

Aus dem Zentrum für Innere Medizin –
Medizinische Klinik I –
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

**Primäre HIV-1-Infektion: Virologische und immunologische
Korrelate einer endogenen Kontrolle der Virusreplikation**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

Christoph Boesecke

aus Lüneburg

Hamburg 2006

Angenommen von der medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am 28.11.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. J. van Lunzen
Prüfungsausschuss: 2.Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Stellbrink
Prüfungsausschuss: 3.Gutachter: Prof. Dr. A.W. Lohse

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	HIV und AIDS: Epidemiologie	5
1.2	Die primäre HIV-Infektion	6
1.2.1	Das Humane Immundefizienzvirus	6
1.2.2	Der Verlauf der HIV-Infektion	6
1.2.3	Die Behandlung der HIV-Infektion	8
1.3	Zielsetzung der Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Patienten	11
2.2	Blutabnahmen	11
2.3	Isolierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells)	12
2.4	Durchflußzytometrie	13
2.5	Charakterisierung HIV-spezifischer CTL mittels ELISpot	15
2.5.1	Beschichten der Platten	16
2.5.2	Auftauen der Zellen	16
2.5.3	Vorbereiten der Platte	17
2.5.4	Farbreaktion	17
2.6	Bestimmung der Plasmavirämie	18
2.7	HLA-Typisierung	19
2.8	Statistik	19
3	ERGEBNISSE	20
3.1	Hintergrund	20
3.2	Immunologische Ausgangsparameter	21
3.3	Viruslast im Verlauf	23
3.4	Aktivierung und Proliferation von CD8+ T-Zellen	24
3.5	Qualität der CD8-Antwort im ELISpot	26

3.6	Quantität der CD8-Antwort im ELISpot	28
3.7	Serokonversion und CD8-Antwort im ELISpot	29
3.8	Fallbeispiele	31
3.8.1	Patient C1	31
3.8.2	Patient C2	32
3.8.3	Patient NC	33
4	DISKUSSION	35
4.1	Viruslast	36
4.2	CD4+ T-Zellen	37
4.3	CD8+ T-Zellen: Proliferation und Aktivierung	37
4.3.1	KI-67	37
4.3.2	CD25 und HLA-DR	38
4.4	CD8-Antwort: Quantität und Qualität	39
4.5	Abhängigkeit des set point levels vom Stadium der Serokonversion und genetischen Determinanten	41
4.6	Schlussfolgerungen	42
5	ZUSAMMENFASSUNG	44
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	46
7	LITERATURVERZEICHNIS	47
8	DANKSAGUNG	57
9	LEBENS LAUF	58
10	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	59

1 Einleitung

1.1 HIV und AIDS: Epidemiologie

Die Zahl der mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) infizierten Menschen hat im Verlauf des letzten Jahrzehnts pandemische Ausmaße angenommen; der weltweite Kampf gegen AIDS ist damit zur größten, nicht nur medizinischen Herausforderung des 21. Jahrhunderts avanciert.

Die Zahl der Menschen, die Ende 2005 mit HIV/AIDS lebten, hat laut UNAIDS/WHO Statusbericht vom Dezember mit 38,6 Millionen die Prognosen von 1992 um über 50% übertroffen (93). Allein im Jahr 2005 haben sich weltweit 4,1 Millionen Menschen neu infiziert (davon in Deutschland 2.600 (80)), über 3 Millionen sind an ihrer Immunschwäche verstorben (davon in Deutschland 750 (80)). Das entspricht in etwa 17.000 Neuansteckungen und fast 9.000 Toten pro Tag.

Da jahrelange, intensive Forschung bisher nicht zur Entwicklung einer Schutzimpfung geführt hat und in naher Zukunft laut Experten auch nicht zu erwarten ist, verbleiben als einzige Möglichkeiten, die Epidemie einzudämmen, die lebenslange medikamentöse Therapie und die Aufklärung der Betroffenen und gesunden Bevölkerung, vor allem aus Risikogruppen. In Uganda konnte durch diese Strategie der Kondom-Verbrauch bei jungen Frauen verdoppelt und damit die Infektionsrate deutlich vermindert werden (93). In einigen Teilen Afrikas und Asiens konnte durch Gabe einer Einzeldosis Nevirapine die Übertragungsrate von der Mutter auf das Kind unter der Geburt halbiert werden (36). In Brasilien werden Patienten mit generischen (ohne die Lizenz der Patenthalter produzierten) Medikamenten kostenlos behandelt (2,9).

1.2 Die primäre HIV-Infektion

1.2.1 Das Humane Immundefizienzvirus

Die Struktur und der Replikationszyklus des HIV-1 als einem Prototypen der humanpathogenen Lentiviren (Retroviren) waren in den vergangenen Jahrzehnten Gegenstand intensivster Forschung. Das Virus besteht aus einer Doppelstrang-RNA und insgesamt 15 Proteinen, die auf einen Kern, eine Hülle, weitere Enzyme und Proteine entfallen. Der primäre Rezeptor für HIV ist das Oberflächenmolekül CD4. Das virale Hüllprotein gp120 bindet CD4 mit hoher Affinität und ermöglicht somit nach zusätzlicher Bindung eines Co-Rezeptors (CCR-5, CXCR-4) die Infektion von hauptsächlich T-Helfer-Zellen und Monozyten/Makrophagen. Zentrales Enzym bei der weiteren Prozessierung, insbesondere der RNA/DNA, in der Wirtszelle ist die reverse Transkriptase (48).

1.2.2 Der Verlauf der HIV-Infektion

Das Hauptmerkmal der Infektion mit dem HI-Virus ist der fortschreitende CD4+ T-Zell-Verlust. Die Virus-Replikation findet dabei hauptsächlich im lymphatischen Gewebe statt, überwiegend in CD4+ T-Lymphozyten der Keimzentren, die in der chronischen Phase hyperplastisch und mit CD8+ T-Zellen infiltriert sind (45,90,92).

Die HIV-Infektion wird klinisch in vier Phasen unterteilt: Die akute oder Primärinfektion (PHI), die klinisch asymptomatische Phase, die symptomatische Phase, in der erste HIV-assoziierte Erkrankungen auftreten, und AIDS (Syndrom der erworbenen Immundefizienz), das durch den Ausbruch verschiedener opportunistischer Infektionen gekennzeichnet ist. Dabei handelt es sich überwiegend um die Reaktivierung endogener Erreger (z.B. CMV, TB, Pneumocystis carinii, Toxoplasma gondii).

Die PHI-Phase wird in der Mehrzahl der Fälle von einem häufig verkannten akuten viralen Syndrom begleitet mit Symptomen wie Fieber, Halsschmerzen, Lymphknotenschwellungen, einem nicht juckenden Exanthem an Stamm und Gesicht, Durchfall und Gewichtsverlust (51). In dieser Phase besteht ein ausgeprägter CD4+ T-Zell-Verlust und eine hohe Plasmavirämie. Diese selektive

Depletion HIV-spezifischer CD4+ T-Zellen im MALT führt zu qualitativen Defekten im Immunsystem (12,92). Im weiteren Verlauf hin zu einer chronischen Infektion steigen die CD4+ T-Zellzahlen wieder an, und die initial sehr hohe Viruslast pegelt sich auf einem niedrigeren Niveau ein (48,76). Diese Abnahme erfolgt zeitgleich mit dem Einsetzen der HIV-spezifischen CTL-Antwort. Etwa zeitgleich wird der humorale Arm der Immunantwort aktiviert. Dieser Prozeß der Serokonversion ist am Ende der vier bis acht Wochen dauernden Primärinfektion zu beobachten.

Die asymptomatische Phase ist durch sinkende CD4+ T-Zellzahlen und eine andauernde Virusreplikation im lymphatischen Gewebe gekennzeichnet, die im Blut zu einem interindividuell unterschiedlichen Niveau der Virämie („set point“) führt. Während dieser Phase können bei den meisten Patienten sowohl ausgeprägte CTL-Antworten gegen HIV-Proteine als auch neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass in sogenannten „long term non progressors“ (LTNP) und bei einigen Patienten, die während der Primärinfektion behandelt wurden, robuste HIV-spezifische T-Helfer-Zell-Antworten messbar sind (81,82), die bei Patienten mit einer voranschreitenden Immunschwäche (sog. Progressors) in dieser Ausprägung nicht zu finden sind (17,33).

Die symptomatische Phase mit Übergang zu AIDS ist von einer tiefen Immunsuppression geprägt. Die Virusreplikation steigt unkontrolliert an und es kommt zu einem progredienten Verlust von HIV-spezifischen CD4+ T-Zellen im peripheren Blut und im GALT (Lymphatisches Darmgewebe) (65a). Opportunistische Infektionen sowie bestimmte maligne Proliferationen (z.B. Non-Hodgkin-Lymphome, Kaposi-Sarkome) können nicht mehr kontrolliert werden. Das Vollbild der AIDS-Erkrankung führt unbehandelt innerhalb kurzer Zeit zum Tod.

Schon früh konnte gezeigt werden, dass die HIV-Infektion zu einer Aktivierung des gesamten Immunsystems mit einem daraus resultierenden erhöhten T-Zell-Umsatz führt, die sich unter Therapie zurückbildet. Dieser erhöhte Umsatz an T-Zellen ist durch ein Missverhältnis von Verbrauch zu Regeneration gekennzeichnet (12, 25, 32).

In der akuten Infektion ist die CTL-Antwort meistens gegen weniger Epitope gerichtet als in der chronischen Infektion, da in dieser Phase die Diversifizierung des Virus noch nicht so weit fortgeschritten ist (4). Diese Entwicklung der CTL nach einem

scheinbar vorbestimmten Muster wurde in einer weiteren Studie primär infizierter Patienten bestätigt (99). Mit fortschreitender Erkrankung und Verringerung der Viruslast unter antiretroviraler Therapie nimmt die Stärke der CTL-Antwort wieder ab (6,35,52), was darauf hindeutet, dass die Stärke der CTL-Antwort von der Viruslast mitbestimmt wird (12,15,27,69). Das heißt, eine messbare CTL-Antwort hängt von der Antigenpräsenz ab.

Auch HIV-spezifische T-Helfer-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen HIV (51a) und sind vornehmlich in LTNPs (81,82, 97a), aber auch bei chronisch Infizierten nachweisbar (79). Walker et al. konnten eine negative Korrelation zwischen der T-Helfer-Zellzahl und der Plasmavirämie (81) sowie eine positive Korrelation zwischen diesen Zellen und der HIV-spezifischen CTL-Antwort zeigen (51b).

Ergänzend wiesen Pantaleo et al. ein Zustandekommen funktioneller CTL-Antworten nur beim Vorhandensein dual IFN-gamma und IL-2 sezernierender CD8⁺ T-Zellen nach, unabhängig von der T-Helfer-Zell-Präsenz (101).

1.2.3 Die Behandlung der HIV-Infektion

Durch die Einführung von nukleosidanalogen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) und nachfolgend von Proteasehemmern (PIs) und Nicht-Nukleosidanalogen-RTIs (NNRTIs) konnten Morbidität und Mortalität massiv gesenkt werden (16,75). Mit der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapien (HAART), der Kombination von drei oder mehr Medikamenten aus mindestens zwei Substanzklassen, wurde eine rasche und teilweise über Jahre anhaltende Senkung der Plasmavirämie auf Werte unterhalb der Nachweisgrenzen der verfügbaren Assays erreicht (37,65,83). Einhergehend mit der Unterdrückung der Virusreplikation kommt es zu einem signifikanten Anstieg der CD4⁺ T-Zellzahlen (10,37), auch bei Patienten mit sehr niedrigen Ausgangswerten (39,64). Die anfängliche Hoffnung, HIV mit Hilfe solcher Therapieansätze innerhalb von nur zwei bis drei Jahren eradizieren zu können (78), erfüllte sich jedoch nicht.

Seit einigen Jahren wird auch versucht, außer den klassischen Zielproteinen RT und Protease andere virale Komponenten zu hemmen. So gibt es bereits Substanzen, die den Co-Rezeptor CCR5 auf den Zellen blockieren (CCR5-Hemmer) oder an

Virusproteine binden und somit die Infektion der Zelle mit HIV behindern („Entry-Inhibitoren“). Sogenannte Budding-Blocker stören die Ausschleusung der reproduzierten HI-Viren aus der infizierten Zelle (50). Eine weitere Substanzgruppe, die kurz vor der Zulassung steht, sind die Integrasehemmer.

Immunologisches oder virologisches Therapieversagen, körperliche und psychische Nebenwirkungen, Medikamentenunverträglichkeit und eine schlechte Therapieadhärenz können im klinischen Alltag Gründe für einen Abbruch der Therapie für einige Wochen, Monate oder gar Jahre sein.

Strukturierte Therapieunterbrechungen werden jedoch auch im Zusammenhang mit der Ausbildung oder Verstärkung einer HIV-spezifischen Immunität untersucht, nachdem Fälle wie der sogenannte „Berlin-Patient“ bekannt wurden (60). Dieser konnte nach der Erstbehandlung während der Primärinfektion und nachfolgenden krankheitsbedingten Therapieunterbrechungen über Jahre ein virologisches set point level unterhalb von 500 RNA-Kopien/ml halten, dies ohne ART und bei stabilen CD4+ T-Zellzahlen.

Folgeuntersuchungen zeigten jedoch bald, dass es sich bei Patienten mit endogener Kontrolle der Viruslast um anekdotische Fälle handelte, die entweder in der akuten Phase der HIV-Infektion (PHI) (60,73,82,95a) oder bei initial sehr niedriger Viruslast behandelt wurden (95). Bei der überwältigenden Mehrheit der Patienten, die erst während der chronischen Infektion behandelt wurden, gab es trotz teilweise jahrelanger Unterdrückung der Viruslast auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze innerhalb von Tagen oder Wochen nach Absetzen der Therapie einen ausgeprägten viralen „Rebound“ (18,25,32,40,44,67,77,84) auf prätherapeutische Werte (41). In den meisten Fällen wurden einhergehend mit dem Anstieg der Viruslast auch eine erneute CD4+ T-Zell-Abnahme sowie der Anstieg verschiedener Aktivierungsparameter beobachtet. Es kommt also frühzeitig während der Infektion zu einem selektiven Immundefekt, insbesondere der HIV-spezifischen T-Zellen, der durch ART nicht mehr reversibel gemacht werden kann.

Im Affenmodell konnte später gezeigt werden, dass STI (strukturierte Therapieunterbrechungen) bei der Behandlung der frühen Infektion zu einer verbesserten Kontrolle der Viruslast führen können, die durch eine verstärkte virus-spezifische CTL-Antwort vermittelt wird (89). Auch im Menschen konnte mit Anstieg

der Viruslast teilweise eine Erhöhung der HIV-spezifischen CTL beobachtet werden (30,77,82,85). Diese ging aber nur in wenigen Fällen auch mit einer verbesserten Viruskontrolle einher (82).

Daher sind die Möglichkeiten und der Einsatz von (endogenen) Vakzinierungen als zusätzliche, zukünftige Behandlungsstrategie ein bedeutender Bestandteil der HIV-Forschung.

Nach Rosenberg et al. ist der zunehmende Virus-Kontrollverlust im Verlauf der Infektion auf funktionelle Defizite der HIV-spezifischen CD8+ T-Zellen zurückzuführen. Dieser Defekt könne durch Stimulierung der HIV-spezifischen T-Helferzell-Antwort behoben werden. Diese Stimulierung gelänge in vitro durch Zugabe autologer, während der Serokonversionsphase konservierter CD4+ T-Zellen und in vivo durch eine Impfung mit HIV-Peptid-codierender DNA (59a).

Douek et al. zeigten, dass eine Impfung mit SIV-Peptid-codierender DNA vor dem großen Verlust an HIV-spezifischen CD4+ T-Gedächtniszellen im Darm (GALT) während der primären HIV-Infektion schützen kann (65b). Kelleher et al. wiesen nach, dass dieser selektive Untergang an CD4+ T-Gedächtniszellen dem Vorhandensein bestimmter Moleküle (CCR-5, CD127, CTLA-4) auf der CD4+ Zelloberfläche geschuldet ist, die damit eine Infektion der Zelle begünstigen (99a).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, immunologische und genetische Parameter zu charakterisieren, die mit der endogenen Kontrolle der Virusreplikation durch HIV-spezifische Immunantworten nach primärer HIV-Infektion (PHI) assoziiert sind.

Dabei soll der immunologische Einfluß eines frühzeitigen Beginns einer antiretroviralen Therapie und strukturierter Therapieunterbrechungen (STI) auf eine mögliche endogene Kontrolle der Virusreplikation nach primärer HIV-Infektion näher beleuchtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die Untersuchungen erfolgten an Materialien von Patienten in der Serokonversionsphase der HIV-Infektion, die in Zusammenarbeit mit Dr. Heiko Jessen in Berlin rekrutiert wurden. In die Studie eingeschlossen wurden 20 homosexuelle Männer im Alter zwischen 22 und 38 Jahren, die folgende Kriterien erfüllen mussten:

- PHI-Symptomatik und/oder
- Negativer HIV-Antikörper-Test (ELISA) in der Vorgeschichte (>6 Monate)
- Positiver Virus-Nachweis mittels PCR

Alle Teilnehmer wurden unverzüglich mit einer hochaktiven, antiretroviralen Therapie behandelt (HAART). Über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr wurde eine medikamentöse HIV-Therapie mit strukturierten, Viruslast-gesteuerten Therapieunterbrechungen (STI) durchgeführt. Das heißt, nachdem die HI-Viruslast (VL) im peripheren Blut unter der Nachweisgrenze von 50 RNA-Kopien/ml lag, erfolgte eine Therapiepause. Sobald die Viruslast die Grenze von >5000 RNA-Kopien/ml (s. Walker et al. (53)) überschritt, begann ein neuer Therapiezyklus. Um zu gewährleisten, dass die Viruslast nach Absetzen von HAART während der STI ihren individuellen „set point level“ erreicht hatte, musste die 2.STI von mindestens dreimonatiger Dauer sein.

2.2 Blutabnahmen

Es wurden Blutproben an Baseline (Tag 0), am Ende jedes Therapieblocks und am Ende jeder Therapiepause genommen. Zu allen Zeitpunkten wurde die Anzahl der Lymphozyten-Subpopulationen (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen, HLA-DR+ T-Zellen und CD45RA+ CD4+ T-Zellen) aus frischem Blut bestimmt. Zusätzlich wurden PBMC aus ca. 30ml Blut isoliert und kryokonserviert. Daraus erfolgten Analysen der Plasmaviruslast, T-Zellzahlen,

Aktivierung und Proliferation der Lymphozyten sowie der HIV-spezifischen CTL-Antworten im peripheren Blut.

2.3 Isolierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells)

PBMC wurden aus Vacutainer CPT™ Cell Preparation Tubes, die Natriumcitrat als Antikoagulant enthielten, mittels Dichte-Gradientenzentrifugation isoliert. Diese Röhren wurden gewählt, um eine standardisierte Form der Isolierung zu gewährleisten und um die Möglichkeit zu haben, aus dem Plasma nachträglich die Viruslast zu bestimmen (dieser Test wird für heparinisertes Blut nicht empfohlen).

Pro Patient wurden 3 bis 5 Röhren à ca. 8 Milliliter venösen Bluts prozessiert.

Die CPTs wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 1600xg (3000 Upm) zentrifugiert. Dabei entsteht wie bei einer klassischen Ficoll-Separation eine Lymphozytenschicht, die im Fall der CPT-tubes durch ein Gel von den dichteren Erythrozyten getrennt wird, während das Plasma im Überstand verbleibt. Von dem Plasma wurden je 2 ml in 3 Nunc Kryoröhren eingefroren. Die auf dem Gel liegenden Lymphozyten wurden in ein 50ml-Polypropylenröhrchen überführt und die CPTs mit je 8 bis 10ml PBS gewaschen, um noch anhaftende Zellen zu ernten. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 400xg (1500 Upm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 4.5ml RPMI resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Bei weniger als 25 Millionen Zellen wurden diese auf 5 Einfrieröhren verteilt, bei mehr à 5 Millionen/Röhren eingefroren. Nach Zugabe der gleichen Menge Einfriermediums wurden die Zellen zügig in 1.8ml-Aliquots auf zuvor beschriftete Kryoröhren verteilt und in einer Kryobox bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium:

30% RPMI

30% Plasma-Expander (Gelifundol)

20% FCS

20% DMSO

	Firma	Katalognummer
Vacutainer CPT	Becton Dickinson	16549
Zentrifuge	Sigma 3K-1	
5ml-Pipette serologisch	Falcon	35 6543
10ml-Pipette serologisch	Falcon	35 6551
25ml-Pipette serologisch	Falcon	35 6525
Cryotube 1.8ml	Nunc	377 267
50ml-Polypropylenröhrchen	Falcon	35 2070
PBS	GibcoBRL	14190-094
RPMI	GibcoBRL	21875-034
FCS	HyClone	CH30160.03
Gelifundol	Biotest	184.190-09
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka	41640
Cryobox	Stratagene	

2.4 Durchflußzytometrie

PBMC wurden bei 37°C aufgetaut und zu 12ml kaltem FACS-Puffer in einem 15ml-Falcon-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden bei 4°C für 6 Minuten bei 400g (1500Upm) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in [(Anzahl der Färbungen-1) x100] µl FACS-Puffer aufgenommen und auf Eis aufbewahrt. Die jeweiligen Antikörper-Kombinationen wurden als Gebrauchslösung hergestellt und für mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt. Es wurden - bis auf Ki-67 - ausschliesslich direkt fluoreszenzgekoppelte monoklonale Antikörper verwendet. Pro Färbung wurden 2.5µl der APC- und 7.5µl der FITC-, PE- und PerCP-Antikörper von Becton Dickinson eingesetzt, von TCR-APC 2µl und von den restlichen Antikörpern 5µl. Für die extrazelluläre Färbung wurden 100ul der jeweiligen Antikörper-Stammlösung in FACS-Röhrchen vorgelegt, je 100µl Zellsuspension zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert, dann mit 2 ml kaltem PBS versetzt und bei 4°C für 5 Minuten bei 400xg abzentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten unter diesen Bedingungen. Die Zellen wurden dann fixiert: die extrazellulär gefärbten mit 300µl 2% PFA/PBS und die intrazellulär zu färbenden mit 500µl 2% PFA. Für die Färbung der intrazellulären Antigene wurden

die Zellen nach 20 Minuten Fixierung im Kühlschrank bei 2000xg abzentrifugiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte durch Zugabe von 500µl Permeabilisierungspuffer (PP) und eine weitere Zentrifugation. Die Zellen wurden dann in 100µl PP aufgenommen, mit je 5µl Ki-67-FITC versetzt und für 20 Minuten im Kühlschrank gefärbt. Nach Zugabe von 2ml Waschpuffer wurden die Zellen für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann abzentrifugiert. Es folgten ein Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer und einer mit 750 µl BSA-Puffer, dann wurden die Zellen mit 300 µl 1% PFA fixiert und gemessen.

Für die Einstellung der Kompensation am Durchflußzytometer wurden je ca. 50 µl Zellsuspension in fünf Röhrchen überführt und mit einer Isotypkontrolle oder jeweils einem einzelnen Antikörper in jeder der vier Farben gefärbt.

Die Messungen erfolgten an einem FACSCalibur™. Es wurden, soweit möglich, jeweils 40.000 CD3⁺ T-Zellen im lifegate gemessen oder 20.000 CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen.

Pufferlösungen:

FACS-Puffer

2% FCS
0.1% Azid
in PBS

Waschpuffer

0.3% Saponin
0.1% BSA
0.1% Azid
in PBS

Permeabilisierungspuffer (PP)

0.1% Saponin
0.1% BSA
0.1% Azid
in PBS

BSA-Puffer

0.1% BSA
0.1% Azid
in PBS

Verwendete Materialien und Antikörper:

	Firma	Katalognummer
15ml Röhrchen	Falcon	35 2096
FACS-Röhrchen	Falcon	35 2052
10x PBS	GibcoBRL	14200-067
FCS	HyClone	CH30160.03
Saponin	Sigma	S-7900
BSA	Sigma	B-4287
Natriumazid	Merck	1.06688.0100
Paraformaldehyd	Serva	31628

□CD3-PerCP	Becton Dickinson	347 344
□CD3-APC	Becton Dickinson	340 440
□CD4-PerCP	Becton Dickinson	347 324
□CD4-FITC	Becton Dickinson	340 133
□CD4-PE	Becton Dickinson	347 327
□CD4-APC	Becton Dickinson	340 443
□CD8-PerCP	Becton Dickinson	347 314
□CD8-FITC	Becton Dickinson	347 313
□CD8-PE	Becton Dickinson	340 046
□CD14-FITC	Becton Dickinson	347 493
□CD19-PE	Becton Dickinson	349 209
□CD25-PE	Becton Dickinson	345 797
□CD28-PE	Becton Dickinson	348 047
□CD38-APC	Becton Dickinson	340 439
□CD45RA-PE	Pharmingen	31265X
□CD45R0-FITC	Pharmingen	31304X
□CD45R0-APC	Becton Dickinson	340 438
□CD62L-FITC	Cymbus Biotechnology	CBL 523F
□CD69-PE	Becton Dickinson	347 827
□CD95-FITC	Becton Dickinson	340 479
□CD122-PE	Becton Dickinson	340 254
□CD103-PE	DAKO	R7188
□HLA-DR-PE	Becton Dickinson	347 367
□CCR5-PE	Pharmingen	36465X
□CXCR4-APC	Pharmingen	36199X
□□□□/ □ TCR-APC	Pharmingen	555718
□Ki-67-FITC	DAKO	F0053

2.5 Charakterisierung HIV-spezifischer CTL mittels ELISpot

Um zu analysieren, gegen welche Epitope von HIV spezifische CTL vorhanden sind, wurden ELISpots eingesetzt, da mit dieser Methode eine große Anzahl an Peptiden getestet werden kann (29,57,66,68,87).

Nach HLA-Typisierung der jeweiligen Patienten wurden die jeweils optimalen Peptide eingesetzt. Die Sequenzen dieser optimalen Peptide für den jeweiligen HLA-Typ wurden der Los Alamos Immunology Database entnommen (28,www.hiv-web.lanl.gov/content/immunology/tables/ctl_summary.html).

2.5.1 Beschichten der Platten

Für die ELISpots wurden 96-Well-Filterplatten mit dem α -IFN- α -Antikörper 1-DK1 (dem „ersten“ oder sogenannten „Fang“(capture)-Antikörper) beschichtet. Dazu wurde der Antikörper 1:2000 in PBS verdünnt (Endkonzentration 0.5 μ g/ml) und je 100 μ l in die wells verteilt. Die Platten wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert und dort gelagert.

	Firma	Katalognummer
Multiscreen [®] -IP sterile Platten	Millipore	MAIPS4510
0.45 μ m		
α -IFN- α -Antikörper 1-DK1	Mabtech AB	3420-3-21
PBS	GibcoBRL	14190-094
elektronische Multikanalpipette		

2.5.2 Auftauen der Zellen

PBMC wurden bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml-Röhrchen mit 12 ml R10 überführt. Die Einfrierröhrchen wurden mit 1 ml R10 gewaschen. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 1500 Upm abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Pellets wurden in 10 ml 37°C warmem R10 resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Pellets erneut in 10 ml warmem R10 aufgenommen und für einige Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Die Zellen wurden vor dem Zählen 1:10 in PBS verdünnt und mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellzahl wurde dann auf 1x10⁶/ml eingestellt.

R10

RPMI

10% FCS

1:100 Hapes-Puffer

1:100 PenStrep

	Firma	Katalognummer
15ml Röhrchen	Falcon	35 2096
RPMI	GibcoBRL	21875-034
FCS	HyClone	CH30160.03
Hepes-Puffer 1M	GibcoBRL	15630-056
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL	15070-063
Trypanblau-Lösung 0.4%	GibcoBRL	15250-061

2.5.3 Vorbereiten der Platte

Die Platten wurden mit einer elektronischen Multikanalpipette mit 200 µl PBS / 1% FCS pro Well sechsmal gewaschen. Dies erfolgte durch Befüllen und nachfolgendes Ausschlagen der Platte. Nach dem letzten Ausschlagen wurden die Wells mit 30 µl R10 befüllt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die gewaschenen Platten wurden mit je 10 µl der ausgewählten Peptide und nachfolgend mit je 100 µl Zellsuspension (\equiv 100.000 Zellen) befüllt und über Nacht, mindestens aber für 12 Stunden, bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Negativkontrolle wurde nur mit Zellen befüllt, die Positivkontrolle mit 10 µl PHA.

	Firma	Katalognummer
Peptide 200µg/ml	MGH EMC	nicht käuflich
Stocklsg:2mg/ml10%DMSO/RPMI		
PHA , 25µg/ml in R10	Sigma	L-9132

2.5.4 Farbreaktion

Die Platten wurden nach der Inkubation wie oben sechsmal mit PBS gewaschen und mit 100µl des zweiten, biotinylierten α -IFN- α -Antikörpers 7-B6-1 (1:2000 in PBS verdünnt, Endkonzentration 0.5 µg/ml) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer bis anderthalb Stunden wurde die Platte erneut sechsmal mit PBS gewaschen und mit 100 µl 1:2000 in PBS verdünnter Streptavidin-alkaliner Phosphatase im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 45 Minuten wurde die Platte sechsmal gewaschen und 100 µl der Substratlösung zugegeben. Diese wurde frisch mit 1:100 NBT und 1:100 BCIP in Tris-Puffer (s.u.) angesetzt. Die Farbreaktion lief bei Raumtemperatur

für ca. 10 bis 20 Minuten, bis die entstehenden spots sich dunkelblau gefärbt hatten. Die Platte wurde dann ausgeschlagen und mit 200 µl PBS /Tween inkubiert. Nach 10 Minuten wurde die Platte mit Wasser gründlich gespült und trocken gelassen. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln, um ein Verblässen der Punkte zu verhindern. Die Auszählung erfolgte frühestens 24 Stunden später manuell unter dem Mikroskop. Dabei wurde pro Well ein Hintergrund von 50 SFC (spot forming cells) pro 10⁶ eingesetzter Zellen abgezogen.

Tris-Puffer pH9.5

0.1M Tris

0.5mM MgCl₂*6H₂O

PBS /Tween

0.05% Tween20 in PBS

BCIP

15mg BCIP in 1ml DMF

NBT

30mg NBT in 1ml 70% DMF

	Firma	Katalognummer
PBS	GibcoBRL	14190-094
IFN- α -Antikörpers 7-B6-1 Biotin	Mabtech AB	3420-6-13
Streptavidin-alkaline Phosphatase	Mabtech AB	3310-8
5-bromo-4-chloro-indolylphosphat (BCIP)	Bio-Rad	170-6532
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Bio-Rad	170-6539
Dimethylformamid (DMF)	Sigma	D4551
Tris	GibcoBRL	15504-020
MgCl ₂ *6H ₂ O	Merck	5833
Tween20	Merck	822184

2.6 Bestimmung der Plasmavirämie

Die Bestimmung der Viruslast im Plasma erfolgte mittels Roche Amplicor PCR Version 3.0, bei Werten oberhalb des linearen Messbereichs im Verdünnungsansatz.

2.7 HLA-Typisierung

Die Bestimmung der HLA-Klasse-I-Oberflächenantigene erfolgte serologisch durch Nachweis von Komplement-vermittelter Zytotoxizität von HLA-Antiseren, Doppelfluoreszenz-Färbung mit Carboxy-Fluorescein und Ethidiumbromid. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskop.

2.8 Statistik

Aufgrund der sehr geringen Fallzahl und der damit verbundenen eingegrenzten Aussagekraft der Ergebnisse wurde auf eine umfassende, statistische Auswertung verzichtet. Die Berechnung der Mittelwerte und Mediane erfolgte mittels Excel von Microsoft Office.

3 Ergebnisse

3.1 Hintergrund

An der Studie nahmen ursprünglich 20 Patienten teil. 5 von ihnen schieden während des Untersuchungszeitraums aufgrund mangelnder Compliance aus, so dass die Daten von 15 Patienten in die Auswertung eingehen.

Die überwiegende Mehrheit aller 15 Patienten litt zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses unter einer Akutsymptomatik im Rahmen ihrer frischen HIV-Infektion (PHI). Alle Teilnehmer hatten anamnestisch in ihrer Vorgeschichte (>6 Monate) einen negativen HIV-Antikörper-Test (ELISA) vorzuweisen. Ebenso gelang zu diesem Zeitpunkt der Nachweis des HI-Virus in den 15 Patientenseren mittels PCR (s. Abb. 3.2.1).

Alle Teilnehmer wurden unverzüglich mit einer hochaktiven, antiretroviralen Therapie behandelt (HAART). 8 Patienten erhielten ddi, EFV und NFV (vor 1.STI) bzw. ABC (nach 1.STI), die restlichen 7 Patienten wurden mit AZT/3TC und LPV/r behandelt.

8 Patienten bekamen zusätzlich Hydroxyurea 500-1000mg/d. In der ausführlich untersuchten Gruppe konnte jedoch bei keinem der diversen Parameter ein auffälliger Unterschied zwischen der mit Hydroxyurea (HU) behandelten und der Gruppe, die ausschließlich die Dreifachkombination bekam, festgestellt werden, wie auch von D. Cooper et al. beschrieben (13a). Es wird daher bei der Darstellung der einzelnen Verläufe nicht mehr explizit darauf hingewiesen.

Über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr wurde eine medikamentöse HIV-Therapie mit strukturierten, Viruslast-gesteuerten Therapieunterbrechungen (STI) durchgeführt. Das heißt, nachdem die HI-Viruslast (VL) im peripheren Blut unter der Nachweisgrenze von 50 RNA-Kopien/ml lag, erfolgte eine Therapiepause. Sobald die Viruslast die Grenze von >5000 RNA-Kopien/ml überschritt (s. Walker et al. (53)), begann ein neuer Therapiezyklus.

Analysen erfolgten vor Therapiebeginn, am Ende jedes Therapieblocks und am Ende jeder Pause.

Nach 2 Pausen wurde der individuelle, virologische „set point level“ ermittelt; also das Niveau, auf dem sich bei jedem Patienten die Viruslast ohne ART einpendelte. Um zu gewährleisten, dass die Viruslast des jeweiligen Patienten auch tatsächlich den individuellen set point erreicht hatte, hatte die 2. Therapiepause eine Dauer von mindestens 3 Monaten.

Nach Abschluß der Studie und Auswertung der gewonnenen Daten ließen sich die Patienten arbiträr in 2 Gruppen einteilen: Die Gruppe der sogenannten „Controller“ (3 von 15 Patienten) und diejenige der „Non-Controller“ (12 von 15 Patienten). Patienten aus der Controller-Gruppe waren in der Lage, die Menge des HI-Virus in ihrem Blut ohne medikamentöse Unterstützung über einen längeren Zeitraum unter 5.000 RNA-Kopien/ml zu halten (53), den Patienten der Non-Controller-Gruppe gelang es ohne HAART nicht, die Menge der Virusreplikation unterhalb dieser Grenze zu halten; sie lagen zum Teil deutlich darüber.

3.2 Immunologische Ausgangsparameter

Im Folgenden ist die Patientengruppe anhand einiger Parameter zum Zeitpunkt des Studienbeginns („Baseline“) näher charakterisiert worden.

	CD4+T-Zellen (Baseline) /ul	CD8+T-Zellen (Baseline) /ul	Viruslast (Baseline) copies/ml	ELISA Negativ (Baseline)
Alle Patienten n=15	514 (+/- 292)	1046 (+/- 837)	1.868.833 (+/- 1.571.650)	4
Controller n=3	526 (+/- 188)	786 (+/- 381)	1.101.167 (+/- 1.305.272)	1
Non-Controller n=12	511 (+/- 314)	1111 (+/- 912)	2.060.750 (+/- 1.614.803)	3

Tab. 3.2.1: Ausgangsmittelwerte

Bemerkenswert ist, dass sich beide Gruppen in ihren mittleren Ausgangswerten nicht wesentlich voneinander unterscheiden, die Patienten beider Gruppen zu Beginn also im Mittel einen vergleichbaren zellulären Immunstatus hatten.

Im Detail betrachtet ergibt sich bei den CD4+ T-Helferzellen, als einem der Hauptangriffsziele des HI-Virus, keine Differenz zwischen den Gruppen. Die Controller verfügten im Mittel über 526 (Range: 275-661), die Non-Controller über 511 Helferzellen/ul (Range: 175-1201). In beiden Gruppen sind also sowohl Patienten mit relativ hohen als auch mit relativ niedrigen Helferzellwerten enthalten.

Ähnliches gilt für die CD8+ zytotoxischen T-Zellen, die bei fast allen Patienten (11/15) als Antwort ihres Immunsystems auf die frische HIV-Infektion angestiegen sind.

Die Patienten der Controller-Gruppe verfügten im Mittel über 786 CD8+ T-Zellen/ul (Range: 339-1272), diejenigen der Non-Controller-Gruppe über 1111 Zellen/ul (Range: 369-3823), so dass sich auch in Bezug auf diese Zellen in beiden Gruppen ein weites Spektrum fand.

Ein diskreter Unterschied zwischen den Gruppen ergab sich bei der Menge der HI-Viren im peripheren Blut zu Beginn der Untersuchung. Die Controller verfügten im Mittel über 1.101.167 RNA-Kopien pro ml mit Werten zwischen 1.500 und 2.935.000 copies/ml. Bei den Non-Controllern ergaben sich Werte zwischen 17.000 und 5.600.000 cop./ml, der Mittelwert von 2.060.750 cop./ml liegt hier doppelt so hoch. Allerdings muss erwähnt werden, dass bei der Bewertung der Virusmenge im Blut des Patienten sowohl in der akuten als auch später in der chronischen Phase im klinischen Alltag neben den Absolutzahlen vielmehr die relative Höhe – also die log-Stufe – entscheidend ist. Und auch in diesem Punkt ergibt sich zwischen den Gruppen keine entscheidende Differenz (s. Abb. 3.3.1: 6,04 in C vs. 6,31 in NC).

Von den 15 Patienten in der akuten Phase der Serokonversion waren bei insgesamt 4 Patienten noch keine Antikörper gegen HIV mittels ELISA nachweisbar, dies betrifft bei den Controllern 1 Patienten, in der Gruppe der Non-Controller 3 Patienten.

Es sei erwähnt, dass zwar die Mehrzahl, aber nicht alle Patienten die damaligen Kriterien für einen sofortigen Beginn der HAART, nämlich eine Viruslast von >50.000 cop./ml (2 von 15 Patienten haben <50.000 RNA-Kopien) und eine CD4+ Zellzahl von <350/ul (9 von 15 Patienten haben >350 Helferzellen), erfüllten (58).

3.3 Viruslast im Verlauf

Das Hauptkriterium für die Einstufung der 15 Patienten in die Gruppe der Controller oder Non-Controller war die Fähigkeit des Immunsystems des jeweiligen Patienten, nach Absetzen der antiretroviralen Therapie die Menge des HI-Virus im Blut über einen entsprechend langen Zeitraum (Dauer der 2.STI mind. 3 Monate) auf einem niedrigen Niveau, nämlich unterhalb 5.000 RNA-Kopien/ml, halten zu können.

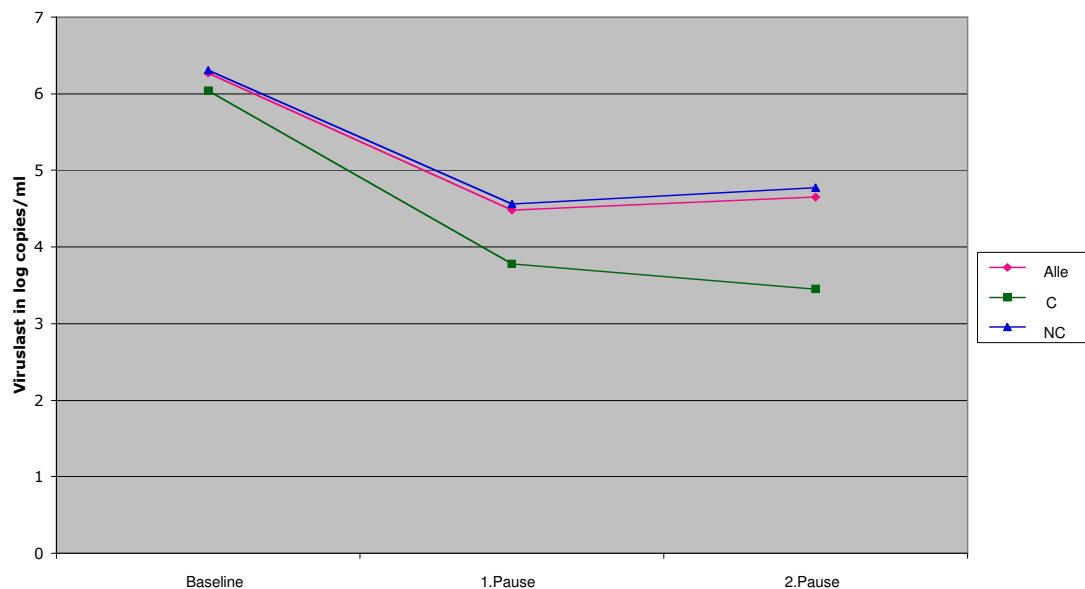


Abb. 3.3.1: Verlauf der Viruslast in log

Dabei ergibt sich bei Betrachtung des Verlaufs der Viruslast folgendes Bild:

Die Viruslast wurde auf der y-Achse in log aufgetragen. So lassen sich Werte, die sich im Verlauf um mehrere Zehnerpotenzen ändern, optisch besser nachvollziehbar darstellen.

Beim Vergleich der Viruslasten zu Beginn und in der 1.Pause lässt sich feststellen, dass allen Patienten durch den ersten ART-Block eine deutliche Reduktion der HI-Viruslast im peripheren Blut gelang. Bei den Non-Controllern gelang ein Abfall um 1,5, bei den Controllern um 2 log-Stufen. In Zahlen ausgedrückt fiel die Viruslast bei allen Patienten von mittleren 1.868.833 cop./ml auf 30.463 cop./ml, bei den Controllern von 1.101.167 auf 6000 cop./ml, bei den Non-Controllern von 2.060.750 auf 35.900 cop./ml (s. Tab. 3.3.1).

Durch den zweiten ART-Block erzielten die Patienten der Non-Controller keine deutliche Verbesserung im Hinblick auf ihre Viruslasten, ihnen gelang in der zweiten Pause kein weiterer Abfall oder gar eine Kontrolle der Virusmenge. In Absolutzahlen betrachtet lag die Viruslast bei 59.005 cop./ml, in der ersten Pause lag sie noch bei 35.900 cop./ml (in log: 4,56 in 1.Pause vs. 4,77 in 2.Pause).

Ein erneuter, geringer Abfall um 0,3 log durch den zweiten ART-Block lässt sich bei den Controllern verzeichnen, ihre Viruslast fiel im Mittel von 6000 cop./ml in der ersten Pause auf 2833 cop./ml in der zweiten Pause (in log: 3,78 in 1.Pause vs. 3,45 in 2.Pause).

	Viruslast (Baseline) copies/ml	Viruslast (1.Pause) copies/ml	Viruslast (2.Pause) copies/ml	Viruslast Median copies/ml
Alle Patienten n=15	1.868.833 (+/- 1.571.650)	30.463 (+/- 34.584)	44.962 (+/- 33.470)	59.000 2.Pause
Controller n=3	1.101.167 (+/- 1.305.272)	6.000 (+/- 5.000)	2.833 (+/- 623)	3.000 set point/2.Pause
Non-Controller n=12	2.060.750 (+/- 1.614.803)	35.900 (+/- 35.969)	59.005 (+/- 26.546)	66.000 2.Pause

Tab. 3.3.1: Viruslastmittelwerte im Verlauf

Die Patienten der Controller-Gruppe erreichten damit ihren „set point“ der Viruslast im Median bei 3.000 cop./ml. Die Non-Controller lagen in dieser Phase bei medianen 66.000 cop./ml.

3.4 Aktivierung und Proliferation von CD8+ T-Zellen

Eines der Hauptmerkmale der HIV-Infektion ist der erhöhte Anteil an proliferierenden CD4+ und CD8+ T-Zellen sowohl in der akuten als auch chronischen Phase der HIV-Infektion. Dieser wird anhand der verstärkten Expression des nukleären Antigens Ki-67 gemessen, das in allen Phasen des Zellzyklus außer der G0-Phase exprimiert wird und somit charakteristisch für proliferierende Zellen ist (34,88).

Abb. 3.4.1 zeigt den Verlauf des Anteils Ki67+CD8+ T-Zellen. Zu Baseline lag mit 21,5% bei den Controllern und 15,5 % bei den Non-Controllern ein deutlich erhöhter Anteil an proliferierenden, zytotoxischen T-Zellen vor. Dieser sank in beiden Gruppen parallel zur Viruslast bis zur 1.Pause auf 10,7% bei den Controllern und auf 3,7% bei den Non-Controllern.

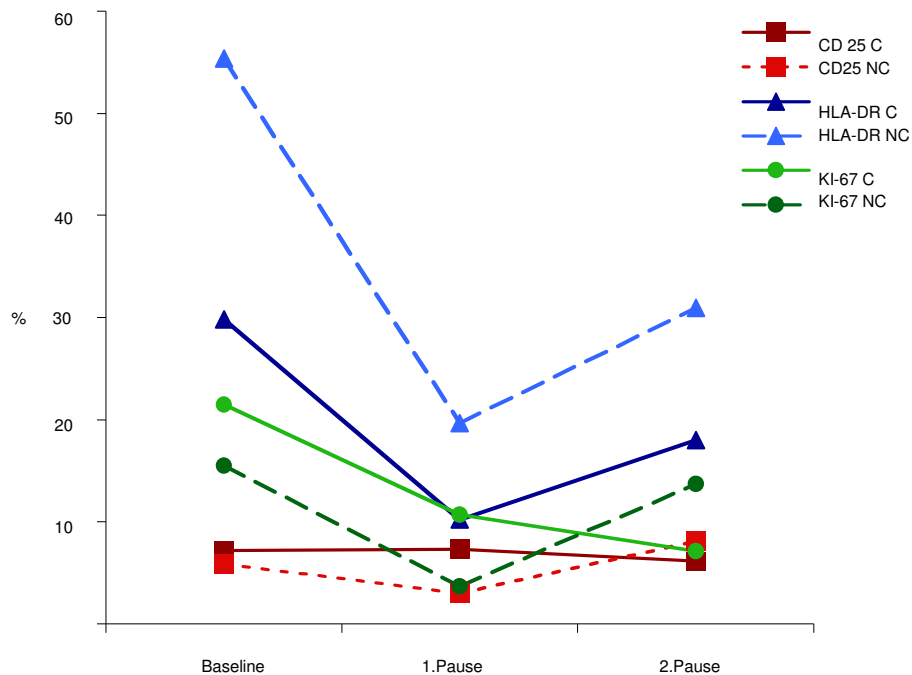


Abb. 3.4.1: Verlauf der Aktivierungsparameter

Im weiteren Verlauf stieg der Anteil bei den Non-Controllern auf 13,7% an, passend zur im Vergleich zur 1.Pause nun wieder höheren Viruslast in der 2.Pause. Bei den Controllern sank der Anteil an Ki67+CD8+ T-Zellen auch hier parallel zur Viruslast weiter ab auf 7,1%.

Zusätzlich zur Proliferation wurden ein früher (innerhalb der ersten 12-24 Stunden) und ein später (innerhalb der ersten 1 bis 2 Tage) Aktivierungsmarker im Verlauf untersucht (1,4,28,32a,43,54a,90).

Die Expression des spät im Rahmen der Aktivierung eines Lymphozyten exprimierten Markers HLA-DR auf CD8+ T-Zellen fiel von Baseline 29,8% (Controller) bzw. 55,4% (Non-Controller) auf 10,2% bei den Controllern und auf 19,7% bei den Non-Controllern in der 1.Pause. Bei beiden Gruppen stieg der Anteil an HLA-DR exprimierenden CD8+ T-Zellen zum Zeitpunkt der 2.Pause wiederum an, auf 30,9%

bei den Non-Controllern und auf 18% bei den Controllern; gegenläufig zur gesunkenen Viruslast.

Der Anteil der frühen Aktivierungsmarker CD25 exprimierender CD8⁺ T-Zellen unterlag sowohl in der Gruppe der Controller als auch der Non-Controller im gesamten Verlauf nur geringen Schwankungen. Ein Zusammenhang z.B. mit der Viruslast ließ sich nicht feststellen.

3.5 Qualität der CD8-Antwort im ELISpot

Die ELISpots dienen der breiten Erfassung der CTL-Antwort, da mit ihnen eine große Anzahl von Peptiden mit einer relativ geringen Zellzahl getestet werden kann. So liefert der ELISpot eine Aussage über die Spezifität der Zelle durch den Nachweis ihrer Fähigkeit, IFN gamma zu produzieren.

Bei den ELISpots wurden acht bis zwölf Aminosäuren lange HLA Klasse I-restringierte Peptide verwendet, die als optimal beschrieben waren, also denen entsprechen, die bei der Infektion einer Zelle bei entsprechender HLA-Restriktion präsentiert werden können.

In Depletionsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IFN gamma nach Stimulation mit HLA Klasse I-Peptiden mehrheitlich auf CD8⁺ T-Zellen beschränkt war (4,7). Es wurden daher unfraktionierte PBMC in diesem Assay eingesetzt, die gleichzeitig auch als Antigen-präsentierende Zellen fungierten. Die so erzielten Ergebnisse wurden als „Punkt-bildende Zellen“ (spot forming cells, SFC) pro Million eingesetzter Zellen angegeben. ELISpots zeigen auch bei gefrorenem Material gute Ergebnisse, so dass PBMCs retrospektiv analysiert werden konnten. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden alle zu einem Zeitpunkt mit verschiedenen Peptiden erhaltenen SFC addiert.

Alle Patienten erkannten zum Zeitpunkt Baseline von allen angebotenen HLA-gematchten Peptiden im Mittel 14,6%. Im weiteren Verlauf generierten alle Patienten noch im Durchschnitt gegen zusätzliche 50,82% aller Peptide eine CTL-Antwort. Insgesamt wurden vom Gesamtkollektiv der Patienten durchschnittlich 65,5% aller eingesetzten Peptide erkannt (s.Tab. 3.5.1).

	WB-Banden (Baseline)	Erkannte Peptide (Baseline) %	Neuerkannte Peptide %	Erkannte Peptide (insgesamt) %
Alle Patienten n=15	4 von 7	14,6	50,82	65,6
Controller n=3	3 von 7	26,7	56,7	83,3
Non-Controller n=12	5 von 7	11,7	49,4	61,2

Tab. 3.5.1: Peptidmittelwerte im Verlauf

Beim Vergleich der beiden Patienten-Gruppen zeigen sich folgende Unterschiede:

1. Die CTL-Antwort der Controller ist bereits zu Baseline breiter als die der Non-Controller: Die Controller erkannten bereits initial 26,7% aller offerierten Peptide, bei den Non-Controllern liegt der Anteil bei 11,7%.
2. Auch mit zunehmender Infektionsdauer bleibt diese Differenz zwischen den beiden Gruppen erhalten: Die Controller konnten während des gesamten STI-Regimes ihre CTL-Antwort gegen die einzelnen Viruspeptide auf durchschnittlich 56,7% erweitern, den Non-Controllern gelang eine Verbreiterung ihrer Immunantwort gegen die HI-Viren auf 49,4%.
3. Am Endpunkt zeichnet sich der prozentual größte Unterschied zwischen den beiden Gruppen ab: Die Controller reagierten auf insgesamt 83,3% der Peptide mit einer CTL-Antwort, bei den Patienten der Non-Controller-Gruppe lösten letztendlich 61,2% der viralen Epitope eine mittels IFN gamma-Ausschüttung messbare Immunreaktion der CD8+ T-Zellen aus.

Interessanterweise gingen mit fortschreitender Infektionsdauer bei fast der Hälfte aller Patienten (7 von 15) Antworten gegen einzelne, früher erkannte Virusepitope verloren. Dabei stand der Verlust einer Reaktion auf das Capsidprotein p24 im Vordergrund. Dies betraf insgesamt 4 Patienten, davon 1 Controller und 3 Non-Controller.

Desweiteren gilt es zu beachten, wie in der 2.Spalte der Tabelle aufgeführt, dass sich die Gruppen untereinander bezüglich ihrer Ausgangsposition in der

Serokonversionsphase ihrer akuten HIV-Infektionen nur geringfügig voneinander unterschieden. Bei den Controllern waren zu Beginn gegen 3, bei den Non-Controllern durchschnittlich gegen 5 Virusbestandteile Antikörper im Western Blot nachweisbar (7 getestete Regionen: gp120, gp160, p24, p31, p55, p66, gp41-43). Im Mittel hatten alle Patienten zusammen genommen gegen 4 von 7 möglichen, im Western Blot getesteten HIV-Antigenen bereits zum Zeitpunkt Baseline Antikörper gebildet.

Dabei sind sowohl in der Gruppe der Controller als auch derjenigen der Non-Controller Patienten repräsentiert, die sich in einer späten oder frühen Phase ihrer Serokonversion befanden, also bereits Antikörper entweder gegen alle getesteten oder aber noch gegen keine der getesteten Regionen gebildet hatten (Range in beiden Gruppen von 0-7 positive Banden im WB).

3.6 Quantität der CD8-Antwort im ELISpot

Neben dem Kriterium der Breite - also der Qualität - der CTL-Antwort gegen HIV ist noch ein zweites notwendig, um die CTL-Antwort umfassend beurteilen zu können: Die Stärke, respektive Quantität.

Diese soll anhand der folgenden Abbildung näher charakterisiert werden.

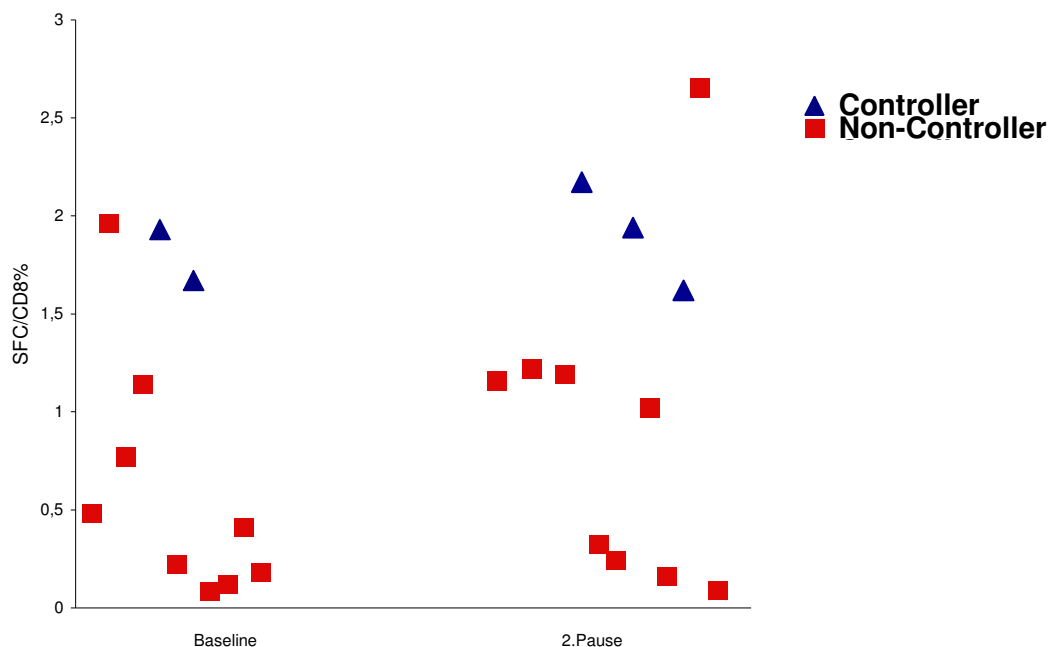


Abb. 3.6.1: Gesamt-CTL-Antworten im Patientenvergleich

Auch in Bezug auf die Stärke der CTL-Antwort ergeben sich zwischen den Gruppen Unterschiede.

Bei den Controllern (blaue Dreiecke) findet sich im Vergleich zu den Non-Controllern (rote Quadrate) sowohl zu Beginn der Untersuchung als auch während der 2. Therapiepause durchschnittlich eine größere Quantität in der CTL-Antwort, das heißt deutlich mehr IFN gamma produzierende CD8+ T-Zellen.

Der Mehrheit aller Patienten ist aber gemein, dass sie ihre einmal erreichte Stärke auch aufrechterhalten bzw. sogar leicht verbessern konnten. Bei den Non-Controllern gelang dies 67%, bei den Controllern allen. Trotz mehrerer Versuche war es nicht möglich, zum Zeitpunkt Baseline bei einem Patienten aus der Controller-Gruppe eine adäquate Reaktion im ELISpot zu erzielen, so dass hier eine Kontamination beim ursprünglichen Einfrieren der Probe vermutet und daher leider auf eine verwertbare Darstellung verzichtet werden mußte.

3.7 Serokonversion und CD8-Antwort im ELISpot

Unabhängig von der Einteilung der Patienten in 2 Gruppen anhand der Höhe der Viruslast im peripheren Blut zum Zeitpunkt der 2. Pause erscheint es ratsam, noch eine Betrachtung der Immunantwort der zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten in Zusammenhang mit dem individuellen Bandenmuster im Western Blot während der Serokonversionsphase vorzunehmen, um die verschiedenen Stadien der Serokonversion, in denen sich die Patienten zu Studienbeginn befanden, ausreichend zu berücksichtigen.

WB-Banden Anzahl	Patienten Anzahl	Erkannte Peptide (Baseline) %	Neuerkannte Peptide %	Erkannte Peptide (insgesamt) %
0-3 von 7 (Frühe Serokonv.)	7	9,5	57,1	66,7
4-7 von 7 (Späte Serokonv.)	8	19,2	45,4	64,6

Tab. 3.7.1: Peptidmittelwerte im Verlauf

7 der insgesamt 15 beobachteten Patienten zeigten zum Zeitpunkt des Studienbeginns 0, 1, 2 oder 3 der 7 möglichen Banden im Western Blot, sogenannte frühe Serokonverter (s. Tab. 3.7.1). Die restlichen 8 Patienten zeigten bereits 4 oder mehr Banden im Western Blot, sogenannte späte Serokonverter.

Erstere erkannten zu Baseline im ELISpot 9,5% aller angebotenen Peptide, Letztere erkannten 19,2%. Im weiteren Verlauf verzeichneten die frühen Serokonverter einen größeren, prozentualen Zuwachs bei der Rate an neuerkannten Peptiden von 57,1% versus 45,4% bei den späten Serokonvertern. Am Ende haben aber im Mittel beide Serokonverter-Gruppen prozentual nahezu den gleichen Anteil an Peptiden erkannt (66,7% vs. 64,6%).

Die verglichen mit den späten Serokonvertern etwas höhere Rate an neuerkannten Peptiden bei den frühen Serokonvertern (57,1% vs. 45,4%) gab Anlaß, die erste Gruppe weiter aufzugliedern; in Serokonvertern mit keiner positiven Bande im Western Blot und Serokonverter, die bereits gegen 1 bis zu 3 Virusepitope Antikörper gebildet hatten (dargestellt in Tabelle 3.7.2).

WB-Banden Anzahl	Patienten Anzahl	Erkannte Peptide (Baseline) %	Neuerkannte Peptide %	Erkannte Peptide (insgesamt) %
0 von 7 (Prä-Serokonv.)	2	0	71,4	71,5
1-3 von 7 (Frühe Serokonv.)	5	13,3	51,4	64,8
4-7 von 7 (Späte Serokonv.)	8	19,2	45,4	64,6

Tab. 3.7.2: Peptidmittelwerte im Verlauf

2 der 15 Patienten standen erst am Beginn ihrer Serokonversion, sie waren in keiner WB-Bande positiv. So erkannten sie zu Baseline keines der offerierten HIV-Peptide (0% vs. 13,3 bzw. 19,2%), erzielten dann mit fortschreitender Infektionsdauer aber die

höchste Rate an neuerkannten Peptiden unter den nun 3 Serokonverter-Gruppen mit 71,4% vs. 51,4 bzw. 45,4%.

Insgesamt wurden in den einzelnen Gruppen 71,5% (Prä-Serokonverter), 64,8% (frühe Serokonverter) und 64,6% (späte Serokonverter) der Peptide erkannt.

Von den 3 Controllern gehört ein Patient in die erste Gruppe der Prä-Serokonverter (Baseline: 0 von 7 WB-Banden), ein weiterer in die Gruppe der frühen Serokonverter (Baseline: 1 von 7 WB-Banden positiv), der dritte (HLA-B 27+) ist der dritten Gruppe „späte Serokonverter“ zuzurechnen (Baseline: 7 von 7 WB-Banden positiv).

3.8 Fallbeispiele

Zur weiteren Veranschaulichung soll jetzt auf einige ausgewählte Patienten exemplarisch eingegangen werden.

3.8.1 Patient C1

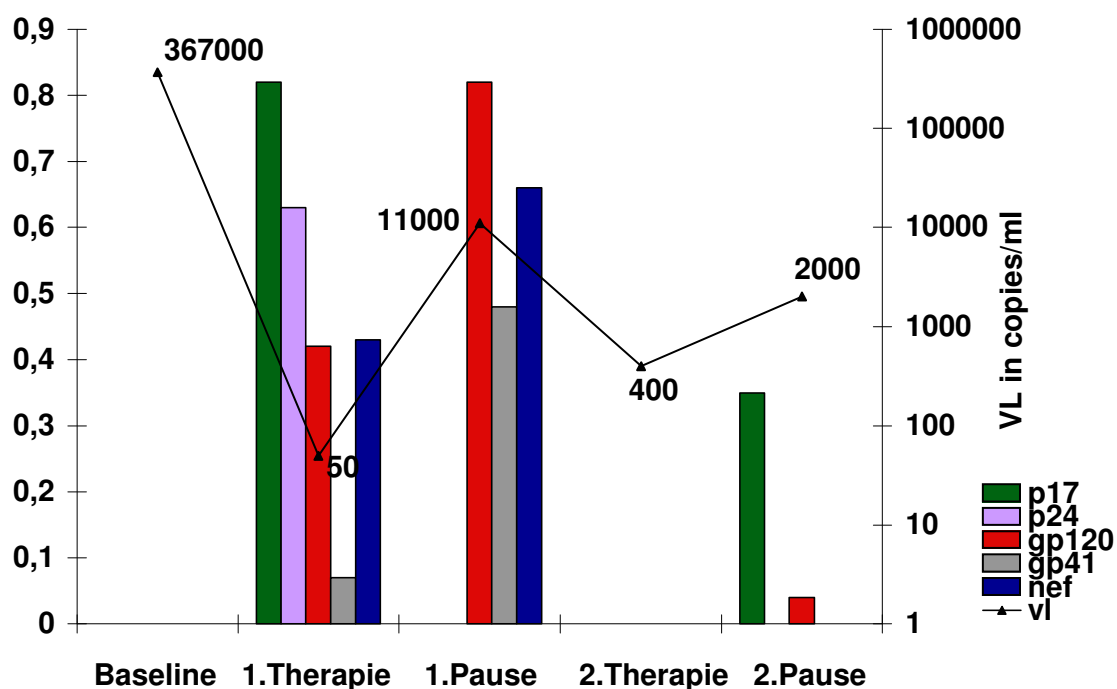


Abb. 3.8.1.1: CTL-Antwort und VL im Verlauf

In Abbildung 3.8.1.1 sind die Ergebnisse der ELISpots eines Patienten aus der Controller-Gruppe im Verlauf dargestellt. Die einzelnen farbigen Säulen geben in ihrer Höhe (linke y-Achse) die Stärke der Immunantwort des Patienten auf die einzelnen dargebotenen Virusepitope wieder, also die Zahl der IFN gamma sezernierenden Zellen pro vorhandene CD8+ T-Zellen in Prozent. Die Reaktion auf jede Virus-Region ist in einer einzelnen Säule dargestellt (s. Legende rechts unten), um gleichzeitig auch eine Aussage über die Breite der CTL-Antwort treffen zu können. Für die viralen Bestandteile p17, p24, gp120 und nef wurde jeweils 1 Peptid im ELISpot eingesetzt, für die Region gp 41 waren es 2.

Zusätzlich ist im Diagramm noch in Kurvenform der Verlauf der Viruslast abgebildet (rechte y-Achse).

Diesem Patienten gelang es, nach einer initial breiten und starken CTL-Antwort die Menge des HI-Virus in seinem Blut nach Beendigung der 2.ART unter Kontrolle (bei 2.000 RNA-Kopien pro ml) zu halten bei einer initialen Viruslast von 367.000 cop./ml. (Der Verlust an Antwortsignalen zum ersten und den letzten beiden untersuchten Zeitpunkten erklärt sich aus vermutlichen Verunreinigungen der Proben beim damaligen Einfrieren.) Dieser Patient war zu Beginn seiner ersten Therapie mit HIV-Medikamenten noch in keiner Bande des Western Blots positiv, gehört also zu den 2 Prä-Serokonvertern.

3.8.2 Patient C2

Ergänzend soll nun auf die ELISpot-Ergebnisse eines weiteren Controllers eingegangen werden. Dieser Patient war bereits zu Beginn seiner 1.ART im Western Blot voll serokonvertiert mit 7 positiven von 7 möglichen Banden.

Allerdings verfügt dieser Patient über das HLA-Allel B 27, für das in Bezug auf das Voranschreiten der HIV-Infektion eine überdurchschnittlich gute Prognose gezeigt werden konnte (3,13).

Auch hier wurde dieselbe Darstellungsart wie bei dem vorhergehenden Diagramm gewählt. Für die HIV-Region p17 wurden 2, für p24 wurden 3, für gp120 1, für nef 1 und für gp 41 4 Peptide eingesetzt.

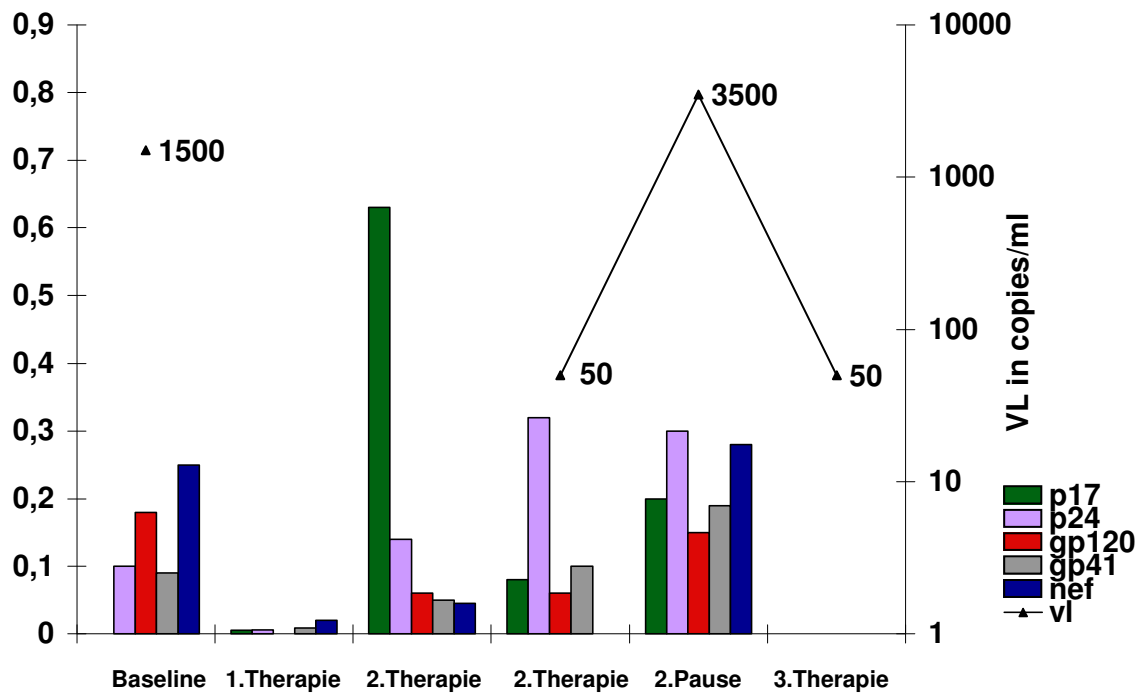


Abb. 3.8.2.1: CTL-Antwort und VL im Verlauf

Die Viruslast war bei komplett abgelaufener Serokonversion initial schon sehr niedrig mit 1500 RNA-Kopien pro ml. Mit einer von Beginn an breiten CTL-Antwort, die im Verlauf an Stärke noch zunahm, erreichte dieser Patient eine Suppression seiner HI-Viren-Menge im peripheren Blut auf einem Niveau von 3.500 cop./ml ohne medikamentöse Unterstützung während der 2. Pause.

3.8.3 Patient NC

Im Gegensatz dazu soll auch noch die Betrachtung der ELISpot-Daten eines Non-Controller-Patienten erfolgen.

Auch hier erfolgte die Darstellung auf die bereits bekannte Weise. Für die virale Region p17 wurde 1 Peptid eingesetzt, für p24 wurden 3 Peptide verwendet, für gp120 2, für gp41 2, für nef 8 und für RT insgesamt 4.

Dieser Patient war zum Zeitpunkt Baseline in 2 von 7 möglichen Banden im Western Blot positiv.

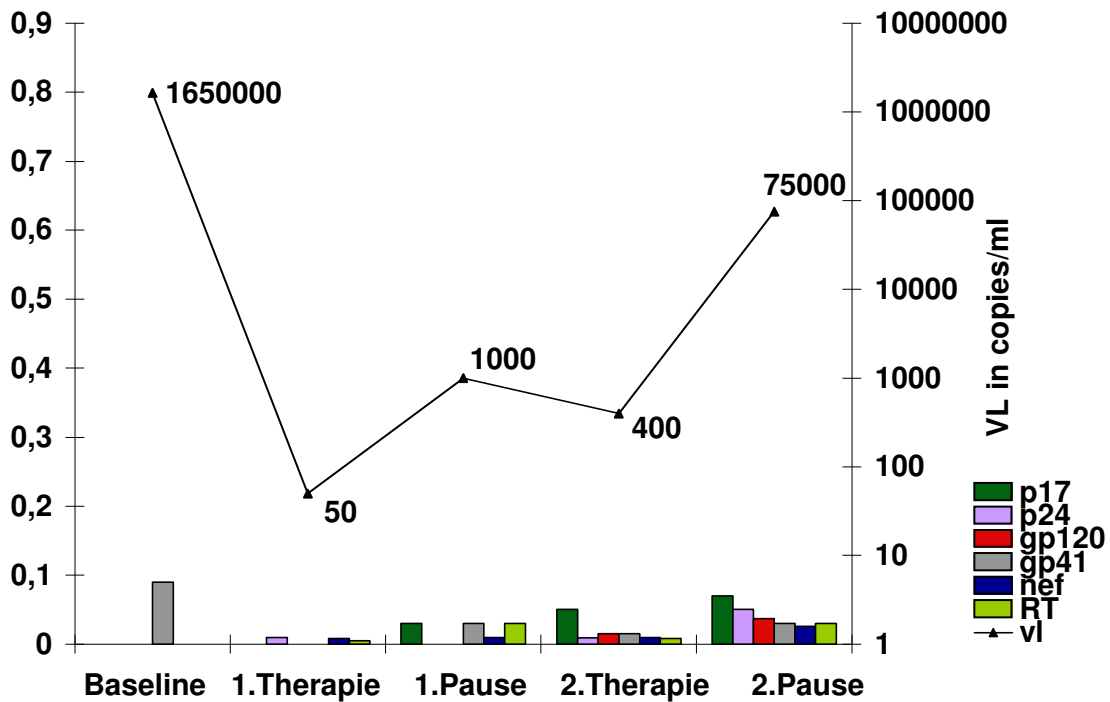


Abb. 3.8.3.1: CTL-Antwort und VL im Verlauf

Der Patient hatte anfänglich eine hohe Viruslast von 1.650.000 RNA-Kopien pro ml. Es gelang ihm, während des STI-Regimes eine breite Immunantwort gegen die verschiedenen Virusproteine zu generieren und aufrecht zu erhalten. Allerdings liegt diese in der Stärke (Höhe der einzelnen Säulen) deutlich unter dem Niveau der beiden oben besprochenen Controller-CTL-Antworten.

Am Endpunkt in der 2. Pause erreichte dieser Patient keine Kontrolle seiner HI-Virusmenge ohne medikamentöse Unterstützung; die Viruslast lag zu diesem Zeitpunkt bei 75.000 cop./ml.

4 Diskussion

In den vergangenen 10 Jahren seit Einführung der sogenannten hoch effektiven antiretroviralen Therapie (HAART) haben sich die Probleme im Umfeld einer HIV-Infektion stark verändert.

So steht heute nicht mehr die Sorge um eine rasche Progression der Immunschwäche aufgrund rasch versagender medikamentöser Therapie und das damit verbundene Auftreten opportunistischer, tödlicher Krankheiten im Vordergrund (86). Vielmehr bestimmen heute die Nebenwirkungen der überlebenswichtigen HIV-Medikamente den Umgang mit HIV-Patienten im klinischen Alltag (50,58). Nebenwirkungen wie das Lipodystrophie-Syndrom und damit assoziierte Stigmatisierungen, chronische Diarrhoen und periphere Nervenschädigungen lassen den Wunsch vieler HIV-Patienten nach einer medikamentenfreien Zeit, einer Therapiepause, verständlich erscheinen.

Grundlage für alle folgenden Studien war dabei der Fall des „Berlin Patient“, dem trotz mehrfacher Pausen während seiner mit HAART behandelten frischen HIV-Infektion bis zum heutigen Tage eine dauerhafte Kontrolle seiner Viruslast gelingt (38,51,60).

Die Einleitung einer antiretroviralen Therapie (50,58,86) und dessen kontrolliertes Absetzen ermöglichen es, dass Immunsystem während der akuten HIV-Infektion durch eine definierte Intervention zu beeinflussen und sein Verhalten daraufhin zu analysieren.

Vor diesem Hintergrund entstand die Idee zu dieser Arbeit.

Unter Einsatz von strukturierten Therapieunterbrechungen (STI) sollten immunologische Parameter untersucht werden, die mit der Entwicklung einer HIV-spezifischen Immunantwort und gegebenenfalls endogenen Kontrolle der Virusreplikation nach primärer HIV-Infektion (PHI) assoziiert sind. Die Parameter wurden unter Therapie, also während der Reduktion der aktiven Virusreplikation, und während der Pausen untersucht.

4.1 Viruslast

Unter der verabreichten Dreifachkombination kam es wie erwartet bei allen 15 Patienten zu einer Abnahme der Virusreplikation. Nach Absetzen der Therapie gelang es drei der 15 beobachteten HIV-infizierten Patienten, die Viruslast ohne Therapie auf einem Niveau von unter 5.000 cop./ml über einen längeren Zeitraum (Dauer der 2.STI >3 Monate) auch ohne HAART stabil zu halten. Auch Rosenberg et al. und Altfeld et al. konnten zeigen, dass strukturierte Therapiepausen zu einer verbesserten Immunkontrolle der HIV-Replikation nach behandelter primärer HIV-Infektion führen (8,82).

Bei den ebenfalls in der akuten Phase behandelten restlichen 12 Patienten ließ sich dieser Effekt nicht feststellen. Sie zeigten alle innerhalb kurzer Zeit nach Absetzen der Therapie einen Wiederanstieg ihrer Viruslast im peripheren Blut (s. Tab. 3.3.1).

Diese Ergebnisse führten zu einer Aufteilung der Patienten in sogenannte „Controller“ (n=3) und „Non-Controller“ (n=12). Kritisch ist anzumerken, dass diese Einteilung arbiträr erfolgte, aber in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (4,5,81,82). Ebenfalls hervorgehoben werden sollte die Tatsache, dass sich die Patienten der beiden Gruppen in ihren HI-Virusmengen zum Zeitpunkt Baseline nicht voneinander unterschieden, die mittlere Viruslast lag bei beiden Gruppen im einstelligen Millionenbereich (s. Tab. 3.2.1).

Die hier beobachteten Verläufe (s. Abb. 3.3.1) stehen im Einklang mit Studien, die ebenfalls einen - bezogen auf die Viruslast und die Mehrzahl der Patienten - nur vorübergehend stabilisierenden Effekt durch ein STI-Regime sehen (8,53,74,95a). Das Absetzen von HAART führte in anderen Studien auch bei Patienten, die in der chronischen Phase der HIV-Infektion behandelt wurden, ebenfalls zum „rebound“ der Plasmavirämie (18,25,32,40,44,67,77,84).

Als Gründe für den (teilweise erst nach über 600 Tagen Therapiepause) beobachteten Verlust der zeitweiligen Immunkontrolle über die Virusreplikation wurden die graduelle genetische Evolution des infizierenden Virus (96) mit konsekutivem immunologischen „escape“ oder potentielle Superinfektionen mit einem zweiten Virus (5) identifiziert.

4.2 CD4+ T-Zellen

Im Rahmen der Studie erfolgten keine intensiveren Untersuchungen der CD4+ T-Helferzellen (s. Tab. 3.2.1). Dennoch seien kurz ein paar grundsätzliche Beobachtungen erwähnt.

Wie bereits aus früheren Veröffentlichungen bekannt ist, sank die Zahl der CD4+ T-Zellen in den Therapiepausen einhergehend mit der steigenden Plasmavirämie, während die der CD8+ T-Zellen zunahm (59,79,98). Dies hatte die Reversion der vor Therapiestopp normalisierten CD4+/CD8+ Ratio zur Folge.

Solche Veränderungen während der HAART-Pausen wurden bei den meisten Untersuchungen zu Therapieunterbrechungen beobachtet (25,30,32,77,95a,100); nur eine Arbeitsgruppe stellte keine Veränderungen fest (84,85). Derartige therapiebedingte Schwankungen im Verlauf der CD4+ T-Zellzahlen galten sowohl für Controller als auch für Non-Controller, zwischen den Gruppen ergaben sich keine Unterschiede.

Zusätzlich führte in den beiden Gruppen eine quasi Normalisierung der absoluten CD4+ Zellzahl zu keiner Veränderung des virologischen „set points“. Dies spricht für frühzeitig - während der Primärinfektion – entstandene qualitative Defizite im T-Zell-Repertoire, die später durch HAART und STI nicht ausgeglichen werden können (65b,99a).

4.3 CD8+ T-Zellen: Proliferation und Aktivierung

4.3.1 KI-67

Bei den von uns untersuchten Patienten ergab sich zum Ende des 1. Therapieblocks eine Verringerung der Ki-67+CD8+ Lymphozyten bei gleichen Ausgangswerten. Im weiteren Verlauf verhielt sich der Anteil proliferierender Zellen wie die Viruslast (s. Abb. 3.4.1): Bei den Controllern zeigte sich ein weiterer Abfall (bei weiterhin sinkender Viruslast), bei den Non-Controllern ein Wiederanstieg (bei wieder zunehmender Virusmenge).

Dies spricht dafür, dass der erhöhte Umsatz durch die Präsenz des Antigens induziert wird und nicht über einen homöostatischen Mechanismus (22,25,42,59). Diese Annahme wird - nach Wiedereinführung der Therapie - durch die daraufhin

abnehmende Proliferation der Zellen bei sinkender Viruslast nochmals bestärkt. Das treibende Agens in diesem Geschehen scheint dabei die Antigenpräsenz zu sein.

Ergänzend zeigt sich auch in dieser Studie, was schon aus früheren bekannt ist. Die CD8-vermittelte HIV-Immunantwort korreliert mit einer Kontrolle der viralen Replikation (43,71,97). In diesem Zusammenhang konnten Schmitz et al. zeigen, dass eine Depletion von CD8+ T-Zellen im Tiermodell zu einer unkontrollierten viralen Replikation führt (89).

4.3.2 CD25 und HLA-DR

Parallel zur Proliferation nahm auch der Anteil aktivierter T-Zellen im Blut unter der ersten Therapie deutlich ab (s. Abb. 3.4.1), und zwar sowohl in der Gruppe der Controller als auch der Non-Controller. Beide hatten zu Baseline im selben Ausmaß CD25+ T-Zellen, die Non-Controller verfügten jedoch zu Baseline über doppelt so viele HLA-DR+ T-Zellen. In Analogie zum Anteil Ki-67+ T-Zellen war auch die Expression von HLA-DR als spätem und CD25 als frühem Aktivierungsmarker bis auf eine Ausnahme (s. unten) sowohl bei den Controllern als auch bei den Non-Controllern im weiteren Verlauf eng mit der Plasmavirämie verbunden (s. Abb. 3.4.1), auch dies stützt die Interpretation der Immunaktivierung als Folge der Antigenpräsenz.

Dieser Rückgang der Expression von Aktivierungsmarkern unter HAART und die Korrelation mit der Viruslast wurden auch von anderen Gruppen für PBMC bestätigt (22,54). Im Widerspruch hierzu steht allerdings der Viruslast-gegenläufige Wiederanstieg an HLA-DR+ T-Zellen in der Gruppe der Controller zum Zeitpunkt der 2.Pause. Eine mögliche Erklärung für die Hochregulierung später Aktivierungsmarker ist die durch HIV angeregte Ausreifung der Zellen in einen terminal differenzierten Status.

Auch andere Arbeiten befassten sich mit der Veränderung der Expression von späten Aktivierungs- und Proliferationsmarkern nach Therapieunterbrechung; größtenteils stimmen die Ergebnisse mit den hier beschriebenen überein (25,32,72,84,85). Der Verlauf der frühen Aktivierungsmarker ist in anderen Studien bisher nicht umfassend untersucht worden, so dass keine Vergleiche angestellt werden konnten.

4.4 CD8-Antwort: Quantität und Qualität

Um die Veränderung der Immunregulation nicht nur auf phänotypischer, sondern auch auf funktioneller Ebene zu charakterisieren, erfolgten Untersuchungen der Zytokin-Produktion nach in vitro-Stimulation. Im Rahmen ihrer pleiotropen Effekte spielen Zytokine eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Immunantwort im Verlauf einer HIV-Infektion. Eine Schlüsselrolle im Zusammenspiel der Zytokine kommt dabei den Interleukinen (IL)-12 und IL-4 zu, die hauptsächlich für die Polarisierung zu einer zellulären (IL-12) oder einer humoralen (IL-4) Immunantwort verantwortlich gemacht werden (70,90). Schon relativ früh wurde deutlich, dass die HIV-Infektion zu Störungen der Zytokin-Produktion führt (19-21). Die in dieser Arbeit gesammelten Daten sprechen für einen Einfluß der antiretroviralen Therapie im Sinne einer Tendenz zur Zunahme der antigeninduzierten Produktion von IFN-gamma .

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der CTL-Antwort im ELISpot zeigte sich, dass Patienten, die in der Lage waren, ihre Virusmenge auf niedrigem Niveau (<5.000 cop./ml) stabil zu halten (Controller), bereits zu Baseline, im Verlauf und am Endpunkt der Untersuchung eine deutlich breitere Immunantwort gegen HIV-Peptide generieren konnten als die Patienten der Non-Controller-Gruppe (s. Tab. 3.5.1). Dabei sind in beiden Gruppen Patienten enthalten, die sich bei HAART-Beginn in einer späten oder frühen Phase ihrer Serokonversion befanden.

So erkannten die 3 Controller zu Beginn der Studie im Mittel 26,7% aller angebotenen Peptide, bis zum Endpunkt waren dies insgesamt 83,3%. Die 12 Non-Controller generierten zum Zeitpunkt Baseline im Mittel gegen 11,7% aller viralen Epitope eine CTL-Antwort, in der Summe kamen sie auf 61,2%.

Interessanterweise gingen mit fortschreitender Infektionsdauer bei fast der Hälfte aller Patienten (7 von 15) Antworten gegen einzelne, früher erkannte Virusepitope verloren. Dabei stand der Verlust einer Reaktion auf das Capsidprotein p24 im Vordergrund. Dies betraf insgesamt 4 Patienten, davon 1 Controller und 3 Non-Controller.

Auch in Bezug auf die individuelle Stärke der Immunantwort gegen die verschiedenen viralen Epitope zeigen die 3 Controller deutlich bessere CTL-Antworten als die 12 restlichen Probanden (s. Abb. 3.6.1). Sowohl zum Zeitpunkt Baseline als auch in der 2.Pause verfügen die Controller über doppelt so viele INF-gamma-produzierende CD8+

T-Zellen wie die Non-Controller. Bei einzelner Betrachtung der Patienten zeigt sich zudem, dass 100% der Controller und 67% der Non-Controller die ursprüngliche Stärke ihrer initialen CTL-Antwort im weiteren Verlauf auch aufrechterhalten konnten.

Diese Ergebnisse der Analysen zum Nachweis HIV-spezifischer CD8+ T-Zellen weisen darauf hin, dass es in Ergänzung zur Rekonstitution der T-Zellimmunität gegenüber opportunistischen Erregern bei einer Minderheit der Patienten im Verlauf einer früh eingeleiteten HAART auch zu einer qualitativen und quantitativen Verbesserung der HIV-spezifischen CTL-Antwort kommt (11). Die von anderen Gruppen veröffentlichten Beobachtungen, dass Therapieunterbrechungen zu einer Verbesserung der HIV-spezifischen Immunität führen (31,77,85), kann durch unsere Untersuchung im Einzelfall nur eingeschränkt unterstützt werden.

Bemerkenswert ist auch, dass die Stärke der HIV-spezifischen Antworten direkt mit der Viruslast verbunden ist und dadurch bei Wiedereinsetzen der Therapie nach der Therapiepause wieder abnimmt. Dieser Zusammenhang der Plasmavirämie mit der Stärke der HIV-spezifischen CTL-Antwort, hinter dem die Frage nach der treibenden Kraft in diesem Geschehen steckt, wurde von einigen Gruppen bestätigt (12,14,15), während andere entweder eine negative Korrelation zwischen den beiden Parametern (17,26,71,94) oder gar keine Korrelation fanden (1,24,33).

Diese Diskrepanzen können durch die sehr unterschiedlichen Methoden und untersuchten Kohorten erklärt werden. Auch die verschiedenen Fallzahlen und Virusmengen im peripheren Blut, unterhalb deren überhaupt von einer endogenen Viruskontrolle gesprochen wurde, erschweren die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Darüber hinaus liegen in den meisten Fällen Querschnittsstudien und nicht longitudinale Beobachtungen wie in unserer Analyse zugrunde.

So müssen die vielversprechenden Daten von Patienten, die noch vor oder während der Serokonversion behandelt wurden und in denen nach sequenziellen Therapieunterbrechungen eine verstärkte Immunantwort gemessen werden konnte (60,72,82,95), noch weiter in größeren und länger laufenden Studien bestätigt werden.

4.5 Abhängigkeit des set point levels vom Stadium der Serokonversion und genetischen Determinanten

Um die verschiedenen Stadien der Serokonversion, in denen sich die einzelnen Patienten zu Beginn der Studie befanden, sowie ihren möglichen Einfluß auf eine endogene Viruskontrolle ausreichend zu berücksichtigen, erfolgte noch eine Betrachtung der CTL-Antworten nicht in der bisherigen Gruppierung mit dem Fokus auf das Vermögen der Patienten zu einer Hemmung der viralen Replikation, sondern vielmehr unter dem Gesichtspunkt, zu welchem Zeitpunkt genau in der primären HIV-Infektionsphase jeder einzelne Patient mit der HAART begann.

Dabei zeigte sich, dass diejenigen Patienten, die noch keine positive Bande im Western Blot vorzuweisen hatten, also erst am Beginn ihrer Serokonversion standen (sog. Prä-Serokonverter), im Vergleich zu bereits weiter fortgeschrittenen Patienten in der Qualität der CD8+ T-Zell-vermittelten Immunantwort einen deutlichen Vorteil hatten (s. Tab. 3.7.2). Interessanterweise gehören 2 der 3 Controller zu diesen Patienten, die sich durch den Beginn ihrer HAART in einem sehr frühen Stadium ihrer Serokonversion offensichtlich eine deutliche breitere Immunantwort gegen HIV bewahren bzw. erwerben konnten. Dieser medikamentöse Schutz vor dem gerade in der PHI-Phase ausgeprägten Verlust der CD4+ T-Gedächtniszellen in der Darmmukosa (GALT) (65b, 99a) wird einen großen Einfluß auf die frühe immunologische Determination haben.

Die beiden eben beschriebenen Patienten erkannten zu Baseline keines der offerierten HIV-Peptide, erzielten dann mit fortschreitender Infektionsdauer aber die höchste Rate an neuerkannten Peptiden unter den nun 3 Serokonverter-Gruppen mit 71,4% (vs. 51,4 bzw. 45,4%).

Auch am Endpunkt hatten die beiden „Prä-Serokonverter“ insgesamt auf die meisten viralen Epitope reagiert mit 71,5%, die frühen und späten Serokonverter kamen auf jeweils knapp 65%.

Von den 3 Controllern gehört ein Patient in die erste Gruppe der Prä-Serokonverter (Baseline: 0 von 7 WB-Banden), ein weiterer in die Gruppe der frühen Serokonverter (Baseline: 1 von 7 WB-Banden positiv), der dritte (HLA-B 27+) ist der dritten Gruppe „späte Serokonverter“ zuzurechnen (Baseline: 7 von 7 WB-Banden positiv). Dies spricht für eine Evolution der CTL-Antwort in der Serokonversionsphase parallel zu den Antikörper-Antworten.

Dieser zuletzt erwähnte Controller-Patient bringt möglicherweise einen weiteren, die Fähigkeit zur Viruslast-Kontrolle determinierenden Faktor mit ins Spiel.

Dieser Patient war zu Beginn seiner HAART bereits voll serokonvertiert, trotzdem gelang ihm eine dauerhafte Unterdrückung seiner Virusmenge im peripheren Blut auf unter 5.000 cop./ml (s. Abb. 3.8.2.1). Dies könnte der Patient, der über keine breitere oder stärkere CTL-Antwort als die beiden anderen Controller verfügt (s. Abb. 3.8.1.1), durch einen genetischen Vorteil erreicht haben. Er verfügt über das HLA-Klasse I-Allel B 27, das unter anderem zusammen mit dem HLA Allel B 57 in jüngster Zeit in Zusammenhang mit sogenannten „long term non progressors“ (LTNP) gebracht wird; also Patienten, die über Jahre hinweg ohne äußere Einflüsse ihre Viruslast unter Kontrolle behalten (3,13).

4.6 Schlussfolgerungen

Es ließ sich zeigen, dass sich die starke Immunaktivierung während einer primären HIV-Infektion unter HAART normalisiert.

Ebenfalls wurde deutlich, dass die Evolution der CTL-Antwort in einem engen Zeitfenster stattfindet und mit der Ausreifung von B-Zellantworten und Generierung von HIV-spezifischen Antikörpern einhergeht.

Von der Stärke und Qualität dieser initialen CTL-Antwort ist eine endogene Kontrolle der Virusreplikation abhängig, möglicherweise auch vom frühen bis sehr frühen Therapiebeginn und noch näher zu charakterisierenden genetischen Determinaten (23).

Seit dem Abbruch der internationalen SMART-Studie mit über 5.400 eingeschlossenen Probanden am Anfang dieses Jahres ist auch bekannt, dass für therapieerfahrene Patienten in der chronischen Phase ihrer HIV-Infektion CD4-gesteuerte STI keinen Vorteil bringen. Das Risiko einer Progression zu AIDS war bei Studienpatienten mit einem STI-Regime sogar doppelt so hoch verglichen mit den Patienten, die dauerhaft auf eine antiretrovirale Therapie eingestellt waren.

So lässt sich abschließend feststellen, dass der therapeutische Nutzen von STI in der frühen HIV-Infektion für die Generierung HIV-spezifischer Immunantworten in der akuten Phase der HIV-Infektion unbewiesen bleibt (46).

Aufgrund der in den bisher veröffentlichten Studien verhältnismäßig kurzen Beobachtungszeiträume und der - wie auch in dieser Untersuchung – geringen Fallzahlen lässt sich allenfalls ein vorübergehender Vorteil für einzelne Patienten postulieren (56,62,95a).

Welche Bedeutung hier eine HIV-Vakzine haben könnte, sei es als genereller Impfschutz vor einer Infektion mit HI-Viren oder als immunmodulierendes und -unterstützendes Therapeutikum nach bereits erfolgter Infektion (=therapeutische Impfung), ist momentan Gegenstand der Forschung (47,49,59a,62,62a,6365b,99a).

5 Zusammenfassung

Mit der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie konnten Mortalität und Morbidität der HIV-Infektion drastisch verringert werden. Die anfängliche Hoffnung, das Virus durch HAART binnen weniger Jahre vollständig aus dem Organismus des Infizierten eradizieren zu können, ließ sich bis heute noch nicht erfüllen. Auch für die nahe Zukunft scheint dieses Ziel nicht erreichbar. Gleichwohl werden die bestehenden Therapieformen weiterentwickelt, und neue Therapieansätze z.B. in Richtung Immunmodulation verfolgt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten immunologische und genetische Parameter charakterisiert werden, die mit der Entwicklung einer HIV-spezifischen Immunantwort nach primärer HIV-Infektion assoziiert sind.

Dabei wurden retrospektiv die Auswirkungen der HIV-Therapie und der ebenfalls durchgeführten kontrollierten Pausen auf das Immunsystem im Blut analysiert; hierbei insbesondere die Effekte auf HIV-spezifische CTL-Antworten.

Generell konnten alle 15 Patienten von dem frühen Therapiebeginn in der akuten Phase der Infektion profitieren: Es kam rasch zu einer Abnahme der Plasmavirämie, die mit der Verringerung der Immunaktivierung einherging. Allerdings führten die eingesetzten Therapieunterbrechungen bei der Mehrzahl der Patienten zu einem Wiederanstieg der Viruslast im Blut, die Aktivierung des Immunsystems nahm ebenfalls erneut zu. Lediglich 3 Patienten gelang eine längerfristige Kontrolle ihrer Plasmavirämie und Immunaktivierung ohne ART.

In den Analysen der HIV-spezifischen CTL-Antworten zeigte sich, dass diese Patienten im Durchschnitt über breitere und stärkere CTL-Antworten gegen einzelne Virusbestandteile verfügten und diese auch über längere Zeit aufrechterhalten konnten. Desweiteren ergaben sich Anhaltspunkte dafür, dass es offensichtlich von Bedeutung ist, zu welchem Zeitpunkt in der Serokonversionsphase mit einer HAART begonnen wird.

Auch eine genetische Prädisposition spielt in diesem Kontext eine nicht zu unterschätzende Rolle.

Insgesamt ließ sich zeigen, dass die anfängliche Breite und Stärke der CTL-Antwort gegen HIV ausschlaggebend für eine spätere endogene Kontrolle der Virusreplikation ist. Die Evolution dieser Antwort findet während der Serokonversion in einem sehr engen Zeitfenster statt, wodurch einer frühzeitig begonnenen antiretroviralen Therapie eine besondere Bedeutung zukommt.

In diesem Zusammenhang bleibt der Stellenwert von strukturierten Therapieunterbrechungen für die Generierung einer HIV-spezifischen Immunantwort unbewiesen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	acquired immune deficiency syndrome (erworbenes Immundefizienzsyndrom)
CD	cluster of differentiation
DC	dendritic cell (dendritische Zelle)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
FDC	follikuläre dendritische Zelle
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	human immune deficiency virus (Humanes Immundefizienzvirus)
HU	Hydroxyurea
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
LTNP	long term non progressor
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NNRTI	Nicht-Nukleosidanaloger Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	nukleosidanaloger Reverse-Transkriptase-Inhibitor
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre periphere Blutzellen)
PHI	Primäre HIV Infektion
PI	Proteaseinhibitor
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SFC	spot forming cell
STI	structured treatment interruption (strukturierte Therapieunterbrechung)
RT	reverse Transkriptase
VL	Viruslast

7 Literaturverzeichnis

1. **Addo, M.M., E.S. Rosenberg, M. Altfeld, B.D. Walker et al..** 2003. Comprehensive epitope analysis of HIV-1-specific T cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* **77**: 2081-2092.
2. **Aerzte-ohne-Grenzen.** 2002. Nachahmerprodukte für südafrikanische HIV/Aids-Patienten, in *Akut:www.Aerzte-ohne-Grenzen.de*. p. 5.
3. **Altfeld, M., M.M. Addo, E.S. Rosenberg, J. Rockstroh, B.D. Walker et al..** 2003. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS* **18**: 2581-91.
4. **Altfeld, M., E.S. Rosenberg, B.D. Walker et al..** 2001. Cellular Immune Responses and Viral Diversity in Individuals Treated during Acute and Early HIV-1 Infection. *J Exp Med* **193**: 169-180.
5. **Altfeld, M., T.M. Allen, E.S. Rosenberg, B.D. Walker et al.** 2002. HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus.[comment]. *Nature* **420**: 434-439.
6. **Altfeld, M., J. van Lunzen, H.J. Stellbrink, B.D. Walker et al..** 2002. Expansion of pre-existing, lymph node-localized CD8+ T cells during supervised treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *Journal of Clinical Investigation* **109**: 837-43.
7. **Altfeld, M., S.A. Kalams et al..** 2001. Identification of Novel HLA-A2-Restricted Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Epitopes Predicted by the HLA-A2 Supertype Peptide-Binding Motif. *J Virol* **75**: 1301-1311.
8. **Altfeld, M., B.D. Walker et al..** 2001. Less is more? STI in acute and chronic HIV-1 infection. *Nat Med* **8**: 881-4.
9. **anonymous.** 2001. Brazil plans to make generic AIDS drugs. *Nature* **412**: 848.
10. **Arno, A., B. Clotet et al..** 1998. Impact on the immune system of undetectable plasma HIV-1 RNA for more than 2 years. *AIDS* **12**: 697-704.
11. **Autran, B., J. Leibowitch, P. Debre et al..** 1999. Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunol Lett* **66**: 207-11.

12. **Betts, M.R., L.J. Picker et al..** 2001. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* **75**: 11983-91.
13. **Blankson, J.N. and R.F. Silicano et al..** 2001. MHC class II genotype and the control of viremia in HIV-1-infected individuals on highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* **107**: 549-551.
- 13a. **Bloch, M.T., D.A. Cooper et al..** 2006. The role of hydroxyurea in enhancing the virologic control achieved through structured treatment interruption in primary HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **42**: 192-202.
14. **Buseyne, F., Y. Riviere et al..** 2002. Inverse correlation between memory Gag-specific cytotoxic T lymphocytes and viral replication in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis* **186**: 1589-96.
15. **Buseyne, F., Y. Rivière et al..** 2002. Frequencies of ex vivo activated HIV-1-specific IFN-g producing CD8+ T cells in infected children correlate positively with plasma viral load. *J. Virol.* **76**: 12414-22.
16. **Chiasson, M.A., M.A. Hamburg et al..** 1999. Declining HIV/AIDS mortality in New York City. *J Acquir Immune Defic Syndr* **21**: 59-64.
17. **Chouquet, C., B. Autran, Y. Riviere et al..** 2002. Correlation between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection. *AIDS* **16**: 2399-407.
18. **Chun, T.W., A.S. Fauci et al..** 1999. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* **401**: 874-875.
19. **Clerici, M., G.M. Shearer et al..** 1993. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest* **91**: 759-65.
20. **Clerici, M. and G.M. Shearer.** 1993. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* **14**: 107-11.
21. **Clerici, M. and G.M. Shearer.** 1994. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* **15**: 575-81.
22. **Cohen Stuart, J.W., R.J. de Boer et al..** 2000. The dominant source of CD4+ and CD8+ T-cell activation in HIV infection is antigenic stimulation. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **25**: 203-11.

23. **Connick, E., R.T. Schooley et al..** 2001. Relationship between HIV-1-Specific Memory Cytotoxic T Lymphocytes and virus load after recent HIV-1 Seroconversion. *J Inf Dis* **184**: 1465-9.
24. **Dalod, M., J.G. Guillet et al..** 1999. Broad, intense anti-human immunodeficiency virus (HIV) ex vivo CD8(+) responses in HIV type 1-infected patients: comparison with anti-Epstein-Barr virus responses and changes during antiretroviral therapy. *J Virol* **73**: 7108-16.
25. **Davey, R.T., A.S. Fauci, H.C. Lane et al..** 1999. HIV-1 and T cell dynamic after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15109-14.
26. **Edwards, B.H., P.A. Goepfert et al..** 2002. Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J Virol* **76**: 2298-305.
27. **Ferbas, J., J.V. Giorgi et al..** 1995. Virus burden in long-term survivors of human immunodeficiency virus (HIV) infection is a determinant of anti-HIV CD8+ lymphocyte activity. *J Infect Dis* **172**: 329-39.
28. **Frahm, N., C. Brander et al..** 2002. Total assessment of HIV specific CTL responses: Epitope clustering, processing preferences and the impact of HIV sequence heterogeneity*, *in* B.T. Korber, et al. (ed.), Book. Theoretical Biology and Biophysics Group: Los Alamos National Laboratory., Los Alamos, NM, USA.
29. **Fujihashi, K., H. Kiyono et al..** 1993. Cytokine-specific ELISPOT assay. *J Immun Meth* **160**: 181-189.
30. **Garcia, F., G. Pantaleo, J.M. Gatell et al..** 2001. The virological and immunological consequences of structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *Aids* **15**: F29-40.
31. **Garcia, F., F. Lori, J.M. Gatell et al..** 2003. A cytostatic drug improves control of HIV-1 replication during structured treatment interruptions: a randomized study. *AIDS* **17**: 43-51.
32. **García, F., G. Pantaleo, J.M. Gatell et al..** 1999. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* **13**: F79-F86.

- 32a. **Gascon, R.L., M.S. McGrath et al..** 2002. Increased HLA-DR expression on peripheral blood monocytes in subsets with primary HIV infection is associated with elevated CD4 T-cell apoptosis and CD4 T-cell depletion. *J Acquir Immune Defic Syndr* **30**: 146-53.
33. **Gea-Banacloche, J.C., M. Connors et al..** 2000. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV- infected progressors and long-term nonprogressors. *J Immunol* **165**: 1082-92.
34. **Gerdes, J., H. Stein et al..** 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology* **133**: 1710-5.
35. **Gray, C.M., T.C. Merigan et al..** 1999. Frequency of class I HLA-restricted anti-HIV CD8+ T cells in individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Immunol* **162**: 1780-8.
36. **Guay, L.A., J.B. Jackson et al..** 1999. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* **354**: 795 – 802.
37. **Gulick, R.M., D.D. Richman et al..** 1998. Simultaneous vs sequential initiation of therapy with indinavir, zidovudine, and lamivudine for HIV-1 infection: 100-week follow-up. *Jama* **280**: 35-41.
38. **Gulick, R.M..** 2002. Structured treatment interruption in patients infected with HIV: a new approach to therapy. *Drugs* **2**: 245-53.
39. **Hammer, S.M., M.A. Fischl et al..** 1997. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team.[comment]. *N Engl J Med* **337**: 725-33.
40. **Harrigan, P.R., J.S.G. Montaner et al..** 1999. Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral therapy. *AIDS* **13**: F59-F62.
41. **Hatano, H., M.A. Polis et al..** 2000. Pre-HAART HIV burden approximates post-HAART viral levels following interruption of therapy in patients with sustained viral suppression. *Aids* **14**: 1357-63.

42. **Hazenberg, M.D., D. Hamann et al..** 2000. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* **95**: 249-55.
43. **Hess, C., M. Altfeld, J. van Lunzen, H.J. Stellbrink, B.D. Walker, A.D. Luster.** 2004. HIV-1 specific CD8+ T-cells with an effector phenotype and control of viral replication. *Lancet* **363**: 833-4.
44. **Ho, D.D. and L. Zhang.** 2000. HIV-1 rebound after anti-retroviral therapy. *Nat Med* **6**: 736-7.
45. **Hufert, F.T., J. van Lunzen, P. Racz, D. von Laer et al..** 1997. Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. *AIDS* **11**: 849-57.
46. **Idemyor, V..** 2003. The concept of STI in the management of patients with HIV disease: where are we currently? *HIV Clin Trials* **2**: 79-83.
47. **Imami, N. and F. Gotch.** 2003. Twenty years of HIV-1 research: what the future holds. *nature immunology* **4**: 501.
48. **Janeway, C.A. and P. Travers.** 1995. *Immunologie*. 2. ed, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
49. **Jasoy, C. and R. Wagner.** 2002. Perspektiven für die Entwicklung einer HIV-Vakzine. *Dt. Ärzteblatt* **99**: 1962-71.
50. **Jessen, H. and A.B. Jessen.** 2004. In der HIV-Therapie hat sich einiges getan. *Forschung und Praxis* **384**: 3-6.
51. **Jessen, H. and H. Jäger.** 2005. *Primary HIV Infection*. Stuttgart/New York: Thieme.
- 51a. **Kalams, S.A., B.D. Walker.** 1998 The critical need for CD4 heil in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* **188**: 2199-204.
- 51b. **Kalams, S.A., B.D. Walker.** 1999. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **73**: 6715-20.
52. **Kalams, S.A., B.D. Walker et al..** 1999. Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **73**: 6721-8.

53. **Kaufmann, D.E., B.D. Walker.** 2004. Limited durability of viral control following treated acute HIV infection. *PLoS Med* **2**: e36.
 54. **Kaufmann, G.R., D.A. Cooper et al..** 1999. Phenotypic analysis of CD8+ T lymphocytes in a cohort of HIV type 1-infected patients treated with saquinavir, ritonavir, and two nucleoside analogs for 1 year, and association with plasma HIV type 1 RNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**: 963-72.
 - 54a. **Kinter, A.L., A.S. Fauci et al..** 2004. CD25+CD4+ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4+ and CD8+ HIV-specific T cell immune response in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* **200**: 331-43.
 55. **Klein, S.A., R. Rossol et al..** 1997. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS* **11**: 1111-8.
 56. **Lafeuillade, A., D. Emilie.** 2003. Predictors of plasma HIV type 1 RNA control after discontinuation of HAART initiated at acute infection combined with STI and immune-based therapies. *J Infect Dis* **188**: 1426-32.
 57. **Lee, F.K., C. Czerkinsky.** 1989. ELISPOT: A New Approach to Studying the Dynamics of Virus-Immune System Interaction for Diagnosis and Monitoring of HIV Infection. *AIDS* **5**: 517-23.
 58. **Lange, C.G., H.J. Stellbrink, J. van Lunzen.** 2002. Indikationen zur Therapie der HIV-Infektion. *Dt. Ärzteblatt* **99**: 570-76.
 59. **Lempicki, R.A., H.C. Lane et al..** 2000. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13778-83.
 - 59a. **Lichterfeld. M., M. Altfeld et al..** 2004. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1 specific CD4+ t cells. *J Exp Med* **200**: 701-12.
 60. **Lisziewicz, J., E. Rosenberg, J. Lieberman, H. Jessen, L. Lopalco, R. Siliciano, B. Walker, and F. Lori.** 1999. Control of HIV despite the discontinuation of antiretroviral therapy [letter]. *N Engl J Med* **340**: 1683-4.
 61. **Lori, F., J. Lisziewicz et al..** 2000. Control of SIV rebound through structured treatment interruptions during early infection. *Science* **290**: 1591-3.
-

62. **Lori, F. and J. Lisiewicz.** 2001. Structured therapy interruptions for the management of HIV infection. *JAMA* **286**: 2981-7.
 - 62a. **Lunzen, J. van.** 2006. Gene therapy of hiv infection by transduced autologous CD4 T-cells inhibiting viral entry. *J Acquir Immune Defic Syndr* **42**: Suppl1:S26-7.
 63. **Markel, H..** 2005. The Search for Effective HIV Vaccines. *N Engl J Med* **353**: 753-7.
 64. **Markowitz, M., J.M. Leonard et al..** 1995. A preliminary study of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease, to treat HIV-1 infection. *N Engl J Med* **333**: 1534-9.
 65. **Mathez, D., J. Leibowitch et al..** 1997. Reductions in viral load and increases in T lymphocyte numbers in treatment-naive patients with advanced HIV-1 infection treated with ritonavir, zidovudine and zalcitabine triple therapy. *Antivir Ther* **2**: 175-83.
 - 65a. **Mattapallil, J.J., D.C. Douek et al..** 2005. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* **434**: 1093-7.
 - 65b. **Mattapallil, J.J., D.C. Douek et al..** 2006. Systemic vaccination prevents the total destruction of mucosal CD4 T cells during acute SIV challenge. *J Med Primatol* **35**: 217-24.
 66. **Merville, P. and J. Banchereau.** 1993. Detection of single cells secreting IFN-gamma, IL-6, IL-10 in irreversibly rejected human kidney allografts, and their modulation by IL-2 and IL-4. *Transplantation* **55**: 639-646.
 67. **Neumann, A.U., B. Autran, C. Katlama, t.C.S. Group et al..** 1999. HIV-1 rebound during interruption of highly active antiretroviral therapy has no deleterious effect on reinitiated treatment. *AIDS* **13**: 677-683.
 - 67a. www.nih.gov/news/pr/jan2006/niaid-18.htm
 68. **Nordström, I. and B. Ferrua.** 1992. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. *J Immun Meth* **150**: 199-206.
 69. **Novitsky, V., M. Essex et al..** 2003. Association between Virus-Specific T-Cell Responses and Plasma Viral Load in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Infection. *J Virol* **77**: 882-90.
 70. **O'Garra, A. and K. Murphy.** 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol* **6**: 458-66.
 71. **Ogg, G.S., A.J. McMichael et al..** 1998. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* **279**: 2103-6.
-

72. **Orenstein, J.M., R.T. Davey et al..** 2000. Rapid activation of lymph nodes and mononuclear cell HIV expression upon interrupting highly active antiretroviral therapy in patients after prolonged viral suppression. *AIDS* **14**: 1709-15.
73. **Ortiz, G.M., D.D. Ho, M. Markowitz et al..** 1999. HIV-1-specific immune responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy. *The Journal of Clinical Investigation* **104**: R13-R18.
74. **Oxenius, A. and B. Hirschel.** 2003. Structured treatment interruptions in HIV infection: benefit or disappointment? *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**: 129-39.
75. **Palella, F.J., S.D. Holmberg et al..** 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**: 853-60.
76. **Pantaleo, G. and A.S. Fauci.** 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* **50**: 825-54.
77. **Papasavvas, E., L.J. Montaner et al..** 2000. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 and CD8 T cell responses in chronically infected persons after temporary treatment interruption. *J Infect Dis* **182**: 766-75.
78. **Perelson, A.S., D.D. Ho et al..** 1997. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**: 188-91.
79. **Pitcher, C.J., L.J. Picker et al..** 1999. HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* **5**: 518-25.
80. **Robert Koch Institut.** 2006. HIV/AIDS in Deutschland - Eckdaten und Trends. www.rki.de.
81. **Rosenberg, E.S., B.D. Walker et al..** 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**: 1447-50.
82. **Rosenberg, E.S., B.D. Walker et al..** 2000. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* **407**: 523-6.
83. **Ruiz, L., J. van Lunzen, H.J. Stellbrink, K. Tenner-Racz, and P. Racz et al..** 1999. Protease inhibitor-containing regimens compared with nucleoside analogues alone in the suppression of persistent HIV-1 replication in lymphoid tissue [see comments]. *AIDS* **13**: F1-8.

84. **Ruiz, L., B. Clotet et al.**. 2000. Structured treatment interruption in chronically HIV-1 infected patients after long-term viral suppression. *AIDS* **14**: 397-403.
85. **Ruiz, L., B. Autran, B. Clote et al.**. 2001. HIV dynamics and T-cell immunity after three structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* **15**: F19-27.
86. **Salzberger, B., J. Rockstroh et al.**. 2004. German-Austrian recommendations for the antiretroviral therapy for HIV-infection. *Eur J Med Res* **11**: 491-504.
87. **Scheibenbogen, C., U. Keilholz et al.**. 1997. A Sensitive ELISPOT Assay for Detection of CD8+ T-Lymphocytes Specific for HLA Class I-binding Peptide Epitopes derived from Influenza Proteins in the Blood of Healthy Donors and Melanoma Patients. *Clin Res Cancer* **3**: 221-6.
88. **Schluter, C., J. Gerdes et al.**. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Journal of Cell Biology* **123**: 513-22.
89. **Schmitz, J.E., K.A. Reimann et al.**. 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**: 857-60.
90. **Seder, R.A. and W.E. Paul.** 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* **12**: 635-73.
- 90a. www.smart-trial.org
91. **Stellbrink, H.J., J. van Lunzen, P. Racz et al.**. 1998. Kinetics of productive and latent HIV infection in lymphatic tissue and peripheral blood during triple-drug combination therapy with or without additional interleukin-2. *Journal of Experimental Medicine* **187**: 949-59.
92. **Tenner-Racz, K., H.J. Stellbrink, J. van Lunzen, P. Racz et al.**. 1998. The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. *J Exp Med* **187**: 949-59.
93. **UNAIDS and WHO**, 2006. AIDS epidemic update. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO).
94. **van Baalen, A.D. Osterhaus et al.**. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol* **78**: 1913-8.

95. **Vila, J., J.M. Seigneurin et al.**. 1997. Absence of viral rebound after treatment of HIV-infected patients with didanosine and hydroxycarbamide [letter]. *Lancet* **350**: 635-6.
- 95a. **Vogel, M., M. Lichterfeld, JK Rockstroh et al.**. Structured Treatment Interruptions Following Immediate Initiation of HAART in Eight Patients with Acute HIV-1 Seroconversion. *Eur J Med Res* **11**: 273-8.
96. **Walker, B.D., A. Luster et al.**. 2003. Immune Control and Immune Failure in HIV Infection. in *10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Boston, MA, USA.
97. **Walker, B.D., R.T. Schooley et al.**. 1987. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *nature* **328**: 345-8.
- 97a. **Walker, B.D. et al.**. 2006. Immune control of HIV infection: Predictability in the midst of chaos. in *13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Denver, Colorado, USA. Abstract 98.
98. **Yerly, S., L. Perrin.** 2000. Decay of cell-associated HIV-1 DNA correlates with residual replication in patients treated during acute HIV-1 infection. *AIDS* **14**: 2805-12.
99. **Yu, X.G., M. Altfeld et al.**. 2002. Consistent patterns in the development and immunodominance of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8+ T-cell responses following acute HIV-1 infection. *Journal of Virology* **76**: 8690-701.
- 99a. **Zaunders, J.J., A.D. Kelleher et al.**. 2006. Infection of CD127+ CD4+ cells and overexpression of CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4 T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **80**: 10162-72.
100. **Zhang, L., M. Markowitz, and D.D. Ho et al.**. 2000. Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* **106**: 839-45.
101. **Zimmerli, S.C., G. Pantaleo et al.**. 2005. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 7239-44.

8 Danksagung

Diese Arbeit ist in größter Dankbarkeit gewidmet meinen Eltern, **Karin und Jürgen Boesecke**, der den Abschluß leider nicht mehr erleben kann.

Meinem Doktorvater **PD Dr. med. Jan van Lunzen** und **Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Stellbrink** kann ich gar nicht genug für die intensive, freundliche und höchst kompetente Betreuung danken.

Dr. rer. nat. Ingrid Stahmer hat mich in kürzester Zeit angesteckt – mit Ihrer grenzenlosen Begeisterung für die naturwissenschaftliche Forschung im Allgemeinen und die Immunologie im Speziellen.

Dres. med. Heiko und Arne B. Jessen entwickelten sich im Laufe der Jahre zu meinen Vorbildern ärztlichen Handelns.

Birgit Carstens, Claudia Peters und Janine Mohn haben mir mit Ihrer beruflichen Professionalität und Menschlichkeit die Arbeit im HIV-Labor unermesslich erleichtert. Den **technischen Assistentinnen aus dem Routinelabor** des Instituts für Immunologie danke ich für die freundlich gewährte Obhut.

Mein Bruder, **Philip Boesecke**, hat sich nicht zuletzt mit seiner EDV-Hilfe unentbehrlich gemacht.

Ekki Stein danke ich für die stetige, oft kräftezehrende Unterstützung in allen Bereichen.

Mein ganz besonderer Dank gilt den **Patienten** dieser Studie.

9 Lebenslauf

Name	Christoph Boesecke
Geburtsdatum	14.01.1977
Geburtsort	Lüneburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Schulbildung	
08/1989 - 06/1996	Gymnasium Johanneum zu Lüneburg
08/1987 - 06/1989	Orientierungsstufe Kaltenmoor, Lüneburg
08/1983 - 07/1987	Grundschule, Wendisch Evern
Zivildienst	
08/1996 - 09/1997	Kindertagesstätte für behinderte Kinder, Lüneburg
Studium	
11/2004	Approbation als Arzt
04/1998 - 11/2004	Studium der Humanmedizin an der Charité, Universitätsmedizin Berlin
07/2001	Beginn einer klinisch-experimentellen Doktorarbeit im HIV- Labor des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg
Famulaturen	
09/2002	Famulatur in der Medizinischen Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg
04/2002	Famulatur im Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg
09/2001	Famulatur in der Kinderklinik des Städt. Klinikums Lüneburg
09/2000	Famulatur in der Allgemein- und HIV-Schwerpunktpraxis Dres. Jessen, Berlin
Praktisches Jahr	
06/2004 - 10/2004	3. PJ-Tertial in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Charité Campus Mitte, Universitätsmedizin Berlin
02/2004 - 06/2004	2. PJ-Tertial in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Teneriffa
10/2003 - 02/2004	1. PJ-Tertial in der Klinik für Innere Medizin, Paritätisches Krankenhaus Lichtenberg, Berlin
Weiterbildung	
04/2005 - 09/2006	Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin in der HIV-Schwerpunktpraxis Dres. Jessen, Lehrpraxis der Charité, Berlin

Berlin, November 2006

10 Eidesstattliche Versicherung

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

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