

Aus der I. Medizinischen Klinik
des Zentrums für Innere Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. A. Lohse

***De novo*-Entstehung von CTL-Antworten gegen
NRTI- resistente HIV-1-Varianten**

Dissertation zur Erlangung eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

Simone Kaiser
aus Rheinfelden/Baden

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am 21.08.2009.

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H.-J.- Stellbrink.

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. M. Aepfelbacher.

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. J. van Lunzen.

Auszüge dieser Arbeit wurden vorgestellt auf dem
10. Deutschen und 16. Österreichischen AIDS-Kongress in Wien 2005 und der
13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections in Denver 2006.

Inhaltsverzeichnis

1 Fragestellung	6
2 Einleitung	7
2.1 Das humane Immundefizienz-Virus HIV-1	7
2.1.1 Struktur und Aufbau von HIV-1.....	7
2.1.2 Der Replikationszyklus von HIV-1.....	8
2.2 Epidemiologie der HIV-Infektion	10
2.3 Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion	11
2.4 HIV- Immunologie	12
2.4.1 Die zelluläre Immunantwort.....	12
2.4.1.1 Zytotoxische T-Lymphozyten.....	12
2.4.1.2 Das MHC-I-Molekül und Peptidbindungsmuster.....	13
2.4.1.3 Die Rolle der zellulären Immunantwort in der HIV-Infektion.....	15
2.4.2 Die humorale Immunantwort.....	16
2.5 HIV- Vakzineforschung	17
2.5.1 Prophylaktische Vakzine.....	17
2.5.2 Therapeutische Vakzine.....	18
2.6 HIV-Therapie	19
2.7 Resistenzen	21
2.7.1 Nomenklatur.....	21
2.7.2 Grundlagen.....	21
2.7.3 Resistenzen und virale Fitness.....	22
2.7.4 Resistenztestung.....	22
2.7.4.1 Phänotypische Resistenzanalyse.....	23
2.7.4.2 Genotypische Resistenzanalyse.....	23
2.7.5 Epidemiologie.....	23
3 Methoden	25
3.1 Patienten	25
3.2 Isolierung und Einfrieren der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)	26
3.3 HLA-Typisierung und genotypische Resistenzanalyse	27
3.4 Affinitätsvorhersage	28
3.4.1 SYFPEITHI.....	28
3.4.2 BIMAS.....	29
3.4.3 Datenbanksuche.....	30
3.5 ELISpot	30
3.6 Ermittlung der CD8-Zellzahl am Durchflusszytometer (FACS-Analyse)	33

4 Ergebnisse	35
4.1 Patienten	35
4.2 Affinitätsvorhersage	36
4.2.1 Auswahl der verwendeten Peptide	36
4.2.2 Einfluss der Mutationen auf die Affinitätsvorhersage	42
4.2.3 Korrelation der Bindungsvorhersagen der beiden Datenbanken	44
4.3 ELISpot-Antworten	45
4.3.1 Antworten gegen M41L	46
4.3.2 Antworten gegen M184V/I.....	53
4.3.3 Antworten gegen L210W.....	62
4.3.4 Antworten gegenüber einzelnen Peptiden	62
4.4 Vergleich Vorhersage - ELISpot-Antwort	65
4.4.1 Vergleich vorhergesagte Bindungsaffinität – ELISpot-Antwort.....	65
4.4.2 Einfluss der Mutationen auf Bindungsvorhersage und ELISpot-Antwort.....	68
5 Diskussion	70
6 Zusammenfassung	79
7 Abkürzungsverzeichnis	80
8 Literaturverzeichnis	83

1 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht, wie durch bestimmte Nukleosidische-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) induzierte HIV-1-Resistenzmutationen die Erkennung viraler Peptide durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) beeinflussen. Sie geht der Frage nach, ob das Auftreten dieser Mutationen zu einem *CTL-escape*, das heißt einem Verlust der CTL-Erkennung, oder zu einer verbesserten CTL-Erkennung führt beziehungsweise ob durch diese Mutationen neue Epitope für die CTL-Erkennung entstehen.

Der Einfluss der Reverse-Transkriptase-Mutationen M41L, M184V, M184I und L210W auf die CTL-Erkennung wird anhand longitudinaler Analysen der Proben von 5 HLA-A2-positiven HIV-1-infizierten Patienten untersucht, welche zu mindestens einem Zeitpunkt eine beziehungsweise mehrere dieser Mutationen aufwiesen.

Im ersten Teil der Arbeit wird eine Datenbankanalyse mittels zweier MHC-Bindungs-Vorhersagealgorithmen durchgeführt. Hierbei wird die Bindungsaffinität aller Peptide, welche die Positionen der untersuchten Resistenzmutationen überlappen, zu den MHC-I-Molekülen der getesteten Patienten bestimmt. Da die MHC-Bindung eine Voraussetzung für die CTL-Erkennung darstellt, sollen so mögliche durch die Mutation neu entstehende CTL-Epitope identifiziert werden. Durch die parallele Testung der Wildtyp- und der mutanten Varianten wird eine Vorhersage über den Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Bindungswahrscheinlichkeit getroffen.

Im zweiten Abschnitt werden dann die Peptide hoher Affinität zusammen mit ihren korrespondierenden Wildtyp- beziehungsweise mutanten Varianten mittels ELISpot-Analyse auf ihre CTL-Erkennung hin untersucht. Hierbei sollen Unterschiede in der CTL-Erkennung der mutanten und der Wildtyp-Varianten herausgestellt werden und untersucht werden, ob durch das Auftreten der Mutationen *de novo* CTL-Antworten induziert werden können. Abschließend werden die Ergebnisse der Datenbank-Vorhersage mit den ELISpot-Ergebnissen in Korrelation gesetzt und anhand dessen auch ein Vergleich der Vorhersagequalität der beiden verwendeten Algorithmen durchgeführt.

2 Einleitung

2.1 Das humane Immundefizienz-Virus HIV-1

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein humanpathogener Vertreter der Lentiviren, welche zur Familie der Retroviren gehören. Der weltweit vorkommende Virusstamm HIV-1 wird unterteilt in die 3 Gruppen M, N und O, wobei die Gruppe M zusätzlich in die Subtypen A bis I unterteilt wird. Der Subtyp B ist der am häufigsten vorkommende in Europa und Nordamerika. Außerdem existiert auch noch ein Virusstamm HIV-2, welcher hauptsächlich in Westafrika vorkommt. Die folgenden Ausführungen beziehen sich ausschließlich auf HIV-1.

2.1.1 Struktur und Aufbau von HIV-1

Das Genom des HI-Virus ist deutlich komplexer als das anderer Retroviren. Neben den bei Retroviren üblichen Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* besitzt HIV-1 noch sechs akzessorische Gene (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*), welche hauptsächlich regulatorische Funktionen besitzen.

Reife HIV-Partikel bestehen aus einem konischen Nukleokapsid, welches von einer Lipid-Doppelmembran umgeben ist. Das Nukleokapsid wird vom Kapsidprotein p24 gebildet, welches aus dem Vorläuferprotein *gag* prozessiert wird. Das Nukleokapsid enthält 2 Kopien der einzelsträngigen RNA und die virusspezifischen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN), welche aus dem Vorläuferprotein *pol* prozessiert werden.

Die Membran enthält das *env*-Protein, ein Heterodimer aus dem membranständigen gp41 und dem externen gp120 [108]. Vgl. Abb. 1.

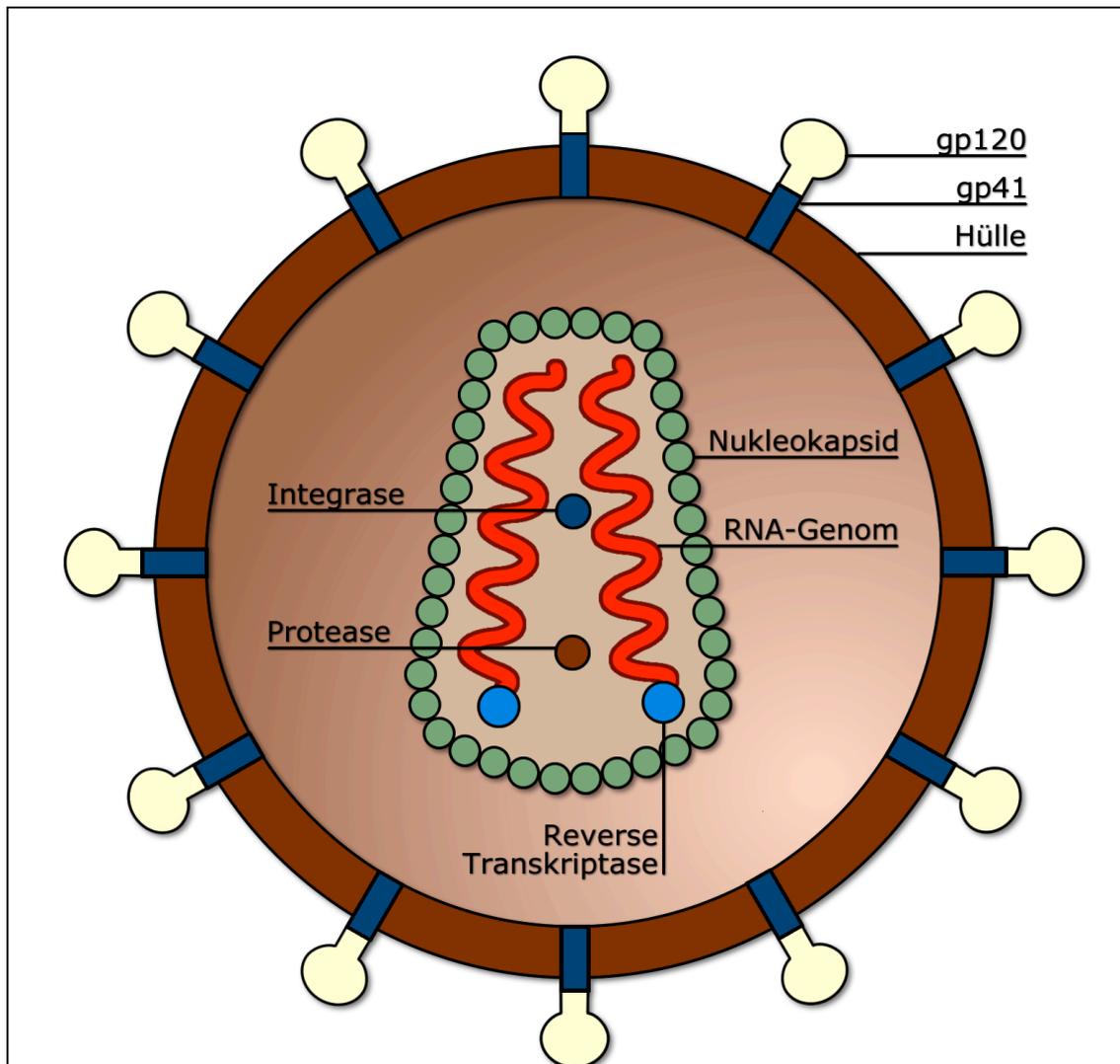


Abb. 1: Struktur von HIV-1 (Urheberschaft liegt beim Verfasser).

2.1.2 Der Replikationszyklus von HIV-1

Das CD4-Antigen als Rezeptor für das HI-Virus wurde erstmals 1984 beschrieben [24], zehn Jahre später wurden die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 als Co-Rezeptoren identifiziert [28], [34]. Die Verteilung dieser Rezeptoren auf den menschlichen Immunzellen ermöglicht dem HIV-1-Virus nicht nur die Infektion von CD4+-T-Helferzellen, sondern auch von Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs). So genannte M-trope Virusisolate, welche CCR5 als Co-Rezeptor verwenden, infizieren hauptsächlich Makrophagen, die T-tropen Viren, welche im späteren Krankheitsstadium häufiger auftreten, infizieren vor allem CD4+-T-Lymphozyten über den CXCR4-Co-Rezeptor [22].

Die Infektion der Wirtszelle beginnt mit der Anlagerung des externen Teils des Hüllproteins (gp120) an den CD4-Rezeptor. Durch die Anlagerung von gp120 an Rezeptor und Co-Rezeptor wird jeweils eine Konformationsänderung bewirkt, wodurch das transmembranale Protein gp41 mit der Zellmembran der Wirtszelle in Kontakt kommt und die Fusion der Zellmembranen eingeleitet wird [29].

Das virale Nukleokapsid wird ins Zytoplasma der Wirtszelle eingeschleust. Nachdem sich das Nukleokapsid aufgelöst hat, wird das virale Genom durch die viruseigene Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Durch die virale Integrase wird dann die Insertion der viralen DNA in das Wirtsgenom katalysiert [35]. Die Integration in transkriptionsaktive, genreiche Regionen der Wirts-DNA wird dabei durch den wirtseigenen Wachstumsfaktor LEDGF/p75 gesteuert [16].

Nach der Integration kann eine Phase genetischer Latenz eintreten [15]. Bei Aktivierung der Zelle setzt die Replikation mit Transkription durch zelluläre RNA-Polymerasen und anschließender Translation in die viralen Proteine ein. Die *env*-Proteine werden in die Zellmembran inseriert und lagern sich dort mit den übrigen Proteinen zusammen.

Schließlich knospen sich neue Viruspartikel ab, die abschließende Reifung des Virus erfolgt durch die virale Protease. Eine Zusammenfassung des Replikationszyklus gibt Abb. 2.

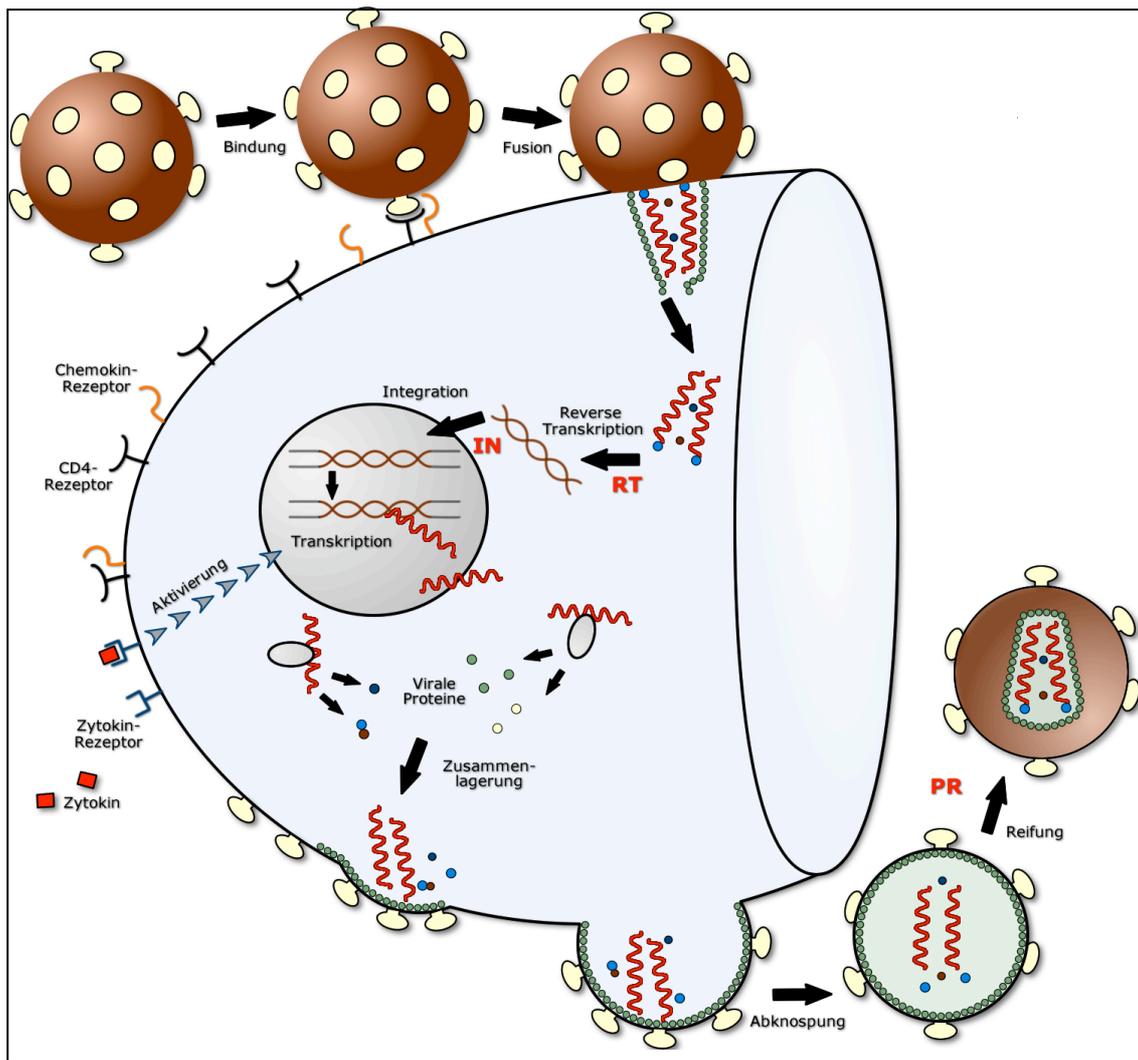


Abb. 2: Replikationszyklus von HIV-1 (Urheberschaft liegt beim Verfasser).

2.2 Epidemiologie der HIV-Infektion

Die weltweite HIV/AIDS-Epidemie stellt eines der größten Gesundheitsprobleme der heutigen Zeit dar. Laut WHO gab es im Jahr 2007 weltweit 33,2 Millionen HIV-Infizierte, bei 2,5 Millionen Neuinfektionen und 2,1 Millionen Todesfällen [109]. Seit dem Jahr 1981, als die ersten Fälle von AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrom) beschrieben wurden, sind mehr als 25 Millionen Menschen an AIDS verstorben. Am stärksten von der Epidemie betroffen sind dabei die afrikanischen Länder südlich der Sahara, wo allein 22,5 Millionen mit dem HI-Virus infizierte Menschen leben [109].

Während sich die Prävalenzraten der HIV-Infektion im südlichen Afrika in den meisten Staaten auf sehr hohem Niveau zu stabilisieren scheinen (z.B. Lesotho: 23,5%, Botswana: 25,2% der 15-49jährigen Erwachsenen) oder sinken (Kenia,

Zimbabwe) [110], nimmt die Anzahl HIV-infizierter Menschen in anderen Regionen der Welt dramatisch zu. Vor allem die Region Osteuropa und Zentralasien und hier vor allem Russland verzeichnet den proportional stärksten Zuwachs an Infektionen [109]. Während sich in Afrika südlich der Sahara die Menschen vor allem über heterosexuellen Geschlechtsverkehr infizieren, verbreitet sich das Virus in Osteuropa und Zentralasien hauptsächlich unter i.v. Drogengebern.

In den Ländern West- und Mitteleuropas sowie Nordamerikas ist die Prävalenz der HIV-Infektion vergleichsweise niedrig (0,3-0,6% der 15-49jährigen Erwachsenen) [109]. In Deutschland lag die geschätzte Zahl der HIV-Infizierten Ende 2007 bei 59.000 [93]. Allerdings steigt die Zahl der Neuinfektionen seit dem Jahr 2000 kontinuierlich an und lag 2007 bei geschätzten 3000 Neuinfektionen [93].

2.3 Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion

Der natürliche Verlauf der HIV-1-Infektion beschreibt die zeitlich aufeinander folgenden Phasen der HIV-Infektion, wie sie ohne antiretrovirale Therapie auftreten.

Die Primärinfektion mit HIV-1 manifestiert sich in 40-90% mit eher unspezifischen, zum Teil grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit, Exanthenen, Lymphadenopathie, Arthralgie, Myalgie, Appetitverlust und Pharyngitis [50], welche meist nur 7-10 Tage anhalten. Im Blut sind zu diesem Zeitpunkt bis zu 10^8 Viruspartikel/ml nachweisbar, die Zahl der CD4-positiven T-Helferzellen nimmt signifikant ab. Mit Einsetzen der zellulären Immunantwort wenige Wochen nach der Erstinfektion und der Bildung HIV-spezifischer Antikörper (Serokonversion) geht die Virusmenge im peripheren Blut deutlich zurück und stabilisiert sich auf einem individuellen Niveau. Dieser so genannte „virale Setpoint“ korreliert eng mit dem Abfall der CD4+-T-Helferzellen und der weiteren Krankheitsprogression [66].

Die 5-10 Jahre nach der Primärinfektion, in denen die Infektion asymptomatisch und die Viruslast niedrig bleibt, wurden früher als „Latenzphase“ bezeichnet. Heute weiß man jedoch, dass auch in diesem Stadium große Mengen an Virus produziert werden, diese aber zum größten Teil vom Immunsystem eliminiert werden [51]. Im Verlauf der HIV-1-Infektion nehmen die CD4+-T-Lymphozyten langsam aber stetig ab. Da diese Zellen als Schaltstellen für die humorale und zelluläre Immunabwehr fungieren, wird der infizierte Organismus zuletzt empfänglich für so genannte opportunistische Infektionen, es

kommt zur Entstehung von AIDS. Die verschiedenen Stadien der HIV-Infektion werden nach der so genannten CDC-Klassifikation eingeteilt (Tab. 1).

Tab. 1: CDC-Klassifikation der Krankheitsstadien der HIV-Infektion

Laborkategorie (Anzahl CD4-Zellen/ μ l)	Klinische Kategorie		
	A Asymptomatisch	B Symptomatisch, keine AIDS-definierenden Erkrankungen	C AIDS-definierende Erkrankung(en)
1: ≥ 500	A1	B1	C1
2: 200 – 499	A2	B2	C2
3: < 200	A3	B3	C3

2.4 HIV- Immunologie

2.4.1 Die zelluläre Immunantwort

2.4.1.1 Zytotoxische T-Lymphozyten

Wenige Wochen nach der Erstinfektion kommt es zur Aktivierung von CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Die CTL können über zwei unterschiedliche Wirkmechanismen die Lyse infizierter Zielzellen induzieren [63].

Zum einen binden die CTL mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) an virale Peptidfragmente, welche auf der Oberfläche der infizierten Zelle von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Aus der Interaktion von T-Zell-Rezeptor, CD8-Co-Rezeptor, Peptid und MHC-I-Molekül resultiert die Freisetzung von u.a. Perforin, das durch die Bildung von Poren in der Zellmembran der Zielzelle deren Lyse einleitet [73]. Bei der Bindung der CTL an die HIV-infizierten Zellen werden außerdem auch noch andere Zytokine freigesetzt, vor allem das antiviral wirkende Interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$) [75] sowie ein bis heute nicht einwandfrei identifizierter löslicher antiviraler Faktor [61].

Ein zweiter Mechanismus ist die Induktion der Apoptose HIV-infizierter Zellen über die Interaktion des Fas-Liganden (FasL) auf den CTL mit dem Fas-Molekül der Zielzellen [45].

Außerdem sezernieren die CTL auch die Chemokine MIP-1alpha, MIP-1beta und RANTES, welche als natürliche Liganden des HIV-Co-Rezeptors CCR5 die Replikation von M-tropen HIV-1-Virusisolaten inhibieren [19], [68].

2.4.1.2 Das MHC-I-Molekül und Peptidbindungsmuster

MHC-I- (wie auch MHC-II-) Moleküle werden durch den so genannten Major Histocompatibility Complex (MHC) kodiert. Für die menschlichen MHC-I-Moleküle, welche auch als Humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet werden, sind 3 Genloci bekannt: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Im Bereich des MHC-Genkomplexes findet sich ein enormer genetischer Polymorphismus. Für die einzelnen Genloci sind bis zu 464 (bei HLA-B) unterschiedliche Allele bekannt. Jedes Individuum besitzt jeweils 2 HLA-A, B und C-Allele.

MHC-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und präsentieren Fragmente intrazellulär synthetisierter Proteine und somit auch Teile der intrazellulär synthetisierten viralen Proteine. Sie bestehen aus einer die Zellmembran durchspannenden α -Kette und dem damit nicht-kovalent verbundenen β_2 -Mikroglobulin (Abb. 3).

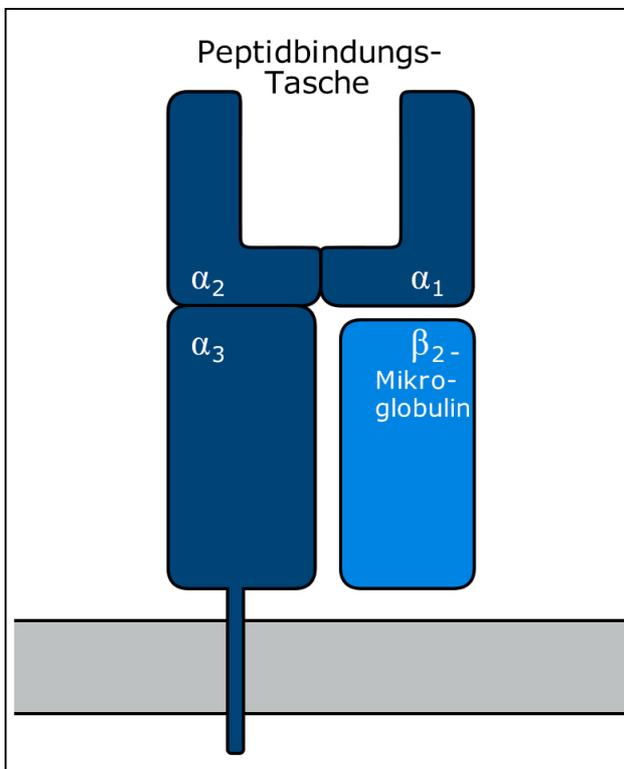


Abb. 3: Struktur des MHC-I-Moleküls (Urheberschaft liegt beim Verfasser).

Die α -Kette bildet eine Bindetasche für Peptide. Ein Teil der intrazellulär synthetisierten Proteine wird durch zytosolische Proteasekomplexe (Proteasomen) in kurze Peptidfragmente zerlegt. Ein kleiner Teil dieser Peptide wird durch den so genannten TAP-Transporter ins Endoplasmatische Retikulum transloziert, einzelne dieser Peptide in den Bindungstaschen der dort befindlichen MHC-I-Moleküle verankert und mit ihnen an die Zelloberfläche transportiert. Dieser Vorgang wird auch Antigenprozessierung genannt [80].

Die einzelnen MHC-I-Moleküle können Peptide unterschiedlicher Länge (8-11 Aminosäuren) und Struktur binden. Die Verankerung des Peptides in der Antigen-Bindungs-Grube findet dabei über 2 Aminosäuren statt, welche komplementär zu den Aminosäuren der Bindungstasche sein müssen. Die Länge und Struktur der Peptidsequenz zwischen diesen so genannten Ankeramino-säuren kann dabei variieren [1], [80] (Abb. 4).

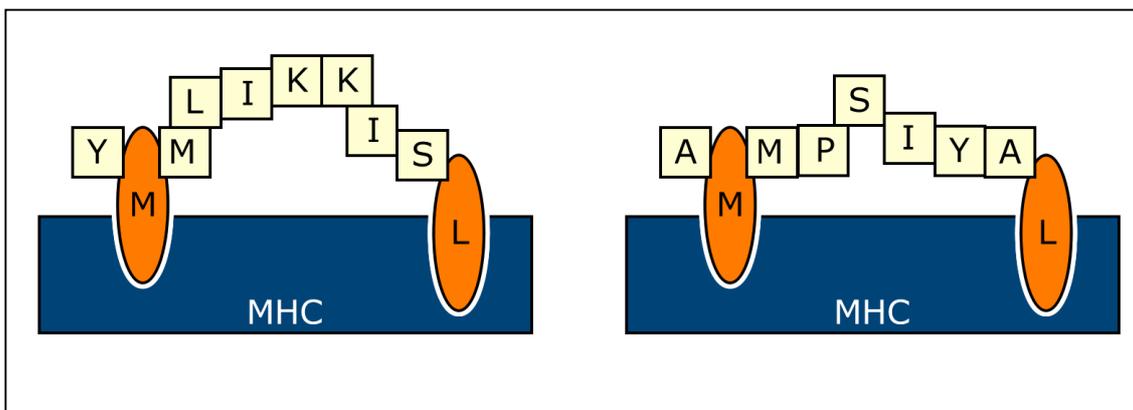


Abb. 4: Die MHC-I-Moleküle sind in der Lage, Peptide unterschiedlicher Länge und Sequenz zu binden. Die Aminosäuren an den Ankerpositionen, normalerweise an Position 2 und am C-Terminus müssen dabei komplementär zu den Peptidbindungsstellen sein. (Urheberschaft liegt beim Verfasser)

Durch ausgedehnte Sequenz-Vergleiche endogener, aus MHC-Klasse-I-Molekülen heraus gelöster, Peptide wurden für die unterschiedlichen HLA-Allele spezifische Peptidbindungs-Muster ermittelt [33]. Die Ankerpositionen (bei Nonameren die Position 2 sowie der C-Terminus) der aus einem bestimmten MHC-I-Molekül herausgelösten Peptide sind immer von denselben 1-3 und selten mehr Aminosäuren besetzt. Auch andere Positionen werden gehäuft von denselben Aminosäuren besetzt

und scheinen die Bindung somit mit zu beeinflussen. Sie werden als Hilfsankerpositionen bezeichnet [33].

Allerdings bleibt unklar, welchen Anteil die Spezifität der zytosolischen Proteasomen sowie der TAP-Transport an den allelspezifischen Peptidbindungsmustern besitzen [33] und bei einigen HLA-Molekülen ist kein eindeutiges Muster erkennbar [17], [18], [23]. Die Peptidbindungsmuster bilden die Grundlage für Algorithmen, welche die Bindungsaffinität von Peptiden zu MHC-I-Molekülen vorhersagen.

2.4.1.3 Die Rolle der zellulären Immunantwort in der HIV-Infektion

Die Rolle der CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) bei der Kontrolle der HIV-Infektion ist noch nicht gänzlich geklärt.

Im Affenmodell wurde gezeigt, dass CTL in der Lage sind, die Virusreplikation zu kontrollieren. So resultierte die Elimination von CD8-positiven T-Lymphozyten in chronisch mit dem Simianen Immunodefizienzvirus (SIV) infizierten Rhesusaffen in einem rapiden Anstieg der Viruslast, wohingegen nach Hinzugabe von SIV-spezifischen CTL die Virämie wieder supprimiert wurde [98]. Auch beim Menschen scheinen die zytotoxischen T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der HIV-Kontrolle zu spielen. So konnten HIV-spezifische CTL bei Personen nachgewiesen werden, welche trotz nachweislich ständiger Exposition gegenüber dem HI-Virus seronegativ blieben [67], [94]. In HIV-Infizierten, welche über 10 Jahre keine Progression der HIV-Infektion sowie eine extrem niedrige Viruslast aufwiesen, so genannten *controllers*, wurden höhere Mengen an HIV-spezifischen CTL gefunden als bei Patienten mit schneller Krankheitsprogression (*progressors*) [86]. Bei Patienten im Stadium der akuten Infektion ging eine starke CTL-Antwort einher mit einem raschen Abfall der Viruslast, wohingegen eine fehlende oder schwache CTL-Reaktion mit einer schlechten Kontrolle der Viruslast korrelierte [11], [54]. Auch einige andere Studien beschreiben eine inverse Korrelation zwischen CTL-Antwort und Viruslast [13], [30], [81].

Diese Ergebnisse konnten jedoch durch neuere und größer angelegte Studien nicht bestätigt werden. Weder Breite noch Höhe der totalen HIV-spezifischen CTL-Antworten korrelierten hier mit der Plasmavirämie [2], [37]. Auch können Patienten mit hoher Viruslast und schneller Krankheitsprogression durchaus starke CTL-Antworten aufweisen [27].

Wenn somit also kein direkter Zusammenhang zwischen einer hohen Gesamt-CTL-Antwort und einer niedrigen Viruslast nachweisbar ist, so gilt es als gesichert, dass CTL-Antworten gegen einzelne spezifische Epitope die Virusreplikation kontrollieren können. Denn wenn das Virus sich durch Selektionierung eines mutanten Virusstamms der CTL-Erkennung bestimmter Epitope entzieht (so genannter *CTL-escape*), so kommt es nachfolgend zu einem Anstieg der Viruslast und einer Beschleunigung des Krankheitsprozesses [10], [43]. Die Anpassung des HI-Virus an die, von den HLA-Klassen des Wirts bestimmte, zelluläre Immunantwort scheint die Virusevolution am Übergang von der akuten zur chronischen Infektion zu bestimmen. So treten über die Hälfte der neuen Mutationen in HLA-spezifischen CTL-Epitopen auf [4]. Neben der Evolution im einzelnen Individuum scheint die HLA-restringierte Immunantwort auch die HIV-Evolution auf Populationsniveau zu beeinflussen [60], [78].

2.4.2 Die humorale Immunantwort

Die Rolle der humoralen Immunantwort bei der Kontrolle der HIV-Infektion ist weniger gut charakterisiert als die der zellulären.

Bei der Kontrolle der akuten HIV-Infektion scheint sie eine untergeordnete Rolle zu spielen. In den ersten Monaten nach der HIV-Infektion werden zwar große Mengen an HIV-spezifischen neutralisierenden Antikörpern gebildet [91], das Plasmavirus entzieht sich der Neutralisation jedoch rasch mithilfe von Mutationen im Envelope-Gen, welche unter anderem eine Veränderung des Glycosylierungs-Musters des Hüllproteins bewirken [114]. Rhesusaffen, bei denen die B-Lymphozyten durch monoklonale Antikörper depletiert wurden, zeigten nach der Infektion mit SIV im Vergleich zu nicht depletierten Affen keine signifikanten Unterschiede im Wiederabfall der initialen Plasmavirämie [97].

Auch in ihrer Bedeutung für die Kontrolle der viralen Replikation während der chronischen Infektion bleibt die humorale Immunantwort hinter der zellulären zurück. Während bei den meisten *controllers* eine dauerhafte und starke CTL-Antwort nachweisbar ist, unterscheiden sich die Titer der neutralisierenden Antikörper bei den meisten dieser Patienten nicht signifikant von denen in Patienten mit chronisch progredientem Verlauf der Infektion (*progressors*) [8]. Erste Untersuchungen zum passiven Transfer von monoklonalen neutralisierenden Antikörpern an

asymptomatische HIV-Patienten zeigten jedoch eine zumindest transiente signifikante Reduktion der Viruslast [104] beziehungsweise einen verzögerten Rebound der Viruslast nach Absetzen der antiretroviralen Therapie [107].

Eine große Bedeutung haben die neutralisierenden Antikörper in der Vakzine-Forschung. Hohe Titer von passiv gegebenen neutralisierenden Antikörpern verhinderten die Infektion mit einem SIV-HIV-Hybridvirus (SHIV) im Affenmodell [83].

2.5 HIV- Vakzineforschung

2.5.1 Prophylaktische Vakzine

Seit über 20 Jahren wird massiv, aber bisher ohne durchschlagenden Erfolg nach einem prophylaktischen Impfstoff gegen das HI-Virus geforscht. Die bisherigen Erfahrungen deuten darauf hin, dass ein effektives Impfgeme die Induktion sowohl von neutralisierenden Antikörpern als auch einer T-Zell-vermittelten Immunantwort beinhalten sollte.

Die passive Verabreichung von monoklonalen neutralisierenden Antikörpern gegen ein Epitop auf dem HIV-Hüllprotein gp120 an Rhesusaffen direkt bevor diese mit einem SIV-HIV-Hybridvirus (SHIV) infiziert wurden, schützte diese vor der Infektion [83]. Bisher getestete gp120-Impfstoffe, zuletzt in Phase-III-Studien in USA und Thailand, konnten jedoch eine HIV-Infektion beim Menschen nicht verhindern [25], [85]. Das Problem bei der Entwicklung eines Impfstoffes, der breit neutralisierende Antikörper gegen das Hüllprotein *env* induzieren soll, welches das einzige für die humorale Immunantwort relevante HIV-Antigen darstellt [79], liegt unter anderem in der Oberflächenstruktur dieses Proteins. Die Erkennung immunodominanter Peptidstrukturen wird zum einen durch eine ausgeprägte Glykosylierung erschwert und zum anderen durch die fehlende Zugänglichkeit von strukturellen Domänen (CD4-Rezeptor, CCR5-Rezeptor) aufgrund von Überlagerungen durch hochvariable Proteinregionen [14], [118]. Es konnten inzwischen zwar fünf breit neutralisierende Antikörper aus dem Blut von Patienten mit einer guten Viruskontrolle isoliert werden (Review [74]), die Induktion der Synthese dieser Antikörper mittels eines Impfstoffes gelang bisher jedoch nicht. Als Grund hierfür wird angenommen, dass diese Antikörper

in ihrer Struktur Autoantikörpern ähneln und deshalb nicht produziert werden [49].

Eine CTL-vermittelte Viruskontrolle wurde in einem geimpften und anschließend mit dem SHIV-Virus infizierten Rhesusaffen nachgewiesen [10]. Eine vergleichbare CTL-vermittelte Viruskontrolle ließ sich jedoch beim Menschen mit keinem der bisher getesteten Vakzinestrategien erreichen, deren Spektrum von attenuiertem Lebendimpfstoff, inaktiviertem HI-Virus, DNA-Plasmiden, Proteinen bis hin zu viralen Vektoren unterschiedlichster Art reicht. Zwar konnte eine Verstärkung der CTL-Antworten durch Zugabe von Zytokinen wie z.B. IL-2 [9] oder durch so genannte Prime-Boost-Verfahren, welche verschiedene Einzelkomponenten in definierter zeitlicher Abfolge zu verknüpfen versuchen, erreicht werden [112], jedoch stellt vor allem die hohe Variabilität des HI-Virus sowie seine Fähigkeit, CTL-Antworten durch Escape-Mutationen zu entgehen, die Vakzineforschung vor große Probleme [25].

Die Probleme bei der Definition einer protektiven Funktion der Immunantwort haben zu einem veränderten Konzept der Vakzination mit dem Ziel der günstigen Beeinflussung des Infektionsverlaufs geführt.

2.5.2 Therapeutische Vakzine

Parallel zur Suche nach einem prophylaktischen Impfstoff wird auch nach so genannten therapeutischen Impfstoffen geforscht. Durch eine dauerhafte antiretrovirale Therapie (vgl. Kap. 2.6) kann bei den meisten Patienten eine effektive Viruskontrolle erreicht werden, allerdings wirken sich Resistenzentwicklung (vgl. Kap. 2.7) und Compliance-Probleme aufgrund teils gravierender Nebenwirkungen limitierend auf den Therapieerfolg aus. Zudem hat ein großer Teil der HIV-Infizierten keinen Zugang zu einer adäquaten antiretroviralen Therapie [110].

Das Ziel einer therapeutischen Vakzine ist die Verstärkung bereits vorhandener und/oder die Induktion von neuen Immunantworten, was idealerweise zu einer Viruskontrolle ohne antiretrovirale Medikamente oder aber zumindest zu einem erniedrigten Medikamentenbedarf führen und den Krankheitsverlauf verlangsamen soll. Zahlreiche Impfstudien mit inaktivierten HIV-Proteinen, HIV-Peptiden, DNA-Plasmiden und viralen Vektoren erbrachten keine signifikanten klinischen Vorteile für die untersuchten Patienten (Review [87]).

Erfolg versprechender waren zwei neuere Studien, in denen der Geflügelpockenvirus-Vektor zusätzlich das Gen für IFN γ enthielt [32] oder das Lipopeptid 6T als zusätzliches Adjuvans mit enthalten war und nach der Impfung subkutan Interleukin-2 injiziert wurde [62]. Nach mehrmaliger Immunisierung unterbrachen die Patienten für mehrere Wochen die antiretrovirale Therapie und in beiden Studien konnte eine signifikant bessere Viruskontrolle bei den geimpften Patienten im Vergleich zur Placebo-Gruppe beobachtet werden. Erfolg versprechend erscheint auch der Ansatz, Patienten mit mit inaktiviertem HI-Virus gepulsten autologen Dendritischen Zellen zu impfen. Hierbei kam es bei 18 chronisch HIV-infizierten Patienten, welche keine antiretrovirale Therapie erhielten, innerhalb eines Jahres zu einem Abfall der Viruslast um das 5-fache [64]. Diese neuen Ansätze lassen hoffen, dass die Kontrolle der HIV-Replikation ohne antiretrovirale Therapie möglich sein kann.

2.6 HIV-Therapie

Trotz der viel versprechenden Ansätze der Vakzineforschung stellt die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) zurzeit die einzige Möglichkeit dar, die Progression der HIV-Infektion zu verhindern bzw. zu verlangsamen. Aktuell stehen in Deutschland für die HIV-Therapie über 20 Einzelsubstanzen und Kombinationspräparate aus insgesamt sechs unterschiedlichen Wirkstoffklassen zur Verfügung (Stand 03/2008):

1. Nukleosidische und Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)
2. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)
3. Proteaseinhibitoren (PIs)
4. Fusionshemmer
5. CCR5-Inhibitoren
6. Integrasehemmer

Nukleosidische und Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)

Die NRTI stellen Analoga der Nukleoside Thymidin (Zidovudin, Stavudin), Cytidin (Lamivudin, Zalcitabin, Emtricitabin), Inosin (Didanosin) und Guanodin (Abacavir) sowie des Nukleotids Adenosin-Monophosphat (Tenofovir) dar. Ihr Ansatzpunkt ist das

HIV-Enzym Reverse Transkriptase. Als falsche Substrate konkurrieren sie mit den physiologischen Nucleosiden, von denen sie sich durch das Fehlen einer Hydroxylgruppe an der 3'-Position der Desoxyribose unterscheiden. Da diese Hydroxylgruppe unabdingbar für die Kettenverlängerung ist, führt ein Einbau der Analoga zum Kettenabbruch und somit zum Ende der Weitervermehrung des HI-Virus.

Nicht-nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)

Die Reverse Transkriptase ist auch das Zielenzym der NNRTI. Im Gegensatz zu den NRTI binden die NNRTI direkt und nicht-kompetitiv an eine RT-Bindungsstelle in der Nähe der Nucleosid-Bindungsstelle. Hierdurch wird die katalytisch aktive Bindungsstelle der Reversen Transkriptase blockiert und der Einbau der Nucleoside verlangsamt.

Protease-Inhibitoren (PI)

Die Protease-Inhibitoren blockieren das aktive Zentrum der Enzyms Protease und behindern so die Reifung der neuen Viruspartikel. Die abgeschnürten Virionen sind damit nicht infektiös und vermehrungsfähig.

Fusionsinhibitoren

Der einzige bisher zugelassene Vertreter dieser neuen Wirkstoffklasse ist Enfuvirtide (T20). Es bindet an das HIV-Protein gp41 und blockiert somit die Fusion des Virus mit der Wirtszelle.

CCR5-Inhibitoren

Der kürzlich zugelassene CCR5-Inhibitor Maraviroc bindet an den Co-Rezeptor CCR5 und verhindert so die Bindung M-troper Virusisolate an die Wirtszelle. Das Medikament ist daher nur wirksam bei Patienten, welche eine M-trope Viruspopulation aufweisen.

Integrase-Hemmer

Integrase-Hemmer hemmen das virale Enzym Integrase, welches als Endonuklease den Einbau der viralen DNA in das Wirtsgenom katalysiert. Ende 2007 ist mit Raltegravir (MK-0518) der erste Integrasehemmer in der EU zugelassen worden.

Da bei der Therapie mit einer einzigen oder zwei Substanzen sehr schnell Resistenzen auftreten, werden die Patienten grundsätzlich mit einer Kombination antiretroviraler

Medikamente behandelt - der so genannten hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART). Als Initialtherapie dienen Kombinationen aus zwei NRTI und einem PI bzw. einem NNRTI oder drei NRTI. Über den besten Zeitpunkt zum Beginn der antiretroviralen Therapie wird zurzeit noch kontrovers diskutiert. Unstrittig ist die Therapieindikation bei Patienten mit AIDS oder HIV-assoziierten Symptomen sowie bei Patienten mit einer CD4-Zellzahl von unter 200/ μ l. Empfohlen wird eine Therapie ab einer CD4-Zellzahl von unter 350/ μ l. Bei einer sehr hohen Viruslast (über 50.000 Kopien/ml) kann ein Therapiebeginn auch schon bei höheren CD4-Zellzahlen gerechtfertigt sein. Auch der Verlauf der Viruslast bzw. der CD4-Zellzahl kann für die Entscheidung zum Therapiebeginn eine Rolle spielen [7].

2.7 Resistenzen

2.7.1 Nomenklatur

Resistenzmutationen werden beschrieben durch ihre Position im Protein, die Abkürzung für die Aminosäure, welche im Referenzstamm diese Position besetzt und die Abkürzung für die Aminosäure nach dem Austausch. Eine Mischpopulation wird durch die Abkürzungen für alle vorhandenen Varianten angegeben. So beschreibt M184MV eine Viruspopulation, in welcher der Wildtyp-Virusstamm gemeinsam mit der resistenten Virusvariante vorliegt, in der Methionin (M) an Position 184 der RT-Sequenz durch Valin (V) ersetzt ist.

2.7.2 Grundlagen

Die Entwicklung von Resistenzen ist eine der Hauptursachen für das Versagen der antiretroviralen Therapie. Durch eine hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase und fehlendes Korrekturlesen (*proofreading*) weist das HI-Virus eine extrem hohe Mutationsrate auf. Hierdurch entstehen ständig neue Virusvarianten, welche auch als Quasispezies bezeichnet werden [20]. In Gegenwart antiretroviraler Medikamente werden Quasispezies, die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber diesen Medikamenten aufweisen, zur dominanten Virusvariante selektioniert. Wie bei anderen antiviralen und antibiotischen Medikamenten auch, wirken sich eine verminderte

Compliance des Patienten sowie ein zu niedriger Wirkspiegel der Medikamente begünstigend auf diese Selektion aus [111].

Die Resistenzentwicklung gegenüber NRTIs und Proteaseinhibitoren ist ein gradueller Prozess. Eine einzige Mutation verursacht noch keine Resistenz, vielmehr kommt es erst durch die Kombination bestimmter Mutationen zu einem signifikanten Sensitivitätsverlust. Eine Ausnahme bildet dabei die Mutation M184V, welche durch Lamivudin, Emtricitabin, Abacavir und Didanosin selektioniert wird [40], [48], [76], [117]. Der Austausch der Aminosäure Methionin durch Valin erzeugt eine hochgradige Resistenz gegenüber Lamivudin und Emtricitabin [40]. Auch bei den NNRTIs kann das Auftreten einer einzigen Mutation bereits eine Resistenz hervorrufen [84].

2.7.3 Resistenzen und virale Fitness

Resistenzmutationen aller Substanzklassen können die virale Fitness beeinträchtigen [47], [55], [65], [69]. Mit viraler Fitness wird die Fähigkeit eines Virus bezeichnet, sich in einer bestimmten Umgebung zu vermehren. Die Replikationskapazität des Virus wird durch die Resistenzmutationen, welche Schlüsselproteine der viralen Replikation verändern, in unterschiedlichem Ausmaß beeinträchtigt. Teilweise können die Defizite in der viralen Replikationskapazität durch weitere Mutationen kompensiert werden – so wird zum Beispiel der Fitnessverlust durch die Proteasemutation L90M durch den Polymorphismus L63P voll kompensiert – bei anderen Mutationen, wie der Proteasemutation D30N, bleiben Replikationsdefizite trotz Co-Mutationen bestehen [69].

Bei den Reverse-Transkriptase-Mutationen führen vor allem die durch Lamivudin, Emtricitabin, Abacavir und Didanosin selektionierten Mutationen M184V, M184I und K65R zu hohen Fitnessverlusten [21], [39], [77], [102]. Die so genannten Thymidinanalogamutationen (TAMs) M41L, D67N, K70R und L210W sowie die NNRTI-Resistenz-assoziierten Mutationen K103N und Y181C führen zu einer vergleichsweise geringen Beeinträchtigung der viralen Replikationskapazität [21], [48].

2.7.4 Resistenztestung

Das Resistenzprofil eines HIV-infizierten Patienten kann auf zwei unterschiedliche Arten ermittelt werden.

2.7.4.1 Phänotypische Resistenzanalyse

Bei der phänotypischen Resistenzanalyse wird die Empfindlichkeit des Virus gegenüber Medikamenten direkt quantifiziert. Hierfür wird die Replikationsfähigkeit des Plasmavirus oder eines rekombinanten Virus mit der Pol-Region des Patientenvirus in Zellkulturen, welche die antiretrovirale Substanz in steigenden Konzentrationen enthalten, gemessen und mit der eines Wildtyp-Virus verglichen. Die IC₅₀ (*inhibitory concentration* 50%) gibt hierbei die Wirkstoffkonzentration an, welche ein Virus auf 50% der Aktivität reduziert, die es in einer Zellkultur ohne Medikament aufweist. Der Faktor, um den die IC₅₀ des getesteten HIV-Isolats höher ist, als die IC₅₀ des Wildtyp-Virus, wird mit einem definierten Cut-off Wert verglichen. Dieser legt fest, wie hoch der Faktor sein darf, damit das HIV-Isolat noch als sensitiv eingestuft werden kann.

2.7.4.2 Genotypische Resistenzanalyse

Für die genotypische Resistenzanalyse wird das Reverse Transkriptase- bzw. Protease-Gen sequenziert und die Sequenz mit der eines definierten Wildtyps (Konsensussequenz) verglichen. Da für die meisten antiretroviralen Medikamente Mutationen beschrieben sind, die mit einer verminderten Sensitivität assoziiert sind, liefert die Genotypisierung einen indirekten Nachweis für eine Resistenz. Im klinischen Alltag wird meist die Genotypisierung zur Resistenztestung herangezogen. Zum einen, weil sie im Gegensatz zur Phänotypisierung mit einem geringeren Zeit- und Kostenaufwand verbunden ist, zum anderen kann sie mit dem Nachweis von resistenten Minoritätenstämmen (ab einem Anteil von 10-20% an der Gesamtpopulation nachweisbar) auch Hinweise auf eine mögliche Resistenzentstehung liefern.

2.7.5 Epidemiologie

Größere Studien über Resistenzen bei Patienten unter HAART-Therapie aus Großbritannien und den USA zeigen, dass bis zu 88% der Patienten mindestens eine resistenzassoziierte Mutation aufwiesen [90], [100]. Berücksichtigt man die Tatsache, dass nur solche Patienten untersucht wurden, welche eine Viruslast von über 500/μl [90] bzw. 2000/μl [100] aufwiesen, wird die tatsächliche Resistenzrate immerhin noch bei mindestens 50% aller behandelten Patienten liegen. Die größte Prävalenz erreichen dabei die NRTI-assoziierten Mutationen.

Die Prävalenzraten medikamentenresistenter Virusstämme bei therapienaiven Patienten (Primärresistenzen) sind regional sehr unterschiedlich. In zwei europaweiten Studien (CASCADE, CATCH) mit 438 bzw. 2208 therapienaiven Patienten lag die Prävalenz von Primärresistenzen in den Jahren 1995 bzw. 1996 bis 2002 bei durchschnittlich 9,6% bzw. 10,3% [72], [116]. In Deutschland zeigen die Daten der Serokonverterstudie 2006 eine Prävalenzrate von 14% an Primärresistenzen bei Patienten mit nicht länger als 3 Jahre zurückliegendem Infektionszeitpunkt [92]. Im Gegensatz zur CASCADE-Studie, welche eine leichte Zunahme der Primärresistenzen von 1995-2002 beschreibt [72], konnte im Beobachtungszeitraum der Serokonverterstudie (1996-2005) sowie der CATCH-Studie (1996-2002) keine signifikante Zunahme der Transmission medikamentenresistenter HIV-Viren insgesamt beobachtet werden [92], [116]. In allen drei Studien nahm die Übertragung von NNRTI-Resistenzen im untersuchten Zeitraum deutlich zu, während die NRTI-Primärresistenzen abnahmen.

3 Methoden

3.1 Patienten und Mutationen

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie bestimmte NRTI-Mutationen die Erkennung durch cytotoxische T-Lymphozyten beeinflussen und ob CTL-Reaktionen gegenüber mutanten Peptiden *de novo* entstehen können.

Als zu untersuchende Mutationen wurden die NRTI-Resistenzmutationen M41L, M184V, M184I und L210W ausgewählt, da diese Mutationen die Aminosäuresequenzen von Peptiden verändern, welche als optimale CTL-Epitope definiert sind, nämlich die der RT-Peptide RT 32-41 (ALVEICTEM; HLA-A2), RT 33-43 (ALVEICTEMEK; HLA-A3), RT 179-87 (VIYQYMDDL; HLA-A2) und RT 202-10 (IEELRQHLL; HLA-B60) (vgl. [38]).

Die untersuchten Patienten entstammen einer prospektiv nachverfolgten HIV-positiven Patientenkohorte der Infektionsambulanz der Medizinischen Klinik am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf. Als gemeinsames Auswahlkriterium der untersuchten Patienten wurde das HLA-Allel A2 ausgewählt, da es das am häufigsten vorkommende HLA-A-Allel in der kaukasischen Bevölkerung darstellt. Die Häufigkeit des HLA-A2-Allels in Deutschland beträgt 51,2% [3].

Zunächst wurde ein Patient (Patient 1) untersucht, welcher bereits beim Eintritt in die Kohorte die 3 Mutationen M41L, M184V und L210W aufwies. Für den eigentlichen Ansatz dieser Arbeit, nämlich die Analyse der Veränderung der CTL-Antworten durch das Auftreten der NRTI-Mutationen wurden 4 Patienten zu 2 bzw. 3 Zeitpunkten untersucht, bei denen durch genotypische Resistenzanalysen im Verlauf das Neuaufreten einer oder mehrerer der vorgenannten Mutationen nachgewiesen wurden (Patienten 2-5).

Die fünf Patienten waren im Median 51 Jahre alt (20-70 Jahre). Patient 2 befand sich im Stadium der symptomatischen HIV-Infektion (CDC-Stadium B), die Patienten 1, 3 und 4 im Stadium der chronischen, aber asymptomatischen HIV- Infektion (CDC-Stadium A). Patient 5 befand sich zum Untersuchungszeitpunkt 1 (T1) im Stadium der Serokonversion, zum Zeitpunkt 2 (T2) im Stadium der asymptomatischen Infektion. (Tab. 2)

Tab. 2: Patienten-Charakteristika

Patient	Geschlecht	Alter (T1)	CDC-Stadium	CD4- Zellen Nadir / μ l	HLA-Antigene
1	männlich	67	A2	275	A2, A68, B44, B51
2	männlich	70	B3	70	A2, A24, B27, B56
3	weiblich	38	A3	189	A2, A3, B35, B52
4	weiblich	51	A2	472	A2, A3, B13, B51
5	männlich	20	A2	347	A2, A29, B44, B62

Die Patienten 1, 2 und 4 befanden sich zum Zeitpunkt T1 bereits unter langjähriger antiretroviraler Therapie (62-170 Monate, Median 122 Monate), die beiden anderen Patienten standen zum Zeitpunkt T1 am Beginn der Therapie. Eine Übersicht über die Medikamente, welche die Patienten im Verlauf der Therapie bis zum Zeitpunkt T2 erhalten hatten, gibt Tab. 3

Tab. 3: Monate unter HAART und verwendete NRTIs und NNRTIs

Patient	Monate unter HAART		Medikamentation	
	T1	T2	NRTIs*	NNRTIs*
1	170		AZT, 3TC, ABC, ddI	EFV, NVP
2	122	168	AZT, 3TC, ddC, ddI, d4T, TDF	EVF, DLV, NVP
3	2	66	AZT, 3TC, ABC, TDF	EFV
4	62	102	3TC, ddI, d4T, TDF	EFV
5	0	12	AZT, 3TC	NVP

* AZT: Zidovudin; 3TC: Lamivudin; ddC: Zalcitabin; d4T: Stavudin; ddI: Didanosin; TDV: Tenofovir; ABC: Abacavir; EFV: Efavirenz; DLV: Delaviridin; NVP: Nevirapin

3.2 Isolierung und Einfrieren der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Venöses Blut wurde in Vacutainer CPTTM Cell Preparation Tubes, welche Natriumcitrat als Antikoagulanzen und eine Gelschicht enthalten, abgenommen. Diese Röhren erlauben eine einfache Auftrennung des Blutes in monozytäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten), Plasma und die restlichen Blutbestandteile. Pro Patient und Zeitpunkt wurden je 4 Röhren à ca. 8ml Blut verwendet.

Die Röhren wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten mit 2000xg (3000U/pm) zentrifugiert. Dadurch entsteht wie bei einer Ficoll-Separation eine Schicht aus

monozytären Zellen, die durch das Gel von den dichteren Erythrozyten getrennt wird. Das Plasma verbleibt im Überstand. Zunächst wurden je 2ml von dem Plasma abgenommen, in 4 Einfrierröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Die monozytären Zellen wurden dann mit dem restlichen Plasma in ein 50ml-Polypropylenröhrchen überführt und die CPTs mit je 8 bis 10ml PBS gewaschen, um noch anhaftende Zellen zu ernten. Die Röhrchen wurden bei 4°C für 10 Minuten mit $400\times g$ (1500 U/pm) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4,5ml RPMI resuspendiert. Nach Zugabe der gleichen Menge Einfriermedium (30% RPMI, 30% Gelifundol (Plasmaexpander), 20% FCS (Fötales Kälberserum), 20% DMSO (Dimethylsulfoxid)) wurden die Zellen zügig, da das DMSO im Einfriermedium bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkt, in 1,8ml-Aliquots auf zuvor beschriftete Einfrierröhrchen verteilt und bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Verwendete Reagenzien	Firma	Katalognummer
Vacutainer CPT TM	Becton Dickinson	16549
Cryotube 1,8ml	Nunc	377267
50ml-Polypropylenröhrchen	Falcon	352070
PBS	Gibco	14190-094
RPMI	Gibco	21875-034
Gelifundol	Biotest	184.190-09
FCS	Biochrom	S0115
DMSO	Fluka	41640

3.3 HLA-Typisierung und genotypische Resistenzanalyse

Die HLA-Klasse-I-Antigene wurden serologisch mit dem so genannten Lymphozytotox-Test bestimmt [106]. Die genotypische Resistenzanalyse wurde mithilfe des ViroSeqTM HIV Genotyping Systems durchgeführt. Dieses System erlaubt eine Sequenzierung der kompletten Protease sowie der Codons 1-335 der Reversen Transkriptase. Die ermittelte Virussequenz wird mit dem WHO-Referenzstamm HXB2

(B-consensus-Sequenz) verglichen und so Resistenzmutationen und Polymorphismen ermittelt.

3.4 Affinitätsvorhersage

Wegen der begrenzten Menge an verfügbarem Probenmaterial der Patienten zu den verschiedenen Zeitpunkten konnten nicht alle Peptide, welche die Positionen der zu untersuchenden Mutationen (RT-Codons 41, 184 und 210) überlappen, direkt im ELISpot auf CTL-Antworten getestet werden. Es musste daher zunächst eine Vorauswahl getroffen werden, welche der mutanten und Wildtyp-Peptide aus den entsprechenden Regionen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die MHC-I-Moleküle der Patienten präsentiert werden würden und so in der Lage wären, eine CTL-Antwort zu induzieren. Hierzu wurde eine Datenbankabfrage mithilfe zweier im Internet frei zugänglicher Algorithmen (SYFPEITHI, BIMAS) durchgeführt. Diese Algorithmen bieten Vorhersagen über die wahrscheinliche Bindungsstärke (Affinität) eines Peptides zu einem bestimmten MHC-Molekül an.

3.4.1 SYFPEITHI

Die Datenbank SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) basiert auf Daten über Peptide, welche aus MHC-I-Komplexen herausgelöst wurden und somit CTL-Epitope darstellen. Bei ausreichender Datenmenge für ein bestimmtes MHC-I-Molekül werden aus diesen Informationen Datentabellen erstellt, welche jeder Aminosäure für jede mögliche Position in der MHC-Bindungstasche einen bestimmten Wert zuordnen. Dieser Wert leitet sich daraus ab, wie oft die Aminosäure an dieser Position innerhalb der natürlichen Epitope erscheint und ob die Position eine Anker- oder Hilfsankerposition darstellt. Aminosäuren, die sehr häufig in einer Ankerposition (Position 2 oder C-Terminus) auftauchen, erhalten für diese Position den Wert 10, weniger häufige 8, seltene 6. Aminosäuren, welche in Hilfsankerpositionen auftauchen, erhalten Werte von 4-6 und sonstige bevorzugte Aminosäuren an bestimmten Positionen Werte von 1-4. Aminosäuren, welche die Bindung negativ beeinflussen, erhalten negative Werte bis minus 3, solche, welche die Bindung nicht erkennbar negativ oder positiv beeinflussen, erhalten den Wert 0.

Bei Eingabe einer Peptidsequenz in die Datenbank wird diese in ihre Okta-, Nona- und Dekamere (Peptide bestehend aus 8, 9 und 10 Aminosäuren) unterteilt. Für jedes Oligomer wird dann die Summe aus den Werten für die einzelnen Aminosäuren, aus denen sich das Peptid zusammensetzt, berechnet. Diese Summe wird als *score* bezeichnet. Die Oligomere werden nach Peptidlänge getrennt (Okta-, Nona- und Dekamere) und nach der Höhe ihrer *scores* absteigend angeordnet in *score*-Listen angezeigt. Für die einzelnen MHC-I-Moleküle werden jeweils nur die Peptidlängen angegeben, die diese bevorzugt binden, so z.B. für HLA-B8 Okta- und Nonamere, für HLA-A*2705 nur Nonamere und für HLA-A*0201 Nona- und Dekamere [88]

3.4.2 BIMAS

Die *scores* bei BIMAS (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) basieren für die meisten HLA-Allele, wie bei SYFPEITHI auch, auf Daten von natürlichen CTL-Epitopen. Die Werte für HLA-A*0201 hingegen leiten sich aus experimentellen Daten über das Bindungsverhalten exogen zum MHC-I-Komplex hinzu gegebener Peptide ab. Es wurde die Dissoziationshalbwertszeit von MHC-I-Peptid-Komplexen in Abhängigkeit vom gebundenen Peptid untersucht. Durch den Vergleich von jeweils 2 Peptiden, welche sich in nur einer Aminosäure unterscheiden, wurde ermittelt, wie eine Aminosäure an einer bestimmten Position die Bindung beeinflusst. Wie bei SYFPEITHI wurden aus den Daten für die jeweiligen MHC-I-Moleküle Tabellen abgeleitet, welcher jeder Aminosäure an jeder möglichen Position einen bestimmten Wert zuordnen. Die Werte für Aminosäuren, welche die Bindung positiv beeinflussen, sind dabei immer größer als 1, Aminosäuren in dominanten Ankerpositionen können einen Wert von bis zu 100 erreichen. Aminosäuren, welche die Bindung negativ beeinflussen, erhalten positive Werte unter 1 und Aminosäuren, welche die Bindung weder erkennbar positiv noch negativ beeinflussen, erhalten den Wert 1. Die Werte der einzelnen Aminosäuren werden hier aber nicht wie bei SYFPEITHI addiert, sondern multipliziert. Abschließend wird das Produkt noch mit einer für jedes HLA-Allel festgelegten Konstante multipliziert. Der resultierende *score*-Wert soll mit der Dissoziationshalbwertszeit des MHC-Molekül-Peptid-Komplexes bei 37°C und einem pH von 6.5 korrelieren [82].

3.4.3 Datenbanksuche

Für diese Untersuchung wurden die Datenbanken SYFPEITHI und BIMAS gemeinsam verwendet, da nicht alle HLA-Allele der untersuchten Patienten von einem Algorithmus alleine abgedeckt wurden. Wenn HLA-Allele von beiden Datenbanken angeboten wurden, wurden sie parallel untersucht. Drei HLA-Allele der Patienten (A29, B13, B56) wurden von keinem der beiden Algorithmen angeboten, es konnten aber für jeden Patienten mindestens 3 seiner HLA-Klasse-I-Allele untersucht werden. Die Datenbanksuche wurde für die Mutationen M41L, M184V, M184I und L210W durchgeführt. Obwohl die Mutation M184I bei keinem der Patienten in den Resistenzanalysen nachweisbar war, wurde sie zusätzlich untersucht, da sie häufig vor der Mutation M184V erscheint, mit deren Auftauchen jedoch genauso häufig wieder verschwindet [99], [113]. Eine Erklärung für das Verschwinden dieser Variante könnte eine starke CTL-Antwort gegen sie sein.

Es wurden die gesamte B-consensus-Wildtyp-Sequenz HXB2 der Reversen Transkriptase (RT) sowie die 4 RT-Sequenzen mit den Mutationen M41L, M184I, M184V und L210W jeweils für alle HLA-Allele der Patienten in die Datenbank eingegeben. Außerdem wurden auch die autologen Virussequenzen der Patienten 3, 4 und 5 jeweils mit und ohne Mutationen für die jeweiligen HLA-Allele in die Vorhersagealgorithmen eingegeben.

3.5 ELISpot

Um zu analysieren, gegen welche Peptide zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bei den Patienten vorhanden waren, wurden IFN γ -ELISpot-Analysen durchgeführt. Der IFN γ -ELISpot macht die Freisetzung von IFN γ durch einzelne CD8-Lymphozyten nach Zugabe von Peptiden (Okta- bis Dodekamere (Peptide aus 12 Aminosäuren)) sichtbar und ist so eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von spezifischen CTL.

Die verwendeten Peptide wurden zunächst mit DMSO und R+ (RPMI + 1% HEPES Puffer + 1% Penicillin-Streptomycin (5000 IU/ml Penicillin + 5mg/ml Streptomycin)) im Verhältnis 1:15 gelöst und die Stocklösung (2mg/ml) bei -80°C aufbewahrt. Für die ELISpot-Analyse wurden sie dann 1:10 in R+ verdünnt auf eine Endkonzentration von $200\mu\text{g/ml}$.

Mikrotiter-Platten mit 96 Vertiefungen (Wells) wurden mit 100µl pro Well eines auf eine Endkonzentration von 0,5µg/ml mit PBS verdünnten α -IFN γ -Antikörpers beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden dann sechsmal mit 200µl pro Well PBS gewaschen und mit 100µl pro Well bovinem Serumalbumin (20µg/ml) beschichtet und für 1,5–2h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die bei –196°C tiefgefrorenen PBMC wurden durch Hin- und Herschwenken der Probengefäße in warmem Wasser und rasches Überführen in ein mit 45ml warmem (37°C) RPMI gefülltes 50ml Falcon-Röhrchen so schnell wie möglich aufgetaut und sofort 8 Minuten bei 20°C und 400xg (1500U/min) abzentrifugiert, um die empfindlichen Effektorzellen durch das im Einfriermedium enthaltene zelltoxische DMSO nicht zu schädigen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgekippt und das Pellet in 10ml warmem RPMI resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 1ml R10 (RPMI + 10% FCS + 1% HEPES Puffer + 1% Penicillin-Streptomycin) aufgenommen und für 2h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen noch einmal zentrifugiert und das Pellet in 1 ml R10 resuspendiert. 10µl der Zellsuspension wurden 1:10 mit Trypanblau verdünnt und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Durch Zugabe einer entsprechenden Menge R10 wurde die Zellzahl auf 0,85-1,5x10⁶ Zellen pro ml eingestellt.

Das bovine Serumalbumin wurde von den Platten abgekippt und 30µl R10 pro Well hinzugegeben. Dann wurden jeweils 10µl der Peptide in 2 bzw. 3 Wells ausplattiert und 100µl pro Well Zellsuspension á 0,85-1,5x10⁵ Zellen hinzugegeben. Neben den mittels Datenbanksuche für die Untersuchung ausgewählten Peptiden wurden auch die bekannten optimalen Peptide für die jeweiligen HLA-Allele ausplattiert. Nur mit PBMC bestückte Wells dienten als Negativkontrolle und Wells mit PBMC plus 4µl Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA; 2mg/ml) und 2µl Ionomycin (1mg/ml) als Positivkontrolle.

Die Platten wurden 16–21h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden sie sechsmal gewaschen, wie bei allen folgenden Waschschritten mit 200µl pro Well unsterilem PBS (10%iges PBS mit destilliertem Wasser auf 1%iges PBS verdünnt). Danach wurden sie mit 100µl pro Well biotinyliertem anti-IFN γ -Antikörper in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml beschichtet und bei Raumtemperatur 60-90 Minuten inkubiert. Die Platten wurden erneut gewaschen und mit 100µl pro Well 1:2000 verdünnter Streptavidin-Phosphatase 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

nochmaligem Waschen wurden 50µl pro Well Substrat (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat/Nitro-Blau-Tetrazolium) hinzugefügt und die Platten bei Raumtemperatur 10 bis 20 Minuten inkubiert, bis die Positivkontrolle optimal reagierte, d.h die sich entwickelnden blauen Punkte (Dots) deutlich zu sehen waren. Anschließend wurden die Platten viermal mit Leitungswasser gewaschen, getrocknet und die Dots unter der Stereolupe ausgezählt. Die Dots in den Wells der Negativkontrolle wurden von dem Resultat jeweils abgezogen.

Da die Patienten über die verschiedenen Zeitpunkte variierende CD8-Zellzahlen aufwiesen, wurden die resultierenden Dots jeweils als prozentualer Anteil der tatsächlich in der Probe vorhandenen CD8-Zellen ausgedrückt. Der Anteil der CD3/CD8-positiven Zellen in der verwendeten Probe wurde mithilfe einer durchflusszytometrischen Messung ermittelt. Antworten, welche über die Negativkontrolle hinausgingen, wurden grundsätzlich als positiv betrachtet. Bei dieser Herangehensweise waren demnach auch Antworten, welche nur aus 1 Dot mehr als der Negativkontrolle bestanden, als positiv definiert. Um eine Unterscheidung treffen zu können zwischen solchen schwachen Antworten, bei welchen eine zufällige Abweichung von der Negativkontrolle nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte und starken Antworten, bei welchen eine zufällige Abweichung sehr unwahrscheinlich war, wurde der Grenzwert für starke (hochamplitudige Antworten) bei 0,01% der CD8-Zellen definiert. Dieser Wert entsprach im Mittelwert aller Messungen einer Antwort von 3,7 Dots/10⁵ CD8-Zellen (1,9-6,2 Dots).

Verwendete Reagenzien	Firma	Katalognummer
Peptide	EMC	
Multiscreen 96well- Platten	Millipore	MAIPS4510
anti-IFN γ Mab 1-D1k	Mabtech	3420-3-39
PBS Dulbecco's	Gibco	14190-094
Bovine Serum Albumin	Sigma	B-4287
RPMI 1640 Medium	Gibco	21875-034
FCS	Biochrom	S0115
Penicillin Streptomycin	Gibco	150070-063

Hepes Buffer	Gibco	156030-061
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat	Sigma	P-8139
Ionomycin	Sigma	I-0634
anti-IFN γ Mab7-B6-1-Biotin	Mabtech	34206-28
Streptavidin-ALP-PQ	Mabtech	37434-E
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat/ Nitro-Blau-Tetrazolium (Substrat)	Sigma	B-1911

3.6 Ermittlung der CD8-Zellzahl am Durchflusszytometer (FACS-Analyse)

Um den prozentualen Anteil der in der Probe vorhandenen CD8-Zellen an der Gesamtzellzahl zu bestimmen, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Nach Färbung der Zellen mit bestimmten Antikörpern können damit sowohl Oberflächenantigene als auch intrazelluläre Antigene nachgewiesen werden.

Für die Färbung wurde die verbleibende Zellsuspension aus dem ELISpot-Versuch, mindestens aber 300 μ l, auf drei 5ml Rundbodenröhrchen verteilt, welche mit einem der folgenden Antikörpercocktails belegt waren:

1. 7,5 μ l Isotyp-Kontrolle γ 1-FITC/ γ 2-PE ; 7,5 μ l CD3-PerCp; 2,5 μ l CD4-APC
2. 7,5 μ l CD8-FITC; 7,5 μ l CD25-PE; 7,5 μ l CD3-PerCp; 2,5 μ l CD4-APC
3. ohne Antikörper

Die Röhrchen 1 und 2 wurden für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, anschließend mit 2ml PBS aufgefüllt und 8 Minuten bei 4°C und 400-450g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen mit 300 μ l 1%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Die Zellsuspension in Röhrchen 3 wurde mit 1ml PBS +2,5 μ l 1M CaCl₂ aufgefüllt und 8 Minuten bei 4°C und 400-450g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen wurden 20 Minuten bei 4°C mit 100 μ l 1M CaCl₂ und 5 μ l Annexin V-FITC inkubiert. Anschließend wurden 400 μ l PBS +1M CaCl₂ und 5 μ l Propidiumiodid (0,1mg/ml) hinzugegeben.

Von jedem Röhrchen wurden 20.000 Zellen am Durchflußzytometer (FACS-Calibur, Cellquest-Version 3.1.3) gemessen und der Anteil der CD8/CD3-positiven Zellen (T8-Zellen), CD8/CD25-positiven Zellen (aktivierte Zellen), und der Annexin/Propidiumiodid-positiven Zellen (tote Zellen) ermittelt.

Verwendete Reagenzien	Firma	Katalognummer
Simultest Control y1/y2 (Isotypkontrolle)	Becton Dickinson	342409
CD3-PerCp	Becton Dickinson	345766
CD4-APC	Becton Dickinson	345771
CD8-FITC	Becton Dickinson	345772
CD25-PE	Becton Dickinson	341011
Annexin V-FITC	Pharmingen	P-556419
Propidiumiodid	Sigma	P-4170
Paraformaldehyd	Merck	1.040.051.000

4 Ergebnisse

4.1 Patienten

Der Zeitraum zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten T1 und T2 beträgt bei den Patienten 2-5 im Median 43 Monate (12-64 Monate). Die Patienten 2-5 hatten zu T2 alle eine niedrigere Plasmavirämie als zu T1 (T1: 222850 Kopien/ml im Median (3000-617000 Kopien/ml); T2: 955 Kopien/ml im Median (195-2900 Kopien/ml)) und sprachen noch auf die antiretrovirale Therapie an. Bei Patient 1 lagen zum Zeitpunkt T1 nach langjähriger HAART-Therapie die Mutationen M41L, M184V und L210W vor. Auch die Patienten 2 und 4 waren zum Zeitpunkt T1 bereits unter HAART-Therapie und entwickelten zu T2 unter anderem die Mutationen L210W (Patient 2) beziehungsweise M41L (Patient 4) neu. Die Patienten 3 und 5 waren zum Zeitpunkt T1 noch therapienaiv und entwickelten die Mutationen M41L (Patient 3) und/oder M184V (beide) zum Zeitpunkt T2 bzw. T_{interim} neu (Tab. 4).

Tab. 4: HIV-Plasmavirämie, CD4-, CD8-Zellen, RT-Mutationen und Polymorphismen der untersuchten Patienten

Zeitpunkte (Monate nach T1)	HIV- RNA (Kopien/ mL)	CD4- Zellen/ µL	CD8- Zellen/ µL	RT –Mutationen	Relevante* RT- Polymorphismen
Patient 1					
T1	4620	275	1512	M41L, M184V, L210W, T215Y	V35I, E40F
Patient 2					
T1 (0)	47000	355	1915	M41L, D67N, M184V, T215Y	V35M, T39A, K43E
T2 (46)	2900	127	737	M41L, D67N, L74L/V, V118I/V, M184V, L210W, T215Y	V35M, T39A, K43E
Patient 3					
T1 (0)	3000	189	1083	Keine	V35T, T39R
T _{int.} (58)	240	490	1071	K103N, M184V, T215F	V35T, T39R
T2 (64)	195	356	1395	M41L/M, K103N, M184V, T215F	V35T, T39R
Patient 4					
T1 (0)	398700	472	1648	D67N, T69N/T, K70K/R, M184M/V, K191R, T215F, K219K/Q	T39A
T2 (40)	1600	966	1886	M41L, D67N, T69N, K70R, M184V, K101K/R, T215F, K219Q	T39A

Patient 5							
T1	(0)	617000	347	1145	Keine		Keine
T2	(12)	310	362	895	K101E, Y181C/Y, M184V, G190A		Keine

* Relevante RT-Polymorphismen = Polymorphismen innerhalb der Regionen der untersuchten Mutationen

4.2 Affinitätsvorhersage

4.2.1 Auswahl der verwendeten Peptide

Die Datenbanksuche mithilfe der Algorithmen SYFPEITHI und BIMAS diente dazu, die untersuchten Mutationen überlappende Peptide mit hoher Affinität zu den MHC-I-Molekülen unserer Patienten zu finden, welche möglicherweise neue CTL-Epitope darstellen würden. Sie ergab für die unterschiedlichen HLA-I-Allele jeweils Listen aller RT-Peptide absteigend angeordnet nach der Höhe des ihnen zugeordneten *score*-Wertes (zur Definition der *score*-Werte bei den beiden Datenbanken vgl. Kap. 3.4.1 und 3.4.2). Beim Vergleich der *score*-Listen von SYFPEITHI und BIMAS fällt zunächst auf, dass sich die Spannweite der ermittelten *score*-Werte bei den beiden Datenbanken deutlich unterscheiden. Bei SYFPEITHI erreichten die Peptide der RT-Sequenz *score*-Werte von -5 bis 32, bei BIMAS Werte von 0-10000. Die *scores* erreichten dabei für die einzelnen HLA-Allele unterschiedlich hohe Maximalwerte (*highscores*, Tab.5).

Tab. 5: Highscores der verschiedenen HLA-Allele (Auswahl)

SYFPEITHI				BIMAS			
HLA-Allel	High-Score	HLA-Allel	High-Score	HLA-Allel	High-Score	HLA-Allel	High-Score
A*0201	30	B*2705	23	A*0201	3636	B*3501	120
A*0203	19	B*2709	22	A*0205	84	B*4403	240
A3	32	B*4402	26	A3	180	B*5102	2662
A*2402	25	B*5101	31	A24	432	B*5103	132
A*6801	24	B62	23	B*2702	200	B*5201	270

Das Muster der Verteilung der *score*-Werte lässt sich für die beiden Datenbanken jeweils am Beispiel der Bindungsvorhersage für Nonamere für HLA-A*0201 aufzeigen. Für HLA-A*0201 ergaben sich bei SYFPEITHI *score*-Werte von -5 bis 30. Nur wenige Peptide erreichten dabei die höchsten Werte, die Verteilungskurve der *scores* fiel zu Beginn der Liste schnell zu den niedrigeren Werten hin ab. Schon das Peptid auf Rang

45 der *score*-Liste (von insgesamt 552 der RT-Sequenz) erreichte nur noch einen Wert von 50% des Höchstwertes (Abb. 5a). Bei BIMAS fiel die Verteilungskurve annähernd exponentiell ab. Schon das Peptid auf Rang 3 erhielt bereits nur noch einen Wert von 50% des höchsten Wertes in der *score*-Liste. Nur insgesamt 50 Peptide erhielten noch einen *score* von ≥ 1 bei einem Höchstwert von 570 (Abb. 5b).

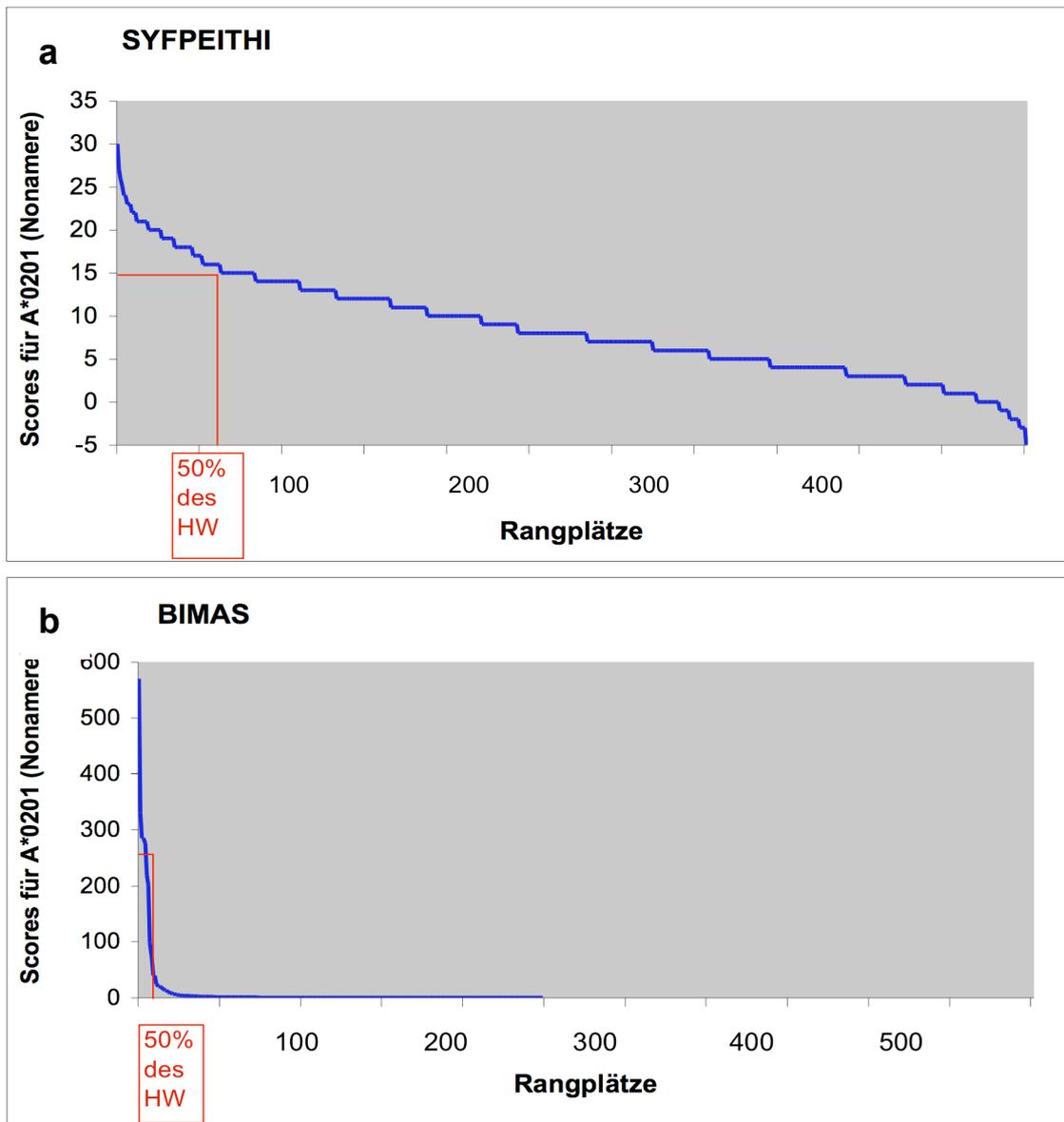


Abb. 5: Verteilung der *score*-Werte der Nonamere der RT-Sequenz für HLA-A*0201 bei SYFPEITHI (a) und BIMAS (b). Die Vorhersage war bei BIMAS nur bis Rang 250 möglich. HW = Höchster *score*-Wert eines Nonameres für HLA-A*0201.

Mithilfe der Informationen der Datenbanken musste nun eine auf beide Datenbanken anwendbare Definition für Peptide hoher Affinität gefunden werden. Die Festlegung eines bestimmten *score*-Wertes als Grenzwert zwischen hochaffinen und nicht hochaffinen Peptiden war nicht möglich, da ein Vergleich der *score*-Werte sowohl zwischen den einzelnen HLA-Allelen innerhalb einer Datenbank aufgrund der unterschiedlichen *highscores* als auch zwischen beiden Datenbanken aufgrund der unterschiedlichen Spannweite der *scores*, nicht möglich war. Die einzige auf beide Datenbanken und alle HLA-Allele anwendbare Definition war die Festlegung eines bestimmten Rangplatzes als Grenzwert zwischen hochaffinen und nicht-hochaffinen Peptiden. Die Autoren der beiden Algorithmen gehen davon aus, dass ein als Epitop präsentiertes Peptid mit 90%iger Wahrscheinlichkeit unter den bestplatzierten 2% der Peptide in den jeweiligen *score*-Listen erscheint [82], [88]. Um diese Aussage zu überprüfen, wurden 14 (SYFPEITHI) bzw. 18 (BIMAS) als CTL-Epitope beschriebene [38] RT-Peptide in die Datenbanken eingegeben. Diese erhielten Rangplätze von 5,5 (SYFPEITHI) bzw. 11 (BIMAS) im Median, was bei 552 möglichen RT-Peptiden einem Platz unter den besten 1% (SYFPEITHI) bzw. 2% (BIMAS) der Peptide entspricht. Von den als optimal definierten CTL-Epitopen rangierten aber immerhin 5 von 11 (36%; SYFPEITHI) bzw. 8 von 18 Peptiden (44%; BIMAS) nicht unter den ersten 2% einer *score*-Liste. (Tab. 6)

Tab. 6: Scores und Rangplätze der optimalen RT-Peptide*

HLA - Allel	Sequenz (Abk.)	Syfpeithi			Bimas		
		Score	Rang	% von 552	Score	Rang	% von 552
A*0201	YV9	24	5	0,9%	10,22	20	3,6%
	AM9	20	18	3,3%	20,369	14	2,5%
	VL9	21	11	2,0%	18,008	15	2,7%
	IV9	30	1	0,2%	39,025	11	2,0%
A3	GK9	22	16	2,9%	2,7	18	3,3%
	QR9	27	5	0,9%	2,25	22	4,0%
	ATK9	26	6	1,1%	20	11	2,0%
	KK10	27	3	0,5%	180	1	0,2%
A*1101	ATK9	20	14	2,5%	1,6	11	2,0%
	IK10	12	84	15,2%	0,4	25	4,5%
B8	GL9	38	1	0,2%	320	1	0,2%
B35	TY9				4	19	3,4%
	VY10				120	1	0,2%

	NY9				12	9	1,6%
B60	IL9				160	1	0,2%
B*5101	EI9	15	32	5,8%	1,9	89	16,1%
	TI8	31	1	0,2%			
B58	IW9				144	2	0,4%
B15 (62)	IY10	23	1	0,2%	377	1	0,2%
Median			5,5	1,0%		11	2,0%

* Optimale Peptide lt. [38].

Um die Sensitivität der Untersuchung zu erhöhen und kein mögliches CTL-Epitop zu übersehen, wurde für die vorliegende Untersuchung ein Peptid als hochaffin definiert, wenn es unter den besten 4% der Peptide auf einer *score*-Liste rangierte. Alle Peptide mit einem Rangplatz über 250 wurden dagegen als niedrigaffine Peptide klassifiziert. Aus der RT-Sequenz abgeleitete Peptide wurden somit folgendermaßen klassifiziert:

1. Hochaffine Peptide: Position 1-22 einer *score*-Liste.
2. Peptide mit mittelhoher Vorhersage: Position 23-250.
3. Peptide mit niedriger Vorhersage: Position 251-552.

Die Datenbanksuche für die HLA-Allele unserer Patienten ergab für die B-consensus-Sequenz insgesamt 23 Peptide, welche unter den besten 4% einer *score*-Liste rangierten. Peptide mit hoher Affinitätsvorhersage fanden sich für die HLA-Allele A*0201 (n=11), A3 (n=4), B44 (n=6) und B*2702 (n=2) und teilten sich auf in 9 Wildtyp-Peptide und 14 Peptide mit einer der Mutationen M41L (n=5), M184V (n=3), M184I (n=3) oder L210W (n=3). Die Eingabe der autologen Peptidsequenzen der Patienten 3 und 4 ergab 8 zusätzliche hochaffine Peptide (3 Wildtyp- und 5 mutante Peptide). Zusätzlich zu den hochaffinen Wildtyp- und mutanten Peptiden wurden jeweils auch die korrespondierenden mutanten bzw. Wildtyp-Peptide in den ELISpot-Analysen mitgetestet. Obwohl eine Vorhersage für Undekamere (Peptide aus 11 Aminosäuren) von keiner der beiden Datenbanken angeboten wurde, wurde das Peptid RT 33-43 ebenfalls in die ELISpot-Untersuchung miteinbezogen, da es als CTL-Epitop für HLA-A3 definiert ist [38]. Außerdem wurden 2 Peptide, welche für keines der untersuchten HLA-Allele eine hohe Vorhersage erreichten, als schwache Kontrollpeptide ausgesucht. Eine vollständige Übersicht der untersuchten Peptide geben Tab. 7 und Tab. 8.

Tab. 7: Übersicht über untersuchte B-consensus –Peptide

RT- Peptid ^a	HLA- Allel	Sequenz ^b	Mutationen	Score		Rang	
				SYFP.	BIMAS	SYFP.	BIMAS
Hochaffine Peptide + korrespondierende Peptide							
32-41 M	A*0201	K <u>A</u> LVEICTEM		13	0,9	100	54
32-41 L	A*0201	K <u>A</u> LVEICTE <u>L</u>	M41L	19	3,8	21*	29
33-41 M	A*0201	A <u>L</u> VEICTEM		20	20,4	18*	14*
33-41 L	A*0201	A <u>L</u> VEICTE <u>L</u>	M41L	26	87,6	3*	9*
34-43 M	A3	L <u>V</u> EICTEM <u>E</u> K		22	4	14*	15*
34-43 L	A3	L <u>V</u> EICTE <u>L</u> E <u>K</u>	M41L	24	4	8*	15*
40-49 M	A3	E <u>M</u> EKEGKISK		12	12	143	7*
40-49 L	A3	E <u>L</u> EKEGKISK	M41L	22	12	14*	7*
41-50 M	B*4402	M <u>E</u> KEGKISKI		22		9*	
41-50 L	B*4403 B*4402	L <u>E</u> KEGKISKI	M41L	22	9	9*	19*
178-87 M	B*4403 A*0201	I <u>V</u> IYQY <u>M</u> DD <u>L</u>		17	9 3,6	33	19* 32
178-87 V	A*0201	I <u>V</u> IYQY <u>V</u> DD <u>L</u>	M184V	21	3,6	11*	32
178-87 I	A*0201	I <u>V</u> IYQY <u>I</u> DD <u>L</u>	M184I	21	3,6	11*	32
179-87 M	A*0201	V <u>I</u> YQY <u>M</u> DD <u>L</u>		21	18	11*	15*
179-87 V	A*0201	V <u>I</u> YQY <u>V</u> DD <u>L</u>	M184V	25	18	4*	15*
179-87 I	A*0201	V <u>I</u> YQY <u>I</u> DD <u>L</u>	M184I	25	18	4*	15*
181-89 M	A*0201	Y <u>Q</u> Y <u>M</u> DDLY <u>V</u>		14	570,9	85	1*
181-89 V	A*0201	Y <u>Q</u> Y <u>V</u> DDLY <u>V</u>	M184V	14	570,9	85	1*
181-89 I	A*0201	Y <u>Q</u> Y <u>I</u> DDLY <u>V</u>	M184I	14	570,9	85	1*
202-10 L	B*4402	I <u>E</u> ELRQH <u>L</u> <u>L</u>		24		1*	
202-10 W	B*4403 B*4402	I <u>E</u> ELRQH <u>L</u> <u>W</u>	L210W	24	4	1*	29
203-12 L	B*4403 B*4402	E <u>E</u> LRQH <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>W</u>		26	12	1*	9*
203-12 W	B*4403 B*4402	E <u>E</u> LRQH <u>L</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>W</u>	L210W	25	36	3*	7*
205-14 L	B*4403 B*2702	L <u>R</u> QH <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>F</u>			36 200		7* 1*
205-14 W	B*2702	L <u>R</u> QH <u>L</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>F</u>	L210W		200		1*
Ausgewählte Peptide ohne Vorhersage							
33-43 M	A3	ALVEICTEM <u>E</u> K					
33-43 L	A3	ALVEICTE <u>L</u> E <u>K</u>	M41L				
Peptide mit niedriger Vorhersage							
34-42 M	A*0201	L <u>V</u> EICTEM <u>E</u>		7	< 0,003	280	> 250
34-42 L	A*0201	L <u>V</u> EICTE <u>L</u> E	M41L	7	< 0,003	280	> 250
41-49 M	A*0201	M <u>E</u> KEGKISK		5	< 0,003	331	> 250
41-49 L	A*0201	L <u>E</u> KEGKISK	M41L	7	< 0,003	280	> 250

^a Anfangs- und Endposition des Peptids in der RT-Sequenz. Der Buchstabe steht für die Wildtyp- bzw. mutante Aminosäure an der Stelle der zu untersuchenden Mutation.

^b Die jeweilige Mutation ist fettgedruckt. Die dominanten Ankerpositionen sind unterstrichen.

* Ein Asterisk steht für einen Rangplatz, welcher ein Peptid als hochaffin definiert.

Tab. 8: Übersicht über untersuchte autologe Peptide

RT- Peptid ^a	HLA- Allel	Sequenz ^b	Mutationen (Polymorphismen)	Score		Rang	
				SYFP.	BIMAS	SYFP.	BIMAS
Patient 3							
32-41M (a3)	A*0201	K <u>AL</u> TEICRE <u>M</u>	(V35T); (T39R)	13	0,2	100	97
32-41L (a3)	A*0201	K <u>AL</u> TEICRE <u>L</u>	(V35T); (T39R); M41L	19	0,8	21*	54
33-41M (a3)	A*0201	<u>AL</u> TEICRE <u>M</u>	(V35T); (T39R)	19	4,1	21*	26
33-41L (a3)	A*0201	<u>AL</u> TEICRE <u>L</u>	(V35T); (T39R); M41L	25	17,5	4*	15*
33-43M (a3)	A3	ALTEICREMEK	(V35T); (T39R)				
33-43L (a3)	A3	ALTEICRELEK	(V35T); (T39R); M41L				
Patient 4							
32-41M (a4)	A*0201	K <u>AL</u> VEICA <u>E</u> M	(T39A)	15	0,9	62	54
32-41L (a4)	A*0201	K <u>AL</u> VEICARE <u>L</u>	(T39A); M41L	21	3,8	11*	29
33-41M (a4)	A*0201	<u>AL</u> VEICA <u>E</u> M	(T39A)	22	20,4	10*	14*
33-41L (a4)	A*0201	<u>AL</u> VEICAE <u>L</u>	(T39A); M41L	28	87,6	2*	9*
33-43M (a4)	A3	ALVEICAEME <u>K</u>	(T39A)				
33-43L (a4)	A3	ALVEICAELE <u>K</u>	(T39A); M41L				
34-43M (a4)	A3	<u>L</u> VEICAEME <u>K</u>	(T39A)	22	4	13*	15*
34-43L (a4)	A3	<u>L</u> VEICAELE <u>K</u>	(T39A); M41L	24	4	8*	15*

^a Anfangs- und Endposition des Peptids in der RT-Sequenz. Der Buchstabe steht für die Wildtyp- bzw. mutante Aminosäure an der Stelle der zu untersuchenden Mutation.

^b Die jeweilige Mutation ist fettgedruckt. Die dominanten Ankerpositionen sind unterstrichen.

* Ein Asterisk steht für einen Rangplatz, welcher ein Peptid als hochaffin definiert.

4.2.2 Einfluss der Mutationen auf die Affinitätsvorhersage

Zur Veranschaulichung des Einflusses der Mutationen auf die Bindungsvorhersage der ausgewählten Peptide wurde jeweils der Quotient aus dem *score* des mutanten Peptides und dem *score* seines korrespondierenden Wildtyp-Peptides gebildet. Dieser Quotient wird im Folgenden als Index bezeichnet. Ein Index größer 1 zeigt an, dass die Mutation die Bindungswahrscheinlichkeit für das jeweilige Peptid erhöht, ein Index kleiner 1, dass die Vorhersage durch die Mutation erniedrigt wird.

In ihrem Einfluss auf die Höhe der Bindungsvorhersage unterschieden sich die einzelnen Mutationen deutlich. Die Mutation M41L erhöhte bei Peptiden, in welchen sie eine dominante Ankerposition veränderte (RT 32-41, 32-41(a3), 32-41(a4), 33-41, 33-41(a3), 33-41(a4), 40-49), die Bindungsvorhersage deutlich mit Indices von im Median 1,40 (1,27-1,83) bei SYFPEITHI (Abb. 6a) und 4,27 (1,00-4,30) bei BIMAS (Abb. 6b). Für die Peptide RT 34-43, 34-43(a4) und 41-50, in welchen keine dominante Ankerposition durch die Mutation betroffen war, verbesserte sich die vorhergesagte Bindungswahrscheinlichkeit durch die Mutation hingegen nicht bzw. nur leicht mit Indices von im Median 1,09 (1,00-1,09) bei SYFPEITHI (Abb. 6a) und 1,00 bei BIMAS (Abb. 6b).

Die ausgewählten Peptide mit der Mutation M184V hatten innerhalb der beiden Datenbanken jeweils die gleichen *score*-Werte zugeordnet bekommen wie die Peptide mit der Mutation M184I (vgl. Tab. 7 und Tab. 8), weshalb die beiden Mutationen nun gemeinsam besprochen werden. Die beiden Mutationen hatten bei SYFPEITHI und BIMAS unterschiedliche Auswirkungen auf die Bindungsvorhersage. Bei SYFPEITHI wurde die Vorhersage durch die Mutationen erhöht, wenn auch nicht so stark wie durch M41L (Index = 1,19 im Median; 1,00-1,24; Abb. 6a). Bei BIMAS hingegen änderte sich die Vorhersage durch die beiden Mutationen nicht (Index = 1,00 im Median; Abb. 6b). Bei keinem der ausgewählten Peptide befanden sich die Mutationen in einer Ankerposition.

Die Mutation L210W veränderte insgesamt die Vorhersage nicht bzw. erniedrigte sie leicht mit einem Index von 0,98 im Median bei SYFPEITHI (Abb. 6a) und 1,00 bei BIMAS (Abb. 6b). Für das Peptid RT 202-10, in welchem die Mutation die C-terminale Ankerposition veränderte, unterschieden sich die Vorhersagen der beiden Datenbanken. Bei SYFPEITHI hatte die veränderte Ankerposition keinen Einfluss auf die Vorhersage,

bei BIMAS verbesserte sich die Vorhersage durch den Austausch der Aminosäure deutlich (Index = 3) (Abb. 6a + b).

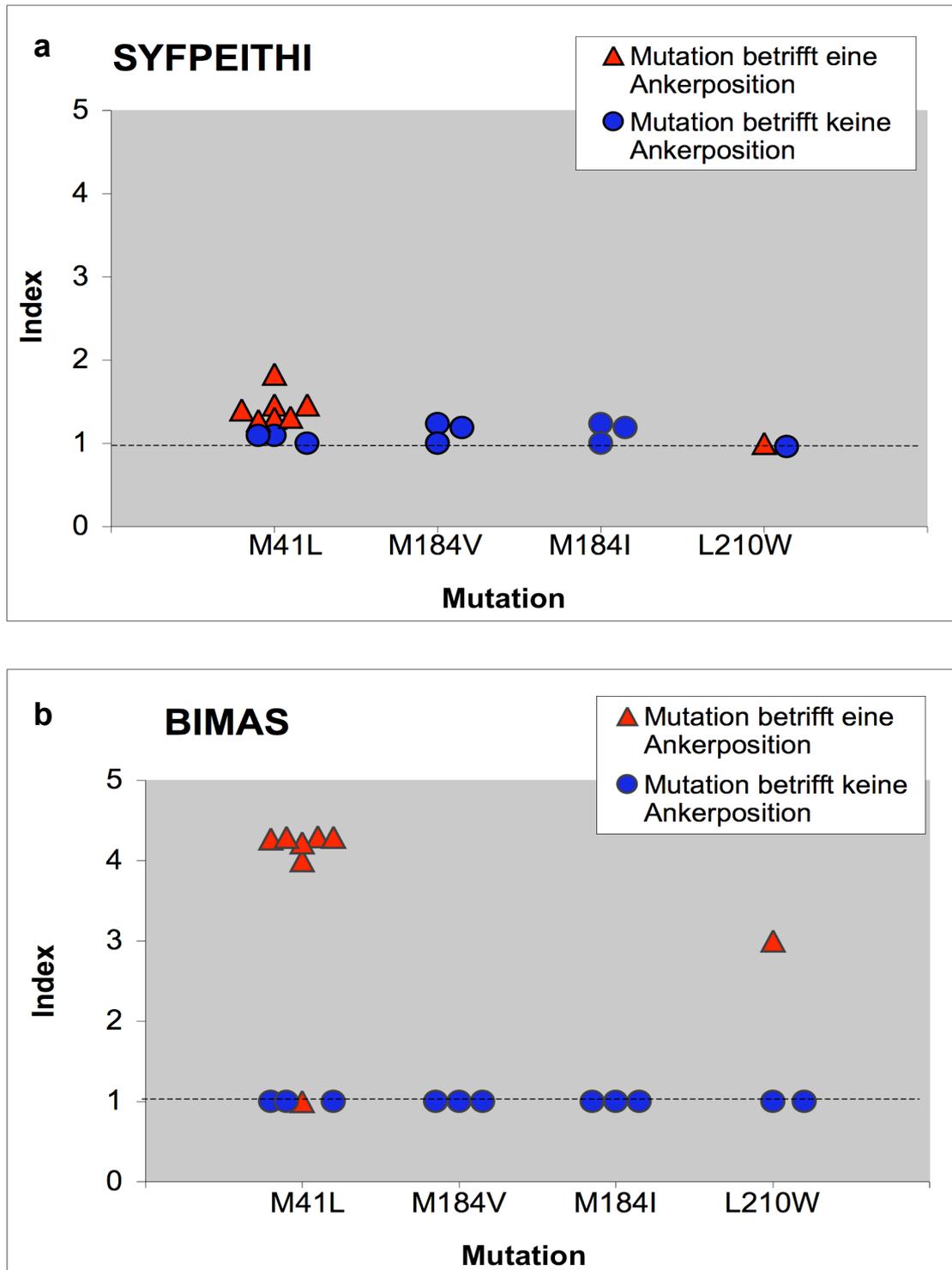


Abb. 6: Einfluss der Mutationen auf die Bindungsvorhersage bei SYFPEITHI (a) und BIMAS (b). Die Symbole stellen jeweils den Quotienten aus der Vorhersage für die mutante Variante und der Vorhersage für den Wildtyp eines RT-Peptides dar (Index = $score_{Mutante} / score_{Wildtyp}$). Blaue Kreise markieren Peptide, bei welchen die Mutation keine Ankerposition betrifft. Rote Dreiecke zeigen Peptide an, in welchen durch die Mutation eine Ankerposition verändert wird.

4.2.3 Korrelation der Bindungsvorhersagen der beiden Datenbanken

Betrachtet man die Bindungsvorhersagen für alle ausgewählten Peptide (vgl. Tab. 7 und Tab. 8) im Gesamten, korrelierten die Vorhersagen der Rangplätze bei SYFPEITHI positiv mit den Vorhersagen bei BIMAS (Pearson's Korrelationskoeffizient = 0,91; Abb. 7). Bei einzelnen Peptiden und bei der Art der Beeinflussung der Vorhersage durch die Mutationen gab es aber große Unterschiede. Die größten Unterschiede gab es dabei in der Vorhersage für die Peptide 181-89M, V und I im Rahmen von HLA-A*0201 und für das Peptid 40-49M für HLA-A3. Die Peptide 181-89M, V und I erhielten bei BIMAS für HLA-A*0201 alle den 1. Rangplatz zugeteilt, d.h. sie werden als diejenigen Peptide betrachtet, welche mit der höchsten Wahrscheinlichkeit von diesem HL-Antigen präsentiert werden. Dem 85. Rangplatz bei SYFPEITHI zufolge haben diese Peptide hingegen nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit als CTL-Epitope präsentiert zu werden. Auch das Peptid 40-49M wird bei BIMAS als hochaffines Peptid betrachtet (Rangplatz 7), bei SYFPEITHI nur als Peptid mit mittelhoher Vorhersage (Rang 143). Auch in der Vorhersage, in welcher Weise eine Mutation das Bindungsverhalten eines bestimmten Peptides beeinflussen wird, kamen die beiden Datenbanken teilweise auf unterschiedliche Ergebnisse. Die Mutationen M184V und I hatten bei BIMAS für HLA-A*0201 keinen Einfluss auf die Bindungsvorhersage (Index = 1) im Gegensatz zu SYFPEITHI – hier erhöhte die Mutation die Vorhersage (Index = 1,19 im Median; 1,00-1,24). Die Mutation L210W hatte bei SYFPEITHI keinen Einfluß auf die Vorhersage, auch wenn sie eine dominante Ankerposition betraf, bei BIMAS hingegen erhielt das mutante Peptid 202-10W, in welchem der C-Terminus durch die Mutation verändert wird, eine deutlich höhere Vorhersage als das Wildtyppeptid (Index = 3). Vgl. auch Kap. 4.2.2.

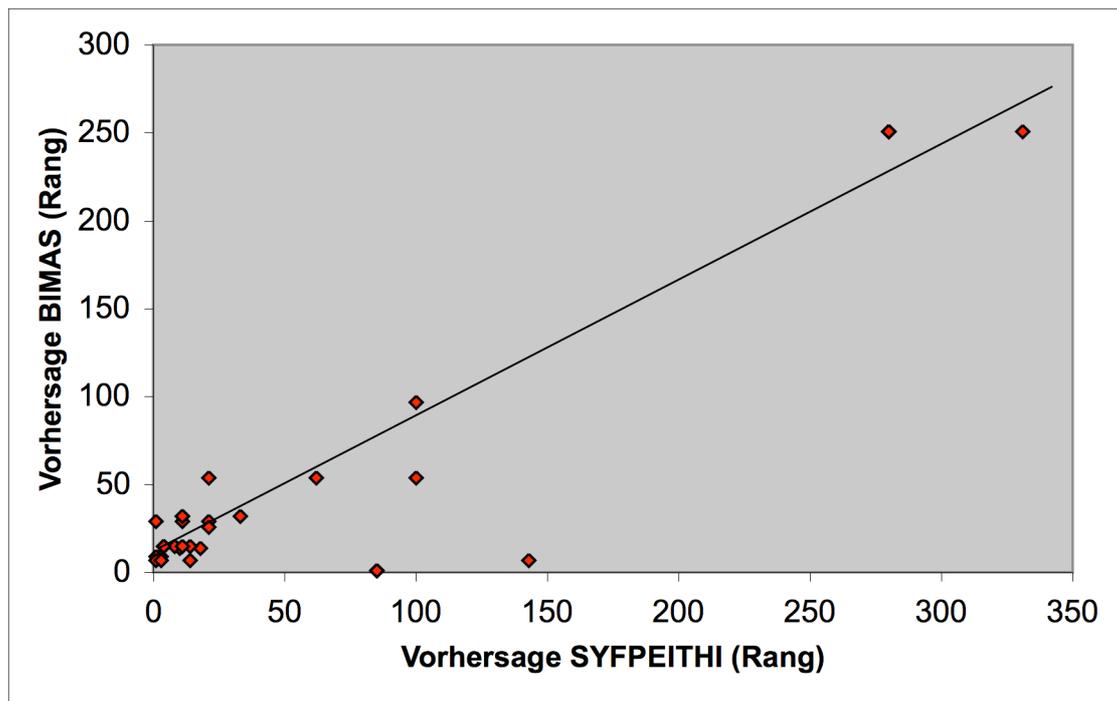


Abb. 7: Korrelation der Bindungsvorhersagen der ausgewählten Peptide bei BIMAS und SYFPEITHI.

4.3 ELISpot-Antworten

Abhängig vom Haplotyp und den vorhandenen Resistenzmutationen wurden bei den einzelnen Patienten jeweils die passenden Peptide im ELISpot auf IFN γ -Antworten getestet (Tab. 9). Alle Patienten zeigten IFN γ -Antworten sowohl gegen Wildtyp-Peptide als auch gegen mutante Virusvarianten, wobei die Antworten der Patienten 1 und 2 nur niedrige Amplituden erreichten (<0,01% der CD8+/CD3+-Zellen). Gegen die Mutationen M41L, M184V und M184I wurden hohe Antworten detektiert, wohingegen gegen die Mutation L210W nur Antworten niedriger Amplitude von < 0,01% der CD8+-Zellen nachgewiesen werden konnten.

Tab. 9: Übersicht über untersuchte Peptide bei den einzelnen Patienten

	M41L	M184V/I	L210W
Patient 1	32-41, 33-41, 34-42, 41-49, 41-50	178-87, 179-87, 181-89	202-10, 203-12
Patient 2	32-41, 33-41, 34-42, 41-49	178-87, 179-87, 181-89	205-14
Patient 3	32-41, 33-41, 33-43, 34-42, 34-43, 40-49, 41-49, 32-41 (a3), 33-41 (a3), 33-43 (a3)	178-87, 179-87, 181-89	
Patient 4	32-41 (a4), 33-41 (a4), 33-43 (a4), 34-43 (a4), 40-49, 41-49	178-87, 179-87, 181-89	
Patient 5		178-87, 179-87, 181-89	

4.3.1 Antworten gegen M41L

Peptide, welche die Mutation M41L beinhalten, und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide wurden für die Patienten 2 und 4 zu 2 Zeitpunkten (T1 und T2) im ELISpot getestet. Bei Patient 1 wurde nur ein Zeitpunkt untersucht, bei Patient 3 wurde zusätzlich ein Zwischenzeitpunkt (T_{interim}) 6 Monate vor T2 untersucht. Während die Mutation M41L bei den Patienten 1 und 2 schon zu T1 nachweisbar war, entwickelte sie sich bei den Patienten 3 und 4 zum zweiten Zeitpunkt T2 neu (Tab. 4).

Patient 1 erreichte gegen die getesteten Peptide keine Antworten hoher Amplitude. Er zeigte gegen 2 Wildtyppeptide (34-42W, 41-50W) sowie 3 mutante Virusvarianten (32-41L, 33-41L, 34-42L) schwache Reaktionen (0,001-0,004%). Nur das optimale Peptid IV9 wurde mit einer Antwort von über 0,01% (0,012%) erkannt. (Abb. 8).

Patient 2 erkannte zu T1 zwei mutante Peptide (32-41L, 33-41L) und zu T2 ein Wildtyp-Peptid (41-49M) mit jeweils niedriger Amplitude (0,002-0,003% der CD8-Zellen; Abb. 9). Diese niedrigen Antworten standen im Gegensatz zu hohen Antworten gegen die optimalen Kontrollpeptide SL9 und IV9, welche im Zeitverlauf sogar zunahmen (T1: 0,090 bzw. 0,031%; T2: 0,141 bzw. 0,057%; Abb. 9). Die Antworten gegen die Kontrollpeptide zeigen, dass der Patient trotz seines fortgeschrittenen Krankheitsstadiums (vgl. Tab. 2) sehr wohl in der Lage war, gute zelluläre Immunantworten zu bilden.

Bei Patient 3 wurden zunächst 7 B-consensus Peptide (32-41, 33-41, 33-43, 34-42, 34-43, 40-49, 41-49) jeweils mit und ohne die M41L-Mutation getestet. Die Reaktionen gegen diese Peptide übertrafen zu keinem der drei Zeitpunkte die Negativkontrolle. Da die Sequenzanalyse des Patienten zu allen Zeitpunkten zwei Polymorphismen in der Region dieser Peptide aufwies (vgl. Tab. 4) wurden, wie im Methodenteil bereits beschrieben, zusätzlich 4 diese Polymorphismen enthaltenden Peptide mit hoher Vorhersage im ELISpot getestet: 32-41M und L(a3) und 33-41M und L(a3). Auch das HLA-A3 restringierte CTL-Epitop 33-43 wurde in der autologen Variante getestet (33-43M und L(a3)). Die Abbildung 10 zeigt die ELISpot-Ergebnisse dieser die Polymorphismen enthaltenden Peptide sowie der Peptide 40-49M und L und 41-49M und L, bei welchen die B-Consensus-Sequenzen der autologen Variante des Patienten entsprechen. Zu T1 zeigten sich niedrigamplitudige Antworten gegen 2/5 der Wildtyp- und 3/5 der mutanten Peptide. (Abb. 10a). Am Interimszeitpunkt, 6 Monate vor dem

Nachweis der M41L-Variante, wurden 2/5 Wildtyp- und 3/5 mutante Peptide hochamplitudig erkannt (Abb. 10b). Die detektierten CTL-Antworten gegen die mutanten Peptide (MW: $0,023 \pm 0,023\%$) waren dabei insgesamt höher als die gegen die Wildtyppeptide (MW: $0,008 \pm 0,017\%$) (Abb. 12). Zu T2, bei nachgewiesener Mutation M41L, welche im Mischtyp mit der Wildtyp-Variante vorlag, wurden 3/5 der mutanten Peptide zusammen mit ihren korrespondierenden Wildtyp-Varianten hochamplitudig erkannt (Abb. 10c). Hierbei erreichten die Antworten gegen die mutanten Peptide (MW: $0,069 \pm 0,066\%$) insgesamt wieder deutlich höhere Amplituden als die Reaktionen gegen die Wildtyp-Peptide (MW: $0,036 \pm 0,037\%$) (Abb. 12). Die Reaktionen gegenüber den optimalen CTL-Epitopen SL9 (p17) und IV9 (RT) zeigten einen unterschiedlichen Amplitudenverlauf über die Zeit. Während die Antwort gegen SL9 kontinuierlich abnahm ($0,027-0,002\%$), nahm die Antwort gegen IV9 stetig zu und erreichte Werte von $0,035-0,127\%$ im Verlauf (Abb. 10).

Bei Patient 4 wurden aufgrund eines Polymorphismus an Position 39 der Reversen Transkriptase (vgl. Tab. 4) 8 autologe Peptide anstelle der betreffenden B-consensus-Peptide untersucht (32-41M und L(a4), 33-41M und L (a4), 33-43M und L (a4), 34-43M und L (a4)) und zusätzlich die Peptide 40-49 M und L und 41-49 M und L, bei denen die B-Consensus-Sequenz jeweils der autologen Sequenz entsprach. Der Patient, bei dem die Mutation M41L als dominante Virusvariante zu T2 neu nachweisbar war (Tab. 4), erkannte zu T1 3/6 mutante Peptide und 5/6 der zugehörigen Wildtyp-Peptide. Keines dieser Peptide erreichte jedoch eine hochamplitudige Antwort. Zu T2 wurden 4/6 Wildtyp- und 4/6 mutante Peptide erkannt. Die Antwort gegen 40-49L trat zum zweiten Zeitpunkt neu auf und war mit $0,012\%$ der CD8-Zellen die einzige hochamplitudige Antwort zu diesem Zeitpunkt (Abb. 11). Insgesamt nahmen bei diesem Patienten die Antworten gegenüber den Wildtyp-Peptiden im Zeitverlauf ab: zu T1 erreichten diese im MW $0,004 \pm 0,002\%$, zu T2 nur noch einen MW von $0,001 \pm 0,003\%$. Die Antworten gegen die mutanten Peptide waren dagegen zu T2 höher (MW: $0,005 \pm 0,005\%$) als zu T1 (MW: $0,002 \pm 0,003\%$) (Abb.12). Die Antworten gegen die optimalen Peptide SL9 und IV9 nahmen im Zeitverlauf ab (SL9; T1: $0,039\%$, T2: $0,005\%$) bzw. waren zu T2 nicht mehr nachweisbar (IV9) (Abb. 11).

Peptide, welche die Mutation M41L enthalten, wurden somit von zwei der vier untersuchten Patienten hochamplitudig erkannt, die korrespondierenden Wildtyp-Peptide von einem der vier Patienten. Die Patienten 1 und 2, die die Mutation M41L

schon zu T1 aufwiesen, erkannten weder Wildtyp- noch mutante Peptide hochamplitudig. Die Patienten 3 und 4 zeigten beide eine Zunahme bzw. ein Neuauftreten von Reaktionen gegen mutante Peptide zum Zeitpunkt T2, nach dem Auftauchen der M41L-Variante. Bei Patient 3 war dabei bereits zum Interimszeitpunkt, 6 Monate vor dem Nachweis der M41L in der Resistenzanalyse, eine deutliche Zunahme der CTL-Antwort gegen die mutanten Peptide zu beobachten. Zusammen mit der Reaktion gegen die mutanten Peptide kam es bei diesem Patienten, bei dem die Mutation im Mischtyp mit dem Wildtyp vorlag, auch zu einer Zunahme der Reaktionen gegen die Wildtyppeptide. Dagegen zeigte Patient 4, bei dem die Mutante zu T2 dominant war, eine Abnahme der Wildtyp-Antworten zu T2.

Es muss erwähnt werden, dass bei den beiden zuerst untersuchten Patienten 1 und 2 nur B-consensus-Peptide getestet wurden und keine autologen Peptide, obwohl auch diese beiden Patienten Polymorphismen im Bereich der getesteten Peptide aufwiesen (vgl. Tab. 4). Bei Patient 3 wurden, nachdem die Testung der B-consensus Peptide keine Reaktionen gezeigt hatte, zum ersten Mal auch autologe Peptide getestet, was bei Patient 4 weitergeführt wurde. Eine Nachtestung mit autologen Peptiden war bei den Patienten 1 und 2 aufgrund fehlendem Probenmaterials nicht mehr möglich. Somit kann eine gute Reaktion dieser Patienten gegenüber autologen Peptiden nicht ausgeschlossen werden.

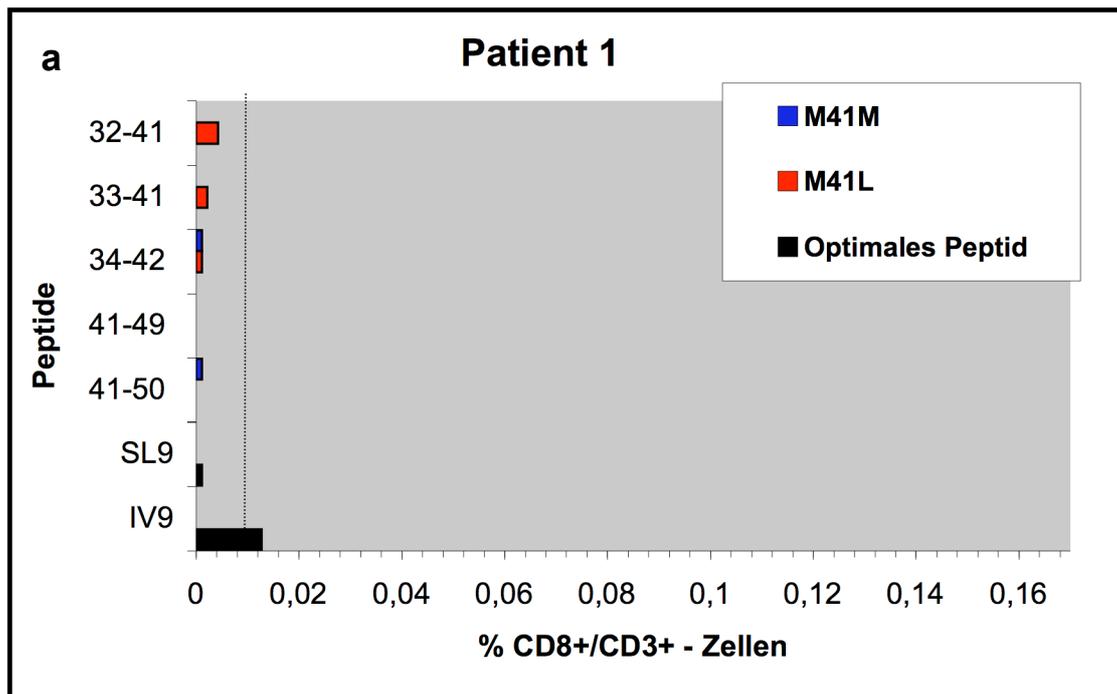


Abb. 8: Interferon-gamma-Antworten von Patient 1 gegen Peptide, welche die Mutation M41L enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide. Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen mutante Peptide und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01%).

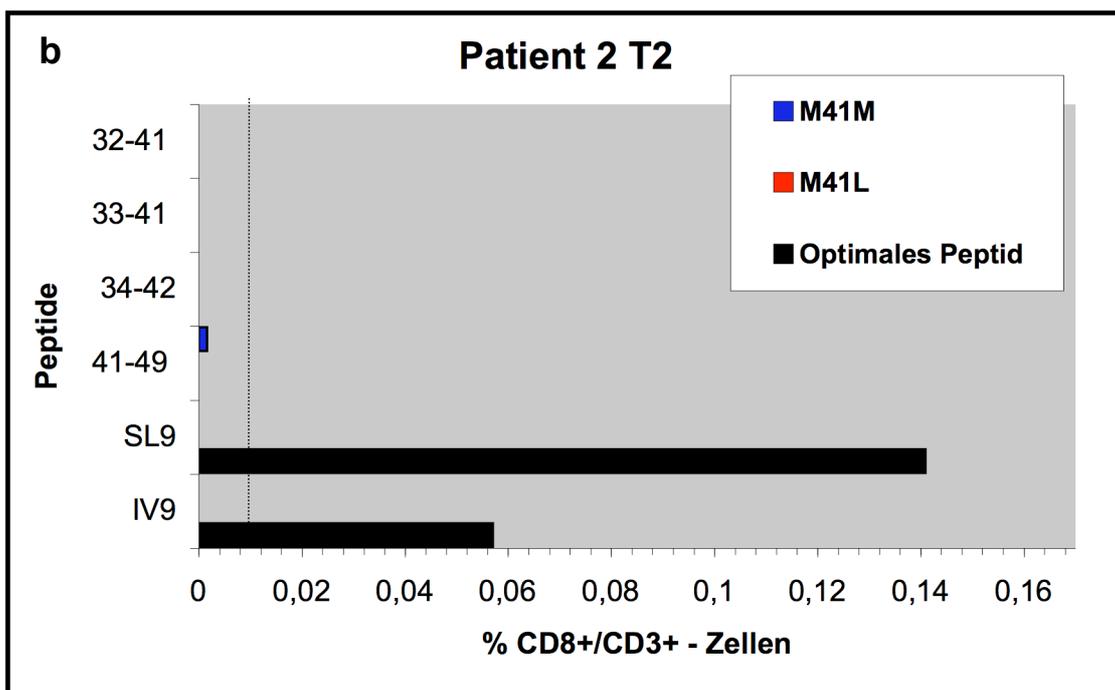
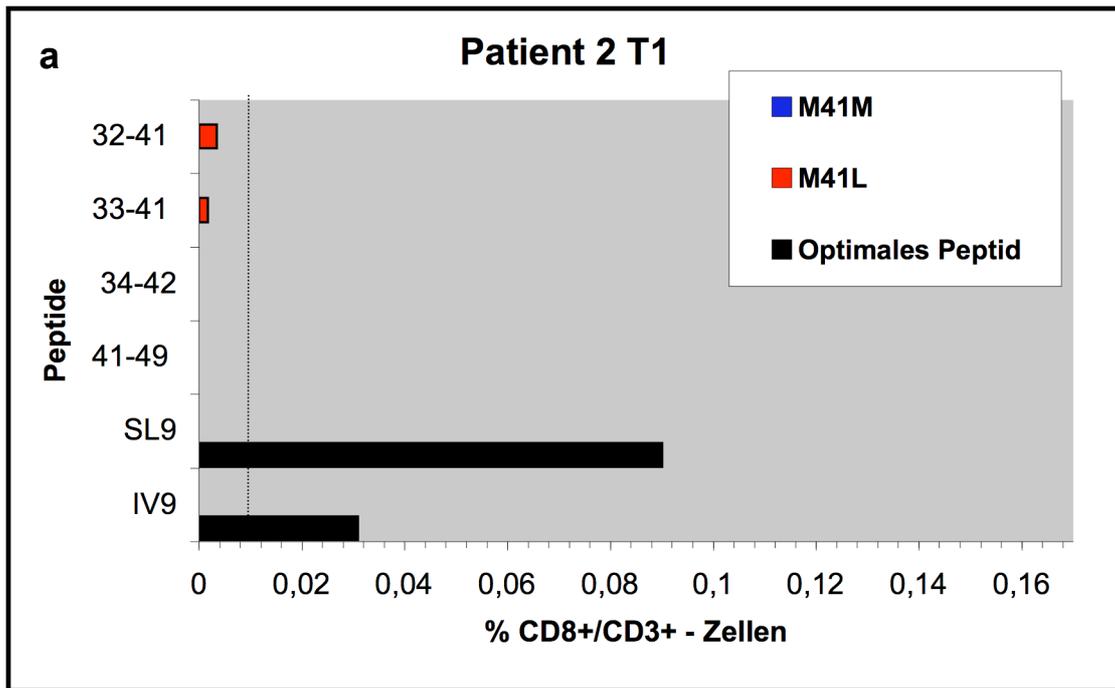


Abb. 9: Interferon-gamma-Antworten von Patient 2 gegen Peptide, welche die Mutation M41L enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide zu den Zeitpunkten T1 (a) und T2 (b). Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen mutante Peptide und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01%).

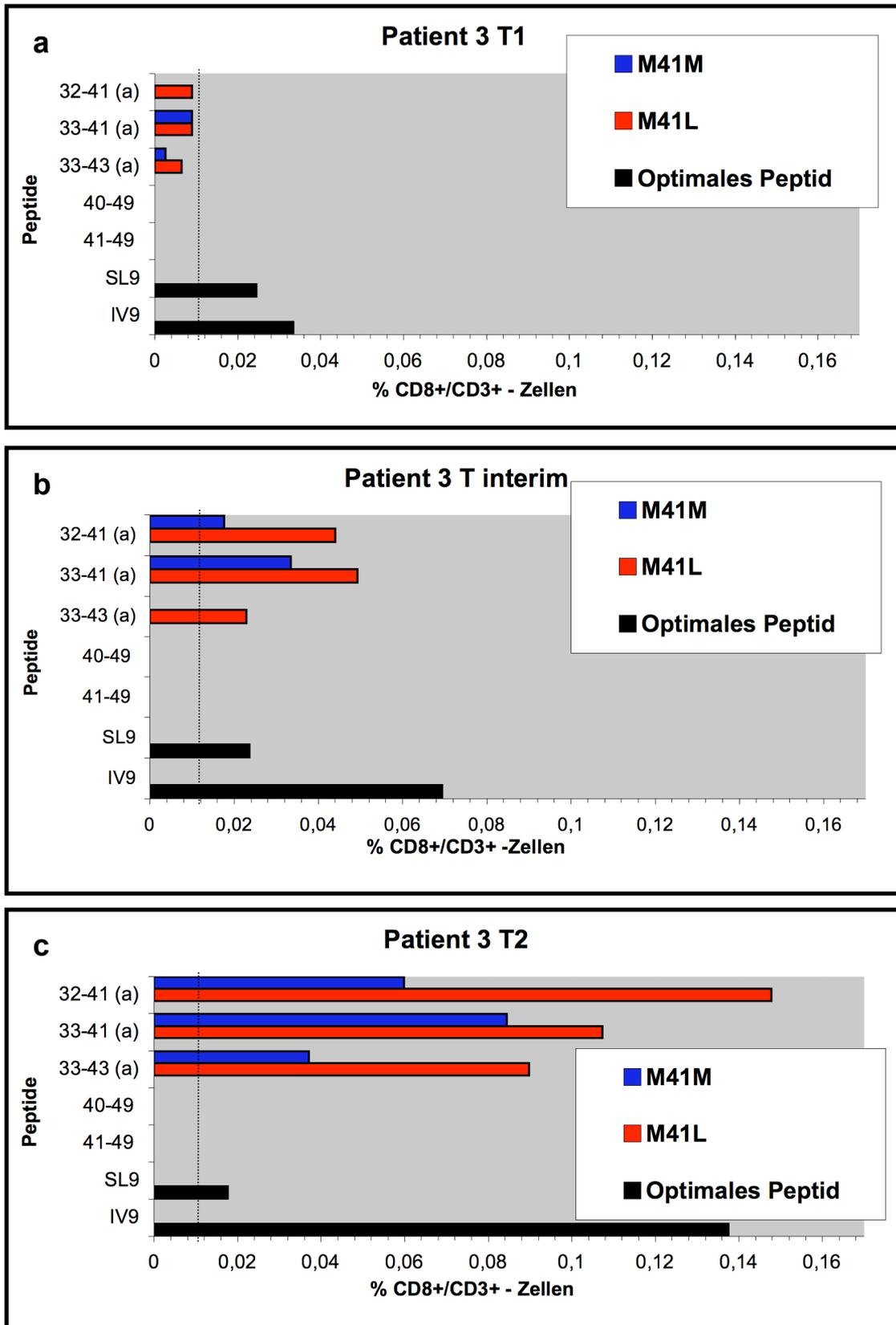


Abb. 10: Interferon-gamma-Antworten von Patient 3 gegen Peptide, welche die Mutation M41L enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide zu den Zeitpunkten T1 (a), Tinterim (b) und T2 (c). Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen mutante Peptide und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01%).

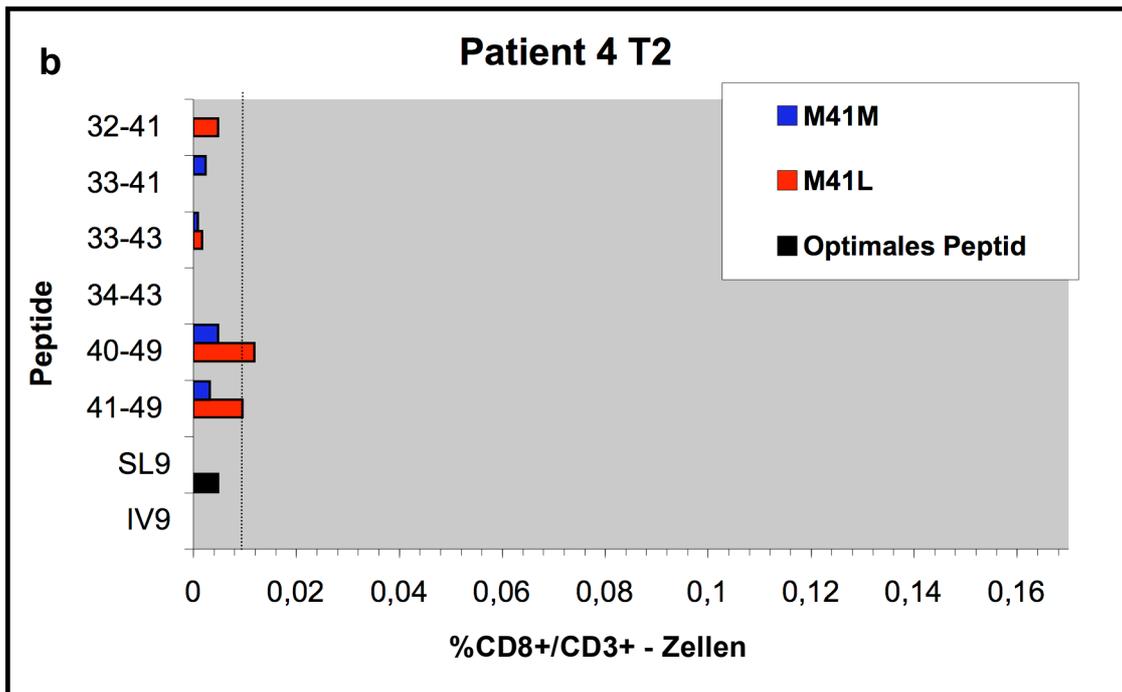
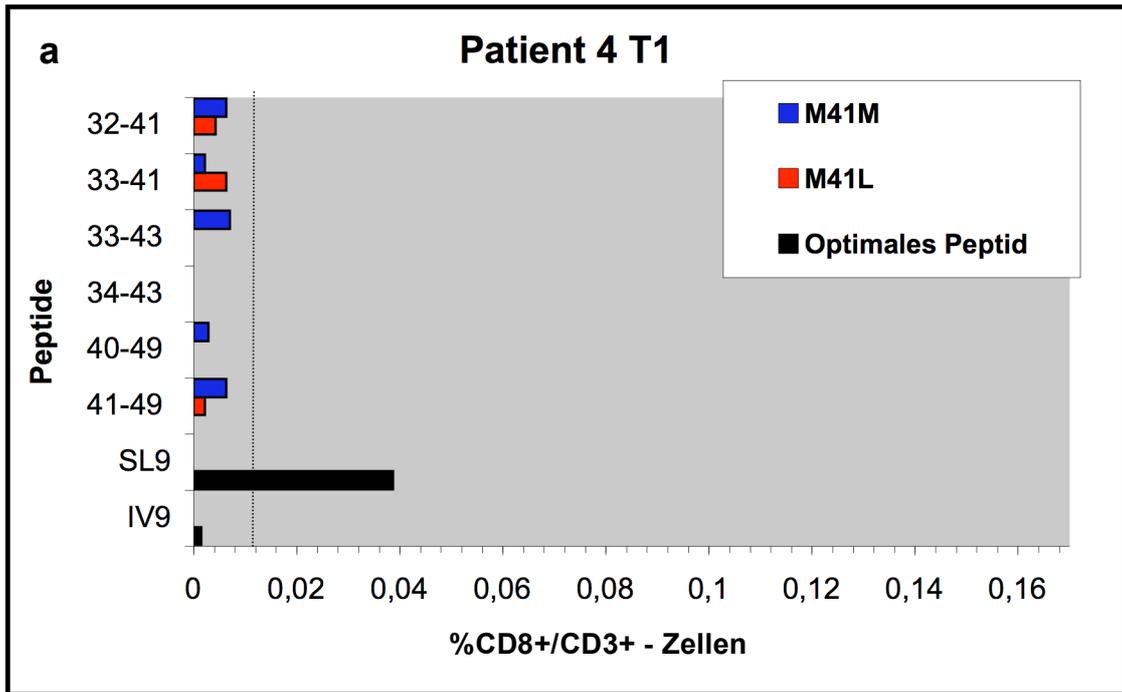


Abb. 11: Interferon-gamma-Antworten von Patient 4 gegen Peptide, welche die Mutation M41L enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide zu den Zeitpunkten T1 (a) und T2 (b). Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen mutante Peptide und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01%).

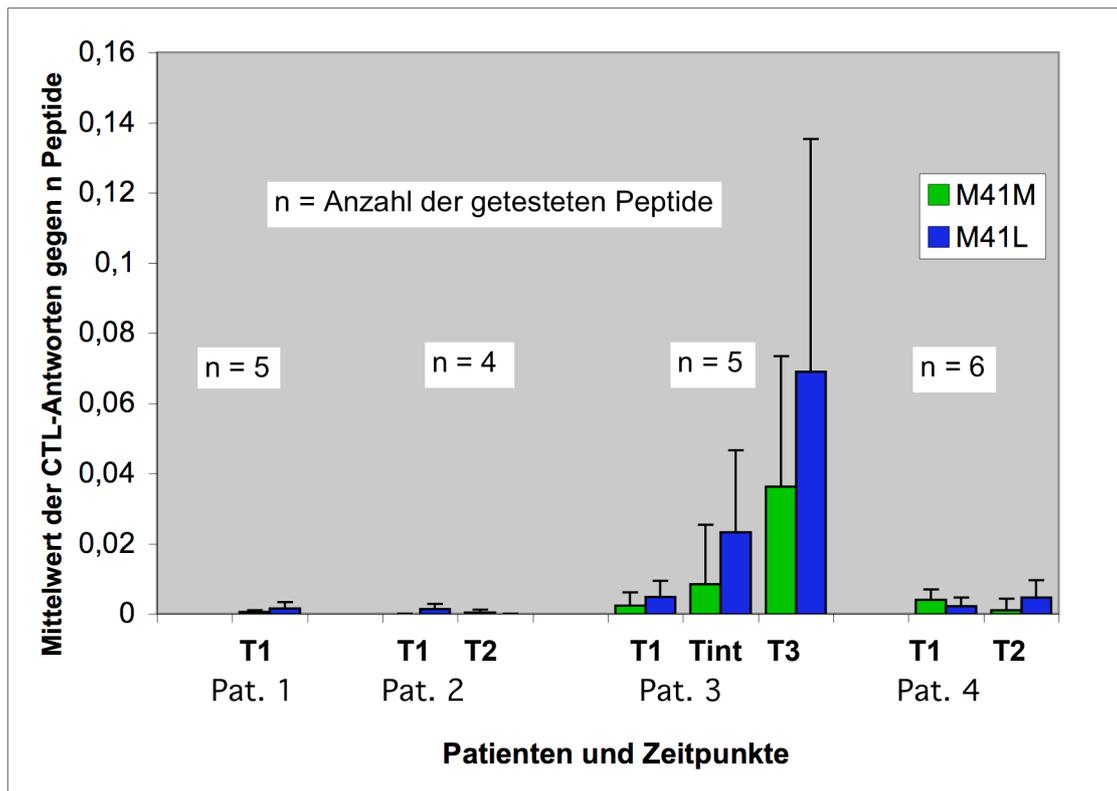


Abb. 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der CTL-Antworten der Patienten 1-4 gegen Peptide welche die Mutation M41L enthalten und die korrespondierenden Wildtyp-Peptide zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. n bezeichnet dabei jeweils die Anzahl der getesteten Peptide. Grüne Balken stellen jeweils die Antworten gegen Wildtyppeptide, blaue Balken die Antworten gegen mutante Peptide dar.

4.3.2 Antworten gegen M184V/I

Bei den Patienten 1 und 2 war die Mutation M184V schon zu T1 dominant, bei Patient 4 lag sie zu T1 im Mischtyp mit der Wildtypvariante vor. Bei den Patienten 3 und 5 hingegen war die Mutante zu T1 mittels Resistenzanalyse nicht nachweisbar, sondern trat erst zum Zeitpunkt T_{interim} bzw T2 auf. Die Mutation M184I war bei keinem Patienten nachweisbar. In der Region der getesteten Peptide (RT178-89) wies keiner der Patienten einen Polymorphismus auf, sodass die ausgewählten B-consensus-Peptide für alle Patienten der autologen Virussequenz entsprachen.

Patient 1 zeigte niedrigamplitudige Antworten gegen 1/3 Wildtyppeptide, 1/3 Peptide mit der Mutation M184V und 3/3 Peptide mit der Mutation M184I (Abb. 13).

Patient 2 erkannte zum Zeitpunkt T1 das Peptid 178-87I niedrigamplitudig (0,001%), zu T2 zeigte er dann niedrigamplitudige Reaktionen gegen 3/3 Wildtyppeptide, 3/3 Peptide mit der Mutation M184V und 1/3 Peptide mit der Mutation M184I (Abb. 14).

Dabei zeigten die Wildtyppeptide insgesamt die höchsten Antworten ($0,003 \pm 0,004\%$), die Antworten gegen die Peptide mit den Mutationen M184V und M184I fielen insgesamt niedriger aus ($0,001 \pm 0\%$ bzw. $0,001 \pm 0,001\%$) (Abb. 18a).

Patient 3 erkannte zu T1, neben 3/3 Wildtyp-Peptiden, auch 3/3 Peptide mit der Mutation M184V und 1/3 Peptide mit der Mutation M184I (181-89I), obwohl zu diesem Zeitpunkt keine der Mutationen nachweisbar war. Zum Zwischenzeitpunkt T_{interim} , an dem die Mutation M184V bereits im Plasma des Patienten nachweisbar war, wurde nur noch 1/3 der Wildtyp-Peptide erkannt, das erkannte Peptid 181-89M zeigte eine deutlich niedrigere Amplitude als zu T1. Gleichzeitig wurden auch nur noch 2/3 Peptide mit der Mutation M184V erkannt (178-87V; 181-89V), die Amplitude nahm für 178-87V deutlich zu, für 181-89V ab. Von den Peptiden mit der Mutation M184I wurde eines zu T_{interim} neu erkannt (179-87I), die Amplitude des schon zu T1 erkannten Peptides 181-89I nahm deutlich ab. Zu T2 wurden wieder 2/3 Wildtyp-Peptide erkannt (179-87M, 181-89M). Von den Peptiden mit der Mutation M184V wurde zu T2 nur noch eines erkannt (181-89V), von denen mit der Mutation M184I 2/3 (179-87I, 181-89I). Hierbei wurden zu allen Zeitpunkten nur für die Peptide 181-89M, V und I hochamplitudige Antworten erreicht (Abb. 15). Insgesamt nahmen die Antworten von T1 zu T2 ab, sowohl gegen die Wildtyppeptide (T1: $0,020 \pm 0,032\%$; T2: $0,006 \pm 0,011\%$), als auch gegen die M184V-Peptide (T1: $0,022 \pm 0,034\%$; T2: $0,005 \pm 0,013\%$) und M184I-Peptide (T1: $0,008 \pm 0,018\%$; T2: $0,006 \pm 0,012\%$) (Abb. 18a).

Patient 4 erkannte zu T1, bei Vorliegen der Mutation M184V im Mischtyp mit der Wildtypvariante, 3/3 Wildtyp-Peptide, 2/3 Peptide mit der Mutation M184V und 3/3 Peptide mit der Mutation M184I. Hochamplitudige Antworten zeigten sich dabei gegen die Peptide 181-89V und 181-89I (Abb. 16a). Insgesamt zeigten sich dabei gegen die Peptide mit der Mutation M184I die höchsten Antworten (MW: $0,009 \pm 0,009\%$), die Wildtyp-Peptide erreichten Antworten von $0,005 \pm 0,002\%$ und die Peptide mit der Mutation M184V zeigten Reaktionen von $0,006 \pm 0,008\%$. (Abb. 18b). Zum Zeitpunkt T2 mit M184V als dominanter Variante, konnte nur gegen das Peptid 181-89M eine niedrigamplitudige Antwort detektiert werden. Auch die Antworten gegenüber den optimalen Peptiden SL9 und IV9 nahmen im Zeitverlauf stark ab (SL9) bzw. waren zu T2 nicht mehr nachweisbar (IV9) (Abb. 16b).

Patient 5 zeigte zu T1 eine niedrigamplitudige Antwort (0,002%) gegenüber 1/2 der getesteten Wildtyp-Peptide (181-89M), mutante Peptide wurden nicht erkannt (Abb. 17a). Zum Zeitpunkt T2, als die Mutation M184V sich neu entwickelt hatte, wurden 2/3 Wildtyp- und 2/3 mutante Peptide erkannt. Die Peptide 179-87M, V und I zeigten dabei niedrigamplitudige Antworten (0,003-0,005%), gegen die Peptide 181-89M, V und I konnten hohe Antworten detektiert werden (0,049-0,070%) (Abb. 17b). Insgesamt erreichten die Antworten gegen die Wildtyp-Peptide Amplituden von $0,037 \pm 0,046\%$, die Antworten gegen die Peptide mit der Mutation M184V $0,032\% \pm 0,039\%$ und die Reaktionen gegen die M184I-Peptide $0,026 \pm 0,032\%$ (Abb. 18b). Die Reaktionen gegen das optimale Kontrollpeptid SL9 nahm zu T2 ebenfalls zu (T1:0,002%; T2: 0,013%) (Abb. 17b).

Peptide mit den Mutationen M184V und M184I wurden also von drei von fünf Patienten und die dazugehörigen Wildtyppeptide von zwei von fünf Patienten hochamplitudig erkannt. Einer von zwei Patienten, bei dem die Mutation erst zu T2 neu nachweisbar war, zeigte schon zu T1 Antworten gegen die mutanten Peptide. Beim anderen Patienten traten zu T2 hochamplitudige Antworten gegen die mutanten Peptide neu auf. Antworten gegenüber Peptiden mit der Mutation M184V traten bei allen Patienten gemeinsam mit Antworten gegenüber Wildtyppeptiden und Peptiden mit der Mutation M184I auf.

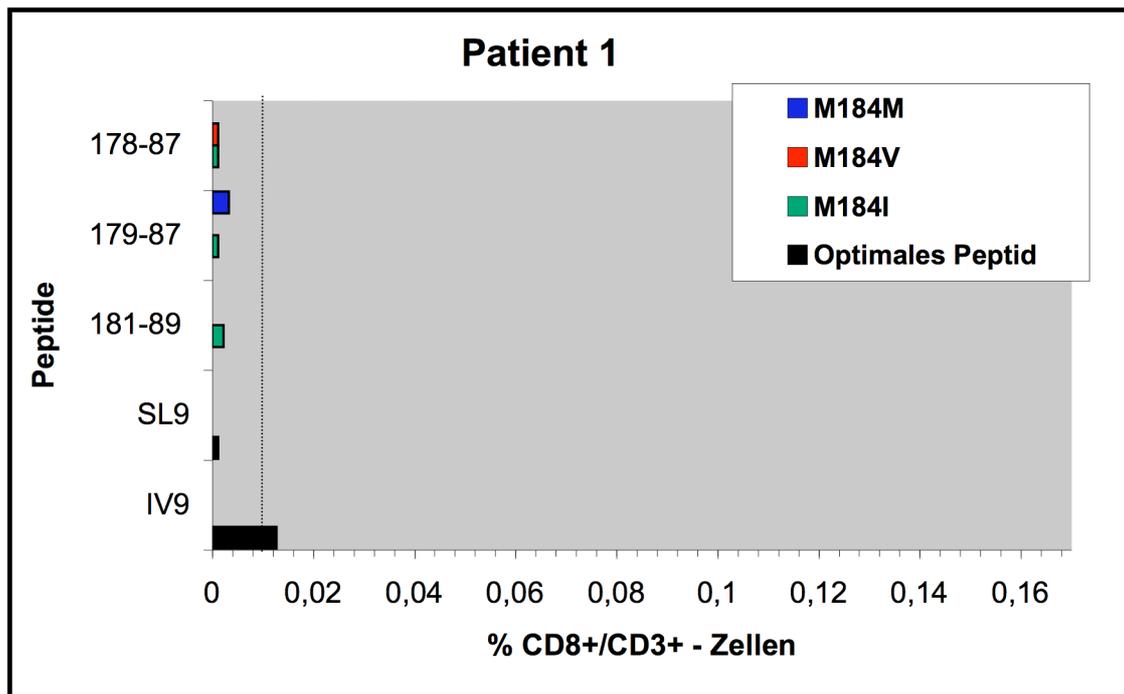


Abb. 13: Interferon-gamma-Antworten von Patient 1 gegen Peptide, welche die Mutation M184V bzw. M184I enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide. Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen Peptide, welche die Mutation M184V enthalten, grüne Balken solche mit der Mutation M184I und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01%).

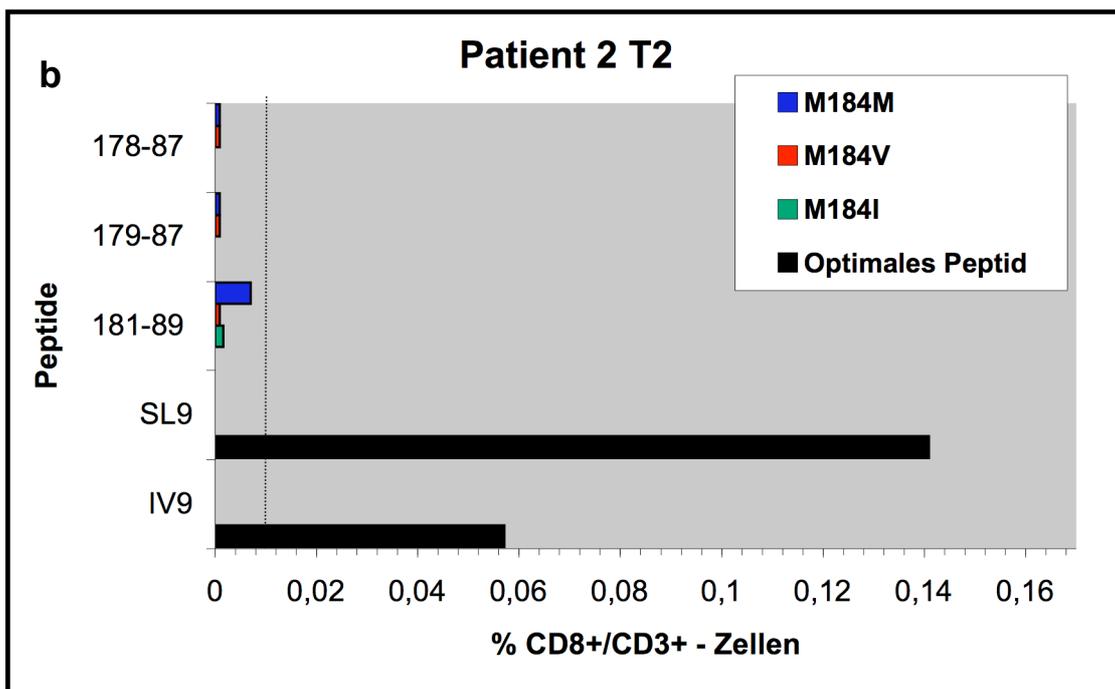
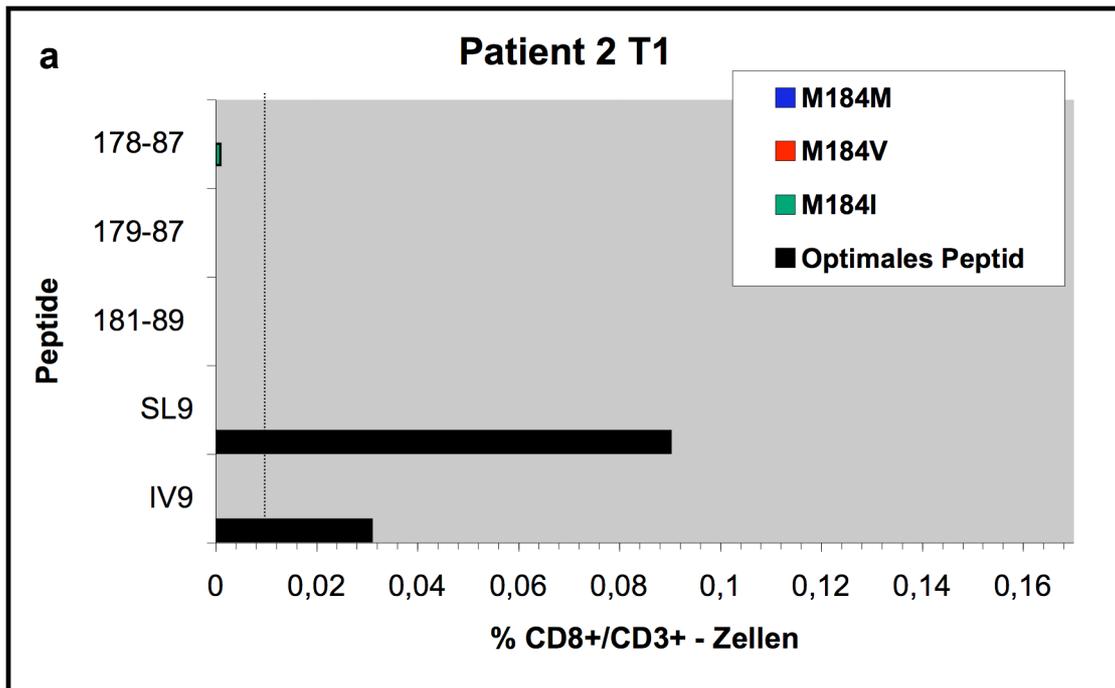


Abb. 14: Interferon-gamma-Antworten von Patient 2 gegen Peptide, welche die Mutation M184V bzw. M184IL enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide zu den Zeitpunkten T1 (a) und T2 (b). Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen Peptide, welche die Mutation M184V enthalten, grüne Balken solche mit der Mutation M184I und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01).

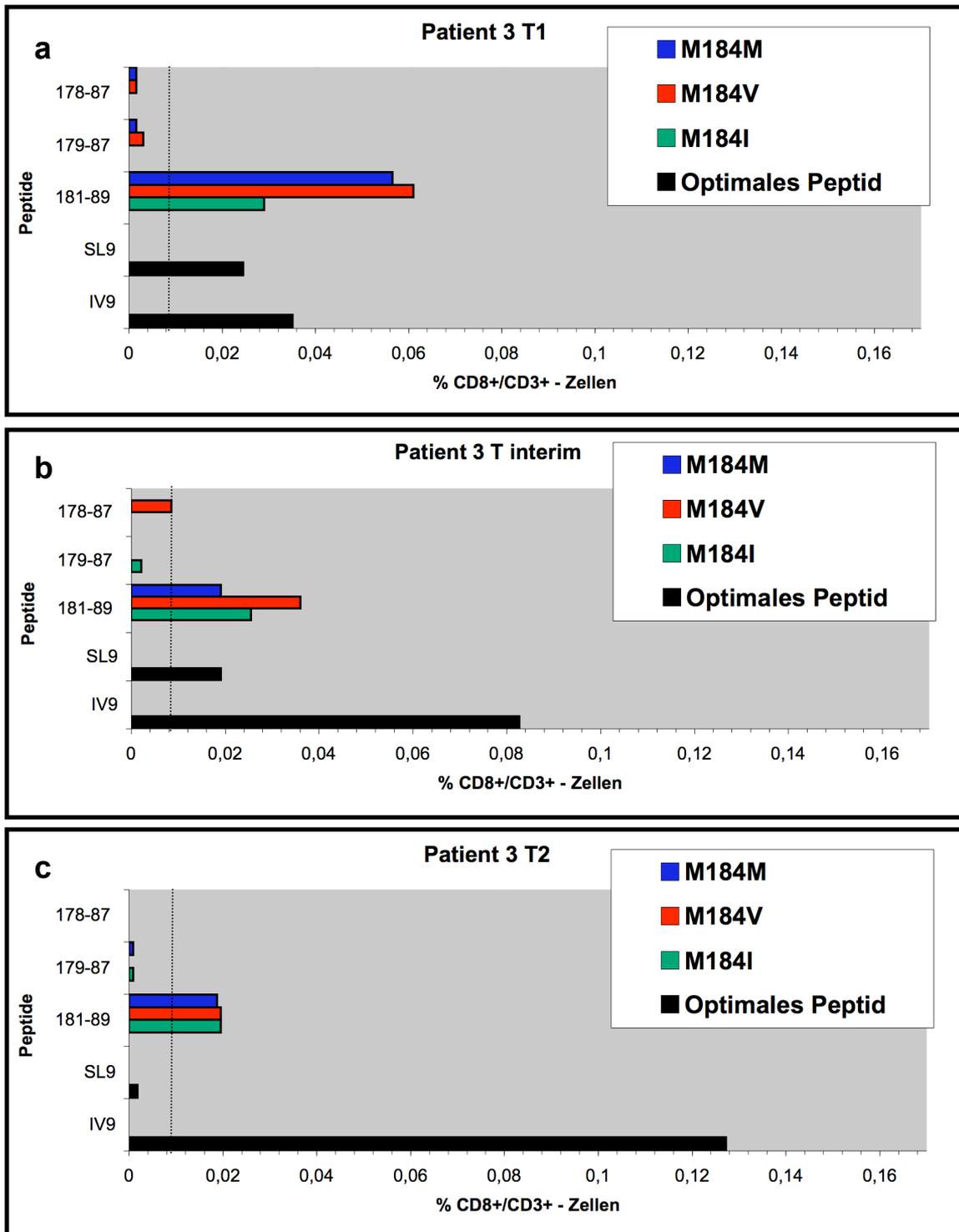


Abb. 15: Interferon-gamma-Antworten von Patient 3 gegen Peptide, welche die Mutation M184V bzw. M184IL enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide zu den Zeitpunkten T1 (a), Tinterim (b) und T2 (c). Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen Peptide, welche die Mutation M184V enthalten, grüne Balken solche mit der Mutation M184I und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01%).

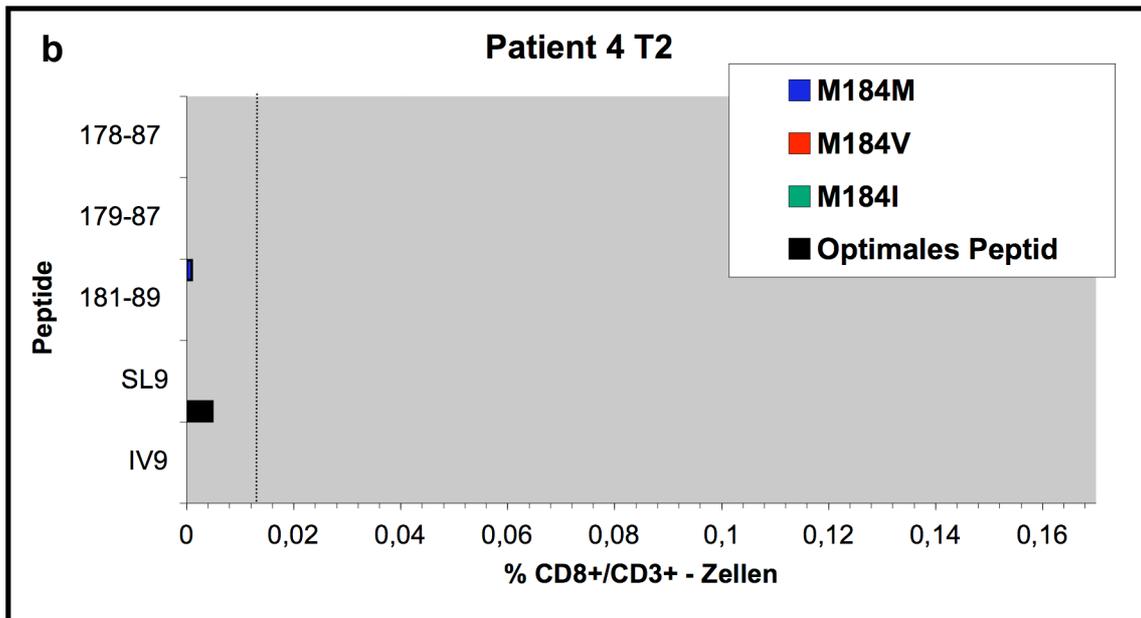
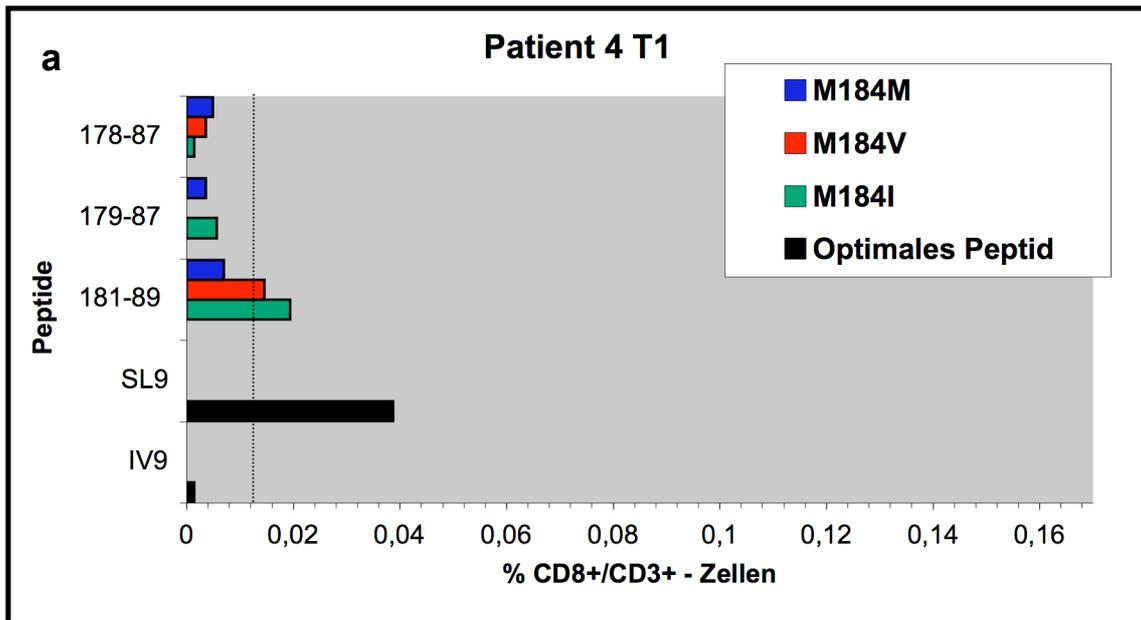


Abb. 16: Interferon-gamma-Antworten von Patient 4 gegen Peptide, welche die Mutation M184V bzw. M184IL enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide zu den Zeitpunkten T1 (a) und T2 (b). Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen Peptide, welche die Mutation M184V enthalten, grüne Balken solche mit der Mutation M184I und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01%).

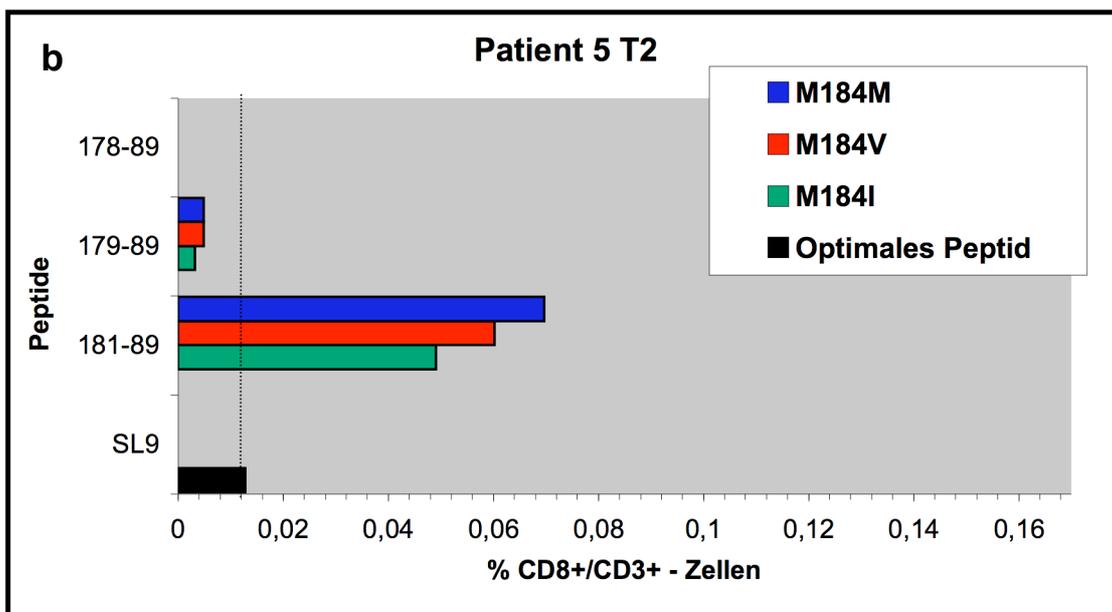
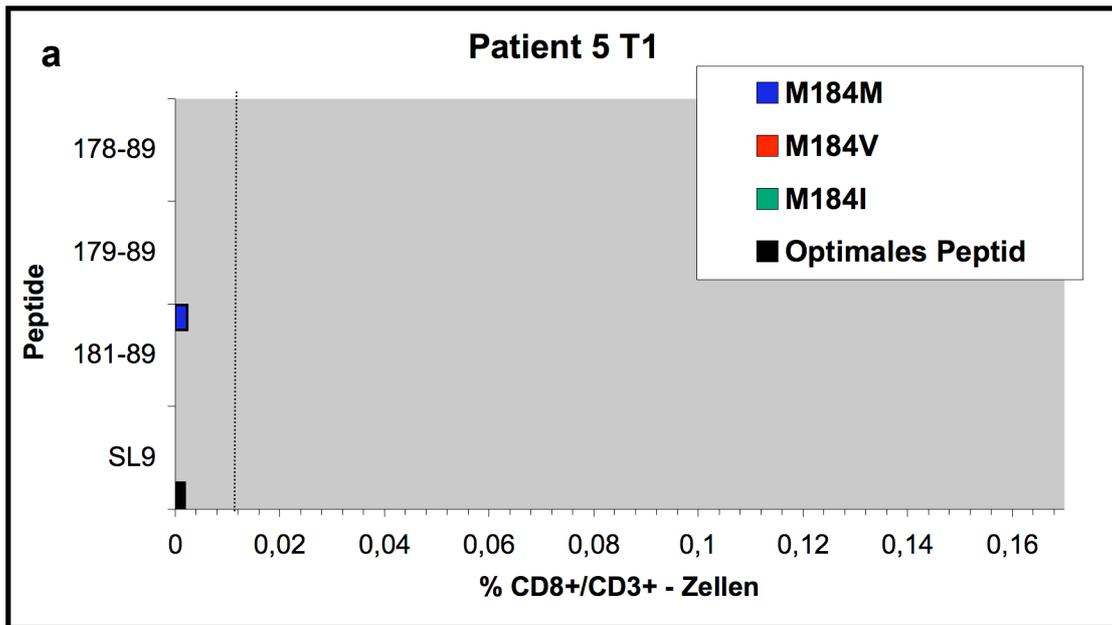


Abb. 17: Interferon-gamma-Antworten von Patient 5 gegen Peptide, welche die Mutation M184V bzw. M184IL enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide zu den Zeitpunkten T1 (a) und T2 (b). Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen Peptide, welche die Mutation M184V enthalten, grüne Balken solche mit der Mutation M184I und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01%).

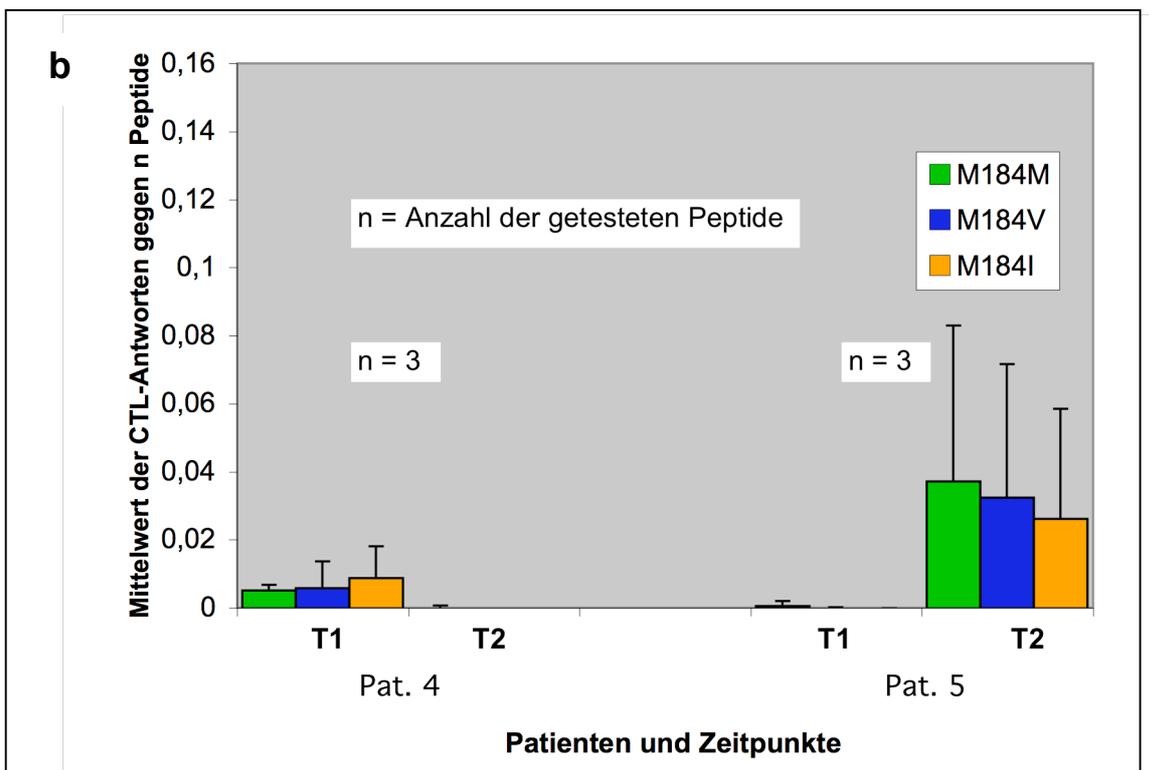
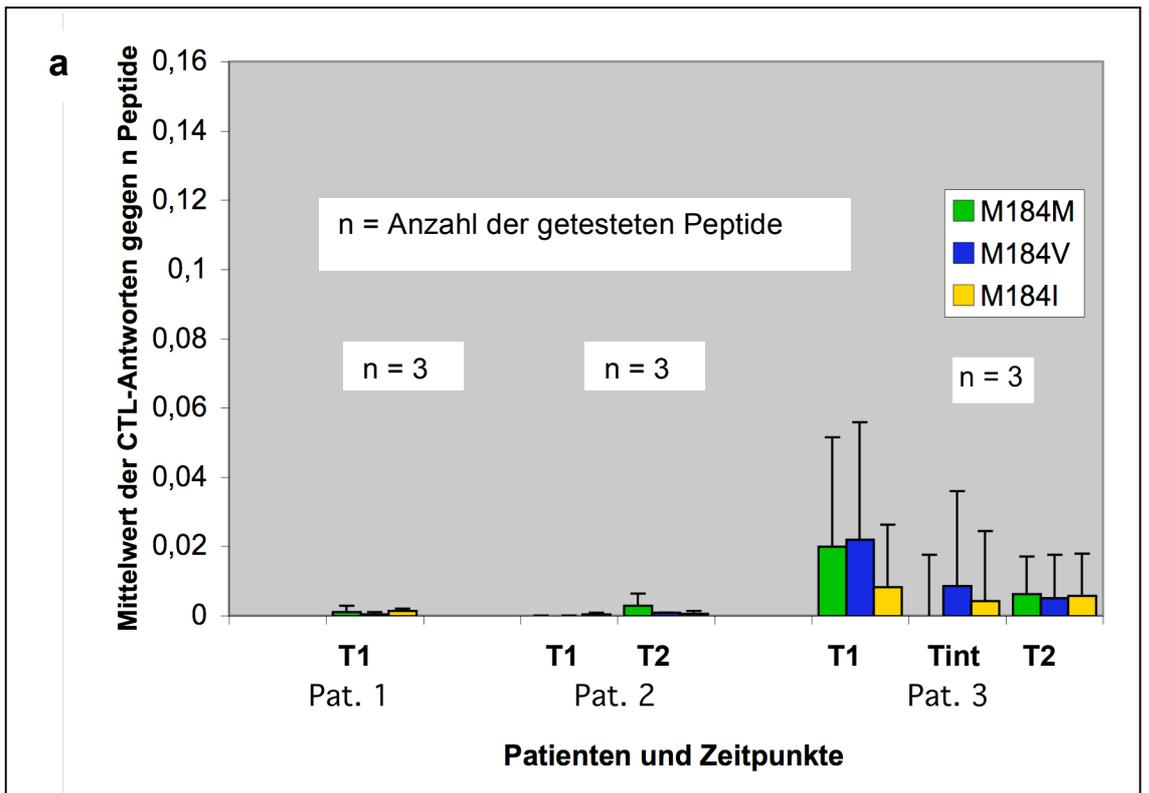


Abb. 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der CTL-Antworten der Patienten 1, 2 und 3 (a) sowie der Patienten 4 und 5 (b) gegen Peptide welche die Mutation M184V bzw. M184I enthalten und die korrespondierenden Wildtyp-Peptide zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Grüne Balken stellen jeweils die Antworten gegen Wildtyppeptide, blaue Balken die Antworten gegen Peptide mit der Mutation M184V und orange Balken Antworten gegen Peptide mit der Mutation M184I dar.

4.3.3 Antworten gegen L210W

Die Mutation L210W war nur bei den Patienten 1 und 2 nachzuweisen. Bei Patient 1 war die Mutation bereits zum Zeitpunkt T1 vorhanden, bei Patient 2 entwickelte sie sich neu zum Zeitpunkt T2.

Für den Patienten 1 konnten zwei hochaffine Peptide für das HLA-Allel B44 mit der Mutation L210W untersucht werden (202-10W; 203-12W). Die Reaktionen gegen diese Peptide und die zugehörigen Wildtyppeptide waren allesamt niedrigamplitudig. Die höchste Antwort (0,006%) zeigte sich gegen das mutante Peptid 202-10W, außerdem wurde auch das andere mutante Peptid 203-12W sowie das Wildtyp-Peptid 202-10L mit niedrigeren Amplituden erkannt (0,002% bzw. 0,001%) (Abb. 19).

Bei Patient 2 konnte wegen seines Haplotyps nur ein hochaffines Peptid, welches die Mutation L210W enthielt, untersucht werden (205-14W; Tab. 9). Weder gegen dieses Peptid noch gegen das zugehörige Wildtyp-Peptid 205-14L waren zu den beiden Zeitpunkten Reaktionen nachweisbar (keine Abbildung).

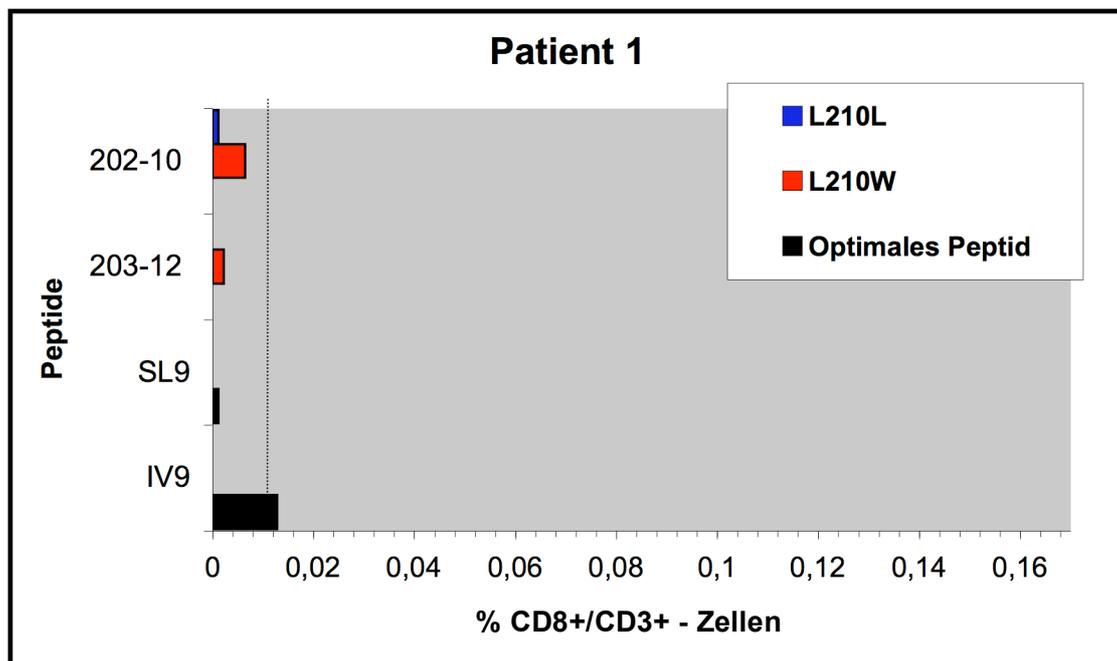


Abb.19: Interferon-gamma-Antworten von Patient 1 gegen Peptide, welche die Mutation L210W enthalten und deren korrespondierende Wildtyp-Peptide. Die Antworten sind als Prozentanteil der gesamten CD8/CD3-positiven Zellen in der verwendeten Probe dargestellt, die Negativkontrolle ist jeweils abgezogen. Blaue Balken stellen Antworten gegenüber Wildtyppeptiden dar, rote Balken Reaktionen gegen Peptide, welche die Mutation L210W enthalten und schwarze Balken Antworten gegenüber optimalen Kontrollpeptiden. Die Linie markiert die Grenze zwischen schwachen und starken CTL-Antworten (0,01%).

4.3.4 Antworten gegenüber einzelnen Peptiden

Die Antworten gegen die Peptide sind im vorangehenden Abschnitt größtenteils zusammengefasst als Reaktionen gegen die einzelnen Mutationen beschrieben worden. Im Folgenden sollen nun die Antworten gegen die Peptide im Einzelnen untersucht werden. Von den insgesamt 45 getesteten Peptiden wurden 35 Peptide (78%) zu mindestens 1 Zeitpunkt erkannt. Zu keinem Zeitpunkt erkannt wurden die Peptide 32-41M, 33-41M, 33-43M und L, 34-43M und L, 41-50L, 203-12L, 205-14L und W (Abb. 21). Hochamplitudige Antworten zeigten sich gegenüber 10 Peptiden (32-41M(a3), 32-41L(a3), 33-41M(a3), 33-41L(a3), 33-43M(a3), 33-43L(a3), 40-49L, 181-89M, 181-89V, 181-89I) (Abb. 21). Das Peptid 40-49L wurde bei 2 Patienten zu insgesamt 5 Zeitpunkten getestet und davon einmal hochamplitudig erkannt (0,012% der CD8-Zellen). Die autologen Peptide von Patient 3 wurden zu insgesamt 3 Zeitpunkten bei diesem Patienten getestet und wurden zu 2/3 Zeitpunkten (32-41M und L, 33-41M und L und 33-43L (alle a3)) bzw. 1/3 Zeitpunkten (33-41M(a3)) hochamplitudig erkannt. Dabei induzierten sie Antworten von 0,06-0,148% der CD8-Zellen. Die Peptide 181-89M, V und I wurden bei 5 Patienten zu insgesamt 11 Zeitpunkten getestet. Das Wildtyp-Peptid 181-89M wurde dabei von 4/5 Patienten zu insgesamt 8/11 (73%) Zeitpunkten erkannt, bei 2/5 Patienten zu 4/11 (36%) Zeitpunkten mit hochamplitudigen Antworten. Das mutante Peptid 181-89V wurde von 4/5 Patienten zu 6/11 (55%) Zeitpunkten, das Peptid 181-89I von 5/5 Patienten zu 7/11 (64%) Zeitpunkten erkannt. Beide mutanten Peptide wurden dabei von 3/5 Patienten zu 5/11 (45%) der getesteten Zeitpunkte hochamplitudig erkannt. Die Amplituden der Antworten gegen diese Peptide erreichten dabei 0,049-0,070% der CD8-Zellen. Damit induzierten die autologen Peptide von Patient 3 die höchsten CTL-Antworten, konnten aber nur bei 1 Patienten getestet werden. Hochamplitudige Antworten gegen die Peptide 181-89M, V und I konnten dagegen bei mehreren Patienten nachgewiesen werden (Abb. 20).

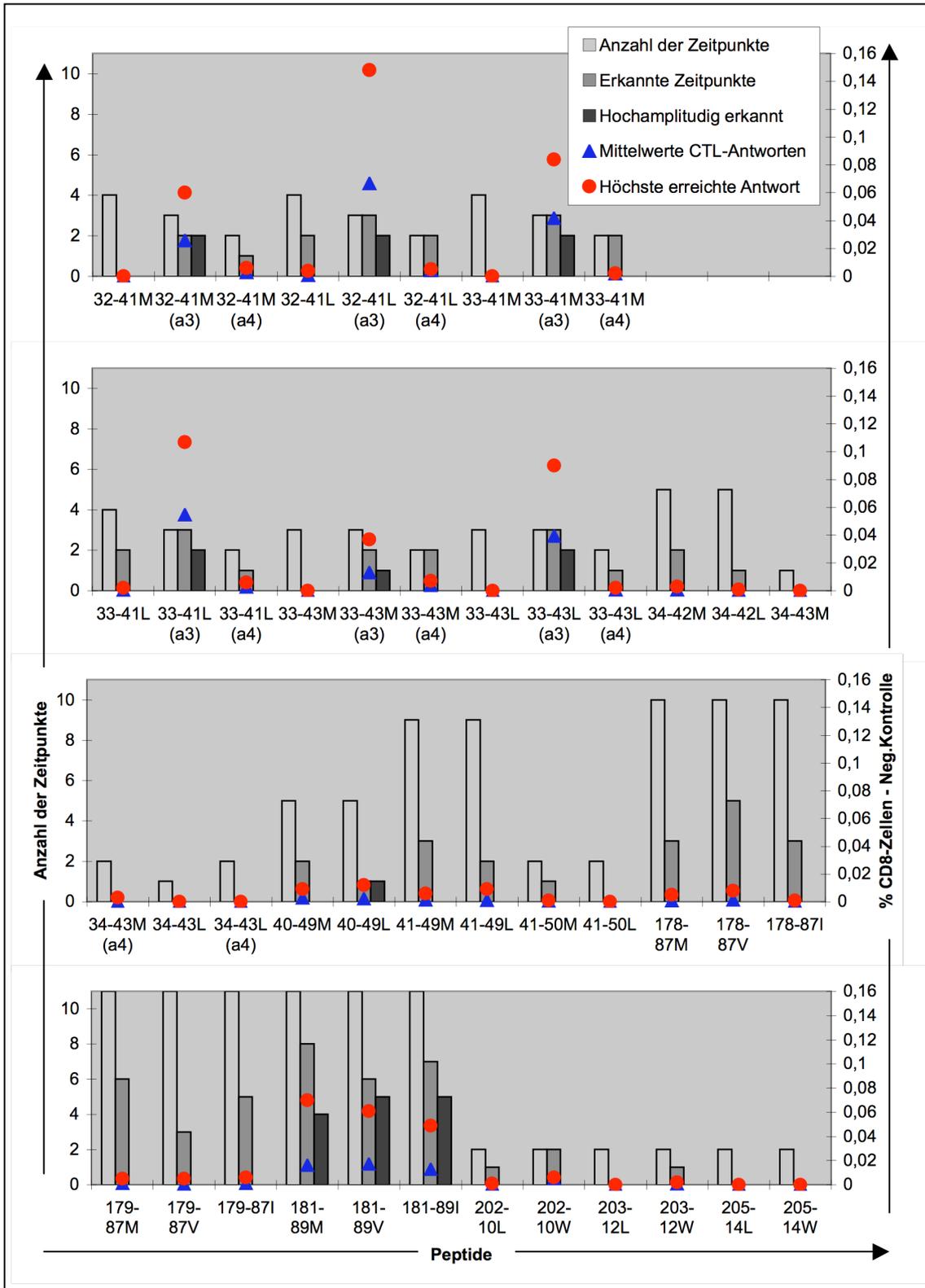


Abb. 20: Antworten der einzelnen RT-Peptide. Mittels des Balkendiagramms (linke Achse) ist die Anzahl der getesteten Zeitpunkte (hellgraue Balken) der Anzahl der Zeitpunkte, an welchen das Peptid erkannt wurde (dunkelgraue Balken) und den Zeitpunkten, an welchen das Peptid hochamplitudig erkannt wurde (schwarze Balken), gegenübergestellt. Das Punktdiagramm (rechte Achse) zeigt die Mittelwerte der CTL-Antworten des jeweiligen Peptides (blaue Dreiecke) sowie die höchste erreichte Antwort (rote Punkte).

4.4 Vergleich Vorhersage - ELISpot-Antwort

4.4.1 Vergleich vorhergesagte Bindungsaffinität – ELISpot-Antwort

Um zu untersuchen, inwieweit die Datenbanksuche, wie sie für diese Arbeit verwendet wurde, ein geeignetes Mittel für die Suche nach möglichen CTL-Epitopen war und ob bzw. wie sich die beiden Datenbanken in der Qualität ihrer Vorhersagen unterschieden, wurden die vorhergesagten Rangplätze für die einzelnen Peptide, nach Algorithmen getrennt, jeweils den gegen sie im ELISpot detektierten CTL-Antworten gegenübergestellt (Abb. 21 und 22). Der Anteil der Peptide mit hoher Bindungsvorhersage, welcher tatsächlich starke Antworten ($\geq 0,01\%$ der CD8-Zellen) im ELISpot-Assay induzieren konnte, war bei beiden Datenbanken relativ niedrig (SYFPEITHI: 4/25 (16%); BIMAS: 5/24 (21%). Für unsere Untersuchung war aber vor allem die Sensitivität der Datenbankvorhersage wichtig, um kein mögliches CTL-Epitop zu übersehen. Die Sensitivität läßt sich an der vorhergesagten Bindungswahrscheinlichkeit jener Peptide bemessen, welche tatsächlich hochamplitudige Antworten induzieren konnten. Insgesamt erzielten 10 Peptide hochamplitudige Antworten (vgl. Kap. 4.3.4). Die beiden autologen Peptide 33-43M (a3) und 33-43L (a3) können in die Gegenüberstellung Datenbankvorhersage – ELISpot-Antworten nicht miteinbezogen werden, da für die Undekamere keine Vorhersage verfügbar war. Von den restlichen 8 Peptiden mit hohen Antworten hatten bei SYFPEITHI 4 Peptide (50%) eine gute Vorhersage erhalten, die anderen 4 Peptide erreichten nur mittelhohe Vorhersagewerte (Rang 85-100). Bei BIMAS waren 5 der 8 Peptide (63%) als hochaffine Peptide vorhergesagt worden, die restlichen 3 Peptide erhielten mittlere Vorhersagen (Rang 26-97). BIMAS schnitt in der Vorhersage gut erkannter Peptide also besser ab als SYFPEITHI, was vor allem auf der unterschiedlichen Einschätzung der Affinität der Peptide 181-89M, V und I beruht, welche alle hochamplitudige Antworten induzieren konnten. Während diese Peptide bei BIMAS für HLA-A*0201 den ersten Rangplatz erhielten (vgl. Tab. 7) erhielten, erreichten diese Peptide bei SYFPEITHI nur den 85. Rangplatz. Die Vorgabe, dass als CTL-Epitope dienende Peptide zu 90% unter den besten 2% der Peptide einer *score*-Liste rangieren sollten (vgl. Kap. 4.2.1) konnten damit beide Datenbanken nicht einhalten. Bei SYFPEITHI rangierten nur 1/8 (12,5%) der gut erkannten Peptide unter den besten 2% einer *score*-Liste, bei BIMAS waren es 4/8 (50%). Mit der gesetzten

Grenze bei 4% der besten Peptide und der parallelen Verwendung beider Datenbanken konnten jedoch 7 der 8 gut erkannten Peptide (88%) als hochaffine Peptide vorhergesagt werden.

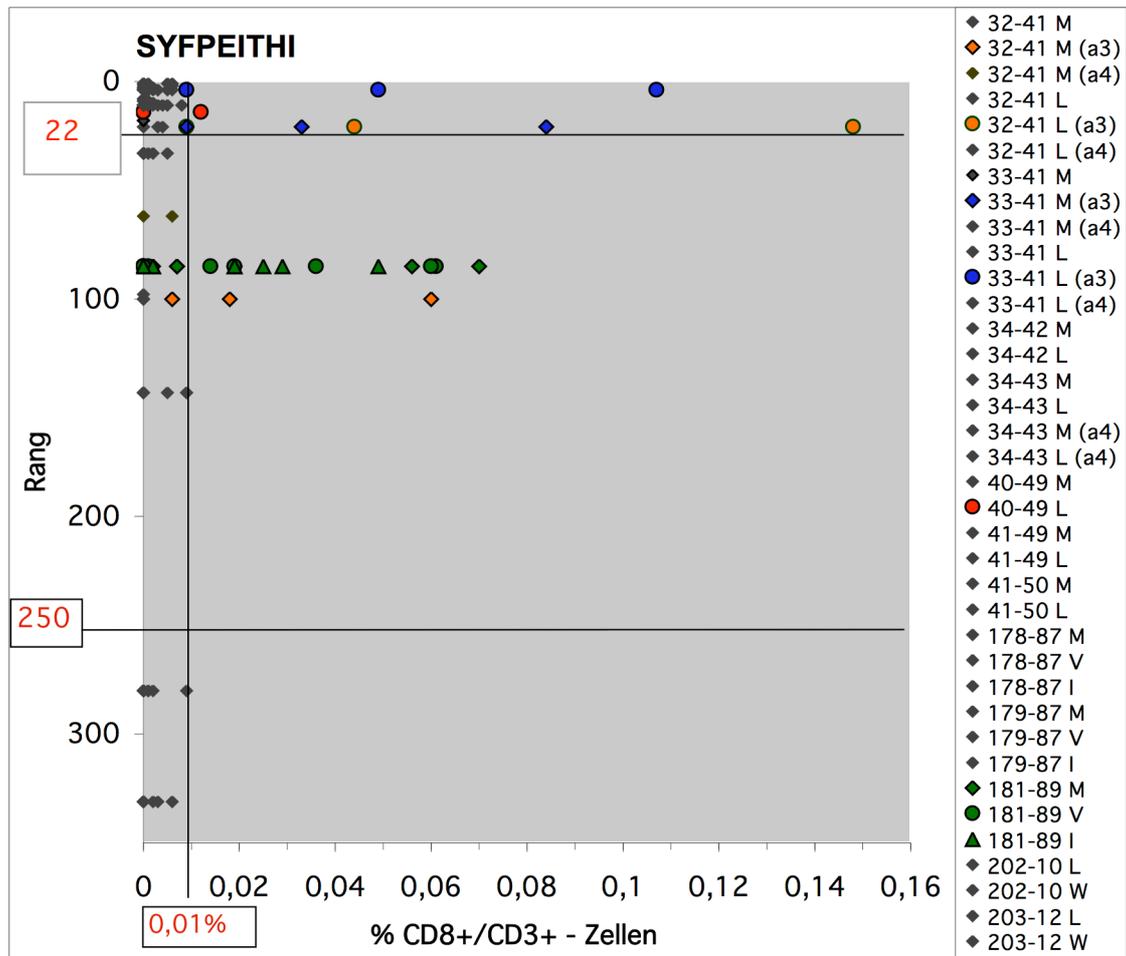


Abb. 21: Gegenüberstellung der Vorhersage der getesteten Peptide bei SYFPEITHI und der Interferon-gamma-Antworten im ELISpot. Die Vorhersagen der Peptide sind unterteilt in hochaffine Vorhersagen (Position 1-22, in mittelhohe Vorhersagen (Position 23-250) und schwache Vorhersagen (Position > 250). Die Grenze zwischen niedrig- und hochamplitudigen Vorhersagen liegt bei 0,01% der CD8-Zellen. Farblich markiert dargestellt sind nur Peptide, welche mindestens einmal eine hochamplitudige Antwort induzierten.

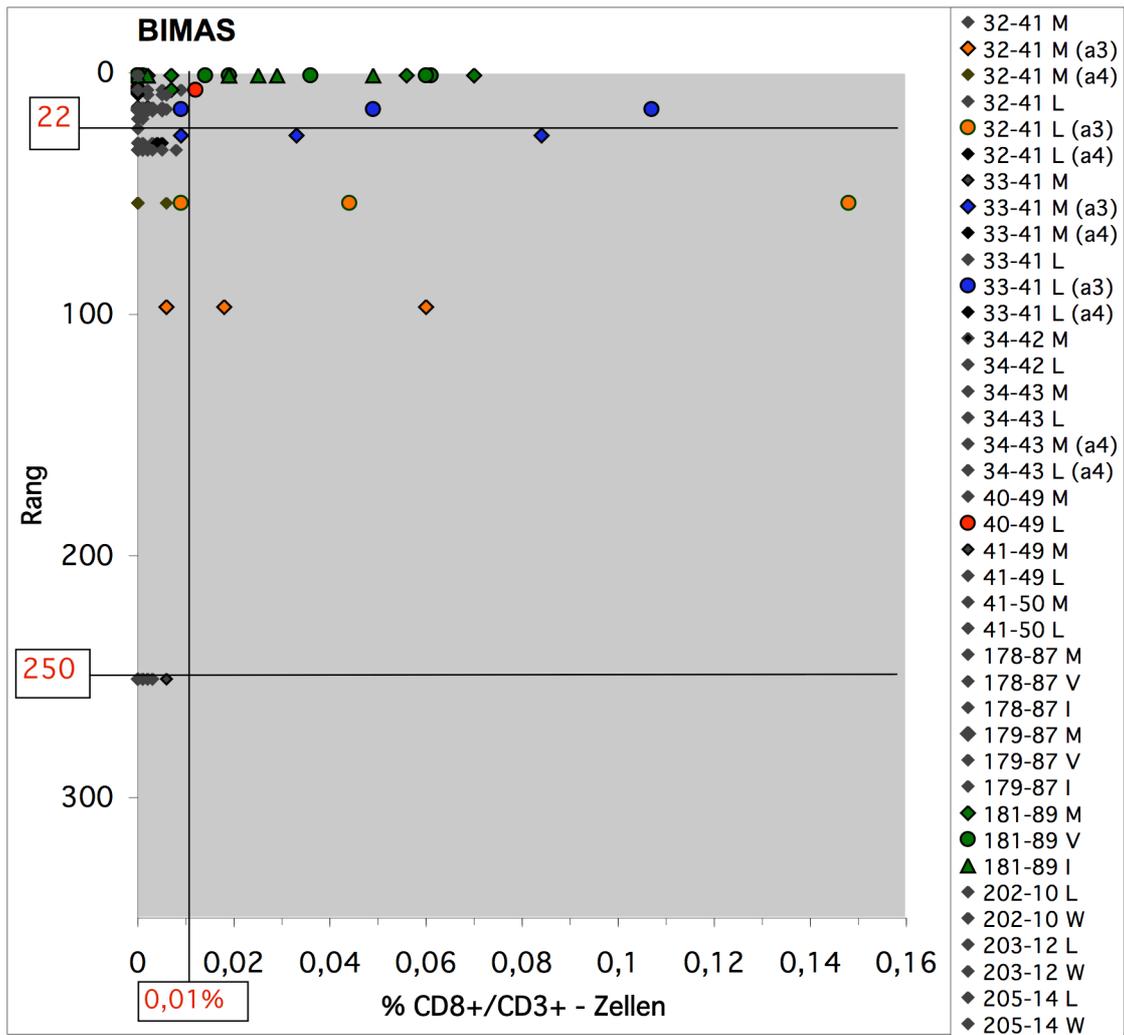


Abb. 22: Gegenüberstellung der Vorhersage der getesteten Peptide bei BIMAS und der Interferon-gamma-Antworten im ELISpot. Die Vorhersagen der Peptide sind unterteilt in hochaffine Vorhersagen (Position 1-22, in mittelhohe Vorhersagen (Position 23-250) und schwache Vorhersagen (Position > 250). Die Grenze zwischen niedrig- und hochamplitudigen Vorhersagen liegt bei 0,01% der CD8-Zellen. Farblich markiert dargestellt sind nur Peptide, welche mindestens einmal eine hochamplitudige Antwort induzierten.

4.4.2 Einfluss der Mutationen auf Bindungsvorhersage und ELISpot-Antwort

Der Einfluss der Mutationen auf die Bindungsvorhersage wurde bereits in Kap. 4.2.2 beschrieben. Um die Vorhersagen mit den tatsächlich beobachteten CTL-Antworten vergleichen zu können, wurde zunächst für jedes Peptid jeweils der Quotient (Index) aus dem Mittelwert der Antworten gegen die mutante Variante und dem Mittelwert der Reaktionen gegen das korrespondierende Wildtyppeptid gebildet. Der Median der ermittelten Indices wurde dann dem Median der vorhergesagten Indices für die jeweiligen Peptide gegenübergestellt (Abb. 23)

Peptide, in welchen die Mutation M41L eine Ankerposition betraf, induzierten insgesamt deutlich höhere CTL-Antworten als ihre korrespondierenden Wildtyppeptide (Index = 1,5 im Median (0,86- 7)). Dieses Ergebnis korreliert gut mit den Vorhersagen der beiden Datenbanken, wonach die mutanten Peptide deutlich höhere Bindungsvorhersagen erhalten (SYFPEITHI: Index = 1,4 im Median; BIMAS: Index = 4,27 im Median). Bei einem Peptid, in welchem die Mutation keine dominante Ankerposition betraf, zeigten sich sowohl in beiden Vorhersagen, als auch bei den ELISpot-Antworten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und mutanter Variante (Index = 1).

Die Indices der Antworten gegen die Peptide mit den Mutationen M184V und M184I und ihre zugehörigen Wildtyppeptide betragen im Median 1,05 (0,57- 1,88) bzw. 0,8 (0,38- 0,86). Die Vorhersage bei BIMAS, wonach sich die Bindungsaffinität durch die Mutationen nicht verändern würde (Index =1 im Median), traf also besser zu als die Vorhersage von SYFPEITHI, wonach die Bindungsaffinität durch die Mutationen deutlich erhöht werden würde (Index = 1,19 im Median).

Die Peptide mit der Mutation L210W wurden in dieser Untersuchung jeweils nur bei 1 Patienten getestet, weshalb eine Untersuchung der Korrelation zwischen Vorhersagen und CTL-Antworten nicht sinnvoll ist.

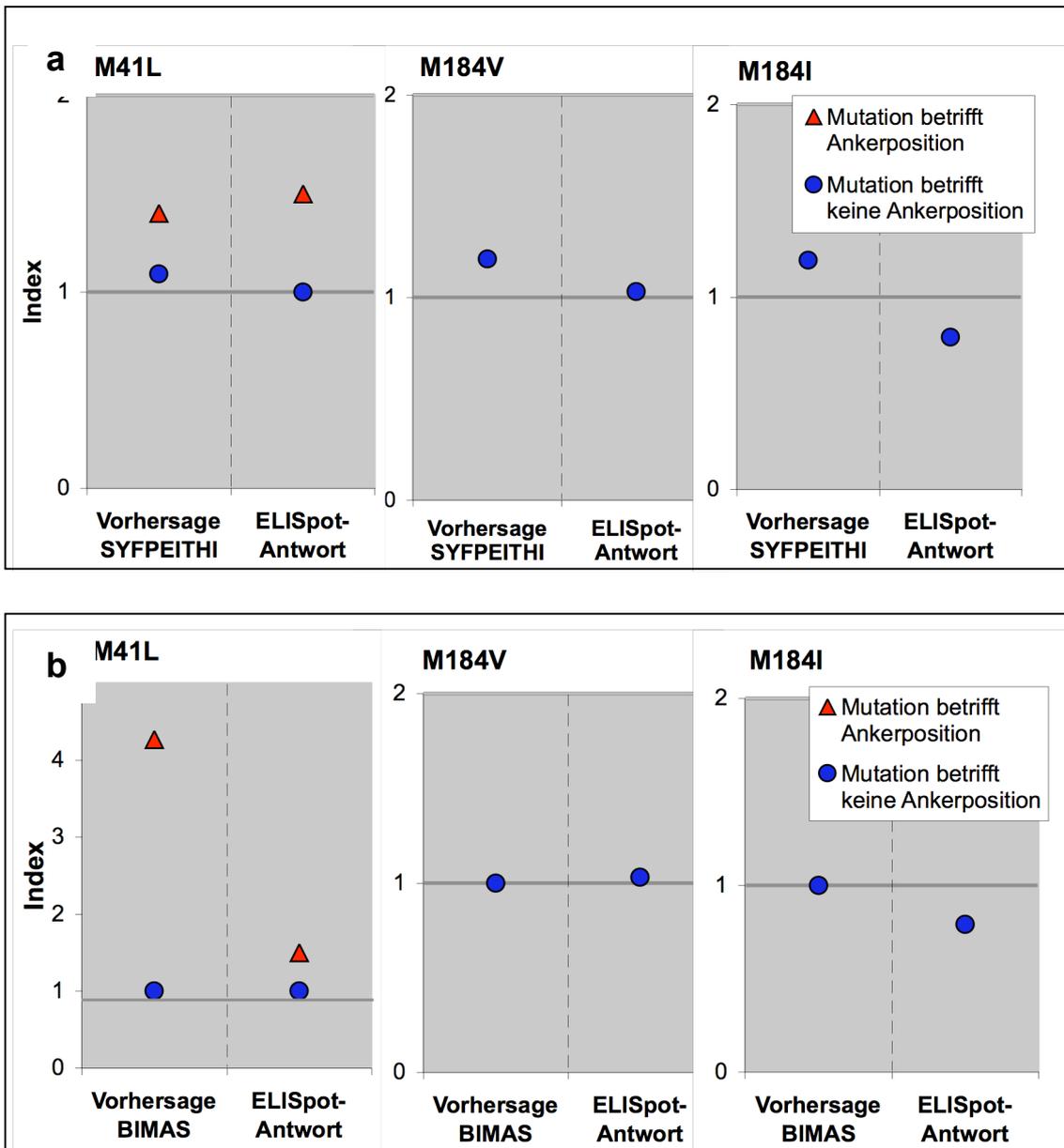


Abb. 23: Einfluss der Mutationen auf die Bindungsvorhersage bei SYFPEITHI (a) und BIMAS (b) und auf die CTL-Antwort im ELISpot. Gegenübergestellt sind jeweils der Median der Indices aus der Vorhersage (jeweils Quotient aus Vorhersage für mutantes Peptid und Vorhersage für das zugehörige Wildtyppeptid) und der Median der Indices der ELISpot-Antworten (jeweils Quotient aus der CTL-Antwort gegen das mutante Peptid und der Antwort gegen das Wildtyppeptid).

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Frage, wie bestimmte NRTI-Resistenz-assoziierte Mutationen die CTL-Erkennung beeinflussen bzw. ob durch diese Mutationen neue CTL-Epitope entstehen.

Die Entstehung von Mutationen bzw. ihr Wiederverschwinden beruht auf einem komplexen Wechselspiel aus verschiedenen Faktoren, welche einen Selektionsdruck auf die jeweilige Viruspopulation ausüben. So werden bei unbehandelten Patienten unter dem Immunselektionsdruck durch die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) bevorzugt Mutationen selektioniert, welche die Bindung von Peptiden an die HLA-I-Moleküle des Wirts negativ beeinflussen und so zur fehlenden Erkennung HLA-I-spezifischer Epitope durch die CTL führen können (*CTL escape*; Review [42]). Die *CTL-escape*-Mutationen führen jedoch häufig zu einer verminderten replikativen Fitness des Virus. Bei Übertragung auf einen Wirt, welcher den das Wildtyp-Epitop präsentierenden HLA-Typ nicht aufweist, bilden sich *CTL-escape*-Mutationen dann häufig schnell wieder zurück [36], [70], [103]. Mutationen, welche die Bindung der Peptide an die HLA-Moleküle des Wirts positiv beeinflussen und so zu einer Verbesserung der CTL-Erkennung führen, müssten theoretisch unterdrückt werden, es sei denn, sie würden einen anderen wichtigen Selektionsvorteil bieten. Unter dem Selektionsdruck der antiretroviralen Therapie könnten also auch Virusstämme mit Mutationen selektioniert werden, welche die CTL-Erkennung verbessern.

Einige Querschnittsstudien haben bereits starke CTL-Antworten gegenüber mutanten Varianten HLA-A2- und HLA-A3-restringierter optimaler RT-Peptide [71], [95], [96] sowie gegenüber Protease-Peptiden mit resistenzassoziierten Mutationen [105] nachgewiesen. In dieser Studie sollte nun anhand longitudinaler Proben von Patienten einer prospektiv nachverfolgten Patientenkohorte überprüft werden, ob CTL-Antworten gegen mutante Peptide *de novo* entstehen können. Dabei ist zu bedenken, dass unter einer modernen kombinierten antiretroviralen Therapie die Resistenzentwicklung im Zeitraum weniger Jahre selten ist. Aus der geringen Anzahl der Patienten, die in der Kohortenstudie die zu untersuchenden Resistenzen entwickelten und von denen asservierte Zellen vor Therapiebeginn und nach Resistenzentwicklung vorhanden waren, kamen darüber hinaus nur diejenigen mit HLA-A2 in Betracht (ca. 50%). Dies erklärt den eher kasuistischen Charakter der Beobachtungen.

Am Beginn der Untersuchung stand die Durchführung einer datenbankgestützten MHC-I-Peptidbindungsanalyse. Da eine Testung aller die fraglichen Mutationen beinhaltenden Peptide mittels ELISpot-Analyse aufgrund der begrenzten Menge an Versuchsmaterial bei standardisierter prospektiver Probenasservierung nicht möglich war und die Bindung eines Peptids an das MHC-I-Molekül eine Voraussetzung für die Erkennung durch CD8-positive T-Zellen ist [101], wurde die datenbankgestützte Peptidbindungsvorhersage mittels der Algorithmen SYFPEITHI und BIMAS zur Vorauswahl der im ELISpot zu analysierenden Peptide verwendet. Der Vergleich der Vorhersage mit den ELISpot-Ergebnissen zeigt, dass nur 21% (BIMAS) bzw. 16% (SYFPEITHI) der durch die Algorithmen gut vorhergesagten Peptide eine starke Antwort im ELISpot induzieren konnte. Ein ähnlich niedriger positiv prädiktiver Wert der Peptidbindungsanalysen zeigte sich auch in einer Studie von Elkington et al. [31]. Hier induzierten 30% der Peptide, für welche durch BIMAS und SYFPEITHI eine hohe Bindungsaffinität vorhergesagt worden war, eine IFN γ -Antwort im ELISpot. Diese niedrigen Werte lassen sich dadurch erklären, dass zur Induktion einer CTL-Reaktion eine gute MHC-I-Molekül-Bindung eines Peptids alleine nicht ausreicht. Für die Vorhersage der MHC-I-Peptid-Bindung hatten Gomez-Nunez et al. in einer neueren Studie eine hohe Sensitivität, Spezifität und positiv prädiktive Werte von 78% (SYFPEITHI) bzw. 86% (BIMAS) für die beiden Algorithmen nachgewiesen [41], ausschlaggebende Faktoren für die Induktion einer CTL-Reaktion sind neben der MHC-Bindung aber unter anderem auch die Antigen-Prozessierung, die Immundominanz sowie das Vorhandensein eines passenden T-Zell-Repertoires [119]. Zur Verbesserung des positiven Vorhersagewerts könnten bei weiteren Versuchen Datenbanken miteinbezogen werden, welche neben der MHC-Bindung auch die Antigenprozessierung berücksichtigen [26], [58]. Diese zeigten bessere Ergebnisse als die Verwendung von SYFPEITHI und BIMAS alleine [58].

Eine neue Art von Peptidbindungsvorhersage-Algorithmen sind die so genannten *Artificial Neural Networks* (ANN) und das *Hidden Markov Model* (HMN), welche im Gegensatz zu den sequenzbasierten Algorithmen SYFPEITHI und BIMAS strukturbasiert arbeiten. Diese Algorithmen weisen eine höhere Spezifität als SYFPEITHI und BIMAS auf [44]. Für die vorliegende Untersuchung war jedoch der Ausschluß falsch negativer Ergebnisse wichtiger als der von falsch positiven, da keine möglichen neuen CTL-Epitope übersehen werden sollten. Eine höhere Sensitivität

wurde wiederum für die sequenzbasierten Methoden im Vergleich zu den strukturbasierten Methoden nachgewiesen [44]. In der vorliegenden Arbeit wiesen die einzelnen Algorithmen jeweils eine Sensitivität von 50% (SYFPEITHI) bzw. 63% (BIMAS) auf, durch die Verwendung beider Datenbanken konnten jedoch 88% der tatsächlich bindenden Peptide vorhergesagt werden. Die kombinierte Anwendung der beiden Datenbanken erscheint also gerechtfertigt. Im Vergleich der beiden Datenbanken zeigte BIMAS in der vorliegenden Studie eine bessere Übereinstimmung mit den ELISpot-Ergebnissen als SYFPEITHI, vor allem in der Bindungsvorhersage der Peptide RT 181-89M/V/I. Auch bei Gomez-Nunez et al. [41] zeigte BIMAS in der Vorhersage der MHC-Bindung im Vergleich zu SYFPEITHI eine deutlich bessere Spezifität (82% vs. 73%) als auch Sensitivität (86% vs. 75%).

Vor Beginn der Diskussion der ELISpot-Ergebnisse sollen hier zunächst zwei methodische Besonderheiten der vorliegenden Untersuchung diskutiert werden.

Die ELISpot-Ergebnisse wurden mit einer sonst nicht üblichen Methode quantifiziert. Die ausgezählten Dots, welche IFN γ -produzierenden CD8-Zellen entsprechen, wurden als Prozentanteil der tatsächlich in der Probe vorhandenen CD8-positiven Zellen beschrieben und nicht wie sonst üblich als Dots bzw. *Spot forming cells* (SFC) pro 10⁶ Zellen (vgl. z.B. [2]). Diese Methode erscheint für die vorliegende Arbeit insofern geeigneter als die herkömmliche, da die Proben der Patienten zu den verschiedenen Zeitpunkten teilweise stark variierende CD8-Zell-Anteile an der Gesamtzellzahl aufwiesen (z.B. 59,5% zu T1 vs. 37,2% zu T2 bei Patient 5) und daher eine Korrektur für diesen Faktor notwendig erschien. Mit der herkömmlichen Methode wären CTL-Antworten zu den verschiedenen Zeitpunkten weniger gut vergleichbar gewesen.

Die zweite Besonderheit ist die Verwendung autologer Peptide bei drei von fünf Patienten. Am Beispiel von Patient 3 konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung autologer Peptide CTL-Antworten detektiert werden können, welche durch die alleinige Verwendung von Consensus-Peptiden nicht nachgewiesen werden. Altfeld et al. [6] beschreiben eine Zunahme der CTL-Antworten um fast 30% durch die Verwendung von autologen Peptiden.

Die ELISpot-Analysen zeigten unterschiedliche Ergebnisse für die einzelnen Mutationen. Im Falle der M41L-Mutation ging das Auftreten der mutanten Variante mit einer Verbesserung bzw. *de novo* Induktion von CTL-Reaktionen gegen die mutanten

Peptide einher. Samri et al. [95] beschreiben eine spezifische CTL-Antwort gegen das mutante Peptid 33-41L bei einem HLA-A*0201 positiven Patienten, bei dem die mutante Virusvariante dominant war. Gegen das mutante Peptid zeigte sich dort eine hochamplitudige Antwort, während das Wildtyp-Peptid nicht erkannt wurde. Mason et al. [71] hingegen fanden bei 6 von 6 HLA-A*0201-positiven Patienten unter antiretroviraler Therapie keine signifikanten Unterschiede in der CTL-Reaktion gegen den Wildtyp und die M41L-Variante dieses Peptides. Beide Varianten konnten in vitro CTL gegen sich und die jeweils andere Variante aktivieren, was für eine Kreuzreaktivität spricht. Ob die Antworten der beiden Patienten der vorliegenden Arbeit, bei welchen starke Antworten gegen die mutanten Peptide nachweisbar waren, als spezifisch anzusehen sind, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht hinreichend geklärt werden. Bei einem Patienten, bei welchem die Mutation zum zweiten Zeitpunkt die dominante Virusvariante darstellte, ging der Anstieg der Antwort gegen die mutanten Peptide mit einem Rückgang der CTL-Antwort gegen die Wildtyp-Peptide einher, was für die Spezifität der beobachteten Antworten spricht. Bei dem anderen Patienten lag zum zweiten Zeitpunkt die M41L-Variante im Mischtyp mit dem Wildtyp vor. Hier zeigte sich zusammen mit dem Anstieg der Reaktion gegen die Mutante auch eine gleichzeitige Steigerung der Antwort gegen die Wildtypvariante. Bei beiden Patienten konnten auch schon zum ersten Zeitpunkt Antworten gegen die mutante Variante detektiert werden. Die Antworten zu Zeitpunkt 1 waren jeweils nur niedrigamplitudig, trotzdem könnte ihr Auftreten zusammen mit dem parallelen Verlauf der Antworten gegen den Wildtyp und die Mutation bei einem Patienten auf das Vorliegen von Kreuzreaktivität hindeuten. Eine andere Erklärung für die niedrigamplitudigen Reaktionen gegen die Variante zum Zeitpunkt 1 könnte das Vorhandensein von mutanten Quasispezies zu diesem Zeitpunkt sein. Bedauerlicherweise erlaubt die genotypische Resistenzanalyse keine sichere Erkennung einer Variante mit einem Anteil von weniger als 10-20 Prozent an der gesamten Viruspopulation. Die parallel zur Antwort gegen die Mutante ansteigende Wildtyp-Antwort könnte eine spezifische Antwort gegen den im Mischtyp vorliegenden Wildtyp-Virusstamm darstellen, welche durch die starke Antwort gegen die Mutante verstärkt wird. Die Varianten wurden zum Zeitpunkt 2 bei beiden Patienten deutlich besser erkannt als die Wildtyp-Peptide. Dieses Ergebnis stimmt mit den Vorhersagen der beiden Algorithmen überein, wonach die Mutation M41L die Affinität der Peptide zum MHC-Molekül deutlich erhöht, falls sie in einer Ankerposition auftritt. Bei den

Peptiden, gegen welche die beschriebenen Antworten detektiert werden konnten, befand sich die Mutation immer in einer Ankerposition. Interessanterweise war die starke CTL-Antwort gegen die M41L-Variante bei Patient 3 schon zum Interimszeitpunkt nachweisbar, 6 Monate vor dem Nachweis der M41L-Mutation. Obwohl die CTL-Antwort im Verlauf noch stärker wurde, konnte sie das Auftreten der Mutation nicht verhindern.

Spezifische CTL-Antworten gegen Peptide mit den Mutationen M184V und M184I wurden in einer Studie von Schmitt et al. [96] nachgewiesen. Einer von 28 HLA-A*0201-positiven Patienten erkannte die mutanten Peptide 179-87V und I sowie 178-87V, jedoch nicht die jeweiligen Wildtyp-Peptide. Bei den getesteten Patienten konnte eine solche spezifische Erkennung dieser Peptide nicht festgestellt werden. Die mutanten Peptide RT 178-87V/I und RT 179-7V/I sowie deren korrespondierende Wildtyp-Peptide wurden von keinem der Patienten hochamplitudig erkannt. Dagegen wurden die Peptide RT181-89V und I von drei von fünf Patienten hochamplitudig erkannt. Die mutanten Peptide wurden jedoch überwiegend zusammen mit dem Wildtyp RT181-89M erkannt. Es zeigte sich im Gegensatz zur M41L-Mutation keine bevorzugte Erkennung der mutanten Peptide, was der Peptidbindungsvorhersage bei BIMAS entspricht, wonach die MHC-Bindung des Wildtyp-Peptids RT181-89M durch die Mutationen M184V und M184I, welche in einer Nicht-Ankerposition auftreten, nicht beeinflusst wird. Samri et al. [95] beschreiben eine kreuzreaktive Antwort gegen Wildtyp und M184V-Variante des Peptids RT181-89 in einem HLA-A*0201-positiven Patienten vor Beginn der antiretroviralen Therapie. Auch bei einem der beiden Patienten dieser Studie, bei welchen zum Zeitpunkt 1 die Mutation M184V nicht nachweisbar war, konnte schon zu Beginn der Therapie eine kreuzreaktive Antwort gegen Wildtyp- und mutante Peptide detektiert werden, welche zum zweiten Zeitpunkt hin abnahm. Bei dem zweiten Patienten jedoch trat erst nach dem Aufkommen der Mutation M184V eine vor Therapie nicht nachweisbare, starke *de novo*-Antwort gegenüber den mutanten Varianten und dem Wildtyp auf.

Parallel zur Untersuchung der M184V-Varianten wurden auch immer die M184I-Varianten getestet, obwohl diese Mutation bei keinem der Patienten zu den getesteten Zeitpunkten nachweisbar war. Wainberg et al. [113] und Schuurman et al. [99] hatten beschrieben, dass vor dem Auftreten der M184V-Mutation häufig die M184I-Variante im Plasma nachweisbar ist, dann aber mit dem Erscheinen der M184V-Mutation wieder

verschwindet. Eine Erklärung für das nur transiente Vorkommen dieser Mutation könnte eine starke Immunantwort gegen diese Variante im Gegensatz zur M184V-Variante darstellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen gegen diese These, da weder in der theoretischen Peptidbindungsvorhersage noch in der ELISpot-Analyse die M184I-Mutation eine bessere Vorhersage erhielt oder höhere CTL-Antworten induzierte als die M184V-Variante. Der Grund für das rasche Wiederverschwinden ist wohl eher in einer niedrigeren enzymatischen Aktivität der die M184I-Mutation enthaltenden Reversen Transkriptase zusammen mit einer begleitenden reduzierten viralen Fitness zu suchen [52], [57], [89].

Eine weitere Teilfrage dieser Untersuchung war, ob durch die RT-Mutationen neue CTL-Epitope entstehen können. Die mutanten Varianten der HLA-A2 und HLA-A3 restringierten bekannten optimalen Peptide RT 33-41 (A2), RT 33-43 (A3) (vgl [38]) konnten in einem Patienten hochamplitudige Antworten induzieren, allerdings nur in der autologen Variante. Gegenüber dem mutanten Peptid RT 40-49 L konnte in einem Patienten eine hochamplitudige Antwort nachgewiesen werden. Diese Reaktionen waren also jeweils nur in einzelnen Patienten und teilweise autologen Varianten nachweisbar, trotzdem ergeben sich hieraus Hinweise darauf, dass durch RT-Mutationen neue CTL-Epitope entstehen können.

Das bisher nicht als optimal definierte Peptid RT 181-89M (vgl. [38]) wurde von 2/5 getesteten HLA-A*0201-positiven Patienten hochamplitudig erkannt, seine mutanten Varianten RT 181-89V und RT 181-89I von 3/5 Patienten. Im Vergleich dazu wurden die optimalen Peptide SL9 (p17 77-85, SLYNTVATL), und IV9 (RT 309-317, ILKEPVHGV) von 3/5 bzw. 3/4 Patienten hochamplitudig erkannt. Auch Samri et al. konnten gute Antworten gegen das Wildtyp-Peptid RT 181-89M und seine mutante Variante RT 181-89V in 1 von 2 HLA-A*0201 positiven Patienten nachweisen [95]. Das Peptid RT 181-89M und seine mutanten Varianten erhalten außerdem bei BIMAS eine höhere Peptidbindungsvorhersage als SL9, welches als immundominantes Peptid für HLA-A*0201 beschrieben wird [12]. Die sich daraus ergebende Hypothese, dass das Peptid RT 181-89 ein neues optimales CTL-Epitop für HLA-A*0201 darstellen könnte, müsste durch weitere Versuche an einer größeren HLA-A2-positiven Patientenkohorte sowie MHC-Stabilisierungsversuche bestätigt werden.

Es konnte also gezeigt werden, dass mit dem Auftreten der Reverse-Transkriptase-Mutationen M41L und M184V, welche mit einer Resistenz gegen NRTI einhergehen,

de novo CTL-Antworten gegen die mutanten Varianten generiert werden können, die teilweise stärker ausfallen als gegen die korrespondierenden Wildtyp-Peptide. Das HI-Virus entgeht also dem Selektionsdruck der antiretroviralen Medikamente im Falle dieser beiden Mutationen nur auf Kosten einer offensichtlich verbesserten CTL-Antwort.

Es stellt sich die Frage, welche Rolle diese neu induzierten bzw. verbesserten CTL-Antworten für die Kontrolle der HIV-Infektion spielen. Das Pol-Protein, welches das Vorläuferprotein für die Reverse Transkriptase darstellt, ist eines der Hauptantigene für die HIV-spezifische CTL-Antwort [56], [59]. Außerdem wurde gezeigt, dass der Verlust der CTL-Antwort gegen ein einziges Epitop durch *CTL-Escape* zum raschen Anstieg der Viruslast und zur Progression zu AIDS führen kann [10], [43]. Angesichts der Breite der HIV-spezifischen CTL-Antwort ist der Anteil einer einzigen Peptid-spezifischen CTL-Antwort an der Viruskontrolle aber nur schwer zu quantifizieren. Es ist denkbar, dass der Anteil der hier nachgewiesenen HLA-A2-restringierten CTL-Antworten an der Viruskontrolle gering ist, wie es bereits für andere HLA-A2-restringierte Antworten [12], [53] und HLA-A-restringierte Antworten insgesamt [53] gezeigt wurde. Die Tatsache, dass der Patient 3 mit seiner Viruslast in den 6 Monaten zwischen dem Interimszeitpunkt und T2 nicht mit seiner Viruslast ansteigt, sondern im Gegenteil leicht abfällt und eine Logstufe unter der Baseline-Viruslast bleibt, obwohl er in dieser Zeit die M41L-Mutation entwickelt, könnte ein Hinweis dafür sein, dass die gute CTL-Antwort gegen die Mutation wie auch gegen den Wildtyp zur Kontrolle der Viruslast beiträgt. Allerdings könnten auch andere Faktoren, wie die CTL-Antwort gegen andere Epitope (im Falle des genannten Patienten die verbesserte Antwort gegenüber IV9) oder eine verminderte virale Fitness der die M41L-Mutation enthaltenden Virusstämme im Vergleich zum Wildtyp [47] für die gute Viruskontrolle verantwortlich sein. Inwieweit also die verbesserten CTL-Antworten zur Viruskontrolle beitragen und inwiefern der Immunselektionsdruck dem Selektionsdruck durch die antiretroviralen Medikamente entgegen wirken kann, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. So könnte man in einer Kohorte von HLA-A2-positiven Patienten unter Therapie mit für die beiden Mutationen selektionierenden Medikamenten, welche keine Resistenzen aufweisen, die CTL-Antwort gegenüber den mutanten Varianten bestimmen und mit denen von Patienten mit medikamentenresistenten Virusvarianten vergleichen.

Ungeachtet der Rolle, welche den verbesserten CTL-Antworten bei der Viruskontrolle zukommt, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass nicht nur das HI-Virus sich an die CTL-Antwort anpassen und ihr mittels *CTL escape* entgehen kann, sondern dass umgekehrt auch das Immunsystem die Fähigkeit besitzt, sich an veränderte Virusvarianten zu adaptieren. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Allen et al. [5], welche in einer aktuellen Studie die *de-novo*-Induktion von CTL-Antworten gegen *CTL-escape*-Varianten beschrieben hatten.

Die hier nachgewiesene Tatsache, dass starke CTL-Antworten gegen medikamentenresistente Virusvarianten induziert werden können, zeigt neue Möglichkeiten für die Vakzineforschung auf. Die kreuzreaktive CTL-Antworten induzierenden Peptide RT181-89M/V und I könnten im Rahmen einer therapeutischen Vakzine genutzt werden, um Immunantworten sowohl gegen Wildtyp-, als auch mutante Varianten zu verstärken. Eine Verwendung dieser Peptide im Rahmen einer prophylaktischen Immunisierung könnte dazu beitragen, die Übertragung von Wildtyp-Viren als auch primärresistenten Viren mit der Mutation M184V in HLA-A2-positiven Patienten zu verhindern. Für den Einsatz dieser Peptide im Rahmen möglicher Impfstoffe spricht die gute Konservierung der Region um das Peptid RT181-89. So beschreiben Harrer et al. eine gute Konservierung der Region YMDD (RT183-86) [46] und in einer Kohorte von 27 HIV-infizierten Patienten mit resistenzassoziierten Mutationen des Universitätsklinikum Eppendorf – im Folgenden *UKE-Kohorte* genannt – fand sich bei keinem Patienten ein Polymorphismus in der Region RT181-89.

Die Immunisierung mit die Mutation M41L-enthaltenden Peptiden, welche deutlich höhere CTL-Antworten induzierten als ihre korrespondierenden Wildtyppeptide, vor Beginn einer antiretroviralen Therapie mit für diese Mutation selektionierenden Medikamenten (Zidovudin, Stavudin) könnte aufgrund der bevorzugten Erkennung der M41L-Mutation gegenüber dem Wildtyp eine prätherapeutisch vorhandene Immunantwort gegen diese Mutation induzieren und somit deren Entstehung verzögern oder sogar verhindern. Problematisch im Hinblick auf den Einsatz im Rahmen einer möglichen Vakzine ist die Tatsache, dass die Region um die Mutation M41L sehr schlecht konserviert ist. 16 von 27 Patienten der *UKE-Kohorte* wiesen Polymorphismen in dieser Region auf. In dieser Studie wurden spezifische CTL-Antworten gegenüber solchen autologen, polymorphistischen Virusvarianten nachgewiesen, wohingegen die entsprechenden Consensus-Peptide nicht erkannt wurden. So erscheint es eher

unwahrscheinlich, dass durch eine Impfung mit Consensus-Peptiden eine Immunantwort induziert werden kann, welche auch die autologen Virusvarianten erfasst. Man müsste also zusätzlich zu den Consensus-Peptiden auch Peptide mit den häufigsten Polymorphismen verwenden. Da, wie im Fall von Patient 3 beschrieben, die starken CTL-Antworten gegen die M41L-Variante zum Interimszeitpunkt eine Entstehung der Mutation zu T2 nicht verhinderten, erscheint es außerdem notwendig, die durch eine mögliche Vakzine induzierten CTL-Antworten zusätzlich zu verstärken. Hierzu bieten sich Verfahren an, mit deren Anwendung in neueren therapeutischen Vakzine-Studien viel versprechende Ergebnisse erzielt werden konnten, wie zum Beispiel die zusätzliche Gabe bzw. Induktion von Zytokinen oder mit Peptiden gepulste Dendritische Zellen (Review: [87]).

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Frage, wie bestimmte NRTI-induzierte Resistenzmutationen die CTL-Erkennung beeinflussen.

In einer theoretischen MHC-I-Peptid-Bindungsanalyse mittels der Algorithmen SYFPEITHI und BIMAS zeigte sich eine deutliche Verbesserung der vorhergesagten Bindungsaffinität durch die Mutation M41L bei Peptiden, in welchen die Mutation eine dominante Ankerposition betraf, eine gleichbleibende (BIMAS) bzw. leicht verbesserte (SYFPEITHI) Vorhersage durch die Mutationen M184V und I sowie eine insgesamt unveränderte Vorhersage durch die Mutation L210W. Insgesamt zeigte die parallele Verwendung der beiden Algorithmen eine hohe Sensitivität bei der Vorhersage von Peptiden, welche starke IFN γ -Antworten induzierten. Dabei stimmte die Vorhersage bei BIMAS besser mit den ELISpot-Ergebnissen überein als bei SYFPEITHI.

Im ELISpot-Assay zeigten sich starke Antworten gegenüber Peptiden mit den Mutationen M41L, M184V und M184I. Nur schwache Antworten fanden sich dagegen gegenüber Peptiden welche die L210W-Mutation enthielten.

Das Neuaufreten der M41L-Mutation ging mit *de novo*, bzw. stark verbesserten IFN γ -Antworten gegenüber mutanten sowie teilweise auch Wildtyp-Peptiden im ELISpot-Assay einher. Die Antworten gegenüber den mutanten Peptide fielen dabei jeweils deutlich stärker aus, als die gegen die Wildtyp-Peptide, was der Datenbankvorhersage entspricht. Mittels autologer Peptide konnten hierbei Antworten detektiert werden, welche mit Consensus-Peptiden nicht nachweisbar waren.

Peptide mit den Mutationen M184V und M184I wurden jeweils nur gemeinsam mit ihren Wildtyp-Varianten erkannt, was für eine Kreuzreaktivität spricht. Bei einem von zwei Patienten, bei welchen die M184V-Mutation zum zweiten Zeitpunkt neu auftrat, ging das Auftreten der Variante mit einer *de novo*- CTL-Antwort gegenüber Wildtyp- und mutanten Varianten einher. Gegenüber dem Peptid RT181-89M und seinen mutanten Varianten RT181-89V und I wurden bei zwei von fünf bzw. drei von fünf Patienten starke IFN γ -Antworten detektiert, woraus sich die Hypothese ergibt, dass die Peptide RT181-89 M, V und I HLA-A2 restringierte CTL-Epitope darstellen.

Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten der NRTI-Resistenzmutationen M41L und M184V *de novo* CTL-Antworten gegenüber mutanten Peptiden induzieren kann und somit das Virus dem Selektionsdruck der antiretroviralen Medikamente im Falle dieser Mutationen nur auf Kosten einer verbesserten Immunantwort entgehen kann. Die Rolle dieser *de novo* CTL-Antworten für die Kontrolle der HIV-Infektion ist weiter abzuklären.

7 Abkürzungsverzeichnis

3TC	Lamivudin
ABC	Abacavir
AIDS	aquired immunodeficiency syndrom (Erworbenes Immunschwächesyndrom)
AZT	Zidovudin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCR5	C-C motif chemokine receptor 5
CD	cluster of differentiation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CPT	cell preparation tubes
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
d4T	Stavudin
DC	dentritic cells (Dentritische Zellen)
ddC	Zalcitabin
ddI	Didanosin
DLV	Delaviridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EFV	Efavirenz
EI	Entry-Inhibitoren
ELISpot	enzyme linked immunospot
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)

HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HS	highscore
i.v.	intravenös
IC	inhibitory concentration
IN	Integrase
INF γ	Gamma-Interferon
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MW	Mittelwert
NNRTI	Nicht-Nukleosidanaloger Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	Nukleosidanaloger Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NVP	Nevirapin
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PI	Protease-Inhibitor
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PR	Protease
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transkriptase
SHIV	SIV-HIV-Hybridvirus
SIV	Simianes Immunodefizienzvirus
T1, (2)	Zeitpunkt 1, (2)
TAM	Thymidin-Analoga-Mutationen
TAP	transporter associated with antigen presentation

TCR	T-Zell-Rezeptor
TDV	Tenofovir
T _{interim}	Interimszeitpunkt
VL	Viruslast
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

8 Literaturverzeichnis

- [1] **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S** (2007) Cellular and molecular immunology, Saunders. S. 97-112.
- [2] **Addo, M. M., X. G. Yu, A. Rathod, D. Cohen, R. L. Eldridge, D. Strick, M. N. Johnston, C. Corcoran, A. G. Wurcel, C. A. Fitzpatrick, M. E. Feeney, W. R. Rodriguez, N. Basgoz, R. Draenert, D. R. Stone, C. Brander, P. J. Goulder, E. S. Rosenberg, M. Altfeld, and B. D. Walker.** 2003. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* **77**:2081-92.
- [3] **Allele frequencies in worldwide populations.** Database (online). <http://www.allelefreqencies.net>
- [4] **Allen, T. M., M. Altfeld, S. C. Geer, E. T. Kalife, C. Moore, M. O'Sullivan K, I. Desouza, M. E. Feeney, R. L. Eldridge, E. L. Maier, D. E. Kaufmann, M. P. Lahaie, L. Reyor, G. Tanzi, M. N. Johnston, C. Brander, R. Draenert, J. K. Rockstroh, H. Jessen, E. S. Rosenberg, S. A. Mallal, and B. D. Walker.** 2005. Selective escape from CD8+ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J Virol* **79**:13239-49.
- [5] **Allen, T. M., X. G. Yu, E. T. Kalife, L. L. Reyor, M. Lichterfeld, M. John, M. Cheng, R. L. Allgaier, S. Mui, N. Frahm, G. Alter, N. V. Brown, M. N. Johnston, E. S. Rosenberg, S. A. Mallal, C. Brander, B. D. Walker, and M. Altfeld.** 2005. De novo generation of escape variant-specific CD8+ T-cell responses following cytotoxic T-lymphocyte escape in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **79**:12952-60.
- [6] **Altfeld, M., M. M. Addo, R. Shankarappa, P. K. Lee, T. M. Allen, X. G. Yu, A. Rathod, J. Harlow, K. O'Sullivan, M. N. Johnston, P. J. Goulder, J. I. Mullins, E. S. Rosenberg, C. Brander, B. Korber, and B. D. Walker.** 2003. Enhanced detection of human immunodeficiency virus type 1-specific T-cell responses to highly variable regions by using peptides based on autologous virus sequences. *J Virol* **77**:7330-40.
- [7] **Arasteh, K., J. Gölz , U. Marcus, J. Rockstroh, B. Salzberger, B. Vielhaber.** Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion (online). Letzte Teilaktualisierung Juni 2005. Erhältlich im Internet unter <http://www.daignet.de/17.html>
- [8] **Bailey, J. R., K. G. Lassen, H. C. Yang, T. C. Quinn, S. C. Ray, J. N. Blankson, and R. F. Siliciano.** 2006. Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **80**:4758-70.

- [9] **Barouch, D. H., A. Craiu, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, X. X. Zheng, S. Santra, J. D. Frost, G. R. Krivulka, M. A. Lifton, C. L. CrAbbs, G. Heidecker, H. C. Perry, M. E. Davies, H. Xie, C. E. Nickerson, T. D. Steenbeke, C. I. Lord, D. C. Montefiori, T. B. Strom, J. W. Shiver, M. G. Lewis, and N. L. Letvin.** 2000. Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4192-7.
- [10] **Barouch, D. H., J. Kunstman, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, S. Santra, F. W. Peyerl, G. R. Krivulka, K. Beaudry, M. A. Lifton, D. A. Gorgone, D. C. Montefiori, M. G. Lewis, S. M. Wolinsky, and N. L. Letvin.** 2002. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **415**:335-9.
- [11] **Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and M. B. Oldstone.** 1994. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **68**:6103-10.
- [12] **Brander, C., K. E. Hartman, A. K. Trocha, N. G. Jones, R. P. Johnson, B. Korber, P. Wentworth, S. P. Buchbinder, S. Wolinsky, B. D. Walker, and S. A. Kalams.** 1998. Lack of strong immune selection pressure by the immunodominant, HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte response in chronic human immunodeficiency virus-1 infection. *J Clin Invest* **101**:2559-66.
- [13] **Buseyne, F., J. Le Chenadec, B. Corre, F. Porrot, M. Burgard, C. Rouzioux, S. Blanche, M. J. Mayaux, and Y. Riviere.** 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.
- [14] **Chen, B., E. M. Vogan, H. Gong, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and S. C. Harrison.** 2005. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* **433**:834-41.
- [15] **Chun, T. W., D. Finzi, J. Margolick, K. Chadwick, D. Schwartz, and R. F. Siliciano.** 1995. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* **1**:1284-90.
- [16] **Ciuffi, A., M. Llano, E. Poeschla, C. Hoffmann, J. Leipzig, P. Shinn, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2005. A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* **11**:1287-9.
- [17] **Claverie, J. M., P. Kourilsky, P. Langlade-Demoyen, A. Chalufour-Prochnicka, G. Dadaglio, F. Tekaiia, F. Plata, and L. Bougueleret.** 1988. T-immunogenic peptides are constituted of rare sequence patterns. Use in the identification of T epitopes in the human immunodeficiency virus gag protein. *Eur J Immunol* **18**:1547-53.

- [18] **Clerici, M., D. R. Lucey, R. A. Zajac, R. N. Boswell, H. M. Gebel, H. Takahashi, J. A. Berzofsky, and G. M. Shearer.** 1991. Detection of cytotoxic T lymphocytes specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individuals. *J Immunol* **146**:2214-9.
- [19] **Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso.** 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**:1811-5.
- [20] **Coffin, J. M.** 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483-9.
- [21] **Cong, M. E., W. Heneine, and J. G. Garcia-Lerma.** 2007. The fitness cost of mutations associated with human immunodeficiency virus type 1 drug resistance is modulated by mutational interactions. *J Virol* **81**:3037-41.
- [22] **Connor, R. I., K. E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe, and N. R. Landau.** 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* **185**:621-8.
- [23] **Dadaglio, G., A. Leroux, P. Langlade-Demoyen, E. M. Bahraoui, F. Traincard, R. Fisher, and F. Plata.** 1991. Epitope recognition of conserved HIV envelope sequences by human cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* **147**:2302-9.
- [24] **Dalglish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-7.
- [25] **Desrosiers, R. C.** 2004. Prospects for an AIDS vaccine. *Nat Med* **10**:221-3.
- [26] **Doytchinova, I. A., and D. R. Flower.** 2006. Class I T-cell epitope prediction: improvements using a combination of proteasome cleavage, TAP affinity, and MHC binding. *Mol Immunol* **43**:2037-44.
- [27] **Draenert, R., C. L. Verrill, Y. Tang, T. M. Allen, A. G. Wurcel, M. Boczanowski, A. Lechner, A. Y. Kim, T. Suscovich, N. V. Brown, M. M. Addo, and B. D. Walker.** 2004. Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **78**:630-41.
- [28] **Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton.** 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**:667-73.
- [29] **Eckert, D. M., and P. S. Kim.** 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* **70**:777-810.

- [30] **Edwards, B. H., A. Bansal, S. Sabbaj, J. Bakari, M. J. Mulligan, and P. A. Goepfert.** 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.
- [31] **Elkington, R., S. Walker, T. Crough, M. Menzies, J. Tellam, M. Bharadwaj, and R. Khanna.** 2003. Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* **77**:5226-40.
- [32] **Emery, S., C. Workman, R. L. Puls, M. Bloch, D. Baker, N. Bodsworth, J. Anderson, S. M. Crowe, M. A. French, J. Hoy, A. Aichelburg, L. D. Ward, D. B. Boyle, M. G. Law, A. D. Kelleher, and D. A. Cooper.** 2005. Randomized, placebo-controlled, phase I/IIa evaluation of the safety and immunogenicity of fowlpox virus expressing HIV gag-pol and interferon-gamma in HIV-1 infected subjects. *Hum Vaccin* **1**:232-8.
- [33] **Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee.** 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**:290-6.
- [34] **Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-7.
- [35] **Ferguson, M. R., D. R. Rojo, J. J. von Lindern, and W. A. O'Brien.** 2002. HIV-1 replication cycle. *Clin Lab Med* **22**:611-35.
- [36] **Fernandez, C. S., I. Stratov, R. De Rose, K. Walsh, C. J. Dale, M. Z. Smith, M. B. Agy, S. L. Hu, K. Krebs, D. I. Watkins, H. O'Connor D, M. P. Davenport, and S. J. Kent.** 2005. Rapid viral escape at an immunodominant simian-human immunodeficiency virus cytotoxic T-lymphocyte epitope exacts a dramatic fitness cost. *J Virol* **79**:5721-31.
- [37] **Frahm, N., B. T. Korber, C. M. Adams, J. J. Szinger, R. Draenert, M. M. Addo, M. E. Feeney, KYusim, K. Sango, N. V. Brown, D. SenGupta, A. Piechocka-Trocha, T. Simonis, F. M. Marincola, A. G. Wurcel, D. R. Stone, C. J. Russell, P. Adolf, D. Cohen, T. Roach, A. StJohn, A. Khatri, K. Davis, J. Mullins, P. J. Goulder, B. D. Walker, and C. Brander.** 2004. Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J Virol* **78**:2187-200.
- [38] **Frahm, N., P. Goulder, and C. Brander.** 2003. Broad HIV-1 Specific CTL Responses Reveal Extensive HLA Class I Binding Promiscuity of HIV-Derived, Optimally Defined CTL Epitopes. In: *HIV Immunology and HIV/SIV Vaccine Databases 2003*. Bette T. M. Korber, Christian Brander, Barton F. Haynes, Richard Koup, John P. Moore, Bruce D. Walker, and David I. Watkins, editors. Publisher: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico. LA-UR 04-8162. pp. 3-24.

- [39] **Frost, S. D., M. Nijhuis, R. Schuurman, C. A. Boucher, and A. J. Brown.** 2000. Evolution of lamivudine resistance in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: the relative roles of drift and selection. *J Virol* **74**:6262-8.
- [40] **Gao, H. Q., P. L. Boyer, S. G. Sarafianos, E. Arnold, and S. H. Hughes.** 2000. The role of steric hindrance in 3TC resistance of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. *J Mol Biol* **300**:403-18.
- [41] **Gomez-Nunez, M., J. Pinilla-Ibarz, T. Dao, R. J. May, M. Pao, J. S. Jaggi, and D. A. Scheinberg.** 2006. Peptide binding motif predictive algorithms correspond with experimental binding of leukemia vaccine candidate peptides to HLA-A*0201 molecules. *Leuk Res* **30**:1293-8.
- [42] **Goulder, P. J., and D. I. Watkins.** 2004. HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* **4**:630-40.
- [43] **Goulder, P. J., R. E. Phillips, R. A. Colbert, S. McAdam, G. Ogg, M. A. Nowak, P. Giangrande, G. Luzzi, B. Morgan, A. Edwards, A. J. McMichael, and S. Rowland-Jones.** 1997. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* **3**:212-7.
- [44] **Gulukota, K., J. Sidney, A. Sette, and C. DeLisi.** 1997. Two complementary methods for predicting peptides binding major histocompatibility complex molecules. *J Mol Biol* **267**:1258-67.
- [45] **Hadida, F., V. Vieillard, L. Mollet, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and P. Debre.** 1999. Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells. *J Immunol* **163**:1105-9.
- [46] **Harrer, E., T. Harrer, P. Barbosa, M. Feinberg, R. P. Johnson, S. Buchbinder, and B. D. Walker.** 1996. Recognition of the highly conserved YMDD region in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes from an asymptomatic long-term nonprogressor. *J Infect Dis* **173**:476-9.
- [47] **Harrigan, P. R., S. Bloor, and B. A. Larder.** 1998. Relative replicative fitness of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 isolates in vitro. *J Virol* **72**:3773-8.
- [48] **Harrigan, P. R., C. Stone, P. Griffin, I. Najera, S. Bloor, S. Kemp, M. Tisdale, and B. Larder.** 2000. Resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor abacavir (1592U89) after monotherapy and combination therapy. CNA2001 Investigative Group. *J Infect Dis* **181**:912-20.
- [49] **Haynes, B. F., J. Fleming, E. W. St Clair, H. Katinger, G. Stiegler, R. Kunert, J. Robinson, R. M. Scearce, K. Plonk, H. F. Staats, T. L. Ortel, H. X. Liao, and S. M. Alam.** 2005. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* **308**:1906-8.

- [50] **Hecht, F. M., M. P. Busch, B. Rawal, M. Webb, E. Rosenberg, M. Swanson, M. Chesney, J. Anderson, J. Levy, and J. O. Kahn.** 2002. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *Aids* **16**:1119-29.
- [51] **Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-6.
- [52] **Keulen, W., N. K. Back, A. van Wijk, C. A. Boucher, and B. Berkhout.** 1997. Initial appearance of the 184Ile variant in lamivudine-treated patients is caused by the mutational bias of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* **71**:3346-50.
- [53] **Kiepiela, P., A. J. Leslie, I. Honeyborne, D. Ramduth, C. Thobakgale, S. Chetty, P. Rathnavalu, C. Moore, K. J. Pfafferott, L. Hilton, P. Zimbwa, S. Moore, T. Allen, C. Brander, M. M. Addo, M. Altfeld, I. James, S. Mallal, M. Bunce, L. D. Barber, J. Szinger, C. Day, P. Klenerman, J. Mullins, B. Korber, H. M. Coovadia, B. D. Walker, and P. J. Goulder.** 2004. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* **432**:769-75.
- [54] **Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho.** 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**:4650-5.
- [55] **Koval, C. E., C. Dykes, J. Wang, and L. M. Demeter.** 2006. Relative replication fitness of efavirenz-resistant mutants of HIV-1: correlation with frequency during clinical therapy and evidence of compensation for the reduced fitness of K103N + L100I by the nucleoside resistance mutation L74V. *Virology* **353**:184-92.
- [56] **Lamhamedi-Cherradi, S., B. Culmann-Penciolelli, B. Guy, M. P. Kieny, F. Dreyfus, A. G. Saimot, D. Sereni, D. Sicard, J. P. Levy, and E. Gomard.** 1992. Qualitative and quantitative analysis of human cytotoxic T-lymphocyte responses to HIV-1 proteins. *Aids* **6**:1249-58.
- [57] **Larder, B. A., S. D. Kemp, and P. R. Harrigan.** 1995. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* **269**:696-9.
- [58] **Larsen, M. V., C. Lundegaard, K. Lamberth, S. Buus, S. Brunak, O. Lund, and M. Nielsen.** 2005. An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur J Immunol* **35**:2295-303.
- [59] **Larsson, M., X. Jin, B. Ramratnam, G. S. Ogg, J. Engelmayer, M. A. Demoitie, A. J. McMichael, W. I. Cox, R. M. Steinman, D. Nixon, and N. Bhardwaj.** 1999. A recombinant vaccinia virus based ELISPOT assay detects high frequencies of Pol-specific CD8 T cells in HIV-1-positive individuals. *Aids* **13**:767-77.

- [60] **Leslie, A., D. Kavanagh, I. Honeyborne, K. Pfafferott, C. Edwards, T. Pillay, L. Hilton, C. Thobakgale, D. Ramduth, R. Draenert, S. Le Gall, G. Luzzi, A. Edwards, C. Brander, A. K. Sewell, S. Moore, J. Mullins, C. Moore, S. Mallal, N. Bhardwaj, K. Yusim, R. Phillips, P. Klenerman, B. Korber, P. Kiepiela, B. Walker, and P. Goulder.** 2005. Transmission and accumulation of CTL escape variants drive negative associations between HIV polymorphisms and HLA. *J Exp Med* **201**:891-902.
- [61] **Levy, J. A., C. E. Mackewicz, and E. Barker.** 1996. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* **17**:217-24.
- [62] **Levy, Y., H. Gahery-Segard, C. Durier, A. S. Lascaux, C. Goujard, V. Meiffredy, C. Rouzioux, R. El Habib, M. Beumont-Mauviel, J. G. Guillet, J. F. Delfraissy, and J. P. Aboulker.** 2005. Immunological and virological efficacy of a therapeutic immunization combined with interleukin-2 in chronically HIV-1 infected patients. *Aids* **19**:279-86.
- [63] **Lowin, B., M. Hahne, C. Mattmann, and J. Tschopp.** 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* **370**:650-2.
- [64] **Lu, W., L. C. Arraes, W. T. Ferreira, and J. M. Andrieu.** 2004. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* **10**:1359-65.
- [65] **Lu, J., P. Sista, F. Giguel, M. Greenberg, and D. R. Kuritzkes.** 2004. Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T-20). *J Virol* **78**:4628-37.
- [66] **Lyles, R. H., A. Munoz, T. E. Yamashita, H. Bazmi, R. Detels, C. R. Rinaldo, J. B. Margolick, J. P. Phair, and J. W. Mellors.** 2000. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis* **181**:872-80.
- [67] **Makedonas, G., J. Bruneau, H. Lin, R. P. Sekaly, F. Lamothe, and N. F. Bernard.** 2002. HIV-specific CD8 T-cell activity in uninfected injection drug users is associated with maintenance of seronegativity. *Aids* **16**:1595-602.
- [68] **Margolis, L. B., S. Glushakova, J. C. Grivel, and P. M. Murphy.** 1998. Blockade of CC chemokine receptor 5 (CCR5)-tropic human immunodeficiency virus-1 replication in human lymphoid tissue by CC chemokines. *J Clin Invest* **101**:1876-80.
- [69] **Martinez-Picado, J., A. V. Savara, L. Sutton, and R. T. D'Aquila.** 1999. Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **73**:3744-52.

- [70] **Martinez-Picado, J., J. G. Prado, E. E. Fry, K. Pfafferott, A. Leslie, S. Chetty, C. Thobakgale, I. Honeyborne, H. Crawford, P. Matthews, T. Pillay, C. Rousseau, J. I. Mullins, C. Brander, B. D. Walker, D. I. Stuart, P. Kiepiela, and P. Goulder.** 2006. Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **80**:3617-23.
- [71] **Mason, R. D., M. I. Bowmer, C. M. Howley, M. Gallant, J. C. Myers, and M. D. Grant.** 2004. Antiretroviral drug resistance mutations sustain or enhance CTL recognition of common HIV-1 Pol epitopes. *J Immunol* **172**:7212-9.
- [72] **Masquelier, B., K. Bhaskaran, D. Pillay, R. Gifford, E. Balestre, L. B. Jorgensen, C. Pedersen, L. van der Hoek, M. Prins, C. Balotta, B. Longo, C. Kucherer, G. Poggensee, M. Ortiz, C. de Mendoza, J. Gill, H. Fleury, and K. Porter.** 2005. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and the role of resistance algorithms: data from seroconverters in the CASCADE collaboration from 1987 to 2003. *J Acquir Immune Defic Syndr* **40**:505-11.
- [73] **McMichael, A. J.** 2006. HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* **24**:227-55.
- [74] **McMichael, A. J., and S. L. Rowland-Jones.** 2001. Cellular immune responses to HIV. *Nature* **410**:980-7.
- [75] **Meylan, P. R., J. C. Guatelli, J. R. Munis, D. D. Richman, and R. S. Kornbluth.** 1993. Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology* **193**:138-48.
- [76] **Miller, V., M. Ait-Khaled, C. Stone, P. Griffin, D. Mesogiti, A. Cutrell, R. Harrigan, S. Staszewski, C. Katlama, G. Pearce, and M. Tisdale.** 2000. HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy. *Aids* **14**:163-71.
- [77] **Miller, M.D., K.L. White, C.J. Petropoulos, N.T. Parkin.** 2003. Decreased replication capacity of HIV-1 clinical isolates containing K65R or M184V RT mutations. Abstract 616, 10th CROI 2003, Boston, USA.
- [78] **Moore, C. B., M. John, I. R. James, F. T. Christiansen, C. S. Witt, and S. A. Mallal.** 2002. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* **296**:1439-43.
- [79] **Moore, J. P., P. W. Parren, and D. R. Burton.** 2001. Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J Virol* **75**:5721-9.
- [80] **Nairn R, Helbert M** (2002) *Immunology for medical students*, Mosby, Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St. Louis Sydney Toronto. S. 60.

- [81] **Ogg, G. S., X. Jin, S. Bonhoeffer, P. R. Dunbar, M. A. Nowak, S. Monard, J. P. Segal, Y. Cao, S. L. Rowland-Jones, V. Cerundolo, A. Hurley, M. Markowitz, D. D. Ho, D. F. Nixon, and A. J. McMichael.** 1998. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* **279**:2103-6.
- [82] **Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan.** 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* **152**:163-75.
- [83] **Parren, P. W., P. A. Marx, A. J. Hessel, A. Luckay, J. Harouse, C. Cheng-Mayer, J. P. Moore, and D. R. Burton.** 2001. Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *J Virol* **75**:8340-7.
- [84] **Petropoulos, C. J., N. T. Parkin, K. L. Limoli, Y. S. Lie, T. Wrin, W. Huang, H. Tian, D. Smith, G. A. Winslow, D. J. Capon, and J. M. Whitcomb.** 2000. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:920-8.
- [85] **Pitisuttithum, P., P. W. Berman, B. Phonrat, P. Suntharasamai, S. Raktham, L. O. Srisuwanvilai, K. Hirunras, D. Kitayaporn, J. Kaewkangwal, S. Migasena, H. W. Sheppard, E. Li, M. Chernow, M. L. Peterson, R. Shibata, W. L. Heyward, and D. P. Francis.** 2004. Phase I/II study of a candidate vaccine designed against the B and E subtypes of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* **37**:1160-5.
- [86] **Propato, A., E. Schiaffella, E. Vicenzi, V. Francavilla, L. Baloni, M. Paroli, L. Finocchi, N. Tanigaki, S. Ghezzi, R. Ferrara, R. Chesnut, B. Livingston, A. Sette, R. Paganelli, F. Aiuti, G. Poli, and V. Barnaba.** 2001. Spreading of HIV-specific CD8+ T-cell repertoire in long-term nonprogressors and its role in the control of viral load and disease activity. *Hum Immunol* **62**:561-76.
- [87] **Puls, R. L., and S. Emery.** 2006. Therapeutic vaccination against HIV: current progress and future possibilities. *Clin Sci (Lond)* **110**:59-71.
- [88] **Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanovic.** 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**:213-9.
- [89] **Rezende, L. F., W. C. Drosopoulos, and V. R. Prasad.** 1998. The influence of 3TC resistance mutation M184I on the fidelity and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* **26**:3066-72.
- [90] **Richman, D. D., S. C. Morton, T. Wrin, N. Hellmann, S. Berry, M. F. Shapiro, and S. A. Bozzette.** 2004. The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. *Aids* **18**:1393-401.

- [91] **Richman, D. D., T. Wrin, S. J. Little, and C. J. Petropoulos.** 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4144-9.
- [92] **Robert-Koch-Institut.** 2006. HIV-Serokonverterstudie, Aktuelle Daten zur Übertragung resistenter HIV, Stand 08/2006 (online). <http://www.rki.de>
- [93] **Robert-Koch-Institut.** 2007. Zum Verlauf der HIV-Epidemie in Deutschland bis Ende 2007. *Epidemiologisches Bulletin*, Nr. 47/2007 (23.11.2007). Robert-Koch-Institut: Berlin.
- [94] **Rowland-Jones, S., J. Sutton, K. Ariyoshi, T. Dong, F. Gotch, S. McAdam, D. Whitby, S. Sabally, A. Gallimore, T. Corrah, and et al.** 1995. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med* **1**:59-64.
- [95] **Samri, A., G. Haas, J. Duntze, J. M. Bouley, V. Calvez, C. Katlama, and B. Autran.** 2000. Immunogenicity of mutations induced by nucleoside reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T cells. *J Virol* **74**:9306-12.
- [96] **Schmitt, M., E. Harrer, A. Goldwisch, M. Bauerle, I. Graedner, J. R. Kalden, and T. Harrer.** 2000. Specific recognition of lamivudine-resistant HIV-1 by cytotoxic T lymphocytes. *Aids* **14**:653-8.
- [97] **Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, M. A. Simon, M. A. Lifton, W. Lin, R. Khunkhun, M. Piatak, J. D. Lifson, G. Grosschupff, R. S. Gelman, P. Racz, K. Tenner-Racz, K. A. Mansfield, N. L. Letvin, D. C. Montefiori, and K. A. Reimann.** 2003. Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J Virol* **77**:2165-73.
- [98] **Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Ghayeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann.** 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**:857-60.
- [99] **Schuurman, R., M. Nijhuis, R. van Leeuwen, P. Schipper, D. de Jong, P. Collis, S. A. Danner, J. Mulder, C. Loveday, C. Christopherson, and et al.** 1995. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J Infect Dis* **171**:1411-9.
- [100] **Scott, P., E. Arnold, B. Evans, A. Pozniak, G. Moyle, M. Shahmenesh, D. White, J. Shirley, P. Cane, and D. Pillay.** 2004. Surveillance of HIV antiretroviral drug resistance in treated individuals in England: 1998-2000. *J Antimicrob Chemother* **53**:469-73.

- [101] **Sette, A., A. Vitiello, B. Reheman, P. Fowler, R. Nayersina, W. M. Kast, C. J. Melief, C. Oseroff, L. Yuan, J. Ruppert, J. Sidney, M. F. del Guercio, S. Southwood, R. T. Kubo, R. W. Chesnut, H. M. Grey, and F. V. Chisari.** 1994. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* **153**:5586-92.
- [102] **Sharma, P. L., and C. S. Crumpacker.** 1999. Decreased processivity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) containing didanosine-selected mutation Leu74Val: a comparative analysis of RT variants Leu74Val and lamivudine-selected Met184Val. *J Virol* **73**:8448-56.
- [103] **Smith, S. M.** 2004. HIV CTL escape: at what cost? *Retrovirology* **1**:8.
- [104] **Stiegler, G., C. Armbruster, B. Vcelar, H. Stoiber, R. Kunert, N. L. Michael, L. L. Jagodzinski, C. Ammann, W. Jager, J. Jacobson, N. Vetter, and H. Katinger.** 2002. Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation. *Aids* **16**:2019-25.
- [105] **Stratov, I., C. J. Dale, S. Chea, J. McCluskey, and S. J. Kent.** 2005. Induction of T-cell immunity to antiretroviral drug-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **79**:7728-37.
- [106] **Terasaki, P. I., and J. D. McClelland.** 1964. Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature* **204**:998-1000.
- [107] **Trkola, A., H. Kuster, P. Rusert, B. Joos, M. Fischer, C. Leemann, A. Manrique, M. Huber, M. Rehr, A. Oxenius, R. Weber, G. Stiegler, B. Vcelar, H. Katinger, L. Aceto, and H. F. Gunthard.** 2005. Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med* **11**:615-22.
- [108] **Turner, B. G., and M. F. Summers.** 1999. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**:1-32.
- [109] **UNAIDS and WHO.** 2007. AIDS epidemic update 2007. Joint United Nations Programm on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO): Geneva. S. 1-7.
- [110] **UNAIDS.** 2006. Report on the global AIDS epidemic. Joint United Nations Programm on HIV/AIDS (UNAIDS): Geneva. S. 6.
- [111] **Vella, S., and L. Palmisano.** 2005. The global status of resistance to antiretroviral drugs. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 4**:S239-46.

- [112] **Vuola, J. M., S. Keating, D. P. Webster, T. Berthoud, S. Dunachie, S. C. Gilbert, and A. V. Hill.** 2005. Differential immunogenicity of various heterologous prime-boost vaccine regimens using DNA and viral vectors in healthy volunteers. *J Immunol* **174**:449-55.
- [113] **Wainberg, M. A., H. Salomon, Z. Gu, J. S. Montaner, T. P. Cooley, R. McCaffrey, J. Ruedy, H. M. Hirst, N. Cammack, J. Cameron, and et al.** 1995. Development of HIV-1 resistance to (-)2'-deoxy-3'-thiacytidine in patients with AIDS or advanced AIDS-related complex. *Aids* **9**:351-7.
- [114] **Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Kilby, M. S. Saag, N. L. Komarova, M. A. Nowak, B. H. Hahn, P. D. Kwong, and G. M. Shaw.** 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-12.
- [115] **Weinstock, H. S., I. Zaidi, W. Heneine, D. Bennett, J. G. Garcia-Lerma, J. M. Douglas, Jr., M. LaLota, G. Dickinson, S. Schwarcz, L. Torian, D. Wendell, S. Paul, G. A. Goza, J. Ruiz, B. Boyett, and J. E. Kaplan.** 2004. The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1-infected persons in 10 US cities. *J Infect Dis* **189**:2174-80.
- [116] **Wensing, A. M., D. A. van de Vijver, G. Angarano, B. Asjo, C. Balotta, E. Boeri, R. Camacho, M. L. Chaix, D. Costagliola, A. De Luca, I. Derdelinckx, Z. Grossman, O. Hamouda, A. Hatzakis, R. Hemmer, A. Hoepelman, A. Horban, K. Korn, C. Kucherer, T. Leitner, C. Loveday, E. MacRae, I. Maljkovic, C. de Mendoza, L. Meyer, C. Nielsen, E. L. Op de Coul, V. Ormaasen, D. Paraskevis, L. Perrin, E. Puchhammer-Stockl, L. Ruiz, M. Salminen, J. C. Schmit, F. Schneider, R. Schuurman, V. Soriano, G. Stanczak, M. Stanojevic, A. M. Vandamme, K. Van Laethem, M. Violin, K. Wilbe, S. Yerly, M. Zazzi, and C. A. Boucher.** 2005. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis* **192**:958-66.
- [117] **Winters, M. A., R. W. Shafer, R. A. Jellinger, G. Mamtora, T. Gingeras, and T. C. Merigan.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase genotype and drug susceptibility changes in infected individuals receiving dideoxyinosine monotherapy for 1 to 2 years. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:757-62.
- [118] **Wyatt, R., P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson, and J. G. Sodroski.** 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**:705-11.
- [119] **Yewdell, J. W., and J. R. Bennink.** 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* **17**:51-88.

Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Stellbrink für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, internationale Kongressluft zu „schnuppern“.

Ebenso ein großes Dankeschön an Dr. Ingrid Stahmer für die gute Betreuung und die vielen kleinen „Anstupser“, ohne die die Beendigung dieser Doktorarbeit vielleicht noch länger gedauert hätte.

Janine Mohn und Kristina Lenz vielen Dank für die nette Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor.

Dr. Christiane Möcklinghoff von der Firma Roche danke ich für die großzügige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Bei Tobias Müller möchte ich mich ganz herzlich für's Korrekturlesen, für die Hilfe bei den Abbildungen und vor allem für's Zuhören und Motivieren bedanken.

Und nicht zuletzt danke ich meinen lieben Eltern Ewald und Alice Kaiser für ihre große Unterstützung bei allem.

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.

Unterschrift:

(Simone Kaiser)