolyse von primären CD4-positiven Zellen.....	58
5.	Diskussion .....	60
6.	Zusammenfassung.....	71
	Conclusions.....	72
7.	Literaturverzeichnis.....	73
8.	Eigene Publikationen .....	87
9.	Danksagung .....	89
10.	Lebenslauf .....	90

**Abkürzungen**

AA	Acrylamid
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
allg.	allgemein
APS	Ammoniumpersulfat
bisAA	Bisacrylamid
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdeoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
Con A	Concanavalin A
crmA	cytokine response modifier A
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
DEVD	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintertraessigsäure
EGTA	Ethylenglycintetraessigsäure
env	envelope
FACS	fluorescence activated cellsorting
FADD	Fas-associated Protein with Death Domain
Fas-L	Fas-(CD95/APO-1)-Ligand
FCS	foetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
gp	Glykoprotein
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICE	Interleukin-1 $\beta$ Converting Enzyme
IE	internationale Einheiten
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton

LB	Luria-Bertani-Medium
LTNPs	long-term non-progressors
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
P	Protease
PBMC	periphere blood mononucleare cells
PBS	Poly-buffered saline
pfu	plaque forming unite
PHA	Phytohämagglutinin
POD	Peroxidase
RPE(-Cy5)	R-Phycoerithrin (-Cyanfarbstoff)
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TCID <sub>50</sub>	tissue culture infectious dose (50%)
TCR	T-cell receptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
ü. N.	über Nacht
VV	Vakzinia-Virus
WT	Wildtyp
YVAD	Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethylketon
ZVAD	N-benzyloxycabonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluormethylketon

## 1. Einleitung

Bei Infektionen mit Viren werden im allgemeinen zwei Wege der erworbenen Immunreaktion mit unterschiedlicher Funktion initiiert: die zelluläre Immunantwort kontrolliert die Infektion, während die humorale Antwort weitere Infektionen durch die gleichen Erreger verhindern soll (Zinkernagel 1996). Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Lymphozyten (T = im Thymus gereift) vermittelt, die Zytokine freisetzen und Fremd-Antigen-präsentierende Zellen zerstören. Diese zelluläre Antwort erfolgt normalerweise parallel zur humoralen (Antikörper) Reaktion, die die Generierung und Freisetzung neutralisierender Antikörper einschließt.

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), die von sogenannten T-Helferzellen (CD4+ Lymphozyten) unterstützt werden, sind die Hauptakteure bei der Vernichtung infizierter Zellen im Rahmen einer antiviralen T-Zell-Antwort. Dies konnte für eine Reihe viraler Infektionen gezeigt werden (Zinkernagel und Doherty 1974, Yap et al., 1978, Sethi et al., 1983, McMichael 1983, reviewed in Ada und McElrath 1997).

Auch bei einer HIV-1-(im Folgenden einfach HIV-) Infektion, in der Teile des Immunsystems, CD4+ T-Zellen, von HIV infiziert werden und deren Depletion eine zentrale Rolle im Fortschreiten der Infektion darstellt, wird immer deutlicher, daß die HIV-spezifischen Lymphozyten eine entscheidene Rolle bei der Kontrolle der Infektion und deren Verlauf innehaben.

### Klinik und Therapie der HIV-Infektion

Obwohl eine HIV-Infektion in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren einen sehr individuellen Verlauf haben kann, läßt sich doch ein überwiegend gültiges Schema darstellen (White und Fenner 1994), in dessen Zentrum der Verlust an CD4+ T-Zellen steht:

Der Infektion mit HIV folgt eine 3-6 wöchige Phase, in der sich die Viren ungehemmt vermehren. Die Ausbildung dieser Virämie kann von Grippe-ähnlichen Symptomen, wie Unwohlsein, Fieber, Gliederschmerzen, Anschwellen der Lymphknoten, begleitet sein. Zu diesem Zeitpunkt können Virus-RNA-Mengen von bis zu  $1 \times 10^7$  Kopien pro ml gemessen werden und gleichzeitig ein Absinken der CD4+ T-Zellzahl unter 500 Zellen pro  $\mu\text{l}$  vorkommen (Mellors et al., 1995). Mit dem Einsetzen der humoralen (Serokonversion), sowie parallel der zellulären Immunabwehr, wird die Virämie zurückgedrängt, die Viruslast sinkt drastisch und die CD4+ T-Zellzahl steigt auf nahezu normale Werte. Es schließt sich eine individuell unterschiedliche Latenzphase an, die von einem mehr oder weniger schnellen Verlust an CD4+ Lymphozyten bei relativ geringer Viruskopienanzahl geprägt ist (mehr zu den Mechanismen dieses Verlustes siehe unten). Die Geschwindigkeit des Zellverlustes ist ein Indiz für das Fortschreiten der Immunschwäche, die eine schnelle (2-4 Jahre), "normale" (bis 10 Jahre),

langsame (länger als 10 Jahre) oder keine Progression aufzeigen kann (rapid, normal, slow und long-term non-progressors). Die CD4+ Zellzahl kann damit, neben der Viruslast, bei der im Gegensatz dazu eine Erhöhung mit Fortschreiten korreliert, für eine Prognose der Überlebenszeit dienen (Schnittman et al., 1990).

Sinkt die CD4+ Zellzahl unter ein Niveau von 200 Zellen pro  $\mu\text{l}$ , kommt es in der Regel bei HIV-Infizierten vermehrt zu opportunistischen Infektionen, zum Beispiel beginnend mit Candida-Infektionen (Oesophagus) und/oder länger anhaltenden infektionsbedingten Durchfällen und Fieber, über verschiedene bakterielle Infekte mit Mykobakterien (Tuberkulose) und atypischen Mykobakterien, zusätzliche virale Erkrankungen mit verschiedenen Herpes-Viren insbesondere Cytomegalieviren (-Retinitis, generalisierte Infektion), Pilzen (z.B. Candidiasis, Pneumocystis carinii-Pneumonie) und parasitäre Befälle (Toxoplasma-Encephalitis), bis zu malignen Tumoren (Karposi-Sarkom, B-Zell-Lymphom) und neurologischen Symptomen (HIV-Enzephalopathie, -Demenz). Eine oder mehrere dieser Erkrankungen oder eine CD4+ Zellzahl unter 200 Zellen pro Mikroliter definieren das Vollbild AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Nach Gewichtsverlusten, Auszehrung und allgemeiner Schwächung erliegen die Patienten meist einer oder der Kombination mehrerer opportunistischer Infektionen.

In den letzten Jahren ist es mit der Entwicklung antiretroviraler Medikamente gelungen in dieses Verlaufsschema einzugreifen und zumindest zeitweise die Progression zu unterbinden. Das oben beschriebene Schema wird dadurch in Richtung "Langzeitüberlebende" verschoben.

Durch die Kombination von meist drei oder auch vier verschiedenen Medikamenten, die sich gegen HI-Virus-eigene, für dessen Replikationszyklus essentielle Enzyme (Reverse Transkriptase (RT) und Protease (P)) richten und diese blockieren, kann eine nahezu vollständige Unterdrückung der Virusvermehrung erreicht werden. Durch diese hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) wird die Viruslast bei einem Großteil der Patienten, unter Umständen selbst in relativ weit fortgeschrittenen Stadien, häufig unter die Nachweisgrenzen (je nach Testverfahren zwischen 20 und 500 Kopien/ml Serum) gedrückt. Zwei Ziele werden dadurch erreicht: Erstens erhält das Immunsystem die Möglichkeit sich zu "erholen", die CD4+ Zellzahlen steigen an, der allgemeine Gesundheitszustand der Infizierten bessert sich. Zweitens verringert sich im Vergleich zu früheren antiretroviralen Therapien, die die Virusreplikation nicht vollständig zu unterdrücken vermochten, die Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung des HIV gegen die Medikamente. Denn durch seine extrem hohe Mutationsrate von ca.  $3,4 \times 10^{-5}$  pro Basenpaar pro Replikationszyklus bei einer Genomgröße von  $10^4$  Basenpaaren (Coffin 1995) ist das Virus bei ungehemmter Vermehrung theoretisch in der Lage, an jeder Stelle seines Genoms während eines Replikationszyklusses mehrmals zu mutieren. Je mehr Virus daher bei bestehender Therapie repliziert, desto höher die Wahr-



scheinlichkeit, daß es Resistenzen entwickelt und so der Wirkung eines Medikamentes entgeht.

Unterstützt wird dieser Effekt der verringerten Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung unter HAART, durch die Wahl von Wirkstoffen innerhalb einer Therapie, die an unterschiedlichen Stellen der HIV-Enzyme (RT/P) ansetzen und daher andere Resistenzmutationen für ein Entkommen erfordern. Die Entwicklung zusätzlicher Medikamente, die neben den HIV-eigenen Enzymen, unter anderem auch die Integrase, außerdem Prozesse beim kontaktvermittelten Eindringen der HI-Viren in die Zellen (z.B. Chemokin-Varianten oder der Peptid-Hemmstoff T-20) hemmen, erweitern hier die Möglichkeiten (Gallo 1998).

Weitere Ziele im Kampf gegen die Infektion sind die Eliminierung des HIV aus dem gesamten Körper, inklusive der Reservoirs in z.B. den Dendritischen Zellen der Lymphknoten (Pantaleo et al., 1993 und 1999), was allerdings nach neueren Schätzungen einen äußerst langen Zeitraum von bis zu 60 Jahren oder länger in Anspruch nehmen könnte (Siliciano 1999).

Näherliegende Ziele sind der Aufbau und die Wiederherstellung der körpereigenen Abwehr, z.B. auch durch die Entwicklung von therapeutischen Impfstoffen, und natürlich auch weiterhin der Schutz vor Neuinfektion, sei es durch Prävention oder die Entwicklung von protektiven Impfstoffen.

### Pathogenese des CD4+ T-Zellverlustes

Obwohl der Verlust der CD4+ Zellen im Zuge der HIV-Erkrankung sehr früh als zentrales Element erkannt wurde und er lange Zeit (bis zur Einführung der HIV-RNA-Kopien-Messung) als deutlichstes Zeichen der Progression der Infektion diente, dauert die Diskussion um die Mechanismen dieser Reduktion bis heute an.

Die unterschiedlichsten beobachteten Prozesse wurden hierin eingebracht:

Zunächst bringt die immense Produktion von HIV-Partikeln selbst produktiv infizierte Zellen um (Wei et al., 1995) und, wie kürzlich erst für die Situation in vivo gezeigt werden konnte (Brodie et al., 1999), töten HIV-spezifische CTL gezielt, auch im lymphatischen Gewebe, infizierte Zellen. Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (Baum et al., 1996) spielt vielleicht ebenfalls eine Rolle. Weitere Beobachtungen beschrieben apoptotische Prozesse in CD4+ T-Lymphozyten von HIV-Patienten nach Ex-Vivo-Stimulation bzw. Aktivierung durch Mitogene und Superantigene (Ameisen 1992, Gougeon et al., 1993 und 1996), was auf eine erhöhte Bereitschaft der Zellen zur Apoptose hindeutet. Passend hierzu konnte eine erhöhte Präsenz des CD95-Rezeptors (Fas) und -Liganden, den Schlüsselmolekülen für die Induktion von Apoptose, auf primären Lymphozyten von HIV-infizierten im Vergleich mit nicht infizierten Probanden gezeigt werden (Badley et al., 1996 und Bäumler et al., 1996).

In Abhängigkeit von HIV-Glykoprotein (gp120)-Expression und Anwesenheit von CD4-Molekülen fanden Laurent-Crawford et al. (1991 und 1993) sowie Zhang et al. (1997) Apoptose in primären T-Lymphozyten und CD4-positiven Zelllinien. Diese Form der Induktion des Zellselbstmordes kann auch durch lösliches gp120, wie es teilweise von HIV-infizierten Zellen ins umgebende Medium abgegeben wird, nicht infizierte Zellen betreffen. Finkel et al. (1995) wiesen nach, daß Apoptose in Lymphknoten ganz überwiegend nicht infizierte Zellen betrifft.

Auch die Bildung von Synzytien (mehrkernige Riesenzellen) bezieht nicht infizierte Zellen mit ein (Lifson et al., 1986). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß es beim Kontakt von HIV-infizierten oder auch nur gp120-exprimierenden Zellen mit CD4+ T-Lymphozyten zur Zellyse beider Populationen kommt (Heinkelein et al., 1995 und 1996). Hiervon sind in großer Zahl nicht infizierte CD4+ Zellen betroffen, wobei zur Initiierung ein Anteil von einem Prozent gp120 exprimierender Zellen ausreichend ist. In besonderem Maße von dieser Zerstörung betroffen sind Gedächtniszellen (CD45RO+, CD29 hi+), während CD8+ Zellen unbeeinflusst bleiben. Diesem Ereignis liegt ein aktiver apoptotischer Prozeß zugrunde (Ohnimus et al., 1997), der durch spezielle peptidische Hemmstoffe der Apoptose inhibiert werden kann.

Diese vielen möglichen apoptotischen Depletionsmechanismen führten zu dem Vorschlag, daß hier eventuell die Chance für einen therapeutischen Ansatz, z.B. in Form einer anti-apoptotischen Therapie durch die Unterbrechung des Signalübertragungsweges vom Fas-Rezeptor aus abwärts, gegeben sei (Estaquier et al., 1996).

Die beschriebenen Prozesse können sicher alle zum akuten Verlust von CD4+ Zellen beitragen, aber ihr Anteil an der dauerhaften, langzeitigen Depletion bleibt fraglich.

Die Messungen der quantitativen Verhältnisse von Virusmengen bzw. Replikation (Produktion von bis zu 10 Milliarden Viren täglich) und CD4-Zellverlust bzw. -Erneuerung (1-2 Milliarden Zellen täglich) im Zusammenhang mit der Gabe von potenten HIV-1 Protease-Inhibitoren machte deutlich, daß das Immunsystem während der HIV-Infektion in höchstem Maße aktiviert ist (Wei et al., 1995 und Ho et al., 1995). David Ho entwickelte hieraus das sogenannte "sink"-(Waschbecken)-Modell: Er verglich die Situation des Immunsystems mit einem mäßig gefüllten Becken, dessen Zu- und Abfluß, entsprechend der CD4-Zellerneuerung und -zerstörung, weit geöffnet sind und sich die Waage halten, solange bis sich die regenerativen Möglichkeiten, im Bild der Zufluß, zu erschöpfen beginnen.

Die Arbeitsgruppe um Frank Miedema argumentierte gegen diese Theorie, nachdem sie zwischen HIV-Infizierten und nicht infizierten Probanden keine essentiellen Unterschiede in den Längen der T-Zelltelomere, die als ein Maß für die Häufigkeit der Teilungen der Zelle und darüber ein Indiz für die Teilungsrate einer Zellpopulation sind, finden konnten (Wolthers et al., 1996). Die Veröffentlichungen von Fleury et al. (1998) und Hellerstein et al.

(1999), die nachwiesen, daß die CD4+ T-Zellproduktion in HIV-Infizierten nicht signifikant höher ist als die in HIV-Negativen, stehen ebenfalls gegen das obige Modell.

Nur wenn es eine offensichtliche Zerstörung ohne eine erhöhte Produktion gäbe, dann würden verlorengangene T-Zellen nicht ersetzt. Dies läßt Hellerstein vermuten, daß eine aktiv unterdrückte und daher ungenügende Erneuerung von CD4+ Zellen als Hauptursache für die Depletion verantwortlich ist. Im Anstieg der CD4+Zellen nach zwölfwöchiger HAART vermuten sie ein Aufheben der Inhibition der Produktion, die durch das effektive Unterdrücken der Virusreplikation erreicht wird.

Festzuhalten bleibt, daß es zwei Hauptarme in den potentiellen Mechanismen der CD4+ Zellzerstörung gibt:

Erstens, Effekte des Virus direkt; durch hohe Produktion von Viruspartikeln in infizierten Zellen oder durch Wechselwirkungen von HIV-Glykoprotein mit CD4-Molekülen.

Zweitens, immunologische Zerstörungen, wie die Induktion von Apoptose mittels Fas-Ligand, die Antikörper bedingte zellvermittelte Zytotoxizität und vor allem HIV-spezifische CTL, die infizierte Zellen, unter anderem T-Helferzellen, töten.

Hier zeigt sich der Grund für die besondere Virulenz des HIV:

Es infiziert immunologisch aktivierte Zellen, so daß gerade HIV-spezifische CD4+ T-Helferzellen, die ganz zu Beginn der Infektion verstärkt proliferieren, um die CTL-Antwort zu initiieren, zu verstärken und zu erhalten (Rosenberg et al., 1997), bevorzugtes Ziel des Virus sind, und damit, so oder so, umgebracht werden.

### Bedeutung der zytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) in der HIV-Infektion

Einen Einblick in die Bedeutung der CTL in der HIV-Infektion gewinnt man, wenn man sich die spezifischen Verhältnisse bei "Langzeitüberlebenden" (long-term non-progressors LTNPs) betrachtet. Diese zeichnen sich über Jahre hinweg durch relativ hohe CD4+ Zellzahlen, sehr niedrige Viruslast (4-20x niedriger als bei Progredienz), normal strukturierte Lymphknoten bei einer allgemein erhöhten CD8+ Zellzahl aus (Pantaleo et al., 1996) und haben besonders starke CTL-Antworten (Harrer et al., 1996c). LTNPs behalten im Vergleich zu Patienten mit fortschreitender Infektion ihren CD8+ CTL-Pool (Ponterilli et al., 1998), ebenso wie ihre breite, HIV-spezifische, proliferative CD4+ T-Zellantwort (Rosenberg et al., 1997).

Die zytotoxischen T-Zellen, die aus HIV-Patienten isoliert werden können, sind in der Regel vom CD8+ Typus und erkennen Peptide, die mit dem humanen Leukozytenantigen-(HLA)-Komplex Klasse I präsentiert werden. Zwei Berichte sind bekannt, in denen auch CD4+ Klasse-II-restringierte CTL-Klone beschrieben wurden (Littau et al., 1992 und Curiel et al.,

1993), wobei im letzteren die HLA-Klassifikation nicht ganz eindeutig war. Die Bedeutung von CD4<sup>+</sup> CTL in der HIV-Infektion ist ebensowenig klar, wie der Grund für das seltene, wenn überhaupt regelmäßige Auftreten derselben im Vergleich zum Erscheinen bei anderen viralen Infektionen, wie z.B. mit Influenza-Viren (Morrison et al., 1986), was einer Klärung bedarf.

Die Unterdrückung der HIV-Replikation durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt nach Yang et al. (1997) über zwei Mechanismen: Einmal durch die Produktion von inhibitorischen Faktoren, unter anderem MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES, die sowohl Makrophagen- als auch T-Zell-trope HIV-Stämme bei der Infektion hemmen können, und zweitens durch Zytolyse von HIV-infizierten Zellen, der Yang die Schlüsselrolle in der antiretroviralen Aktivität einräumt. Er beschreibt die Elimination von HIV aus Zellkulturen durch spezifische CTL und konnte auch bei einem Verhältnis von 1:1000 (CTL zu CD4<sup>+</sup> Zellen) eine Inhibition der Virusreplikation nachweisen, was den Verhältnissen in vivo entspräche. Der tatsächliche Nachweis der zytotoxischen Aktivität von CTL in vivo ist, wie oben bereits erwähnt, Brodie et al. (1999) erstmals gelungen.

Weiterhin untermauert wird die Bedeutung der zytotoxischen T-Zellen durch die Beobachtung, daß im peripheren Blut Infizierter mit großer Häufigkeit HIV-spezifische T-Zellen anzu-treffen sind (Moss et al., 1995) und daß diese Häufigkeit (bis zu 1% der PBMC, Gotch et al., 1990) sich umgekehrt proportional zur viralen Plasma-RNA Menge verhält (Ogg et al., 1998).

Außerdem konnten CTL aus den verschiedensten Geweben isoliert werden, z.B. aus der Lunge (Plata et al 1987), den Lymphknoten (Hadida et al., 1995) oder dem zentralen Nervensystem (Jassoy et al., 1992). CTL können gegen die meisten HIV-Proteine gerichtet sein und die unterschiedlichsten Epitope erkennen (reviewed in McMichael und Walker 1994).

Ein asymptomatischer Krankheitsverlauf wurde mit einer HIV-gag-Protein spezifischen Antwort assoziiert (Klein et al., 1995), wobei bis zu 6 unterschiedliche aktive CTL-Klone, die gegen Epitope verschiedener HIV-Proteine gerichtet waren, aus einem Patienten isoliert werden konnten (Harrer et al., 1996b).

Mit der Entwicklung der "Tetramer-Technik" in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß der Anteil der HIV-spezifischen CTL durchaus auch bis zu 10 Prozent betragen kann (McMichael et al., 2000), wobei deren Funktionalität noch diskutiert wird.

Bei einem Fortschreiten der Infektion wird die HIV-spezifische CTL-Aktivität schlechter nachweisbar (Carmichael et al., 1993) und eine Abnahme der Interleukin-2-(IL-2)-stimulierbaren CTL-Antwort wurde beobachtet (Jin et al., 1998). Die Gründe für diese Abnahme sind noch nicht geklärt. Diskutiert wird unter anderem ein zur CD4-Depletion sekundärer Verlust an CTL, da die Aufrechterhaltung der zellulären Immunaktivität und auch die CTL-Gedächtniszellen abhängig von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sind.

Clerici und Shearer (1993) schlagen als Grund ein "Umschalten" von einer eher T-Helfer-1- (Th1)-bestimmten Antwort, die mit der Sekretion von IL-2, Interferon- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor- $\beta$  eine zelluläre Immunität fördert, zu einer Th2-dominierten Immunantwort vor, die mit dem Ausschleiden von IL-4, -5, -10 und -13 die Antikörperproduktion unterstützt.

Möglich wäre auch eine "Erschöpfung" der CTL-Klone durch ständige Aktivierung durch Antigen und resultierender Teilung, wofür die verkürzten Telomerregionen in der CD8<sup>+</sup> Zellpopulation von HIV-Infizierten (Effros et al., 1996) und auch die gestiegene Bereitschaft zur Apoptose in CD4<sup>+</sup> wie CD8<sup>+</sup> Zellen (Gougeon et al., 1996) sprechen würden.

Ein anderer Grund für das Versagen der zellulären Kontrolle der Infektion kann das Auftreten von sogenannten "Escape-Mutanten" des HIV sein. Goulder et al. (1997) stellen das Auftreten von "Escape-Mutanten" in einen Zusammenhang mit der Progression zu AIDS. Die HIV-spezifischen CTL üben einen Selektionsdruck auf das Virus aus, das durch Mutationen diesem zu entkommen versucht. Die Mutationen können dabei die Präsentation durch die HLA-Moleküle betreffen (Borrow et al., 1996), die Interaktion mit dem T-Zellrezeptor stören (Rid et al., 1996) oder auch die CTL-Erkennung verhindern (Koup 1994). Möglich sind auch Mutationen im Epitop-flankierenden Bereich, die dann das der Präsentation vorrangige Prozessieren verändern würde, so daß das zuvor erkannte Epitop nicht mehr an der Oberfläche erscheint (Couillin et al., 1994).

Auch wenn häufig "Escape-Mutanten" beschrieben werden können, so bleibt ihre Interpretation im Zusammenhang mit dem allgemeinen Krankheitsverlauf doch schwierig, da die immunologischen Situationen sehr individuell sind. So argumentieren Miedema und Klein (1996), daß Mutationen gegen mehr als zwei Epitope gleichzeitig, die notwendig wären einer häufig gefächerten CTL-Antwort zu entkommen, trotz der hohen Mutationsrate des HIV sehr unwahrscheinlich sind.

Beobachtungen, die zeigen, daß teilweise die CTL-Aktivitäten zu 90% von einem Klon dominiert werden (Goulder et al., 1997), lassen das Entkommen wieder wahrscheinlicher werden. Der Erkennung durch einen CTL-Klon entwischt, könnte dann ein anderer CTL-Klon die führende Rolle übernehmen und expandieren, so daß die multiplen CTL-Antworten, die in vielen Patienten gefunden werden können, eine Folge des Entkommens und der Selektion des Virus wären (Nowak et al., 1995 und Price et al., 1997).

Deutlich wird jedenfalls durch das Auftreten von "Escape-Mutanten", daß die CTL einen Selektionsdruck auf das Virus ausüben, es also direkt bekämpfen und somit eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HIV-Infektion spielen.

### Mechanismen der CTL-vermittelten Zytolyse

Die T-Zell vermittelte Zytolyse ist *in vitro* durch zwei unterschiedliche Mechanismen gekennzeichnet (Kägi et al., 1994, Lowin et al., 1994).

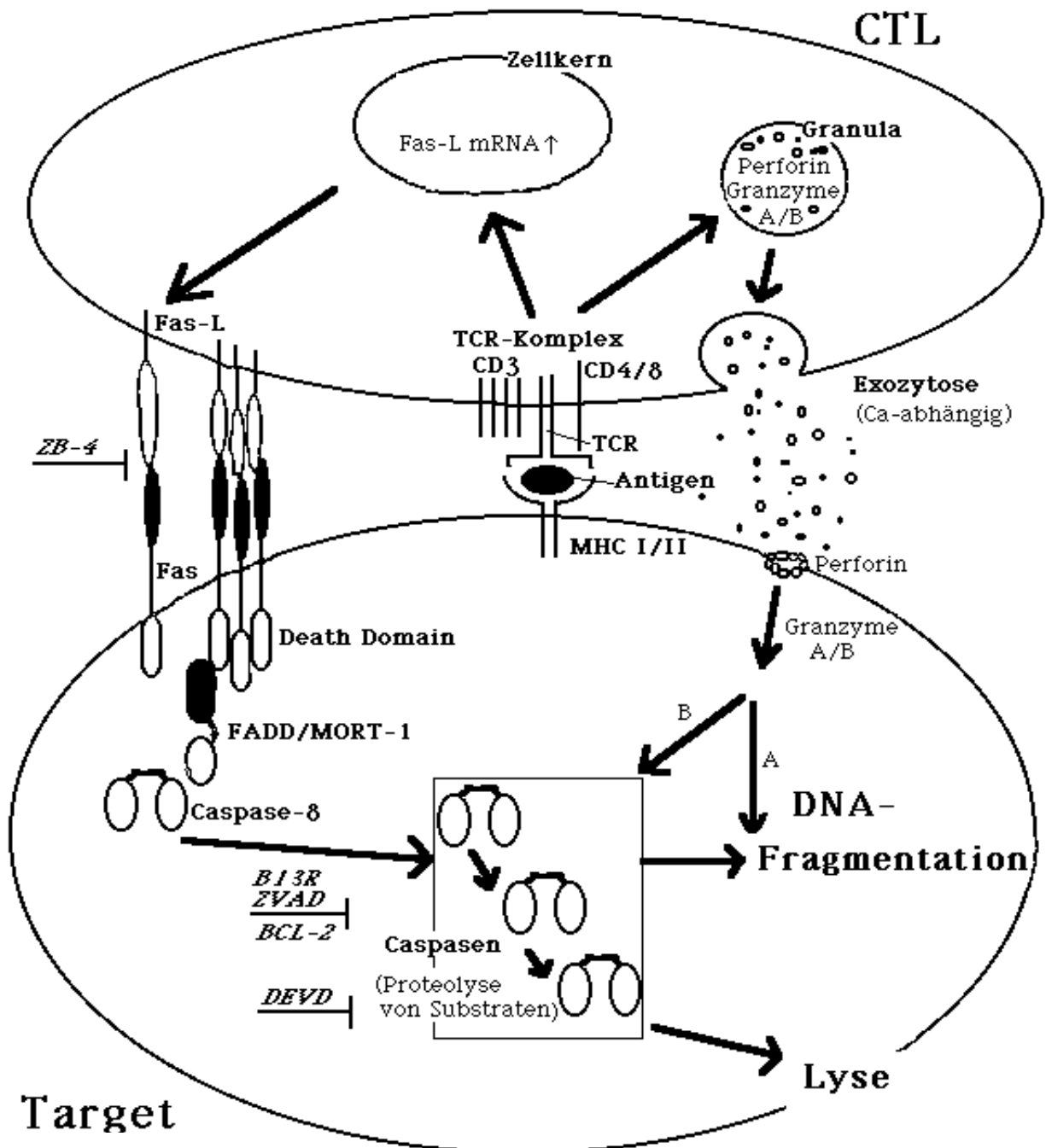
Der Erste ist abhängig von extrazellulärem Kalzium und führt zur Freisetzung von Perforin und Serinesterasen (Granzymes) aus Granula, was zu DNA-Fragmentation und Lyse der Zielzelle führt (Heusel et al., 1994). Das Perforin (auch: Pore-forming-Enzyme), das N-terminal Homologien zum Komplement-Lyse-Faktor aufweist, bildet im Durchmesser bis zu 20 nm weite Poren in der Membran der Zielzelle, was zur Induktion der Lyse ausreicht, nicht aber für die Veränderungen im Zellkern (Chromatinkondensation) verantwortlich ist (Duke et al., 1989, Liu et al., 1995). Für die apoptotischen Ergebnisse dieses Mechanismus sorgen die mitausgeschütteten, durch die Poren eindringenden "Granzymes" (A und B), die auf unterschiedlichen Ebenen (s. auch Abb. 1.1) eingreifen (Shi et al., 1992, Sarin et al., 1997). Die T-Zellen selbst scheinen dabei gegen die Perforinlyse unempfindlich zu sein (Liu et al., 1995).

Der zweite Lyseweg ist Kalzium-unabhängig und erfordert CD95-(Fas, APO-1)-Expression auf der Target- bzw. CD95-Ligand (CD95-L) auf der Effektorzelloberfläche (Rouvier et al., 1993). CD95 ist ein auf vielen Zellen anzutreffender Oberflächenmarker und Mitglied der TNF-Rezeptorsuperfamilie, der Apoptose induzieren kann (Nagata und Goldstein 1995). Der CD95-L wird auf T-Zellen nach Exposition mit Antigen oder Stimulation über CD3 exprimiert (Remsdell et al., 1994). Nach der Bindung des Liganden trimerisiert das CD95-Molekül (s. auch Abb. 1.1) und intrazellulär entsteht die sogenannte "Death Domain", die durch die Bindung von FADD/MORT-1 (**F**as-**A**ssociating Protein with **D**eath **D**omain) die Caspase-8 (**C**ystein **a**spartasen) aktiviert und darüber eine Kaskade von Caspasen (Alnemri et al., 1996) in Gang bringt, die letztlich zur Zerstörung der Zelle führt (Nagata 1997).

Die meisten Untersuchungen zu den Lysemechanismen wurden im murinen System, an primären CD4+ und CD8+ T-Zellen bzw. an Hybridom-Zelllinien durchgeführt. Die Zuhilfnahme von "Knock-out"-Mäusen, die verschiedene Defekte im Zusammenhang mit der CD95-induzierten Apoptose aufwiesen oder z.B. kein Perforin bildeten (Nagata und Goldstein 1995), war dabei sehr förderlich.

Auch die Inhibition eines Weges oder eines seiner Teilschritte ermöglicht besondere Einblicke in die Lysemechanismen *in vitro*. So verhindert der Entzug von extrazellulärem Kalzium die Ausschüttung der lytischen Granula und damit die Perforin-vermittelte Lyse.

Desweiteren vermag der monoklonale Antikörper ZB-4 (anti-CD95) die Bindung des CD95-Liganden kompetitiv zu hemmen und verhindert so die Initiation der Apoptose.



**Abb. 1.1: Mechanismen der CTL-vermittelten Zytolyse**

Schematische Darstellung der zwei Mechanismen der CTL-vermittelten Lyse (verändert nach Nagata 1997 und Sarin et al., 1997). Einige Inhibitoren (kursiv) sind an den Stellen, an denen sie hemmend eingreifen, aufgezeigt. Weitere Erklärungen im Text.

Selbst nach der Einleitung kann die apoptotische Enzymkaskade noch unterbrochen werden. Bcl-2, ein Protooncogen, ist ein natürlicher Antagonist (Lee et al., 1996, Schröter et al., 1995), synthetische Peptide, z.B. ZVAD und DEVD, die unterschiedlichen Caspasen als Pseudo-substrat dienen, werden irreversibel hemmend eingesetzt (Anel et al., 1996 und 1997).

Auch Viren haben teilweise Proteine (Baculovirus p35 (Beidler et al., 1995) oder Kuhpocken cytokine response modifier A (crmA) (Gagliardini et al., 1994)) entwickelt, die Apoptose verhindern. Tewari et al. (1995) beschreiben crmA als erstes virales Genprodukt, das direkt gegen den CTL-vermittelten Zelltod gerichtet ist.

Das Vakzinia-Virus B13R-Genprodukt einiger Pocken-Impfstämme ist zu 92% dem crmA homolog und inhibiert über die Blockade des ICE (Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme, heute auch Caspase-1) die CD95-induzierte Apoptose (Heinkelein et al., 1996).

Die von spezifischen CTL verwendeten Lysemechanismen können nach Cao et al. (1995) unterschiedlich stark oder einzeln angesprochen werden. Das mag an differierenden Effektor/Target Verhältnissen (E/T-Verhältnis) und daraus resultierender Variabilität der Expression des CD95-Rezeptors wie -Liganden liegen (Anel et al., 1994) oder aber abhängig von der Art der Infektion sein (Kägi et al., 1995).

Häufig wurden auch beide Lysemechanismen parallel angetroffen (Topham et al., 1997), wobei im murinen System die CD95-induzierte Lyse eher im Zusammenhang mit CD4+ CTL, und da speziell mit immunregulatorischen Aufgaben, gesehen wird und der Perforin/Granzyme-Mechanismus mehr den CD8+ CTL zugesprochen wird (Hahn et al., 1995, Piazza et al., 1997).

In den letzten Jahren konnten auch die ersten humanen CTL beschrieben werden, die im wesentlichen die gleichen Mechanismen zur Zytolyse benutzen. Ando et al. (1997) berichtet von Hepatitis-C-Virus-spezifischen CTL und Garcia et al. (1997) untersuchten einen HIV-nef-erkennenden CTL-Klon. Beide diskutieren zusätzlich die Zerstörung von unbeteiligten, nicht infizierten Zellen, sogenannte "Bystander", die durch Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), als weiterem CTL-Lysemechanismus, oder durch erhöhte Expression des CD95-Liganden verursacht sein soll.

Die Wahl bzw. Wirksamkeit der Lysemechanismen scheint auch im Menschen zum Teil von der Beschaffenheit der Targets und ihrer Empfänglichkeit, speziell für die CD95-induzierte Apoptose abzuhängen (Lewinsohn et al., 1998). So entwickeln einige Tumore CD95-Resistenzen, so daß spezifische CD4+ wie CD8+ CTL gegen diese ausschließlich über den Perforin-Weg agieren können (Rivoltini et al., 1998). Die wechselseitige Beziehung von Effektoren und Zielzellen geht hier soweit, daß die CTL selbst, als Schutz gegen CD95-Ligand exprimierende Tumorzellen, auch resistent gegen die CD95-vermittelte Lyse werden.



## Zielsetzung der Arbeit

Wie oben beschrieben, sind die HIV-spezifischen CTL von zentraler Bedeutung in der Bekämpfung der HIV-Infektion. Die Lysemachanismen, die sie zur Zerstörung infizierter Zellen einsetzen, sind bislang nicht beschrieben.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten hierzu zwei Aspekte näher untersucht werden:

1. Unterliegen CD4+ gp120-spezifische CTL, die im Rahmen einer Impfstudie von R. Siliciano aus HIV-seronegativen Probanden gewonnen wurden und bei HIV-Infizierten nicht zu isolieren sind, der von unserer Gruppe beschriebenen fusionsbedingten Zellyse und kann dies ein Grund für ihr Fehlen in HIV-Positiven sein?
2. CD8+ HIV-spezifische CTL sollten gewonnen und charakterisiert, ihre Lysemechanismen bestimmt werden. Der CD95-vermittelte Anteil der Zytotoxizität und eine Annäherung an die Situation in vivo waren dabei von besonderem Interesse.

## 2. Material

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät bzw. Material	Spezifikation und Bezugsquelle
Arbeitswerkbank	Sterilwerkbank der Sicherheitsstufe L2 lt. GenTG, Modell BSI C, Antair
Bakterienschtüttler	Certomat R/H, B. Braun
Blotkammer	Semi-dry, institutseigene Herstellung
Blot-Papier	GB002 oder GB003, Schleicher & Schuell
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -begast, Heraeus
Durchflußzytometer	FACScan, Becton & Dickinson
Gammacounter	1282 Compugamma, LKB Wallac
Kryogefäße	2 ml, Nalgene, Nalge company, USA
Miniaturreaktionsgefäße	0,5 ; 1,5 und 2 ml , Eppendorf
Nitrocellulose	0,45 µm, BA85 Schleicher & Schuell
Photometer	LKB Ultrospec III, Pharmacia
Röntgenfilm Biomax	Kodak
Ultraschallbad	Brosonic 2200, Branson
Vakuumzentrifuge	Speed-vac SC110, Servant
Zellkulturflaschen	klein (70 ml), Falcon, Becton & Dickinson mittel (250 ml), Falcon, Becton & Dickinson groß (600 ml), Falcon, Becton & Dickinson
Zellkulturplatten	96-Loch-Rundbodenplatte, Falcon, Becton & Dickinson 96-Loch-Flachbodenplatte, Falcon, Becton & Dickinson 24-Loch-Platte, Multiwell, Falcon, Becton & Dickinson 6-Loch-Platte, Makroplatte, Cellstar, Greiner

Zentrifugen	Tischzentrifuge 5417C, Eppendorf Kühlzentrifuge, Rotixa R/P, Hettich Sorvall, RC5C, DuPont
Zentrifugenröhrchen	15 ml; 50 ml , Greiner

## 2.2 Feinchemikalien und Reagenzien

Feinchemikalie	Spezifikation und Bezugsquelle
6-Aminocapronsäure	Sigma
Acrylamid	reinst, Carl Roth GmbH&Co
Agar	Pharmacia
Agarose	Eurogentec
APS	BioRad
Bacto trypton	DIFCO
Bacto yeast extract	DIFCO
BES	Calbiochem
Bisacrylamid	2-fach kristallisiert, Carl Roth GmbH&Co
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Carl Roth GmbH&Co
Concanavalin A	Sigma
Cyclosporin A	Sigma
Detach(a)beads	Detachmentbeads für Dynabeads, Dynal
DMFA	Sigma
DMSO	Sigma
DNA-100bp-Leiter	Fermentas
Dynabeads	CD4, CD8, Dynal
ECL-Kit	NEN

---

EDTA	Carl Roth GmbH&Co
EGTA	Sigma
FCS	Linearis
Ficoll	Lymphoprep, Nycomed Pharma, N 1,077±0,001 g/l , 280±15 mOsm , pH 6,8±0,5
HEPES	Biochrom
IL-2	EuroCetus
L(+)-Glutamin	Fluka, CH
Liquemin N25000	Heparin-Natrium, 5000 IE/ml , Hoffmann-La Roche AG,
MEM	Gibco BRL
Na <sub>2</sub> <sup>51</sup> CrO <sub>4</sub>	1 mCi/ml, in Kochsalzlösung pH 8,0-10,0 , NEN
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Penicillin/Streptomycin	Trockensubstanz, Gibco BRL
Phytohämagglutinin PHA	Sigma
QIAprep Spin Miniprep kit	QIAGEN
RNase	Merck
Rotiphenol	Carl Roth GmbH&Co
RPMI-1640	Gibco BRL
SDS	Carl Roth GmbH&Co
TEMED	BioRad
Tris	reinst; FERAK Laborat GmbH
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin	Trockensubstanz, Gibco, BRL
Wasserstoffperoxid, 30%	FERAK Laborat GmbH

### 2.3 Peptide

Peptid	Bezugsquelle
DEVD	Bachem Biochemika
HIV-env Peptide 740.1-18	Centralised Facility for AIDS Reagents, NIBSC
HIV-env Peptide 94-116	B. Walker, Boston, Mass., USA
HIV-env Protein bac, gp120	NIH, AIDS Reagent Program
HIV-gag Peptid 788.13	Centralised Facility for AIDS Reagents, NIBSC
HIV-gag Peptide 703.1-13	Centralised Facility for AIDS Reagents, NIBSC
YVAD	Bachem Biochemika
ZVAD	Enzyme System Products, California, USA

### 2.4 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften und Bezugsquelle
12F6	Maus-anti-CD3-Antikörper, stimulierend, Johnson Wong, über B. Walker) Mass. General Hospital, Boston, USA
Klon 902	IgG, Maus-anti-HIV-1-gp120, mAB, Hybridomüberstand, eigene Herstellung
Klon 183-H12-5C	IgG, Maus-anti-HIV-1-p24, mAB, Hybridomüberstand, eigene Herstellung
Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper-POD	IgG, Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper, Peroxidasegekoppelt, DAKO
CH-11	IgM, Maus-anti-CD95(FAS/Apo-1)-Antikörper induzierend, Coulter-Immunotech
DK25	IgG1, Maus-anti-Human-CD8-Antikörper, RPE-konjugiert, DAKO
Ziege-anti-Maus	IgG, Ziege-anti-Maus-Ig-Antikörper, FITC-konjugiert, DAKO
Kaninchen-anti-Maus	IgG, Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper, Peroxidasegekoppelt, DAKO

Kaninchen-anti-Mensch	IgG, Kaninchen-anti-Human-Ig-Antikörper, FITC-konjugiert, DAKO
MH	Serum, human-anti-Vakzinia-Virus, eigene Herstellung
MT310	IgG1, Maus-anti-Human-CD4-Antikörper, FITC-konjugiert, DAKO
Kaninchen-anti-B13R	Kaninchen-Serum, anti-Vakzinia-B13R, G. Smith, Oxford
UCHT1	IgG, Maus-anti-CD3-Antikörper, RPE-Cy5 konjugiert, DAKO
ZB4	IgG1, Maus-anti-CD95(Fas/APO-1) Antikörper, inhibierend, Coulter-Immunotech

## 2.5 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften und Bezugsquelle
010-035i-B-LCL	Probanden B-Zelllinie, EBV-transformiert, B. Walker HLA: A1/11; B8/62; C4; DR3; DRw52; DQ2
143B-tk <sup>-</sup>	humane Osteoblasten-Zelllinie mit Thymidinkinase-Gendefekt, ATCC
38a-B-LCL	Probanden B-Zelllinie, EBV-transformiert, selbst hergestellt
414-B-LCL	Probanden B-Zelllinie, EBV-transformiert, R. Siliciano HLA: A3/11; B18/35; Bw4/6; Cw4/5; DR3; DPw6(13); DQw1/2
9601-B-LCL	Probanden B-Zelllinie, EBV-transformiert, selbst hergestellt HLA: A25/28 , B51/60 , Bw4/6 , Cw1/3
9701-B-LCL	Probanden B-Zelllinie, EBV-transformiert, selbst hergestellt
A3.01	immortalisierte CD4 <sup>+</sup> T-Zelllinie, NIH HLA: A1/31 , B8/60 , DR 3/7
AA2	immortalisierte CD4 <sup>+</sup> B-Zelllinie, NIH HLA: A1/2 , B51/57
ACH-2	A3.01, chronisch HIV-infiziert, NIH
B95-5	produktiv EBV-infizierte permanente Zelllinie, ATCC

BE-B-LCL	Probanden B-Zelllinie, EBV-transformiert, selbst hergestellt HLA: A2/31 , B35/51 , C4 , DR4/w6
CH-B-LCL	Probanden B-Zelllinie, EBV-transformiert, selbst hergestellt
H9 <sub>HTLV-IIIb</sub>	immortalisierte CD4+ T-Zelllinie, produktiv HIV-infiziert, NIH
Hybridom 183-H12-5C	Hybridomzelllinie, anti-HIV-1-p24-mAB, NIH
Hybridom 902	Hybridomzelllinie, anti-HIV-1-gp120-mAB, NIH
Hybridom OKT3	Hybridomzelllinie, anti-human-CD3-mAB, stimulierend, ATCC
Jurkat Klon E6.1	immortalisierte CD4+ T-Zelllinie, NIH HLA: A9/25 , B7/41 , DR2/
PBMC allg.	von verschiedenen HIV-seronegativen Spendern zur Kultivierung poly- und monoklonaler T-Zellen verwendet

## 2.6 CTL-Klone (nicht selbst klonierte)

CTL-Klon	CD	Spezifikation und Bezugsquelle
414.45	CD4+	vac gp120, Epitop aa 337-361, R. Siliciano HLA-Klasse II, (Orentas et al., 1990)
414.5	CD4+	vac gp120, Epitop aa 337-361, R. Siliciano HLA-Klasse II, (Orentas et al., 1990)
Een217	CD4+	vac gp120, Epitop aa4 10-429, R. Siliciano HLA: DR4, DW10, (Orentas et al., 1990)
111x39	CD4+	vac gp120, R. Siliciano HLA-Klasse II, (Orentas et al., 1990)

## 2.7 Verwendete Viren

### 2.7.1 Vakzinia Viren

Virusvariante	Virusstamm	Eigenschaften	Bezugsquelle
<u>HIV-Rekombinationen</u>			
rCo-C14	VV-Copenhagen	HIV-gag Protein	eigene Rekombination
rVV-nef	VV-Western Reserve	HIV-nef Protein	T. Yilma, Ca., USA
rWR-E3/1	VV-Western Reserve	HIV-gag Protein	eigene Rekombination
rWR-H11/10	VV-Western Reserve	HIV-gag Protein	eigene Rekombination
vAbt 228	NYVAC	HIV-p17 Protein	Therion Biologics
vAbt 141	NYVAC	HIV-gag Protein	Therion Biologics
vAbt 286	NYVAC	HIV-p24 Protein	Therion Biologics
vCF21	VV-Western Reserve	HIV-RT Protein	B. Moss
vPE12	VV-Western Reserve	gp160 , Schnittstelle zw. gp120 und gp41 zerstört	B. Moss
vPE16	VV-Western Reserve	vollständiges gp160	B. Moss
vPE16/1	VV-Copenhagen	vollständiges gp160	eigene Rekombination
vPE17	VV-Western Reserve	verkürzt, → aa 747	B. Moss
vPE18	VV-Western Reserve	verkürzt, → aa 635	B. Moss
vPE20	VV-Western Reserve	verkürzt, → aa 393	B. Moss
vPE21	VV-Western Reserve	verkürzt, → aa 287	B. Moss
vPE22	VV-Western Reserve	verkürzt, → aa 204	B. Moss
vPE8	VV-Western Reserve	vollständiges gp120 → aa 502	B. Moss



VV-Wildtypen

VV-Co WT	VV-Copenhagen	kein funktionelles B13R-Produkt	B. Walker
VV-WR WT	VV-Western Reserve	exprimiert B13R	B. Walker
$\Delta$ B13R	VV-Western Reserve	B13R-deletiert	G. Smith
B13Rrev	VV-Western Reserve	B13R-revertiert	G. Smith

**2.7.2 HIV**

HIV-1	HTLV-IIIB	-	NIH
-------	-----------	---	-----

- B. Moss: Laboratories of Viral Diseases and Immunoregulation, Bethesda, Maryland, USA
- B. Walker: Mass. General Hospital, Boston, Massachusetts, USA
- G. L. Smith: University of Oxford, Oxford, UK
- R. F. Siliciano: Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA
- ATCC: American Type Tissue Culture Collection, Maryland, USA
- NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control, UK
- NIH: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Maryland, USA
- Therion Biologics, Cambridge, Massachusetts, USA

### 3. Methoden

#### 3.1 Medien und Kultur von Bakterien

##### Herstellen von Agar-Platten

Die Kultur von Bakterien erfolgte mit LB-Medium,

LB = Luria-Bertani-Medium:	10 g	(Bacto) trypton
(ad 1 Liter aqua dest.)	5 g	(Bacto) yeast extract
pH 7,5 (mit NaOH)	10 g	NaCl
	15 g	Agar

welches in einer autoklavierbaren Flasche angesetzt und nach dem Autoklavieren auf 55°C abgekühlt, mit Antibiotika (z.B. 100 mg Ampicillin/Liter) versetzt wurde. Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium in sterile Petrischalen (Plastik) gegossen (ca. 30 ml/Schale). Nach dem Erkalten bzw. Erstarren konnten die Platten mit Parafilm verschlossen (Verdunstungsschutz) und bei 4°C aufbewahrt werden.

##### Über-Nacht Kulturen und Plasmid-Isolation

###### Mini-Prep:

Für einen sogenannten "Mini-Prep" wurden Bakterienklone, die auf Agar-Platten gewachsen waren, mittels eines sterilen Zahnstochers berührt und in ein steriles Reagenzglas mit 1 oder 2 ml LB-Medium gegeben, das mit dem entsprechenden Selektionsagens (Antibiotika: z.B. Ampicillin, 100 µg/ml) versetzt war.

Über Nacht bei 37°C und 180 rpm auf dem Bakterienschüttler wuchs der Klon und wurde morgens im Volumen verdoppelt und dann nochmals eine Stunde wachsen gelassen.

###### Maxi-Prep:

Ein sogenannter "Maxi-Prep" wurde z.B. aus 10 µl einer Bakterien Glycerin-Stammsuspension (ü. N. Kultur plus 15% Glycerin, bei -20°C, 1-2 Jahre haltbar, oder bei -80°C, mehrere Jahre haltbar) auf 250 ml Medium in einem 2 l-Kolben angesetzt, über Nacht bei 180 rpm und 37°C wachsen gelassen, morgens auf einen Liter mit vorgewärmtem Medium aufgefüllt und eine weitere Stunde wachsen gelassen.

Die Ernte der Bakterien fand je nach Volumen bei 4.000 bis 10.000 x g in einer entsprechenden Zentrifuge statt.

Anschließend erfolgte der Aufschluß der Bakterien und die Isolation der Plasmide mittels eines QIAgen Kits für "Mini-" bzw. "Maxi-Preps".

### 3.2 Zellkultur

Für die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden folgende Medien verwendet:

#### R-0 (10, 15):

RPMI-1640

Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml
L(+)-Glutamin	500 µg/ml
HEPES	10 mM (pH 7,4)
FCS	0; 10 bzw. 15% (v/v)

Für die Kultur von PBMC und T-Zellklonen enthielt das R-10 zusätzlich rekombinantes humanes Interleukin-2 (100 U/ml).

#### M-10:

MEM (Minimum Essential Medium)

Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml
L(+)-Glutamin	500 µg/ml
FCS	10% (v/v)

Die Medien sowie die Additiva wurden steril behandelt und vor einem Kontakt mit den Zellen, falls nicht anders erwähnt, auf 37°C vorgewärmt.

#### 3.2.1 Passagieren von adhärennten Zelllinien

Adhärennte Zelllinien werden kurz vor oder bei Erreichen eines Zellmonolayers passagiert.

Hierzu wurde das Medium (M-10) steril abgenommen, der Zellrasen einmal mit ATV-Lösung gespült und dann in derselben Lösung, die einen enzymatischen Verdau der Adhäsionsproteine der Zellen bewirkt, bis zum beginnenden Ablösen der Zellen vom Boden durch Abzurunden inkubiert (nach 3-5 Minuten, beschleunigt bei 37°C und durch leichtes Klopfen).

Nach Inaktivierung durch Zugabe von mindestens der gleichen Menge an Nährmedium wurden die gut resuspendierten Zellen im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 zur Erhaltung in großen Kulturflaschen mit 40 ml Medium neu angesetzt.

ATV-Lösung:

8 g	NaCl
400 mg	KCl
1 g	D-Glucose
580 mg	Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>
500 mg	Trypsin
200 mg	Versen
	ad 1 l aqua dest., pH 7,2-7,4

### **3.2.2 Passagieren von Suspensionszellen**

Immortalisierte lymphoide Suspensionszelllinien sollen vor einem vollständigen Umschlagen des pH-Indikators im RPMI-Medium von rot nach gelb passagiert werden (ca. alle drei bis vier Tage).

Dieses geschah in der Regel nach Resuspension in Verhältnissen zwischen 1:3 und 1:10 , wobei das entnommene Volumen an verbrauchtem Medium durch frisches ersetzt wurde. Bei sehr stark stoffwechselnden Zellen und zum Erhalt einer größeren Zellzahl konnte auch vor dem Resuspendieren verbrauchtes Medium abgesogen werden und die Zellen anschließend entsprechend der Bedürfnisse behandelt werden.

### **3.2.3 Kultur von primären T-Zellen**

Primäre T-Zellen und CTL-Linien wurden, da sie sich nicht unbegrenzt teilen können, nicht passagiert, sondern erhielten bei möglichst geringem Zellverlust lediglich einen partiellen Mediumsaustausch (R-10-IL-2). Hierbei war sowohl die Stoffwechselaktivität anhand des pH-Indikators im RPMI-Medium als auch die Zelldichte sowie -vitalität zu berücksichtigen.

(Zur Gewinnung und eventuellen Stimulation s. 3.5 und 3.6)

### 3.2.4 Bestimmung der Zelldichte und -vitalität

Zur Bestimmung der Zelldichte und -vitalität wurden gut resuspendierte Zellen 1:2 oder, je nach geschätzter Dichte, auch in größerer Verdünnung, mit 10  $\mu$ l Trypanblaulösung (0,1% in 20% Ethanol, sterilfiltriert) versetzt.

Auf diese Weise können lebende Zellen, die den Farbstoff ausschließen können und farblos bleiben, von toten, blau eingefärbten Zellen unterschieden werden.

Die Auszählung erfolgte mit Hilfe eines Binokulars in einer Neubauer-Zählkammer, wobei die Anzahl der lebenden und der toten Zellen in vier großen Quadranten, die ein definiertes Volumen von je 0,1  $\mu$ l beinhalten, notiert wurde.

Die Zelldichte, in Zellen pro ml, ergab sich aus der Anzahl der lebenden Zellen (Minimum 100 Zellen) der vier Quadranten, multipliziert mit dem Umrechnungsfaktor  $4 \times 10^4$  (von  $\mu$ l auf ml) und dividiert durch den Verdünnungsfaktor (evtl. Vorverdünnung plus Verdünnung durch den Farbstoffzusatz).

Die Zellvitalität in Prozent ergab sich aus dem Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl multipliziert mit 100.

### 3.2.5 Kryokonservierung

#### Einfrieren von Zellen

Die einzufrierenden Zellen sollten möglichst vital sein und sich in der Proliferation befinden; B-Zelllinien sollten frisch passagiert, T-Zellklone ca. 10 Tage zuvor restimuliert sein.

Eine ausreichende Menge Zellen, zwischen 2 und 10 Millionen pro Aliquot, wurden zunächst abzentrifugiert und in einem Milliliter vorgekühltem Medium resuspendiert, dann mit einem Milliliter eines Gemisches aus 9 Teilen FCS und einem Teil DMSO auf Eis vermengt und über Nacht in Kryo-Gefäßen auf minus 80°C gekühlt. Am nächsten Tag wurden die Gefäße zur Lanzeitlagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

#### Auftauen von Zellen

Tiefgefrorene Zellen sind sehr empfindlich und müssen möglichst schnell aufgetaut werden.

Hierzu wurden die Zellen dem flüssigen Stickstoff entnommen, zum Transport auf Eis gelagert und unter fließendem, warmen Wasser aufgetaut. Zur Entfernung des zum Einfrieren verwendeten und toxischen DMSO, wurden die Zellen sofort in 5 ml auf Eis vorgekühltem R-10-Medium aufgenommen und bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Resuspension in Medium bei Raumtemperatur (RT) sollte die Lebendzellzahl bestimmt werden, so daß

nach erneuter Zentrifugation eine Aussaat der Zellen mit einer Dichte zwischen 0,5 und 1,5 Mio. Zellen pro ml im entsprechenden Medium erfolgen konnte. Die Zellen wurden erst nach einer Wachstums- und Erholungsphase von mindestens 10 Tagen für Versuche verwendet.

### **3.3 Gewinnung von monozytären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)**

Zur Isolation von monozytären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden einem Spender mittels Venenpunktion 20-120 ml Blut entnommen, wobei der Zusatz von 0,1 ml Liquemin ( $\equiv$  500 IE Heparin-Na) auf 50 ml Blut die Gerinnung desselben verhinderte. Je 15 ml Blut wurden mit 15 ml R-0 verdünnt und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Ficoll unterschichtet. Die Röhrchen wurden anschließend für 30 min bei einer Geschwindigkeit von 1500 rpm und 20°C zentrifugiert, wobei ein langsames Erreichen der Endgeschwindigkeit (Anlaufzeit 2 min) und ein ungebremstes Auslaufen der Zentrifuge eine optimale Schichtenbildung gewährleisten sollte.

Die PBMC bildeten eine ringförmige trübe Phase oberhalb des Ficoll und konnten vorsichtig mittels einer Pipette abgesammelt und nach zweimaligem Waschen mit R-10, zur Entfernung von Ficoll-Rückständen, gezählt werden.

Sie standen nun entweder bereit zur Bestrahlung mit Gammastrahlen (30 Gray bei einer Zelldichte von  $1-5 \times 10^7$  Zellen/ml), um anschließend als Fütterzellen bei der Kultivierung von T-Zellen zu dienen oder aber waren das Ausgangsmaterial zur Gewinnung von transformierten Zelllinien, primären Zellen oder Klonen.

### **3.4 EBV-Transformation von B-Zellen**

Um primäre humane B-Zellen in eine permanente Zelllinie zu wandeln, transformiert man sie mit Epstein-Barr-Viren (EBV).

Dazu wurden  $5 \times 10^6$  frische PBMC eines Probanden, von dem eine B-Zelllinie angelegt werden sollte, zunächst in 1 ml einer 5 mM Lösung von L-Leucin-Methylester in R-0 für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, um störende Monozyten zu inaktivieren. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in R-10 wurden sie in 1 ml R-15 aufgenommen, dem 20  $\mu$ l Cyclosporin A (20  $\mu$ g/ml) und 1 ml eines EBV-Kulturüberstandes (der produktiv infizierten, permanenten Zelllinie B95-5) hinzugefügt wurden.

Nach 2-4 Wochen erhielt man so eine lymphoblastoide B-Zelllinie (B-LCL), die dann, wie oben beschrieben, passagiert werden konnte.

### 3.5 Selektion von primären polyklonalen CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen

Die Selektion von CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen aus PBMC erfolgte mittels an Eisenkügelchen (Beads) gebundenen spezifischen Antikörpern, mit denen die gewünschten Zellen, CD4- oder CD8-positiv, magnetisch von den restlichen Zellen separiert werden konnten.

Zur Vorbereitung wurden die in Na-Azid stabilisierten Beads (200  $\mu$ l für  $20 \times 10^6$  PBMC) 5 mal in PBS mit 2% FCS gewaschen, wobei die Beads mittels eines Permanentmagneten beim Mediumswechsel an der Gefäßwand gehalten wurden. Resuspendiert in 450  $\mu$ l PBS mit 1,35% FCS wurden die Beads zu den ebenfalls gewaschenen und abzentrifugierten PBMCs gegeben und für eine Stunde bei gelegentlichem Aufschlagen auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in 3,5 ml PBS mit 2% FCS aufgenommen und magnetisch getrennt.

Die gewünschten Zellen befanden sich nun mit den Beads an der Gefäßwand, während der Rest der Zellen mit dem PBS abgesogen werden konnte. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Beads mit den Zellen in 200  $\mu$ l R-10 aufgenommen und für 40 min bei Raumtemperatur mit 20  $\mu$ l "Detachment-Beads" (löslicher kompetitiver Antikörper im Überschuß) zum Ablösen der Zellen versetzt. Aufgefüllt mit 3,5 ml R-10 wurde abschließend erneut magnetisch getrennt, die Zellen aus der Lösung abzentrifugiert und in frischem R-10 aufgenommen.

Die erhaltenen polyklonalen Zellen waren zu 80-90% CD4- bzw. CD8-positiv und konnten nun entweder direkt für Versuche gebraucht, der Gewinnung klonaler Zelllinien (s.u.) zugeführt oder aber polyklonal stimuliert werden.

### 3.6 Stimulation primärer T-Zellen

Die überwiegende Anzahl der aus peripherem Blut isolierten T-Zellen befindet sich in der Ruhephase und muß, um eine Vermehrung zu erreichen, zur Proliferation angeregt werden. Hierzu existieren verschiedene Methoden, die je nach Zellsubtyp, CD4+ oder CD8+, und auch je nach Zelllinie oder -klon optimale Ergebnisse bewirken.

#### Stimulation mittels Anti-CD3-Antikörpern (überwiegend für CD8+ Zellen)

Hierzu wurden die zu stimulierenden Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml R-10-IL2 1:1 bis 1:3 mit heterologen Fütterzellen gemischt und mit dem CD3-Antikörper 12F6 (aufgereinigtes Protein) 0,1  $\mu$ g/ml oder OKT-3 (Zellkulturüberstand) 2  $\mu$ g/ml versetzt. Je nach Gesamtmenge wurden die Zellen in kleinen Kulturflaschen (ab 5 Mio.) oder in 24-Lochplatten kultiviert.

Die Zellteilungsrate erreichte nach etwa 5-7 Tagen ein Maximum. Die Fütterzellen starben nach ca. einer Woche ab, sie sollten bis dahin die T-Zellen durch Präsentation des CD3-Antikörpers zur Kreuzvernetzung von CD3 durch IG-Rezeptor-tragende Mono- und B-Lymphozyten zur Teilung anregen, und durch die Herstellung eines serumähnlichen Milieus sowie über die Sekretion von Interleukinen bei der Proliferation unterstützen.

#### Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) oder Concanavalin A (Con A)

Die zu stimulierenden Zellen wurden über Nacht in einer Dichte von 1 bis  $3 \times 10^6$  Zellen/ml in R-10 mit  $2 \mu\text{g/ml}$  PHA oder  $10 \mu\text{g/ml}$  Con A inkubiert. Optional konnten der Kultur Fütterzellen zugesetzt werden. Am nächsten Tag wurde die Hälfte des Kulturmediums durch R-10-IL-2 ersetzt.

#### Stimulation mit einem für einen speziellen Klon spezifischen Peptid

Hierbei wurden die zu bestrahlenden Zellen zuvor für eine Stunde mit dem entsprechenden Peptid ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) behandelt oder aber über Nacht mit dem entsprechenden rekombinanten Vakzina-Virus infiziert, um eine Aufnahme und Präsentation des spezifischen Antigens an der Zelloberfläche zu ermöglichen, so daß der entsprechende spezifische CTL-Klon dieses erkennen konnte und zur Proliferation angeregt wurde.

### **3.7 Gewinnung von klonalen primären CD8+ HIV-spezifischen T-Zelllinien mittels Klonierung in Grenzverdünnung**

Für die CTL-Klonierung wurden zunächst PBMCs eines HIV-positiven Probanden gewonnen. Diese wurden dann in Fütterzellmedium, bestehend aus  $1 \times 10^6$  Fütterzellen/ml R-10-IL-2 mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  12F6, so stark verdünnt, daß sich bei einer Aussaat von je  $100 \mu\text{l}$  in 96 Loch-Rundbodenplatten jeweils 100, 30, 10 oder 3 Zellen pro Napf befanden.

Nach 7 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit  $100 \mu\text{l}$  R-10-IL-2 gefüttert und nach weiteren 14 Tagen konnten dann gegebenenfalls erste Klone entnommen und zur Vermehrung erneut stimuliert werden.

Das Ziel der Grenzverdünnung in diesen Ansätzen war es, zu erreichen, daß in den Vertiefungen der Kulturplatten, in die Zellen ausgesät wurden, jeweils nur eine Zelle proliferierte, so daß daraus ein T-Zellklon erwachsen konnte.

Die Wahrscheinlichkeit, daß die gewachsenen Zellen in einer Vertiefung tatsächlich einen Klon bildeten, war der Prozentzahl der ausgewachsenen Näpfe einer Verdünnungsstufe indirekt proportional. Auf eine exakte Überprüfung mit einer genetischen Analyse des T-Zellrezeptors wurde verzichtet. Bei unter 10-20 Prozent an ausgewachsenen Aussaaten ist die



Wahrscheinlichkeit, daß es sich um Klone handelt relativ groß. Eine Überprüfung, ob ein Gemisch aus CD4+ und CD8+ T-Zellen vorlag, in einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem geeigneten Antikörper erfolgte obligatorisch.

Die Wahrscheinlichkeit, CD8+ Zelllinien zu erhalten, ließ sich dadurch erhöhen, daß anstelle von PBMC selektionierte CD8+ Zellen eingesetzt wurden oder aber daß CD4+ Zellen zuvor depletiert wurden (negative Selektion).

Um nun eine eventuelle HIV-Spezifität festzustellen, wurde ein Teil der gut gewachsenen Linien direkt (bei langsam oder schlecht wachsenden Klonen nach der ersten Restimulation) in einen Zytotoxizitätstest mit Einfachbestimmung (s.u.) gegen HIV-Protein-(env-, gag-, RT- oder nef-) exprimierende Zellen eingesetzt.

### **3.8 Viruskultur**

#### **3.8.1 Anzucht von Vakzinia-Viren**

Zur Anzucht von Vakzinia-Viren wurden adhärente 143B-tk<sup>-</sup>-Zellen, die einen zu ca. 70% dichten Zellrasen in einer 600 ml Kulturflasche bildeten, nach Absaugen des Mediums mit 10 ml virushaltigem MEM-Medium (0% FCS) überschichtet. Die Viruskonzentration wurde dabei so gewählt, daß eine MOI (multiplicity of infection) von 0,05 erreicht wurde, also im Schnitt jede zwanzigste Zelle infiziert wurde. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank wurde die Viruslösung entfernt und durch 40 ml frisches M-10-Medium ersetzt. Innerhalb von zwei Tagen war der gesamte Zellrasen durchinfiziert, was an einer wabenähnlichen Struktur, gebildet durch aneinandergrenzende Plaques, zu erkennen war. Das Virus, welches sich überwiegend innerhalb der infizierten Zellen befand, wurde nun durch ein Abschaben der Zellen vom Flaschenboden und Zentrifugation konzentriert. Anschließend wurden die Zellen in hypoosmolarem Puffer (2,5 ml Tris/HCl, 10 mM, pH 9,0) resuspendiert, dreimal tiefgefroren und wieder aufgetaut und für eine Minute in ein Ultraschallbad bei niedriger Leistung getaucht, um das Virus möglichst vollständig freizusetzen. Die Suspension wurde letztlich aliquotiert bei -20°C tiefgefroren.

#### **3.8.2 Virustiterbestimmung**

Wie oben bereits erwähnt, bilden sich als zytopathischer Effekt bei der Infektion eines Zellrasens von 143b-tk<sup>-</sup>-Zellen mit Vakzinia-Viren charakteristische Plaques aus. Diesen Umstand macht man sich bei der Titerbestimmung zunutze.

Dazu wurden die Zellen bis zu einer Dichte von rund 70% in 6-Loch-Platten kultiviert, nach Absaugen des Mediums mit je 0,5 ml Virusverdünnung in MEM-0 (von  $10^{-5}$  bis  $10^{-10}$ ) für zwei Stunden inkubiert und anschließend mit frischem Medium MEM-10 (3 ml) für zwei Tage weiterkultiviert. Dann wurde nach Absaugen des Kulturüberstandes je Vertiefung 0,5 ml Färbelösung (0,2% Kristallviolett in 20% Ethanol) zugegeben, diese nach zwei Minuten entfernt und die Platte getrocknet.

Das Kristallviolett färbt die Zellen des Zellrasens gleichmäßig violett an, wobei jedes durch die Infektion einer Zelle mit einem Vakzinia-Virus entstandene Plaque als eine durchsichtige Scheibe mit verstärkt gefärbtem Rand deutlich sichtbar wird.

Die Titerbestimmung erfolgte nach Auszählung der Plaques in der Vertiefung mit der zweitgrößten Verdünnung in der noch Plaques zu erkennen waren und berechnete sich anhand der Verdünnungsstufe multipliziert mit der zweifachen Anzahl (0,5 ml zur Infektion) der Plaques. Der Virustiter wurde angegeben in plaque forming units (pfu) pro ml .

### **3.9 Herstellung von rekombinanten Vakzinia-Viren durch homologe Rekombination**

Die homologe Rekombination von Vakzinia-Viren ist ein Verfahren, das es ermöglicht, virusfremde Gene ins Genom einzuschleusen. Hierbei macht man sich zu Nutze, daß sich während der DNA-Replikation homologe DNA-Abschnitte aneinander lagern und durch Strangbrüche mit wechselseitigem Wiederverschließen Sequenzaustausche stattfinden können.

Kloniert man nun das gewünschte Gen so in ein geeignetes Plasmid, daß es an beiden Seiten vom in Vakzinia Viren enthaltenem Thymidinkinasegen flankiert wird, so kann man bei der Transfektion von Vakzinia-infizierten Zellen mit diesem Plasmid in seltenen Fällen einen Austausch erwarten.

Durch das Einschleusen des Fremdgens mitten in das Thymidinkinasegen kann von diesem Virus keine funktionelle Thymidinkinase mehr gebildet werden, was man zur Selektion auf ebenfalls Thymidinkinase-defekten Zellen (143B-tk<sup>-</sup>-Zellen) nutzt.

Diese Selektion mit Bromdeoxyuridin (BrdU), welches durch die Thymidinkinase in eine toxische Substanz umgewandelt wird, ist aufgrund von spontanen Mutationen im Thymidinkinasegen nicht zu 100 Prozent sicher; anscheinend positive Viren müssen in jedem Fall auf das Vorhandensein des Fremdgens und auf dessen Expression hin überprüft werden.

Zur Rekombination von HIV-gag in VV-WR wurden zunächst 143B-tk<sup>-</sup>-Zellen mit VV-WR Wildtyp bei 0,5 bis 1 pfu in einer 6-Loch-Platte infiziert. Zwischenzeitlich wurde das Plasmid pAbt-141 (ca. 30 µg) aus einem Maxi-Prep in 600 µl 2-fach BES-Puffer (50 mM BES, pH 6,95 , 280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gelöst und unter Zufuhr von Luft sehr langsam mit

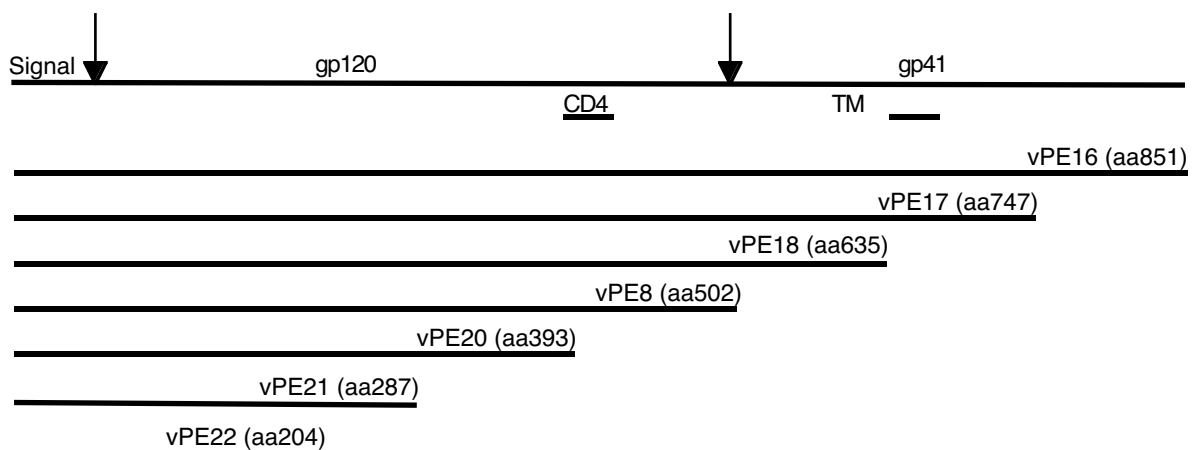
600  $\mu$ l sterilfiltrierter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (250 mM) präzipitiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 400  $\mu$ l der Präzipitat-Suspension auf mittlerweile für 2 Std. infizierte Zellen, deren Medium abgesogen wurde, gegeben und für weitere 3 Std. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand durch Medium ersetzt.

Als Negativkontrolle wurden gleichbehandelte VV-WR-infizierte Zellen, die eine plasmidfreie Suspension erhielten, mitgeführt. Die Ernte der Viren erfolgte bei gut zu beobachtender Infektion nach gut einem Tag.

Es folgten zwei Infektionszyklen unter Selektionsbedingungen, in denen dem Medium BrdU (200  $\mu$ g/ml) zugesetzt war. Nach erfolgter Expressionskontrolle in indirekter Immunfärbung (s.u.) wurden zunächst Einzelplaques in 96-Loch-Flachbodenplatten ausgesät und anschließend zwei positive Klone subkloniert.

### 3.10 Infektion von Suspensionszellen mit Vakzinia-Virus

Hierzu wurde die zu infizierende Menge an Zellen in einem 15-ml-Falcon-Gefäß abzentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 50  $\mu$ l entfernt und darin resuspendiert. Das Virus wurde in der gewünschten Konzentration (MOI zw. 1 und 10) in 250  $\mu$ l R-0 angesetzt und für 90 Minuten zu den Zellen hinzugefügt. Anschließend wurde einmal mit 5 ml R-15 gewaschen und die Zellen dann für 8 bis 16 Stunden in einer Dichte von rund  $1 \times 10^6$ /ml in einer 24-Lochplatte im Brutschrank inkubiert.



**Abb. 3.1: Eine schematische Darstellung des HIV-1 Env-Proteins und von Verkürzungen desgleichen in rekombinierten Vakzinia-Viren (verändert nach Earl et al., 1991)**

Graphisch dargestellt ist das HIV-1 Env-Protein in Originallänge und die C-terminal verkürzten Proteine, wie sie von den eingesetzten rekombinanten VV exprimiert wurden. Die CD4-Bindungsstelle und die Transmembranregion (TM) sind angedeutet, die Pfeile markieren die Schnittstellen während des Prozessierens.

Die Infektionsrate wurde nach Antikörpermarkierung, entweder mit dem Anti-VV-Serum MH und/oder, je nach verwendeter VV-Rekombinante, mit dem entsprechenden Anti-HIV-Protein-Antikörper, durchflußzytometrisch bestimmt.

Für eine erfolgreiche Infektion lag die Rate der infizierten Zellen bei 80% , wobei das humane Anti-VV-Serum bei einigen Zelllinien einen relativ hohen unspezifischen Hintergrund aufwies.

In Abbildung 3.1 sind die eingesetzten, unterschiedlich verkürzten rekombinanten Vakzinia-Viren mit HIV-Glykoproteinanteil schematisch dargestellt.

### **3.11 Infektion mit HIV**

#### Immortalisierte CD4+ T-Zelllinien

Für die HIV-Infektion von immortalisierten CD4+ T-Zelllinien wurde auf  $5 \times 10^6$  abzentrifugierte Zellen 1 ml HIV-Überstand mit einer  $TCID_{50}$  von  $1 \times 10^5$ /ml gegeben und das Gemisch für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 10 ml mit R-10 aufgefüllt und in eine kleine Zellkulturflasche überführt.

In den folgenden Tagen wurde die Kultur beobachtet und Proben zur lichtmikroskopischen Beurteilung des zytopathischen Effektes (Anschwellen der Zellen und Synzytienbildung) und für intrazelluläre Färbungen des HIV-p24-Proteins entnommen. Nach 3-5 Tagen waren in der Regel bis zu 80% der Zellen infiziert.

#### Primäre CD4+ T-Zellen

Zur Infektion klonaler oder polyklonaler CD4+ T-Zellen mit HIV mußten diese zunächst stimuliert werden, da sich in der Ruhephase befindliche CD4+ Zellen nicht mit HIV infizieren lassen.

Die Stimulation von  $1 \times 10^7$  Zellen erfolgte in 5-10 ml R-10-IL2 mit einem Zusatz von  $2 \mu\text{g/ml}$  PHA für drei Tage in einer kleinen Kulturflasche im Brutschrank. Danach wurden  $4 \times 10^6$  vitale Zellen sedimentiert und wie oben beschrieben mit 1 ml HIV-Überstand infiziert. Die abschließende Aufnahme der Zellen erfolgte in einem Volumen von 5 ml und der Anteil p24-positiver Zellen erreichte nach 4 bis 5 Tagen ein Maximum zwischen 60 und 80% .

### 3.12 Durchflußzytometrie

Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern kann man in der Durchflußzytometrie zelleigene wie Fremd-Antigene bestimmen und vergleichend quantifizieren. Es ist hierbei sowohl möglich die Häufigkeit eines konkreten Ereignisses (z.B. eine Infektion) innerhalb einer Population von Zellen zu bestimmen als auch die relative Häufigkeit eines gegebenen Antigens auf oder in den Zellen einer Population zu messen, so z.B. die Expression des CD95-Moleküls an der Zelloberfläche.

Der Nachweis der Antigene kann einerseits direkt mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder aber indirekt über nicht markierte Erst- und markierte Zweitantikörper, die wiederum den ersten Antikörper erkennen, erfolgen.

Am FACScan-Durchflußzytometer bestand die Möglichkeit, drei Fluoreszenzfarbstoffe parallel zu messen, FITC, RPE und RPE-Cy5, die alle bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurden und deren Emissionen mit Maxima bei 530 nm, 570 nm und 670 nm aufgenommen werden konnten.

In der Regel wurden von einer Probe  $1-5 \times 10^4$  Zellen ausgemessen, wobei lediglich die Population im Zählfenster (gate) ausgewählt wurde, die der Lebendzellpopulation entsprach. Somit gingen tote Zellen, die kleiner und komprimierter erschienen, und "Zellschrott" nicht in die Ergebnisse ein.

### 3.13 Antikörpermarkierungen für die Durchflußzytometrie

Um den Erfolg von VV- wie HIV-Infektionen zu überprüfen wurden Markierungen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Ebenso konnte der Einfluß von Stimulationen und Infektionen auf die Regulation von Zellproteinen kontrolliert werden.

#### 3.13.1 Extrazelluläre Färbungen

Für jede Bestimmung wurden ca.  $1 \times 10^5$  Zellen mit 2,5 ml FACS-Puffer (0,1% BSA, 0,01% Natriumazid in PBS) gewaschen, sedimentiert und für 30-40 Minuten in einem Volumen von ca. 100 µl bei 4°C mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer zur Entfernung nicht gebundenen Antikörpers wurde entweder der Zweitantikörper zugegeben und erneut inkubiert und gewaschen oder aber gleich in 1 ml Formaldehydlösung (3,5% in PBS) für 30 Minuten bei 4°C fixiert. Zur Messung wurden die Zellen in 200 µl Formaldehydlösung (2% in PBS) überführt. Als Negativkontrollen und zur Kompensation des Durchflußzytometers wurden ein Anti-Maus-IgG-Antikörper und nicht

infizierte oder kontrollinfizierte bzw. bei Messungen von Stimulationseffekten unstimulierte Zellen eingesetzt.

### 3.13.2 Intrazelluläre Färbungen

Die intrazelluläre Färbung erfordert die Permeabilisierung der Zellmembran, damit die spezifischen Antikörper durch diese ins Innere der Zelle vordringen können.

Hierzu war es notwendig die zu färbenden Zellen zunächst für eine Stunde in 3% Formaldehydlösung in PBS bei 4°C zu fixieren. Zur Permeabilisierung wurden die gewaschenen Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur in 300 µl einer 3% Triton X-100-Lösung gegeben und anschließend zweimalig erneut gewaschen. Die Antikörperinkubation erfolgte dann wie oben beschrieben, wobei auf den abschließenden Fixierungsschritt verzichtet werden konnte.

### 3.14 Für die Immunfärbungen verwendete Antikörper und die eingesetzten Mengen

Folgende Antikörper wurden in der Immunfärbung verwendet:

**Tab 3.1: verwendete Antikörper und eingesetzte Mengen pro Färbung**

Name	Spezifität	Spezies	Farbe	-klonal	µl/Fbg.
183-H12-5C	anti-HIV-p24	Maus	-	mono (HÜ)	50
902	anti-HIV-gp120	Maus	-	mono (HÜ)	20
MH (Serum 1:100)	anti-VV	Mensch	-	poly	20
Kaninchenserum	anti-Mensch IgG	Kaninchen	FITC	poly	1,5
Maus IgG	ohne	Maus	FITC	mono	3
Maus IgG	ohne	Maus	RPE	mono	3
UCHT1	anti-CD3	Maus	RPE-Cy5	mono	3
MT310	anti-CD4	Maus	FITC	mono	3
DK25	anti-CD8	Maus	RPE	mono	3
Kaninchenserum	anti-Maus-Ig	Kaninchen	HRPT	mono	1
BX2	anti-CD95	Maus	-	mono	2,5

HÜ = Hybridom-Überstand

### 3.15 Indirekte intrazelluläre Immunfärbung von adhärennten VV-infizierten Zellen

Um die erfolgreiche Rekombination von Vakzinia-Viren mit HIV-Proteinen (hier speziell HIV-gag in VV-WR) effektiv beurteilen zu können und auf Monoklonalität zu überprüfen, wurde innerhalb dieser Arbeit eine Methode zur indirekten Immunfärbung von adhärennten 143B-tk<sup>-</sup>-Zellen entwickelt.

Hierzu wurden mit rekombiniertem-VV infizierte Zellen in 6-Loch-Platten zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer 3% Formaldehyd-Lösung in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschschriff mit PBS/BSA (1%) erfolgte für eine Minute eine Inkubation in 0,3% Triton X-100-Lösung, gefolgt von zwei weiteren Waschschriffen. Angeschlossen wurden je einstündige Inkubationen mit dem ersten (Anti-HIV-p24) und zweiten (Kaninchen-anti-Maus-IgG, Peroxidase gekoppelt) Antikörper auf einem Schüttler, unterbrochen durch drei 5-minütige Waschschriffe. Nach abschließendem Waschen der Platten mit PBS/BSA und reinem PBS erfolgte die Entwicklung der Färbung mittels einer AEC-Lösung (1 ml AEC-Stock [0,4% in DMFA] auf 19 ml NaAc mit 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Durch rekombinierte-VV verursachte Plaques färbten sich rot an, während uninferierte Zellen und Plaques von Wildtypviren farblos blieben.

Dieses Verfahren wurde auch zum "Screening" während der Rekombinationsversuche genutzt.

Viren aus dem Rekombinationsansatz wurden so in 96-Loch-Flachbodenplatten mit 143B-tk<sup>-</sup>-Monolayer ausgesät, daß statistisch pro Vertiefung nur ein infektiöses Partikel vorhanden war. Nach 2-3 Tagen Inkubation wurden die Kulturüberstände, die allgemein nur relativ wenig freigesetztes Virus von zerstörten Zellen enthalten, separat geerntet und tiefgefroren. Die verbliebenen Zellen mit den Plaques wurden wie oben beschrieben gefärbt, so daß positive Plaques identifiziert und über die in den tiefgefrorenen Überständen enthaltenen Viren vermehrt und auf Klonalität hin überprüft werden konnten.

### 3.16 Western-Blot

Im Western-Blot werden Proteine, die zuvor in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen wurden, durch Antikörper spezifisch markiert und sichtbar gemacht.

### 3.16.1 Probengewinnung

Je Probe wurden  $1 \times 10^6$  Zellen einmal mit PBS gewaschen, sedimentiert und in  $300 \mu\text{l}$  Lysepuffer (10 mM Tris, pH 8,0, 20 mM EDTA, 0,5% Triton X-100) aufgenommen. Nach einem Einfrier-/Auftau-Zyklus wurde das Gesamtprotein in 1 ml Methanol ü.N. gefällt und anschließend getrocknet.

### 3.16.2 Tricin-SDS-PAGE und Elektrobplot

Das gefällte Gesamtprotein wurde in  $15 \mu\text{l}$  Protein-Proben-Puffer gelöst und für 5 Minuten bei  $98^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden  $7 \mu\text{l}$  des Überstandes auf ein 9% Tricin-Gel (ca.  $7 \times 9$  cm) mit 4% Sammelgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei konstantem Strom, 20 mA für 15 Minuten und dann bei 25 mA für ca. 2 Stunden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und die Proteine im „Semi-Dry-Verfahren“ bei 130 mA für eine Stunde auf Nitrozellulose ( $0,45 \mu\text{m}$ ) übertragen.

#### Proben-Puffer:

Tris/HCl	50 mM , pH 6,8
Glycerin	12% (w/v)
SDS	4% (w/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	2% (w/v)
Bromphenolblau	0,01% (w/v)

#### Gel-Puffer:

Tris/HCl	3 M , pH 8,45
SDS	0,3% (w/v)

#### Sammelgel: (4%) (für 2 Gele)

Gelpuffer	1,98 ml
AA/bisAA (48%/1,5%)	0,65 ml
Aqua dest.	5,37 ml
APS (10% (w/v))	100 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$

#### Trenngel: (9%)

Gelpuffer	2,66 ml
AA/bisAA (48%/1,5%)	1,47 ml
Aqua dest.	3,87 ml
APS (10% (w/v))	100 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$

#### Kathoden-Puffer:

Tris	100 mM
Tricin	100 mM
SDS	0,1% (w/v)
Aqua dest	(pH ca. 8,3)

#### Anoden-Puffer:

Tris/HCl	200 mM , pH 8,9
----------	-----------------



**Blot-Transfer-Puffer:**

Tris	25 mM
Glycin	40 mM
Methanol	3% (v/v)
Aqua dest.	(pH ca. 8,3)

**3.16.3 Immunfärbung**

Vor der anschließenden Immunfärbung wurde die Nitrozellulosemembran zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen für eine Stunde unter Schwenken in PBS mit 0,5% Tween 20 und 3% Milchpulver inkubiert.

Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Rabbit-anti-B13R-Serum 1:1000) über Nacht bei 4°C , gefolgt von zweimaligem Waschen für 20 min und der einstündigen Inkubation mit dem Zweitantikörper (Bovine-anti-rabbit-POD, 1:500) bei Raumtemperatur.

Zur Entwicklung des Western-Blots mit dem ECL-Nachweisreagenz wurde dieser zunächst zweimal im oben genannten Puffer für 10 min gewaschen und dann in reinem PBS für weitere 10 Minuten inkubiert. Das ECL-Reagenz wurde, die Membran vollständig benetzend, für 1 Minute aufgetragen, der Blot anschließend mit Filterpapier vorsichtig getrocknet und mit Hilfe eines photographischen Films analysiert.

Antikörper-markierte Proteine erscheinen auf dem Röntgenfilm nach der Entwicklung als dunkle Banden. Die Intensität der Färbung wird bestimmt durch die Stärke der Bande und die Dauer des Auflegens des Filmes auf den Blot.

**3.17 Isolation niedermolekularer DNA und ihre Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese**

Ein Nachweis für Apoptose in Zellen ist die Darstellung einer Folge von 180 bp großen Stücken niedermolekularer DNA , die durch den Abbau der DNA durch Endonukleasen entstehen, die bei der Induktion von Apoptose zwischen den Nukleosomen schneiden.

Zur Isolation niedermolekularer DNA wurden 1,5 bis 2 Millionen Zellen je Probe wie gewünscht inkubiert und anschließend sedimentiert. Die Lyse erfolgte für 5 Minuten auf Eis in 1 ml Lyse-Puffer. Die hochmolekulare DNA wurde dann in einer Ultrazentrifugation pelletiert und die niedermolekulare DNA aus dem Überstand mit Phenol/Chloroform isoliert und mit Ethanol präzipitiert. Nach der Trocknung wurde die DNA in Probenpuffer gelöst.

Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 1,8%-Agarosegel in TBE mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid für ca. 30 Minuten bei 120 V und TBE als Laufpuffer.

Die Vielfachen der 180 bp werden im UV-Licht als Bandenmuster im Agarosegel sichtbar. Eine gewöhnlich mitisolierte Wolke niedermolekularer RNA diente auf dem Gel als ein Qualitätsmerkmal für die Isolation gleicher Mengen an Zellen bzw. DNA.

<u>Lyse-Puffer:</u>		<u>TBE:</u>		<u>Probenpuffer:</u>	
Tris/HCl	10 mM, pH 8,0	Tris/HCl	50 mM, pH 8,0	Tris/HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	20 mM	Borsäure	50 mM	EDTA	20 mM
Triton X-100	1%	EDTA	2 mM	Glycerin	5% (w/v)
				Bromphenolblau	0,01% (w/v)

### 3.18 Ermittlung der Zytotoxizität in $^{51}\text{Cr}$ Chromfreisetzungsversuchen

Im Chromfreisetzungsversuch wird das Ausmaß von Zellyse, die durch unterschiedliche Induktoren ausgelöst werden kann, ermittelt. Das Prinzip beruht darauf, daß bei einer Inkubation von Zellen in einer gepufferten konzentrierten  $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung dieses in die Zellen eindringt und sich unspezifisch an zelluläre Proteine anlagert. Stirbt eine Zelle während des Versuchszeitraumes und lysiert, so werden die löslichen Inhaltsstoffe mit dem radioaktiven Chromat wieder freigesetzt, welches dann aus dem Zellkulturüberstand mittels eines Gamma-counters quantifiziert werden kann.

Für einen Versuchsansatz wurde eine berechnete Menge an Zellen (zumeist die Targetzellen = anterograde Lyse) abzentrifugiert und für eine Stunde in möglichst geringem Volumen mit 100 mCi radioaktiver Natriumchromatlösung bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurde nicht aufgenommenes Chromat durch zweimaliges Waschen mit 5 ml R-10 entfernt und die Zellen in einem Volumen gelöst, das die pro Einzelbestimmung erforderliche Menge (meist  $1 \times 10^4$ ) Zellen in 100  $\mu\text{l}$  enthielt.

Die Zellsuspension wurde dann sogleich auf vorbereitete 96-Loch Rundbodenplatten verteilt, die neben den Versuchsansätzen in Dreifachbestimmung auch Platz für die Bestimmung der Spontanfreisetzung im Medium ohne Effektoren und der Maximalfreisetzung in 1,5% Triton X-100-Lösung boten.

Ein beschleunigtes Absetzen der Zellen auf den Grund der Platte konnte, falls kurzfristige Meßpunkte unter drei Stunden gewünscht waren, durch ein vorsichtiges Zentrifugieren

(Anlaufzeit 2 Minuten und ungebremster Auslauf) der Platte bei 500 rpm für eine Minute erzielt werden.

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden 100  $\mu$ l des Überstandes unter Vermeidung eines Aufwirbelns des Zellsedimentes abgesogen und in FACS-Röhrchen zu 100  $\mu$ l 3% Triton X 100-Lösung, zwecks Inaktivierung eventuell mitpipettierten Viruses, gegeben.

Die Zytolyse wurde abschließend aus den Mittelwerten der Dreifachbestimmung wie folgt berechnet:

$$\text{Lyse (\%)} = \frac{\text{Meßwert - Spontanfreisetzung}}{\text{Maximalwert - Spontanfreisetzung}} \times 100$$

## 4. Ergebnisse

### 4.1 CD4+ HIV-spezifische CTL

CD4+ HIV-spezifische CTL konnten bisher nicht aus HIV-infizierten Patienten isoliert werden. Es ist nicht bekannt, ob dies aus technischen Gründen nicht möglich ist oder ob sie in vivo überhaupt nicht vorkommen. HIV-Env-spezifische CD4+ CTL können jedoch nach einer Vakzinierung seronegativer Probanden mit HIV-Hüllproteinen neben CD8+ CTL aus deren Blut gewonnen werden (Hammond et al., 1992).

Die Fragestellung hier konzentriert sich darauf herauszufinden, ob diese CD4+ CTL, deren Aufgabe es ist, HIV-infizierte Zellen zu eliminieren, auch die von unserer Arbeitsgruppe, Heinkelein et al., 1995/96, beschriebene unspezifische, durch Zellfusion vermittelte Lyse hervorrufen können.

#### 4.1.1 Lyse von HIV-1 Glykoprotein exprimierenden autologen Zellen durch die Env-spezifischen Klone 414.5 und 414.45

Zunächst sollte die Aktivität der Env-spezifischen Klone im autologen System überprüft werden.

Hierzu wurden autologe B-Lymphozyten, 414 B-LCL, mit den rekombinanten Vakzinia-Viren vPE17 oder vPE18, die als Env-Expressions-Vektoren dienten, infiziert. Da beide Klone, 414.5 und 414.45, Epitope im Bereich von gp120 erkennen, sollten sie sowohl Zielzellen, die mit vPE17, als auch Zellen, die mit vPE18 infiziert wurden, lysieren.

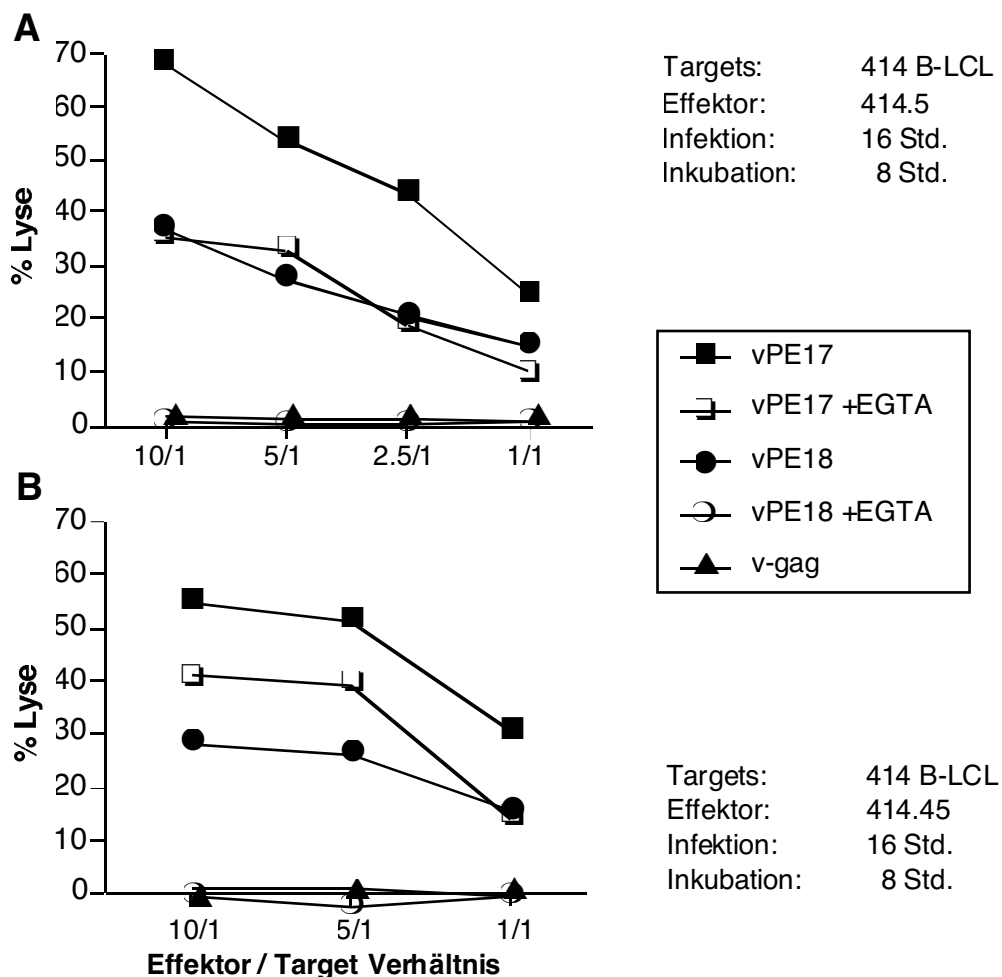
Das Konstrukt vPE17 sorgt bei der Infektion aufgrund einer Verkürzung im intrazellulär lokalisierten Bereich des gp41-Anteils des HIV-Glykoproteins für eine besonders hohe Zelloberflächenexpression, während die Verkürzung im vPE18 auch die Transmembranregion des gp160- bzw. gp41-Anteils einschließt und daher zu keiner Oberflächenexpression des env-Proteins führt (siehe auch Abb. 3.1).

Als Kontrolle diente die Infektion mit dem HIV-gag exprimierenden Konstrukt vAbt 141. Im Chromfreisetzungsversuch wurde die Lyse bei verschiedenen Effektor/Target-Verhältnissen in der An- und Abwesenheit von EGTA ermittelt. Das EGTA verhindert durch ein Abfangen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Medium mittels Komplexierung die Perforin-vermittelte spezifische Zytolyse.

Mit beiden CTL-Klonen ergab sich eine vom E/T-Verhältnis abhängige Zytolyse der vPE17 und der vPE18 infizierten HIV-env exprimierenden Zellen (s. Abb. 4.1). Die kontrollinfizierten Zellen wurden nicht lysiert.

In Gegenwart von EGTA wurde die Lyse der vPE17-infizierten Zellen nur teilweise gehemmt, die der vPE18-infizierten Zellen dagegen vollständig. Das heißt, daß bei Infektion der Targetzellen mit dem vPE17-Konstrukt sowohl eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige wie -unabhängige Lyse vorhanden ist, während ohne eine Oberflächenexpression des HIV-gp120, bei Infektion mit vPE18, keine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige, wohl aber die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zytolyse gemessen werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen auf zwei unabhängige Lysemechanismen der  $\text{CD4}^+$  Env-spezifischen CTL schließen. Der eine ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, der andere benötigt die Expression des gp120 an der Zelloberfläche, aber kein Kalzium im Kulturmedium.



**Abb. 4.1: Lyse von HIV-1-Glykoprotein-exprimierenden autologen Zellen durch  $\text{CD4}^+$  Env-spezifische CTL in An- und Abwesenheit von EGTA**

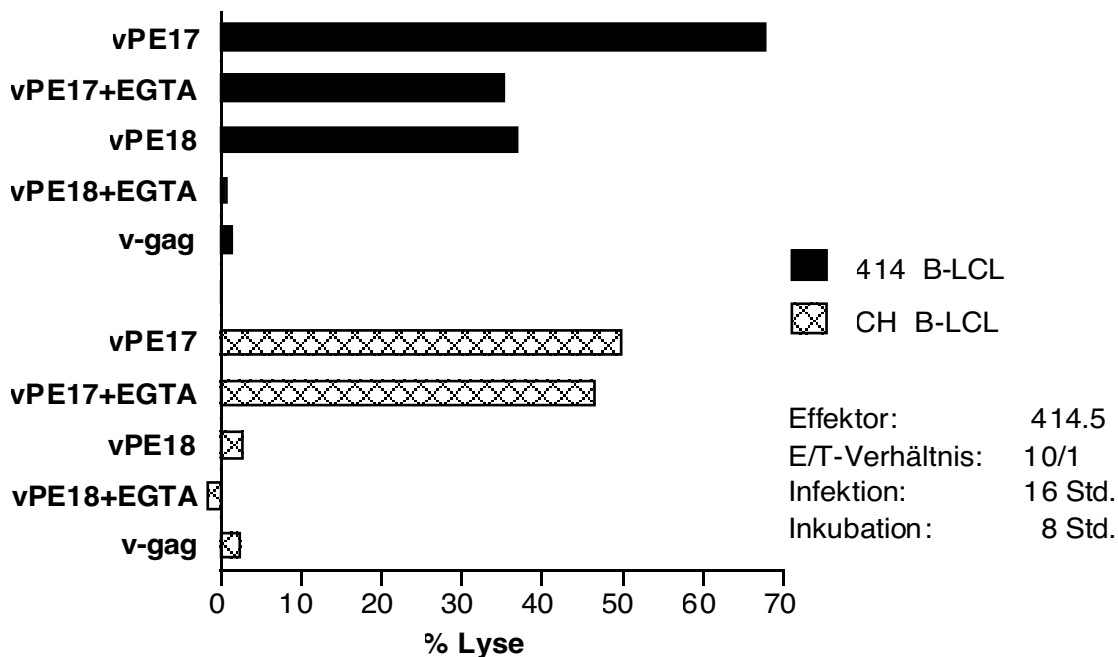
414B-LCL wurden mit den HIV-Env-exprimierenden Vakziniakonstrukten vPE17 und vPE18 oder zur Kontrolle mit dem Vakzinia/HIV-Gag Konstrukt vAbt 141 (v-gag) für 16 Std. infiziert und dienten als Zielzellen (Targets) für die  $\text{CD4}^+$  CTL-Klone 414.5 (A) und 414.45 (B). Die Inkubation betrug 8 Std., die EGTA-Konzentration war 1,5 mM.

#### 4.1.2 Vergleich der CD4+ CTL-vermittelten Lyse im autologen und heterologen System

Um zu überprüfen, welcher der beiden oben beschriebenen Lysemechanismen auf eine spezifische, HLA-restringierte Zytolyse zurückzuführen war, wurden in weiteren Versuchen neben den autologen B-Lymphoblasten auch heterologe, sich im HLA-Klasse-II-Muster unterscheidende B-Zellen (CH) als Targets eingesetzt.

Die in Abb. 4.2 dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß im Gegensatz zum autologen System bei Infektion der heterologen CH B-LCL mit Vakzinia/env-Konstrukten nur dann Lyse auftrat, wenn das gp120 auch an der Zelloberfläche exprimiert wurde. Diese Lyse war, anders als bei autologen 414 B-LCL, wo die Chromfreisetzung teilweise (bei vPE17) oder vollständig (bei vPE18) durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug zu blockieren war, nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig.

Somit scheint sie nicht HLA-restringiert zu sein und beruht nicht auf der Freisetzung von Perforin. Sie verhält sich wie die bei Heinkelein et al. 1995 beschriebene fusionsvermittelte unspezifische Zytolyse.

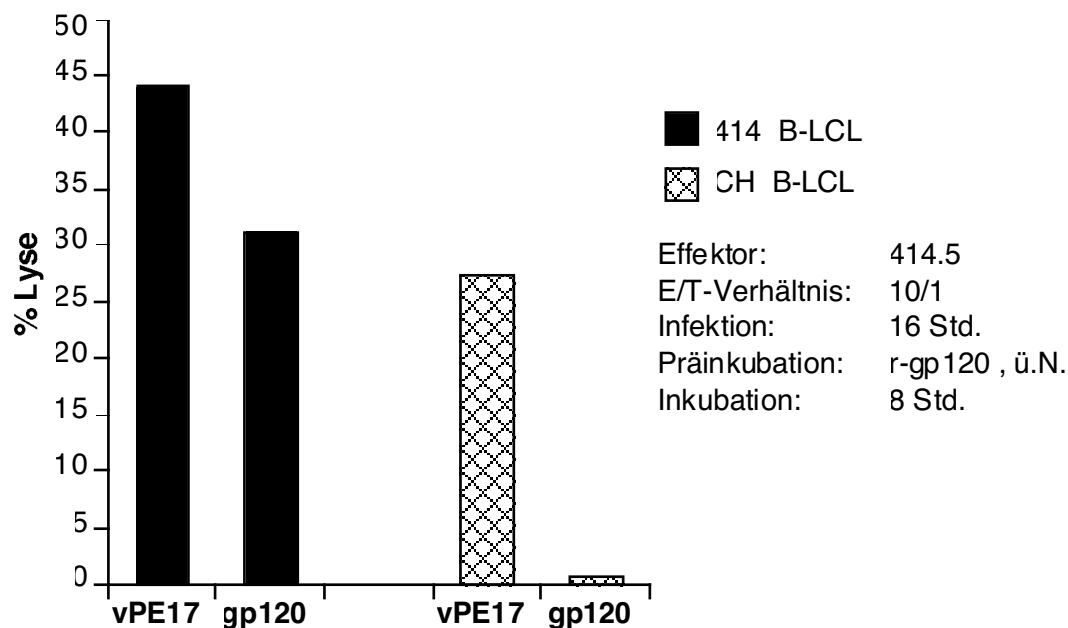


**Abb. 4.2: Zytolyse von Glykoprotein exprimierenden auto- und heterologen B-LCL durch CD4+ HIV-env-spezifische CTL**

Autologe (414) und heterologe (CH) B-LCL wurden für 16 Std. mit HIV-Glykoprotein exprimierenden Vakzinia-Konstrukten oder dem Kontroll-Virus (v-gag) infiziert und dienten als Targetzellen für den CTL-Klon 414.5. Die Lyse wurde nach 8 Std. im Chromfreisetzungsversuch in An- und Abwesenheit von EGTA (1,5 mM) bei einem E/T-Verhältnis von 10/1 ermittelt.

### 4.1.3 Spezifische, CD4+ CTL-vermittelte Lyse von Targetzellen, die mit rekombinantem HIV-Glykoprotein (r-gp120) sensitiviert wurden

Einen Vergleich der gemessenen Lyse zwischen Vakzinia-infizierten, gp120 exprimierenden und mit löslichem r-gp120 vorbehandelten Targetzellen im autologen sowie heterologen System zeigt Abb. 4.3 . Die Präinkubation von B-Zellen mit r-gp120 bewirkt, daß dieses Fremdprotein in die Zellen aufgenommen, dort im endoplasmatischen Retikulum prozessiert und in Form verschiedener Peptide (Epitope) mit HLA Klasse-II-Molekülen an der Oberfläche präsentiert wird. Durch diesen Versuch sollte ausgeschlossen werden, daß die Oberflächenpräsentation des gp120 für die antigen-spezifische Zytolyse notwendig ist.



**Abb. 4.3: Vergleich der Zytolysen nach vPE17-Infektion und r-gp120-Präinkubation**

Autologe (414) und heterologe (CH) B-LCL wurden entweder für 16 Std. mit dem Vakzinia-Konstrukt vPE17 infiziert oder über Nacht mit rekombinantem gp120 (10 µg/ml) präinkubiert. Als Effektor dienten Zellen des CTL-Klon 414.5, die in einem Verhältnis von 10/1 für 8 Std. zugesetzt wurden.

Aus der Graphik ist ersichtlich, daß bei Vakzinia-Infektion beide Target-Zellpopulationen, autologe wie heterologe, lysiert werden, wohingegen die Sensitivierung mit r-gp120 lediglich bei autologen Zellen in der Koinkubation mit spezifischen CTL zur Zerstörung der Targetzellen führt.

Es zeigt sich, daß zur antigenspezifischen Lyse eine Oberflächenpräsentation des gp120 nicht erforderlich ist, wohl aber für die Fusions-vermittelte unspezifische Lyse.

Die hier mit den Klonen 414.5 und 414.45 erzielten Ergebnisse konnten mit zwei weiteren, CD4+ HIV-env spezifischen CTL-Klonen (Een 217 und 111x39) anderer Probanden bestätigt werden. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wird an dieser Stelle verzichtet.

## **4.2 CD8+ HIV-spezifische CTL**

Den CD8+ HIV-spezifischen CTL wird in der HIV-Infektion eine zentrale Bedeutung in der körpereigenen antiretroviralen Aktivität zugesprochen. Mit ihrem Erscheinen, ca. 6 Wochen nach einer HIV-Infektion, klingt die initiale Virämie ab, ihre relative Häufigkeit korreliert mit einem günstigen Krankheitsverlauf (Lubaki et al., 1999).

Die Hauptfunktion der CD8+ CTL ist, neben der Sekretion von Immunregulantien, die Erkennung und Zerstörung infizierter Zellen. Die Zerstörung kann, wie einleitend bereits beschrieben, durch die Induktion von Apoptose über CD95 oder über den Perforin-Weg erfolgen.

Diese Erkenntnisse wurden zum überwiegenden Teil im murinen System gewonnen.

Übertragen auf die HIV-Infektion und den humanen Bereich sollte in diesem Abschnitt im Besonderen untersucht werden, mit welchen Mechanismen CD8+ HIV-spezifische CTL ihre Zielzellen zerstören.

### **4.2.1 Zusammenfassung der Gewinnung von HIV-spezifischen CD8+ CTL**

Zur Gewinnung von HIV-spezifischen CD8+ CTL-Klonen wurden PBMC von zwei HIV-positiven Probanden wie unter 3.7 beschrieben in insgesamt sechs verschiedenen Versuchen in unterschiedlichen Grenzverdünnungen von 3 bis 100 Zellen pro Einzelansatz ausgesät.

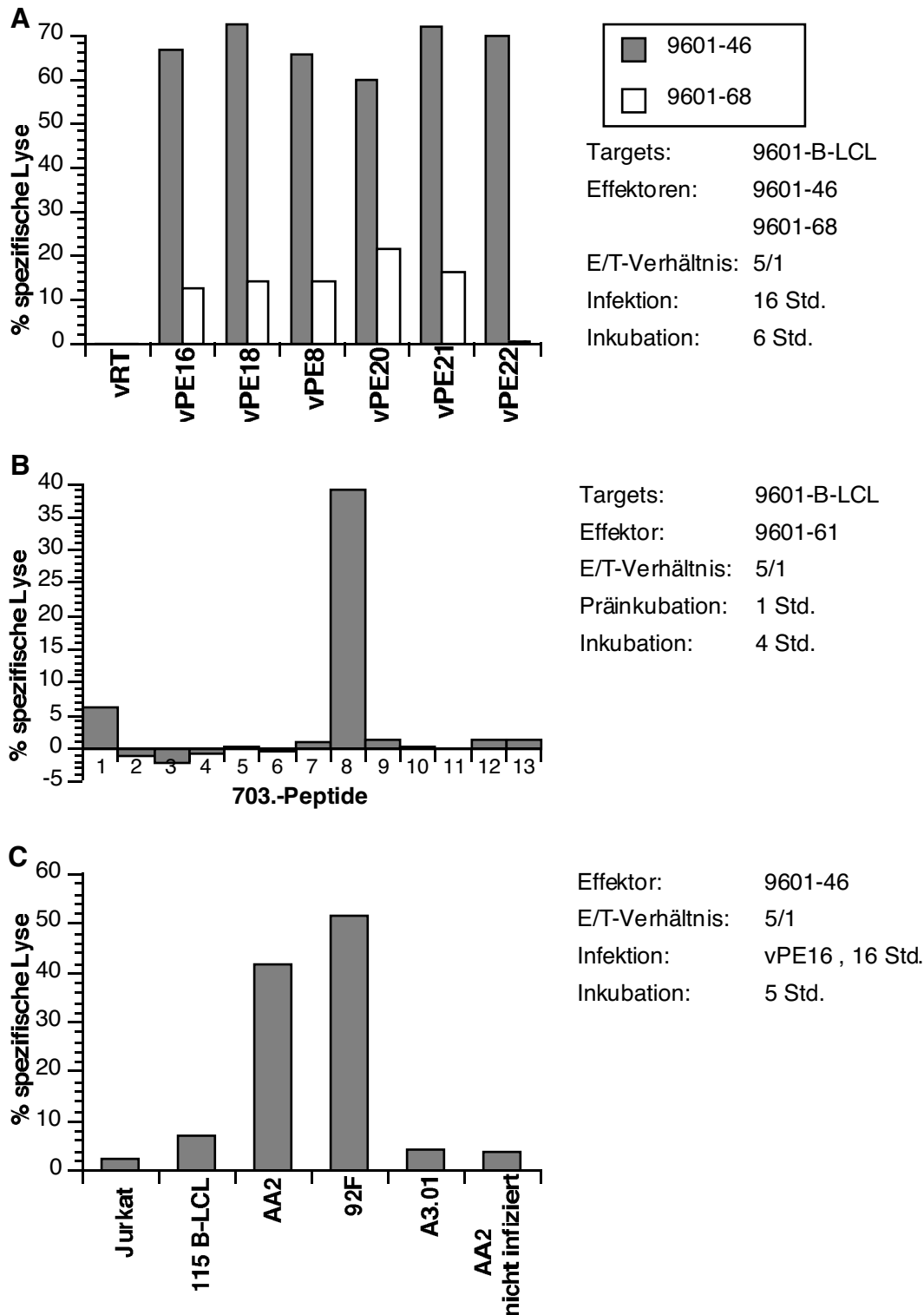
Dies ergab insgesamt 5.740 Einzelproben, aus denen 895 "Klone" isoliert und näher untersucht wurden, woraus letztendlich 5 CD8+ CTL-Klone gegen HIV-spezifische Epitope gewonnen werden konnten. Die Klone stammten alle von einem Patienten mit der Bezeichnung 9601 .

### **4.2.2 Nähere Beschreibung der verwendeten HIV-spezifischen CD8+ CTL**

Die CD8+ CTL erkennen ihre Zielzellen anhand von ganz spezifischen Peptidsequenzen, die hier aus den Proteinen des HI-Virus stammen und von den infizierten Zellen mittels HLA-Klasse-I-Molekülen an der Oberfläche präsentiert werden.

Zunächst wurden, soweit möglich, HLA-Restriktion und Epitopspezifität der CTL-Linien charakterisiert. Die Epitopbestimmung erfolgte durch den Einsatz von molekularbiologisch veränderten Vakzinia-Viren (s. 3.9), die nach der Infektion die Zellen einzelne vollständige oder aber verkürzte HIV-Proteine exprimieren lassen.





#### Abb. 4.4: Spezifikation der gewonnenen CTL-Klone

Unter A ist die Eingrenzung des Epitopbereiches für die Klone 9601-46 bzw. -68 dargestellt. Die autologen Targetzellen wurden mit rekombinanten Vakzinia-Viren infiziert, die unterschiedlich lange Abschnitte des HIV-Env-Proteins exprimierten.

B zeigt eine weitere Spezifikation, jetzt für den Klon 9601-61, mit HIV-p17-Peptiden (je 10 µg/ml).

Abschnitt C verdeutlicht exemplarisch für 9601-46 das Bestimmen des zur Präsentation notwendigen HLA-Subtyps. Das E/T-Verhältnis betrug jeweils 5/1, die Infektionen erfolgten für 16 Std., die Präinkubation mit Peptid betrug eine Stunde und die Inkubationen 6 (A), 4 (B) bzw. 5 (C) Stunden.

In vergleichenden Lyseexperimenten, in denen verkürzte HIV-Proteine exprimiert werden, kann festgestellt werden, in welchem Bereich des jeweiligen HIV-Proteins das Epitop liegt, welches von einem bestimmten CTL-Klon erkannt wird.

Durch die Präinkubation der Targetzellen mit synthetischen HIV-Peptiden kann dann anschließend das Epitop noch genauer beschrieben werden.

Des Weiteren läßt sich durch den Einsatz heterologer Zelllinien, die lediglich in einem HLA-Subtyp mit der autologen Zelllinie des Probanden übereinstimmen, auch das HLA-Molekül bestimmen, über welches das Epitop präsentiert werden muß, damit der spezifische Klon die Zielzelle lysiert.

Die Abbildung 4.4 zeigt exemplarisch die für die gewonnenen CTL-Klone durchgeführten Spezifikationschritte. Im Abschnitt A ist zu erkennen, daß der Klon 9601-46 vPE16 (vollständiges HIV-Glykoprotein) bis vPE22 (aa 1-204)-infizierte Zellen erkennt. Der Klon 9601-68 lysiert, mit deutlich geringerem Prozentsatz als 9601-46, nur bis zum Einsatz von vPE21 (aa 1-287). Kontrollinfizierte Targets (vCF21 = RT) werden gar nicht lysiert.

Das bedeutet, daß das Epitop, welches von 9601-46 erkannt wird, in den ersten 204 Aminosäuren des HIV-env Proteins liegt, während das für 9601-68 zwischen den Aminosäuren 204 und 287 liegen muß. Die genauere Spezifikation der Epitope für diese beiden Klone durch unterschiedliche HIV-Env Peptide (740.1-18 und HIV-Env Peptide 94-116) war nicht möglich.

In Abschnitt B ist stattdessen die Annäherung an das Epitop für den HIV-Gag spezifischen CTL-Klon 9601-61 dargestellt. Der für die Erkennung zur Lyse entscheidene Bereich konnte auf die Sequenz zwischen den Aminosäuren 71 und 85 des Gag-p17-Proteins eingegrenzt werden.

Abschnitt C zeigt das Lyseverhalten des Klons 9601-46 mit unterschiedlichen heterologen Targetzellen, die in jeweils einer Subklasse mit der HLA-Klasse I des Probanden 9601 (HLA: A25/28; B51/60) übereinstimmten (Jurkat: A25 ; 115-B-LCL: A28 ; AA2: B51 ; 92F: B51 und A3.01: B60). Zellen mit dem Subtyp B51, AA2 und 92F, wurden erkannt und lysiert, während die anderen Zelllinien oder nicht infizierte AA2-Zellen nicht zerstört wurden.

**Tab. 4.1: Übersicht über die HIV-spezifischen CD8+ CTL-Klone des Probanden 9601**

CTL Klon	HIV Spezifität	Proteinbereich	Peptid/Epitop	HLA-Subtyp
9601-61	gag	p17	703.8 aa71-85	B51
9601-46	gp160	gp120	bis aa204	B51
9601-68	gp160	gp120	zw. aa204-287	B51 ?
9601-121	gag	p24	nicht näher best.	nicht A25, B60, B51
9601-11	gag	p17	703.8 aa71-85	B51

Die Tabelle 4.1 enthält eine Zusammenfassung über die Ergebnisse der Spezifizierungen zu den fünf oben erwähnten, gewonnenen HIV-spezifischen CTL-Klonen. Der Klon 9601-11, in einer zeitlich späteren Klonierung „gefischt“, erkannte das gleiche Epitop wie 9601-61, der als erster HIV-spezifischer CTL-Klon dieses Probanden gewonnen werden konnte.

Außer diesen Klonen wurde der Klon 38a15 verwendet, der eine Peptidsequenz im HIV-Gag Protein (p17) erkannte, aa261-269, die in dem Peptid 788.13 (aa 253-274) enthalten war. Die Lyse dieses Klons war HLA-B8-restringiert und Versuche wurden hier ausschließlich mit der homologen B-Zelllinie 38a-B-LCL durchgeführt.

Um nun die Mechanismen der Lyse HIV-spezifischer CTL, die über zwei unterschiedliche Wege (CD95- oder Perforin-vermittelt) ablaufen kann, untersuchen zu können, wurden unter anderem diverse Vakzinia-Virus-Rekombinationen eingesetzt. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe wiesen darauf hin, daß bestimmte Vakzinia-Virus-Stämme mit der CD95 vermittelten Apoptose interferieren. Deshalb wurden HIV-Gene in unterschiedliche Vakzinia-Virus-Stämme kloniert, um die Virus-Stamm-abhängige Inhibition der Apoptose zu untersuchen.

### **4.2.3 Vorbereitende Untersuchungen**

Vakzinia-Viren eignen sich aufgrund des breiten Spektrums an Wirtszellen und der guten molekularbiologischen Handhabbarkeit besonders als Werkzeuge für die Untersuchung der CTL-vermittelten Zytolyse, da man durch sie unterschiedliche Fremdproteine (z.B. HIV-Proteine) in Zielzellen exprimieren lassen kann (Earl et al., 1991).

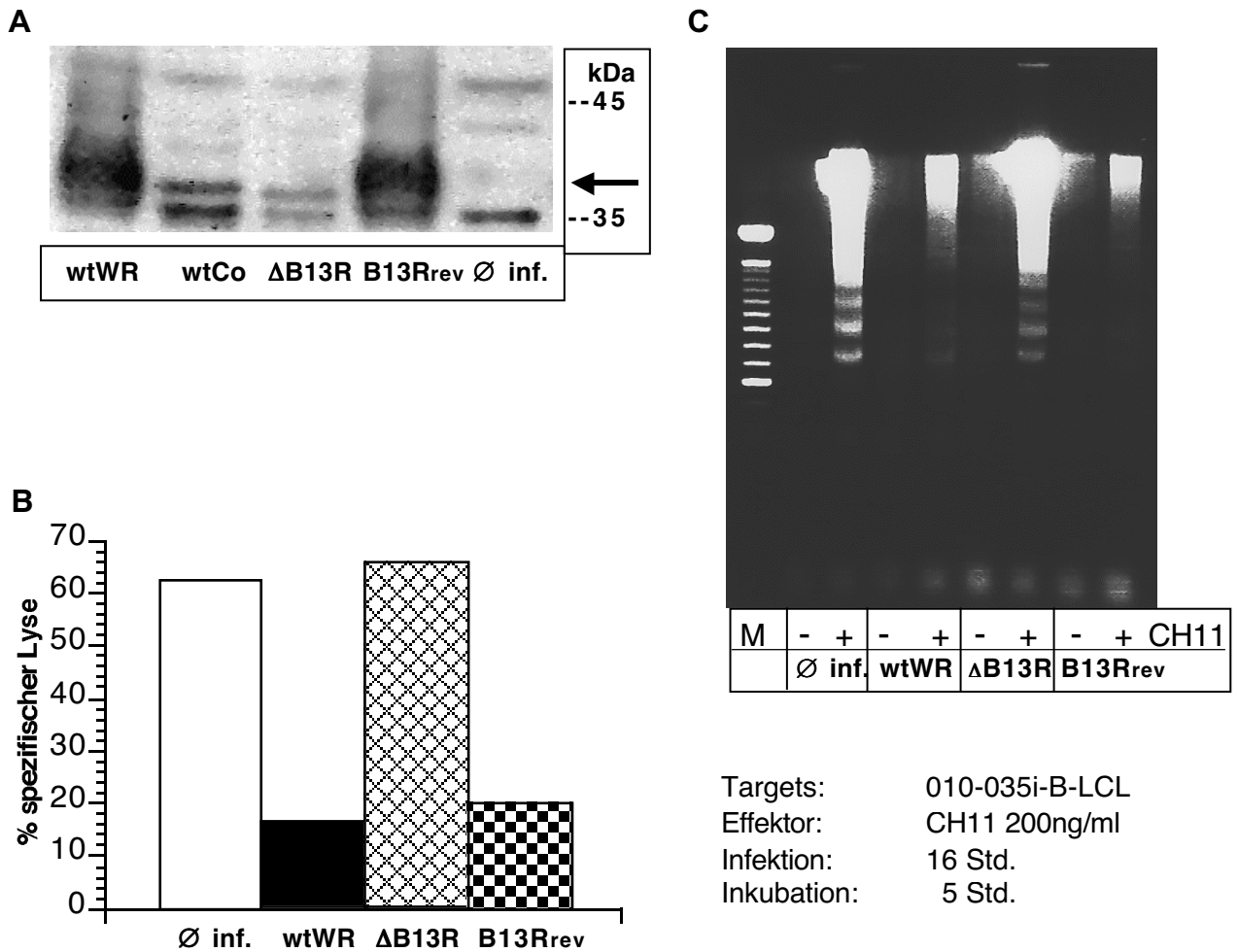
Andererseits wurde in unserer Arbeitsgruppe (Heinkelein et al., 1996) erstmals nachgewiesen, daß VV-WR, nicht aber VV-Copenhagen (bzw. NYVAC), CD95-vermittelten Zelltod unterdrückt. Dieses erfolgt deutlich bevor der Zellmetabolismus durch die VV-Infektion zusammenbricht und nicht durch ein Herunterregulieren des CD95-Moleküls von der Zelloberfläche oder einer Beeinflussung von dessen Bindungseigenschaften.

#### **4.2.3.1 Inhibition der CD95-induzierten Apoptose durch das Vakzinia-Virus B13R-Genprodukt**

Vergleiche der Gensequenzen von VV-Copenhagen und -WR haben gezeigt, daß zwischen den Virusstämmen ein Unterschied im B13R-Gen besteht. Dieses Gen ist dem Kuhpocken-

gen crmA zu 92 Prozent homolog. CrmA ist ein Serinprotease-Inhibitor und hemmt das "Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme" (ICE) und darüber die Apoptose (Tewari et al., 1995).

In einer Zusammenarbeit mit der Gruppe von G. Smith, Oxford, wurde untersucht, ob B13R CD95-(und TNF  $\alpha$ -) induzierte Apoptose hemmt. Dazu wurden VV-WR-Mutanten verwendet, bei denen entweder das B13R-Gen herausgeschnitten ( $\Delta$ B13R) bzw. anschließend wieder hineinkloniert (B13Rrev) wurde.



**Abb. 4.5: Inhibition der CD95-induzierten Apoptose durch das Vaccinia-Virus B13R-Genprodukt**

010-035i B-Lymphoblasten wurden für 16 Std. mit VV, WR-Wildtyp (wtWR), WR mit deletiertem B13R-Gen ( $\Delta$ B13R) oder  $\Delta$ B13R mit revertiertem B13R-Gen (B13Rrev) infiziert und anschließend mit dem anti-CD95-Antikörper CH11 in einer Konzentration von 200 ng/ml inkubiert.

**A:** Nachweis der B13R-Expression im Western Blot mit dem Kaninchen-anti-B13R-Serum (1:1000).

**B:** Chromfreisetzung nach 5 Std. Inkubation mit CH11 .

**C:** DNA-Fragmentation nach 3,5 Std. Inkubation mit CH11 . (M=100 bp Leiter, die untere starke Bande entspricht 500 bp).

Western Blot-Analysen mit einem B13R-spezifischen Antiserum zeigen die Expression von B13R in wtWR und B13Rrev infizierten Zellen (Abb. 4.5 A, relativ breite Bande bei rund 38 kDa, mit einem Pfeil gekennzeichnet). VV-Copenhagen und  $\Delta$ B13R infizierte, sowie nicht infizierte Zellen zeigen kein B13R-Produkt.

Die Resistenz gegen die CD95-vermittelte Zytolyse, die B13R-exprimierende VV-Konstrukte vermitteln, wurde in Zytotoxizitätstests untersucht. Abbildung 4.5 B zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines  $^{51}$ Chromfreisetzungsversuches.

Die CH11-induzierte Zytolyse, als Maß für Apoptose, wurde in B13R-positiven Zellen deutlich gehemmt. Die CD95-Antikörper-induzierte Apoptose wird also durch das B13R-Genprodukt inhibiert.

Auch nach Präparation der niedermolekularen DNA zeigte sich das für Apoptose typische Bandenmuster in Vielfachen von 180 bp nur in den Zellen, die kein B13R exprimierten (s. Abb. 4.5 Abschnitt C).

Dieser Mechanismus der Inhibition von Apoptose durch B13R ermöglicht es, durch den Einsatz unterschiedlicher VV-Stämme, gezielt und differentiell die CD95-vermittelte Zytolyse zu blockieren.

#### **4.2.3.2 Homologe Rekombination von Vakzinia-Viren zum Einschleusen von HIV-Proteinen**

Im VV-Wildtyp WR (Western Reserve) ist das B13R-Gen vorhanden und wird exprimiert, während im VV-Wildtyp Co (Copenhagen) das Leseraster des Gens unterbrochen ist und kein funktionelles Genprodukt entsteht (s. Abb. 4.5 A).

In der Arbeitsgruppe vorgelegen haben VV-Konstrukte in WR (vPE16) und Co (vPE16/1), die das HIV-Env-Gen enthalten, für HIV-Gag lag lediglich ein Co-Konstrukt (vC14) vor, so daß hier das Herstellen eines gag-Konstruktes mittels homologer Rekombination in den VV-Wildtyp WR notwendig wurde.

Die Rekombination erfolgte wie unter 3.9 beschrieben.

Es konnten nach insgesamt dreimaliger Selektion zwei Klone isoliert werden, die in der indirekten Immunfärbung positiv für die Expression von HIV-Gag waren, E3 und H11. Nach erneuter Einzelplaque-Aussaat ohne Selektionsbedingungen wurden die beiden Gag-positiven Subklone, E3/1 und H11/10, zur Bildung einer hochkonzentrierten Virus-Stammsuspension mit einem Titer von je  $1 \times 10^8$  pfu/ml vermehrt.

Sie dienen im Weiteren zur Infektion von Targetzellen in zytotoxischen Assays, in denen die Expression von HIV-Gag Protein bei gleichzeitigem Vorhandensein des B13R-Genproduktes erwünscht war.

#### **4.2.3.3 Concanavalin A-vermittelte Zytolyse**

Bevor die Antigen-spezifische Lyse getestet wurde, mußte untersucht werden, ob die CD8+ CTL-Klone sowohl Perforin- wie auch CD95-vermittelt lysieren können.

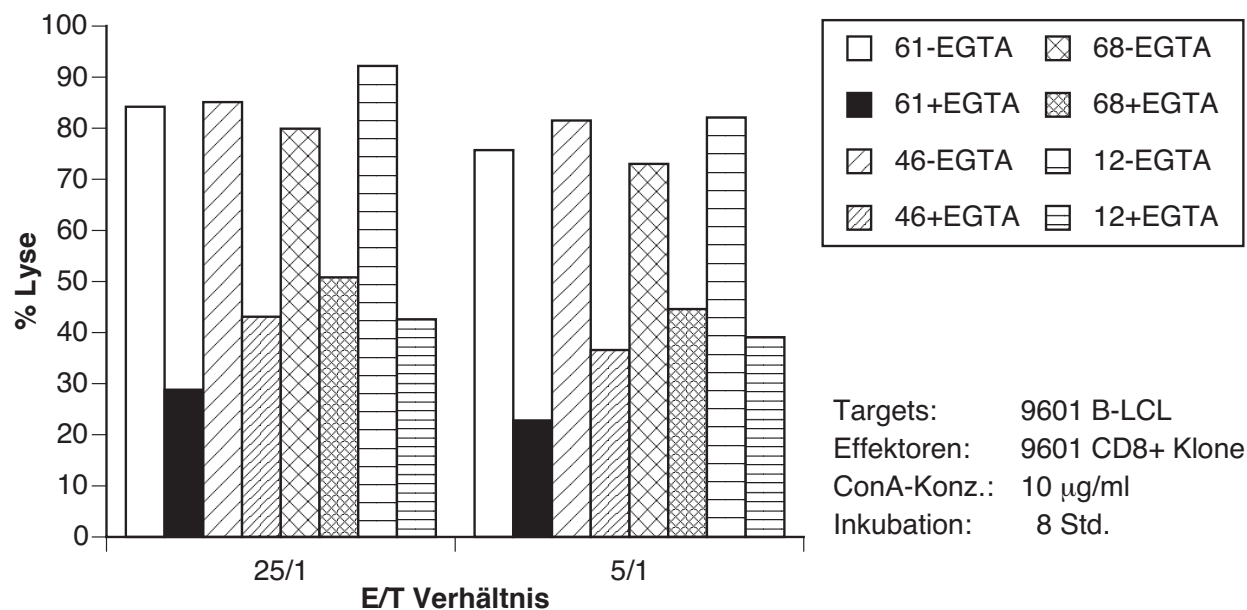
Denn in der Literatur waren bislang humane CTL beschrieben worden, die mit unterschiedlichen Lysemechanismen arbeiteten: ein anti-Hepatitis C CTL-Klon nutzt sowohl Perforin-, wie CD95- als auch TNF  $\alpha$ -vermittelte Lyse (Ando et al., 1997); Tumor-spezifische CTL nutzen sowohl Perforin als auch CD95 (Zeytun et al., 1997); CD8+ T-Zellen vernichten Influenza-infizierte Zellen über Perforin und CD95 (Topham et al., 1997); humane CD4+ CTL gegen Herpes-Simplex-Virus lysieren ausschließlich über Perforin (Yasukama et al., 1999); und Hadida et al. (1999) beschreiben polyspezifische CTL HIV-infizierter Patienten, die über den CD95/CD95L-Weg Zellen zerstören.

Zur Überprüfung der hier gewonnenen CD8+ CTL-Klone wurden unspezifische Lyseexperimente durchgeführt, in denen die Targetzellen mittels des pflanzlichen Lektins Concanavalin A (Con A) in so engen Kontakt mit den CTL gebracht wurden, so daß Lyse auch ohne die Präsentation von Antigen stattfinden konnte.

##### **4.2.3.3.1 Con A-vermittelte Lyse von autologen B-Lymphoblasten durch CD8+ HIV-spezifische T-Zellklone enthält einen deutlichen Kalzium-unabhängigen Anteil, der klon-spezifisch in der Höhe schwankt**

Autologe B-Lymphoblasten wurden für 8 Stunden mit verschiedenen CD8+ CTL-Klonen des Probanden 9601 kokultiviert. Die Lyse wurde unspezifisch durch Con A (10  $\mu$ g/ml) induziert.

Die Auswertung dieses Versuches (s. Abb. 4.6) ergibt für alle getesteten CTL-Klone gute Lyseraten, die für ein E/T-Verhältnis von 25/1 um die 80% und für ein E/T-Verhältnis von 5/1 zwischen 70 und 80% erreichen. Bei Kalziumentzug durch Komplexbildung mit EGTA sind die Lyseraten stark vermindert und schwanken in beiden E/T-Verhältnissen klon-abhängig zwischen 23 und 50% , wobei der CTL-Klon 9601-61 die niedrigste und der Klon 9601-68 die höchste Kalzium unabhängige Lyserate aufweist.



**Abb. 4.6: Con A-vermittelte Lyse von autologen B-Lymphoblasten durch CD8+ HIV-spezifische T-Zellklone**

Die Targetzellen, 9601-B-LCL, wurden mit verschiedenen autologen CD8+ T-Zellklonen bei den Effektor/Target-Verhältnissen von 25/1 und 5/1 unter dem Einfluß von 10 µg/ml Concanavalin A lysiert. Der Versuch wurde in An- und in Abwesenheit von 1,5 mM EGTA durchgeführt, die Inkubationszeit betrug 8 Stunden.

Die unterschiedlichen Höhen der Kalzium-unabhängigen Zytolyse ließen sich auch durch möglichst genaue Gleichbehandlung der CTL-Klone (gleiche Anzahl von Restimulationen und gleiche Zeitspanne nach der letzten Restimulation) nicht nivellieren.

HIV-spezifische CTL sind folglich in der Lage, mindestens zwei unterschiedliche Lysewege zu vollziehen, einen Kalzium-abhängigen und einen Kalzium-unabhängigen. Die Höhe des Kalzium-unabhängigen Anteils ist hierbei, Con A-vermittelt und bei gleichen Targets, klon-spezifisch.

Über welchen Mechanismus er induziert werden kann, wird unter 4.2.3.3.3 beschrieben.

#### **4.2.3.3.2 Die Höhe des Kalzium-unabhängigen Anteils an der Zytolyse ist auch von den verwendeten Targetzellen abhängig**

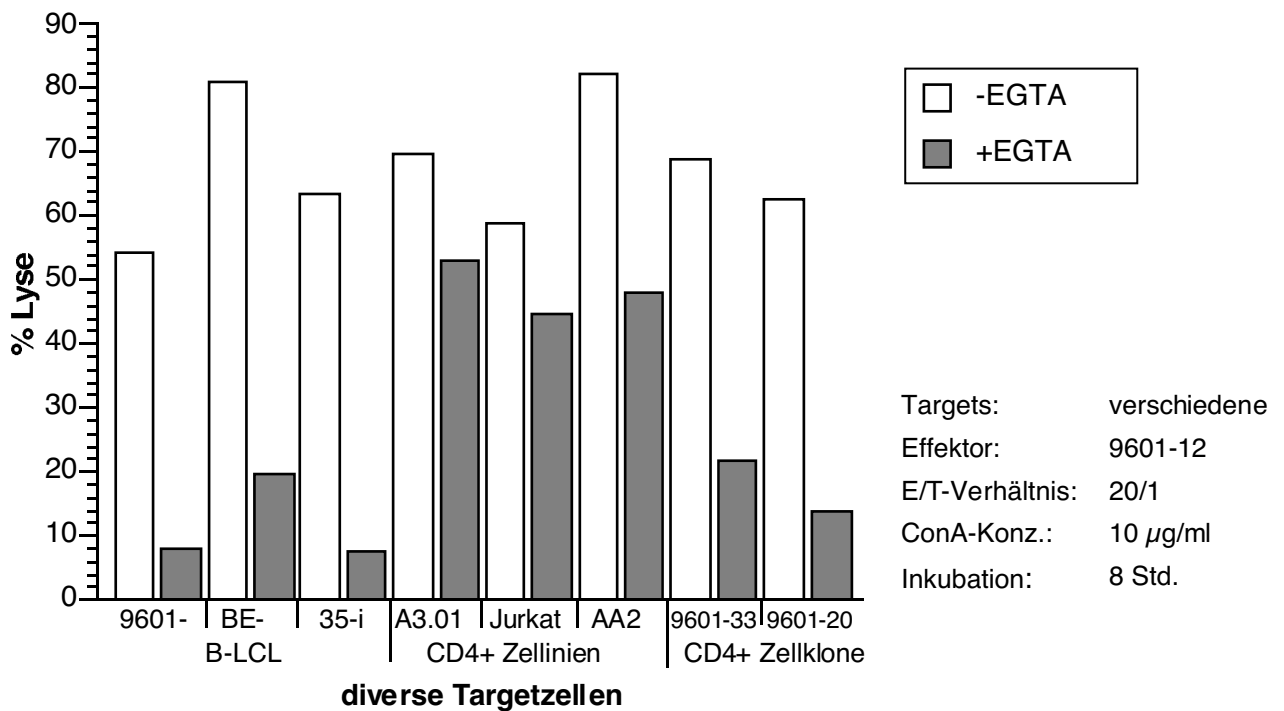
Die natürlichen Target-Zellen für HIV-spezifische CTL sind die HIV-infizierten Zellen des Immunsystems, überwiegend CD4+ Lymphozyten. Für Untersuchungen zu Lysemechanismen von CTL werden aber häufig, aus Gründen der leichteren Verfügbarkeit und Handhabbarkeit, immortalisierte T-Zelllinien und EBV-transformierte B-Zelllinien verwendet.

Um zu überprüfen ob, und in wie weit, die mit diesen Targetzellen gewonnenen Ergebnisse auf die natürliche Situation übertragen werden können, wurde ein Vergleich der Con A-ver-

mittelten Zytolyse mit einem CD8<sup>+</sup> CTL-Klon und unterschiedlichen Targetzellen durchgeführt.

Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 4.7, zeigen, daß der Kalzium-unabhängige Anteil an der Lyse in seiner Ausprägung stark von den verwendeten Targetzellen bestimmt wird. Mit den CD4-positiven T-Zelllinien A3.01 und Jurkat, sowie der CD4-positiven B-Zelllinie AA2, ergaben sich mit 54% , 44% bzw. 48% die höchsten Anteile bei diesen immortalisierten Zelllinien. Die EBV-transformierten B-Zelllinien, autolog wie heterolog, und die primären CD4<sup>+</sup> Klone erreichten lediglich Kalzium-unabhängige Anteile zwischen 14% und 20%.

Die immortalisierten Zelllinien zeigten in vergleichenden Anti-CD95-Immunfärbungen einen höheren relativen Anteil (bezogen auf ihre Größe) an Oberflächenexpression von CD95 als primäre Zellen. Ein möglicher Grund für einen größeren Kalzium-unabhängigen Anteil an der Zytolyse.



**Abb. 4.7: Con A-vermittelte Lyse mit einem CD8<sup>+</sup> T-Zellklon und unterschiedlichen Targetzelllinien**

Als Targetzellen in diesem Versuch dienten die autologe 9601-B-Zelllinie; BE- und 35i-B-LCL, zwei heterologe B-Zelllinien; AA2, eine CD4-positiv B-Zelllinie; die CD4-positiven T-Zelllinien A3.01 und Jurkat E6.1; und die autologen CD4-positiven T-Zellklone 9601-33 und -20. Die Lyse erfolgte bei einer Concanavalin A-Konzentration von 10 µg/ml ± 1,5 mM EGTA, bei einem E/T-Verhältnis von 20/1 für 8 Stunden.

Allgemein zeigten sich neben den hier beschriebenen Zelltyp-bedingten Schwankungen in der Höhe der Lyseraten, gesamt wie partiell, auch Unterschiede von Versuch zu Versuch.

In Abhängigkeit von der Fitneß der Zellen allgemein, der eventuell mehr oder minder starken Infektion mit VV oder HIV der Targetzellen und insbesondere auch dem Zustand der CTL-



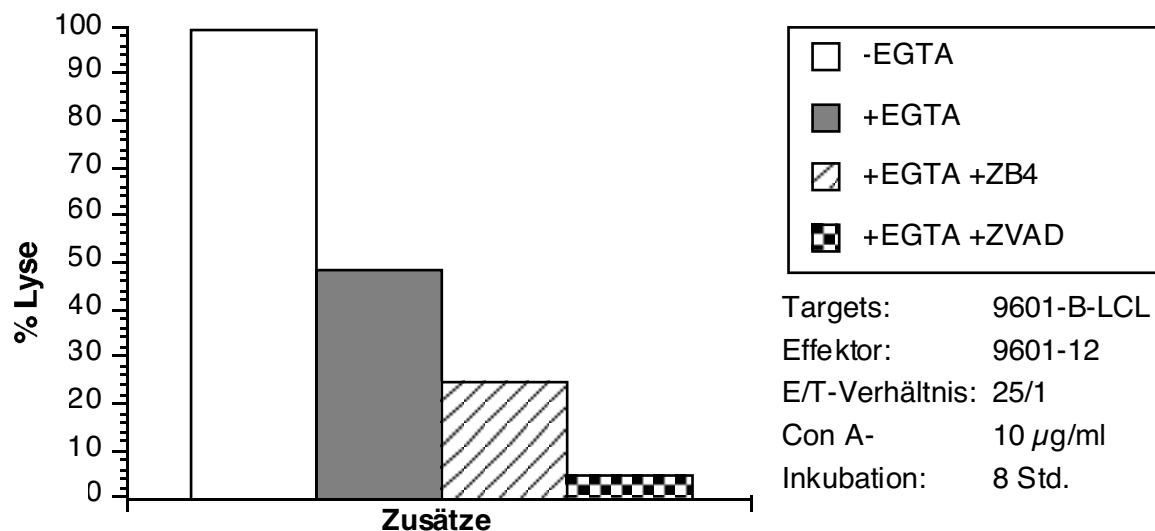
Klone, betreffend die Anzahl der Stimulationszyklen und die Zeit spanne nach Stimulation, ergaben sich Abweichungen. Um diese so gering wie möglich zu halten, wurden die beeinflussbaren Parameter so konstant wie möglich gehalten und auf Vergleiche zwischen zeitlich relativ weit auseinanderliegenden Versuchen weitestgehendst verzichtet.

#### 4.2.3.3 Hemmstoffe der CD95-induzierbaren Apoptose inhibieren den Kalzium-unabhängigen Anteil der Con A-vermittelten Lyse

Ist der Kalzium-unabhängige Anteil an der oben beschriebenen Con A-vermittelten Zytolyse unter Beteiligung von HIV-spezifischen CD8+ CTL-Klonen ein apoptotischer Prozess, der über CD95 initiiert wird, so müßten Hemmstoffe der CD95-induzierten Apoptose diesen unterdrücken können.

Tatsächlich hemmen, wie in Abb. 4.8 dargestellt, sowohl das irreversibel Caspasen-inhibierende Peptid ZVAD, nahezu vollständig, als auch der inhibierende anti-CD95 Antikörper ZB4, teilweise, den Kalzium-unabhängigen Anteil der Zytolyse.

Es ist folglich ein apoptotischer Prozess bei der Con A-vermittelten Lyse beteiligt. Ob dieser hier vollständig über CD95 oder eventuell auch über andere Induktoren (evtl. TNF- $\alpha$ ) initiiert wurde, bleibt offen.



**Abb. 4.8: Inhibition des Kalzium-unabhängigen Anteils der Con A-vermittelten Lyse durch ZVAD und ZB4**

Die Concanavalin A-(10  $\mu$ g/ml)-vermittelte Lyse der autologen B-Zellen erfolgte durch den CD8+ Klon 9601-12 für 8 Stunden bei einem E/T-Verhältnis von 25/1 in An- oder Abwesenheit von 1,5 mM EGTA  $\pm$  100 ng/ml ZB4 oder  $\pm$  50  $\mu$ M ZVAD .

#### 4.2.4 Mechanismen der Antigen-spezifischen Zytolyse CD8+ CTL

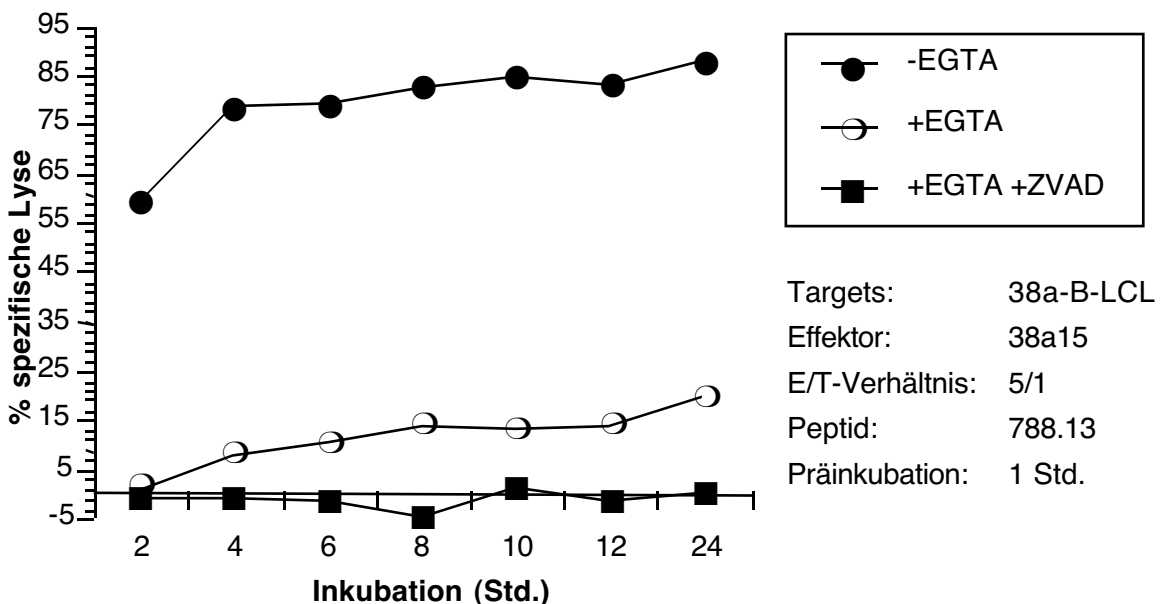
Zur Untersuchung der Lysemöglichkeiten der CTL können durchaus gut zu handhabende Zelllinien und unspezifische Lyseinduktoren verwendet werden. Um zu einer Aussage zu der Situation *in vivo* zu gelangen, müssen die Versuchsbedingungen inklusive der Targetzellen so gut der natürlichen Situation entsprechen wie möglich.

Im weiteren sollen nun die Verhältnisse bei Antigen-spezifischer Zytolyse betrachtet werden.

##### 4.2.4.1 Lysekinetik mit dem HIV-gag-spezifischen CTL-Klon 38a15

Zunächst wurde untersucht, ob ein Kalzium-unabhängiger Anteil bei der Antigen-spezifischen Zytolyse überhaupt vorkommt. Hierzu wurde eine Lysekinetik aufgenommen, die die optimale Inkubationszeit für einen möglichst deutlichen Kalzium-unabhängigen Anteil ergeben sollte.

Die in Abb. 4.9 dargestellte Kinetik zeigt einen auf niedrigem Niveau mit der Zeit konstant steigenden Kalzium-unabhängigen Lyseanteil, der bei 8 bis 12 Stunden einen optimalen Bereich um 14% aufweist. Nach 24 Stunden ist der Anteil zwar nochmals auf 19,9% gestiegen, allerdings erreichte zu diesem Zeitpunkt die Spontanfreisetzung inakzeptabel hohe Werte (über 30% der Maximallyse). Die spezifische Lyse insgesamt beträgt bereits nach 4 Stunden knapp 80% und steigt dann nur noch unwesentlich an.



**Abb. 4.9: 24-Stundenkinetik der Antigen-spezifischen Zytolyse des CD8+ CTL-Klons 38a15**

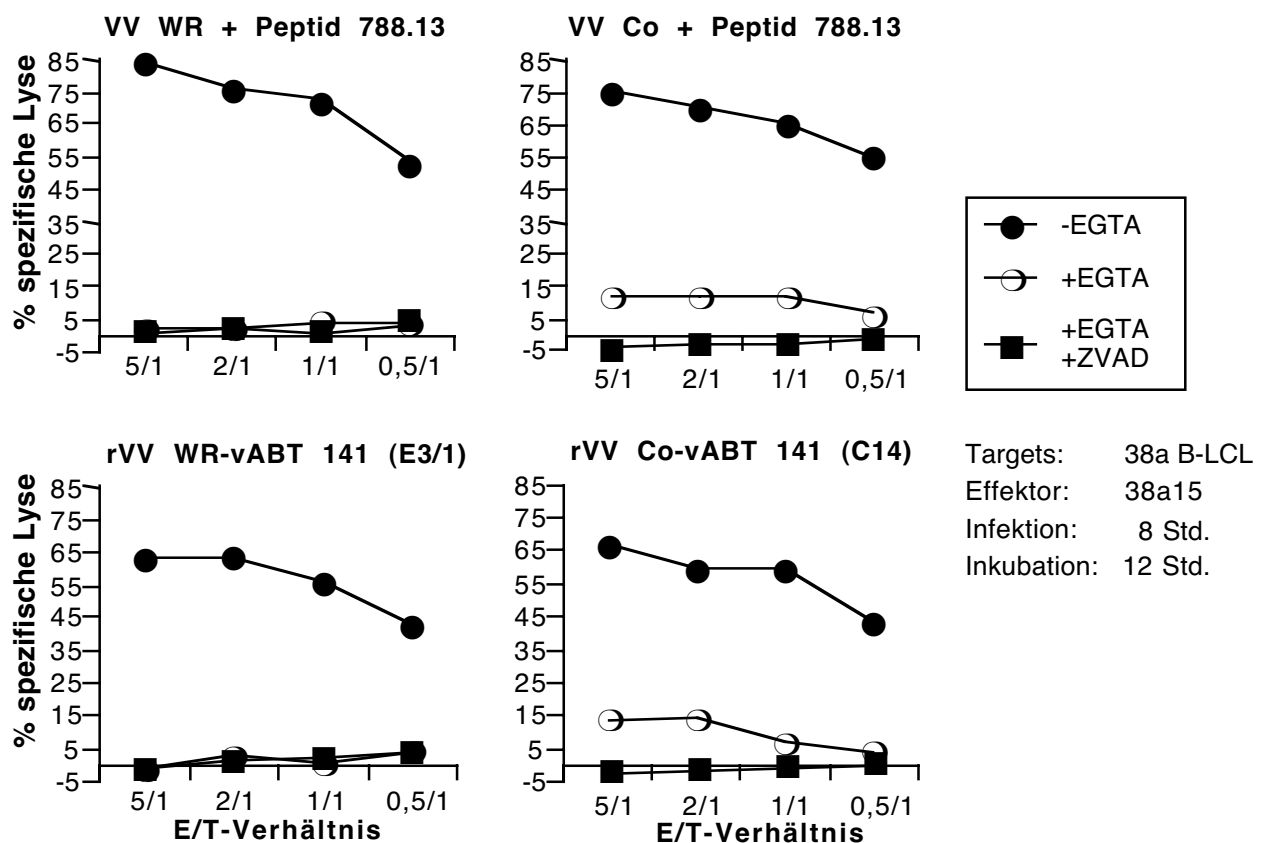
Die Lyse-Kinetik wurde hier mit dem CD8+ HIV-Gag-spezifischen CTL-Klon 38a15 in einem Effektor/Target-Verhältnis von 5/1 durchgeführt. Als Targets dienten autologe B-LCL, die eine Stunde vor Versuchsbeginn mit dem 38a15-spezifischen Peptid 788.13 (1 µg/ml) präinkubiert wurden. Die ZVAD-Konzentration betrug 20 µM.

Über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden läßt sich die Zytolyse durch den Zusatz von ZVAD und EGTA vollständig blockieren.

Ähnliche Zeitverläufe ließen sich auch mit den HIV-Gag bzw. HIV-Env-spezifischen CTL-Klonen 9601-61 bzw. 9601-46 beobachten. Die Inkubationsdauer wurde daher in den weiteren Untersuchungen auf möglichst 8 bis 12 Stunden ausgedehnt.

#### 4.2.4.2 Das B13R-Genprodukt des Vakzinia-Virus WR vermag sowohl die Peptid-induzierte als auch die durch virale HIV-Proteinexpression initiierte Antigen-spezifische Kalzium-unabhängige Zytolyse zu unterdrücken

Um zu untersuchen, ob die Wahl des rekombinanten VV-Stammes einen Einfluß auf die CD95-vermittelte Lyse hat, wurde folgendes vergleichende Experiment durchgeführt.



**Abb. 4.10: Inhibition des Ca-unabhängigen Anteils der CTL-spezifischen Zytolyse durch das VV-WR B13R-Genprodukt**

Die hier dargestellten Zytotoxizitätstests wurden mit dem HIV-Gag-spezifischen CD8+ CTL-Klon 38a15 und autologen B-LCL durchgeführt. Die Targets waren entweder mit VV-WR bzw. Co-Wildtyp infiziert und zusätzlich mit dem spezifischen Peptid 788.13 (1 µg/ml) eine Stunde vorinkubiert oder mit rekombinanten VV, WR wie Co, infiziert, die das HIV-Gag-Protein exprimierten. In allen Fällen wurde für 8 Stunden infiziert und dann für weitere 12 Stunden mit unterschiedlichen Effektor/Target-Verhältnissen inkubiert.

Die autologen 38a-B-LCL wurden einmal durch die Zugabe des dem CTL-Klon (38a15) korrespondierenden Peptids (788.13) für die spezifische Lyse präpariert, und zum Zweiten durch die virale HIV-Proteinexpression von rekombinanten VV zur Lyse vorbereitet. Durch die Wahl des VV-Stammes WR, welcher das funktionelle B13R-Produkt exprimiert, konnte der CD95-vermittelte Anteil der Zytolyse unterdrückt werden. Bei Infektion mit Viren des Copenhagen-Stammes blieb der CD95-vermittelte Anteil deutlich sichtbar (s. Abb. 4.10).

Insgesamt lag in diesem autologen System mit 38a-B-Zellen der Kalzium-unabhängige Anteil zwischen 7% und 13% bei einem E/T-Verhältnis von 5/1 und war bei nicht infizierten, Peptid-stimulierten Targets, sowie VV-Co infizierten Zellen, durch den Zusatz von ZVAD (20  $\mu$ M) auf Null abzusenken.

Die spezifische Zytolyse war im Kalzium-abhängigen wie -unabhängigen Teil, bezogen auf das E/T-Verhältnis konzentrationsabhängig, beim größten E/T-Verhältnis von 5/1 zeigten sich die jeweils höchsten Lyseraten.

#### **4.2.4.3 Der Kalzium-unabhängige Anteil der CTL-vermittelten spezifischen Zytolyse ist ein apoptotischer Prozess, der über CD95 initiiert wird**

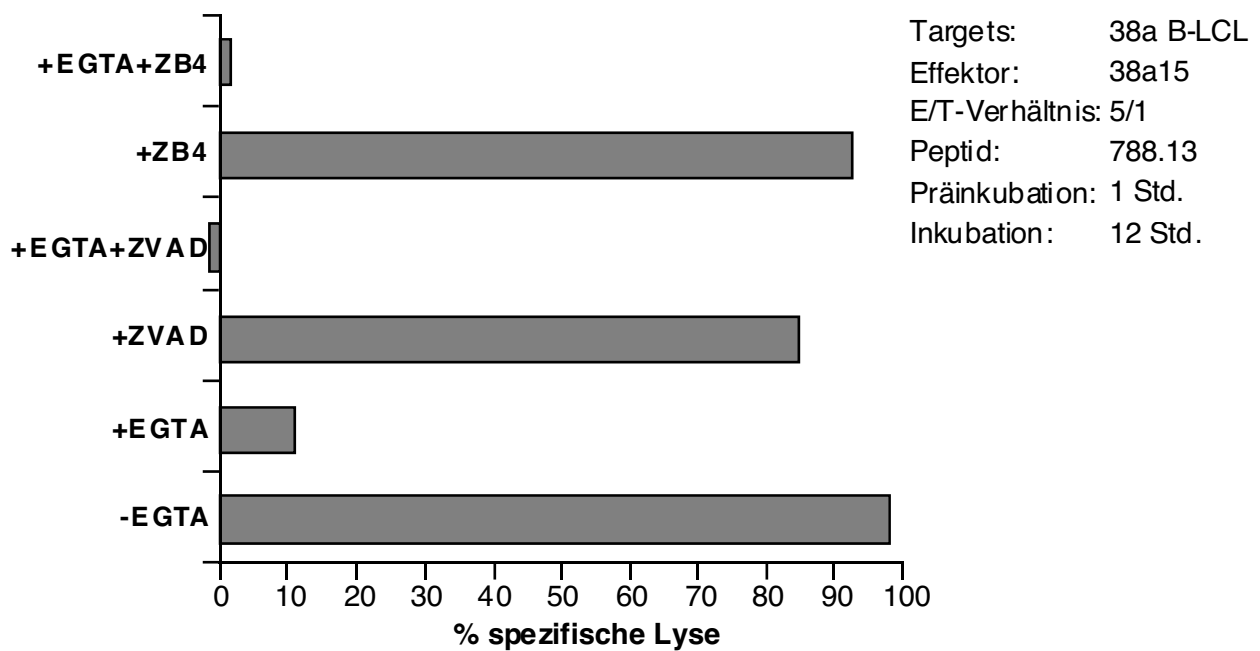
Der Kalzium-unabhängige Anteil der CTL-vermittelten spezifischen Zytolyse des HIV-Gag erkennenden Klons 38a15 war mit autologen B-LCL statistisch signifikant nachweisbar und betrug durchschnittlich  $10,4 \pm 2,0\%$  nach 12-stündiger Inkubation ( $p < 0,01$ ,  $n=4$ ). Er ließ sich deutlich durch das synthetische Peptid ZVAD, einem Caspase-Inhibitor, unterdrücken, was für einen apoptotischen Prozeß spricht.

Um zu ermitteln, ob die Apoptose über CD95 vermittelt wurde, kam der inhibierende CD95-Antikörper ZB4 zum Einsatz.

Die Lyse ließ sich mit dem CD95-Antikörper ZB-4 (100 ng/ml) vollständig unterdrücken (s. Abb. 4.11), was nachweist, daß der Kalzium-unabhängige Anteil eben gerade, und hier im Gegensatz zur unspezifischen Lysevermittlung durch Con A, ausschließlich über CD95 (Fas, APO-1) induziert wird.

Diese Ergebnisse konnten sowohl mit weiteren HIV-spezifischen CTL-Klonen bestätigt werden, als auch durch den inhibierenden Einsatz von spezifischeren Caspase-Inhibitoren, wie YVAD für Caspase-1 und DEVD für Caspase-3, untermauert werden (hier nicht dargestellt).

Die Reduktion der Zytolyse unter Kalziumentzug plus ZVAD oder ZB4 auf Nullniveau schließt die Beteiligung weiterer Prozesse (z.B. TNF- $\alpha$ ) an der HIV-spezifischen CTL-vermittelten Lyse aus.



**Abb. 4.11: Inhibition des CD95-vermittelten Anteils der CD8+ HIV-spezifischen CTL-Lyse durch ZVAD sowie durch ZB4, einen CD95-blockierenden Antikörper**

Der Ansatz wurde mit dem HIV-Gag-spezifischen CTL-Klon 38a15 und autologen B-LCL bei einem Verhältnis von 5/1 für 12 Stunden durchgeführt. Präinkubiert für eine Stunde wurde mit dem spezifischen Peptid 788.13 (10 µg/ml), die Inkubationen enthielten ±1,5 mM EGTA und ±20 µM ZVAD oder ±100 ng/ml ZB4.

#### 4.2.4.4 Die spezifische Lyse der CD4+ Zelllinie AA2 wird ebenfalls über Perforin und CD95 vermittelt

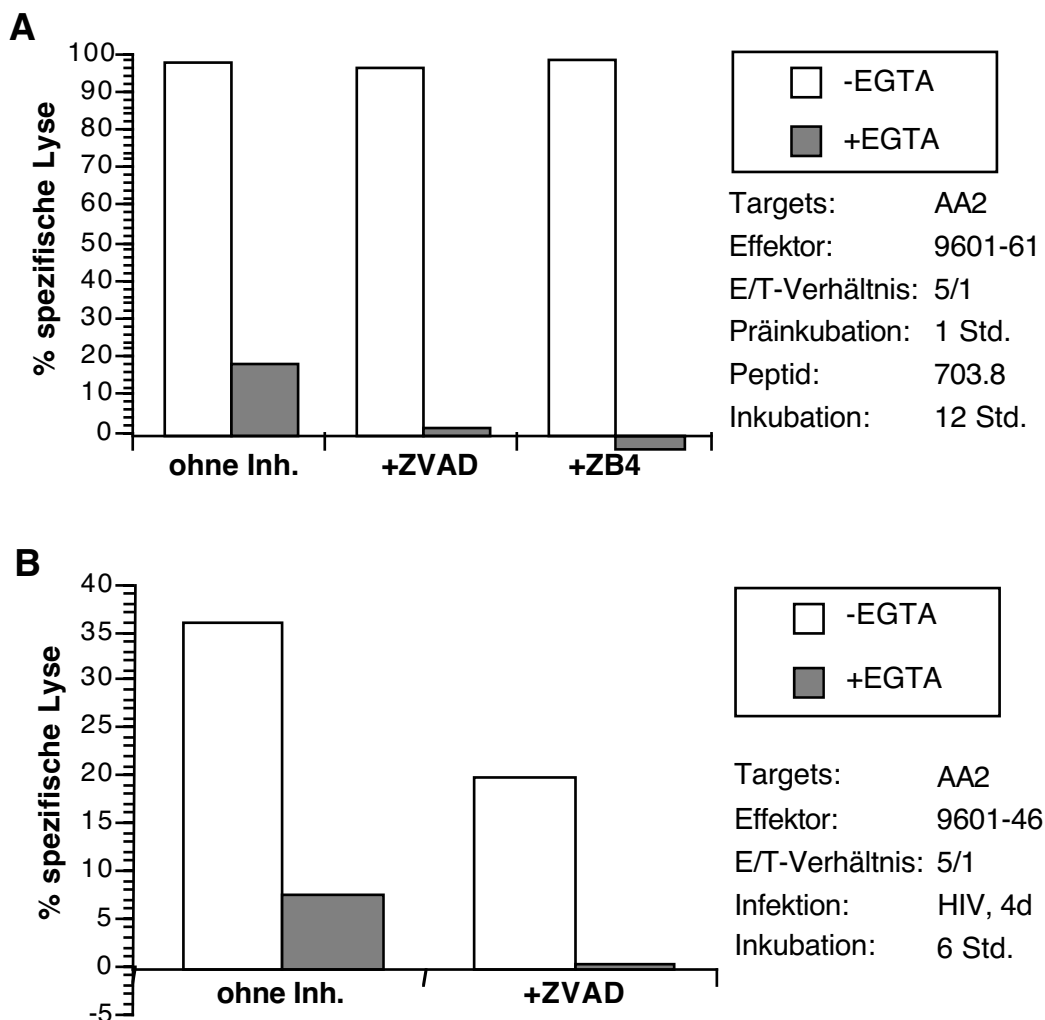
Um sich nun der In-Vivo-Situation anzunähern und zu untersuchen, ob auch die Lyse HIV-infizierter Zellen über Perforin und CD95 durchgeführt wird, wurde die CD4+, HLA-B51-positive B-Zelllinie AA2 eingesetzt. Sie ist HIV-infizierbar und kann Gag- wie Env-Epitope für die Klone 9601-61 und -46 über HLA B51 präsentieren.

In Abb. 4.12A ist exemplarisch ein Lyseexperiment dargestellt, bei dem die AA2-Zellen als Targetzellen mit dem für den CTL-Klon 9601-61 spezifischen Peptid 703.8 präpariert waren. Die Lyse nach 12 Stunden war bei einem E/T-Verhältnis von 5/1 nahezu vollständig und wies bei Kalziumentzug einen CD95-vermittelten Anteil von 17,7% auf, der sowohl durch ZVAD als auch durch ZB4 vollständig hemmbar war. Zellen, die mit einem Kontrollpeptid präpariert waren, wurden nicht lysiert. Die Zelllinie war somit klar für die spezifische Lyse einsetzbar.

Abb. 4.12B zeigt das Ergebnis eines Zytotoxizitätstestes, bei dem die AA2-Zellen für vier Tage mit HIV infiziert waren und dann mit dem HIV-env-spezifischen Klon 9601-46 in einem Verhältnis von 5/1 kokultiviert wurden. Die Zytolyse nach 6 Stunden erreichte einen Wert von

35,9% bei einem CD95-Anteil von 7,5% , der mit ZVAD vollständig zu blockieren war. Die Zellen wiesen auch bei dieser relativ kurzen Inkubation von 6 Stunden bereits eine hohe Spontanfreisetzung von 33,4% auf, die wahrscheinlich auf die Bildung von Synzytien und deren spontane Degradation zurückzuführen war. Für diese Annahme spricht auch die Beobachtung, daß die Spontanfreisetzung in dem Ansatz mit ZVAD, was den ebenfalls apoptotischen Prozeß der Synzytiendegradation inhibiert, mit 25,8% wesentlich geringer ausfiel.

Daß die Gesamtlyse bei HIV-Infektion nur bei 36% lag, gegenüber rund 100% nach Peptid-Inkubation, lag unter anderem wahrscheinlich daran, daß in den AA2-Zellen die MHC I-Expression durch die HIV-Infektion auf circa die Hälfte reduziert wurde.



**Abb. 4.12: Zytotoxizitätstests mit der CD4+ Zelllinie AA2**

Die CD4+ B-Lymphoblasten-Zelllinie AA2 wurde als Target in diesen Zytotoxizitätstests eingesetzt. Die Zellen wurden entweder mit dem Peptid 703.8 (10 µg/ml) präinkubiert und mit 9601-61 für 12 Std. kokultiviert (A) oder für 4 Tage mit HIV infiziert und mit 9401-46 für 6 Std. kokultiviert (B). Das E/T-Verhältnis betrug 5/1, der Einfluß von ZVAD (20 µM) und/oder ZB4 (100 ng/ml) wurde in An- und Abwesenheit von 1,5 mM EGTA gemessen.

#### 4.2.4.5 Vergleichende Färbungen von Oberflächenmolekülen bei CD4-positiven primären Zellen und T-Zellklonen

Wie aus den Experimenten mit der unspezifischen Lyse durch Con A (s. 4.2.3.3.2) zu ersehen ist, ist für primäre CD4+ Zellen ein geringerer Anteil an Ca<sup>2+</sup>-unabhängiger Zytolyse zu erwarten. In der Literatur ist allerdings beschrieben, daß unter einer HIV-Infektion die Expression von CD95 (Fas) und CD95-Ligand (Fas-Ligand) an der Zelloberfläche von T-Zellen ansteigt (Badley et al., 1996, Bäumlner et al., 1996).

Deshalb ist hier der Einfluß der Stimulation und der HIV-Infektion von CD4-positiven primären Zellen und T-Zellklonen auf die Expression von Zelloberflächenproteinen, im besonderen des CD95-Moleküls, untersucht worden.

Die Immunfärbungen erfolgten einmal direkt vor der Stimulation der Zellen mit PHA (Tag 0), dann an Tag 4 der Stimulation, an dem auch die HIV-Infektion eingeleitet wurde, und abschließend an Tag 7, insgesamt sieben Tage nach Stimulation für alle Zellen, inklusive dreitägiger Infektion für den HIV-infizierten Teil.

In Tabelle 4.2 sind die gewonnenen Daten, bezogen auf einen relativen Wert von eins zu Beginn der Stimulation, für zwei Zellklone und einmal für polyklonale CD4+ PBMC aufgeführt.

**Tab. 4.2: Färbungen von Zelloberflächenproteinen nach Stimulation und HIV-Infektion**

Zellen	Färbung	Tag 0	Tag 4	Tag 7 nicht inf.	Tag 7 HIV-inf.
<u>9601-20</u> (CD4+ Klon)	CD95	1	12,3	11,5	12,1
	MHC I	1	n.b.	2,9	2,2
	CD4	1	22,1	8,5	7,4
	p24	-	-	1,1%	57,2%
<u>9601-33</u> (CD4+ Klon)	CD95	1	12,7	10,9	10,9
	MHC I	1	n.b.	3,4	2,6
	CD4	1	25,5	16,2	10,5
	p24	-	-	2,4%	71,9%
<u>9601-PBMC</u> (CD4-selektioniert)	CD95	1	11,7	10,2	13,1
	MHC I	1	n.b.	2,5	1,9
	CD4	1	19,8	6,1	2,4
	p24	-	-	1,7%	71,7%

n.b. ≙ nicht bestimmt

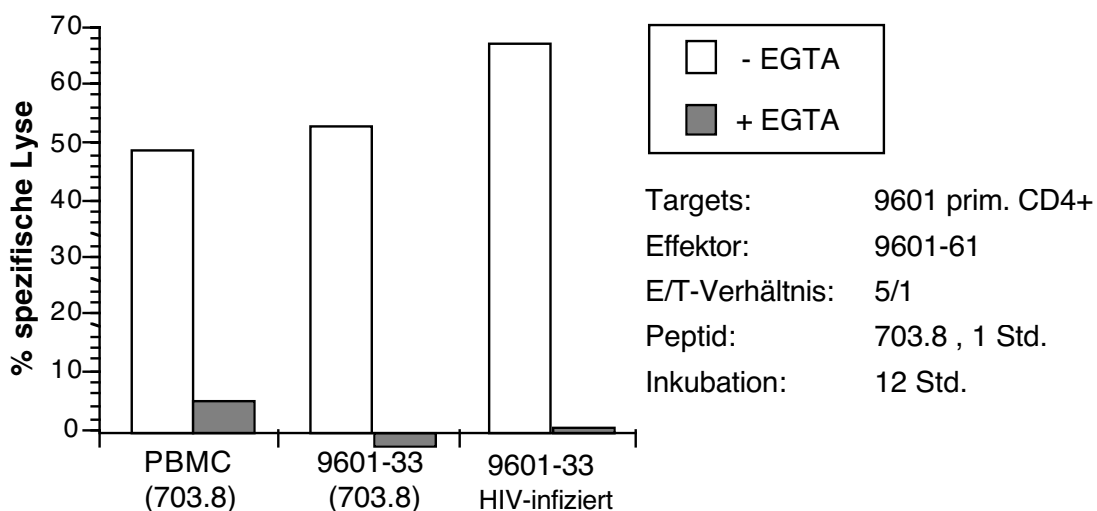
Allgemein zeigte sich ein Ansteigen der Expression aller gemessenen Oberflächenmoleküle nach Stimulation mit PHA. Die Expression des CD95-Moleküls stieg ungefähr um den Faktor 10 bis 12 an und blieb auf diesem Niveau, unabhängig von einer HIV-Infektion der Zellen. Die PHA-Stimulation der Zellen stellt somit schon eine maximale Aktivierung dar.

Die Expression des CD4-Moleküls stieg nach der PHA-Stimulation stark an, Faktor 20-25 an Tag 4, und fiel bis Tag 7 auf Werte zwischen Faktor 6 und 16. Bei relativ guter HIV-Infektion der Zellen von mehr als 70% zeigte sich eine deutliche Reduktion von CD4 und tendenziell ebenso eine Verminderung der Oberflächenexpression von MHC I.

Man kann somit an der Expression der Oberflächenmoleküle nachvollziehen, daß CD4+ Zellen nach einer Aktivierung leichter mit HIV zu infizieren sind (gesteigerte CD4-Expression) und daß sie bei erfolgreicher Infektion durch das Herabregulieren von MHC I schlechter von spezifischen CTL zu erkennen und zu lysieren sind, obwohl die CD95-Expression auf einem hohen Niveau konstant bleibt.

#### 4.2.4.6 Spezifische CTL-vermittelte Zytolyse von primären CD4-positiven Zellen

Die maximale Annäherung an die Situation in vivo erfolgte in Lyseexperimenten mit HIV-infizierten CD4-positiven primären Zellen.



**Abb. 4.12: Spezifische Zytolyse von CD4+ Targetzellen**

Eingesetzt wurden CD4+ primäre Zellen des Probanden 9601 (PBMC oder klonale Zellen), die entweder mit dem spezifischen Peptid 703.8 für eine Stunde präinkubiert oder für drei Tage HIV-infiziert waren. Als Effektor diente der HIV-Gag spezifische CTL-Klon 9601-61, das E/T-Verhältnis betrug 5/1 und die Inkubation dauerte 12 Stunden.



Der Kalzium-unabhängige CD95-vermittelte Anteil der spezifischen Zytolyse von CD4+ primären Zellen, wie PBMC oder auch T-Zellklonen, war mit Werten kleiner als fünf so gering, daß er sich nicht signifikant und reproduzierbar darstellen ließ.

Trotz des Anstiegs der CD95-Expression an der Zelloberfläche nach Stimulation (s. oben), welcher auch unter einer HIV-Infektion erhalten blieb, sank der Anteil der Kalzium-unabhängigen Lyse im Vergleich zu unstimulierten Zellen eher, als daß er anstieg.

In Abb. 4.13 ist exemplarisch ein Chromfreisetzungsversuch mit primären CD4+ Zellen des Probanden 9601 dargestellt. Der Kalzium-unabhängige Anteil lag unter 5% und somit im unspezifischen Schwankungsbereich. Auch mit Zusätzen von ZVAD oder ZB4 waren keine hemmenden Effekte mehr auszumachen.

## 5. Diskussion

Die zelluläre Immunantwort auf eine Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus ist stark und von besonderer Bedeutung bei der Kontrolle des Infektes. Sie kann aber in der überwiegenden Anzahl der Fälle die Virämie nicht auf Dauer unterdrücken oder das Virus, wie bei vielen anderen viralen Infekten, vollständig eliminieren. Das HIV infiziert Schlüssel-zellen der Immunabwehr, stört dadurch deren Koordinationsaufgaben, entkommt dabei selbst der Zerstörung und führt letztlich zu einem Zusammenbruch des gesamten Immunsystems.

Die zelluläre Immunabwehr bei einer HIV-Infektion wird im Wesentlichen getragen von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), deren Aufgaben die Lyse infizierter Zellen (dazu später näheres) und die Sekretion von Zytokinen sind, die die virale Replikation beeinflussen (Yang et al., 1997, Buseyne et al., 1996). So inhibiert sezerniertes Interferon- $\gamma$  die HIV-Replikation, während TNF- $\alpha$  diese unter Umständen aktiviert (Bollinger et al., 1993, Harrer et al., 1993, Jassoy et al., 1993). HIV-spezifische CTL produzieren außerdem Chemokine, wie MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES, die mit dem HIV um dessen für die Infektion benötigten Co-Rezeptoren konkurrieren oder dieselben von der Zelloberfläche von CD4+ Zellen herunterregulieren (Cocchi et al., 1995, Price et al., 1998).

HIV-spezifische CTL können schon sehr früh im Verlauf der Infektion nachgewiesen werden und mit ihrem Erscheinen geht die initiale Virämie zurück (Wilson et al., 2000). Nach neuesten Ergebnissen können dabei bis zu 10% der CD8+ T-Lymphozyten in dieser akuten Phase der Infektion beteiligt sein.

Der Breite und der Qualität dieser ersten Generierung von CTL wird eine prognostische Komponente zugesprochen, was die Progression der Infektion betrifft (Pantaleo et al., 1996 und 1997, Propato et al., 2001). Eine gute Ausstattung mit HIV-spezifischen Lymphozyten wurde vor allem bei Langzeitüberlebenden mit nicht progredienter Infektion (LTNP) beobachtet, welche diese auch über Jahre behalten (Pontesilli et al., 1998, Rosenberg et al., 1997). Bei sogenannten Progressoren, dem häufigeren Krankheitsverlauf, ist die CTL-Antwort entweder bereits zu Beginn der Infektion eingeschränkter, die genetische Ausstattung scheint hierbei eine bedeutende Rolle zu spielen, so steht z.B. HLA-Monozygotie für eine schlechtere Prognose (Carrington et al., 1999), oder die Qualität der CTL läßt, eventuell auch durch zurückgehende T-Helfer-Zellzahlen, nach (Gea-Banacloche, 2000).

Als weiteren Grund für ein Nachlassen der CTL-Antwort werden sogenannte „Escape“-Mutanten diskutiert (Gould und Bangham, 1998), bei denen das Virus durch Sequenzverän-

derungen im Epitop selbst oder in dessen Bindungsstellen zur HLA-Präsentation der CTL-Erkennung entkommt.

Im Gegensatz zu Beobachtungen bei anderen viralen Infektionen sind die bei HIV-Patienten isolierten CTL fast ausschließlich CD8-positiv. Ausnahmen sind die Beschreibungen eines HIV-Gag-p24-spezifischen CD4+ Klons durch Littaua et al. (1992) und ein HIV-Env-spezifischer CD4+ CTL-Klon durch Curiel et al. (1993), der allerdings nicht klassisch HLA-restringiert lysierte.

Es stellt sich die Frage, wieso HIV-spezifische CD4+ CTL so gut wie nie aus HIV-positiven Patienten isoliert werden können.

Sicher sind die CD4+ Zellen das primäre Ziel des HIV und die Infektion sowie die damit verbundene direkte Zerstörung CD4-positiver, reifer wie naiver, CTL durch das Virus ist sicher ein Grund für eine verringerte Anzahl, nicht aber verantwortlich für ein vollständiges Fehlen der CD4+ HIV-spezifischen CTL.

Daß solche, prinzipiell auch gegen HIV gerichtete CD4+ CTL generiert werden können, wurde in In-Vitro-Stimulationen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) seronegativer Spender (Siliciano et al., 1988) und in Impfstudien bei HIV-seronegativen Probanden mit rekombinantem HIV-Glykoprotein (r-gp160) gezeigt (Orentas et al., 1990).

Solche CD4+ CTL wurden mir für meine Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die in diesen Studien dargestellten HIV-Glykoprotein-spezifischen CD4+ CTL erkannten Epitope des intra- wie extrazellulären Bereiches des Glykoproteins und lysierten HLA-Klasse-II-restringiert spezifisch Antigen-präsentierende Zellen. Diese CD4+ CTL exprimierten ebenso wie CD8+ CTL Perforin und ihre Lyse war abhängig von extrazellulärem Kalzium (Hammond et al., 1992, Stanhope et al., 1993, reviewed in Siliciano, 1996).

Die Untersuchungen meiner Arbeit zeigen, daß diese CD4+ HIV-gp120-spezifischen CTL, neben der von ihnen induzierten spezifischen HLA-restringierten  $Ca^{2+}$ -abhängigen Zytolyse, auch an einer zweiten Form der Lyse beteiligt sind. Diese Form der Lyse ist Antigen-unspezifisch und wurde in unserer Arbeitsgruppe von Heinkelein et al. 1995 und 1996 charakterisiert. Diese Lyse findet bei Kontakt von CD4+ Zellen mit HIV-infizierten, oder auch nur HIV-Glykoprotein an ihrer Oberfläche exprimierenden Zellen statt. Sie ist nicht HLA-restringiert,  $Ca^{2+}$ -unabhängig und erfordert eine Expression von gp160. Ihr liegt ein aktiver apoptotischer Prozeß zugrunde (Ohnimus et al., 1997), der nicht durch CD95 oder TNF-Rezeptor 1 vermittelt wird. Die Zellen fusionieren miteinander und bilden sogenannte Synzytien, die dann in vitro apoptotisch zugrunde gehen.

Für nicht infizierte T-Helferzellen konnte in Kokulturversuchen ein signifikanter Verlust bei Kultivierung mit nur einem Prozent infizierter Zellen beobachtet werden, wobei Gedäch-

niszellen (CD45RO+, CD29h+) schneller vernichtet wurden als naive Zellen (CD45RO-, CD29lo+) (Heinkelein et al., 1997).

Die bei HIV-gp120-spezifischen CD4+ CTL hier erstmals aufgezeigte zweite Form der Lyse entspricht in ihren Merkmalen exakt der eben skizzierten Fusions-vermittelten unspezifischen Lyse bei Kontakt von CD4+ Lymphozyten mit HIV-infizierten Zellen.

Unter 4.1.1 wurde gezeigt, daß bei Einsatz von CD4+ gp120-spezifischen CTL zwei unabhängige Lysemechanismen vorhanden sind, ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiger und ein Ca<sup>2+</sup>-unabhängiger, welcher allerdings gp120-Expression an der Zelloberfläche benötigt. Beide Formen der Lyse treten gemeinsam nur bei autologen Targetzellen auf, die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Zytolyse findet auch zwischen heterologen Zellen statt und ist daher nicht HLA-restringiert (s. 4.1.2). Bei alleiniger Epitop-Präsentation ohne Oberflächenexpression, nach Präinkubation mit r-gp120, tritt diese unspezifische Lyseform nicht auf (s. 4.1.3).

Vermuten läßt sich in diesem Zusammenhang, daß der von Curiel et al. (1993) beschriebene gp120-spezifische CD4+ CTL-Klon eventuell lediglich ein nicht HIV-spezifischer CD4-Klon war, der nur die unspezifische Fusions-vermittelte Lyse zeigte. Für diese Annahme sprechen die nicht eindeutig zu klärende HLA-Restriktion und das Fehlen von Lyse bei nicht vorhandener Oberflächenpräsentation des gp120-Anteils bei Verwendung von verkürzten Vakzinia-Env-Konstrukten.

Auf eine Untersuchung der spezifischen CD4+ CTL-vermittelten Zytolyse im Hinblick auf Anteile an CD95-vermittelten bzw. Perforin-induzierten Anteilen wurde verzichtet, da einerseits die CD4+ CTL, wie oben beschrieben, in der HIV-Infektion keine oder eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen und zum anderen eine Differenzierung zwischen spezifischen apoptotischen Prozessen und unspezifischen, Fusions-vermittelten ebenfalls apoptotischen Ereignissen schwierig geworden wäre.

Zwar zeigte sich bei der Verwendung des VV-Konstruktes vPE18, das zu keiner Oberflächenexpression von gp120 führt, kein Ca<sup>2+</sup>-unabhängiger Lyseanteil (s. Abb. 4.1 und 4.2), welcher bei einer CD95-vermittelten Zytolyse zu erwarten gewesen wäre, allerdings ist dieses Vakzinia-Virus vom Stamm WR abgeleitet, der die CD95-induzierte Apoptose unterdrücken kann (s. 4.2.3.1). Dadurch sind gültige Aussagen zur CD95-vermittelten Apoptose mit vPE18 (WR) hier nicht möglich.

Die hier aufgezeigte Fusions-vermittelte Lyse von HIV-spezifischen CD4+ CTL beinhaltet in ihrer Konsequenz, der Zerstörung beider oder aller beteiligten Zellen, einen dramatischen Unterschied zur „normalen“ Antigen-spezifischen Zytolyse von CD4+ wie CD8+ CTL.

Die „normale“ Form der Zytolyse bleibt für die zytotoxischen Zellen ohne Schaden, sie werden, im Gegenteil, durch den Antigenkontakt zur Ausschüttung von Zytokinen und zur Proliferation angeregt (Jasoy et al., 1993, Pantaleo et al., 1994, Callan et al., 1996).

CD4+ HIV-spezifische CTL, die ja gerade aufgrund ihrer Funktion in der Immunabwehr verstärkt in engen Kontakt zu HIV-infizierten Zellen mit gp120 Oberflächenexpression treten, laufen somit ständig Gefahr, selbst Opfer der unspezifischen Fusions-vermittelten Lyse zu werden. Entgehen sie dieser unspezifischen Zerstörung hier, so sind sie, durch den Antigenkontakt aktiviert, als CD4+ Zellen besonders gut durch das HI-Virus zu infizieren und eben dadurch gefährdet, zugrunde zu gehen.

Da die stärkste Expansion der HIV-spezifischen CTL während der akuten Infektion und der initialen Virämie stattfindet, also bei besonders hoher Viruslast und großer Anzahl produktiv infizierter Zellen, ist es sehr wahrscheinlich, daß es bereits hier, zu Beginn der Infektion, zu einer negativen Selektion CD4+ HIV-spezifischer CTL kommt. HIV-spezifische CD4+ Klone gelangen wahrscheinlich erst gar nicht zur Expansion und sind daher in chronisch infizierten Patienten normalerweise nicht nachzuweisen.

Interessant wären in diesem Zusammenhang Untersuchungen, ob HIV-spezifische CD4+ CTL in Patienten vorkommen, die von der Arbeitsgruppe von Bruce Walker, Boston, während der akuten Infektion mit hochwirksamer anti-retroviraler Therapie (HAART) behandelt wurden. Bei diesen Patienten konnte eine besonders gute HIV-spezifische T-Helferzellantwort beobachtet werden. Nach strukturierten Therapieunterbrechungen wurde bei ihnen der Wiederanstieg der Viruslast teilweise so gering, daß ihr Immunsystem die Infektion über einen längeren Zeitraum ohne HAART zu kontrollieren vermochte (Rosenberg et al., 2000).

Eine starke HIV-spezifische T-Helferzellantwort ist mitentscheidend für den Aufbau und den Erhalt aktiver zytotoxischer T-Zellen, CD4- wie CD8-positiver.

Tatsächlich berichtet eine neuere Veröffentlichung aus dieser Gruppe, Norris et al. (2001), daß es ihnen gelungen ist, multifunktionelle CD4+ T-Zellen zu isolieren, die HIV-Gag spezifisch sind und die die Zellproliferation anregen, IFN- $\gamma$  sekretieren und zytolytische Aktivität aufweisen.

In HIV-Infizierten können allerdings, wie einleitend bereits erwähnt, in überwiegender Mehrheit CD8+ CTL nachgewiesen werden. Die neuesten Meßtechniken, wie z.B. der funktionelle Nachweis über eine IFN- $\gamma$ -Produktion im Elispot (Scheibenbogen et al., 2000) oder die Markierung von Epitop und HLA-Klasse-I-Molekül in der sogenannten „Tetramer-Technik“ (Wilson et. al, 2000), zeigen im Vergleich zur klassischen Methode der CTL-Isolation durch Klonierung in Grenzverdünnungen (LDA = limiting delution assay), einen zum Teil wesentlich höheren Anteil HIV-spezifischer CTL (bis zu 10% der CD8+ Zellen, gegenüber 0,1 bis 3% in früheren Untersuchungen). Für die Messungen mit den neuen Techniken sind

allerdings auch keine Zellteilungen erforderlich und die Detektion erfolgt nicht durch den Nachweis von spezifischer Lyse.

Dieses führte zu Diskussionen über die Funktionalität der mittels Tetramer-Technik nachgewiesenen CTL (Rowland-Jones et al., 2001). Appay et al. (2000) beschreiben, daß nur 15% der von ihnen so dargestellten HIV-spezifischen CTL Perforin enthielten und spezifische Targetzellen nur mäßig lysierten, was auf einen wesentlichen Anteil nicht zytolytisch aktiver CTL hindeutet. Die sekretorischen Funktionen schienen allerdings weniger beeinträchtigt.

Im Gegensatz dazu stellten Goulder et al. (2000) eine gute Korrelation zwischen Tetramer-Assay und Zytotoxizitätstests nach LDA fest und postulierten, daß nicht-funktionelle CTL keine Rolle in der chronischen HIV-Infektion spielen.

Innerhalb dieser Arbeit wurden die HIV-spezifischen CTL mittels Grenzverdünnung (LDA) gewonnen und anschließend als CTL-Klone beschrieben (s. 4.2). Der Anteil der CD8+ T-Zelllinien, die sich als klonal und HIV-spezifisch herausstellten, lag dabei deutlich unter einem Prozent (fünf Klone von insgesamt rund 5.700 Einzelproben).

Erheblich relativiert wird diese geringe Gesamtausbeute, wenn man beachtet, daß sich bei meinen Studien von einem (9701) von zwei Patienten, aus nicht bekannten Gründen keine CTL darstellen ließen und daß Proben des zweiten Probanden (9601), die mehr als eine Spezifität aufwiesen oder nicht rein CD8-positiv waren, nicht weiter bearbeitet wurden.

Eine ähnlich niedrige Quote für die Isolation von CTL-Klonen aus Blut berichten Mollet et al. (2000), die im Schnitt 3,8 unterschiedliche HIV-spezifische Klone aus Therapie-naiven Patienten isolierten, was bei ihren Versuchen einer Frequenz von 0,24% entsprach.

Mit dem Beginn einer anti-retroviralen-Therapie (ART) verdreifachte sich diese Frequenz zunächst, um dann mit der Zeit wieder abzufallen und nur bei Viruslastanstieg, durch z.B. Therapieunterbrechungen, erneut zu steigen.

Aus Cerebrospinal-Flüssigkeit, zum Beispiel, lassen sich, im Vergleich zum peripheren Blut, wesentlich höhere Anteile an HIV-spezifischen CTL darstellen (Jassey et al., 1992).

Bei den während dieser Arbeit isolierten und beschriebenen Klonen handelt es sich um die, die vermehrt werden konnten. Eine Frequenzanalyse (als Spiegelbild der Situation in vivo) ist nicht möglich. Die Aktivität der fünf hier gewonnen Klone richtete sich gegen den HIV-Gag p17 (Matrix-protein)-bzw. den p24 (Capsidprotein)-Anteil, sowie gegen zwei unterschiedliche Bereiche des extrazellulären Anteils des HIV-Glykoproteins.

Es wurden keine HIV-RT- bzw. Nef-spezifischen CTL-Klone isoliert.

Für diesen Patienten, der zum Zeitpunkt der Blutentnahmen eine HAART bekam, deren Beginn allerdings noch nicht lange (zwischen 3 und 9 Monate) zurück lag, und dessen Viruslast unter der Nachweisgrenze von 50 Kopien pro ml lag, ist dies eine zu erwartende, relativ breite Streuung der antiviralen Aktivität.

Altfeld et al. (2001) beschreiben, daß, neben der hier ebenfalls isolierten, gegen p17 gerichteten Aktivität, auch das zu den akzessorischen HIV-Proteinen gehörende Vpr ein bevorzugtes Ziel der CTL-Antwort ist. Aktivitäten gegen die akzessorischen HIV-Proteine, sowie gegen HIV-Tat (Transaktivator der Transkription), wurden hier nicht näher untersucht.

Die zwei CTL-Klone des Probanden 9601, die HIV-gag p17-spezifisch waren, erkannten ein Epitop innerhalb der Aminosäuren 71 bis 85, das mittels HLA-B51 präsentiert wurde. Dieser Sequenzbereich ist auch schon für eine Präsentation mit HLA-A2 beschrieben worden (Nixon and McMichael, 1991; Johnson et al., 1992), die Präsentation über HLA-B51 ist hier erstmals aufgezeigt.

Ebenfalls über HLA-B51 präsentiert wurden die Epitope für die env-spezifischen Klone 9601-46 und 9601-68. Das Epitop für 9601-46 lag innerhalb der ersten 204 Aminosäuren des gp120, während das für 9601-68 zwischen den Aminosäuren 204 und 287 lag. Die HIV-Env-Epitope konnten nicht näher charakterisiert werden.

Als Gründe lassen sich hier eine unterschiedliche Prozessierung des Gesamtproteins im Vergleich zu den getesteten synthetischen Peptiden vermuten, oder die entscheidenden Peptide, die die zu erkennenden Epitope enthielten, waren in der Zelle bzw. im Medium nicht stabil genug, so daß es zu keiner oder aber nur zu einer ungenügenden Präsentation der Epitope reichte.

Zytotoxische T-Zellen lysieren ihre Targetzellen über zwei Mechanismen: die Induktion von Apoptose über das CD95-Oberflächenmolekül oder über den Perforin-Weg, der aus dem Durchlöchern der Plasmamembran der Zielzelle und dem Einschleusen von proteolytischen Enzymen besteht.

Die ursprünglichen Untersuchungen zum Mechanismus der CTL-vermittelten Zytotoxizität erfolgten überwiegend im murinen System. Sie führten zu der These, daß CD4+ CTL überwiegend immunmodulatorische Aufgaben besäßen, wie z.B. die klonale Expansion und Kontraktion bei einer Immunreaktion zu steuern, und wenn überhaupt, dann hauptsächlich über CD95 zytotoxisch aktiv werden. Währenddessen sollen CD8+ CTL danach mehr der Infektabwehr dienen und mittels Perforinausschüttung lysieren (Hahn et al., 1995; Podack et al., 1995; Piazza et al., 1997).

Die in den letzten Jahren gewonnenen humanen CTL, die gegen endo- sowie exogene Ziele gerichtet waren, zeigten keine so eindeutige Aufteilung. Unabhängig vom CD-Status wurden sowohl CD95- als auch Perforin-induzierte Lyse beobachtet. Zum Beispiel wurde berichtet, daß ein CD8+ Anti-Hepatitis C CTL-Klon sowohl Perforin-, wie CD95- als auch TNF- $\alpha$ -vermittelte Lyse nutzt (Ando et al., 1997); Tumor-spezifische CTL nutzen sowohl Perforin als auch CD95 (Zeytun et al., 1997); CD8+ T-Zellen vernichten Influenza-infizierte Zellen über Perforin und CD95 (Topham et al., 1997); oder humane CD4+ CTL gegen Herpes-Simplex

Virus lysieren ausschließlich über Perforin (Yasukama et al., 1999) während CD4<sup>+</sup> CTL gegen *Mycobacterium tuberculosis* sowohl Perforin als auch CD95 zur Lyse einsetzen (Lewinssohn et al., 1998).

Viele Untersuchungen zur CTL-vermittelten Lyse werden unter Zuhilfenahme von Vakzinia-Viren als Vektoren durchgeführt, ohne genauere Angaben zum verwendeten Vakzinia-Stamm zu machen.

In dieser Arbeit konnte aber nachgewiesen werden (s. 4.2.3.1), daß es bei Messungen der Lysemechanismen von entscheidender Bedeutung ist, welcher Vakzina-Virus-Stamm eingesetzt wird. Ein CD95-vermittelter Anteil an der Zytolyse läßt sich nur nachweisen, wenn Vakzinia-Viren verwendet werden, die kein funktionelles B13R-Genprodukt exprimieren (s. auch 4.2.4.2). Das B13R-Genprodukt hemmt das Interleukin-1 $\beta$ -Converting-Enzyme (ICE oder Caspase-1) und unterbricht damit den Signaltransduktionsweg zur Apoptose, der durch CD95 initiiert wird.

Der sehr häufig verwendete Vakzinia-Stamm WR, von dem auch viele HIV-Konstrukte abgeleitet sind (s. 2.7), exprimiert ein funktionelles B13R und inhibiert die CD95-induzierte Apoptose (Kettle et al., 1997).

Sollen die Lysemechanismen bestimmter CTL untersucht werden, so muß bei den Versuchsbedingungen darauf geachtet werden, daß nicht durch die Wahl eines Parameters, z.B. des Vektorstammes, eine Möglichkeit unbeabsichtigt inhibiert oder ausgeschlossen wird.

In den Versuchen innerhalb dieser Arbeit wurde der inhibierende Effekt des B13R bewußt zur Unterdrückung der Apoptose eingesetzt. Ein eindrucksvolles Beispiel für einen viralen Mechanismus, die Abwehr des Wirtes zu beeinflussen, was auch für das HI-Virus noch zu diskutieren sein wird.

Unter Berücksichtigung der viralen Apoptose-inhibierenden Eigenschaften konnten für die hier charakterisierten CD8<sup>+</sup> CTL-Klone CD95- und Perforin-vermittelte Lysemechanismen nachgewiesen werden. Sowohl bei unspezifischer Lyseinduktion durch Concanavalin A als auch bei spezifischer Lyse von Peptid-stimulierten oder mit viralen Vektoren inkubierten Zellen traten beide Lysewege auf.

Bei Inhibition der Perforin-induzierten Lyse durch Kalzium-Entzug blieb ein geringerer Kalzium-unabhängiger Anteil signifikant nachweisbar. Dieser ließ sich einerseits durch die Expression des B13R in Vakzinia-Virus WR inhibieren oder direkt durch den Anti-CD95-Antikörper ZB4 blockieren.

Lediglich bei der Con A-vermittelten Lyse blieb unter Kalzium-Entzug und ZB4-Block noch eine Restlyse sichtbar, die eventuell, wie bei den von Ando et al. (1997) beschriebenen HCV-spezifischen CTL, TNF- $\alpha$ -vermittelt war. Diese Restlyse ließ sich durch den unspezifischen



Caspase-Inhibitor ZVAD, der auch TNF- $\alpha$ -vermittelte Apoptose zu inhibieren vermag, unterdrücken.

In der spezifischen Lyse blieb bei Hemmung der Perforin- und CD95-Lyse kein weiterer, eventuell TNF- $\alpha$ -induzierter Anteil meßbar.

Der CD95-vermittelte apoptotische Anteil an der Zytolyse der isolierten CTL-Klone war durchweg geringer als der Perforin-Anteil und erreichte erst zeitlich später ein Optimum (nach 8 - 12 Stunden, s. 4.2.4.1).

Zwar ist die durch unphysiologische Agenzien oder hochdosierte stimulierende Antikörpergaben induzierte apoptotische Lyse schon nach 4 - 6 Stunden nahezu abgeschlossen, doch kann die physiologisch induzierte Apoptose teilweise auch wesentlich längere Zeit in Anspruch nehmen (Anel et al., 1997).

In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant gewesen, die Perforin-vermittelte Lyse durch Concanamycin A, welches leider nicht zur Verfügung stand, statt durch Kalzium-Entzug zu inhibieren. Concanamycin A blockiert die Perforin-Lyse, in dem es eine pH-Wert-Anhebung in den lytischen Granula der CTL bewirkt, wodurch das Perforin instabil wird (Kataoka et al., 1996). Denn der in den hier dargestellten Versuchen angewandte Kalzium-Entzug, verhindert zwar zuverlässig die Granula-Ausschüttung, inhibiert aber gleichzeitig die T-Zellaktivität und die Induktion der CD95-Ligand-Expression (Lewinssohn et al., 1998), was bei längeren Inkubationszeiten eventuell von Bedeutung sein und den CD95-Anteil an der in vitro gemessenen spezifischen Lyse mindern könnte.

Die Höhe der Lyseraten der einzelnen isolierten CD8<sup>+</sup> CTL-Klone unterschied sich insgesamt relativ wenig, in der Ausprägung des Kalzium-unabhängigen Anteils dagegen teilweise erheblich (s. 4.2.3.3.1). Bei gleichen Zielzellen und absolut gleicher unspezifischer Induktion (durch Con A) konnten CD95-Anteile zwischen 23% und 50% gemessen werden.

Diese Unterschiede zwischen den CTL-Klonen ließen sich nicht durch möglichst exakte Gleichbehandlung der CTL im Blick auf Anzahl der Restimulationen und Dauer nach der letzten Restimulation ausgleichen. Inwieweit die Differenzen trotzdem durch unterschiedliche Aktivierungslevel der CTL bedingt gewesen sind oder aber auf klonspezifische Merkmale zurückzuführen waren, bleibt offen. Direkte Messungen von Aktivierungsmarkern innerhalb der Population der CTL-Klone sind nicht erfolgt.

In der Arbeit von Shankar et al. (1999) werden CD8<sup>+</sup> HIV-spezifische CTL beschrieben, die heterogen in der Expression von Aktivierungsmarkern gewesen sind und relativ hohe Schwankungen in der spezifischen Lyse zwischen 20 und 60% zeigten. Angeblich lysierten diese Klone alle ausschließlich über den Perforin-Weg.

Den bei Vektor-Verwendung genutzten Vakzinia-Virus-Stämmen wird in dieser Arbeit allerdings keine Beachtung geschenkt. Die Bezeichnungen der Vakzinia-Konstrukte (vPE16

oder vCF21) jedoch deuten eindeutig auf die gleiche Quelle hin, wie die der in unserer Gruppe verwendeten Konstrukte, und daher auf VV-WR als Virus-Stamm, der, wie oben nachgewiesen, die CD95-induzierte Apoptose hemmt.

Die Perforin-Lyse wurde von Shankar et al. in den relativ kurzen Inkubationen von 6 Stunden selektiv durch Kalzium-Entzug gehemmt, die CD95-Lyse sollte durch inhibierenden CD95-Antikörper gehemmt werden. Die in den Abbildungen ersichtlichen Reduktionen der Lyse eines Klons durch die CD95-Antikörper von über 10% und der ca. 40% der Gesamtlöse betragende Kalzium-unabhängige Anteil eines anderen Klons werden leider nicht weiter diskutiert.

Die Zytolyse scheint jedenfalls auch bei Shankar et al. nicht vollständig Perforin-induziert zu sein, sondern teilweise auch über CD95 initiiert. Die eigenen Ergebnisse, die zeigen, daß die HIV-spezifischen CD8+ CTL überwiegend über den Perforin-Weg lysieren, werden durch Shankar et al. bestätigt.

Zu einer rundum konträren Aussage gelangt die Arbeit von Hadida et al. (1999), die für HIV-spezifische CD8+ T-Zellen ausschließlich Fas/FasL-(CD95/CD95-Ligand)-vermittelte Zytolyse feststellt und keinen Perforin-Anteil ausweist.

Allerdings verwendete diese Gruppe nicht CTL-Klone sondern ex vivo mit IL-2 und PHA-Blasten von gesunden Spendern aktivierte polyspezifische CTL-Linien. Die angewendeten, völlig unphysiologisch hohen Effektor/Target-Verhältnisse von 120 : 1, die zu lediglich 20-prozentiger Lyse führen, und die fehlenden Negativ-Kontrollen in den dargestellten Versuchen, lassen Zweifel an der Spezifität der hier gemessenen Lyse aufkommen.

Interessant in Hadidas Arbeit sind allerdings die Untersuchungen zur Aktivierung der CD95-Ligand-Expression durch RANTES, die einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der sekretorischen Funktionen der T-Zellen gibt und darüber hinaus eine direkte Verknüpfung mit der zytolytischen Aktivität aufzeigt.

Entscheidend für den apoptotischen Lyseweg ist, neben der Expression des CD95-Liganden in den CTL, auch die individuelle Empfindlichkeit der Zielzellen, der CD95-induzierten Apoptose zu unterliegen (Lewinssohn et al., 1998).

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden (s. 4.2.3.3.2), daß bei gleichen CTL-Klonen sich der CD95-vermittelte Anteil an der Lyse verschiedener Targetzellen in der Ausprägung unterschied. Immortalisierte CD4-positive Zelllinien wiesen eine wesentlich höhere Kalzium-unabhängige Lyse-Empfindlichkeit auf als B-Zelllinien und primäre CD4+ Zellen.

Für Untersuchungen zu den potentiellen Lysemöglichkeiten HIV-spezifischer CTL reicht die Verwendung von Zelllinien aus. Um eine Aussage über die Verhältnisse in vivo treffen zu können, muß sich dieser Situation allerdings so gut wie möglich angenähert werden.

Messungen mit nativen CD4<sup>+</sup> Zellen gestalten sich jedoch relativ schwierig. Zum einen sind die isolierten Zellen nicht so stabil wie immortalisierte Zelllinien, sie zeigen in Chromfreisetzungsvorsuchen, gerade bei längeren Inkubationszeiten, eine höhere Spontanlyse. Zum anderen müssen sie, um infiziert werden zu können, zunächst stimuliert werden.

Die Infektion mit HIV ist daher insgesamt relativ aufwendig und langwierig, was die Zellen weiter destabilisiert. Hinzu kommen virale Mechanismen, die die Messungen verkomplizieren.

So reguliert das HIV-Nef die Oberflächenexpression von MHC I (HLA Klasse I) herunter, was eine verringerte Epitopräsentation zur Folge hat und infizierte Zellen zum Teil der Lyse entzieht (Collins et al., 1998). Diese Reduktion des HLA I konnte in den Immunfärbungen (s. 4.2.4.5) in der Tendenz teilweise bestätigt werden.

Die Expression des CD95 wurde durch die HIV-Infektion nicht beeinflusst, sie stieg aber mit der vorangehenden Stimulation der Zellen, ebenso wie die Expression anderer Oberflächenmarker (z.B. CD4), stark an.

Trotz dieser eindeutigen CD95-Expression an der Oberfläche HIV-infizierter primärer Zellen, ließ sich in Chromfreisetzungsexperimenten kein signifikanter Kalzium-unabhängiger Anteil an der Zytolyse durch HIV-spezifische CD8<sup>+</sup> CTL nachweisen.

Interessant wäre es in diesem Zusammenhang zu untersuchen, ob eventuell die Expression des HIV-Tat, das wie von McClosky et al. (1997) beschrieben, Apoptose so zu inhibieren vermag wie das B13R-Genprodukt des Vakzinia-Virus, die CD95-vermittelte Lyse unterdrückt.

Da die angewandten Versuchsbedingungen in den Chromfreisetzungsvorsuchen am ehesten den Verhältnissen im Blut vergleichbar waren, kann man davon ausgehen, daß die spezifische Zytolyse HIV-infizierter Zellen im peripheren Kreislauf wahrscheinlich fast ausschließlich über den Perforinweg von statten geht.

In anderen Kompartimenten und strukturierten Geweben, wie zum Beispiel den Schleimhäuten, dem zentralen Nervensystem oder den Lymphknoten, könnte, bedingt durch ein anderes Milieu, eventuell die CD95-vermittelte Lyse in den Vordergrund treten. So wurden zum Beispiel in Lymphknoten, Orten der aktiven HIV-Replikation (Frankel et al., 1996 und Brodie et al., 2000), verstärkt apoptotische Zellen detektiert. Parallel dazu zeigen CTL im Lymphgewebe eine geringere Perforin-Expression als solche im Blut (Andersson et al., 1999). Außerdem führt ein verstärkter Kontakt mit Antigenen zu einer Erhöhung der CD95-Ligand-Expression (Rogers et al., 1997).

Inwieweit bei den detektierten apoptotischen Zellen in Lymphknoten ein aktiver lytischer Prozeß, initiiert durch CTL, vorliegt oder aber eventuell die Eingangs beschriebene Fusionsbedingte Apoptose, ist nur schwer zu entscheiden, da nur aufgrund indirekter Beobachtungen darauf geschlossen werden kann.

Festzuhalten bleibt, daß HIV-spezifische CTL eine entscheidene Rolle in der Kontrolle der HIV-Infektion spielen. Mit ihren sekretorischen wie lytischen Funktionen vermögen sie teilweise die Infektion zu kontrollieren. Ein Verlust der spezifischen CTL-Abwehr durch zum Beispiel „Escape-Mutanten“ des Virus (Rowland-Jones et al., 1997 und Price et al., 1997) oder durch eine Reduktion der CD4-Hilfe über die Zeit (Jin et al., 1998 und Pontesilli et al., 1998) und eine daraus resultierende fehlende Reifung und Aktivierung von CTL (Appay et al., 2000), korrelieren mit einem Fortschreiten der Erkrankung.

Im Extrem beschreiben Kaul et al. (2001) den Fall einer afrikanischen Prostituierten, bei der sich durch ständigen Antigen-Kontakt ein Schutz vor einer HIV-Infektion aufgebaut hatte, der mit einer lokalen HIV-spezifischen CTL-Antwort assoziiert war. Nach reduzierter HIV-Exposition während eines Ausstiegs aus dem Beruf, kam es bei dieser Frau zu einer Serokonversion. Ein Indiz für die Wichtigkeit des Erhalts einer möglichst breiten, einsatzbereiten HIV-spezifischen Immunabwehr.

Auch bei HIV-Infizierten, wie solchen aus dem Kollektiv der noch während oder direkt nach der akuten Infektion behandelten Patienten, beschrieben durch die Gruppe um B. Walker bzw. den „Langzeitüberlebenden“, steht diese aktive Abwehr im Zusammenhang mit einer Kontrolle der Infektion (Rosenberg et al., 1997).

In der Behandlung chronisch infizierter Patienten mit progredienter Erkrankung erscheint es daher sinnvoll, neben der Bekämpfung des Virus durch spezifische Medikamente auch immunmodulatorisch einzugreifen und die körpereigene zelluläre Abwehr zu stärken.

Projekte und Studien zu diesem Themenkomplex, wie die Gabe immunstimulierender Agenzien (IL-2) oder der Einsatz von therapeutischen Vakzinen mit immundominanten HIV-Epitopen (Hanke et al., 1998) oder auch das Einschleusen von autologen, mit definierten HIV-Vektoren modifizierten dendritischen Zellen, die die T-Zellantwort anregen und zur Anlage von Gedächtniszellen führen (Lisziewicz et al., 2001), ermöglichen weitere Einblicke in eine erfolgreiche Immunabwehr und eröffnen darüber hinaus vielleicht auch neue, optimierte Therapieoptionen.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Zytolyse, die durch HIV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bewirkt wird, untersucht.

Grundsätzlich erscheinen in der Abwehr viraler Infekte sowohl CD4+ wie CD8+ CTL. In chronisch HIV-Infizierten sind in der Regel lediglich CD8+ CTL zu finden. HIV-spezifische CD4+ CTL können aber zum Beispiel in Impfstudien aus Probandenblut isoliert werden.

Sie erwiesen sich als zytolytisch aktiv und waren außerdem, wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, auch an einer Fusions-vermittelten Lyse beteiligt. Diese ist Kalzium-unabhängig, auch mit heterologen Zellen möglich und die Expression des HIV-gp120 an der Zelloberfläche der Zielzellen ist essentiell, während die Präsentation von gp120 Epitopen nicht ausreicht.

Die Konsequenz dieser Lyseform ist die apoptotische Zerstörung aller beteiligten Zellen. CD4+ HIV-spezifische CTL können über diesen Lysemechanismus bereits in der akuten Phase der Infektion einer negativen Selektion unterliegen, was ein Grund für das Fehlen der HIV-spezifischen CD4+ CTL in chronisch Infizierten darstellen kann.

HIV-spezifische CD8+ CTL konnten aus einem HIV-positiven Patienten isoliert werden. Insgesamt wurden fünf Klone näher charakterisiert. Zwei erkannten jeweils ein Epitop aus unterschiedlichen Bereichen des extrazellulären Anteils des Glykoproteins, einer einen Bereich des p17-Anteils und zwei dasselbe Epitop im p24-Anteil des gag-Proteins. Dieses Epitop, plaziert innerhalb der Aminosäuren 71 bis 85, konnte hier zum erstenmal für die Präsentation mit HLA B51 beschrieben werden.

In der spezifisch induzierten Lyse wiesen alle CD8+ CTL-Klone zwei Lysemechanismen auf, einen Perforin-vermittelten und einen CD95-vermittelten Anteil.

Die CD95-vermittelte Lyse war stets prozentual geringer, und zusätzlich, sowohl Klon- wie Zielzell-spezifisch, unterschiedlich stark ausgeprägt.

In HIV-infizierten primären Zellen ließ sich kein CD95-Anteil signifikant nachweisen, was darauf hinweist, daß dieser Lysemechanismus wahrscheinlich keine Rolle bei der Zerstörung infizierter Zellen im peripheren Blut spielt.

In anderen Geweben kann sich die Situation unterschiedlich darstellen.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß das Vakzinia-Virus B13R-Genprodukt die CD95-vermittelte Apoptose hemmt. Daher muß bei der Untersuchung apoptotischer Vorgänge, die Wahl der eingesetzten Vektoren genauestens bedacht werden.

## 6. Conclusion

In this work the HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte (CTL) mediated cytotoxicity was investigated.

Normally CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CTL are generated to defend viral infections. In chronically infected HIV-patients generally only CD8<sup>+</sup> CTL are detectable. But HIV-specific CD4<sup>+</sup> CTL can be isolated from blood of HIV-vaccine candidates, for example.

These CTL were cytotoxic active and, as shown in this work for the first time, were also involved in fusion-mediated lyses. This lyses is independent of extracellular calcium, works with heterologous cells and the expression of HIV-gp 120 at the cell surface is essential. A presentation of gp 120 epitopes by HLA is not sufficient.

In consequence this form of lyses is destructive in an apoptotic manner for all participating cells. CD4<sup>+</sup> HIV-specific CTL could be negative selected by this mechanism in the early stage of infection. This could be a reason for the absence of HIV-specific CD4<sup>+</sup> CTL in chronically infected patients.

HIV-specific CD8<sup>+</sup> CTL were isolated from one patient. Five were characterized in more detail. Two of them recognized an epitope in different parts of the extracellular region of the glycoprotein, one discerned the p17-protein and two the same epitope of the p24-part of the gag-protein. This epitope, localized between amino acids 71 to 85, is here reported for the first time for presentation with HLA B51.

In specific induced lyses all CD8<sup>+</sup> CTL-clones presented two lyses-mechanisms, a perforin-mediated and a CD95-mediated portion.

The CD95-mediated lyses always showed lower percentages and differed dependant on the CTL-clone and the target-cells in its markedness.

For HIV-infected primary cells no significant CD95-mediated lyses was detectable, leading to that there is no role for this lyses mechanism in destruction of infected cells in peripheral blood.

In other tissues the situation can differ.

In this work, furthermore the inhibition of CD95-mediated apoptosis by the Vaccinia Virus B13R gene product was proven. Therefore, the vectors used in investigations of apoptosis has to be chosen carefully.

## 7. Literaturverzeichnis

Ada GL, McElrath MJ.

HIV type 1 vaccine-induced cytotoxic T cell responses: Potential role in vaccine efficacy.  
*AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997; **13**(3): 205-10.

Addo MM, Altfeld M, Rosenberg ES, Eldridge RL, Philips MN, Habeeb K, Khatri A, Brander C, Robbins GK, Mazzara GP, Goulder PJ, Walker BD.

The HIV-1 regulatory proteins Tat and Rev are frequently targeted by cytotoxic T lymphocytes derived from HIV-1-infected individuals.

*Proc Natl Acad Sci (USA)*. 2001 Feb 13; **98**(4): 1781-6.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson D, Salvesen G, Thornberry NA, Wong W, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature.

*Cell* 1996; **87**: 171.

Altfeld M, Addo MM, Eldridge RL, Yu XG, Thomas S, Khatri A, Strick D, Phillips MN, Cohen GB, Islam SA, Kalams SA, Brander C, Goulder PJ, Rosenberg ES, Walker BD.

Vpr is preferentially targeted by CTL during HIV-1 infection.

*J Immunol*. 2001 Sep 1; **167**(5): 2743-52.

Ameisen JC

Programmed cell death and AIDS: From hypothesis to experiment.

*Immunol. Today*; **13**: 388-91.

Andersson J, Behbahani H, Liebermann J, Connick E, Landay A, Patterson B, Sonnerborg A, Lore K, Uccini S, Fehniger TE.

Perforin is not co-expressed with granzyme A within cytotoxic granules in CD8 T lymphocytes present in lymphoid tissue during chronic HIV infection.

*AIDS* 1999 Jul 30; **13**(11): 1295-303.

Ando K, Hiroshi K, Kaneko T, Moriyama T, Muto Y, Kayagaki N, Yagita H, Ikumura K, Imawari M.

Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL.

*J Immunol*. 1997 Jun 1; **158**(11): 5283-91.

Anel A, Buferne M, Boyer C, Schmitt-Verhulst AM, Golstein P.

T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A.

*Eur J Immunol*. 1994 Oct; **24**(10): 2469-76.

Anel A, Gamen S, Alava MA, Schmitt-Verhulst AM, Pineiro A, Naval J.

Role of oxidative damage and IL-1 beta-converting enzyme-like proteases in Fas-based cytotoxicity exerted by effector T cells.

*Int Immunol*. 1996 Jul; **8**(7): 1173-83.

Anel A, Gamen S, Alava MA, Schmitt-Verhulst AM, Pineiro A, Naval J.

Inhibition of CPP32-like proteases prevents granzyme B- and Fas-, but not granzyme A-based cytotoxicity exerted by CTL clones.

*J Immunol*. 1997 Mar 1; **158**(5): 1999-2006.

Appay V, Dunbar PR, Cerundolo V, McMichael A, Czaplewski L, Rowland-Jones S.

RANTES activates antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in a mitogen-like manner through cell surface aggregation.

*Int Immunol*. 2000 Aug; **12**(8): 1173-82.

Badley A.D., McElhinny, J.A., Leibson, P.J., Lynch, D.H., Alderson, M.R. and Paya, C.V  
Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes.  
*J Virol*, 1996 **70**(1): 199-206.

Badley AD, McElhinny JA, Leibson PJ, Lynch DH, Alderson MR, Paya CV.  
Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes.  
*J Virol*. 1996 Jan; **70**(1): 199-206.

Baum LL, Cassutt KJ, Knigge K, Khattri R, Margolick J, Rinaldo C, Kleeberger CA, Nishanian P, Henrard DR, Phair J.  
HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression.  
*J Immunol*. 1996; **157**: 2168-73.

Bäumler CB, Bohler T, Herr I, Benner A, Krammer PH, Debatin KM.  
Activation of the CD95 (APO/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children.  
*Blood*. 1996 Sep 1; **88**(5): 1741-46.

Beidler DR, Tewari M, Friesen PD, Poirier G, Dixit VM.  
The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis.  
*J Biol. Chem*. 1995 Jul 14; **270**(28): 2526-28.

Bollinger RC, Quinn TC, Liu AY, Stanhope PE, Hammond SA, Viveen R, Clements ML, Siliciano RF.  
Cytokines from vaccine-induced HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes: effects on viral replication.  
*AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993 Nov; **9**(11): 1067-77.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB.  
Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection.  
*J Virol*. 1994 Sep; **68**(9): 6103-10.

Brodie SJ, Lewinsohn DA, Patterson BK, Jiyamapa D, Krieger J, Corey L, Greenberg PD, Riddell SR.  
In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells.  
*Nat Med*. 1999 Jan; **5**(1): 34-41.

Brodie SJ, Patterson BK, Lewinsohn DA, Diem K, Spach D, Greenberg PD, Riddell SR, Corey L.  
HIV-specific cytotoxic T lymphocytes traffic to lymph nodes and localize at sites of HIV replication and cell death.  
*J Clin Invest*. 2000 May; **105**(10): 1407-17.

Buseyne F, Fevrier M, Garcia S, Gougeon ML, Riviere Y.  
Dual function of a human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte clone: Inhibition of HIV replication by noncytolytic mechanisms and lysis of HIV-infected CD4+ cells.  
*Virology*. 1996 Nov 1; **225**(1): 248-53.

Callan MFC, Steven N, Krausa P, Wilson JDK, Moss PAH, Gillespie GM, Bell JI, Rikinson AB, McMichael AJ.  
Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis.  
*Nature Med*. 1996; **2**: 205-11.

Cao W, Tykodi SS, Esser MT, Braciale VL, Braciale TJ.  
Partial activation of CD8+ T cells by a self-derived peptide.  
*Nature*. 1995 Nov 16; **378**(6554): 295-8



- Carmichael A, Jin X, Sissons P, Borysiewicz L.  
Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: Differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease.  
*J Exp Med.* 1993 Feb 1; **177**(2): 249-56.
- Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ.  
HLA and HIV-1: Heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage.  
*Science.* 1999; **283**: 1748-52.
- Clerici M, Shearer G.  
A Th1 to Th2 switch is a critical step in the aetiology of HIV infection.  
*Immunol. Today*; 1993; **14**(3): 107-11.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino DA, Arya SK, Gallo RC, Lusso P.  
Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells.  
*Science.* 1995; **270**(5243): 1811-15.
- Coffin JM.  
HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy.  
*Science* 1995, **267**(5197): 483-89.
- Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D.  
HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes.  
*Nature.* 1998 Jan 22; **391**(6665): 397-401.
- Couillin I, Culmann-Penciolelli B, Gomard E, Choppin J, Levy JP, Guillet JG, Saragosti S.  
Impaired cytotoxic T lymphocyte recognition due to genetic variations in the main immunogenic region of the human immunodeficiency virus 1 NEF protein.  
*J Exp Med.* 1994 Sep 1; **180**(3): 1129-34.
- Curiel TJ, Wong JT, Gorczyca PF, Schooley RT, Walker BD.  
CD4+ human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope-specific cytotoxic T lymphocytes derived from the peripheral blood cells of an HIV-1-infected individual.  
*AIDS Res Hum Retroviruses.* 1993 Jan; **9**(1): 61-8.
- Duke RC, Persechini PM, Chang S, Liu CC, Cohen JJ, Young JDE.  
Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation.  
*J Exp Med.* 1989 Oct; **170**: 1451-1456.
- Earl PL, Koenig S, Moss B.  
Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: Analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses.  
*J Virol.* 1991; **65**: 31-41.
- Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, Harley CB, Villeponteau B, West MD, Giorgi JV.  
Shortened telomeres in the expanded CD28- CD8+ subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis.  
*AIDS.* 1996; **10**: 17-22.
- Estaquier J, Tanaka M, Suda T, Nagata S, Golstein P, Ameisen JC.  
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 Jun 15; **87**(12): 4959-66.

Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, Baba TW, Ruprecht RM, Kupfer A.

Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes.

*Nature Med.* 1995; **1**: 129-34.

Fleury S, de Boer RJ, Rizzardini GP, Wolthers KC, Otto SA, Welbon CC, Graziosi C, Knabenhans C, Soudeyns H, Bart PA, Gallant S, Corpataux JM, Gillet M, Meylan P, Schnyder P, Meuwly JY, Spreen W, Glauser MP, Miedema F, Pantaleo G.

Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy.

*Nat Med.* 1998 Jul; **4**(7): 794-801.

Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, Mannan P, Thompson LD, Abbondanzo SL, Nelson AM, Pope M, Steinman RM.

DC-SIGN, a dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid.

*Science.* 1996; **272**: 115-117.

Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RK, Drexler HC, Rotello R, Fishman MC, Yuan J.

Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene.

*Science.* 1994; **263**: 826-28.

Gallo RC.

12th World AIDS Conference in Geneva

*AIDS Treatment News.* 1998 Jul 17.

Garcia S, Fevrier M, Dadaglio G, Lecoecur H, Riviere Y, Gougeon ML.

Potential deleterious effect of anti-viral cytotoxic lymphocyte through the CD95 (FAS/APO-1)-mediated pathway during chronic HIV infection.

*Immunol. Lett.* 1997 Jun 1; **57**(1-3): 53-8.

Gea-Banacloche JC, Migueles SA, Martino L, Shupert WL, McNeil AC, Sabbaghian MS, Ehler L, Prussin C, Stevens R, Lambert L, Altman J, Hallahan C, de Quiros JC, Connors M  
Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors.

*J Immunol.* 2000 Jul 15; **165**(2): 1082-92.

Gotch FM, Nixon DF, Alp N, McMichael AJ, Borysiewicz LK.

High frequency of memory and effector gag specific cytotoxic T lymphocytes in HIV seropositive individuals.

*Int. Immunol.* 1990; **2**: 707.

Gougeon ML, Lecoecur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T, Montagnier L.

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 May 1; **156**(9): 3509-20.

Gould KG, Bangham CR.

Virus variation, escape from cytotoxic T lymphocytes and human retroviral persistence.

*Semin Cell Dev Biol.* 1998 Jun; **9**(3): 321-28.

Goulder PJR, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, McMichael AJ, Rowland-Jones S.

Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS.

*Nature Med.* 1997 Feb; **3**(2): 212-17.

Goulder PJ, Tang Y, Brander C, Betts MR, Altfeld M, Annamalai K, Trocha A, He S, Rosenberg ES, Ogg G, O'Callaghan CA, Kalams SA, McKinney RE Jr, Mayer K, Koup RA, Pelton SI, Burchett SK, McIntosh K, Walker BD.

Functionally inert HIV-specific cytotoxic T lymphocytes do not play a major role in chronically infected adults and children.

*J Exp Med.* 2000 Dec 18; **192**(12): 1819-32.

Hadida F, Haas G, Zimmermann N, Hosmalin A, Spohn R, Samri A, Jung G, Debre P, Autran B.

CTLs from lymphoid organs recognize an optimal HLA-A2-restricted and HLA-B52-restricted nonapeptide and several epitopes in the C-terminal region of HIV-1 Nef.

*J Immunol.* 1995 Apr 15; **154**(8): 4174-86.

Hadida F, Vieillard V, Autran B, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Debre P.

HIV-specific T cell cytotoxicity mediated by RANTES via the chemokine receptor CCR3.

*J Exp Med.* 1998 Aug 3; **188**(3): 609-14.

Hadida F, Vieillard V, Mollet L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Debre P.

Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells.

*J Immunol.* 1999 Aug 1; **163**(3): 1105-9.

Hahn-S; Gehri-R; Erb-P.

Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity.

*Immunol-Rev.* 1995 Aug; **146**: 57-79.

Hammond SA, Bollinger RC, Stanhope PE, Quinn TC, Schwartz D, Clements ML, Siliciano RF.

Comparative clonal analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4+ and CD8+ cytolytic T lymphocytes isolated from seronegative humans immunized with candidate HIV-1 vaccines.

*J Exp Med.* 1992 Dec 1; **176**(6): 1531-42.

Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, Ogg GS, Tan R, Becker M, Gilbert SC, Hill AV, Smith GL, McMichael A.

Immunogenicities of intravenous and intramuscular administrations of modified vaccinia virus Ankara-based multi-CTL epitope vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in mice.

*J Gen Virol.* 1998 Jan; **79**(Pt 1): 83-90.

Harrer T, Jassoy C, Harrer E, Johnson RP, Walker BD.

Induction of HIV-1 replication in a chronically infected T-cell line by cytotoxic T lymphocytes.

*J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993 Aug; **6**(8): 865-71.

Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Elbeik T, Staprans SI, Feinberg MB, Cao Y, Ho DD, Yilma T, Caliendo AM, Johnson RP, Buchbinder SP, Walker BD.

Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection.

*AIDS ReAIDS Res Hum Retrovirussess .* 1996 May 1; **12**(7): 585-92.

Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Barbosa P, Trocha A, Johnson RP, Elbeik T, Feinberg MB, Buchbinder SP, Walker BD.

Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load.

*J Immunol.* 1996 Apr 1; **156**(7): 2616-23.

Heinkelein M, Sopper S, Jassoy C.

Contact of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4+ T lymphocytes is highly cytolytic for both cells.

*J Virol.* 1995 Nov; **69**(11): 6925-31.

Heinkelein M, Euler-Konig I, Klinker H, Ruckle-Lanz H, Jassoy C.  
Lysis of human immunodeficiency virus type 1 antigen-expressing cells by CD4 and CD8 T cells ex vivo.

*J Infect Dis.* 1996 Jul; **174**(1): 209-13.

Heinkelein M, Pilz S, Jassoy C.

Inhibition of CD95 (Fas/Apo1)-mediated apoptosis by vaccinia virus WR.

*Clin Exp Immunol.* 1996; **103**: 8-14.

Heinkelein M, Müller M, Kutsch O, Sopper S, Jassoy C.

Rapid and selective depletion of CD4+ T lymphocytes and preferential loss of memory cells on interaction of mononuclear cells with HIV-1 glycoprotein-expressing cells.

*AIDS ReAIDS Res Hum Retroviruses* . 1997; **16**: 74-82.

Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune JM.

Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans.

*Nat Med.* 1999 Jan; **5**(1): 83-9.

Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JG, Ley TJ.

Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells.

*Cell.* 1994; **76**: 977.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M.

Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.

*Nature.* 1995 Jan 12; **373**: 123-26.

Jassoy C, Johnson RP, Navia BA, Worth J, Walker BD.

Detection of a vigorous HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte response in cerebrospinal fluid from infected persons with AIDS dementia complex.

*J Immunol.* 1992 Nov 1; **149**(9): 3113-19.

Jassoy C, Harrer T, Rosenthal T, Navia BA, Worth J, Johnson RP, Walker BD.

Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes release gamma interferon, tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and TNF-beta when they encounter their target antigens.

*J Virol.* 1993 May; **67**(5): 2844-52.

Jin X, Wills M, Sissons JG, Carmichael A.

Progressive loss of IL-2-expandable HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during asymptomatic HIV infection.

*Eur J Immunol.* 1998 Nov; **28**(11): 3564-76.

Johnson RP, Trocha A, Buchanan TM, Walker BD.

Identification of overlapping HLA class I-restricted cytotoxic T cell epitopes in a conserved region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: Definition of minimum epitopes and analysis of the effects of sequence variation.

*J Exp Med.* 1992 Apr 1; **175**(4): 961-71.

Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P.

Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity.

*Science.* 1994 Jul 22; **265**(5171): 528-30.

Kägi D, Seiler P, Pavlovic J, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H.

The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses.

*Eur J Immunol.* 1995 Dec; **25**(12): 3256-62

Kataoka-T; Shinohara-N; Takayama-H; Takaku-K; Kondo-S; Yonehara-S; Nagai-K  
Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity.  
*J Immunol.* 1996 May 15; **156**(10): 3678-86.

Kataoka T, Taniguchi M, Yamada A, Suzuki H, Hamada S, Magae J, Nagai K  
Identification of low molecular weight probes on perforin- and Fas-based killing mediated by cytotoxic T lymphocytes.  
*Biosci Biotechnol Biochem.* 1996 Oct; **60**(10): 1726-28.

Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, Dong T, Yang HB, Kiama P, Rostron T, Njagi E, Bwayo JJ, MacDonald KS, McMichael AJ, Plummer FA.  
Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses.  
*J Clin Invest.* 2001 Feb; **107**(3): 341-49.

Kettle S, Alcamí A, Khanna A, Ehret R, Jassoy C, Smith GL.  
Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1beta-converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1beta-induced fever.  
*J Gen Virol.* 1997; **78**, 677-65.

Klein MR, Van VCA, Holwerda AM, Garde SRK, Bende RJ, Keet IPM, Eeftinck SJKM, Osterhaus ADME, Schuitemaker H, Miedema F.  
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): 1365-72.

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD.  
Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome.  
*J Virol.* 1994 Jul; **68**(7): 4650-55.

Laurent-Crawford AG, Krust B, Muller S, Reviere Y, Rey-Cullie MA, Bechet JM, Montagnier L, Hovanessian AG.  
The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis.  
*Virology.* 1991; **185**: 829-39.

Laurent-Crawford AG, Krust B, Reviere Y, Desgranges C, Muller S, Kieny MP, Dauguet C, Hovanessian AG.  
Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells.  
*AIDS Res Hum Retroviruses* . 1993; **9**: 761-73.

Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER.  
Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells.  
*J Immunol.* 1996; **157**: 1919-25.

Lee RK, Spielman J, Podack ER.  
Bcl-2 protects against Fas-based but not perforin-based T cell-mediated cytotoxicity.  
*Int-Immunol.* 1996 **Jul** (7): 991-1000.

Lewinsohn DM, Bement TT, Xu J, Lynch DH, Grabstein KH, Reed SG, Alderson MR.  
Human purified protein derivative-specific CD4+ T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms.  
*J Immunol.* 1998 Mar 1; **160**(5): 2374-79.

Lifson JD, Reyes GR, McGrath MC, Stein BS, Engleman EG.  
AIDS retrovirus induced cytopathology: Giant cell formation and involvement of CD4 antigen.  
*Science.* 1986; **232**: 1123-27.

Lisziewicz J, Gabrilovich DI, Varga G, Xu J, Greenberg PD, Arya SK, Bosch M, Behr JP, Lori F.

Induction of potent human immunodeficiency virus type 1-specific T-cell-restricted immunity by genetically modified dendritic cells.

*J Virol.* 2001 Aug; **75**(16): 7621-28.

Littau RA, Oldstone MB, Takeda A, Ennis FA.

A CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clone to a conserved epitope on human immunodeficiency virus type 1 p24: Cytotoxic activity and secretion of interleukin-2 and interleukin-6.

*J Virol.* 1992 Jan; **66**(1): 608-11.

Liu CC, Walsh CM, Young JD.

Perforin: structure and function.

*Immunol. Today.* 1995 Apr **16**(4): 194-201.

Liu CC, Walsh CM, Eto N, Clark WR, Young JD.

Morphologic and functional characterization of perforin-deficient lymphokine-activated killer cells.

*J Immunol.* 1995 Jul 15; **155**(2): 602-08.

Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J

Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways.

*Nature.* 1994 Aug 25; **370**(6491): 650-52.

Lubaki NM, Shepherd ME, Brookmeyer RS, Hon H, Quinn TC, Kashamuka M, Johnson M, Gottle R, Devers J, Lederman HM, Bollinger RC.

HIV-1-specific cytolytic T-lymphocyte activity correlates with lower viral load, higher CD4 count, and CD8+CD38-DR- phenotype: comparison of statistical methods for measurement.

*J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999 Sep 1; **22**(1): 19-30.

McClosky TW, Ott M, Tribble E, Khan SA, Teichberg S, Paul MO, Pahwa S, Verdin E, Chirmule N.

Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells.

*J Immunol.* 1997; **158**: 1014-19.

McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA.

Cytotoxic T-cell immunity to influenza.

*New Eng J Med.* 1983; **309**: 13-17.

McMichael AJ, Ogg G, Wilson J, Callan M, Hambleton S, Appay V, Kelleher T, Rowland-Jones S.

Memory CD8+ T cells in HIV infection.

*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2000 Mar 29; **355**(1395): 363-67.

McMichael AJ, Walker BD.

Cytotoxic T lymphocyte epitopes: Implications for HIV vaccines.

*AIDS.* 1994; **8**(1): 155-73.

McMichael AJ, Rowland-Jones SL.

Cellular immune responses to HIV.

*Nature.* 2001 Apr 19; **410**: 980-87.

Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo C, Todd J, Hoo V, Kokka R, Gupta P.

Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion.

*Ann. Intern. Med.* 1995; **122**: 573-79.

Miedema F, Klein M.

AIDS pathogenesis: A finite immune response to blame?

*Science.* 1996; **272**: 505.

Miskovsky EP, Liu AY, Pavlat W, Viveen R, Stanhope PE, Finzi D, Fox WM, Hruban RH, Podack ER, Siliciano RF.

Studies of the mechanism of cytolysis by HIV-1-specific CD4+ human CTL clones induced by candidate AIDS vaccines.

*J Immunol.* 1994 Sep 15; **153**(6): 2787-99.

Mollet L, Li TS, Samri A, Tournay C, Tubiana R, Calvez V, Debre P, Katlama C, Autran B  
Dynamics of HIV-specific CD8+ T lymphocytes with changes in viral load. The RESTIM and COMET Study Groups.

*J Immunol.* 2000 Aug 1; **165**(3): 1692-704.

Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ.

Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones.

*J Exp Med.* 1986 Apr 1; **163**(4): 903-21.

Moss P, Rowland-Jones SL, Frodsham PM, McAdam S, Giangrande P, McMichael AJ, Bell JI  
Persistent high frequency of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T cells in peripheral blood of infected donors.

*Proc Natl Acad Sci (USA).* 1995; **92**(13): 5773-77.

Nagata S.

Apoptosis by death factor.

*Cell* 1997 Feb 7; **88**: 355-365.

Nagata S, Goldstein P.

The Fas death factor.

*Science.* 1995 Mar 10; **267**(5203): 1449-56.

Nixon DF, McMichael AJ.

Cytotoxic T-cell recognition of HIV proteins and peptides.

*AIDS.* 1991; **5**: 1049-59.

Norris PJ, Sumaroka M, Brander C, Moffett HF, Boswell SL, Nguyen T, Sykulev Y, Walker BD, Rosenberg ES.

Multiple effector functions mediated by human immunodeficiency virus-specific CD4+ T-cell clones.

*J Virol.* 2001 Oct; **75**(20): 9771-79.

Nowak MA, May RM, Phillips RE, Rowland-Jones S, Lalloo DG, McAdam S, Klenerman P, Koppe B, Sigmund K, Bangham CR.

Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections.

*Nature.* 1995 Jun 15; **375**(6532): 606-11.

Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak M, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones S, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho D, Nixon DF, McMichael A

Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA.

*Science.* 1998 Mar 27; **279**(5359): 2103-6.

Ohnibus H, Heinkelein M, Jassoy C.

Apoptotic cell death upon contact of CD4+ T lymphocytes with HIV glycoprotein-expressing cells is mediated by caspases but bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor 1.

*J Immunol.* 1997; **159**: 5246-52.

Orentas RJ, Hildreth JE, Obah E, Polydefkis M, Smith GE, Clements ML, Siliciano RF.

Induction of CD4+ human cytolytic T cells specific for HIV-infected cells by a gp160 subunit vaccine.

*Science.* 1990 Jun 8; **248**(4960): 1234-37.

Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS.

The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection.

*Semin Immunol.* 1993 Jun; **5**(3): 157-63.

- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Cohen OJ, Vaccarezza M, Gantt K, Muro-Cacho C, Fauci AS.  
Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection.  
*Immunol Rev.* 1994 Aug; **140**: 105-30.
- Pantaleo G, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Fauci AS.  
Antiviral immunity in HIV-1 infected long-term non-progressors (LTNPs).  
*Virology.* 1996; **7**: 131-138.
- Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS.  
Virologic and immunologic events in primary HIV infection.  
*Springer Semin Immunopathol.* 1997; **18**(3): 257-66.
- Pantoleo G.  
Unraveling the strands of HIV's web.  
*Nature Med.* 1999 Jan; **5**(1): 27-28.
- Piazza C, Gilardini Montani MS, Moretti S, Cundari E, Piccolella E.  
CD4+ T cells kill CD8+ T cells via Fas/Fas ligand-mediated apoptosis.  
*J Immunol.* 1997; **158**: 1503-06.
- Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphael M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM, Debre P.  
AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders.  
*Nature.* 1987 Jul 23-29; **328**(6128): 348-51.
- Podack-ER.  
Execution and suicide: cytotoxic lymphocytes enforce Draconian laws through separate molecular pathways.  
*Curr-Opin-Immunol.* 1995 Feb; **7**(1): 11-6.
- Pontesilli O, Klein MR, Kerkhof-Garde SR, Pakker NG, de Wolf F, Schuitemaker H, Miedema F.  
Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte responses: A predominant gag-specific response is associated with nonprogressive infection.  
*J Infect Dis.* 1998 Oct; **178**(4): 1008-18.
- Price P, Johnson RP, Scadden DT, Jassoy C, Rosenthal T, Kalams S, Walker BD.  
Cytotoxic CD8+ T lymphocytes reactive with human immunodeficiency virus-1 produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and variable amounts of interleukins 2, 3, and 4 following stimulation with the cognate epitope.  
*Clin Immunol Immunopathol.* 1995 Jan; **74**(1): 100-6.
- Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, Bangham CRM, Phillips RE.  
Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection.  
*Proc Natl Acad Sci.* 1997 Mar; **94**: 1890-95.
- Price DA, Sewell AK, Dong T, Tan R, Goulder PJ, Rowland-Jones SL, Phillips RE.  
Antigen-specific release of beta-chemokines by anti-HIV-1 cytotoxic T lymphocytes.  
*Curr Biol.* 1998 Mar 12; **8**(6):355-58.
- Propato A, Schiaffella E, Vicenzi E, Francavilla V, Baloni L, Paroli M, Finocchi L, Tanigaki N, Ghezzi S, Ferrara R, Chesnut R, Livingston B, Sette A, Paganelli R, Aiuti F, Poli G, Barnaba V.  
Spreading of HIV-specific CD8+ T-cell repertoire in long-term nonprogressors and its role in the control of viral load and disease activity.  
*Hum Immunol.* 2001 Jun; **62**(6): 561-76.



- Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Picha KS, Kennedy MK, Lynch DH.  
Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death.  
*Int Immunol*. 1994 Oct; **6**(10): 1545-53.
- Rivoltini L, Radrizzani M, Accornero P, Squarcina P, Chiodoni C, Mazzocchi A, Castelli C, Tarsini P, Viggiano V, Belli F, Colombo MP, Parmiani G.  
Human melanoma-reactive CD4+ and CD8+ CTL clones resist Fas ligand-induced apoptosis and use Fas/Fas ligand-independent mechanisms for tumor killing.  
*J Immunol*. 1998 Aug 1; **161**(3): 1220-30.
- Rogers AM, Thilenius AR, Russell JH.  
Cyclosporine-insensitive partial signaling and multiple roles of Ca<sup>2+</sup> in Fas ligand-induced lysis.  
*J Immunol*. 1997 Oct 1; **159**(7): 3140-47.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax P, Kalams SA, Walker BD  
Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia.  
*Science*. 1997 Nov 21; **278**(5342): 1447-50.
- Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, Robbins GK, D'Aquila RT, Goulder PJ, Walker BD.  
Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection.  
*Nature*. 2000 Sep 28; **407**(6803): 523-26.
- Rouvier E, Luciani MF, Golstein P.  
Fas involvement in Ca<sup>2+</sup>-independent T cell-mediated cytotoxicity.  
*J Exp. Med*. 1993 Jan; **177**: 195-200.
- Rowland-Jones S, Tan R, McMichael A.  
The role of cellular immunity in protection against HIV infection.  
*Adv. Immunol*. 1997; **65**: 277-346.
- Rowland-Jones SL, Pinheiro S, Kaul R, Hansasuta P, Gillespie G, Dong T, Plummer FA, Bwayo JB, Fidler S, Weber J, McMichael A, Appay V.  
How important is the 'quality' of the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection?  
*Immunol Lett*. 2001 Nov 1; **79**(1-2): 15-20.
- Sarin A, Williams MS, Alexander-Miller MA, Berzofsky JA, Zacharchuk CM, Henkart PA.  
Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases.  
*Immunity*. 1997 Feb; **6**(2): 209-15.
- Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L, Herr W, Schmittel A, Cerottini JC, Woelfel T, Eggermont AM, Keilholz U.  
Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN gamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: A four-centre comparative trial.  
*J Immunol Methods*. 2000 Oct 20; **244**(1-2): 81-89.
- Schnittman SM, Greenhouse JJ, Psallidopoulos MC, Baseler M, Salzman NP, Fauci AS, Lane HC.  
Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease.  
*Ann Intern Med*. 1990 Sep 15; **113**(6): 438-43.
- Schröter M, Lowin B, Borner C, Tschopp J.  
Regulation of Fas(Apo-1/CD95)- and perforin-mediated lytic pathways of primary cytotoxic T lymphocytes by the protooncogene bcl-2.  
*Eur-J-Immunol*. 1995 Dec; **25**(12): 3509-13.

- Sethi KK, Omata Y, Schnewer KE.  
Protection of mice from fatal herpes simplex virus type 1 infection by adoptive transfer of virus-specific and H-2 restricted cytotoxic T lymphocytes.  
*J Gen Virol.* 1983; **64**: 443-47.
- Shankar P, Xu Z, Lieberman J.  
Viral-specific cytotoxic T lymphocytes lyse human immunodeficiency virus-infected primary T lymphocytes by the granule exocytosis pathway.  
*Blood.* 1999 Nov 1; **94**(9): 3084-93.
- Shi L, Kam CM, Powers JC, Aebersold R, Greenberg AH.  
Purification of three cytotoxic lymphocyte granule Serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions.  
*J Exp Med.* 1992 Dec; **176**: 1521-29.
- Siliciano RF, Lawton T, Knall C, Karr RW, Berman P, Gregory T, Reinherz EL.  
Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones: Effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4+ cell depletion.  
*Cell.* 1988 Aug 12; **54**(4): 561-75.
- Siliciano RF.  
The role of CD4 in HIV envelope-mediated pathogenesis.  
*Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; **205**: 159-79.
- Siliciano RF.  
Latency and reservoirs for HIV-1.  
*AIDS.* 1999; 13 Suppl A: 49-58.
- Stanhope PE, Clements ML, Siliciano RF.  
Human CD4+ cytolytic T lymphocyte responses to a human immunodeficiency virus type 1 gp160 subunit vaccine.  
*J Infect Dis.* 1993 Jul; **168**(1): 92-100.
- Tewari-M; Telford-WG; Miller-RA; Dixit-VM.  
CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis.  
*J-Biol-Chem.* 1995 Sep 29; **270**(39): 22705-08.
- Topham DJ, Tripp RA, Doherty PC.  
CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes.  
*J Immunol.* 1997, **159**: 5197-5200.
- Wei C, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM.  
Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.  
*Nature.* 1995 Jan 12; **373**: 117-122.
- White DO, Fenner FJ.  
Medical Virology  
*Academic Press*, Fourth Edition, San Diego, 1994
- Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Davis C, Shaunak S, Downie J, Dyer W, Workman C, Sullivan S, McMichael AJ, Rowland-Jones SL.  
Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection.  
*AIDS.* 2000 Feb 18; **14**(3): 225-33.
- Wolthers KC, Bea G, Wisman A, Otto SA, de Roda Husman AM, Schaft N, de Wolf F, Goudsmit J, Coutinho RA, van der Zee AG, Meygaard L, Miedema F.  
T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4+ T cell turnover.  
*Science.* 1996 Nov 29; **274**(5292): 1543-47.

- Yang OO, Kalams SA, Trocha A, Cao H, Luster A, Johnson RP, Walker BD.  
Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: Evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms.  
*J Virol.* 1997 Apr; **71**(4): 3120-28.
- Yang OO, Tran AC, Kalams SA, Johnson RP, Roberts MR, Walker BD.  
Lysis of HIV-1-infected cells and inhibition of viral replication by universal receptor T cells.  
*Proc Natl Acad Sci (USA).* 1997 Oct 14; **94**(21): 11478-83.
- Yap KL, Ada GL, McKenzie IF.  
Transfer of specific cytotoxic T lymphocytes protects mice inoculated with influenza virus.  
*Nature* 1978; **273**: 238-39.
- Yasukawa M, Hasegawa A, Ohniami HA, Ykishijin Y, Arai J, Ishida Y, Tugita S.  
Fas-independent cytotoxicity mediated by human CD4+ CTL directed against herpes simplex virus-infected cells.  
*J Immunol.* 1999 May 1; **102**(9): 5569-75.
- Zeytun A, Hassuneh M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS.  
Fas-Fas ligand-based interactions between tumor cells and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes: A lethal two-way street.  
*Blood.* 1997 Sep 1; **90**(5): 1952-59.
- Zhang Y, Fadeel B, Hodara V, Fenyö EM.  
Induction of apoptosis by primary HIV-1 isolates correlates with productive infection in peripheral blood mononuclear cells.  
*AIDS.* 1997; **11**: 1219.
- Zinkernagel RM.  
Immunology taught by viruses.  
*Science.* 1996 Jan 12; **271**(5246): 173-78.
- Zinkernagel RM, Doherty PC.  
Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis.  
*Nature.* 1974 Oct 11; **251**(5475): 547-48.

## 8. Eigene Publikationen

Robert Ehret, Jochen Schab and Elmar Weiler  
Lipoxygenases in *Bryonia dioica* Jacq. tendrils and cell cultures  
*Journal of Plant Physiology*, (1994); Vol. **144**: 175-82.

Susan Kettle, Antonio Alcami Anu Khanna, Robert Ehret, Christian Jassoy and Geoffrey Smith  
Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- $\alpha$  and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1 $\beta$ -induced fever  
*Journal of General Virology*, (1997); 78: 677-85.

Robert Ehret, Martin Heinkelein, Robert F. Siliciano and Christian Jassoy  
Human immunodeficiency virus glycoprotein-specific CD4 $^{+}$  cytotoxic T lymphocytes are involved in two types of cytotoxicity: Antigen-specific and cell-cell fusion-related cell lysis  
*AIDS Research and Human Retroviruses*, (1997); Vol. **13**, No. 12: 1017-21.

Wolfram Strupp, Gerald Weidinger, Carsten Scheller, Robert Ehret, Hartmut Ohnimus, Hermann Girschick, Piet Tas, Egbert Flory, Martin Heinkelein and Christian Jassoy  
Treatment of cells with detergent activates caspases and induces apoptotic cell death  
*The Journal of Membrane Biology*, (2000); 175: 181-89.

P. Braun, M. Helm, R. Ehret, B. Schmidt, K.H. Stürmer, H. Walter, C. Hoehn, K. Korn and H. Knechten  
Predictive Value of Different Drug Resistance Interpretation Systems in Therapy Management of HIV-Infected Patients in Daily Routine  
*Antiviral Therapy*, (2002); 7 (sup 1):77

H. Knechten, C. Höhn, P. Braun, R. Ehret  
Virological failure after switch in remission from a Efavirenz (EFV) containing regimen to a Tenofovir (TDF) containing regimen – a two cases report  
*Sixth International Congress on Drug Therapy in HIV Infection*, Glasgow (UK); Nov. 2002:P5

Ehret R., Braun P., Wiesmann F., Knechten H.  
Detektion Resistenz-assoziiierter Mutationen bei therapienaiven Patienten nach Präselektion durch den HIV-Therapeuten  
*European Journal of Medical Research*, (2003); Vol **8** (sup 1):78

M. Helm, H. Walter, R. Ehret, B. Schmidt, K. Korn, M. Kurowski, H. Knechten, P. Braun  
Vergleich der Vorhersagekraft verschiedener HIV-Resistenz-Interpretationssysteme hinsichtlich des Therapieansprechens  
*European Journal of Medical Research*, (2003); Vol **8** (sup 1): 8

H. Knechten, C. Höhn, M.O. Yun-Kremer, R. Ehret, P. Braun, M. Knickmann und die NÄAGNO Studiengruppe  
Virologisch Medizinisches Qualitätsmanagement- Analyse zur Therapieeffektivität von und für HIV Schwerpunktpraxen in NRW  
*European Journal of Medical Research*, (2003); Vol **8** (sup 1)::92

## 9. Danksagung

Mein persönlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Christian Jassoy für die Überlassung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes, für sein großes Interesse an dieser Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die ausdauernde Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Kreft danke ich für die Übernahme des Korreferats meiner Arbeit und sein Engagement.

Herrn Prof. Dr. V. ter Meulen danke ich für seine großzügige Unterstützung meiner Arbeit.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, alle Mitarbeiter der Nachbargruppen und des ganzen Institutes für Virologie und Immunologie, im Besonderen an Ingeborg Euler-König (auch für das nicht selbstverständliche Asyl), Dr. Martin Heinkelein, Dr. Sieghart Sopper und Dr. Stephan Niewisk, die alle bei Fragen und für Diskussionen immer zur Verfügung standen und mich unterstützt haben.

Ebenfalls danken möchte ich meinem jetzigen Arbeitgeber Dr. Heribert Knechten und Mechthild Knickmann für die geleistete Unterstützung und Freistellung zur endgültigen Fertigstellung dieser Arbeit.

Danke Werner.

## 10. Lebenslauf

Name	Robert Ehret
Anschrift	Riehler Straße 51 50668 Köln
Geburtsdatum	27.01.1966
Geburtsort	Gelsenkirchen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Aug. 1972 – Juni 1976	Grundschule an der Devensstraße, Gelsenkirchen-Horst
Aug. 1976 – Juni 1985	Leibniz-Gymnasium, Gelsenkirchen-Buer Abschluß: allgemeine Hochschulreife
Aug. 1985 – Okt. 1987	Anerkennungsverfahren zum Wehersatzdienst und Ersatzdienst in der mobilen Alten und Krankenpflege, Diakoniestation Gelsenkirchen-Mitte
Nov. 1987 – Sept. 1989	Grundstudium der Biologie, Westfälische Wilhemsuniversität Münster
Okt. 1989 – März 1992	Hauptstudium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum
Apr. 1992 – Sept. 1993	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Leitung: Prof. Dr. E. Weiler Thema: Lipoxygenasen, Enzyme des Jasmonatstoffwechsels in differenzierten und undifferenzierten Geweben von <i>Bryonia dioica</i> Jacq.
Apr. 1995 – Jan. 1998	Doktorarbeit am Lehrstuhl für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg Leitung: Prof. Dr. V. ter Meulen Thema: Zytotoxische-T-Lymphozyten (CTL)-vermittelte Zytolyse bei der HIV-Infektion
seit Okt. 2000	Angestellt als Biologe in der Gemeinschaftspraxis Dr. Knechten / Dr. Habets, Aachen