

**Lymphozyten-Subpopulationen und T-Zell-Funktion in
der Therapie der chronischen Infektion mit dem Humanen
Immundefizienzvirus 1 (HIV-1)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Nicole Frahm
aus Borken/Westfalen

Hamburg 2003

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	HIV-Infektion und AIDS	6
1.2	Das humane Immundefizienzvirus HIV-1	7
1.2.1	Struktur	7
1.2.2	Der Replikationszyklus	9
1.3	Immunpathogenese der HIV-Infektion	11
1.3.1	Klinischer Verlauf	12
1.3.2	Immunantwort gegen HIV	14
1.4	Die Behandlung der HIV-Infektion	19
1.4.1	Hoch-aktive antiretrovirale Therapie (HAART)	19
1.4.2	Strukturierte Therapieunterbrechungen (structured treatment interruptions, STI)	23
1.5	Ziele dieser Arbeit	24
1.5.1	Klinische Phase III-Studie ARCHY	24
1.5.2	Vergleich Blut/Lymphknoten	25
1.5.3	Kontrollierte Therapieunterbrechung	25
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Blutabnahmen	27
2.2	Lymphknoten-Proben-Entnahmen (PEs)	27
2.3	Isolierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells)	27
2.4	Isolierung von LMNC (lymph node mononuclear cells)	28
2.5	Färbung von Lymphozytensubpopulationen zur Messung an einem Durchflußzytometer	30
2.6	Sortieren von T-Zell-Subpopulationen mit Dynabeads	32
2.7	Real-time PCR mit dem TaqMan Assay	34
2.8	Stimulation von Lymphozyten mit Mitogenen	35
2.9	Stimulation von Lymphozyten mit Super- und Recall-Antigenen	36
2.10	Färbung von intrazellulären Zytokinen bei stimulierten Lymphozyten	37
2.11	Färbung von HIV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen mit HLA-Tetrameren	39

2.12	Screening HIV-spezifischer CTL mittels ELISpot	40
2.12.1	Beschichten der Platten	40
2.12.2	Auftauen der Zellen	41
2.12.3	Vorbereiten der Platte	42
2.12.4	Farbreaktion	42
2.13	Stimulation von CTL zur Produktion von IFN- γ	43
2.14	Färbung von intrazellulärem IFN- γ nach Stimulation (intracellular cytokine staining, ICS)	44
2.15	Bestimmung der proviralen DNA in PBMC (AMPLICOR HIV-1 DNA Monitor)	45
2.15.1	Lyse der PBMC	45
2.15.2	Amplifikation	46
2.15.3	Bestimmung der Gesamt-DNA-Konzentration	47
2.15.4	Detektion	48
2.16	Statistische Auswertung	49

3 ERGEBNISSE

50

3.1	ARCHY	50
3.1.1	Viruslast im Verlauf der Therapie	50
3.1.2	Provirale DNA	51
3.1.3	T-Zellzahlen	54
3.1.4	Näive und Memory-T-Zellen	56
3.1.5	Proliferation von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	58
3.1.6	Späte Aktivierungsmarker	61
3.1.7	Frühe Aktivierungsmarker	64
3.1.8	Costimulation	65
3.1.9	Chemokin-Rezeptor-Expression	66
3.1.10	B-Zellen	68
3.1.11	Stimulation mit Mitogenen	69
3.1.12	Stimulation mit Super- und Recall-Antigenen	70
3.2	Kontrollierte Therapieunterbrechung	73
3.2.1	Plasmavirämie und T-Zellzahlen	73
3.2.2	Proliferation von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	75
3.2.3	Späte Aktivierungsmarker	76
3.2.4	Frühe Aktivierungsmarker	78

Inhaltsverzeichnis	5
3.2.5 Costimulationsmarker	79
3.2.6 B-Zellen	79
3.2.7 CD103	80
3.2.8 Stimulation mit Mitogenen	82
3.2.9 Stimulation mit Super- und Recall-Antigenen	84
3.2.10 Färbung mit HLA-Tetrameren	86
3.2.11 ELISpots	87
3.2.12 Intrazelluläre Zytokin-Färbung	89
4 DISKUSSION	92
5 ZUSAMMENFASSUNG	102
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	104
7 LITERATURVERZEICHNIS	106

1 Einleitung

1.1 HIV-Infektion und AIDS

Die durch das humane Immundefizienzvirus (HIV) verursachte AIDS-Pandemie hat Ausmaße angenommen, die man sich noch vor einem Jahrzehnt kaum vorstellen konnte. Die Zahl der Menschen, die Ende 2002 mit HIV/AIDS lebten, hat laut UNAIDS/WHO Statusbericht von Dezember mit 42 Millionen die Prognosen von 1991 um über 50% übertroffen (Abb. 1.1) ¹⁷⁷.



Abb. 1.1: Anzahl der Ende 2002 mit HIV/AIDS lebenden Menschen ¹⁷⁷

Seit Beginn der Epidemie Ende der 70er/Anfang der 80er Jahre in Afrika sind über 25 Millionen Kinder und Erwachsene an den Folgen der Immundefizienz gestorben. Allein im Jahr 2002 gab es 5 Millionen Neuinfizierte, das sind fast 14.000 pro Tag. Im gleichen Zeitraum sind 3.1 Millionen Menschen gestorben. In Afrika ist die HIV-Prävalenz unter Erwachsenen höher, als man es jemals für möglich gehalten hat – sie liegt in Botswana bei 38.8%.

Obwohl es erstmals Hinweise auf eine Stabilisierung der Zahl der Neuinfektionen in Afrika südlich der Sahara gibt, steigen diese anderswo dramatisch. In der Russischen Föderation hat

sich die Zahl der registrierten Infektionen in den letzten vier Jahren verzwanzigfacht. In Asien sind die Prävalenzraten zwar verhältnismäßig niedrig, dies betrifft jedoch in den bevölkerungsreichsten Ländern der Erde wie China und Indien trotzdem mehrere Millionen Menschen. Dazu kommt, daß z.B. in einigen indischen Regionen der Anteil HIV-positiver werdender Mütter höher liegt als die nationale Prävalenzrate.

Zusätzlich zu dem Elend von Krankheit und Tod hat die Epidemie auch noch verheerende Folgen auf die Wirtschaft der am stärksten betroffenen Länder. In zehn Jahren wird laut UNAIDS das Bruttoinlandsprodukt in Südafrika um 17% unter dem ohne AIDS zu erwartenden Wert liegen, in Botswana werden sogar 20% Minderung prognostiziert. Dies hat zur Folge, daß die ärmsten Haushalte mit noch 13% weniger Einkommen leben müssen.

Da jahrelange, intensivste Forschung nicht zur Entwicklung einer Schutzimpfung geführt hat (internationale Experten gehen davon aus, daß es auch in den nächsten fünf Jahren nicht dazu kommen wird), ist die einzige Möglichkeit zur Eindämmung der Epidemie neben lebenslanger Therapie die Aufklärung der Betroffenen und der potentiellen Neu-Infizierten. Diese Strategie hat in einigen Ländern wie z.B. Uganda zu einer Verminderung der Infektionsrate geführt – unter anderem hat sich der Kondom-Verbrauch bei 15-24jährigen Frauen verdoppelt ¹⁷⁷.

Neuerdings wird auch die Möglichkeit der Einführung von antiretroviralen Therapien in Entwicklungsländern diskutiert. In vielen Staaten in Afrika und Asien wird werdenden Müttern die Möglichkeit geboten, mit einer Einzeldosis Nevirapine für je Mutter und Kind die Übertragungsrate bei der Geburt um die Hälfte zu verringern ⁶⁹. In Brasilien werden Betroffene mit sogenannten „generischen“ Medikamenten, die ohne die Lizenz der Patenhalter produziert werden, kostenlos behandelt ^{2,9}. In Haiti läuft ein Programm, in dem die Therapie unter Beobachtung verabreicht wird (DOT, directly observed treatment), um mangelnder Medikamentencompliance und eventuellem Mißbrauch der Drogen vorzubeugen

¹¹⁶.

1.2 Das humane Immundefizienzvirus HIV-1

1.2.1 Struktur

HIV-1 ist das prototypische Mitglied der humanpathogenen Lentiviren: Retroviren, die nur sehr langsam zur Erkrankung führen. Lentiviren unterscheiden sich auch durch ihre

genetische Komplexität von anderen Retroviren, die meistens aus nur drei Genen bestehen: *gag*, *pol* und *env* ¹⁸².

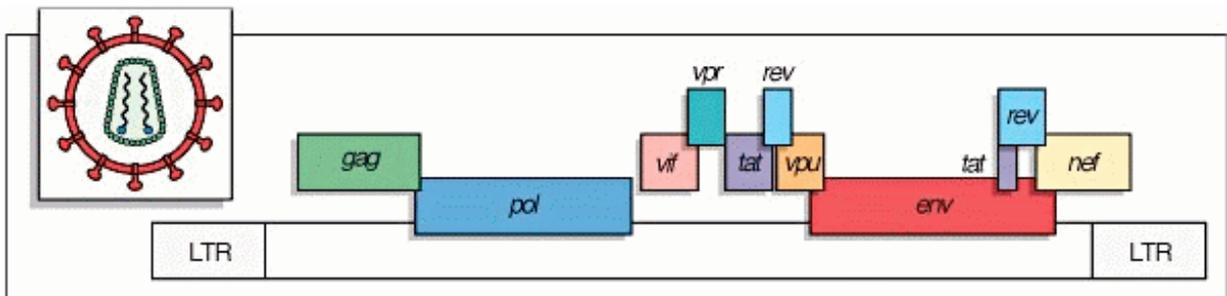


Abb. 1.2.1.1.: Genorganisation von HIV-1 ⁸¹

HIV dagegen besteht aus insgesamt 15 Proteinen und einer RNA: vier Strukturproteinen des viralen Kerns, zwei Hüllproteinen, drei Enzymen, den genregulatorischen Proteinen Tat und Rev und den akzessorischen Proteinen Nef, Vpr, Vpu und Vif (Abb. 1.2.1.1).

Das HIV-Genom besteht aus neun offenen Leserastern, die auf 9kb verteilt sind. Die allen Retroviren gemeinsamen Gene *gag*, *env* und *pol* codieren für Polyproteine, die nach der

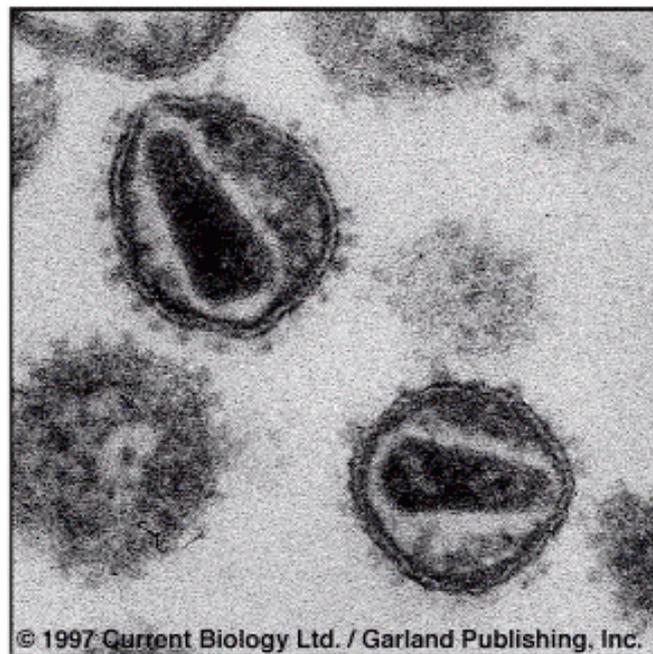


Abb. 1.2.1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HIV-Partikeln ⁸¹

Translation proteolytisch gespalten werden. Der Kern eines viralen Partikels besteht aus den insgesamt von *gag* codierten Matrixprotein p17, dem Capsidprotein p24, dem an die beiden verpackten genomischen RNA-Strängen bindenden Nucleocapsidprotein p7 und p6.

Die Virushülle entsteht bei der Knospung aus Teilen der Wirtszellmembran, in die außer Membranproteinen der Zelle Trimere der beiden von *env* codierten Hüllproteine gp120 und gp41 eingelagert werden¹⁷⁶. Die durch *pol* kodierten Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase sowie die akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Nef werden ebenfalls in das Viruspartikel verpackt.

1.2.2 Der Replikationszyklus

Der primäre Rezeptor für HIV ist das Oberflächenmolekül CD4. Das Hüllprotein gp120 bindet CD4 mit hoher Affinität und ermöglicht somit die Infektion hauptsächlich von T-Helfer-Zellen und Monozyten/Makrophagen. Zur Fusion mit der Zellmembran kommt es aber erst nach der zusätzlichen Bindung eines Corezeptors¹²², hauptsächlich der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4. Die dadurch induzierte Konformationsänderung des gp120/gp41-Komplexes ermöglicht die Verschmelzung der viralen mit der Zellmembran.

Abbildung 1.2.2 zeigt den Replikationszyklus von HIV von der Fusion bis zur Entstehung neuer viraler Partikel.

Nach der Fusion wird der Viruskern enthüllt (uncoating), wodurch der Nucleoprotein-Komplex freigesetzt wird. Die reverse Transkription erfolgt nach der Anlagerung eines tRNA^{Lys}-primers im Cytosol¹⁷⁶; die reverse Transkriptase (RT) katalysiert dabei sowohl die RNA-abhängige als auch die DNA-abhängige DNA-Polymerisation⁵⁵. Zusätzlich weist RT eine RNase H-Domäne auf, die für den Abbau des RNA-Teils der entstehenden RNA-DNA-Hybride zuständig ist. Da RT keine „proof-reading“-Aktivität hat, ist die Fehlerrate bei der Replikation sehr hoch, mit einer Mutation je 10^4 bis 10^5 Basen – dies würde bedeuten, daß kein Virus dem anderen gleicht. Vif scheint in dieser frühen Phase eine wichtige Rolle zu spielen, da in *vif*-Deletionsmutanten die DNA-Synthese nicht vollständig ablaufen kann¹⁸⁴. Der Präintegrationskomplex mit Integrase, p17, RT und Vpr wird nach vollendeter reverser Transkription in den Zellkern transportiert und die entstandene DNA-Duplex durch die Integrase in das Genom der Zelle eingebaut¹⁷⁶.

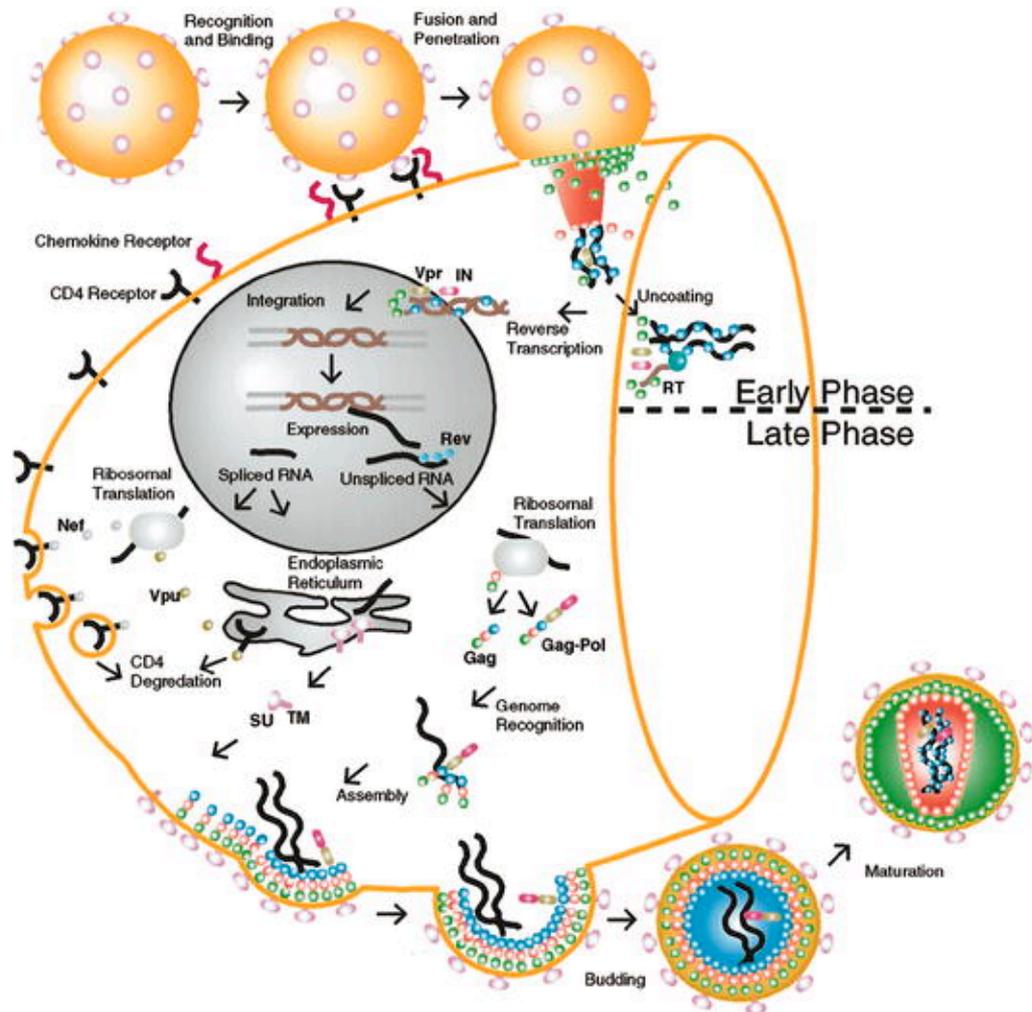


Abb. 1.2.2: Replikationszyklus von HIV ¹⁷⁶

Die Transkription der viralen Gene erfolgt in aktivierten Zellen durch die Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B an den im 5' long terminal repeat (LTR) lokalisierten Promotor. Anfangs ist die Elongationseffizienz sehr niedrig, erst mit der Bildung von Tat (transactivator of transcription) und seiner Bindung an TAR (transactivating response element) wird die Produktion von viralen mRNAs ca. 100fach erhöht ⁵⁵.

In der frühen Phase der Infektion werden die viralen mRNAs mehrfach gespleißt, und es entstehen hauptsächlich Tat, Rev und Nef. Später werden jedoch auch un- und einfach gespleißte Transkripte im Cytosol benötigt, die in die zur Verpackung notwendigen Polyproteine translatiert werden oder als genomische RNA dienen. Dazu muß der in der Zelle voreingestellte Mechanismus der Zurückhaltung von nicht gespleißten RNAs im Zellkern umgangen werden. Rev enthält ein nukleäres Exportsignal (NES), das den Transport durch die Kernmembran in beide Richtungen ermöglicht. Durch die Bindung von oligomerisiertem

Rev an das „rev responsive element“ (RRE) der RNA wird diese durch die nukleäre Exportmaschinerie in das Cytosol transportiert⁵⁵.

Im endoplasmatischen Retikulum wird *env* translatiert, und das entstehende gp160 trimerisiert dort, bevor es glykosyliert wird. Auf dem Weg zur Zellmembran wird es weiter posttranslational modifiziert und in trimerische gp120/gp41-Komplexe gespalten, die bei der Knospung in die Virushülle integriert werden. Die Bindung an CD4, das auch im ER synthetisiert wird, würde diesen Vorgang verhindern; hier greift Vpu ein, indem es an CD4 bindet und es in den Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg einschleust¹⁶⁰. Auch bereits auf der Oberfläche exprimiertes CD4 stört den Aufbau der Viruspartikel; es wird durch Interaktion mit Nef in den Endosomen abgebaut¹⁴¹. Ausserdem wurde gezeigt, daß Nef die Oberflächenexpression von MHC-Klasse I-Molekülen herunterreguliert¹⁶¹. Diese beiden Mechanismen könnten zur Beeinträchtigung der Immunantwort gegen HIV beitragen.

Das Polyprotein Gag sowie das durch eine Verschiebung des Leserasters bei der Translation entstehende Gag-Pol werden an den Ribosomen synthetisiert¹⁷⁶. Das N-terminal myristylierte p17 dirigiert die Bindung der beiden Polyproteine an die Zellmembran. Dort kommt es durch die Zusammenlagerung der viralen Proteine zur Knospung eines noch unreifen, nicht infektiösen Viruspartikels, in dem Gag, Gag-Pol, Vif, Vpr, Nef und zwei genomische RNAs von einer gp120 und gp41 enthaltenden Membran umhüllt werden. Während der Reifung werden in einem sequenziellen Prozess die Strukturproteine aus Gag und die Enzyme aus Pol von der Protease gespalten und rearrangiert, um infektiöse Partikel zu ergeben¹⁷⁶.

1.3 Immunpathogenese der HIV-Infektion

Das Hauptmerkmal der Infektion mit dem HI-Virus ist der fortschreitende CD4⁺ T-Zell-Verlust. Dieser ist wahrscheinlich durch eine Vielzahl von Ursachen bedingt. Einerseits wurde nachgewiesen, daß HIV einen direkten zytopathischen Effekt auf CD4⁺ T-Zellen hat und diese durch die Infektion zerstört werden. Die Infektionsfrequenz von CD4⁺ T-Zellen (1:1000 – 1:10000) reicht jedoch nicht aus, um deren Verlust vollständig zu erklären. Alternativ gibt es mehrere immunpathogenetische Mechanismen: die Zerstörung von infizierten CD4⁺ T-Zellen durch HIV-spezifische cytotoxische T-Zellen, Autoimmunreaktionen, die chronische Aktivierung der Zellen oder der Zelltod durch Apoptose (activation induced cell death, AICD)¹⁶⁴.

Die Masse der Virusreplikation findet im lymphatischen Gewebe statt, das als Haupt-Zielorgan gelten kann. In frühen wie in fortgeschrittenen Stadien der Infektion replizieren dabei überwiegend $CD4^+$ T-Lymphozyten des Keimzentrums das Virus. Als Zeichen der Aktivierung des B-Zellsystems sind die Keimzentren in der chronischen Phase der Infektion hyperplastisch und mit $CD8^+$ T-Zellen infiltriert. Lokal findet sich eine erhöhte Proliferationsrate von $CD4^+$ T-Zellen^{80, 169, 173, 179}. Die pathophysiologische Bedeutung der chronischen Immunaktivierung bei der Progression der Erkrankung und beim Fortschreiten der $CD4^+$ T-Zelldepletion ist noch unklar.

1.3.1 Klinischer Verlauf

Die HIV-Infektion wird klinisch in vier Phasen unterteilt: die akute oder Primärinfektion, die klinisch asymptomatische Phase, die symptomatische Phase, in der erste HIV-assoziierte Erkrankungen auftreten, und AIDS (Syndrom der erworbenen Immunsdefizienz), das sich durch den Ausbruch verschiedener opportunistischer Infektionen ergibt (Abb. 1.3.1). Dabei handelt es sich überwiegend um die Reaktivierung endogener Erreger (z.B. CMV, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, Toxoplasmen). Exogene Neuinfektionen hingegen sind selten.

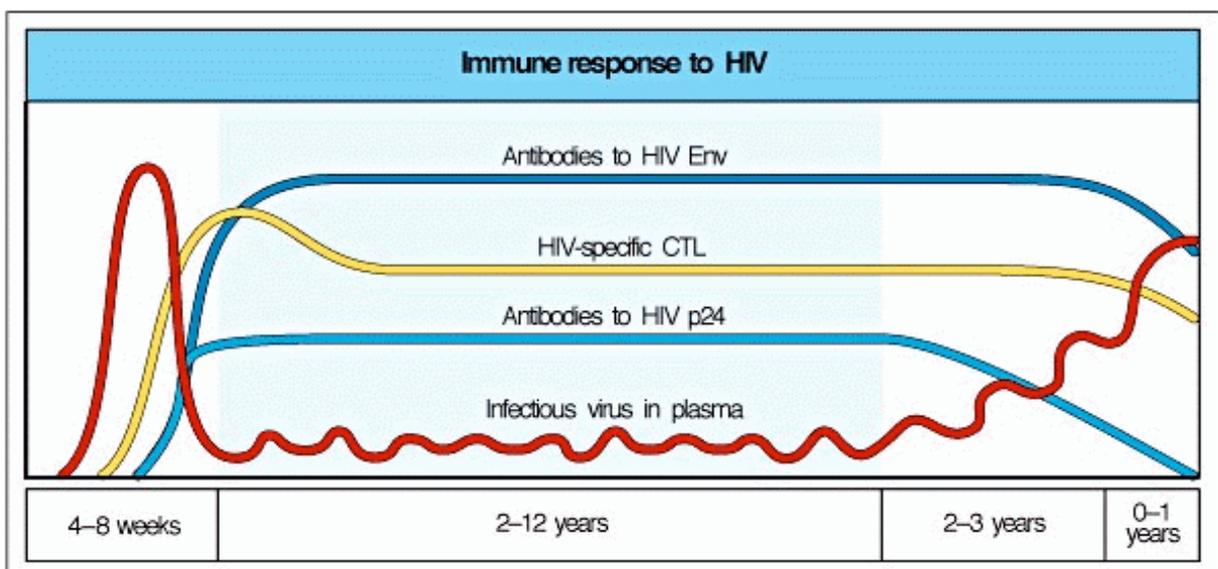


Abb. 1.3.1: Verlauf der Immunantwort in den verschiedenen Phasen der HIV-Infektion⁸¹

Die Primärinfektion wird in 50 bis 70% der Fälle von einem akuten viralen Syndrom begleitet, das jedoch wegen der mangelnden Spezifität der grippeähnlichen Symptome meistens unerkant bleibt¹³⁷. Schon in dieser frühen Phase kommt es zu einem ausgeprägten

Verlust an CD4⁺ T-Zellen, der jedoch beim Übergang in die asymptomatische Phase teilweise ausgeglichen wird⁸¹. Die Viruslast ist in dieser Phase extrem hoch (bis 10⁷ RNA-Kopien/ml), nimmt aber in der Folge deutlich ab¹³⁷. Diese Abnahme erfolgt zeitgleich mit dem Einsetzen der HIV-spezifischen CTL-Antwort, die, wie im Affenmodell gezeigt werden konnte, ein wesentlicher Faktor der Suppression der Virusreplikation in der chronischen Phase ist¹⁵⁹. Im Anschluß daran wird der humorale Arm der Immunantwort aktiviert. Die gebildeten Antikörper sind hauptsächlich gegen die CD4-Bindungsdomäne oder den V3-Loop von gp120 gerichtet¹²¹. Dieser Prozeß der Serokonversion ist am Ende der vier bis acht Wochen dauernden Primärinfektion zu beobachten.

Die asymptomatische Phase ist durch sinkende CD4⁺ T-Zellzahlen und eine andauernde Virusreplikation gekennzeichnet, die im Blut auf individuell sehr unterschiedlichem Niveau persistiert. Im Lymphknoten sind Virusreplikation und Zahl der infizierten Zellen wesentlich höher^{126, 137}, und Veränderungen der Lymphknotenarchitektur werden in dieser Phase deutlich (s.o.). Als ein möglicher Grund für die unterschiedliche Virusbeladung in beiden Kompartimenten wird das „trapping“ von HIV an follikulären dendritischen Zellen (FDC) in den Keimzentren genannt: in der frühen Phase, wenn die Lymphknotenarchitektur zwar beeinträchtigt, aber noch nicht zerstört ist, ist der Unterschied wesentlich höher als in der späten Phase, in der das FDC-Netzwerk praktisch nicht mehr vorhanden und somit kein „trapping“ mehr möglich ist. Als Konsequenz dieser Beobachtungen kann gefolgert werden, daß die „überschüssigen“ Viren dann ins Blut abgegeben werden und zu einer Angleichung der Virusbeladung in beiden Kompartimenten führen würden¹³⁷.

Während der asymptomatischen Phase kann bei den meisten Infizierten sowohl eine ausgeprägte CTL-Antwort gegen alle HIV-Proteine (s.u.) als auch die Produktion von Antikörpern nachgewiesen werden. Während gezeigt wurde, daß in sogenannten „long term non progressors“ (LTNP) und Patienten, die während der Primärinfektion behandelt wurden, robuste T-Helfer-Antworten meßbar sind^{148, 149}, sind HIV-spezifische CD4⁺ T-Zell-Antworten in der chronischen Infektion typischerweise schwach oder nicht nachweisbar^{127, 149}. Die fehlende T-Zell-Hilfe könnte einer der Gründe sein, warum es zu einer unzureichenden HIV-spezifischen CTL-Antwort und nachfolgend zur Etablierung der chronischen Infektion und zum Fortschreiten der Krankheit kommt⁸⁴.

Je nach Dauer der asymptomatischen Phase können Patienten in unterschiedliche Gruppen gegliedert werden. Bei unbehandelter Infektion vergehen im Mittel ca. 9 Jahre, bis durch den CD4⁺ T-Zell-Verlust opportunistische Infektionen ausbrechen. Bei schnellen Progressoren

fällt die Viruslast nach der Serokonversion nicht so stark ab, und die CD4⁺ T-Zellzahlen sinken sehr schnell, so daß die symptomatische Phase bereits nach zwei Jahren beginnen kann. Dies wird unter anderem mit einer immungenetischen Prädisposition durch bestimmte HLA-Allele bzw. Homozygotie bezüglich eines oder mehrerer HLA-Klasse-I-Allele in Verbindung gebracht, die für eine Immunantwort gegen HIV wenig geeignet sind^{79, 87, 129, 174}. LTNPs sind nachweislich seit über 10 Jahren infiziert, weisen jedoch eine sehr niedrige Viruslast und normale Lymphozytenwerte auf. Sie zeigen meist ausgeprägte zytotoxische und T-Helfer-Antworten, die über die Jahre stabil erhalten bleiben. Auch hier wird der Einfluß bestimmter HLA-Allele sowie weiterer genetischer Faktoren beschrieben^{115, 171, 174}.

Die symptomatische Phase mit dem Übergang zu AIDS ist von einer tiefen Immunsuppression geprägt. Die Virusreplikation steigt unkontrolliert an, die CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut gehen gänzlich verloren, und auch die bis dahin vorhandene Immunantwort ist nicht mehr nachweisbar. Die physiologische Struktur der Lymphknoten löst sich auf, und opportunistische Infektionen sowie bestimmte Krebsarten können nicht mehr kontrolliert werden. Das Vollbild der AIDS-Erkrankung führt unbehandelt innerhalb kurzer Zeit zum Tod.

1.3.2 Immunantwort gegen HIV

Zahlreiche Veränderungen des Immunsystems wurden bei der Infektion mit HIV beobachtet, unter anderem eine polyklonale B-Zell-Aktivierung mit Hypergammaglobulinämie und der Produktion von Autoantikörpern, die Reduktion der zytolytischen Aktivität von natürlichen Killer (NK)-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), eine verminderte T-Helfer-Funktion bei Stimulation mit Mitogenen und Antigenen, veränderte Aktivität von antigen-präsentierenden Zellen (APC) und eine gestörte Produktion immunmodulatorischer Zytokine¹⁶⁵.

1.3.2.1 Immunaktivierung

Schon früh konnte gezeigt werden, daß die HIV-Infektion von einer Aktivierung des gesamten Immunsystems begleitet wird. Bei anderen viralen Infektionen beschränkt sich die erhöhte Aktivierung meist auf die akute Infektionsphase, während sie bei der HIV-Infektion in allen Phasen bemerkbar ist. Mehrere Faktoren wurden als prädiktive Marker für die

Progression zu AIDS identifiziert, darunter die CD4⁺ T-Zellzahl (bzw. CD4⁺/CD8⁺-Ratio) und serologische Faktoren wie Neopterin, β 2-Mikroglobulin, IgA und der lösliche IL-2-Rezeptor⁴⁵. Später kam die Expression bestimmter Lymphozytenmarker wie CD38 und CD62L (L-Selektin) als Prognosemarker hinzu^{64, 102}.

Auch die Expression weiterer Aktivierungsmarker wie des MHC Klasse II-Moleküls HLA-DR^{88, 109, 143} und des Apoptoserezeptors CD95 (Fas)^{20, 39, 166, 186} ist bei HIV-Infizierten erhöht (womit die gestiegene Anfälligkeit für AICD einhergeht, s.o.), während die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD25 sowohl als erniedrigt¹⁰⁹ als auch als erhöht beschrieben wurde^{78, 181}.

Mit der gesteigerten Aktivierung geht ein geringerer Anteil an naïven T-Zellen einher, die durch die Expression von CD45RA und CD62L gekennzeichnet sind⁸⁸. Gleichzeitig ist der Anteil an CD45RO⁺ sogenannten „Memory“-T-Zellen erhöht. Außerdem induziert HIV den Verlust der Expression des Costimulationsfaktors CD28, insbesondere auf CD8⁺ Lymphozyten¹⁰⁴, der teilweise für die beobachtete Verschlechterung der Immunantwort verantwortlich sein könnte.

Auch die Expression der HIV-Corezeptoren CCR5 und CXCR4 auf Lymphozyten wurde untersucht. Die Expression von CCR5 ist auf T-Lymphozyten signifikant erhöht, während CXCR4 auf T-Zellen und Monozyten erniedrigt ist. Die Expression von CCR5 korreliert dabei mit der Viruslast, der CD4⁺ T-Zell-Zahl und der Expression von CD38^{65, 125, 134}

1.3.2.2 T-Zell-Umsatz

Aufgrund der Immunaktivierung kommt es während der HIV-Infektion zu einem erhöhten T-Zell-Umsatz, der durch die gesteigerte Proliferationsrate der Lymphozyten verdeutlicht wird. 1995 zeigten Ho *et al*⁷⁶ basierend auf einem mathematischen Modell, dem die Veränderungen der Viruslast und der CD4⁺ T-Zellzahlen nach Therapie mit einem Proteaseinhibitor als Grundlage dienten, daß die Produktion von 10⁹ Virionen/Tag zu einem deutlich erhöhten Umsatz von T-Helfer-Zellen führt. Diese Interpretation wurde von Wei *et al* in derselben Ausgabe von Nature¹⁸⁷ erhärtet; ihr liegt ein mathematisches Modell zugrunde, das resistenz-assoziierte Mutationen als Basis für die Kalkulation des zu erwartenden Umsatzes verwendet. Der von beiden Gruppen postulierte Umsatz von rund 10⁹ CD4⁺ Lymphozyten/Tag wurde durch die Möglichkeit in Frage gestellt, daß es sich bei dem beobachteten Anstieg der CD4⁺ T-Zellen um eine Umverteilung aus dem lymphatischen Gewebe handeln könnte^{123, 168}.

Zusätzlich wurde beschrieben, daß zwar der Umsatz von CD8⁺ Lymphozyten (gemessen an der Verkürzung der Telomere, die als Marker für die Replikationsgeschichte der Zelle gilt ⁷²) deutlich erhöht ist, der der T-Helfer-Zellen jedoch im Verlauf der Infektion stabil bleibt ¹⁸⁹. Erst 1998 wurde von mehreren Gruppen schlüssig gezeigt, daß der CD4⁺ T-Zell-Umsatz in der unbehandelten HIV-Infektion gesteigert ist und unter Therapie mit sinkenden Viruslasten wieder abfällt. Dabei wurde der Anteil an Zellen bestimmt, in denen das nukleäre Antigen Ki-67 nachgewiesen werden konnte, das in allen Phasen des Zellzyklus ausser der G₀-Phase exprimiert wird ^{155, 173}. In anderen Arbeiten wurde der Anteil proliferierender Zellen *in-vivo* durch Einbau des Nucleosidanalogs Bromodeoxyuridin (BrdU) im Affenmodell gemessen ^{118, 150}. Im selben Jahr fanden Fleury *et al*, daß „der Anteil an proliferierenden CD4⁺Ki-67⁺ Lymphozyten in HIV-infizierten Patienten in frühen Krankheitsstadien denen von HIV-negativen Kontrollen ähnelt“ ⁴⁹, um zwei Jahre später festzustellen, daß vor HAART „CD4 und CD8 T-Zell-Umsatz erhöht sind“ ⁵⁰. 2001 zeigten schließlich zwei Gruppen durch direkte Messungen den erhöhten CD4⁺ T-Zell-Umsatz während der HIV-Infektion, indem sie Patienten über einen definierten Zeitraum das schon in der SIV-Infektion eingesetzte BrdU ⁹⁴ bzw. deuterierte Glucose ¹¹⁹ verabreichten. Diese Versuche verdeutlichten ebenfalls, daß es sich bei den untersuchten Zellen nicht um eine einheitliche Population handelte, sondern um eine mit hohem Umsatz, aber geringer Lebensdauer (Effektor-Zellen) und um eine langlebige, sich langsam teilende Subpopulation (naïve oder Memory-Zellen) ⁹⁴.

Nachdem heute eine gewisse Einigkeit darüber herrscht, daß der Anteil an proliferierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der unbehandelten HIV-Infektion deutlich erhöht ist, bleibt die Diskussion darüber, ob die treibende Kraft dafür ein homöostatischer Mechanismus ist oder ob dies einfach die erhöhte Immunaktivierung durch das Virus reflektiert.

1.3.2.3 CTL-Antworten

Dank der Entwicklung neuer Methoden, die ein rasches „screening“ der CTL-Antwort ermöglichen, wurde diese in den letzten Jahren ausführlich charakterisiert.

In der akuten Infektion ist die CTL-Antwort meistens schwächer und gegen weniger Epitope gerichtet als in der chronischen Infektion, da in dieser Phase die Diversifizierung des Virus noch nicht so weit fortgeschritten ist ³. Zusätzlich zu Unterschieden in der Stärke und Breite der Immunantwort ist auch die Spezifität der CTL nicht dieselbe. Während 75% der chronisch infizierten HLA-A2-positiven Patienten das von *gag* codierte Peptid SLYNTVATL erkennen,

wurde dieses in einer Studie mit 11 HLA-A2-positiven akut Infizierten von keinem der Patienten erkannt, obwohl diese durchaus Immunantworten gegen andere HIV-Epitope aufgebaut hatten⁶⁶. Die Entwicklung der CTL-Antwort nach einem scheinbar vorbestimmten Muster wurde in einer weiteren Studie primär-infizierter Patienten bestätigt¹⁹¹ und sollte in der Impfstoffforschung berücksichtigt werden.

Nachdem die HIV-spezifische CTL-Antwort mit dem Erreichen der chronischen Infektion verstärkt und gegen eine größere Anzahl von Epitopen gerichtet wird, nimmt sie mit Fortschreiten der Krankheit bei weniger als 400 CD4⁺ T-Zellen/ μ l wieder ab, obwohl CTL-Vorläufer gegen andere virale Erreger auf dem Niveau von Normalkontrollen erhalten bleiben²⁵. Auch mit der Verringerung der Viruslast unter antiretroviraler Therapie wird die CTL-Antwort vermindert^{5, 67, 86}, was darauf hindeutet, daß die Stärke der HIV-spezifischen CTL-Antwort von der Viruslast mitbestimmt wird⁴⁶. Positive Korrelationen zwischen der CTL-Antwort gegen eines oder mehrere HIV-Proteine und der Viruslast wurden auch von drei weiteren Gruppen beschrieben^{17, 23, 128}, von denen zwei jedoch ebenso eine inverse Korrelation postulierten^{22, 128}. Die negative Korrelation der Viruslast mit der HIV-spezifischen CTL-Antwort wurde von drei weiteren Gruppen publiziert^{28, 42, 131}, während neuere Daten für das Fehlen einer Korrelation sprechen^{1, 53}. Eine Erklärung für die erwähnten Diskrepanzen könnte die Anwendung unterschiedlichster Methoden zur Bestimmung der CTL-Antwort sein (u.a. ELISpots, Tetramer-Färbungen oder intrazelluläre Zytokin-Färbungen mit Einzelpeptiden oder Peptidpools an frisch isolierten Zellen, Zytotoxizitäts-Assays mit ⁵¹Cr aus kultivierten Zelllinien). Abschließend läßt sich jedoch wohl nur sagen, daß das genaue Zusammenspiel zwischen Virus und CTL noch nicht geklärt scheint. Ein Faktor, der dabei nicht vernachlässigt werden darf, ist die Möglichkeit einer Funktionsbeeinträchtigung von HIV-spezifischen CTL. Mit den oben erwähnten Methoden der *ex vivo* Quantifizierung werden sie zwar als spezifische Zellen erkannt und sind in der Lage, nach Stimulation Cytokine zu produzieren, enthalten jedoch weniger Perforin und scheinen in einem nicht voll ausgereiften Phänotyp zu verharren^{10, 26}. Es ist jedoch nicht klar, ob dieser Befund eine biologische Signifikanz besitzt.

1.3.2.4 T-Helfer-Zell-Antworten

Die HIV-spezifische CD4⁺ T-Zell-Antwort ist weniger genau beschrieben, da Helfer-Zellen *in vivo* weniger stark expandieren und daher sehr kleine Zellpopulationen nachgewiesen werden

müssen. Daher wurden in den letzten Jahren widersprüchliche Ergebnisse publiziert. HIV-spezifische T-Helfer-Zellen sind mit den klassischen Proliferationstests fast ausschließlich in LTNPs und in Patienten, die während der akuten Infektion behandelt wurden, nachzuweisen^{148, 149}. Es ist allgemein akzeptiert, daß sie eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen HIV spielen⁸⁴, und es konnte gezeigt werden, daß es eine negative Korrelation zwischen der Zahl Gag-spezifischer T-Helfer-Zellen und Plasmavirämie¹⁴⁸ sowie eine positive Korrelation zwischen diesen Zellen und Gag-spezifischen CTL gibt⁸⁵. Die Anwendung neuerer Methoden wie der intrazellulären Anfärbung von Zytokinen hat den Nachweis HIV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen auch bei chronisch Infizierten erlaubt¹⁴². Deren Häufigkeit liegt aber signifikant unter der von LTNPs, und die Behandlung der Patienten senkt den Anteil spezifischer Zellen weiter, so daß bei erfolgreich behandelter chronischer HIV-Infektion kaum CD4⁺ T-Zell-Antworten gegen das Virus mehr nachgewiesen wurden¹⁴². Auch diese Beobachtung ist jedoch nicht unwidersprochen: Eine neuere Veröffentlichung beschreibt im Gegensatz dazu, daß im Proliferationsassay bestimmte p24-spezifische T-Helfer-Zellen in chronisch Infizierten kaum zu finden sind, jedoch unter Therapie zunehmen⁸.

1.3.2.5 Zytokine

Der Verlauf der Zytokin-Expression während der HIV-Infektion wird ähnlich kontrovers diskutiert wie die T-Helfer-Zell-Antwort. Verschiedene Methoden wurden herangezogen, um das Zytokin-Expressions-Profil zu erfassen.

Bei der Messung der konstitutiven Zytokin-Expression *ex vivo* mittels RT-PCR wurde gezeigt, daß die Level von Interferon- γ (IFN- γ) sowie von Interleukin-10 (IL-10) bei HIV-Infizierten im Vergleich zu Normalkontrollen erhöht sind, sich im Verlauf der Infektion aber nur unwesentlich ändern. Diese Erhöhung wurde sowohl in mononukleären Zellen des peripheren Bluts (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) als auch in Lymphknotenzellen nachgewiesen und war auf CD8⁺ T-Zellen beschränkt. Expression erkennbarer Mengen an IL-2 und IL-4 wurden weder in HIV⁺ Patienten noch in Normalkontrollen gemessen⁶⁸. Die Autoren widerlegen somit den vorher postulierten T_H1/T_H2-switch^{32, 33, 163}, der besagt, daß T_H1-Cytokine wie IFN- γ und IL-2 zugunsten einer erhöhten Expression von T_H2-Cytokinen wie IL-4 und IL-10 im Verlauf der Infektion herunterreguliert werden.

Legt man die Produktion von Cytokinen nach Stimulation mit Mitogenen zugrunde, gibt es sowohl Hinweise für einen erhöhten Anteil an IFN- γ -produzierenden Lymphozyten^{167, 188} als

auch für einen Verlust dieser Zellen³². Eine genauere Unterteilung in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen deutet auf eine Verminderung der IFN- γ -Produktion in T-Helfer-Zellen und eine Erhöhung in CTL hin⁹¹. Einigkeit besteht dahingehend, daß die Zellen nach Stimulation weniger IL-2 auf der Einzelzellebene produzieren. Bei IL-4 und IL-10 hingegen gibt es wiederum sowohl Anzeichen für eine unveränderte Expression^{68, 188} als auch für eine Erhöhung der Cytokinproduktion⁹¹.

Abschließend läßt sich nur feststellen, daß es eine Veränderung der Cytokin-Expression durch die Infektion mit HIV gibt, ohne daß diese jedoch bisher ein einheitliches Muster aufweist.

1.4 Die Behandlung der HIV-Infektion

1.4.1 Hoch-aktive antiretrovirale Therapie (HAART)

Jahrzehntelange Erforschung der Pathogenese von HIV hat weder zur Entwicklung eines Impfstoffes noch zur Heilung von AIDS geführt. Erst durch die Einführung von nukleosidanalogen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) und nachfolgend von Proteasehemmern (PIs) und Nicht-Nukleosidanalogen-RTIs (NNRTIs) konnten Morbidität und Mortalität massiv gesenkt werden^{27, 136}. Mit der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapien (HAART), der Kombination von drei oder mehr Medikamenten aus mindestens zwei Substanzklassen, wurde eine rasche und teilweise über Jahre anhaltende Senkung der Plasmavirämie auf Werte unterhalb der Nachweisgrenzen der verfügbaren Assays erreicht^{70, 112, 151}. Einhergehend mit der Unterdrückung der Virusreplikation kommt es zu einem signifikanten Anstieg der CD4⁺ T-Zellzahlen^{11, 70}, auch bei Patienten mit sehr niedrigen Eingangswerten^{71, 111}. Die Erwartung, HIV mit Hilfe solcher Therapieansätze innerhalb von nur zwei bis drei Jahren eradizieren zu können¹³⁹, erfüllte sich jedoch nicht. Schon bald wurde klar, daß es wegen der frühen Etablierung latenter Reservoirs^{29, 47, 190} auch unter optimalen Therapiebedingungen nicht Jahre, sondern Jahrzehnte dauern würde, das Virus zu eradizieren⁴⁸.

Neue Therapieansätze mit immunmodulatorischen Zusatzsubstanzen wurden eingeführt, um das wirtseigene Immunsystem bei der Bekämpfung von HIV mit einzubeziehen und zu unterstützen. Cytokine wie Interleukin-2 (IL-2) führen zu einer semi-selektiven Expansion des CD4⁺ T-Zell-Pools^{43, 93} und könnten somit die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung opportunistischer Infektionen verhindern. Ein weiterer angestrebter Effekt von IL-2 war in

klinischen Studien das „Ausschwemmen“ von HIV aus ruhenden latent infizierten CD4⁺ Zellen, indem diese aktiviert und somit zur Expression von HIV angeregt werden. Unter diesen Bedingungen würde HAART, die keinen Einfluß auf das integrierte Provirus hat, wieder greifen. In einer nicht-randomisierten Studie konnte gezeigt werden, daß die adjuvante Gabe von IL-2 zwar keinen deutlichen Einfluß auf die provirale DNA hat, wohl aber zu einer signifikant niedrigeren Frequenz von ruhenden CD4⁺ T-Zellen führt, die replikationskompetentes Virus enthalten, gemessen als Anzahl von „infektiösen Units pro Million Zellen (IUPM)“ in einem quantitativen Co-Kulturansatz³¹. In einer randomisierten klinischen Studie ließ sich kein Unterschied in der Menge an proviraler DNA nachweisen; es fand sich jedoch bei der Mehrzahl der Patienten eine persistierende niedriggradige Virusreplikation, die den latent infizierten Zellpool wieder auffüllen und somit einer Eradikation entgegenwirken dürfte¹⁷⁰.

Derartigen immunmodulatorischen Therapieansätzen stehen als weitere potenzielle adjuvante Substanzen Zytostatika zur Verfügung. Diese könnten durch die Verringerung der Anzahl an verfügbaren Zielzellen für die HIV-Infektion den Pool der latent infizierten Zellen verkleinern und die Überlebensdauer infizierter Zellen verkürzen. Eine mögliche immunmodulatorische Wirkung des Zytostatikums Hydroxyurea, das seit den 60er Jahren in der Behandlung von Leukämien eingesetzt wird⁴⁰, wird in einem Teil dieser Arbeit als Zusatz zu einer Dreifachkombinationstherapie untersucht. Auch das nach Transplantationen eingesetzte Cyclosporin A wird als Adjuvans diskutiert¹⁴⁷.

Neuerdings wird auch versucht, ausser den klassischen Zielproteinen RT und Protease andere virale Komponenten zu hemmen. Ein Peptid, das die zur Fusion von HIV mit der Zellmembran notwendige Konformationsänderung von gp41 unterbindet⁸⁹, steht kurz vor der Zulassung (T-20).

1.4.1.1 Hydroxyurea

Hydroxyurea ist ein Zytostatikum, welches die Zellen in der G1-Phase vor der DNA-Synthese blockiert. Dieser Effekt entsteht durch die irreversible Inhibierung der Ribonukleotid-Reduktase, die in der Synthese von dNTPs eine limitierende Rolle spielt⁴⁰. Durch den reduzierten intrazellulären Pool an dNTPs wird die DNA-Synthese gehemmt, auch die der proviralen DNA¹⁰⁵.

Ein großer Vorteil von Hydroxyurea ist theoretisch, daß es im Gegensatz zu den zur Zeit eingesetzten antiviralen Therapeutika, ein zelluläres Enzym beeinflusst. Dieses unterliegt im Gegensatz zu den viralen Proteinen keinen raschen Änderungen durch Mutationen. Daher sind in 40 Jahren, in denen Hydroxyurea eingesetzt wurde, keine Anzeichen von Resistenzen bekannt geworden ⁴⁰.

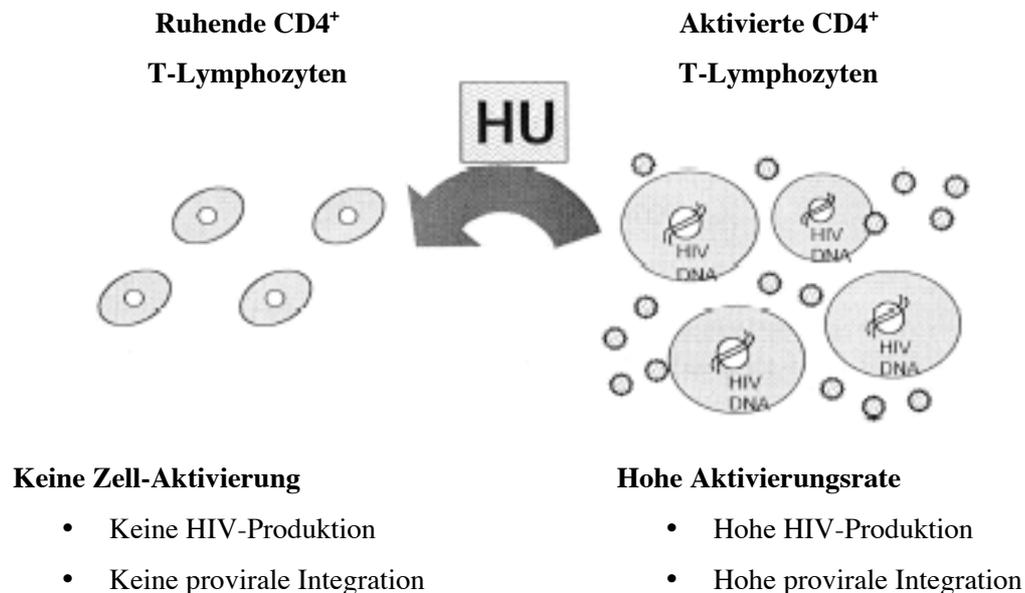


Abb. 1.4.1.1.a: Hydroxyurea vermindert die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen und limitiert dadurch die HIV-Integration und -Produktion ¹⁰⁷

Lori unterteilt die Wirkungsweise von Hydroxyurea in immunmodulatorische und antivirale Effekte ¹⁰⁷. Der immunmodulatorische Effekt ist wiederum bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich. Auf der T-Helfer-Ebene verhindert Hydroxyurea durch den Arrest der Zellen in einem ruhenden Status die Produktion von HIV (das nur in aktivierten, nicht aber in ruhenden Zellen vollständig transkribiert wird) und die Integration des Provirus (Abb. 1.4.1.1.a).

Die Hypothese für die Interaktion von Hydroxyurea mit CD8⁺ T-Zellen sieht vor, daß sowohl die durch die exzessive Aktivierung verursachte Erschöpfung der CTL als auch die von CTL vermittelte Vernichtung von T-Helfer-Zellen unterbunden werden, indem die Zellen in einem ruhenden Status verbleiben (Abb. 1.4.1.1.b).

Auch der antivirale Effekt von Hydroxyurea setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen ¹⁰⁷. Die direkte Auswirkung der Verminderung des dNTP-Pools führt zu einer inkompletten Transkription aus Mangel an DNA-Bausteinen. Zusätzlich kommt es zu einem synergistischen Effekt von Hydroxyurea und einigen NRTIs: durch die erniedrigte

Konzentration an dNTPs wird die Wahrscheinlichkeit des Einbaus von NRTIs erhöht. Da der dATP-Pool am stärksten von Hydroxyurea vermindert wird, ist der synergistische Effekt mit Didanosin, einem dATP-Analogon, am ausgeprägtesten. Aber auch die Wirkung von Stavudin wurde in *in vitro*-Modellen verstärkt, da Hydroxyurea die intrazelluläre Phosphorylierung dieses Thymidin-Analogons erhöht ⁵⁷. *In vivo* konnte diese Beobachtung jedoch noch nicht bestätigt werden.

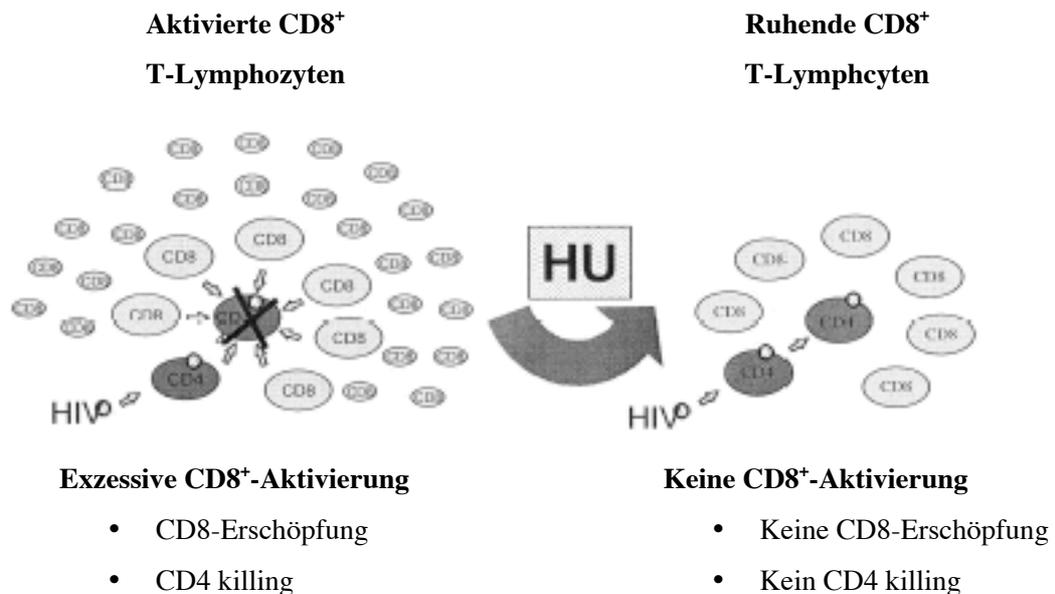


Abb. 1.4.1.1.b: Hydroxyurea reduziert die CD8-Aktivierung und verhindert somit die CD8-Erschöpfung und die Depletion von CD4⁺ Zellen ¹⁰⁷

Ebenso zeigt Hydroxyurea die Fähigkeit, für Resistenzmutationen gegen Didanosin zu kompensieren ¹⁰⁷. Durch die Erniedrigung des intrazellulären dATP-Spiegels wird das Analogon wieder in eine kompetitive Position gebracht. Dadurch lassen sich Viren mit genotypischer Resistenz phänotypisch nicht mehr vom Wildtyp unterscheiden.

Als weiterer Wirkmechanismus wurde vor kurzem gezeigt, daß Hydroxyurea die Transaktivierung des HIV-LTR-Promotors inhibiert ²⁴. Dieser Mechanismus scheint unabhängig von der Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase zu sein.

Sowohl die bisher durchgeführten Pilotstudien ^{18, 19, 35, 51} als auch kontrollierte oder randomisierte Studien ^{106, 154} konzentrierten sich auf den Verlauf der Viruslast und die CD4⁺ T-Zellzahl im Rahmen von Monotherapien oder der Kombination von zwei Nucleosidanaloga mit Hydroxyurea. Unter diesen nicht besonders stringenten Bedingungen konnte die Wirksamkeit von Hydroxyurea in allen Studien erwiesen werden ¹⁰⁷. Während die Kombination von Didanosin mit Hydroxyurea aufgrund der relativ guten Kosten-Nutzen-

Verhältnisses in Ländern der dritten Welt eine vielversprechende Alternative ist¹⁵⁶, ist sie den hierzulande üblichen Mehrfachkombinationen nicht gewachsen. Es ist jedoch bisher nichts über einen eventuellen positiven Effekt von Hydroxyurea als Zusatz einer Proteaseinhibitor-enthaltenden Mehrfachkombination bekannt.

1.4.2 Strukturierte Therapieunterbrechungen (structured treatment interruptions, STI)

In der klinischen Praxis ergeben sich viele Gründe für eine Unterbrechung der Therapie für wenige Tage oder Monate bis hin zu Jahren, unter ihnen immunologisches oder virologisches Therapieversagen, Medikamentenunverträglichkeit und eine schlechte Therapieadhärenz¹¹⁷. Strukturierte Therapieunterbrechungen jedoch werden auch im Zusammenhang mit der Ausbildung oder Verstärkung einer HIV-spezifischen Immunität untersucht, nachdem Fälle wie der „Berlin-Patient“ bekannt wurden¹⁰³. Dieser konnte nach der Erstbehandlung während der Primärinfektion und darauf folgenden krankheitsbedingten Therapieunterbrechungen einen virologischen set point über Monate unterhalb von 500 RNA-Kopien/ml erhalten.

Folgeuntersuchungen zeigten jedoch bald, daß es sich bei Patienten mit Kontrolle der Viruslast um anekdotische Fälle handelte, die entweder in der akuten Phase der HIV-Infektion^{103, 133, 149} oder bei sehr niedriger Viruslast behandelt wurden¹⁸³. Bei der überwältigenden Mehrheit der Patienten, die erst während der chronischen Infektion behandelt wurden, gab es trotz teilweiser jahrelanger Unterdrückung der Viruslast auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze innerhalb von Tagen oder Wochen nach Therapiestop einen ausgeprägten viralen Rebound^{30, 38, 60, 73, 77, 124, 138, 152} auf prätherapeutische Werte⁷⁴. In den meisten Fällen wurden einhergehend mit dem Anstieg der Viruslast auch eine erneute CD4⁺ T-Zell-Abnahme sowie der Anstieg verschiedener Aktivierungsparameter beobachtet⁵⁴.

Im Affenmodell konnte später gezeigt werden, daß STI bei der Behandlung der frühen Infektion zu einer verbesserten Kontrolle der Viruslast führen können, die durch eine verstärkte virus-spezifische CTL-Antwort vermittelt werden¹⁰⁸. Auch im Menschen konnte teilweise eine Erhöhung der HIV-spezifischen CTL mit Anstieg der Viruslast beobachtet werden^{58, 138, 149, 153}. Diese geht aber nur in wenigen Fällen auch mit einer verbesserten Viruskontrolle einher¹⁴⁹.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Diese Arbeit besteht aus drei komplementären Abschnitten:

1. Untersuchung des Einflusses einer Dreifachkombinationstherapie mit und ohne adjuvantem Hydroxyurea auf virale und immunologische Parameter im Rahmen einer klinischen Phase III-Studie (ARCHY)
2. Vergleich der Wirkung der Therapie in Blut und Lymphknoten
3. Analyse des viralen Rebounds sowie des Einflusses der erneuten viralen Replikation auf Parameter der Immunaktivierung sowie auf die HIV-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort im Rahmen einer Therapieunterbrechung bei 15 Patienten

Teile dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor für Virologie, Roche Welwyn, dem Labor für die Immunpathogenese von AIDS am Centre Hospitalier Universitaire Vaudois in Lausanne und dem Partners AIDS Research Center am Massachusetts General Hospital in Boston durchgeführt.

1.5.1 Klinische Phase III-Studie ARCHY

Die Studie **AntiRetrovirale Chemotherapie plus HYdroxyurea** war eine offene, randomisierte, prospektive multizentrische Studie, die an sieben Praxen und Universitätskliniken im nord-deutschen Raum durchgeführt wurde. Es wurden 28 Patienten eingeschlossen, die folgende Kriterien erfüllen mußten:

- ✓ Dokumentierter Nachweis der HIV-1-Infektion
- ✓ Zwischen 18 und 70 Jahre alt
- ✓ Erteilung einer schriftlichen Einverständniserklärung
- ✓ Plasmavirämie < 5000 Kopien/ml
- ✓ CD4⁺ T-Zellzahl > 200 Zellen/ μ l
- ✓ Lebenserwartung > 6 Monate
- ✓ Bereitschaft zur strikten Antikonzeption
- ✓ Bei Frauen im gebärfähigen Alter : negativer Schwangerschaftstest
- ✓ Keine Vortherapie mit antiretroviralen Substanzen oder Hydroxyurea
- ✓ Allgemein guter gesundheitlicher Zustand

Hauptziel der Studie war es, die antivirale und immunomodulatorische Wirkung von Hydroxyurea in Kombination mit einer Standard-Dreifachkombination bei der HIV-Infektion im

Blut und im lymphatischen Gewebe zu untersuchen. Dies wurde anhand der Viruslast, der T-Zellzahlen und verschiedener Parameter der Lymphozytenaktivierung und –proliferation sowie mit Hilfe funktioneller Assays analysiert.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg zustimmend beurteilt. Alle Patienten gaben vor dem Einschluss schriftlich ihr informiertes Einverständnis ab.

Hydroxyurea wurde als Zusatzstoff gewählt, da es neben einem direkten anti-virologischen Effekt die Wirkung von Nukleosidanaloga verstärkt, den Einfluß von Resistenz-assoziierten Mutationen minimiert und zusätzlich eine immunmodulatorische Komponente beinhaltet, indem es die Aktivierung der potentiellen Zielzellen von HIV verhindert (s. Abschnitt 1.4.1.1). Die Wirkung auf mehreren Ebenen macht eine verbesserte Viruskontrolle wahrscheinlicher. Die Nukleosidanaloga Didanosin und Stavudin wurden gewählt, da sie die besten synergistischen Effekte mit Hydroxyurea (Didanosin) bzw. die geringste Hämatotoxizität der Thymidinanaloga (Stavudin) aufweisen.

Die Patienten bekamen eine Standardtherapie mit 2 x 40 mg Stavudin, 2 x 250 mg (bei <60 kg Körpergewicht) oder 1 x 400 mg (bei >60 kg KG) Didanosin (ddI) und 2 x 1250 mg Nelfinavir. Der für Hydroxyurea randomisierte Arm erhielt zusätzlich 2 x 500 mg Hydroxyurea über die ersten sechs Monate der Studie. Die Gesamtdauer der Studie betrug 12 Monate.

1.5.2 Vergleich Blut/Lymphknoten

Alle Parameter (außer der Produktion von Zytokinen nach Stimulation) wurden parallel in Blut und Lymphknoten analysiert. Aus Gründen der Verfügbarkeit werden die meisten Studien an peripheren Lymphozyten durchgeführt, diese machen jedoch nur 2% der Gesamtlymphozyten des Menschen aus¹⁷⁵. Daher ist es unerlässlich, zu zeigen, daß das Blut als Indikator für die Abläufe im lymphatischen Gewebe dienen kann.

1.5.3 Kontrollierte Therapieunterbrechung

Um einen Einblick in die Wirksamkeit der verabreichten Therapien zu erhalten, wurde bei 15 Patienten die Therapie völlig abgesetzt. Vier dieser Patienten wurden aus der ARCHY-Studie rekrutiert, und weitere 11 waren Teilnehmer der der COSMIC-Studie, die adjuvantes IL-2 zu

einer Vierfachkombination erhalten hatten. Die Patienten waren optimal vorbehandelt und zeigten keine Anzeichen persistierender viraler Replikation im peripheren Blut. Vor und während der Therapiepause wurden Plasmaviruslast, T-Zellzahlen, Aktivierung und Proliferation der Lymphozyten sowie HIV-spezifische CTL untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Blutabnahmen

Für ARCHY erfolgten Blutabnahmen zum Screening (Überprüfung der Erfüllung der Einschlusskriterien), an Baseline (Tag 0), Tag 14, Tag 28 und darauffolgend monatlich bis Monat 12. Screening und Baseline sollten nicht über 30 Tage auseinanderliegen; ggf. wurde das Screening wiederholt. Zu allen Zeitpunkten wurden die Viruslast und die Anzahl der Lymphozyten (getrennt in T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, HLA-DR⁺ T-Zellen und CD45RA⁺ CD4⁺ T-Zellen) aus frischem Blut bestimmt. Zusätzlich wurden PBMC aus ca. 30ml Blut isoliert und kryokonserviert.

Bei Therapieabbruchern wurden Proben vor der Pause und, soweit verfügbar, nach drei Tagen, einer, zwei, drei und vier Wochen und dann monatlich abgenommen.

2.2 Lymphknoten-Proben-Entnahmen (PEs)

Bei ARCHY wurden zu Baseline und an Monat 6 bei Zustimmung des Patienten axilläre Lymphknoten in Lokalanästhesie chirurgisch entnommen. Die zweite Lymphknoten-PE wurde verhältnismäßig früh gewählt, da zu diesem Zeitpunkt der Unterschied zwischen den beiden Randomisierungsarmen am größten sein sollte.

2.3 Isolierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells)

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

Pro Patient wurden 3 bis 5 Röhrchen à ca. 8 Milliliter venösen Blutes verarbeitet.

Die CPTs wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 1600g (3000 Upm) zentrifugiert. Dabei entsteht wie bei einer klassischen Ficoll-Separation eine Lymphozytenschicht, die in diesem Fall durch ein Gel von den dichteren Erythrozyten getrennt wird, während das Plasma im Überstand verbleibt. Von dem Plasma wurden je 2 ml in 3 Nunc Kryoröhrchen

eingefroren. Die auf dem Gel liegenden Lymphozyten wurden in ein 50ml-Polypropylenröhrchen überführt und die CPTs mit je 8 bis 10ml PBS gewaschen, um noch anhaftende Zellen zu ernten. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 400g (1500 Upm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 4.5ml RPMI resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Bei weniger als 25 Millionen Zellen wurden diese auf 5 Einfrierröhrchen verteilt, bei mehr à 5 Millionen/Röhrchen eingefroren. Nach Zugabe der gleichen Menge Einfriermedium wurden die Zellen zügig in 1.8ml-Aliquots auf zuvor beschriftete Kryoröhrchen verteilt und in einer Kryobox bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium:

30% RPMI

30% Plasma-Expander (Gelifundol)

20% FCS

20% DMSO

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

2.4 Isolierung von LMNC (lymph node mononuclear cells)

Axilläre Lymphknoten wurden nach der Entnahme in 0.9%iger Natriumchloridlösung auf Eis gehalten, um eine rasche Autolyse der Lymphozyten zu verhindern. Zur Isolierung der Zellen wurde der Lymphknoten unter der Sterilbank in eine nicht beschichtete Petrischale mit kaltem RPMI gegeben. Ein Drittel des Lymphknotens wurde mit einem sterilen Einmalskalpell

abgetrennt und der Rest wieder in NaCl auf Eis gegeben. Das gekühlte Material wurde anschließend für die pathologischen Untersuchungen (*in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie) weiterverarbeitet. Mit Hilfe einer sterilen Einmalpinzette wurden die Zellen von der Schnittfläche aus mit dem Skalpell aus der Kapsel gestrichen. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb in ein 50ml- Polypropylenröhrchen gegeben und die Petrischale mit RPMI gewaschen, um den Verlust der Zellen durch Haftung an die Petrischale zu minimieren. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 400 g (1500Upm) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5ml RPMI aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Wie bei PBMC wurden maximal 5 Millionen LMNC pro Röhrchen eingefroren, mindestens aber 5 Kryoröhrchen. Das Volumen wurde entsprechend erhöht und mit der selben Menge an Einfriermedium versetzt. Beim Einfrieren von mehr als 50 Millionen Zellen wurde die Suspension vor der Zugabe des Einfriermediums à 9 ml aliquotiert und nacheinander eingefroren, um die Einwirkzeit des DMSO zu minimieren. LNMC wurden über Nacht bei -80°C in einer Kryobox gekühlt und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium:

30% RPMI

30% Plasma-Expander (Gelifundol)

20% FCS

20% DMSO

	Firma	Katalognummer
0.9% Natriumchloridlösung	Braun	6697366.00.00
Petrischale	Falcon	35 1029
50ml-Röhrchen	Falcon	35 2070
Einmalskalpell	Braun	055 180 75
Polystyrol-Pinzette		
Zellsieb 70µm	Falcon	35 2350
Cryotube 1.8ml	Nunc	377 267
RPMI	GibcoBRL	21875-034
FCS	HyClone	CH30160.03
Gelifundol	Biotest	184.190-09
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka	41640
Cryobox	Stratagene	

2.5 Färbung von Lymphozytensubpopulationen zur Messung an einem Durchflußzytometer

PBMC oder LMNC wurden bei 37°C angetaut und zu 12ml kaltem FACS-Puffer in einem 15ml-Falcon gegeben. Die Zellen wurden bei 4°C für 6 Minuten bei 400g (1500Upm) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in [(Anzahl der Färbungen-1) x100] µl FACS-Puffer aufgenommen und auf Eis aufbewahrt. Die Standardantikörperkombinationen wurden als Stammlösung hergestellt und für mehrere Wochen aufbewahrt. Es wurden bis auf Ki-67 ausschliesslich direkt gekoppelte monoklonale Antikörper verwendet. Pro Färbung wurden 2.5µl der APC- und 7.5µl der FITC-, PE- und PerCP-Antikörper von Becton Dickinson eingesetzt, von TCR-APC 2µl, und von Antikörpern anderer Firmen 5µl. Für die Färbung wurden die an der Zelloberfläche bindenden Antikörper in FACS-Röhrchen vorgelegt und je 100µl Zellsuspension zugegeben. Die Zellen wurden mit den Antikörpern für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert, dann mit 2 ml kaltem PBS versetzt und bei 4°C für 5 Minuten bei 400g abzentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten bei diesen Bedingungen. Die Zellen wurden dann fixiert: die nur extracellulär gefärbten mit 300µl 1% PFA und die intracellulär zu färbenden mit 500µl 2% PFA. Erstere waren nach kurzer Einwirkzeit fertig zur Analyse. Für die Färbung der intracellulären Marker wurden die Zellen nach 20 Minuten Fixierung im Kühlschrank abzentrifugiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte durch Zugabe von 500µl Permeabilisierungspuffer (PP) und eine weitere Zentrifugation. Die Zellen wurden dann in 100µl PP aufgenommen, mit je 5µl Ki-67-FITC versetzt und für 20 Minuten im Kühlschrank gefärbt. Nach Zugabe von 2ml Waschpuffer wurden die Zellen für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann abzentrifugiert. Es folgten ein Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer und einer mit 750 µl BSA-Puffer, dann wurden die Zellen mit 300 µl 1% PFA fixiert und gemessen.

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

Die Messungen erfolgten an einem 4-Farb-FACSCalibur™. Es wurden, soweit möglich, jeweils 40.000 CD3⁺ T-Zellen im Lymphozytengate gemessen oder 20.000 CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen.

FACS-Puffer

2% FCS
0.1% Azid
in PBS

Waschpuffer

0.3% Saponin
0.1% BSA
0.1% Azid
in PBS

1% und 2% PFA

10% PFA in PBS verdünnen, immer frisch ansetzen

Permeabilisierungspuffer (PP)

0.1% Saponin
0.1% BSA
0.1% Azid
in PBS

BSA-Puffer

0.1% BSA
0.1% Azid
in PBS

10% PFA

10g Paraformaldehyd bei 72°C in 80ml PBS lösen
auf 100ml mit PBS auffüllen
aliquotieren und bei -20°C lagern

Alle Puffer im Kühlschrank lagern, soweit nicht anders angegeben.

	Firma	Katalognummer
15ml Röhrchen	Falcon	35 2096
FACS-Röhrchen	Falcon	35 2052
10x PBS	GibcoBRL	14200-067
FCS	HyClone	CH30160.03
Saponin	Sigma	S-7900
BSA	Sigma	B-4287
Natriumazid	Merck	1.06688.0100
Paraformaldehyd	Serva	31628
□CD3-PerCP	Becton Dickinson	347 344
□CD3-APC	Becton Dickinson	340 440
□CD4-PerCP	Becton Dickinson	347 324
□CD4-FITC	Becton Dickinson	340 133
□CD4-PE	Becton Dickinson	347 327
□CD4-APC	Becton Dickinson	340 443
□CD8-PerCP	Becton Dickinson	347 314
□CD8-FITC	Becton Dickinson	347 313
□CD8-PE	Becton Dickinson	340 046
□CD14-FITC	Becton Dickinson	347 493
□CD19-PE	Becton Dickinson	349 209
□CD25-PE	Becton Dickinson	345 797
□CD28-PE	Becton Dickinson	348 047
□CD38-APC	Becton Dickinson	340 439

□CD45RA-PE	Pharmingen	31265X
□CD45R0-FITC	Pharmingen	31304X
□CD45R0-APC	Becton Dickinson	340 438
□CD62L-FITC	Cymbus Biotechnology	CBL 523F
□CD69-PE	Becton Dickinson	347 827
□CD95-FITC	Becton Dickinson	340 479
□CD122-PE	Becton Dickinson	340 254
□CD103-PE	DAKO	R7188
□HLA-DR-PE	Becton Dickinson	347 367
□CCR5-PE	Pharmingen	36465X
□CXCR4-APC	Pharmingen	36199X
□□/□TCR-APC	Pharmingen	555718
□Ki-67-FITC	DAKO	F0053

2.6 Sortieren von T-Zell-Subpopulationen mit Dynabeads

Um ein Maß für die Anzahl an naïven, kürzlich aus dem Thymus ausgewanderten Zellen (recent thymic emigrants, RTE) zu bestimmen, wurde die Menge der „T cell receptor rearrangement excision circles“ (TRECs) in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gemessen. TRECs entstehen während der Reifung von T-Zellen beim Rearrangement des T-Zell-Rezeptors. Es sind DNA-Fragmente, die nach dem Ausschneiden aus dem Genom zirkularisieren und bei der Teilung der Zelle nicht repliziert werden. Sie sind jedoch so stabil, daß man sie auch nach vielen Zellteilungen noch nachweisen kann. Eine Lymphocytenpopulation, die viele RTEs enthält, hat dementsprechend einen hohen Anteil an TRECs, während dieser durch Proliferation verdünnt wird und in Memory-T-Zellen niedrig ist.

Eingefrorene PBMC wurden bei 37°C angetaut und zu 12 ml R20 in einem 15 ml Falcon gegeben. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 1700 Upm abzentrifugiert und mit 15 ml R20 gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Alle weiteren Schritte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, auf Eis.

Je 100 µl Dynabeads für die Anreicherung von CD4 und CD8 exprimierenden Zellen wurden in 1.5 ml Eppendorfgefäße gegeben und diese in Magnethalter gestellt. Der Überstand konnte so abgenommen werden und die Beads wurden zweimal mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen. CD4-Beads wurden in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen, CD8-Beads in 600 µl. Dazu wurden dann 600 µl bzw. 400 µl Zellsuspension gegeben (durch die invertierte CD4⁺/CD8⁺Ratio bei HIV-Patienten sind mehr CD8⁺ T-Zellen in den Proben, daher wurde

mehr Material für die Sortierung in CD4⁺ Zellen eingesetzt). Zellen und Beads wurden auf einer Rolleinrichtung bei 4°C für 30 Minuten gemischt, dann kurz anzentrifugiert (2s), um die Beads aus dem Deckel zu lösen und dreimal in den Magnettracks mit je 500 µl FACS-Puffer gewaschen. Sie wurden dann in 100 µl R1 aufgenommen, mit 10 µl DETACHaBEAD versetzt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Vortexer bei 600 Upm geschüttelt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Beads mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen. Dieser Überstand wurde zu den ersten 110 µl dazugegeben, und die Zellzahl wurde bestimmt. Das Äquivalent zu 250.000 Zellen wurde dann in ein 1.5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt und diese für 10 Minuten bei 2000 Upm in einer Eppendorfszentrifuge pelletiert. Wenn weniger Zellen vorhanden waren, wurden alle verwendet und die Zellzahl auf dem Röhrchen vermerkt. Bei weniger als 50.000 Zellen wurde die Probe verworfen. Der Überstand wurde sehr sorgfältig mit einer feinen Pipettenspitze abgenommen, damit das Pellet möglichst trocken eingefroren werden konnte. Die Sarstedtröhrchen wurden bei -80°C eingefroren und bis zur Analyse gelagert. Alle Proben eines Patienten wurden im gleichen Ansatz sortiert.

R20

20% FCS in RPMI

FACS-Puffer

2% FCS in PBS

R1

1%FCS in RPMI

	Firma	Katalognummer
15ml Röhrchen	Falcon	35 2096
FCS	HyClone	CH30160.03
RPMI	GibcoBRL	21875-034
10x PBS	GibcoBRL	14200-067
1.5ml Eppendorfgefäße	Eppendorf	0030 120.086
Dynabeads CD4	Dynal	111.15/16
Dynabeads CD8	Dynal	111.07/08
DETACHaBEAD CD4/CD8	Dynal	125.03/04
Sarstedt-Reaktionsgefäß mit Deckel	Sarstedt	72.692.005
Zählkammer	Neubauer	
Trypanblau-Lösung 0.4%	GibcoBRL	15250-061
Magnetic Particle Concentrator	Dynal	
Rotationsmischer		
Vortex mit Aufsatz für Eppendorfgefäße		

2.7 Real-time PCR mit dem TaqMan Assay

Die Anzahl von TRECs wurde mittels real-time PCR bestimmt. Die PCR erfolgte mit dem 5'Nuclease oder TaqMan Assay.

Die Pellets der sortierten Zellen wurden mit 10 μ l pro 100.000 Zellen einer 100 μ g/ml Proteinase K-Lösung (also standardmäßig in 25 μ l) überschichtet. Die Zellen wurden kurz gevortext und abzentrifugiert und bei 56°C inkubiert. Nach 1-2 h wurden sie nochmals gevortext und abzentrifugiert und die Proteinase K für 15 Minuten bei 95°C inaktiviert. Der Überstand wurde dann direkt in der PCR eingesetzt.

Je PCR wurden 20 μ l MasterMix angesetzt:

H ₂ O:	12.125 μ l
PlatinumTaq Puffer:	2.5 μ l
Mg ²⁺ (3.5mM):	1.75 μ l
Primer 5' (500nM):	1.0 μ l
Primer 3' (500nM):	1.0 μ l
PROBE (150nM):	0.75 μ l
BD636 reference:	0.25 μ l
dNTPs (0.2mM):	0.5 μ l
Platinum Taq (0.5u):	0.125 μ l

Der MasterMix wurde in einer 96-well-Platte vorgelegt und je 5 μ l H₂O (3x, Nullkontrolle), Standard (je 2x) oder Zellüberstand (je 1x) zugegeben. Die PCR wurde am ABI7700-System durchgeführt. Sie begann mit 5 Minuten Hot-start bei 95°C und lief für 40 Zyklen mit 30s 95°C und 1min 60°C. Die Einstellungen wurden für die benutzten Farbstoffe und Referenz angepaßt. Mit den 5 Standards wurde eine Standardkurve ermittelt, mit der die TREC-Konzentration des zu untersuchenden Materials bestimmt wurde.

Proteinase K

100 μ g/ml in 10mM Tris-HCl pH8

sj Standards

10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ Kopien in 5 μ l

10mM Tris-HCl pH8

1M Tris-HCl pH8 mit Wasser verdünnen

	Firma	Katalognummer
Proteinase K	GibcoBRL	25530-015
Tris-HCl (TRIZMA [®] Hydrochloride)	Sigma	T7149
Platinum [®] Taq DNA Polymerase	GibcoBRL	10966-018
Taq DNA Polymerase PCR Buffer	GibcoBRL	18067-017
10mM dNTP Mix	GibcoBRL	18427-013
50mM MgCl ₂		
Primer 5'	CACATCCCTTTCAACCATGCT	
Primer 3'	GCCAGCTGCAGGGTTTAGG	
PROBE	FAM'ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACT'Tamra	
BD636		
ABI7700	Perkin-Elmer	
sj Standard	Zur Verfügung gestellt von D. Douek, NIH	

2.8 Stimulation von Lymphozyten mit Mitogenen

Zur Messung der Zytokinproduktion wurden Lymphozyten aus heparinisiertem Blut mit Phorbolmyristylacetat (PMA)/Ionomycin stimuliert. PMA aktiviert die Proteinkinase C, greift also direkt in die Signaltransduktionskaskade ein. Ionomycin ist ein Ca²⁺-Ionophor und wirkt durch den ermöglichten Calcium-Flux ebenso auf die Signaltransduktion. Beide Substanzen fördern durch die Aktivierung von NF- κ B die Transkription von Zytokin-Genen. Die Ausschüttung der Zytokine in das Medium wurde durch Zugabe von Brefeldin A verhindert, das die Translokation von Proteinen aus dem endoplasmatischen Reticulum in den Golgi-Apparat hemmt. Dadurch konnten die produzierten Zytokine direkt in den Zellen nachgewiesen werden.

RPMI wurde mit 10 μ g/ml Brefeldin A (BFA) versetzt und davon 500 μ l in ein 15 ml Falcon gegeben für die Negativkontrolle. Zur Stimulation wurden zusätzlich zum BFA 25 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin zum Medium gegeben und davon 500 μ l in ein weiteres 15 ml Falcon gegeben. In beide Röhrchen wurden jeweils 500 μ l Blut gegeben und die Mischung für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden die Erythrozyten für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 12ml FACS Lysing Solution lysiert und die Lymphozyten für 6 Minuten bei 4°C und 400g (1500 Upm) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium bei -80°C in Styroporboxen eingefroren. Bei dieser Temperatur wurden sie gelagert, bis alle Zeitpunkte eines Patienten in einem Ansatz gefärbt werden konnten.

BFA

10mg/ml in DMSO

15µl Aliquots

Ionomycin

5mg/ml in Ethanol

PMA

1mg/ml in DMSO

5µl Aliquots frisch mit 200µl RPMI verdünnen

Einfriermedium

10% DMSO

1% BSA

in PBS

Alle Reagenzien wurden bei -20°C gelagert

	Firma	Katalognummer
15ml Röhrchen	Falcon	35 2096
Phorbolmyristylacetat (PMA)	Sigma	P-8139
Ionomycin	Calbiochem	407 952
Brefeldin A (BFA)	Sigma	B-7651
RPMI	GibcoBRL	21875-034
FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson	349 202
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka	41640
BSA	Sigma	B-4287
Ethanol	Merck	1.00983.1000
PBS	GibcoBRL	14190-094

2.9 Stimulation von Lymphozyten mit Super- und Recall-Antigenen

Um die Produktion von Zytokinen nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors zu messen wurde je 1ml heparinisiertes Blut in 15ml Zentrifugenröhrchen transferiert und entweder mit 2.5µl CD28, CD28 + 5 µg/ml SEB, CD28 + 1 µg/ml CMV-Lysat oder CD28 + 10 µg/ml Tetanustoxoid bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach einer Stunde wurden 10 µg/ml BFA zugegeben und für weitere 5 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden durch 15 Sekunden langes vortexen mit 2mM EDTA von der Röhrchenwand gelöst und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurden 12ml FACS Lysing Solution zugegeben und die Zellen wie bei der Stimulation mit Mitogenen weiterbehandelt.

SEB

1mg/ml in PBS

5µl-Aliquots bei -20°C

CMV

1mg/ml in PBS

2µl-Aliquots bei -70°C

TT

1mg/ml in PBS
 10µl-jAliquots
 -20°C

EDTA

20mM in PBS, pH8
 4°C

Einfriermedium

10% DMSO
 1% BSA
 in PBS
 -20°C

	Firma	Katalognummer
15ml konisches Röhrchen	Falcon	35 2096
□CD28 low azide	Becton Dickinson	340 975
Staphylococcal Enterotoxin B (SEB)	Sigma	S-4881
Human Zytomegalovirus Lysate (CMV)	Advanced Biotechnologies Inc.	10-144-000
Tetanus Toxoid (TT)	Serum Institut Bern	
Brefeldin A (BFA)	Sigma	B-7651
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma	E-5134
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson	349 202
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka	41640
BSA	Sigma	B-4287
PBS	GibcoBRL	14190-094

2.10 Färbung von intrazellulären Zytokinen bei stimulierten Lymphozyten

Die mit Mitogenen oder Antigenen stimulierten und nachfolgend eingefrorenen Lymphozyten wurden durch Zugabe von 10ml BSA-Puffer aufgetaut und bei 4°C für 6 Minuten bei 400 g abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 6 ml PBS aufgenommen und auf je 2 FACS-Röhrchen verteilt, die zusätzlich zum Antigen mit IL-2 und IFN-□ beschriftet waren. Die Zellen wurden erneut bei 4°C für 5 Minuten bei 400 g abzentrifugiert (alle weiteren Zentrifugationsschritte bei diesen Bedingungen) und die Pellets mit 500 µl frisch angesetzter FACS Permeabilizing Solution gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wurden 2 ml BSA-Puffer zugegeben und die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit den Antikörpern versetzt: die Zellen, die unspezifisch mit PMA/Ionomycin stimuliert wurden, mit je 7.5 µl □CD3-PerCP, 7.5 µl □CD8-FITC, 1 µl □IL-2-PE oder □IFN-□-PE und das IL-2-Röhrchen zusätzlich mit 2.5 µl □TNF-□□APC. Die mit spezifischen Antigenen stimulierten

Zellen wurden mit je 7.5 μ l CD4-PerPC, 7.5 μ l \square IL-2-FITC oder \square IFN- \square FITC, 7.5 μ l CD69-PE und das IL-2-Röhrchen zusätzlich mit 2.5 μ l \square TNF- \square APC versetzt. Die Inkubation erfolgte für eine halbe Stunde im Kühlschrank. Die Zellen wurden dann mit 2 ml BSA-Puffer gewaschen, mit frisch angesetztem 1%igem PFA fixiert und nach kurzer Einwirkzeit am FACSCalibur™ gemessen. Bei den mitogen-stimulierten Zellen wurden soweit möglich 40.000 CD3⁺ T-Zellen im Lymphozytengate gemessen, bei den antigen-stimulierten 25.000 CD4⁺ T-Zellen.

BSA-Puffer

0.5% BSA

0.1% Azid

in PBS

10% PFA

10g Paraformaldehyd bei 72°C in 80ml PBS lösen

auf 100ml auffüllen

aliquotieren und bei -20°C lagern

1% PFA

10% PFA in PBS verdünnen

	Firma	Katalognummer
BSA	Sigma	B-4287
Natriumazid	Merck	1.06688.0100
Paraformaldehyd	Serva	31628
10x PBS	GibcoBRL	14200-067
FACS-Röhrchen	Falcon	35 2052
FACS™ Permeabilizing Solution	Becton Dickinson	340 457
\square CD3-PerCP	Becton Dickinson	347 344
\square CD8-FITC	Becton Dickinson	347 313
\square IL-2-PE	Pharmingen	18955A
\square IFN- \square PE	Pharmingen	18905A
\square TNF- \square -APC	Becton Dickinson	340 534
\square CD4-PerCP	Becton Dickinson	347 324
\square CD69-PE	Becton Dickinson	347 827
\square IL-2-FITC	Becton Dickinson	340 448
\square IFN- \square -FITC	Becton Dickinson	340 449

2.11 Färbung von HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit HLA-Tetrameren

Mit der Entwicklung von HLA-Tetrameren war es erstmals möglich, antigen-spezifische Zellen direkt sichtbar zu machen und zu quantifizieren. Tetramere bestehen aus vier rekombinant in *E. coli* produzierten Komplexen aus je einem HLA-Klasse I-Molekül, β 2-Mikroglobulin und einem synthetischen Peptid. Das *in vitro* gefaltete Tetramer entsteht durch die Biotinylierung des HLA-Moleküls und nachfolgender Kopplung durch die Zugabe von Streptavidin-PE. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Die von den HLA-Molekülen präsentierten Peptide werden von spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt und gebunden, und durch den Fluoreszenzfarbstoff werden diese Zellen im Durchflußzytometer sichtbar gemacht.

Tetramerfärbungen wurden sowohl an frischem EDTA-Blut als auch an aufgetauten PBMC durchgeführt. Bei der Färbung von Blut wurden 100 μ l in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit 2.5 μ l Tetramer versetzt. Es handelte sich dabei um einen HLA-A2-Tetramer, an das das Peptid SLYNTVATL aus p17 gebunden war. Nach einer Viertelstunde bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß (alle Inkubationen fanden unter diesen Bedingungen statt) wurden die Antikörper zur Charakterisierung der Tetramer-positiven Zellen zugegeben: 2.5 μ l \square CD3-APC und 7.5 μ l \square CD8-PerCP. Nach einer weiteren Viertelstunde Inkubation wurde 1 ml FACS Lysing Solution zugegeben und die Erythrozyten für 10 Minuten lysiert. Die Proben wurden dann mit 3 ml PBS gewaschen und bei 400 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 μ l 1% PFA fixiert und die Zellen nach kurzer Einwirkzeit am FACSCalibur gemessen. Es wurden soweit möglich mindestens 20.000 CD8⁺ T-Zellen im Lymphozytengate gemessen.

Für die Färbung von PBMCs wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml konisches Röhrchen mit 12 ml FACS-Puffer überführt. Nach Zentrifugation bei 4°C für 6 Minuten bei 400 g wurde das Pellet in einem kleinen Volumen FACS-Puffer aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung (0.2% in PBS) versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde 5 x 10⁶/ml eingestellt. Davon wurden 100 μ l mit 2.5 μ l Tetramer in einem FACS-Röhrchen gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubiert (alle weiteren Inkubationsschritte unter diesen Bedingungen, s.o.), dann die gleichen Antikörper wie bei der Färbung von Blut zugegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert.

Die Zellen wurden mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen und das Pellet in 150 μ l PBS aufgenommen. Unter ständigem Vortexen wurden dann 150 μ l 3% PFA zugegeben und die Zellen nach kurzer Einwirkzeit wie oben gemessen.

FACS-Puffer

2% FCS in PBS

10% PFA

10g Paraformaldehyd bei 72°C in 80ml PBS lösen

auf 100ml auffüllen

aliquotieren und bei -20°C lagern

1% und 3% PFA

10% PFA in PBS verdünnen

	Firma	Katalognummer
15ml konisches Röhrchen	Falcon	35 2096
FCS	HyClone	CH30160.03
Paraformaldehyd	Serva	31628
10x PBS	GibcoBRL	14200-067
FACS-Röhrchen	Falcon	35 2052
FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson	349 202
□CD3-APC	Becton Dickinson	340 440
□CD8-PerCP	Becton Dickinson	347 314
HLA-A2-Tetramer mit SLYNTVATL	Jörn Schmitz / Marcelo Kuroda	
Zählkammer	Neubauer	
Trypanblau-Lösung 0.4%	GibcoBRL	15250-061

2.12 Screening HIV-spezifischer CTL mittels ELISpot

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

Der HLA-Typ der jeweiligen Patienten war vor der Untersuchung bekannt, so daß die bis dahin bekannten optimalen Peptide eingesetzt wurden. Die Sequenzen der optimalen Peptide für den jeweiligen HLA-Typ wurden der Los Alamos Immunology Database entnommen ⁵².

2.12.1 Beschichten der Platten

Für die ELISpots wurden 96-Well-Filterplatten mit dem □-IFN-□-Antikörper 1-DK1 (dem „ersten“ oder sogenannten „Fang“(capture)-Antikörper) beschichtet. Dazu wurde der

Antikörper 1:2000 in PBS verdünnt (Endkonzentration 0.5 $\mu\text{g/ml}$) und je 100 μl in die Wells verteilt. Die Platten wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert und dort gelagert; solange keine Verdunstung auftrat waren sie für einige Wochen haltbar.

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

2.12.2 Auftauen der Zellen

PBMC oder LMNC wurden bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml-Röhrchen mit 12 ml R10 überführt. Die Einfrierröhrchen wurden mit 1 ml R10 gewaschen. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 1500 Upm abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Pellets wurden in 10 ml 37°C warmem R10 resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Pellets erneut in 10 ml warmem R10 aufgenommen und für einige Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Durch diese Vorinkubation wurden beim darauffolgenden Zählen der Zellen nur diejenigen berücksichtigt, die mit großer Wahrscheinlichkeit die Inkubation mit Peptid überleben würden. Die Zellen wurden vor dem Zählen 1:10 in PBS verdünnt und mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellzahl wurde dann auf $1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt.

R10

RPMI

10% FCS

1:100 Hepes-Puffer

1:100 PenStrep

	Firma	Katalognummer
15ml Röhrchen	Falcon	35 2096
RPMI	GibcoBRL	21875-034
FCS	HyClone	CH30160.03

Hepes-Puffer 1M	GibcoBRL	15630-056
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL	15070-063
Trypanblau-Lösung 0.4%	GibcoBRL	15250-061

2.12.3 Vorbereiten der Platte

Um Verwechslungen auszuschließen und das Pipettieren zu erleichtern wurden die Platten und ihre Deckel unterteilt und beschriftet. Die Platten wurden mit einer elektronischen Multi-kanalpipette mit 200 μ l PBS / 1% FCS pro Well sechsmal gewaschen. Dies erfolgte durch Befüllen und nachfolgendes Ausschlagen der Platte. Nach dem letzten Ausschlagen wurden die Wells mit 30 μ l R10 befüllt, um ein Austrocknen zu verhindern.

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

	Firma	Katalognummer
Peptide 200 μ g/ml	MGH	nicht käuflich
PHA , 25 μ g/ml in R10	Sigma	L-9132

2.12.4 Farbreaktion

Die Platten wurden nach der Inkubation wie oben sechsmal mit PBS gewaschen und mit 100 μ l des zweiten, biotinylierten \square -IFN- \square -Antikörpers 7-B6-1 (1:2000 in PBS verdünnt, Endkonzentration 0.5 μ g/ml) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer bis anderthalb Stunden wurde die Platte erneut sechsmal mit PBS gewaschen und mit 100 μ l 1:2000 in PBS verdünnter Streptavidin-Phosphatase im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 45 Minuten wurde die Platte sechsmal gewaschen und 100 μ l der Färbelösung zugegeben. Diese wurde frisch mit 1:100 NBT und 1:100 BCIP in Tris-Puffer (s.u.) angesetzt. Die Farbreaktion lief bei Raumtemperatur für ca. 10 bis 20 Minuten, bis die sich entwickelnden Punkte dunkelblau geworden waren. Die Platte wurde dann ausgeschlagen und mit 200 μ l PBS / Tween inkubiert. Nach 10 Minuten wurde die Platte unter fließendem Wasser gründlich abgespült und getrocknet. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln, um ein Verblässen der Punkte zu verhindern.

Tris-Puffer pH9.5

0.1M Tris

0.5mM MgCl₂·6H₂O**PBS /Tween**

0.05% Tween20 in PBS

BCIP

15mg BCIP in 1ml DMF

NBT

30mg NBT in 1ml 70% DMF

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

2.13 Stimulation von CTL zur Produktion von IFN- γ

Um die IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Peptiden genauer zu quantifizieren wurden diese mit Brefeldin A inkubiert und im Durchflußzytometer analysiert. Die Zellen wurden wie für ELISpots aufgetaut und eine bis vier Stunden vorinkubiert (s. 2.12.2). Vor dem Ansetzen wurden sie gezählt und auf 1x10⁶/ml eingestellt. Als Antigen wurden die Peptide ausgewählt, die im ELISpot die stärksten Signale gegeben hatten. Je 1 ml Zellsuspension wurde in eine 24-Well-Platte gegeben und mit je 1 μ l α CD28 und α CD49d versetzt. Dann wurden 20 μ l Peptid zugegeben und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Negativkontrolle wurden nur Zellen und Antikörper gegeben, zur Positivkontrolle zusätzlich 20 μ l PHA. Nach einer Stunde wurden 10 μ l Brefeldin A zugegeben und die Platten weiterinkubiert. Nach 5 bis 6 Stunden wurden die Platten über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

	Firma	Katalognummer
24well-Platte	Nunc	143982
□CD28	Becton Dickinson	340975
□CD49d	Becton Dickinson	340976
Brefeldin A (BFA) 1mg/ml	Sigma	B-7651
PHA , 25µg/ml in R10	Sigma	L-9132

2.14 Färbung von intrazellulärem IFN-□ nach Stimulation (intracellular cytokine staining, ICS)

Stimulierte Zellen wurden am Tag nach der Stimulation gefärbt. Die Zellen wurden mit einer 1 ml-Pipette resuspendiert und in FACS-Röhrchen übertragen. Die Wells wurden mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und dieser zu den Zellen gegeben. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1500 Upm und 4°C wurden die Zellen einmal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und mit je 3 µl □CD8-PerCP und 0.7 µl □CD4-APC im Kühlschrank inkubiert. Nach einer halben Stunde wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 100 µl Fix/Perm Solution A versetzt. Die Fixierung erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen (die Zentrifugationsschritte ab hier aber bei 1700 Upm (500g)) und in 100µl Fix/Perm Solution B aufgenommen. Nach 15 Minuten Permeabilisierung bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden 15 µl □IFN-□FITC zugegeben und 30 Minuten im Kühlschrank weiterinkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 200 µl PBS aufgenommen und im FACS gemessen. Der PE-Kanal wurde als Kontrolle benutzt.

FACS-Puffer

1% FCS in PBS

	Firma	Katalognummer
FACS-Röhrchen	Falcon	35 2052
PBS	GibcoBRL	14190-094
FCS	HyClone	CH30160.03
□CD8-PerCP	Becton Dickinson	347 314
□CD4-APC	Becton Dickinson	340 443
Fix/Perm	Caltag	GAS004
□IFN-□FITC	Becton Dickinson	340 449

2.15 Bestimmung der proviralen DNA in PBMC (AMPLICOR HIV-1 DNA Monitor)

Alle benötigten Lösungen wurden vor der Benutzung auf Raumtemperatur gebracht. Alle Schritte wurden in unterschiedlichen Räumen durchgeführt, um Kontaminationen zu minimieren.

Die provirale DNA wurde aus gefrorenen PBMC und LNMC bestimmt, wobei alle Zeitpunkte eines Patienten parallel untersucht wurden. Alle Werte sind Mittelwerte aus Duplikaten. Die erhaltenen Werte wurden unter Berücksichtigung des aus durchflußzytometrischen Analysen der Blutprobe vom gleichen Zeitpunkt bekannten Anteils an CD4⁺ T-Zellen in DNA Kopien pro Million CD4⁺ T-Zellen umgerechnet. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß diese Werte nicht völlig korrekt sind, da sich in den Präparationen auch infizierte Monozyten oder Makrophagen befinden könnten, ist der zu erwartende Fehler gering und wird daher vernachlässigt

2.15.1 Lyse der PBMC

PBMC wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und in Sarstedt-Reaktionsgefäßen für 3 Minuten bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal in 1 ml „Wash Solution“ gewaschen. Zwei zusätzliche Röhrchen wurden mit je 25 µl Positiv- und Negativkontrolle gefüllt.

Der Lysispuffer wurde mit dem „inneren Quantitation Standard (QS)“ versetzt, so daß dieser in einer Endkonzentration von 30 Kopien/50 µl vorlag. Dazu wurde berechnet, wieviel Lysispuffer gebraucht wurde (400 µl für große Pellets, 300 µl oder weniger für kleine, 125 µl je Kontrolle) und die Konzentration des QS von 53 Kopien/µl mit einbezogen. Folgende Formel wurde verwendet:

$$\mu\text{l QS} = (\mu\text{l Lysispuffer}) \times (30 \text{ Kopien} / 50\mu\text{l}) / \text{Konzentration QS}$$

Die berechnete Menge Lysispuffer+QS wurde zu den Pellets oder Kontrollen gegeben und solange gevortext, bis die Pellets sich größtenteils gelöst hatten. Die Zellen wurden dann für eine halbe Stunde bei 60°C inkubiert. Nach 20 Minuten wurden die Röhrchen gegebenenfalls nochmals gevortext, falls das Pellet sich nicht völlig gelöst hatte. Dann wurde die Reaktion durch 30 Minuten Inkubation bei 95°C gestoppt. In dieser Zeit wurde die PCR vorbereitet.

	Firma	Katalognummer
Specimen Wash Solution	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
HIV-1 Buccal lysis reagent	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
HIV-1 DNA Monitor Quantitation Standard	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
HIV-1 DNA Monitor (-) Control	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
HIV-1 DNA Monitor (+) Control	Roche Molecular Systems	nicht käuflich

2.15.2 Amplifikation

Für die PCR wurden 100 μl „AMPLICOR HIV-1 Monitor Manganese Solution, version 1.5“ zu einem Röhrchen „AMPLICOR HIV-1 Monitor Master Mix, version 1.5“ gegeben und gemischt. Je 50 μl Mix werden pro Reaktion in ein PCR-Röhrchen gegeben, alle Ansätze ausser den Kontrollen werden in Duplikaten durchgeführt.

Nach der Inkubation bei 95°C wurden die Zellysate kurz abzentrifugiert, je 50 μl des Überstandes zu dem PCR-Mix gegeben und gemischt. Der Rest der Zellysate wurde bei 4°C bis zur DNA-Bestimmung aufbewahrt.

Die PCR wurde in einem GeneAmp PCR System 9600 durchgeführt. Die Reaktion startete mit 2 Minuten 50°C, dann 4 Zyklen mit 95°C, 52°C und 72°C für je 10 s, gefolgt von 26 Zyklen 90°C, 55°C und 72°C für je 10s. Abgeschlossen wurde sie mit 15 Minuten bei 72°C. Das gesamte Programm lief ca. eine Stunde.

Nach der Entnahme aus der PCR-Maschine wurden die Deckel vorsichtig entfernt, mit einer Multikanalpipette je 100 μl „MONITOR Denaturation Solution (1)“ zu den Proben gegeben und einige Male resuspendiert. Die denaturierten Proben wurden dann wieder verschlossen und über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

	Firma	Katalognummer
AMPLICOR HIV-1 Monitor Manganese Solution, version 1.5	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
AMPLICOR HIV-1 Monitor Master Mix, version 1.5	Roche Molecular Systems	nicht käuflich

MONITOR Denaturation Solution (1)	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
PCR-Röhrchen		
GeneAmp PCR System 9600	PerkinElmer	
Multikanalpipette		

2.15.3 Bestimmung der Gesamt-DNA-Konzentration

Während die PCR lief, wurde die DNA-Konzentration der Zellysate bestimmt. Dazu wurde eine Standardkurve mit Kalbsthymus-DNA erstellt:

Negativkontrolle

0.5 μ l DNA/400 μ l Färbepuffer = 125ng

1.0 μ l = 250ng

1.5 μ l = 375ng

2.0 μ l = 500ng

Von den lysierten Zellen wurden jeweils 2 μ l in 400 μ l Färbepuffer verdünnt, erfahrungsgemäß sollte diese Konzentration innerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve liegen. Die DNA-Verdünnungen wurden dann in einem Fluorometer bei 365 nm Anregung/458 nm Emission gemessen. In die Berechnung der Konzentrationen muß ein Faktor 2 mit einfließen, da die DNA der lysierten Zellen einzelsträngig vorliegt und daher nur die Hälfte des Farbstoffes binden kann.

Kalbsthymus-DNA

250 μ l H₂O zu 250 μ g Kalbsthymus-DNA

10xTNE Puffer

100mM Tris

10mM EDTA

2M NaCl

mit HCl auf pH7.4 einstellen

Hoechst 33258 Dye 1mg/ml Stock

10mg in 10ml H₂O

Färbepuffer

45ml H₂O

5ml 10xTNE

5 μ l Hoechst Dye Stock

	Firma	Katalognummer
Kalbsthymus-DNA	Amersham Pharmacia Biotech	80-6227-06
Hoechst 33258 Dye	Amersham Pharmacia Biotech	80-6226-87
Tris	Gibco BRL	15504-020
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma	E-5134

NaCl	Merck	1540.5000
HCl rauchend 37%	Merck	1.00314.1000

2.15.4 Detektion

Die angewärmten Lösungen wurden auf Präzipitate untersucht und gegebenenfalls diese bei 37°C gelöst. Das „AMPLICOR 10xWash-Concentrate“ wurde für den ELISA-Washer mit destilliertem Wasser verdünnt. Die warme „HIV-1 Monitor Microwell Plate (HIV-1 MWP)“ wurde aus der Folie genommen und alle Wells mit 100 µl „Monitor Hybridization Buffer (2)“ befüllt. Je 25 µl der denaturierten Proben aus dem Kühlschrank wurden in Reihe A der HIV-1 MWP pipettiert und zehnmal resuspendiert. Je 25 µl wurden dann in die nächste Reihe pipettiert und resuspendiert, bis Reihe F erreicht ist. Von hier wurden 25 µl entnommen und verworfen. Weitere 25 µl der denaturierten Proben wurden dann in Reihe G pipettiert und in Reihe H verdünnt. Reihe A bis F enthalten Sequenzen, die homolog zu HIV sind, während Reihe G und H homologe Sequenzen zum QS enthalten. Die MWP wurde geschlossen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurde sie mit einem ELISA-Washer fünfmal mit dem höchstmöglichen Volumen gewaschen, die Waschlösung sollte zwischendurch für 30s einwirken können. Die MWP wurde nach dem Trockenklopfen mit je 100 µl „Avidin-HRP Conjugate (3)“ versetzt und für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde die Substratlösung hergestellt: Pro Platte wurden 12 ml „Substrate A(4A)“ mit 3 ml „Substrate B(4B)“ versetzt und gemischt. Die Substratlösung wurde bis zur Benutzung im Dunkeln aufbewahrt. Die MWP wurde wie oben gewaschen, mit je 100 µl Substratlösung versetzt und im Dunkeln inkubiert. Nach 10 Minuten wurden 100µl „Stop Reagent (5)“ zugegeben und die OD bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

Die Konzentration der HIV-DNA wird durch Vergleich mit der QS bestimmt und mit der ermittelten Gesamt-DNA-Konzentration auf Kopien pro µg DNA bzw. Kopien/Million PBMC berechnet (1 µg Gesamt-DNA entspricht 150.000 Zellen).

	Firma	Katalognummer
AMPLICOR 10xWash-Concentrate	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
HIV-1 Monitor Microwell Plate	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
Monitor Hybridization Buffer (2)	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
Avidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (3)	Roche Molecular Systems	nicht käuflich

Substrate A (4A)	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
Substrate B (4B)	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
Stop Reagent (5)	Roche Molecular Systems	nicht käuflich
ELISA-Washer		
ELISA-Reader 450nm		

2.16 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Daten wurden zwei Programme eingesetzt: GraphPad Prism 3.0c für Macintosh und CSF Statistika 6.0 für PCs. Multivariable Analysen über die Zeit wurden mit Anova berechnet, P-Werte <0.05 wurden als signifikant angesehen. Für den Vergleich zwischen Blut und Lymphknoten wurde der Wilcoxon matched pairs Test für nichtparametrische Verteilungen eingesetzt. Dieser Test erlaubt gleichzeitig zu entscheiden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gibt, und ob die Werte beider Gruppen miteinander korrelieren. Für den Vergleich zwischen viraler RNA und proviraler DNA Werte wurde der Spearman rank Test eingesetzt, ebenso für Korrelationen zwischen der Plasmavirämie und immunologischen Parametern. Werte für die Plasmavirämie, die unterhalb der Nachweisgrenze des eingesetzten Tests lagen (25 RNA-Kopien/ml), wurden als 24 RNA-Kopien/ml angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 ARCHY

Von 28 teilnehmenden Patienten haben 20 das festgelegte Studienende von 12 Monaten erreicht, einer wurde bis Monat 9 verfolgt. Die anderen sieben Patienten schieden nach weniger als einem halben Jahr aus. Für die Analyse der Lymphozytensubpopulationen in dieser Arbeit wurden nur die Daten der Patienten verwendet, die bis mindestens Monat 9 nachverfolgt wurden. Es gehen daher nicht alle Daten der Gesamtstudie in diese Auswertungen ein. Auch für die aus der detaillierten Analyse ausgeschlossenen Patienten liegen jedoch Daten für die Plasmavirämie und die absoluten T-Zell-Zahlen vor, die zu jedem Probenzeitpunkt frisch gemessen wurden. Diese wurden in den jeweiligen Abschnitten in die Analyse des Gesamtkollektivs eingeschlossen.

Vorwegzunehmen ist, daß viele der untersuchten Parameter deutliche Veränderungen im Verlauf der Therapie zeigten. Es konnte jedoch in der ausführlich untersuchten Subgruppe mit einer Ausnahme bei keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen der mit Hydroxyurea (HU) behandelten Gruppe und der, die ausschließlich die Dreifachkombination bekam, festgestellt werden. Es wird daher bei der Darstellung der einzelnen Verläufe nicht mehr explizit darauf hingewiesen.

3.1.1 Viruslast im Verlauf der Therapie

Die Plasmaviruslast wurde mit dem Roche AMPLICOR HIV-1 MONITOR[®] Test, Version 1.5 entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA) bestimmt. Die von diesem Test vorgesehene Nachweisgrenze von 50 RNA-Kopien/ml wurde durch Erhöhung des eingesetzten Plasmavolumens auf 1 ml auf 25 RNA-Kopien/ml gesenkt. Werte unterhalb dieses Detektionslimits wurden als 24 Kopien/ml kalkuliert.

Der Verlauf der Plasmaviruslast unter Therapie ist in Abb. 3.1.1.1 dargestellt. Aufgetragen sind in blau die Mittelwerte mit Standardfehler von 11 Patienten, die in den Therapiearm mit HU randomisiert wurden, und in grün die Mittelwerte der Patienten, die nur mit der Dreifachkombination behandelt wurden.

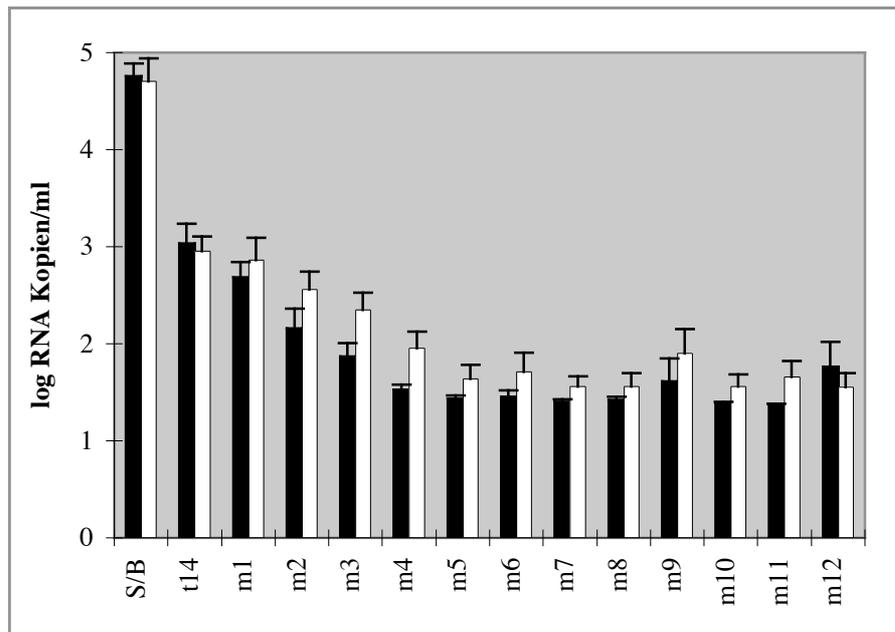


Abb. 3.1.1.1 Plasmaviruslast im Verlauf der Therapie. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

Der Abfall der Plasmavirusbeladung über die Zeit war in beiden Gruppen hochsignifikant ($p=10^{-6}$ bis Monat 6). Sie sank von 4.76 (+HU) bzw. 4.70 log RNA Kopien/ml (-HU) um 3 Logstufen auf 1.76 bzw. 1.55 log RNA Kopien/ml. Deutlich zu erkennen ist die rasche, biphasische Kinetik: nach nur 14 Tagen ist die Viruslast im Mittel um über eineinhalb Logstufen gefallen, um bis Monat 5 langsam bis auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze zu sinken und im weiteren Verlauf zu stagnieren (Abb. 3.1.1.1). Bei jeweils vier Patienten in beiden Gruppen gelang es nicht, die Viruslast dauerhaft auf Werte unter der Nachweisgrenze zu senken, was sich im leichten Anstieg der Mittelwerte ab Monat 9 bemerkbar macht.

Der zusätzliche antivirale Effekt von HU deutet sich graphisch zwar an, ist aber wie bereits erwähnt in der untersuchten Patientensubgruppe nicht signifikant. Betrachtet man jedoch das Gesamtkollektiv, ist die Plasmavirämie bis Monat 6 (also während der Einnahme von HU) in der Gruppe ohne HU signifikant höher ($p=0.015$) als in der Gruppe mit HU (ohne Abb.).

3.1.2 Provirale DNA

Neben der Plasmaviruslast wurde auch der Verlauf der proviralen DNA in PBMC und LMNC untersucht. Latent infizierte $CD4^+$ T-Zellen gelten als Reservoir für das Virus und daher als mögliche Ausgangsquelle für den Wiederanstieg der Plasmaviruslast bei Therapiepausen oder

–abbrüchen bei Patienten, deren HIV-RNA im Plasma über längere Zeit nicht mehr nachweisbar war. Die Reduktion dieses Reservoirs ist daher eines der Ziele der Therapie. Zusätzlich könnte die Analyse der proviralen DNA Hinweise auf eine residuelle virale Replikation geben, die bei Plasmaviruslasten unterhalb der Nachweisgrenze nicht detektiert werden kann.

Unter Therapie kam es bei allen Patienten zu einer signifikanten Abnahme ($p < 0.05$) der proviralen DNA um im Mittel 0.97 Logstufen (Abb. 3.1.2.1) im Blut. Sie verlief in beiden Gruppen parallel. Die Werte wurden als DNA-Kopien/Million $CD4^+$ T-Zellen angegeben (s. S. 45).

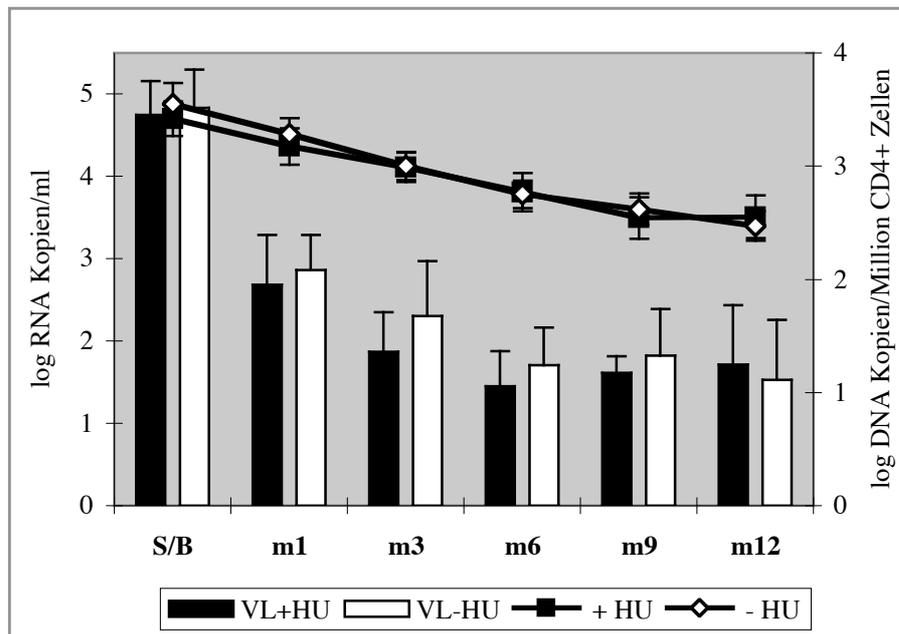


Abb. 3.1.2.1: Plasmaviruslast und provirale DNA in PBMC im Verlauf der Therapie. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

Um zu untersuchen, ob die Höhe der Plasmavirämie einen direkten Einfluß auf die Größe des latenten Reservoirs hat, wurde die Korrelation zwischen RNA-Kopien/ml und DNA-Kopien/ 10^6 $CD4^+$ T-Zellen analysiert.

Sowohl zu Baseline als auch über alle späteren Zeitpunkte hinweg korrelierte die Plasmavirämie deutlich ($p < 0.0001$) mit dem Anteil an Provirus-Kopien pro Million $CD4^+$ T-Zellen (Abb. 3.1.2.2).

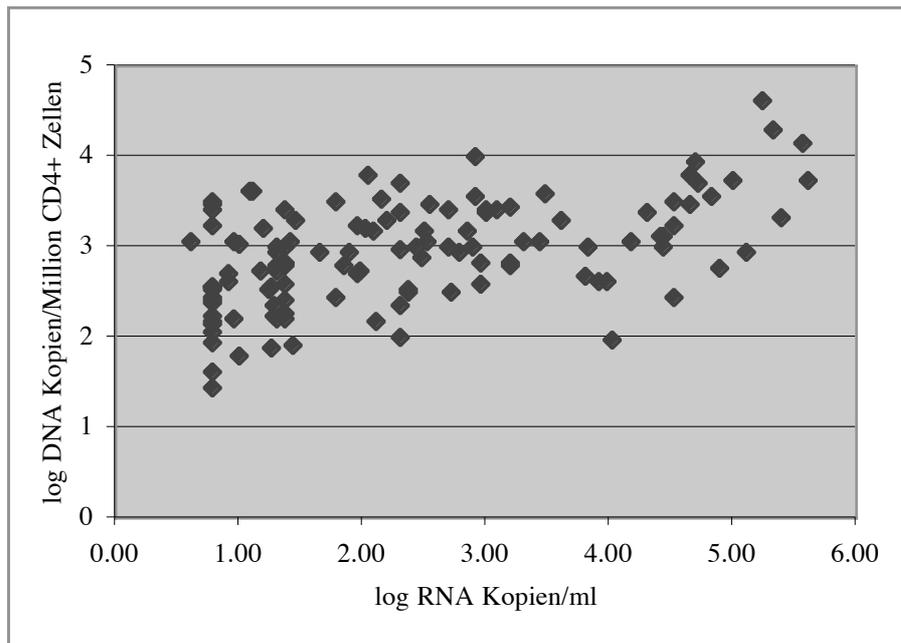


Abb. 3.1.2.2: Korrelation zwischen der Plasmavirämie und der proviralen DNA

Im Lymphknoten nahm die provirale DNA im Mittel um 0.77 Logstufen ab, auch hier war der Verlauf in beiden Gruppen gleich (Abb. 3.1.2.3).

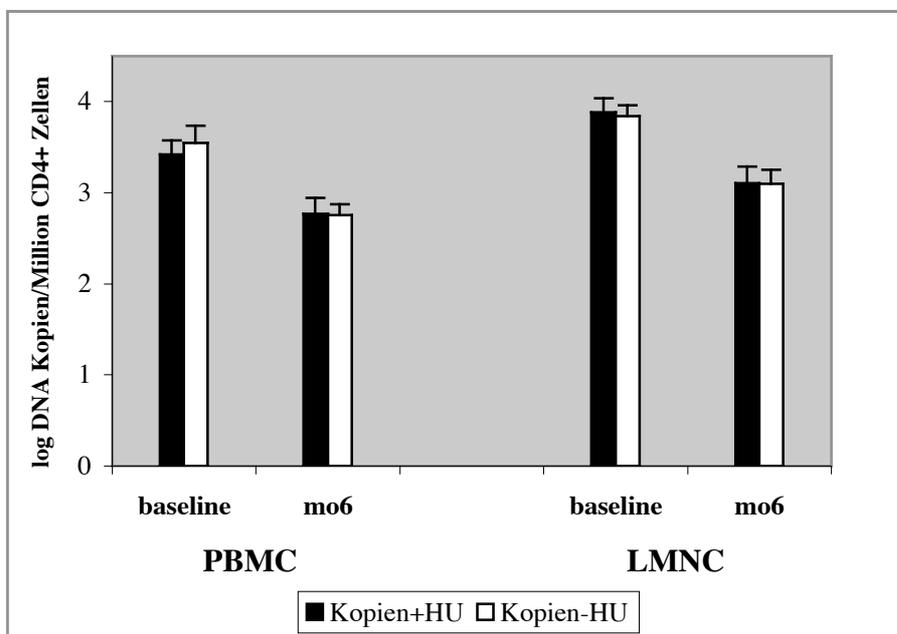


Abb. 3.1.2.3: Verlauf der proviralen DNA in CD4⁺ T-Zellen aus PBMC und Lymphknoten unter Therapie. Mittelwerte mit Standardfehlern von 9 Patienten mit (schwarz) und 4 Patienten ohne HU (weiß).

Der Vergleich zwischen der proviralen DNA in Blut und Lymphknoten zeigte, daß die Werte in beiden Kompartimenten signifikant miteinander verknüpft waren ($p < 0.0001$), jedoch lagen sie im Lymphknoten signifikant höher als im Blut ($p = 0.0002$).

3.1.3 T-Zellzahlen

Die aktuellen T-Zellzahlen wurden beim Eintreffen des Materials aus frischem EDTA-Blut mit dem Trucount-System von Becton Dickinson gemessen. Da die T-Zellen hierfür nicht aufgereinigt wurden, entsprechen die Werte den tatsächlichen Verhältnissen *in vivo*.

Die CD4⁺ T-Zellzahl lag zu Baseline bei 420 Zellen/ μl (+HU) bzw. 413 Zellen/ μl (-HU), dabei schwankten die Zahlen zwischen 204 und 695 Zellen/ μl , es wurden also sowohl Patienten mit deutlich fortgeschrittener HIV-Infektion eingeschlossen als auch solche, deren T-Helfer-Zellen im Normalbereich lagen. Die CD4⁺ T-Zellzahl stieg im Verlauf der Therapie in beiden Gruppen signifikant an ($p = 0.028$). Bis Monat 6 gab es einen Vorteil für die Patienten ohne HU, der aber nur bei Betrachtung des Gesamtkollektivs Signifikanz erreichte ($p = 0.046$).

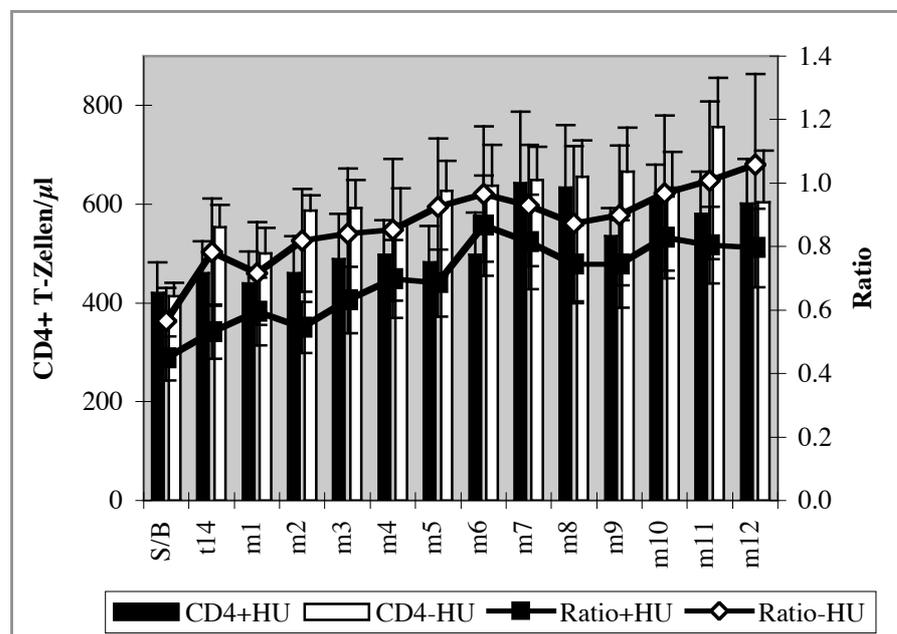


Abb. 3.1.3.1: CD4⁺ T-Zellzahlen und CD4⁺/CD8⁺-Ratio im Blut im Verlauf der Therapie. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

Mit dem Absetzen der Einnahme von HU nach 6 Monaten kam es bei diesen Patienten zu einem raschen Anstieg der CD4⁺ T-Zellzahlen, so daß sie zum Ende der Studie an Monat 12

mit 601 Zellen/ μl (+HU) bzw. 604 Zellen/ μl (-HU) in beiden Gruppen angeglichen waren (Abb. 3.1.3.1).

Es kam zu keinem signifikanten Abfall der CD8⁺ T-Zellzahl, die von 992 (+HU) bzw. 1009 Zellen/ μl (-HU) auf 830 bzw. 757 Zellen/ μl sanken (ohne Abb.), und auch der Anstieg der CD4⁺/CD8⁺-Ratio unter Therapie von 0.45 (+HU) bzw. 0.57 (-HU) auf 0.80 bzw. 1.06 war zwar deutlich, aber nicht signifikant (Abb. 3.1.3.1).

Im Lymphknoten kam es im Verlauf der Therapie sowohl bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu deutlichen Veränderungen. Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen stieg signifikant von 50.11% (+HU) bzw. 54.01% (-HU) auf 65.04% bzw. 69.06% ($p=0.007$), während die CD8⁺ T-Zellen von 47.85% (+HU) bzw. 43.11% (-HU) auf 33.72% bzw. 28.70% abfielen ($p=0.007$, ohne Abb.). Der Verlauf der Ratio in Abb. 3.1.3.2 verdeutlicht den positiven Einfluß der Therapie und gibt die unterschiedlichen Anteile der Subpopulationen in Blut und lymphatischem Gewebe wieder.

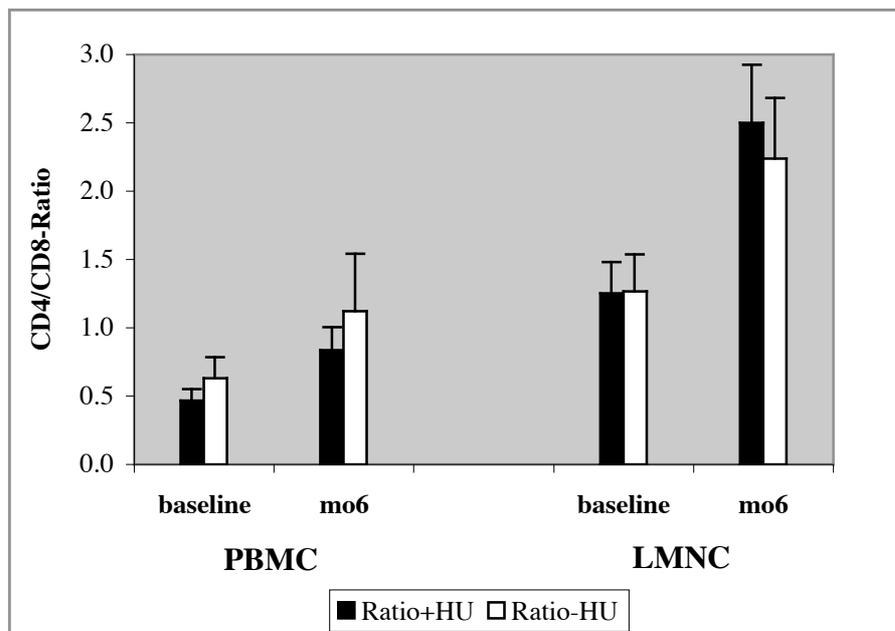


Abb. 3.1.3.2: Verlauf der CD4⁺/CD8⁺-Ratio in Blut und Lymphknoten unter Therapie. Mittelwerte mit Standardfehlern von 10 Patienten mit (schwarz) und 5 Patienten ohne Hydroxyurea (weiß).

Der Wilcoxon matched pairs Test zwischen Blut und Lymphknoten ergab, daß die CD4⁺/CD8⁺-Ratio trotz der deutlichen niedrigeren Werte im Blut ($p<0.0001$) signifikant in beiden Kompartimenten korrelierte ($p<0.0001$).

3.1.4 Naïve und Memory-T-Zellen

Bei den CD4⁺ T-Zellen kam es unter Therapie zu keinen auffälligen Änderungen der relativen Anteile von naïven, CD45RA⁺- und der CD45R0⁺ Memory-T-Zellen (Abb. 3.1.4.1).

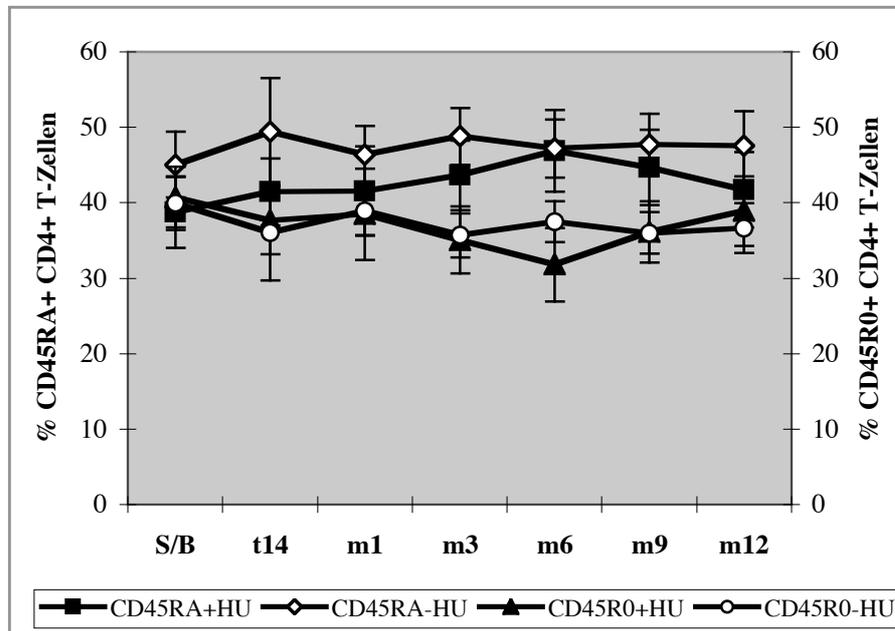


Abb. 3.1.4.1: Naïve und Memory-CD4⁺ T-Zellen im Blut im Verlauf der Therapie. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

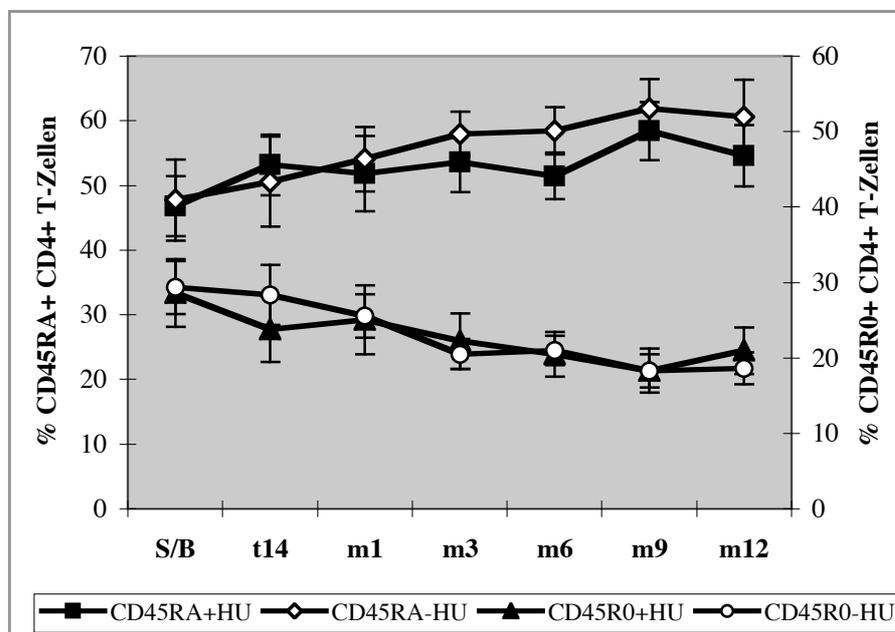


Abb. 3.1.4.2: Naïve und Memory-CD8⁺ T-Zellen im Blut im Verlauf der Therapie. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

Über den gesamten untersuchten Zeitraum waren diese beiden Subpopulationen ähnlich wie bei Normalkontrollen verteilt, die 42.3% CD45RA⁺ und 38.2% CD45R0⁺ CD4⁺ T-Zellen aufwiesen.

Im Gegensatz dazu fielen die CD45R0⁺ CD8⁺ T-Zellen im Verlauf der Therapie von 28.61% (+HU) bzw. 29.33% (-HU) signifikant auf 20.97% bzw. 18.62% ab ($p=0.014$), während es zu einem Anstieg der CD45RA⁺ CD8⁺ T-Zellen von 46.78% (+HU) bzw. 47.75% (-HU) auf 54.61% bzw. 60.62% kam ($p=0.09$, Abb. 3.1.4.2). Die Werte ähneln also nach 12 Monaten Therapie denen von Normalkontrollen mit 63.2% CD45RA⁺ CD8⁺ T-Zellen und 14.8% CD45R0⁺ CD8⁺ T-Zellen.

Der Verlauf der naïven und Memory-CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten bestätigte die Befunde im Blut, während sich im CD4⁺ T-Zellkompartiment eine Umkehrung dieses Verlaufs andeutete: der Anteil der naïven Zellen schien im Lymphknoten unter Therapie abzunehmen, während die CD45R0⁺ CD4⁺ T-Zellen zunahm (Abb. 3.1.4.3). Die Werte lagen jedoch eng beieinander und entsprachen den Schwankungen, die auf CD4⁺ T-Zellen im Blut beobachtet wurden.

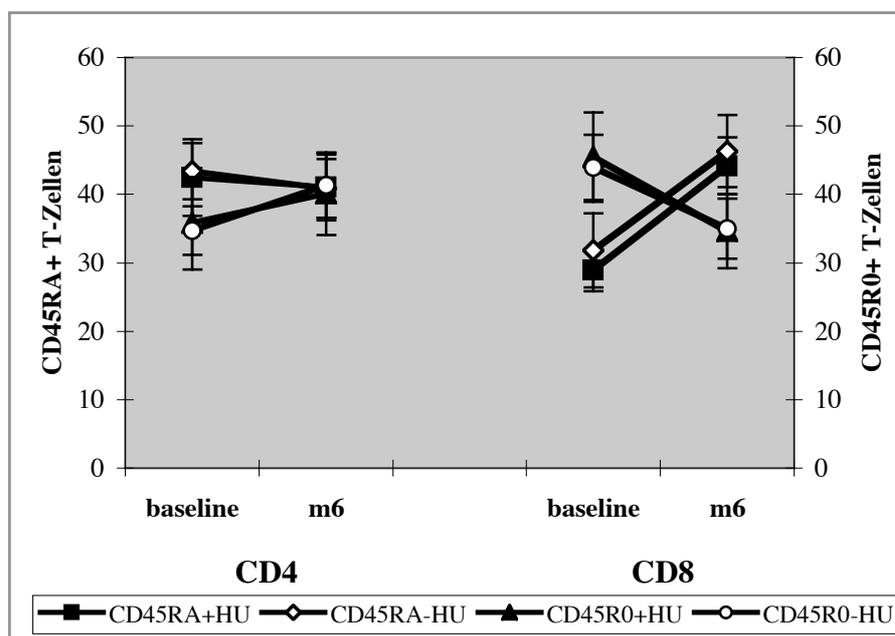


Abb. 3.1.4.3: Naïve und Memory-CD4⁺ und -CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten im Verlauf der Therapie. Mittelwerte mit Standardfehlern von 10 Patienten mit (schwarz) und 8 Patienten ohne HU (weiß).

Bei CD4⁺ T-Zellen zeigte sich außerdem, daß die CD45RA⁺ und CD45R0⁺ Subpopulationen in Blut und Lymphknoten gleichmäßig verteilt waren ($p=0.77$ bzw. $p=0.62$) und signifikant miteinander korrelierten ($p<0.0001$). Im Gegensatz dazu waren deutlich mehr CD45R0⁺

CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten ($p=0.0006$) und dementsprechend mehr CD45RA⁺ CD8⁺ T-Zellen im Blut ($p=0.0011$), und während letztere in beiden Kompartimenten korrelierten ($p=0.0058$), gab es keine signifikante Korrelation zwischen den CD45RO⁺ CD8⁺ T-Zellen in Blut und Lymphknoten ($p=0.12$).

3.1.5 Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Eines der Hauptmerkmale der HIV-Infektion ist der auch in der chronischen Phase erhöhte Umsatz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Dieser wird anhand der verstärkten Expression des nukleären Antigens Ki-67 gemessen, das in allen Phasen des Zellzyklus ausser der G₀-Phase exprimiert wird^{63, 158} und somit charakteristisch für proliferierende Zellen ist.

Abb. 3.1.5.1 zeigt den Verlauf des Anteils Ki-67⁺CD4⁺ T-Zellen unter Therapie. Zu Baseline war mit 8.27% (+HU) bzw. 6.25% (-HU) ein gegenüber Normalkontrollen (1.6%) deutlich erhöhter Anteil an T-Helfer-Zellen im Zellzyklus. Dieser sank in beiden untersuchten Gruppen bis Monat 6 parallel zur Viruslast auf 3.07% bzw. 3.65% und stieg gegen Studienende mit der leicht zunehmenden Plasmavirämie wieder an. Der Abfall war trotz der ab Monat 3 leicht ansteigenden Werte in beiden Gruppen hochsignifikant ($p<10^{-6}$).

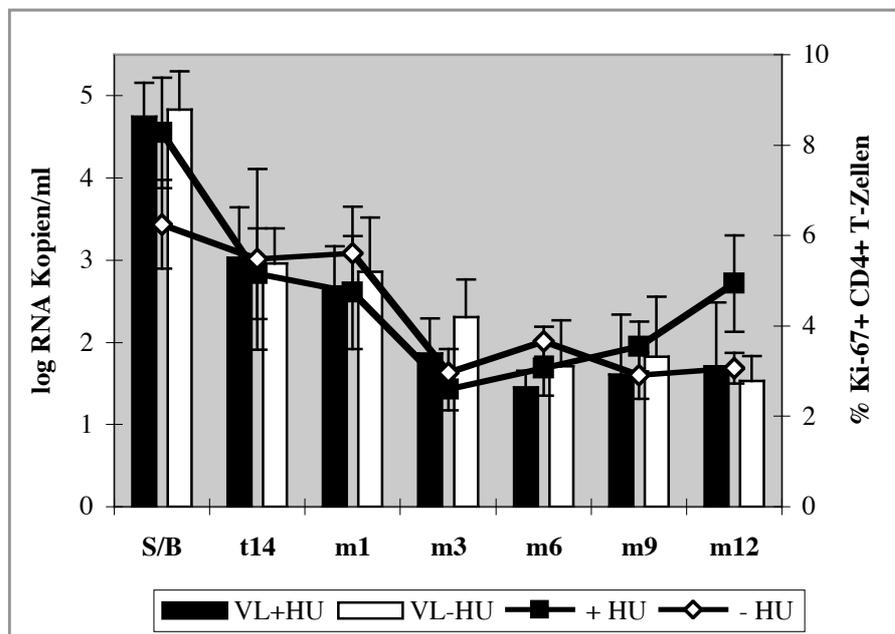


Abb. 3.1.5.1: Proliferation von CD4⁺ T-Zellen im Blut. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

Obwohl der Anteil an proliferierenden $CD4^+$ T-Zellen in beiden Therapiearmen ähnlich war, war die Abnahme der Anzahl (in Zellen/ μ l) $Ki-67^+CD4^+$ T-Zellen bei Patienten, die HU erhalten hatten, bis Monat 6 signifikant höher ($p=0.03$).

Da der Verlauf des Anteils $Ki-67^+$ Zellen der Plasmavirämie folgte, wurde untersucht, ob beide Parameter miteinander korrelieren (Abb. 3.1.5.2).

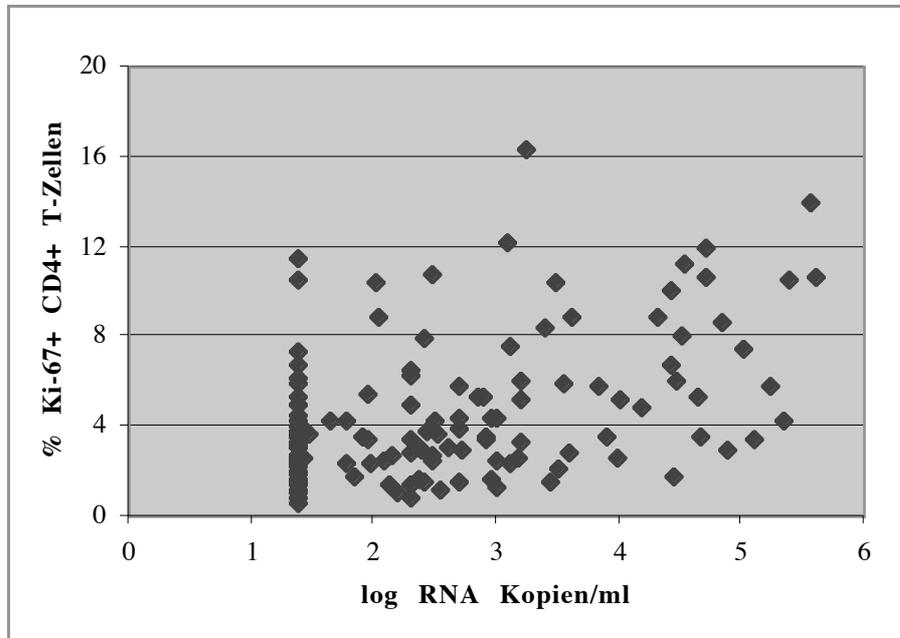


Abb. 3.1.5.2: Korrelation zwischen der Plasmavirämie und dem Anteil an proliferierenden $CD4^+$ T-Zellen

Obwohl alle Werte (einschließlich der Viruslasten <25) in die Auswertung eingeschlossen wurden, war die Korrelation zwischen der Plasmavirämie und dem Anteil an proliferierenden $CD4^+$ T-Zellen hochsignifikant ($p<0.0001$).

Der Anteil an $Ki-67^+CD8^+$ T-Zellen war zu Baseline mit 14.96% (-HU) bzw. 10.72% (+HU) noch deutlicher erhöht als bei $CD4^+$ T-Zellen und Normalkontrollen (1.4%). Auch hier verlief die hochsignifikante Abnahme proliferierender Zellen ($p<10^{-6}$) parallel zur Viruslast auf 3.34% bzw. 4.83% zu Monat 6, und gegen Studienende kam es analog zur steigenden Plasmavirämie zu einem leichten Anstieg der Proliferation (Abb. 3.1.5.3).

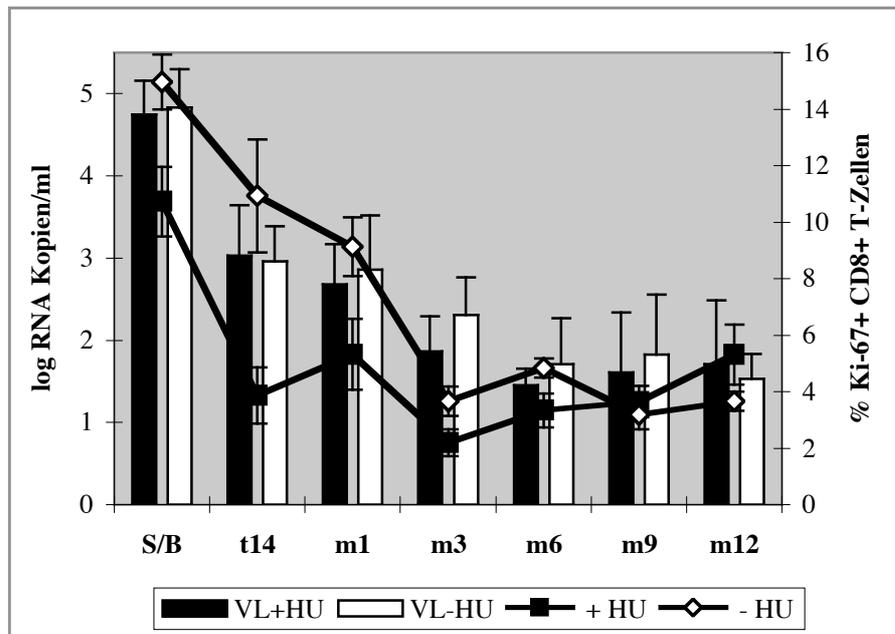


Abb. 3.1.5.3: Proliferation von CD8⁺ T-Zellen im Blut. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

Die Korrelation zwischen Plasmavirämie und proliferierenden Zellen war auch bei dieser Subpopulation hochsignifikant (Abb. 3.1.5.4, $p < 0.0001$).

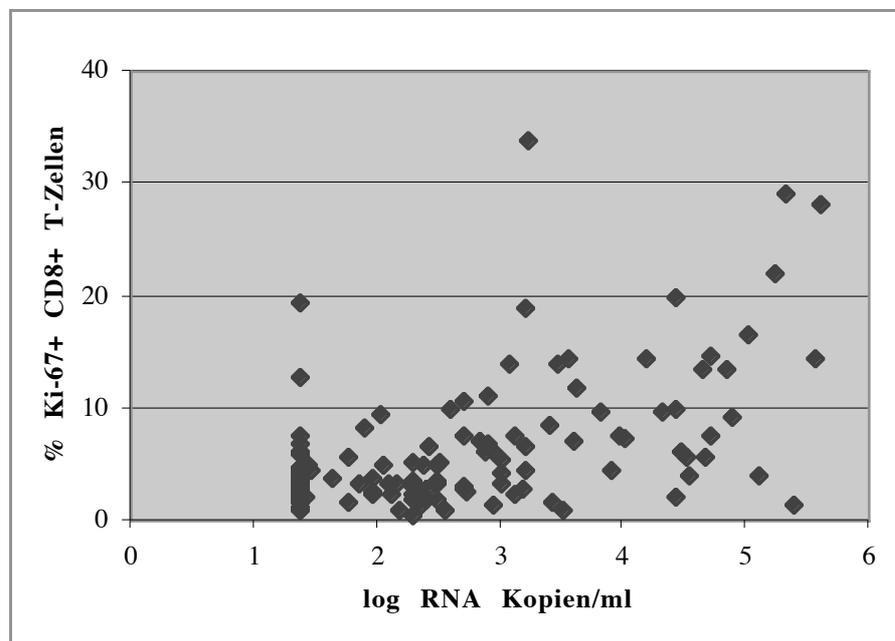


Abb. 3.1.5.4: Korrelation zwischen Plasmavirämie und dem Anteil an proliferierenden CD8⁺ T-Zellen

Der Anteil an proliferierenden Zellen im Lymphknoten spiegelte den im Blut wider: der zu Baseline mit 4.09% (+HU) bzw. 3.76% (-HU) erhöhte Anteil an Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen nahm

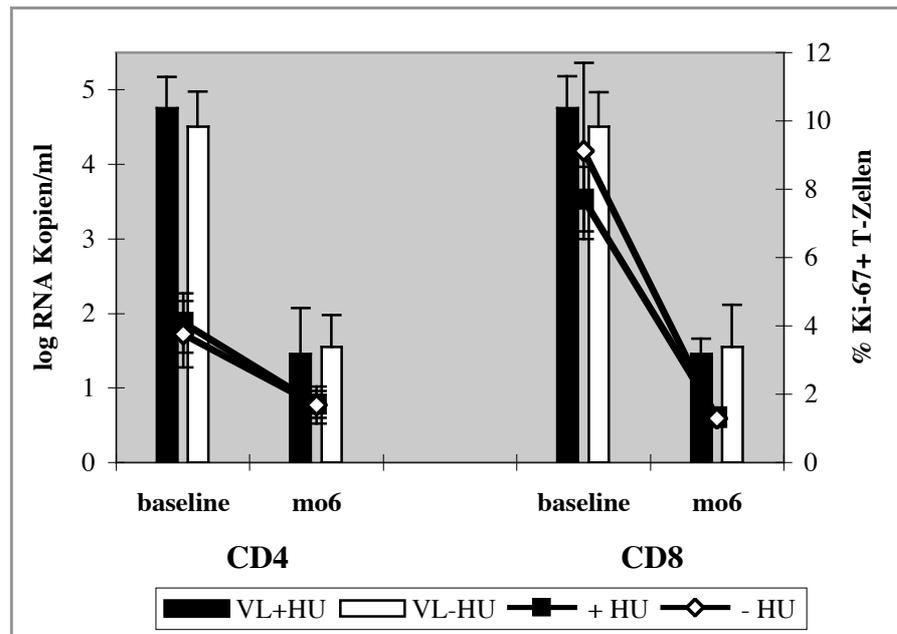


Abb. 3.1.5.5: Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten. Mittelwerte mit Standardfehlern von 10 Patienten mit (schwarz) und 8 Patienten ohne HU (weiß).

im Verlauf der Therapie auf 1.70% bzw. 1.68% ab und lag somit sogar unter dem Wert für HIV-negative Kontrolllymphknoten mit 2.40%. Die Werte korrelierten dabei signifikant zwischen Blut und Lymphknoten ($p=0.0002$). Auf CD8⁺ T-Zellen nahm die Expression von 7.71% (+HU) bzw. 9.12% (-HU) parallel zur Plasmavirämie auf 1.33% bzw. 1.29% ab und lag somit ebenso leicht unterhalb des Kontrollwertes mit 1.86% (Abb. 3.1.5.5), die Werte korrelierten auch hier zwischen LNMC und PBMC ($p<0.0001$). Insgesamt war der Anteil proliferierender Zellen im Lymphknoten signifikant niedriger als der im Blut ($p<0.0001$ für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen).

3.1.6 Späte Aktivierungsmarker

Zusätzlich zur Proliferation wurden mehrere Aktivierungsmarker im Verlauf der Therapie untersucht. Die Expression des spät im Verlauf der Aktivierung eines Lymphozyten exprimierten Markers HLA-DR fiel auf CD4⁺ T-Zellen von baseline 21.08% (+HU) bzw. 13.29% (-HU) auf 8.40% bzw. 8.63% ($p=0.01$), um nachfolgend parallel zur Viruslast wieder leicht anzusteigen (Abb. 3.1.6.1). Sie erreichten somit nicht ganz den Wert von Normalkontrollen (5.8%). Die Korrelation des Anteils HLA-DR⁺ CD4⁺ T-Zellen mit der Plasmavirämie war hochsignifikant ($p<0.0001$).

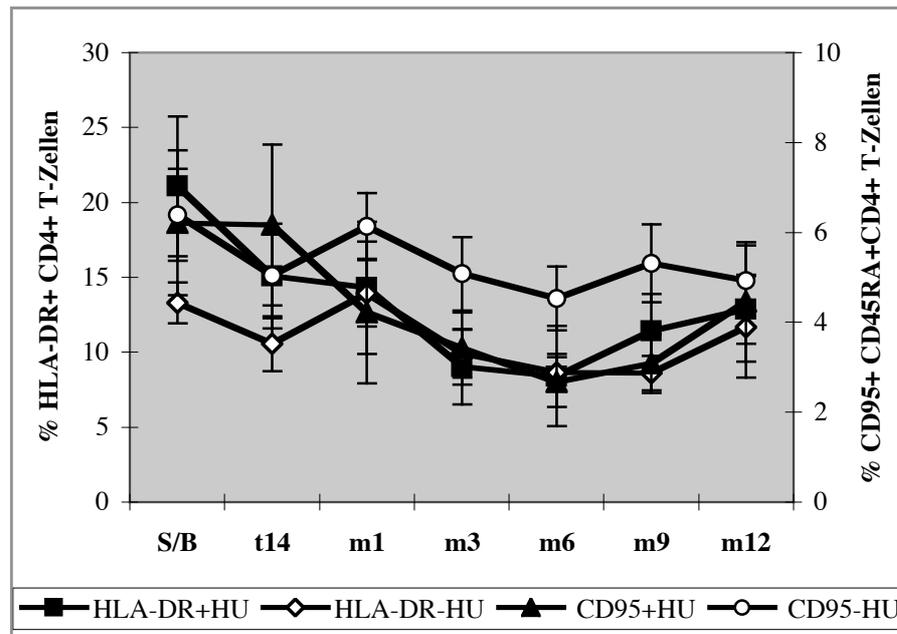


Abb. 3.1.6.1: Aktivierungsmarker auf CD4⁺ T-Zellen im Blut. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

Die Expression des Apoptosemarkers CD95 (Fas) war auf CD45RA⁺ und CD45R0⁺ Zellen extrem unterschiedlich: auf CD45RA⁺ CD4⁺ T-Zellen lag sie im Mittel deutlich unter 10%, während sie auf CD45R0⁺ CD4⁺ T-Zellen bei über 90% lag. Da es bei den Memory-T-Zellen nur unwesentliche Veränderungen in der Expression von CD95 im Verlauf der Therapie gab, die der Expression bei Normalkontrollen entsprach, wurden daher nur die Fas⁺CD45RA⁺CD4⁺ T-Zellen dargestellt. Bei diesen wurde eine Abnahme der Expression von Fas von 6.21% (+HU) bzw. 6.39% (-HU) auf 2.67% bzw. 4.53% zu Monat 6 (Abb. 3.1.6.1) beobachtet, die über die Zeit zwar nicht signifikant war, jedoch war der Unterschied zwischen den Therapiearmen signifikant ($p=0.0288$). Die Expression lag an Monat 6 sogar unter dem Wert für Normalkontrollen mit 4.8%; sie stieg dann bis Monat 12 parallel zur Viruslast wieder leicht an. Es zeigte sich jedoch nur ein Trend zur Korrelation der Expression von CD95 auf CD45RA⁺CD4⁺ T-Zellen und der Viruslast ($p=0.06$).

Auf CD8⁺ T-Zellen wurde die Expression von HLA-DR und CD38 analysiert. Beide Aktivierungsmarker fielen im Verlauf der Therapie parallel zur Viruslast hochsignifikant ab ($p<10^{-6}$ für beide Marker). HLA-DR fiel von Baseline 36.46% (+HU) bzw. 49.17% (-HU) bis Monat 6 auf 14.71% bzw. 24.07%, die Expression lag somit über den gesamten Zeitraum deutlich über der auf CD4⁺ T-Zellen; sie entsprach gegen Ende der Studie der Expression bei Normalkontrollen mit 15.8%.

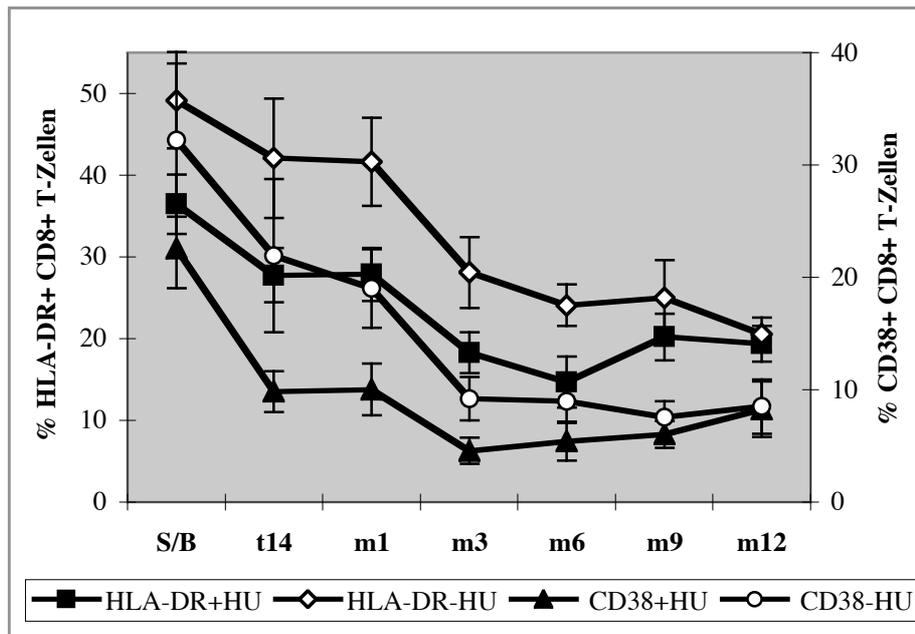


Abb. 3.1.6.2: Späte Aktivierungsmarker auf CD8⁺ T-Zellen im Blut. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

Bei der Auswertung des prognostischen Markers CD38 wurde nur die Population als positiv angesehen, die eine sehr hohe Fluoreszenz zeigte ($>10^2$), um die Unterschiede über die Zeit deutlicher hervorzuheben. Die CD38^{hi} CD8⁺ T-Zellen sanken von Baseline 22.53% (+HU) bzw. 32.23% (-HU) bis Monat 6 auf 4.55% bzw. 8.98% und blieben im Verlauf bis Monat 12 stabil. Es lagen keine Vergleichswerte von Normalkontrollen für CD38^{hi}-Zellen vor.

Die Expression beider Aktivierungsmarker auf CD8⁺ T-Zellen korrelierte hochsignifikant mit der Plasmavirämie ($p < 0.0001$).

Auch im Lymphknoten sank die Expression der Aktivierungsmarker, sie spiegelte insgesamt den Verlauf im Blut wider (Abb. 3.1.6.3). Die Expression von HLA-DR fiel auf CD4⁺ T-Zellen von 21.96% (+HU) bzw. 23.17% (-HU) auf 14.76% bzw. 17.44%.) und lag somit leicht über den HIV-negativen Kontrollen mit 10.33%. Die Expression im Lymphknoten war dabei signifikant höher als im Blut ($p = 0.0055$). Auf CD8⁺ T-Zellen nahm der Anteil von 50.51% (+HU) bzw. 52.13% (-HU) auf 20.55% bzw. 23.42% ($p < 10^{-6}$) ab, der Kontrollwert lag bei 17.89%. Auch auf dieser Subpopulation war die Expression im Lymphknoten signifikant höher als die im Blut ($p = 0.0152$).

Ebenso war die Expression von CD38 auf CD8⁺ T-Zellen in LNMC im Vergleich zu PBMC erhöht ($p = 0.0005$). Sie sank in den ersten sechs Monaten der Studie signifikant von 47.64% (+HU) bzw. 48.29% (-HU) auf 9.26% bzw. 12.43% ($p < 10^{-6}$).

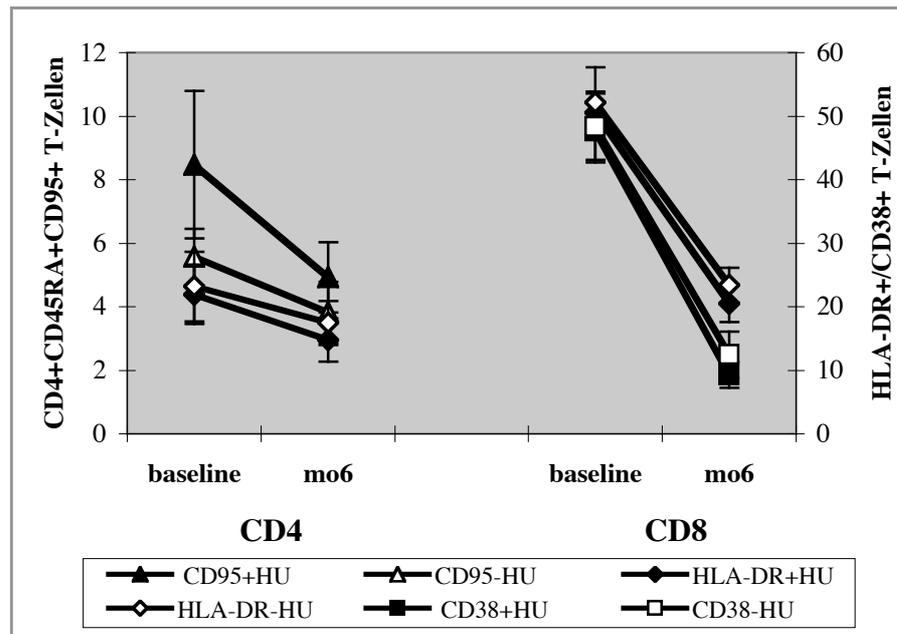


Abb. 3.1.6.3: Aktivierungsmarker auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten. Mittelwerte mit Standardfehlern von 10 Patienten mit (schwarz) und 8 Patienten ohne HU (weiß).

Die Expression von CD95 auf CD45RA⁺CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten sank unter Therapie von 8.47% (+HU) bzw. 5.58% (-HU) auf 4.93% bzw. 3.82%, diese Abnahme war jedoch nicht signifikant. Die Expression dieses Markers war in Blut und Lymphknoten gleich hoch ($p=0.9961$).

Alle untersuchten Aktivierungsmarker zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der Expression im Blut und in den Lymphknoten ($p<0.0001$ für alle Subpopulationen).

3.1.7 Frühe Aktivierungsmarker

Es war nicht möglich, die Auswirkungen der Therapie auf die frühen Aktivierungsmarker CD69 und CD25 eindeutig zu charakterisieren. Es kam sowohl im Blut als auch im Lymphknoten zu stark schwankenden Ergebnissen bezüglich der Expression dieser Marker auf CD4⁺- und CD8⁺ Zellen, die entscheidend auf der extrem schwierigen Unterscheidung zwischen positiven und negativen Zellen aufgrund der niedrigen durchschnittlichen Fluoreszenzintensität beruhen dürften. Daher wurde von einer Darstellung der Ergebnisse zu CD25 und CD69 abgesehen.

3.1.8 Costimulation

Einer der postulierten Beiträge der HIV-Infektion zur Verschlechterung der Immunantwort ist die Herunterregulation des costimulatorischen Moleküls CD28 auf CD8⁺ T-Zellen. CD28 ist für die Weiterleitung des sogenannten „2. Signals“ bei der Aktivierung einer T-Zelle zuständig, ohne das eine über den T-Zell-Rezeptor stimulierte Zelle apoptotisch oder anergisch wird.

Vor Therapiebeginn war die Expression von CD28 auf CD8⁺ T-Zellen deutlich reduziert; nur 38.67% (+HU) bzw. 48.18% (-HU) der Zellen waren im Gegensatz zu 76.6% bei Normalkontrollen CD28⁺ (Abb. 3.1.8.1). Unter Therapie kam es zu einem Anstieg auf 45.48% bzw. 53.97%, der jedoch nicht ausreichte, um die Werte zu normalisieren, und gegenüber Baseline nicht signifikant war.

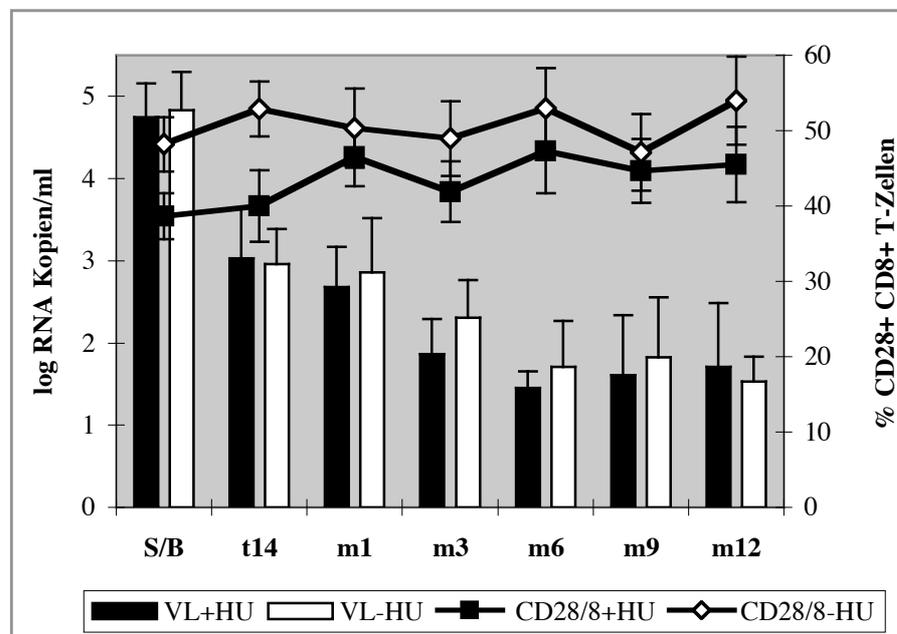


Abb. 3.1.8.1: Plasmavirämie und Expression von CD28 auf CD8⁺ T-Zellen im Blut. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

Auch im Lymphknoten konnte eine Steigerung der Expression von CD28 gemessen werden. Sie lag auf CD8⁺ LNMC signifikant höher als im Blut ($p < 0.0001$), die bei Normalkontrollen gemessenen 92.33% waren durch die HIV-Infektion zu Baseline auf 72.35% (+HU) bzw. 75.82% CD28⁺ Zellen reduziert. Unter Therapie kam es zu einer deutlichen Verbesserung auf 88.74% bzw. 91.47% und somit zu einer normalisierten Expression von CD28 (Abb. 3.1.8.2). Trotz des leicht unterschiedlichen Verlaufs in Blut und Lymphknoten waren die Werte in beiden Kompartimenten signifikant korreliert ($p = 0.0257$).

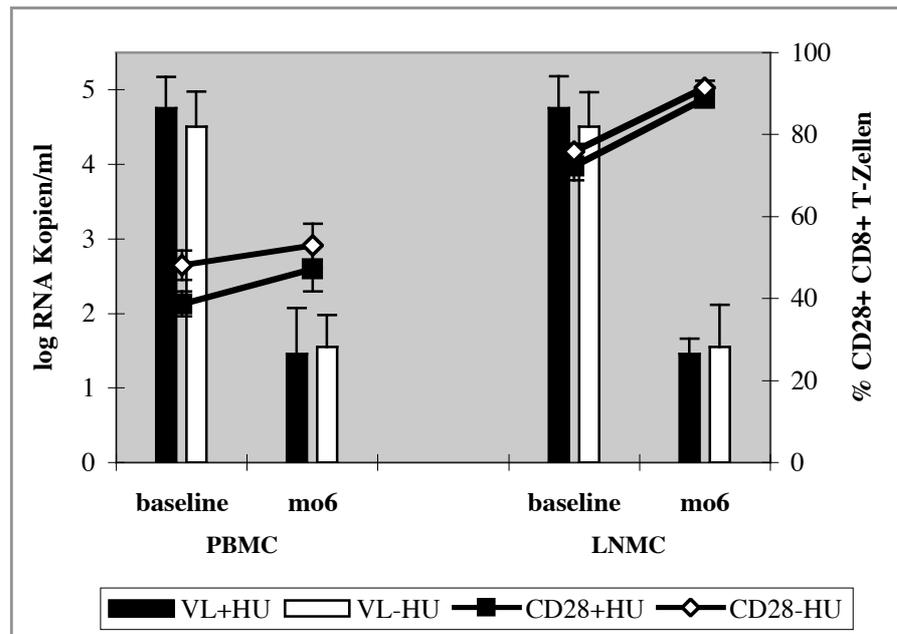


Abb. 3.1.8.2: Plasmaviruslast und CD28 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten. Mittelwerte mit Standardfehlern von 9 Patienten mit (schwarz) und 5 Patienten ohne HU (weiß).

3.1.9 Chemokin-Rezeptor-Expression

Die Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 wurde analysiert, da diese beiden Moleküle als Corezeptoren für HIV dienen und damit eine Bedeutung für die Infizierbarkeit der Zielzellen haben. Da zur Infektion einer Zelle auch der Primärrezeptor CD4 exprimiert werden muß, wurden die Cozeptoren nur auf CD4⁺ T-Zellen gemessen.

Es wurden nur unwesentliche Veränderungen beim Anteil der CXCR4⁺CD4⁺ T-Zellen im Verlauf der Therapie festgestellt, der um den Wert bei Normalkontrollen mit 84.14% schwankte (Abb. 3.1.9.1).

Im Gegensatz dazu kam es bei der Expression von CCR5 zu einer hochsignifikanten Verringerung von Baseline 12.50% (+HU) bzw. 13.13% (-HU) auf 6.70% bzw. 8.34% zu Monat 6 ($p=0.0005$) und somit auf Werte unterhalb von Normalkontrollen mit 9.16%. Gegen Ende der Studie stiegen die Werte wieder leicht an, trotzdem blieb der Abfall bis Monat 12 signifikant ($p=0.0008$). Die Expression von CCR5 korrelierte dabei signifikant mit der Plasmavirämie ($p=0.001$).

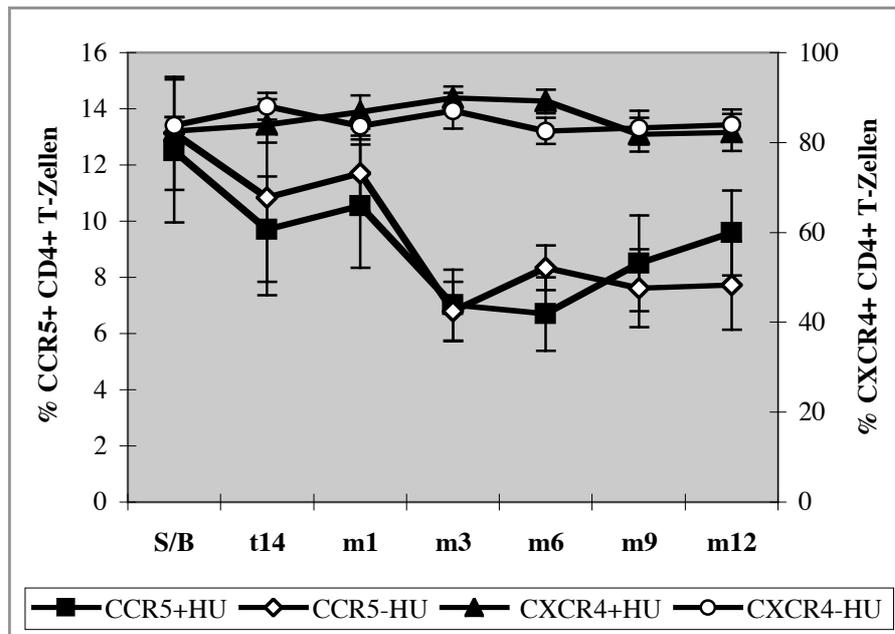


Abb. 3.1.9.1: Corezeptor-Expression auf CD4⁺ T-Zellen im Blut. Mittelwerte mit Standardfehlern von 10 Patienten mit (schwarz) und 10 Patienten ohne HU (weiß).

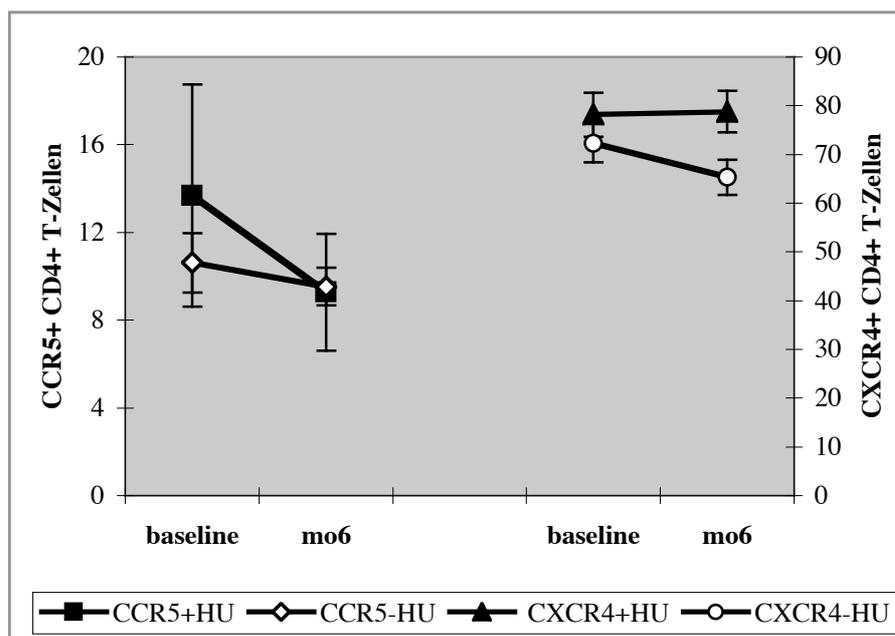


Abb. 3.1.9.2: Corezeptor-Expression auf CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten. Mittelwerte mit Standardfehlern von 9 (CCR5) bzw. 6 (CXCR4) Patienten mit (schwarz) und 8 (CCR5) bzw. 7 (CXCR4) Patienten ohne HU (weiß).

Die CXCR4-Expression im Lymphknoten veränderte sich unter Therapie nur unwesentlich (Abb. 3.1.9.2). Sie korrelierte nicht mit der Expression im Blut ($p=0.09$) und war im Blut signifikant höher ($p=0.0005$). Der Anteil an CCR5⁺CD4⁺ LNMC nahm unter Therapie

hingegen deutlich ab (Abb. 3.1.9.2). Er korrelierte zwischen Blut und Lymphknoten ($p=0.0274$) und war in beiden Kompartimenten gleich hoch ($p=0.6875$).

3.1.10 B-Zellen

Die Proliferation von B-Zellen in Blut und Lymphknoten sowie die Expression des prognostischen Markers CD38 im Blut wurden im Verlauf der Therapie untersucht.

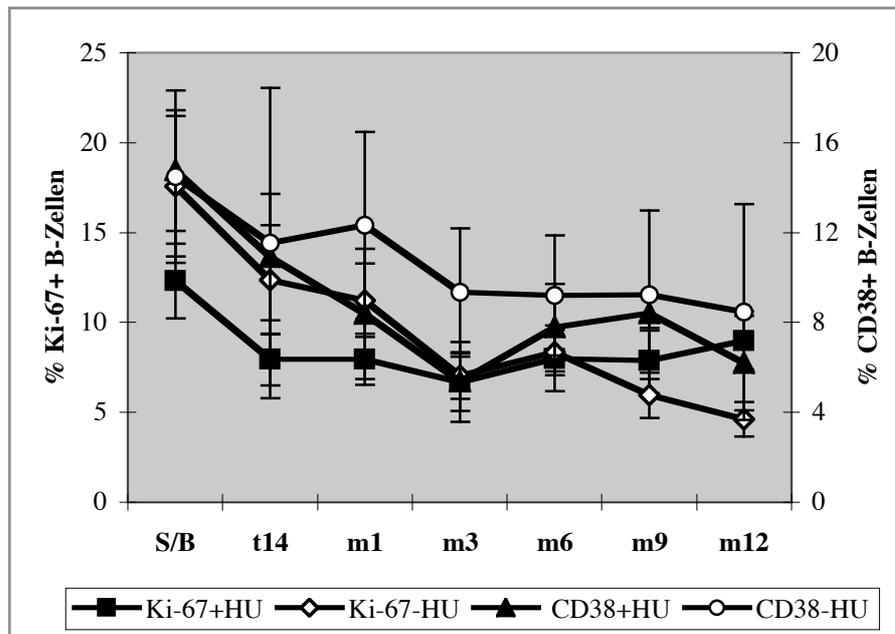


Abb. 3.1.10.1: Proliferation und Aktivierung von B-Zellen im Blut. Mittelwerte mit Standardfehlern von 11 (Ki-67) bzw. 5 (CD38) Patienten mit (schwarz) und 10 (Ki-67) bzw. 4 (CD38) Patienten ohne HU (weiß).

Wie bei den T-Lymphozyten war der Anteil der sich im Zellzyklus befindenden B-Zellen zu Baseline im Blut mit 12.31% (+HU) bzw. 17.58% (-HU) gegenüber Normalkontrollen mit 3.13% deutlich erhöht (Abb. 3.1.10.1). Im Verlauf der ersten 6 Monate unter HAART verringerte sich dieser Anteil auf 8.01% bzw. 8.33%. Bei den Patienten ohne HU fiel der Wert bis Ende der Studie weiter auf 4.62%, während er sich im anderen Arm mit 9.00% stabilisierte. Die Abnahme der proliferierenden B-Zellen war über den gesamten Zeitraum hochsignifikant ($p=0.0002$) und korrelierte mit der Abnahme der Plasmavirämie ($p=0.001$). Auch die Expression von CD38 nahm auf B-Zellen im Blut deutlich von 14.76% (+HU) bzw. 14.49% (-HU) auf 6.20% (+HU) bzw. 8.47% (-HU) ab. Dieser Abfall erreichte jedoch keine Signifikanz.

Der Anteil an Ki-67⁺ B-Zellen im Lymphknoten war signifikant höher als im Blut ($p=0.0418$) und nahm von Baseline 23.85% (+HU) bzw. 27.45% (-HU) auf 12.91% bzw 17.46% ab ($p=0.033$, ohne Abb.). Auch nach 6 Monaten Therapie war der Anteil der Ki-67⁺ B-Zellen noch deutlich gegenüber Normalkontrollen mit 4.10% erhöht.

3.1.11 Stimulation mit Mitogenen

Um über die Phänotypisierung hinaus einen Eindruck von der Reaktion der Lymphozyten auf verschiedene Stimuli zu erhalten, wurden diese *ex vivo* mit verschiedenen Antigenen inkubiert.

Durch Stimulation mit Phorbolmyristylacetat (PMA) und Ionomycin wird unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors direkt auf die Signaltransduktionskaskade eingewirkt, so daß der Ablauf dieser Kaskade untersucht werden kann. Nachgewiesen wird die Produktion von Zytokinen, die durch die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ b an die entsprechenden Gene ausgelöst wird und eines der Ziele der Signaltransduktionskaskade ist. Da die Spezifität des T-Zell-Rezeptors bei dieser Art der Stimulation unerheblich ist, wird die allgemeine Ansprechbarkeit aller T-Zellen aus sowohl der CD4⁺ als auch der CD8⁺ Subpopulation überprüft.

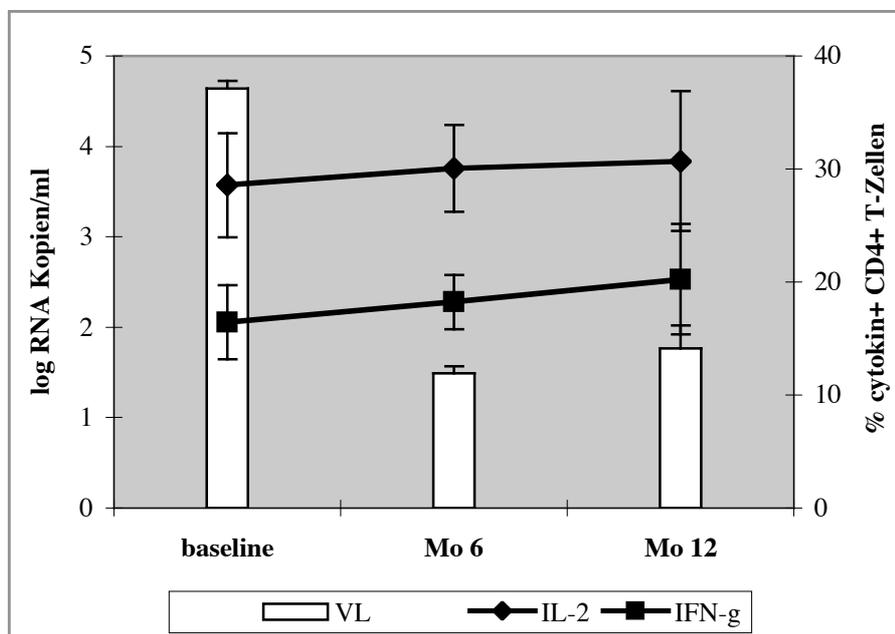


Abb. 3.1.11.1: Zytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Mittelwerte mit Standardfehlern von 17 Patienten.

Da in beiden Therapiearmen unterschiedlich viele Patienten eingeschlossen wurden (11 / 6), die zu Baseline stark divergierende Werte zeigten, war der Einfluß von Hydroxyurea auf die Zytokin-Produktion nicht zu erfassen. Daher wurden die Daten aller 17 untersuchten Patienten zusammengefaßt.

Unter Therapie kam es zu einem leichten Anstieg des Anteils der Lymphozyten, die Interleukin-2 (IL-2) oder Interferon- γ (IFN- γ) produzierten. Die IL-2⁺CD4⁺ T-Zellen nahmen von 28.56% zu Baseline auf 30.69% nach 12 Monaten Therapie zu, bei CD8⁺ T-Zellen stieg der Anteil von 8.56% auf 10.78% (Abb. 3.1.11.1 und Abb. 3.1.11.2).

Der Prozentsatz IFN- γ -produzierender Zellen stieg in der CD4⁺ Population von 16.46% auf 20.23%, in der CD8⁺ T-Zell-Fraktion nahm er von 49.98% auf 51.21% zu, wobei die Produktion zu Monat 6 noch etwas höher lag.

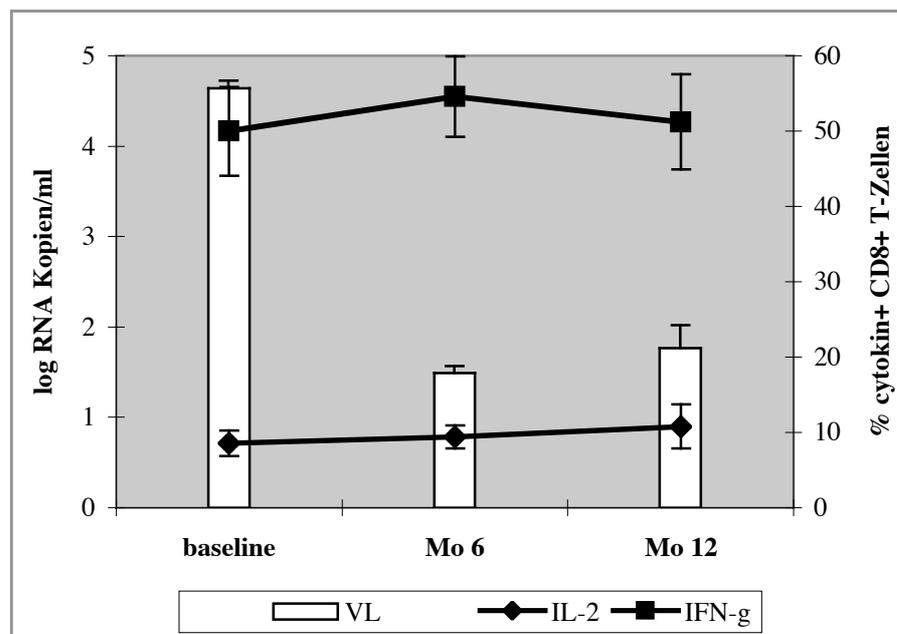


Abb. 3.1.11.2: Zytokin-Produktion von CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Mittelwerte mit Standardfehlern von 17 Patienten.

3.1.12 Stimulation mit Super- und Recall-Antigenen

Bei der Stimulation mit dem Superantigen Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) wird das Signal zwar über den T-Zell-Rezeptor aufgenommen, ist aber unabhängig von dessen Spezifität, da SEB unprozessiert an das MHC Klasse II-Molekül bindet und mit bestimmten

V α -Ketten des T-Zell-Rezeptors reagiert. Dadurch wird eine relativ große Anzahl an Lymphozyten stimuliert, das Signal ähnelt aber dem eines spezifischen Antigens. Da SEB an HLA-Klasse II bindet, übermittelt es nur an CD4⁺ T-Zellen ein Signal, daher werden CD8⁺ T-Zellen in diesem Assay nicht berücksichtigt.

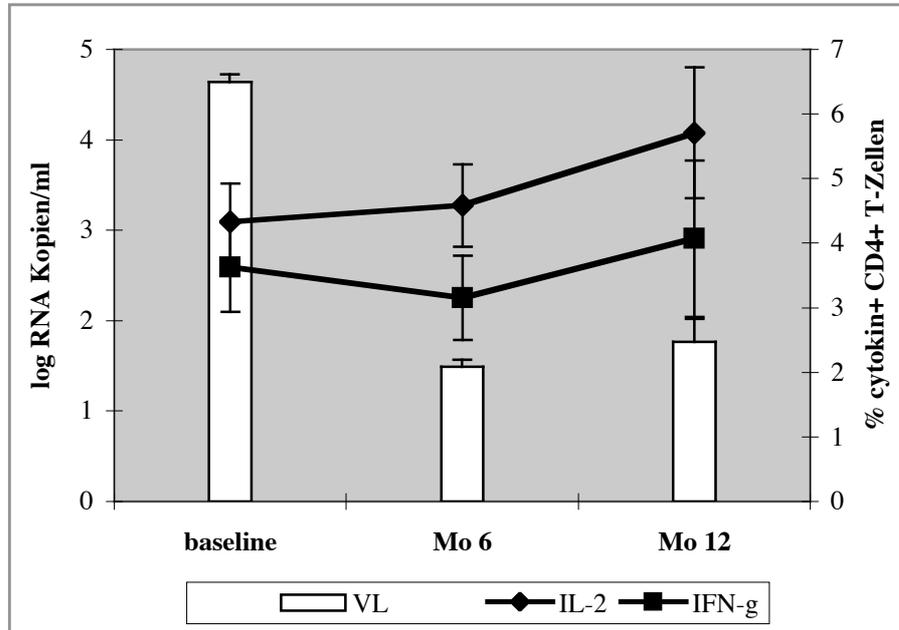


Abb. 3.1.12.1: Cytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit SEB. Mittelwerte mit Standardfehlern von 17 Patienten.

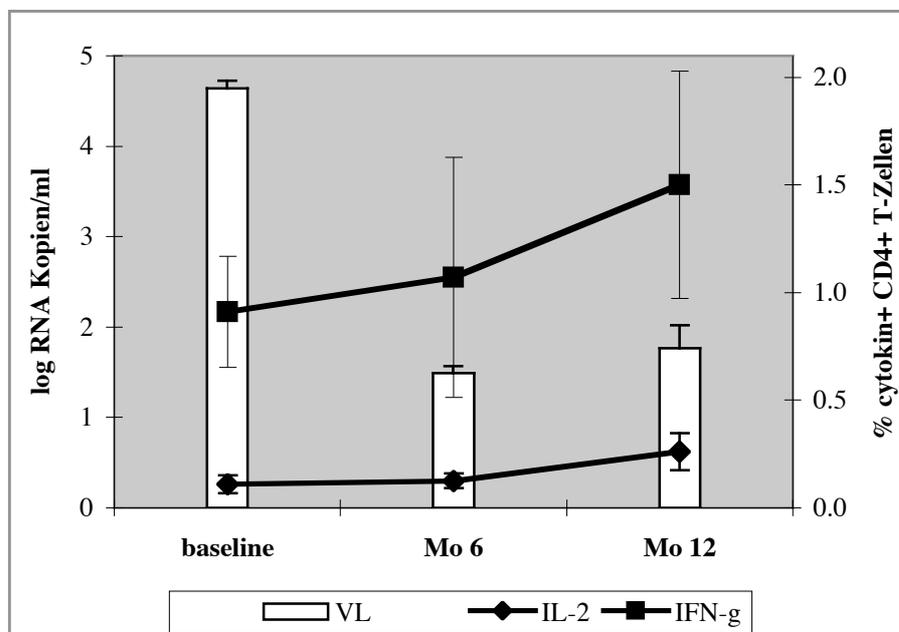


Abb. 3.1.12.2: Zytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit CMV. Mittelwerte mit Standardfehlern von 17 Patienten.

Auch die Stimulation mit den Recall-Antigenen Cytomegaloviruslysate (CMV) und Tetanus Toxoid (TT) zielt in dem verwendeten Assay nur auf CD4⁺ T-Zellen, da das gesamte Protein eingesetzt wird. Exogene Antigene werden hauptsächlich in den Klasse II-Prozessierungsweg eingeschlossen, daher werden größtenteils CD4⁺ T-Zellen von ihnen aktiviert.

Unter Therapie kam es nach Stimulation mit SEB zu einer leichten Erhöhung des Anteils Zytokin-produzierender Zellen. IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen stiegen von 4.33% auf 5.71%, IFN- γ Zellen von 3.63% auf 4.01% mit einer leichten Abnahme zu Monat 6 (Abb. 3.1.12.1).

Da die CMV-Serologie nicht von allen Patienten verfügbar war, wurden alle in die Auswertung eingeschlossen. Es zeigte sich eine Erhöhung der Zytokin-produzierenden CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit CMV-Lysat von 0.10% auf 0.24% für IL-2 und 0.91% auf 1.50% für IFN- γ (Abb. 3.2.9.2). Deutlich erkennbar war die verstärkte Produktion von IFN- γ als inflammatorischem Zytokin im Verhältnis zum regulatorischen IL-2, das sonst hauptsächlich produziert wird. IFN- γ blockiert die virale Replikation und kann Viren aus infizierten Zellen eliminieren, ohne diese zu töten; die beobachtete Erhöhung der Produktion könnte sich daher positiv auf den Verlauf der Infektion auswirken.

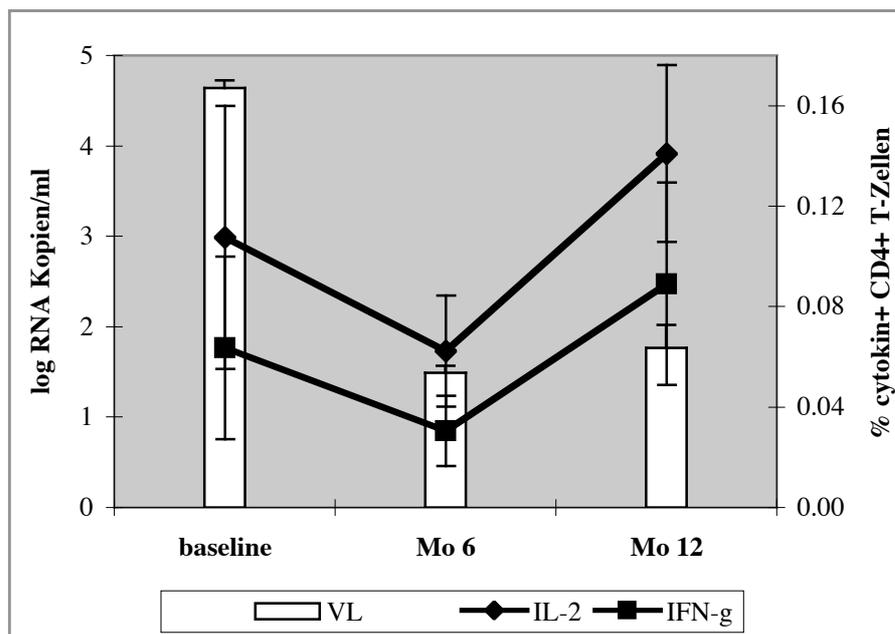


Abb. 3.1.12.3: Zytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit TT. Mittelwerte mit Standardfehlern von 17 Patienten.

Die Stimulation mit TT führte in diesem Assay zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen. TT wird als Kontrolle in Proliferationsassays eingesetzt und wurde daher auch hier eingeschlossen. Da die Frequenz der TT-spezifischen Zellen sehr gering ist, sind sie zwar im

Proliferationsassay nachzuweisen, da bei diesem eine Vermehrung der spezifischen Zellen stattfindet, der direkte Nachweis *ex vivo* ist jedoch schwierig.

Der Anteil TT-spezifischer CD4⁺ T-Zellen nahm im Verlauf der ersten 6 Monate von 0.11% IL-2⁺ bzw. 0.06% IFN- γ Zellen um die Hälfte ab, um bis Studienende auf 0.14% bzw 0.09% anzusteigen (Abb. 3.1.12.3). Es kam dabei zu großen interindividuellen Schwankungen, wie aus der Streubreite ersichtlich.

Insgesamt wurde die Ansprechbarkeit der Lymphozyten auf verschiedenartige Reize tendenziell durch die Therapie erhöht, diese Erhöhung war aber bei keinem der untersuchten Stimuli besonders ausgeprägt.

3.2 Kontrollierte Therapieunterbrechung

Um zu untersuchen, ob die antiretrovirale Therapie zur anhaltenden Veränderung immunologischer Parameter führt, wurde ein zur Senkung der Virusreplikation unter Therapie entgegengesetzter experimenteller Ansatz gewählt: Patienten mit stabiler Virussuppression unter Therapie setzten diese vorübergehend ab. Dazu wurden 15 optimal vorbehandelte Patienten aus den kontrollierten, randomisierten Studien COSMIC und ARCHY gewählt. 11 Patienten aus COSMIC hatten über 24 Monate eine Vierfachkombination aus zwei Nukleosidanaloga und zwei Proteaseinhibitoren mit oder ohne IL-2 während des ersten Jahres erhalten. Sechs der Patienten kamen aus dem Arm mit, fünf aus dem ohne IL-2. Die vier Patienten aus ARCHY hatten alle adjuvant Hydroxyurea erhalten.

Die eingeschlossenen Patienten waren im Median 19 (12 – 25) Monate unter HAART mit einer Suppression der Plasmavirämie unter die Nachweisgrenze von 25 RNA-Kopien/ml für im Median 13 (6 – 23) Monate. Die CD4⁺ T-Zellzahl stieg unter Therapie von zu Baseline im Median 562 (275 – 778) Zellen/ μ l auf 931 (436 – 1718) Zellen/ μ l. Die CD4⁺/CD8⁺-Ratio verbesserte sich in dieser Zeit von im Median 0.55 (0.31 – 1.02) auf 1.05 (0.69 – 1.79). Alle angegebenen Werte stellen auf Grund der Schwankungsbreite bei kleiner Gruppengröße Mediane mit Minimal- und Maximalwerten dar.

3.2.1 Plasmavirämie und T-Zellzahlen

Trotz anhaltender Unterdrückung der Viruslast auf sehr niedrige Werte wurde HIV-RNA im Plasma bei allen Patienten 3 (1.5 - 6) Wochen nach Absetzen der Therapie wieder

nachweisbar (Abb. 3.2.1.1). Nach 4 Wochen erreichte die Viruslast mit 19400 (3010 – 882300) RNA-Kopien/ml ein Maximum, fiel dann aber bei 13 Patienten ohne erneute Therapie etwas ab. Bei 14 Patienten pegelte sich die Viruslast auf prätherapeutische Level ein. Nach 3 (1 – 4) Monaten Therapiepause wurde bei 10 Patienten die Behandlung fortgesetzt. Bei dieser Gruppe war die Viruslast innerhalb kurzer Zeit wieder unter der Nachweisgrenze. Vier Patienten kontrollierten ihre Viruslast ohne Therapie, inzwischen 29, 28, 23 und 22 Monate lang, bei Werten zwischen 1000 und 11000 RNA-Kopien/ml. Bei einem Patienten kam es nach 10 Monaten Therapiepause mit Viruslasten um 500 RNA-Kopien/ml zu einem Anstieg auf über 200.000 RNA-Kopien/ml, woraufhin er erneut behandelt wurde. Dieser Patient wird bis zur Wiedereinleitung der Therapie zu der Gruppe der unbehandelten Patienten gezählt.

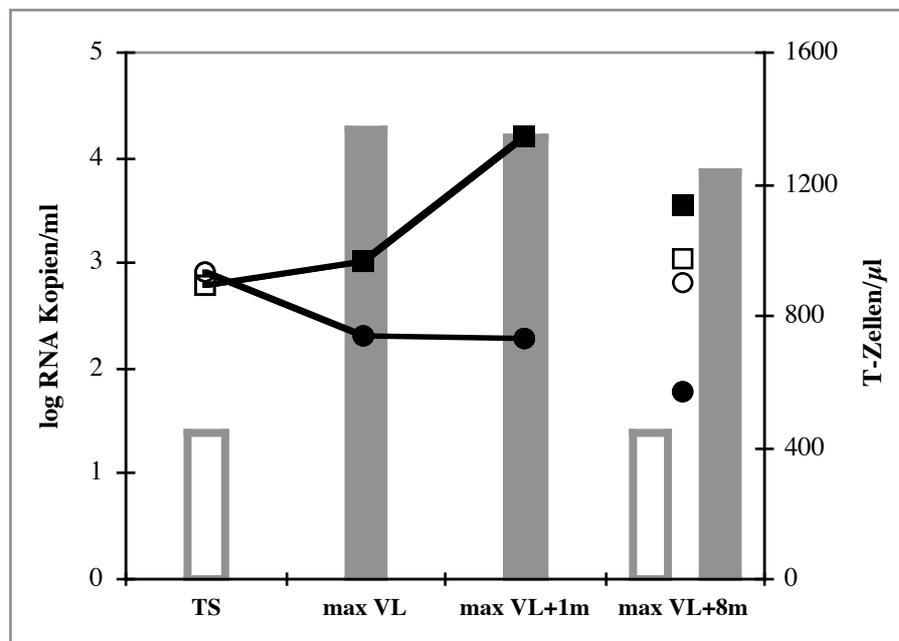


Abb. 3.2.1.1: Verlauf der Viruslast und der T-Zellzahlen nach Therapiestop. Median der Viruslast (Balken), CD4⁺ T-Zellen (○) und CD8⁺ T-Zellen (■). Offene Symbole, unter HAART. Geschlossene Symbole, unbehandelt.

Da die Kinetik des Wiederanstiegs der Viruslast bei den Patienten stark variierte, wurden die Werte auf vier Zeitpunkte standardisiert: Therapiestop (TS), maximale gemessene Viruslast (max VL), ein Monat nach dem Maximum, noch ohne Therapie bei allen Patienten (max VL +1m, dieser Wert umfaßt 1 – 8 Wochen nach der maximal gemessenen VL) und 8 Monate nach dem Maximum (max VL +8m, 3 – 13 Monate nach max VL). Zu dem letzten Zeitpunkt

wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: unbehandelte und behandelte. Bis dahin wurden alle zusammen als eine Gruppe behandelt.

Der Anstieg der Viruslast nach Therapiestop war hochsignifikant ($p < 0.0001$), ebenso wie der Abfall von max VL bis zu max VL+8m für die behandelte Gruppe ($p = 0.0002$). Auch der Abfall von max VL bis zu max VL+8m für die unbehandelte Gruppe war noch signifikant ($p = 0.0495$), ebenso wie der Unterschied zwischen den beiden Gruppen am Ende der Untersuchung ($p = 0.0045$).

Es konnte kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Viruslast zwischen Patienten mit oder ohne adjuvantes IL-2 oder Hydroxyurea beobachtet werden. Die Werte zwischen den drei Gruppen waren jedoch zu Therapiestop sehr unterschiedlich.

Nach dem deutlichen Anstieg der CD4⁺ T-Zellzahlen unter Therapie (s. 3.2) kam es zusammen mit der steigenden Viruslast nach Therapiestop zu einem sofortigen Absinken (Abb. 3.2.1.1). Ab max VL+1m war die Abnahme mit 727 (321 – 1093) Zellen/ μ l signifikant ($p = 0.04$). Bei den 5 weiterhin unbehandelten Patienten sanken die Zellzahlen weiter auf 563 (399 – 1050) / μ l, während das Wiedereinsetzen von HAART zu einem Anstieg der CD4⁺ T-Zellen auf 895 (606 – 1329) / μ l führte.

Im Gegensatz dazu stiegen die CD8⁺ T-Zellzahlen bis max VL+1m mit steigender Viruslast signifikant an ($p = 0.03$). Nach diesem Zeitpunkt fielen sie in beiden Gruppen wieder, wobei der Abfall bei den behandelten Patienten wesentlich ausgeprägter war (Abb. 3.2.1.1).

Mit den Änderungen der T-Zellzahlen kam es zu einer Reversion der CD4⁺/CD8⁺-Ratio, die sich unter HAART auf Werte über 1 normalisiert hatte. Bis max VL+1m kam es zu einem hochsignifikanten Absinken der Ratio ($p = 0.001$) auf 0.51 (0.25 – 1.01), das selbst durch die Wiedereinführung der Therapie nicht völlig aufgehoben wurde; die CD4⁺/CD8⁺-Ratio erreichte bei den behandelten Patienten 0.76 (0.62 – 1.22). Ohne HAART war sie mit 0.59 (0.46 – 0.93) noch niedriger.

3.2.2 Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 nach Therapiestop korrelierte signifikant mit dem Verlauf der Viruslast ($p = 0.0275$ für CD4⁺ T-Zellen und $p < 0.0001$ für CD8⁺ T-Zellen).

Die höchste Expression wurde auf CD4⁺ T-Zellen an max VL mit 3.44 (1.21 – 7.37) % erreicht (Abb. 3.2.2.1). Sie sank dann parallel zur Plasmavirämie und erreichte nach Wiedereinführung der Therapie 2.41 (0.62 – 3.89) %. Dieser Wert lag nicht signifikant höher

als zu Therapiestop mit 1.92 (0.66 - 4.25) %. Bei Weiterführung der Therapiepause war Ki-67 mit 2.75 (2.09 – 4.97) % auch nicht signifikant erhöht.

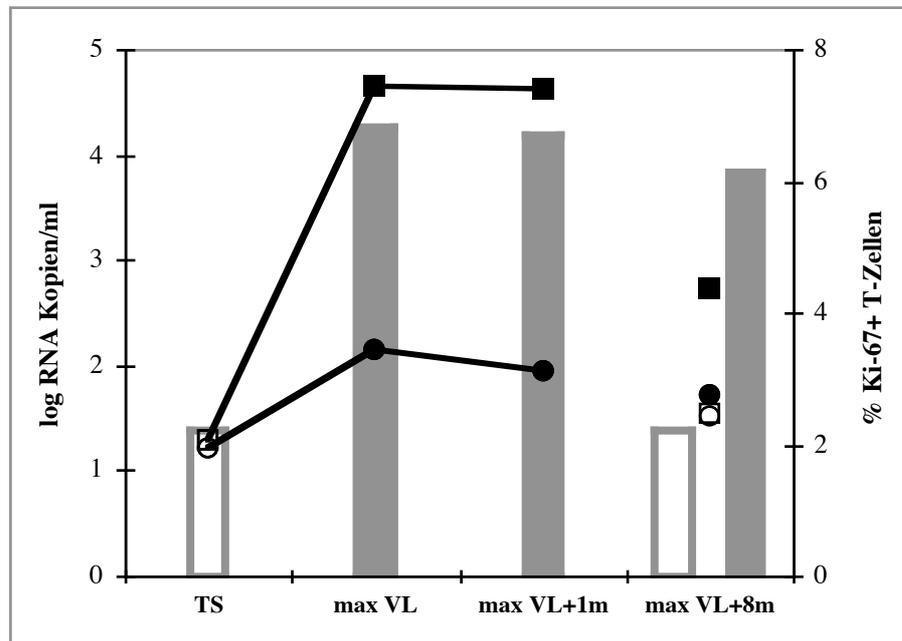


Abb. 3.2.2.1: Verlauf der Viruslast und des Proliferationsmarkers Ki-67 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Median der Viruslast (Balken), Ki-67⁺CD4⁺ (○) und Ki-67⁺CD8⁺ T-Zellen (■). Offene Symbole, unter HAART. Geschlossene Symbole, unbehandelt.

Der Verlauf der Ki-67-Expression von CD8⁺ T-Zellen spiegelte den von CD4⁺ T-Zellen. Die Veränderungen waren aber wesentlich stärker ausgeprägt. Das Maximum der Expression wurde an max VL mit 7.43 (3.51 – 36.44) % erreicht, ein hochsignifikanter ($p=0.0003$) Anstieg gegenüber dem Ausgangswert zu Therapiestop mit 2.06 (0.48 – 6.24) %. Die Expression nahm nach einem Monat leicht ab und erreichte bei behandelten Patienten 2.46 (0.56 – 5.90) %; sie ist somit gegenüber TS immer noch signifikant höher ($p=0.0013$). Der Unterschied zwischen unbehandelten Patienten mit 4.35 (1.75 – 13.60) % und Patienten, die zu max VL+8m auf Therapie waren, war jedoch nicht signifikant..

3.2.3 Späte Aktivierungsmarker

Parallel zur Proliferation stiegen auch verschiedene Aktivierungsmarker auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Der Anteil an HLA-DR⁺CD8⁺ T-Zellen und der CD38⁺CD8⁺ T-Zellen korrelierte dabei signifikant mit der Viruslast ($p=0.0001$ für beide Subpopulationen); bei HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen gab es einen Trend zur Korrelation mit der Plasmavirämie ($p=0.0544$).

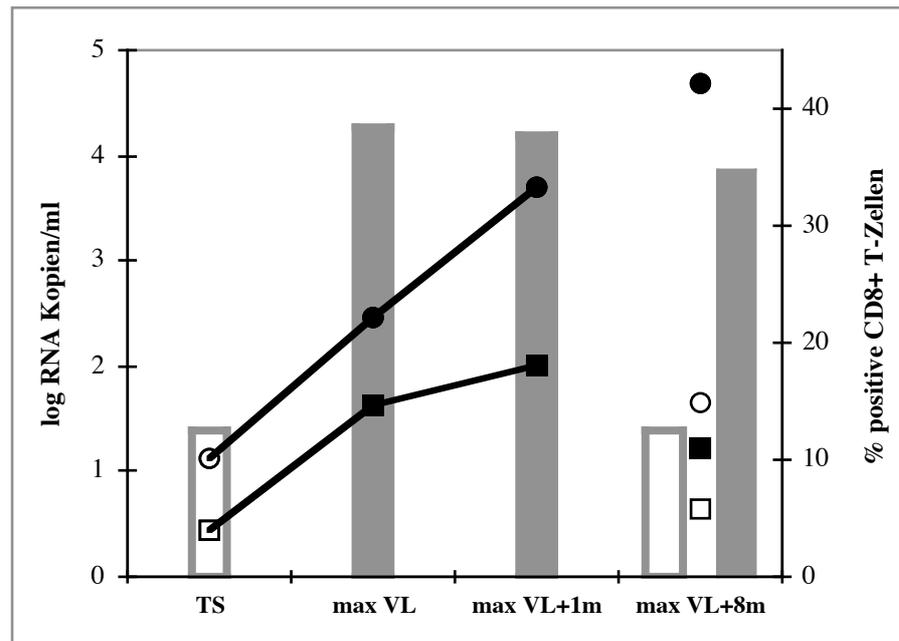


Abb. 3.2.3.1: Verlauf der Viruslast und der späten Aktivierungsmarker auf CD8⁺ T-Zellen. Median der Viruslast (Balken), HLA-DR⁺ (●) und CD38⁺ CD8⁺ T-Zellen (■). Offene Symbole, unter HAART. Geschlossene Symbole, unbehandelt.

Die Expression von HLA-DR stieg auf CD8⁺ T-Zellen mit leichter Verzögerung zur Viruslast (Abb. 3.2.3.1) signifikant an ($p=0.0001$). Sie erreichte zu max VL+1m 33.18 (16.10 – 59.10)% und fiel bei Wiedereinsetzen der Therapie auf 14.86 (7.13 – 31.65)%, damit war sie gegenüber TS leicht erhöht 10.06 (2.98 – 26.54)%. Bei den unbehandelten Patienten kam es zu einem weiteren Anstieg HLA-DR⁺CD8⁺ T-Zellen, damit war der Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Patienten an max VL+8m signifikant ($p=0.003$).

Die Expression von CD38 auf CD8⁺ T-Zellen stieg von 3.87 (1.26 – 29.64)% zu TS auf 17.95 (6.36 – 38.70)% an max VL+1m ($p<0.0002$, Abb. 3.2.3.1). Mit der Wiedereinführung von HAART verringerte sich die Expression von CD38 auf 5.76 (4.64 – 24.26)%, bei den unbehandelten Patienten lag sie an max VL+8m bei 10.90 (4.59 – 28.29)%.

Der Anstieg der Expression von HLA-DR auf CD4⁺ T-Zellen von 7.33 (3.17 – 12.10) % zu TS erreichte an max VL+1m mit 10.84 (6.72 – 24.68) Signifikanz ($P = 0.04$). Bei den behandelten Patienten fiel sie bis max VL+8m wieder auf 7.09 (5.36 – 10.90)%, ohne Behandlung auf 8.83 (7.44 – 16.01)%.

Der Anteil der CD95⁺CD4⁺ T-Zellen stieg von 39.67 (18.42 – 83.17)% zu TS auf 46.91 (25.46 – 89.33)% an max VL+1m; nach Einführung von HAART sank er wieder auf 33.97 (25.29 – 53.66)%. Bei unbehandelten Patienten nahm die Expression weiter zu, sie erreichte an max

VL+8m 54.97 (33.89 – 73.56)% und lag somit signifikant höher als bei behandelten Patienten ($p=0.028$).

3.2.4 Frühe Aktivierungsmarker

Mit dem Anstieg der Proliferations- und späten Aktivierungsmarker kam es bei den früh exprimierten Aktivierungsmarkern CD69 und CD25 auf CD8⁺ T-Zellen zu einer Abnahme (Abb. 3.2.4.1), die für CD45R0⁺CD25⁺ Zellen signifikant war ($p=0.0055$).

Auf CD4⁺ T-Zellen kam es ebenfalls zu einer verminderten Expression von CD25, während CD69 keine Korrelation mit der Plasmavirämie zeigte. Die Expression der frühen Aktivierungsmarker blieb auch mit der Einführung der Therapie auf beiden Subpopulationen weiter gestört. Diese führte nur bei CD25⁺CD45R0⁺CD8⁺ T-Zellen zu einer signifikanten Verbesserung gegenüber den nicht behandelten Patienten ($p=0.028$), während CD69 bei den unbehandelten Patienten wieder anstieg.

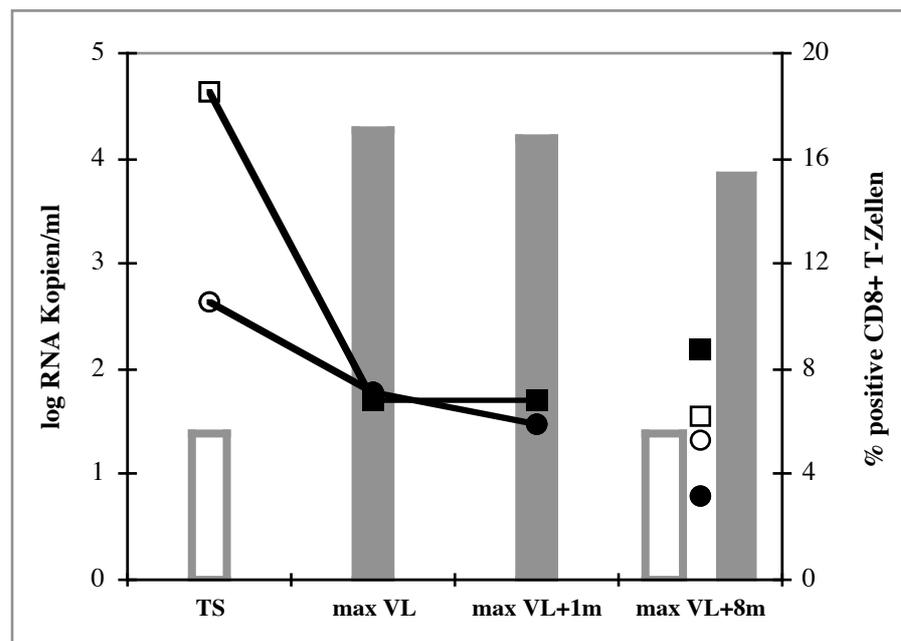


Abb. 3.2.4.1: Verlauf der Viruslast und der frühen Aktivierungsmarker auf CD8⁺ T-Zellen. Median der Viruslast (Balken), CD25⁺CD45R0⁺ (●) und CD69⁺ CD8⁺ T-Zellen (■). Offene Symbole, unter HAART. Geschlossene Symbole, unbehandelt.

3.2.5 Costimulationsmarker

Der Costimulationsmarker CD28 wurde im Verlauf der Therapiepause mit zunehmender Plasmavirämie auf CD8⁺ T-Zellen herunterreguliert (Abb. 3.2.5.1). Die Abnahme der Expression ist sowohl auf CD45RA⁺ als auch auf CD45R0⁺CD8⁺ T-Zellen zu beobachten und ist bei letzteren signifikant ($p=0.036$). Durch Wiedereinführung von HAART wurde die Expression auf beiden Subpopulationen wieder auf ähnliche Werte wie bei Therapiestop angehoben.

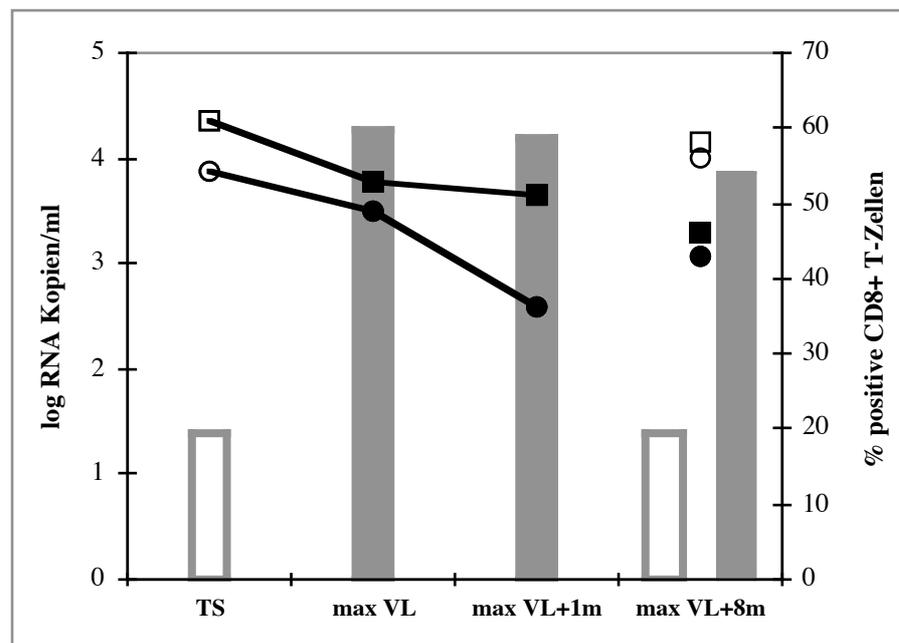


Abb. 3.2.5.1: Verlauf der Viruslast und des Costimulationsmarkers CD28 auf verschiedenen CD8⁺ T-Zellsubpopulationen. Median der Viruslast (Balken), CD28⁺CD45RA⁺ (●) und CD28⁺CD45R0⁺ CD8⁺ T-Zellen (■). Offene Symbole, unter HAART. Geschlossene Symbole, unbehandelt.

3.2.6 B-Zellen

Ähnlich wie bei T-Lymphozyten stieg auch die Anzahl der proliferierenden B-Zellen mit steigender Viruslast an (Abb. 3.2.6.1). Mit der Abnahme der Viruslast ging auch die Proliferation von B-Zellen auf den Expressionslevel bei Therapiestop zurück, unabhängig von der Wiedereinführung von HAART.

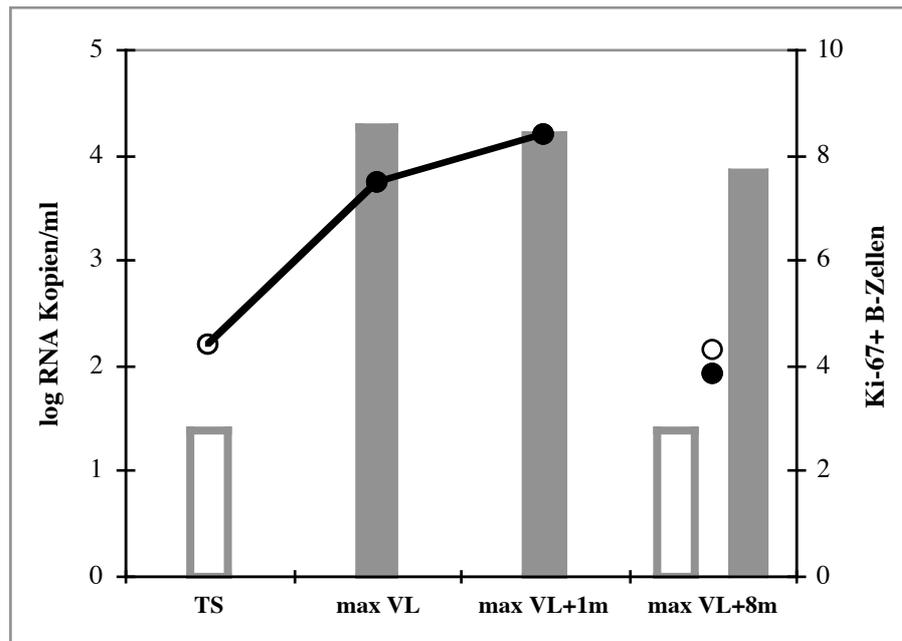


Abb. 3.2.6.1: Verlauf der Viruslast und der Proliferation auf CD19⁺ B-Zellen. Median der Viruslast (Balken) und der Ki-67⁺ B-Zellen (●). Offene Symbole, unter HAART. Geschlossene Symbole, unbehandelt.

3.2.7 CD103

Um der Frage nach der Beeinflussung des thymischen Nachschubs an naiven T-Zellen durch die Virusreplikation nachzugehen, wurden „recent thymic emigrants“ (RTE) quantifiziert. Die Messung erfolgte in sortierten Zellen mit einer PCR, in der die bei der Rekombination des T-Zell-Rezeptors anfallenden „T cell receptor excision circles“ (TRECs) nachgewiesen werden. Dem Ansatz liegt folgende Überlegung zugrunde: Diese zirkularisierte DNA ist sehr stabil und wird bei der Teilung der Zelle nicht dupliziert, sondern an eine der Tochterzellen weitergegeben. Je mehr Zellen sich in einer Population geteilt haben, desto stärker werden die TRECs verdünnt. Eine Population, die viele RTEs enthält, weist dementsprechend viele TRECs auf.

Im Jahr 2000 beschrieben McFarland *et al.*, daß die Expression von CD103 mit dem Anteil an RTEs korreliert, allerdings nur auf CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ T-Zellen. Bisher war CD103 oder α _E-Integrin nur als „human mucosal Lymphozyte antigen 1“ (HML-1) bekannt, das zusammen mit α ₇ auf über 90% der intestinalen intraepithelialen Lymphozyten, auf Lamina Propria Lymphozyten und auf PHA-stimulierten PBMC exprimiert wird^{90,157}. Es wurde daher modellhaft für den thymischen Nachschub die Population von CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ Zellen auf die Expression von CD103 hin untersucht.

Entgegen den Erwartungen kam es nach Therapieunterbrechung bei allen untersuchten Patienten zu einem Anstieg der Expression von CD103, der jedoch nicht auf CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ T-Zellen beschränkt war, sondern in allen untersuchten Populationen auftrat. Dieser Anstieg korrelierte zeitlich nicht genau mit der Viruslast; die höchste CD103-Expression wurde teilweise vor, teilweise auch kurz nach dem Erreichen der maximalen Viruslast gemessen. Daher wurde eine Darstellung gewählt, die nicht auf die Viruslast normiert ist, sondern auf die maximale Expression von CD103 (Abb. 3.2.7.1).

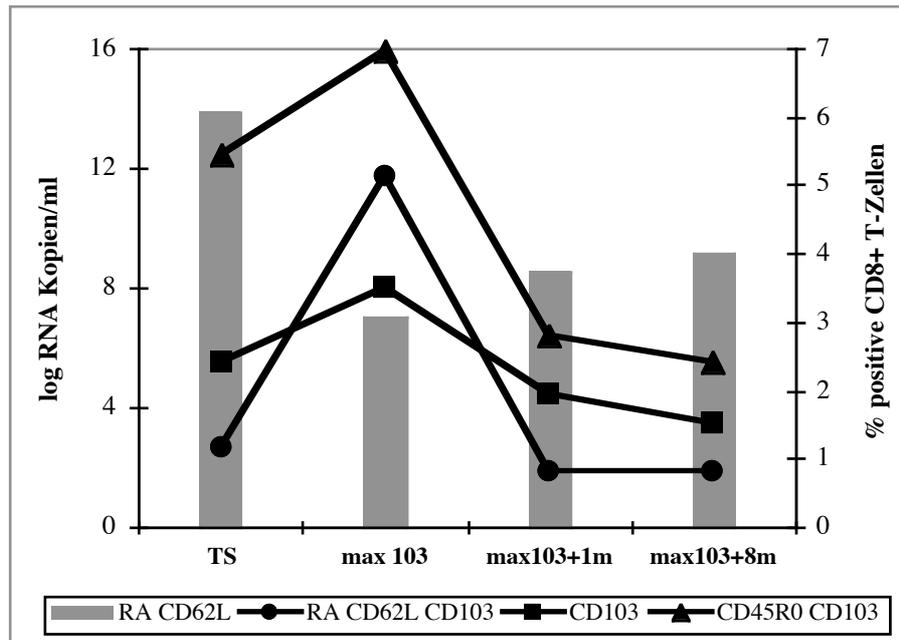


Abb. 3.2.7.1: Naïve CD8⁺ T-Zellen und Expression von CD103 auf CD8⁺ T-Zellsubpopulationen nach Therapieunterbrechung bei 8 Patienten.

Nach dem Durchlaufen eines Maximums fiel die CD103-Expression auf allen Subpopulationen an den Verlauf der Viruslast angelehnt wieder ab.

Einhergehend mit dem Anstieg der CD103-Expression war ein Absinken des Anteils an naïven, CD45RA⁺CD62L⁺CD8⁺ T-Zellen zu beobachten, der sich anschließend teilweise erholte (Abb. 3.2.7.1). Diese Diskrepanz zwischen dem Verlauf der naïven Zellen und den mutmaßlichen RTEs sollte durch die Messung von TRECs bestätigt oder widerlegt werden.

Dazu wurden aus PBMC nach Therapieabbruch mit Hilfe magnetischer Beads positiv CD4⁺ oder CD8⁺ Populationen gereinigt und die TRECs mit einer sogenannten „real time PCR“ nachgewiesen. Diese erlaubt eine genaue Quantifizierung der amplifizierten Produkte.

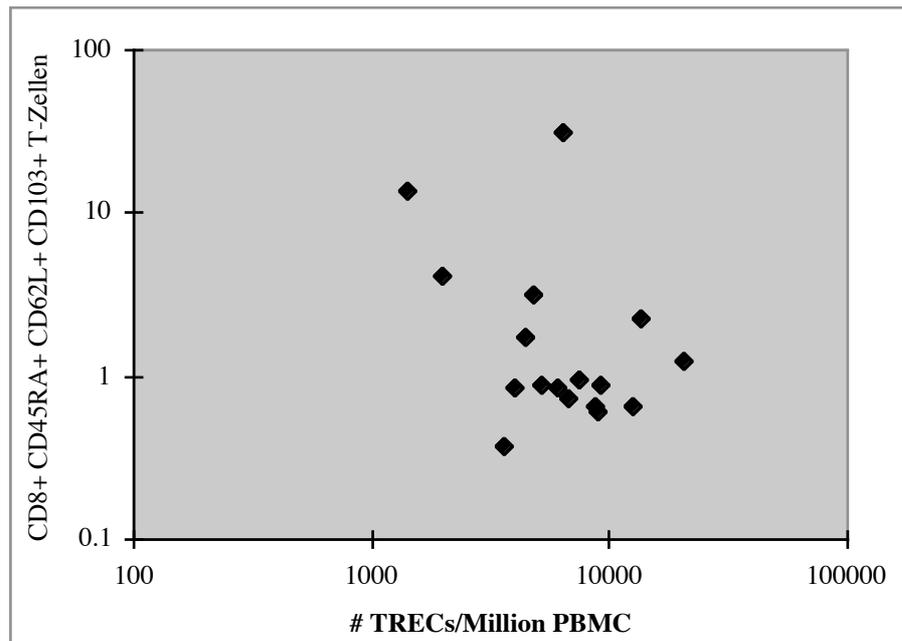


Abb. 3.2.7.2: Fehlende Korrelation zwischen der Anzahl an TRECs und der Expression von CD103

Es stellte sich heraus, daß in diesem Patientenkollektiv die Anzahl der TRECs in CD8⁺ T-Zellen nicht mit der Expression von CD103 korrelierte (Abb. 3.2.7.2). Sie korrelierte jedoch auch nicht mit der Viruslast; bei einigen Patienten kam es nach Therapiestop zu einem Anstieg der TRECs, bei anderen wiederum zu einem Abfall (ohne Abbildung). Es konnte nicht bestimmt werden, welche Faktoren für dieses divergente Verhalten verantwortlich waren.

3.2.8 Stimulation mit Mitogenen

Um einen Eindruck von der Ansprechbarkeit der Lymphozyten nach Therapieabbruch zu erhalten wurde Blut von neun Patienten mit Mitogenen und Antigenen stimuliert. Aufgrund der kleineren Fallzahl wurden alle Patienten zusammengefaßt, ohne auf den genauen Therapiestatus einzugehen.

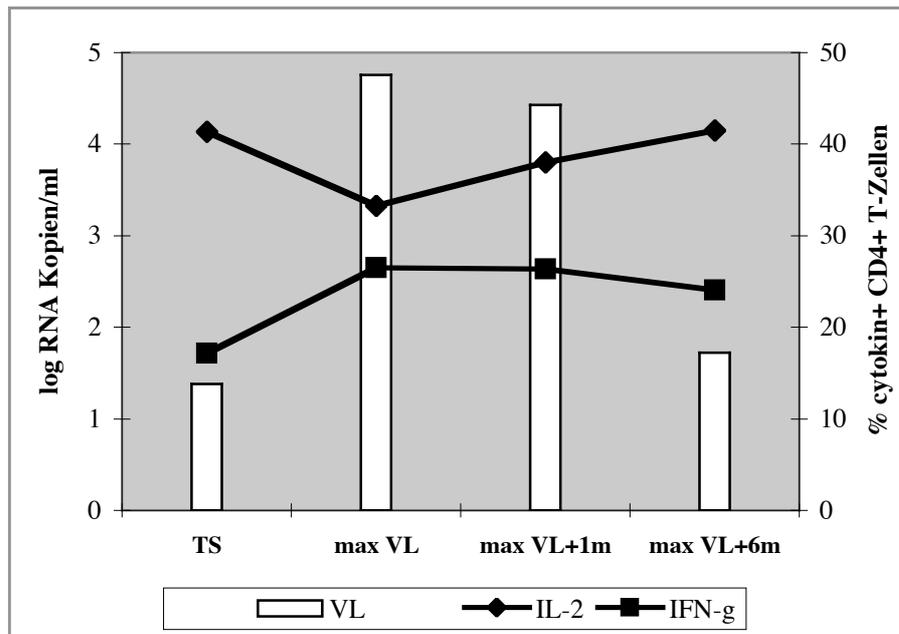


Abb. 3.2.8.1: Zytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomyacin. Mediane von neun Patienten.

Die Wirkungsweise von PMA und Ionomyacin ist in Kapitel 3.1.11 zusammengefaßt. Nach Stimulation mit diesen Mitogenen verlief die Expression von IFN- γ in CD4⁺ T-Zellen genau parallel zur Viruslast, während IL-2 sich genau entgegengesetzt verhielt (Abb. 3.2.8.1).

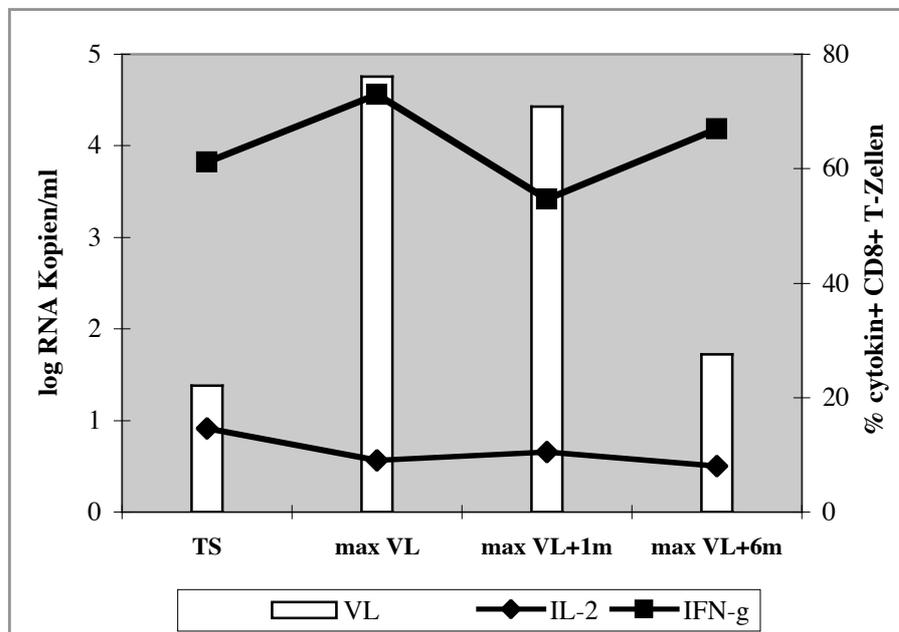


Abb. 3.2.8.2: Zytokin-Produktion von CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomyacin. Mediane von neun Patienten.

Bei den CD8⁺ T-Zellen stieg die Produktion von IFN- γ ebenso mit der Viruslast an und fiel zu max VL+1m, um anschließend wieder anzusteigen (Abb. 3.2.8.2). Auch hier verhielt sich die

Expression von IL-2 genau entgegengesetzt dazu. Die beobachteten Veränderungen waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Deutlich ist, daß CD4⁺ T-Zellen verstärkt IL-2 produzierten, während auf CD8⁺ T-Zellen die Expression von IFN- γ ausgeprägter war, und daß sich die Expression der Zytokine am Ende des Beobachtungszeitraums wieder der zu Therapiestop näherte.

3.2.9 Stimulation mit Super- und Recall-Antigenen

Die Stimulation von Lymphozyten mit Super- und Recall-Antigenen nach Therapiestop führte zu keiner signifikanten Veränderung der Zytokin-Produktion. Stimulation mit SEB führte zu einem im Verhältnis zur Viruslast leicht verzögerten Anstieg der Expression sowohl von IL-2 als auch von IFN- γ die nachfolgend wieder abfielen (Abb. 3.2.9.1).

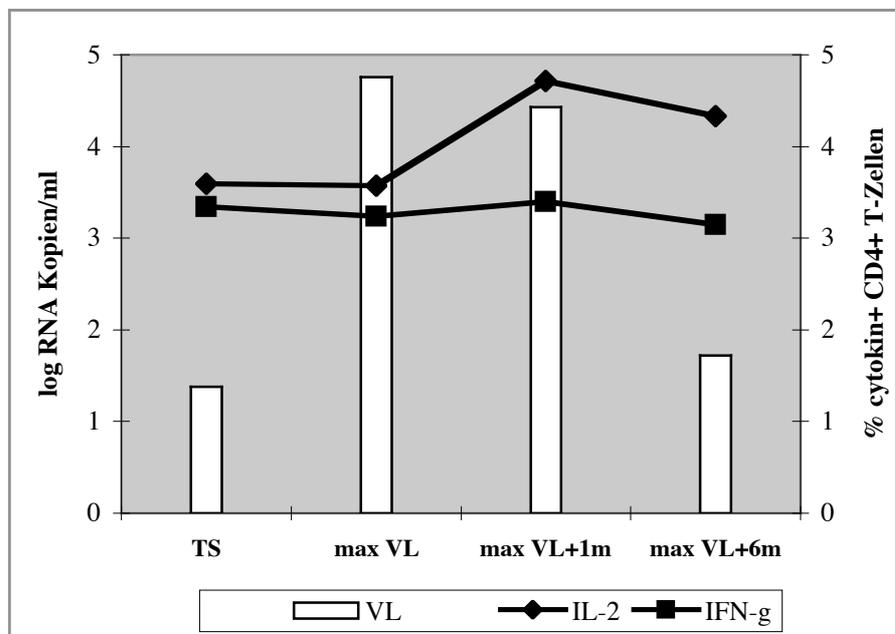


Abb. 3.2.9.1: Zytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit SEB. Mediane von neun Patienten.

Bei der Stimulation mit Cytomegaloviruslysate (CMV) und Tetanus Toxoid (TT) wurden nur Patienten berücksichtigt, deren Antwort gegen das jeweilige Protein deutlich gegenüber der Kontrolle ohne Antigen erhöht war.

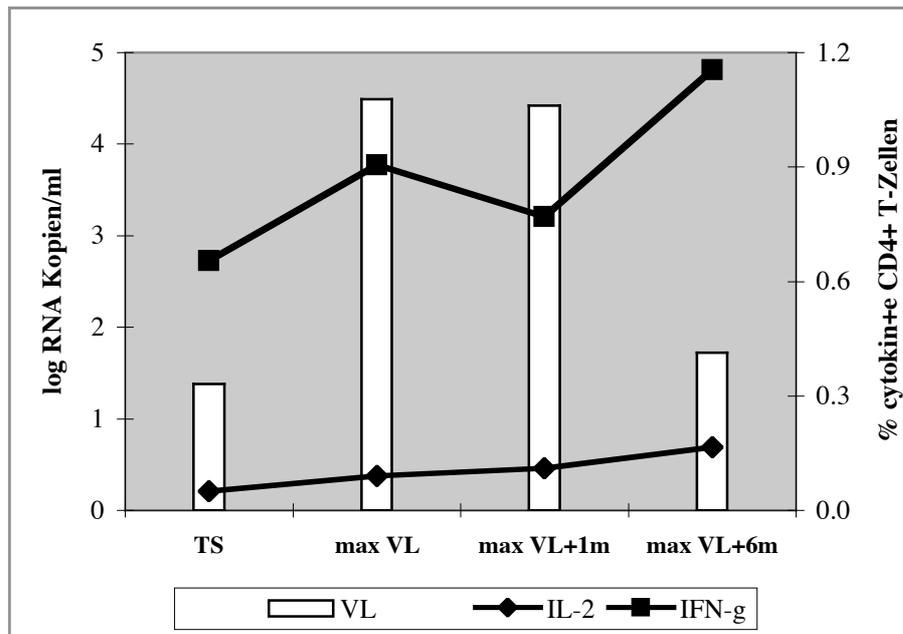


Abb. 3.2.9.2: Zytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit CMV. Mediane von acht Patienten.

Die Therapieunterbrechung führte bei Stimulation mit CMV zu einer Erhöhung der Expression sowohl von IL-2 als auch von IFN- γ die auch nach dem Absinken der Viruslast anhielt (Abb. 3.2.9.2)

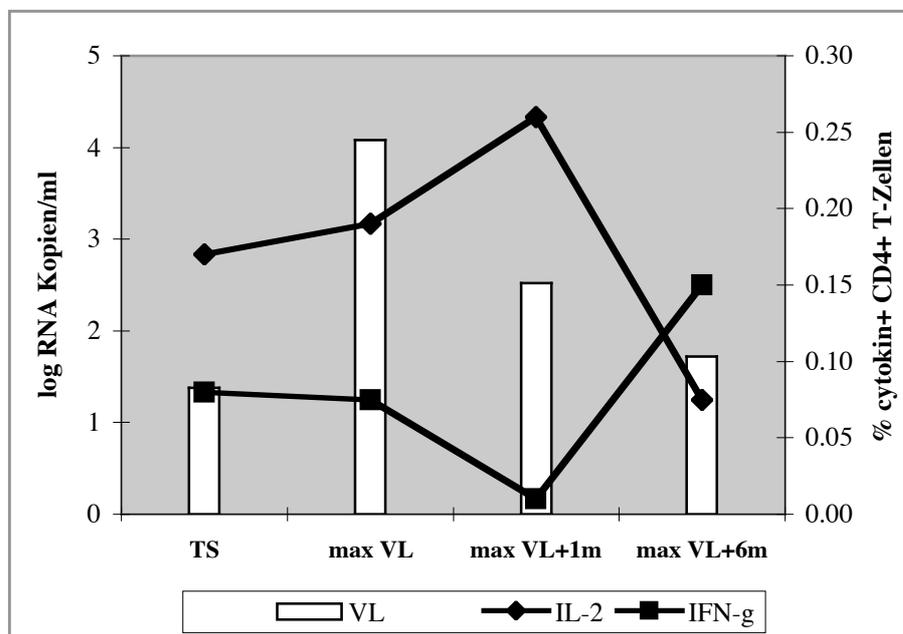


Abb. 3.2.9.3: Zytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit TT. Mediane von sieben Patienten.

Die Stimulation mit TT führte, wie schon die unspezifische Aktivierung der Zellen mit PMA, zu gegenläufigen Antworten von IL-2 und IFN- γ (Abb. 3.2.9.3). Hier nahm jedoch die

Expression von IL-2 mit steigender Viruslast verzögert zu, um mit niedriger Viruslast wieder abzufallen, während nach Stimulation mit PMA IFN- γ anstieg. Die Expression dieses Zytokins fiel nach Stimulation mit TT im Verlauf der Therapieunterbrechung, um nachfolgend wieder anzusteigen.

3.2.10 Färbung mit HLA-Tetrameren

Die Färbung mit fluoreszenzmarkierten, peptidtragenden HLA-Tetrameren gibt schnell und einfach Aufschluß über den Anteil der im Blut zirkulierenden, antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen. Es standen zwei dieser Moleküle zur Verfügung: ein HLA-A2-Tetramer, an welches das Peptid SLYNTVATL aus Gag-p17 gebunden war (A2-SL9), und ein HLA-B8-Tetramer mit FLKEKGGL aus Nef (B8-FL8). Beide Tetramere wurden an jeweils einem Patienten mit dem passenden HLA-Haplotyp gemessen.

Da Tetramer-positive Zellen auch aus gefrorenen Proben analysiert werden können, wurde der Verlauf der HIV-spezifischen Zellen vor, unter und nach HAART dokumentiert.

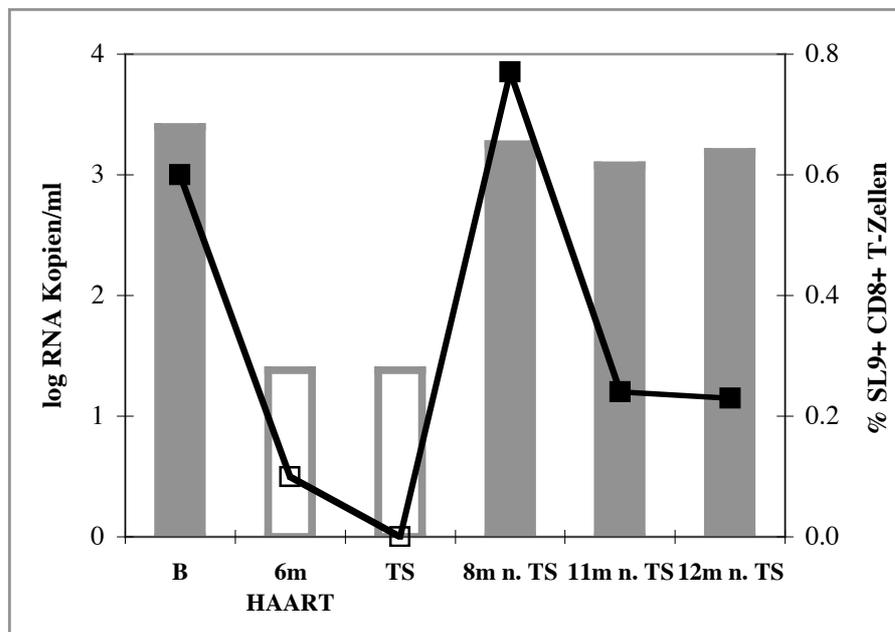


Abb. 3.2.10.1: A2-SL9⁺ CD8⁺ T-Zellen von Patient 1051 unter HAART und nach Therapiestop

Der Anteil der HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen korrelierte in beiden Patienten signifikant mit der Viruslast ($P=0.0333$ für A2-SL9 und $P=0.0123$ für B8-FL8). Vor Therapiebeginn waren 0.6% A2-SL9⁺ bzw. 4.33% B8-FL8⁺ CD8⁺ T-Zellen vorhanden, die beide unter Therapie stark abnahmen; bei Patient 1051 gingen die A2-SL9-spezifischen Zellen sogar auf unter die

Nachweisgrenze zurück (Abb. 3.2.10.1). Dies liegt wahrscheinlich an der verhältnismäßig niedrigen Frequenz der Tetramere und an der langen Therapiedauer (19 Monate). Patient 2016 war insgesamt nur 12 Monate therapiert und wies eine insgesamt höhere Frequenz auf, daher sind bei ihm auch zu Therapiestop noch spezifische Zellen nachzuweisen (Abb. 3.2.10.2). Nach Therapiestop kam es bei beiden Patienten parallel zur Viruslast zum Wiederanstieg der HIV-spezifischen CTL, die bei am Zeitpunkt der maximal gemessenen Viruslast bei 1051 0.77% und bei 2016 4.76% der CD8⁺ T-Zellen ausmachten und somit bei beiden Patienten höher lagen als der Ausgangswert. Nachfolgend kam es in beiden Patienten wieder zu einer leichten Reduktion der Tetramer⁺ Zellen (s. Abbildungen).

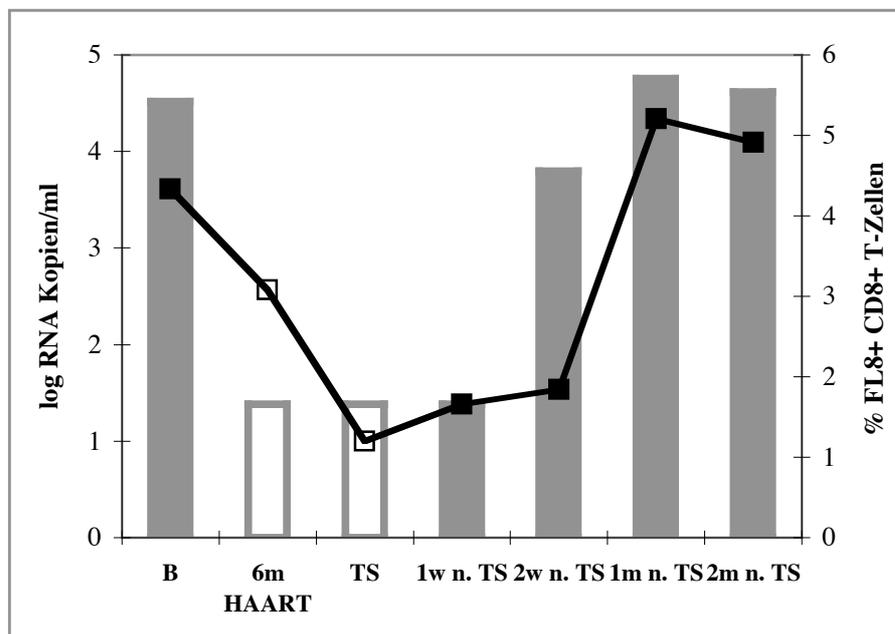


Abb. 3.2.10.2: B8-FL8⁺ CD8⁺ T-Zellen von Patient 2016 unter HAART und nach Therapiestop

3.2.11 ELISpots

Während HLA-Tetramere schnell und einfach Angaben über bestimmte HIV-spezifische T-Zellen ermöglichen, dienen ELISpots eher der breiten Erfassung der CTL-Antwort, da mit ihnen eine große Anzahl von Peptiden mit einer relativ geringen Zellzahl getestet werden kann. Zusätzlich liefert der ELISpot nicht nur eine Aussage über die Spezifität der Zellen, sondern auch gleich über ihre Fähigkeit, IFN- γ zu produzieren.

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

In Depletionsversuchen konnte gezeigt werden, daß die Produktion von IFN- γ nach Stimulation mit HLA Klasse I-Peptiden auf CD8⁺ T-Zellen beschränkt war^{3, 6}. Es wurden daher unfraktionierte PBMC in diesem Assay eingesetzt, die gleichzeitig auch als antigen-präsentierende Zellen fungierten. Die so erzielten Ergebnisse wurden als „Punkt-bildende Zellen“ (spot forming cells, SFC) pro Million eingesetzter PBMC angegeben. ELISpots zeigen auch bei gefrorenem Material gute Ergebnisse, so daß PBMC retrospektiv analysiert werden konnten. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden alle zu einem Zeitpunkt mit verschiedenen Peptiden erhaltenen SFC addiert, die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der erkannten Peptide. Es wurden zwei Patienten ausgewählt, zu denen auch Daten zu Tetramer-Färbungen vorlagen.

Da nicht zu allen HLA-Typen die gleiche Anzahl an optimalen Peptiden beschrieben ist, wurden bei Patient 1051 13 Peptide eingesetzt (acht A2-, zwei A32- und drei B44-Peptide), während Patient 2016 33 Peptide verfügbar waren (vier A1-, acht A3-, zwölf B7- und neun B8-Peptide). Dies spiegelte sich in einer um eine Logstufe stärkeren und breiteren Immunantwort von Patient 2016 wider (Abb. 3.2.11.1 und Abb. 3.2.11.2). Trotz der unterschiedlich ausgeprägten Antwort war jedoch bei beiden Patienten die Korrelation der Anzahl der HIV-spezifischen CTL mit der Viruslast zu erkennen, die unter Therapie abnahmen, um nach Therapieunterbrechung mit zunehmender Viruslast wieder anzusteigen.

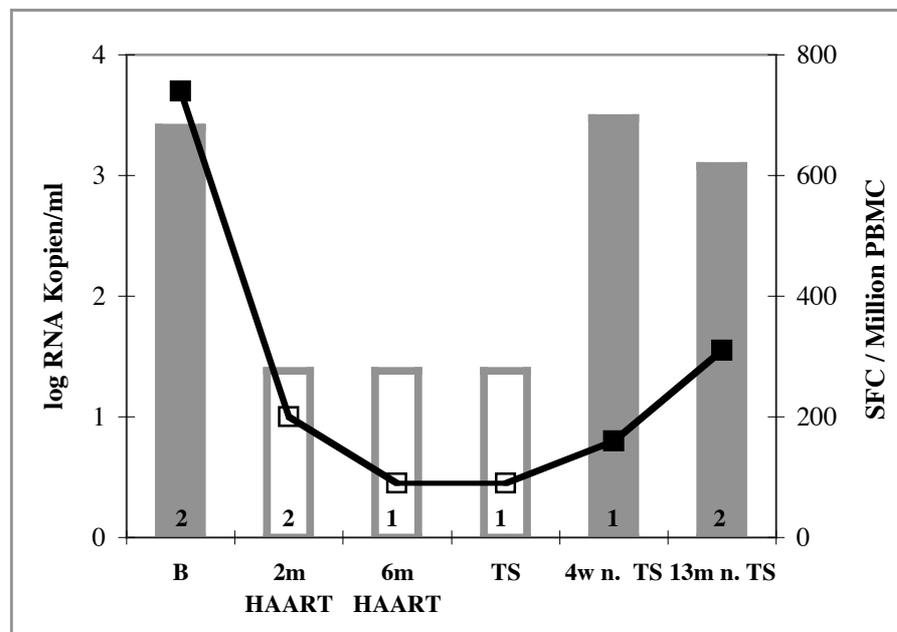


Abb. 3.2.11.1: SFC pro Million PBMC und Anzahl erkannter Epitope von 1051 unter HAART und nach Therapiestop

Dabei konnte die Zahl der IFN- γ produzierenden Zellen unter Therapie unter die Nachweisgrenze des Assays fallen, so daß Antworten gegen einige Epitope unter HAART zu verschwinden schienen, dann mit steigender Virusreplikation allerdings wieder auftauchten (Abb. 3.2.12.1).

Der leichte Anstieg der SFC unter Therapie bei Patient 2016 wird auch bei akut Infizierten unter Therapie beobachtet ³. Er läßt sich dadurch erklären, daß die verringerte Viruslast zu einer Verbesserung der Immunkontrolle führt, die sich durch das noch nachweisbare Virus gegen HIV richtet ³.

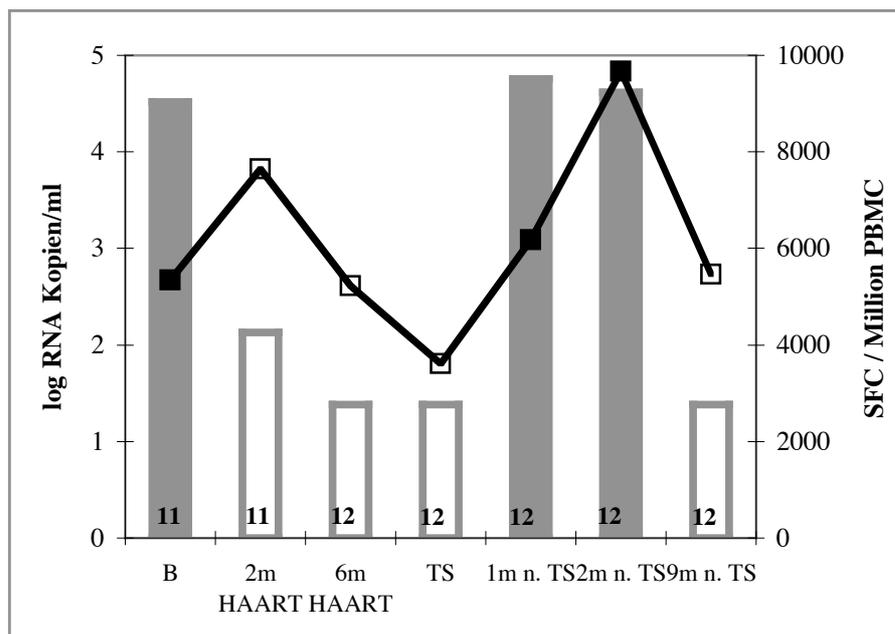


Abb. 3.2.11.2: SFC pro Million PBMC und Anzahl erkannter Epitope von 2016 unter HAART und nach Therapiestop

Insgesamt bestätigten die Ergebnisse des ELISpots die der Tetramer-Färbungen; beide Methoden zeigten eine gute Korrelation der HIV-spezifischen T-Zellen mit der Viruslast.

3.2.12 Intrazelluläre Zytokin-Färbung

Zur genauen Quantifizierung der HIV-spezifischen CTL-Antwort wurden PBMC mit den Peptiden, die die beste Antwort im ELISpot ergeben hatten, stimuliert und die IFN- γ -Produktion der Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Mit Hilfe der intrazellulären Zytokin-Färbung (intracellular cytokine staining, ICS) konnte die Zytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen ausgeschlossen und der exakte Anteil der Peptid-spezifischen CTL bestimmt werden. Da in diesem Assay jedoch sehr viele Zellen benötigt werden war es notwendig, einen

ELISpot vorzuschalten. ICS wurden ebenso wie ELISpots und Tetramer-Färbungen an gefrorenem Material durchgeführt.

Ebenso wie beim ELISpot lagen die Antworten der beiden untersuchten Patienten fast eine Logstufe auseinander, zeigten aber den gleichen Verlauf und korrelierten beide mit der Viruslast (Abb. 3.2.12.1 und Abb. 3.2.12.2).

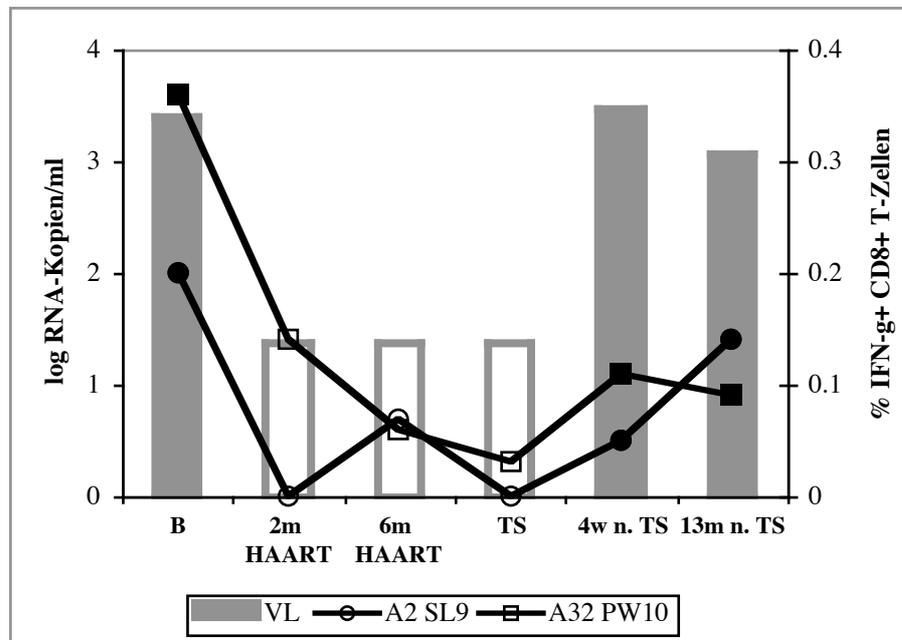


Abb. 3.2.12.1: IFN- γ -Produktion von CD8⁺ T-Zellen von 1051 nach Stimulation mit verschiedenen Peptiden unter HAART und nach Therapiestop.

Deutlich zeigte sich, daß CTL-Antworten die für verschiedene Epitope spezifisch waren, den gleichen zeitlichen Verlauf hatten und jeweils der Viruslast folgten (die Korrelation zwischen Viruslast und HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen war für B8-FL8 bei Patient 2016 signifikant, $P=0.0480$).

Auch im ICS war bei 2016 nach Therapiebeginn ein kurzer Anstieg der für das dominante Epitop spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu beobachten; dies bestätigt die Ergebnisse des ELISpot und zeigt, daß es sich bei dem Anstieg nicht um ein Artefakt handelte. Die Therapieunterbrechung führte zwar zu einer ausgeprägten, aber keiner dauerhaften Erhöhung der HIV-spezifischen Zellen, wie die Wiedereinführung von HAART bei 2016 verdeutlicht (Abb. 3.2.12.2).

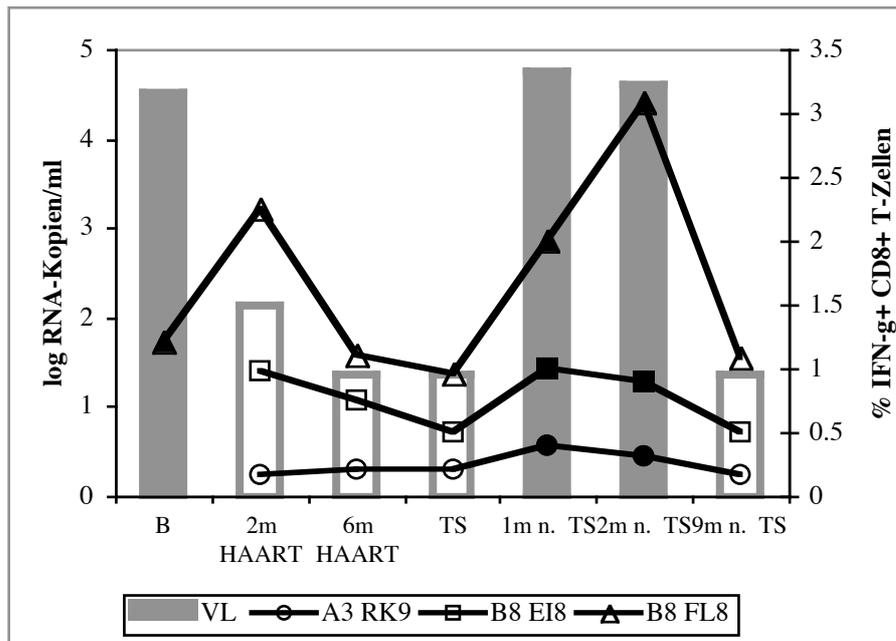


Abb. 3.2.12.2: IFN- γ -Produktion von CD8⁺ T-Zellen von Patient 2016 nach Stimulation mit verschiedenen Peptiden unter HAART und nach Therapiestop.

Insgesamt konnte mit drei verschiedenen Methoden gezeigt werden, daß HIV-spezifische CD8⁺ T-Zellen vor der Einführung von HAART in chronisch infizierten Patienten vorhanden waren, unter Therapie mit sinkender Viruslast teilweise auf unterhalb der Nachweisgrenze abnahmen und nach Therapieunterbrechung mit dem Rebound der Viruslast wieder anstiegen. Ebenso wurde mit zwei der Methoden gezeigt, daß dieses Wiederauftauchen der spezifischen CTL nicht von Dauer war und daß diese durch die erneute Viruskontrolle bei Wiedereinführung der Therapie wieder abnahmen.

4 Diskussion

Die moderne antiretrovirale Therapie mit Inhibitoren der viralen reversen Transkriptase oder Protease, aber auch neueren Ansätzen wie Inhibitoren der Fusion der Virusmembran mit der der Wirtszelle, unterliegt grundlegenden Wirkungsbeschränkungen. So führen diese Substanzen zwar zu einer Hemmung der Neuinfektion von Zellen, haben aber kaum Einfluß auf latent infizierte Zellen, so daß eine Virus-Eradikation nicht möglich erscheint. Es werden daher adjuvante Substanzen gesucht, die einen Einfluß auf die Etablierung oder Persistenz des viralen Reservoirs zeigen. Unter anderem werden zu diesem Zweck Zytostatika bzw. Immunsuppressiva wie Hydroxyurea oder Cyclosporin A in Betracht gezogen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effekte der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) mit oder ohne adjuvanter Gabe von Hydroxyurea im Vergleich zwischen Blut und lymphatischem Gewebe im Rahmen einer randomisierten, kontrollierten und prospektiven Studie (ARCHY). Virologische und immunologische Parameter wurden unter Therapie, also während der Reduktion der aktiven Virusreplikation, untersucht. Darüber hinaus wurde als Bestätigung des potentiellen Einflusses von Hydroxyurea auf das virale Reservoir in einer ausgewählten Subgruppe die Therapie abgesetzt und die Kinetik der wiedereinsetzenden Virusreplikation und die resultierenden immunologischen Veränderungen analysiert. Der Grund für die Wahl von Hydroxyurea war die Annahme, daß dieses Zytostatikum über die Inhibition der Ribonukleotid-Reduktase durch Hemmung der zellulären Aktivierung die Zahl an Target-Zellen in der Gegenwart von infektiösem Virus reduzieren könnte. Alternativ könnte die Reduktion des intrazellulären Nukleotidpools -- zusätzlich zur Verstärkung der Wirkung der verabreichten Nukleosidanaloga durch geringere Konkurrenz -- die virale Integration vermindern, da während des Integrationsprozesses intermediäre einzelsträngige DNA-Stücke gebildet werden, die durch eine Polymerase mit Nukleotiden komplementiert werden ⁷.

Unter der verabreichten Dreifachkombinationstherapie kam es wie erwartet unter HAART zu einer signifikanten Abnahme der Virusreplikation. Im Gesamtkollektiv wurde dabei die Plasmavirämie bis zum Ende der Verabreichung von Hydroxyurea in der Gruppe, die mit HU behandelt wurde, signifikant stärker reduziert als in der Gruppe, die ausschließlich die Dreifachkombination erhalten hatte. Der Unterschied war allerdings im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Beobachtungen gering, wahrscheinlich durch die starke antiretrovirale

Wirkung der bei ARCHY eingesetzten Dreifachkombination. Bisherige Untersuchungen setzten Hydroxyurea im Rahmen einer Monotherapie oder der Kombination von zwei Nukleosidanaloga ein und konnten daher einen wesentlich ausgeprägteren Einfluß auf den Abfall der Virämie beobachten ^{92, 145, 154}.

Neben der Plasmavirämie wurde auch die Kinetik der proviralen DNA in CD4⁺ T-Zellen als Maß für die Viruslatenz untersucht. Erwartungsgemäß korrelierte die Menge an proviraler DNA signifikant mit der viralen RNA im Plasma und nahm unter Therapie in Blut und Lymphknoten deutlich ab. Es fand sich jedoch in den Untersuchungen in keinem der beiden Kompartimente ein Unterschied in der Menge an proviraler DNA zwischen den beiden Behandlungsarmen. Dies schließt einen Einfluß von Hydroxyurea zwar nicht aus, dieser dürfte jedoch – wenn dennoch vorhanden -- sehr gering sein. Die Eliminationskinetik erschien nach Monat 1 linear; die von Furtado *et al.* beobachtete zweite Phase, in der der Anteil an HIV-DNA-positiven Zellen stagniert, tritt erst wesentlich später im Verlauf der Therapie auf ⁵⁶. Garrigue *et al.* beschrieben ebenfalls die in dieser Studie beobachtete, um eine Logstufe geringere HIV-DNA-Beladung nach einem Jahr HAART, allerdings in Gesamt-PBMC, ohne darauf einzugehen, daß unter Therapie die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen (und somit an potentiellen Trägern der proviralen DNA) anstieg ⁶¹.

Während der Verlauf der Lymphknotenbeladung mit viraler RNA unter Therapie relativ gut charakterisiert ist ^{41, 95-99}, gab es bisher keine longitudinalen Daten über die Menge an proviraler DNA im Lymphknoten nach mehr als acht Wochen HAART ¹⁷². Unter Mono- und Bitherapien wurden sowohl Zunahmen als auch Abnahmen der proviralen DNA im Lymphknoten beschrieben ^{95, 97}, was auf die deutlich geringeren antiretrovirale Potenz dieser Kombinationen zurückzuführen sein dürfte. Der in unserer Studie beobachtete höhere Anteil an HIV-DNA-positiven Zellen im Lymphknoten wurde von Querschnitts-Studien bestätigt ^{82, 114, 140}.

Zu der hier verwendeten Methodik ist kritisch anzumerken, daß ein Großteil der proviralen DNA aus nicht replikationsfähigem Provirus bestehen könnte und im Rahmen der zuvor abgelaufenen Virusreplikation über Jahre hinweg akkumuliert worden sein dürfte ¹⁹⁰. Ebenso ist es nicht möglich, zwischen integriertem und unintegriertem Provirus zu unterscheiden. Weiterhin wurde beschrieben, daß eine Zelle mehr als eine Kopie proviraler DNA enthalten kann ⁸³. Als Konsequenz ist eine Berechnung der absoluten Anzahl infizierter Zellen nicht ohne weiteres möglich. Es ist also nicht auszuschließen, daß trotz fehlender Signifikanz für

die Gesamtmenge proviraler DNA die Anzahl neu infizierter Zellen reduziert wird. Die hier erhobenen Daten können diese Frage aufgrund der oben erwähnten methodischen Einschränkungen nicht beantworten.

Die signifikante Verminderung des Anstiegs der CD4⁺T-Zellen bis Monat 6 in der mit HU behandelten Gruppe ist durch eine Hemmung der CD4⁺ Zellproliferation zu erklären, insbesondere da sich im Lymphknoten zu diesem Zeitpunkt kein Anhalt für eine präferentielle Lokalisation von proliferierenden CD4⁺ Zellen ergab. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls einen sehr schwachen Anstieg^{106, 154} oder sogar eine Abnahme der CD4⁺ T-Zellzahlen¹²⁰ bei der Einnahme von Hydroxyurea beobachteten. Dieser Effekt war bei Archy jedoch auf die Dauer der Einnahme (6 Monate) beschränkt und rasch reversibel, wie der sprunghafte Anstieg der CD4⁺ T-Zellzahl ab Monat 7 in der HU-Gruppe belegt. Auch spricht die zu Monat 12 vergleichbare T-Helfer-Zellzahl in beiden Therapiearmen gegen einen langanhaltenden Einfluß von Hydroxyurea. Es wurden keine deutlichen Veränderungen im Anteil an CD45RA⁺, naiven und CD45R0⁺ Memory-CD4⁺ T-Zellen beobachtet; der Anstieg der CD4⁺ T-Zellen im Blut verteilte sich gleichmäßig auf beide Subpopulationen. Die von anderen Gruppen beobachtete biphasische Kinetik konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden^{12, 135}.

Der Rückgang der absoluten CD8⁺ T-Zellzahl als Zeichen der Deaktivierung der CD8⁺ T-Zell-Immunantwort war wesentlich schwächer ausgeprägt als der Anstieg der CD4⁺ T-Zellzahl und erreichte keine statistische Signifikanz. Es kam jedoch in beiden Therapiearmen zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an naiven CD8⁺ T-Zellen im Blut, der sich durch das selektive Absterben hochaktivierter Effektorzellen erklären läßt.

Auch im Lymphknoten kam es wie erwartet unter Therapie zu einer signifikanten Erhöhung des CD4⁺ T-Zell-Anteils^{15, 16, 146} und der CD4⁺/CD8⁺Ratio, die insgesamt wesentlich höher lag als im Blut¹⁴⁰. Dies liegt an der Akkumulation von T-Helfer-Zellen in den T-Zell-Zonen des Lymphknotens. Das Absinken des Anteils an CD8⁺ T-Zellen war im Lymphknoten wesentlich ausgeprägter als im Blut und im Gegensatz zu anderen Studien statistisch signifikant¹⁵.

Der inzwischen erreichte Konsens über den erhöhten Umsatz von CD4⁺ T-Zellen in der unbehandelten HIV-Infektion wird von den Ergebnissen dieser Studie unterstützt. Vor Therapiebeginn war der Anteil proliferierender Zellen im Blut bei CD4⁺ T-Zellen im Mittel über viereinhalbfach, bei CD8⁺ T-Zellen sogar über neunfach höher als bei Normalkontrollen.

In beiden Therapiearmen kam es im Verlauf der Therapie zu einer hochsignifikanten Verringerung der Ki-67⁺ Lymphozyten, deren Anteil im Vergleich zu Normalkontrollen zu Monat 12 aber immer noch erhöht war. Der Anteil proliferierender Zellen korrelierte dabei signifikant mit der Virusbeladung und nicht mit der CD4⁺ T-Zellzahl, was dafür spricht, daß der erhöhte Umsatz durch die Präsenz des Antigens induziert wird und nicht über einen homöostatischen Mechanismus^{36, 75, 101}. Bis zum Ende der Gabe von Hydroxyurea nach sechs Monaten Therapie war die Anzahl proliferierender CD4⁺ T-Zellen im Therapiearm mit HU signifikant niedriger als ohne HU. Möglicherweise könnte dies auf einen von Hydroxyurea verursachten „cyclic arrest“ hindeuten.

Der zu Baseline deutlich erhöhte Anteil der proliferierenden Zellen im Lymphknoten nahm bis Monat 6 ab und war signifikant niedriger als der im Blut. Eine geringere Expression von Ki-67 in Lymphknoten wurde auch von Fleury *et al.* beschrieben, allerdings war in dieser Kohorte der Umsatz gegenüber Normalkontrollen nur unwesentlich erhöht⁵⁰. Im Gegensatz dazu zeigten Lempicki *et al.* einen weitaus höheren Anteil an proliferierenden Zellen im Lymphknoten im Vergleich zum Blut¹⁰¹. Weitere Studien der Proliferation im lymphatischen Gewebe wurden hauptsächlich an Gewebeschnitten vorgenommen^{44, 173, 193} und verzichteten auf einen Vergleich zum Blut.

Parallel zur Proliferation nahm auch der Anteil aktivierter T-Zellen unter Therapie in Blut und Lymphknoten deutlich ab. In Analogie zum Anteil Ki-67⁺ T-Zellen war auch die Expression von HLA-DR, CD38, CCR5 und CD95 mit der Plasmavirämie korreliert; dies bestätigt die Interpretation der Immunaktivierung als Folge der Antigenpräsenz. Der Rückgang der Expression von Aktivierungsmarkern unter HAART und die Korrelation mit der Viruslast wurden auch von anderen Gruppen für PBMC bestätigt^{36, 88}. Ein signifikanter Einfluß von Hydroxyurea auf die Expression der Aktivierungsmarker konnte nicht festgestellt werden. Dies könnte jedoch teilweise auf die unterschiedliche Expression dieser Marker zwischen den beiden Therapiearmen bereits zu Baseline zurückzuführen sein.

Während die Expression der Aktivierungsmarker signifikant zwischen PBMC und LNMC korrelierte, lag sie für HLA-DR und CD38 im Lymphknoten signifikant höher als im Blut. Die verstärkte Präsenz aktivierter Zellen im Lymphknoten wurde ebenso von anderen Gruppen beschrieben^{21, 100, 144}. Eine mögliche Erklärung ist die hohe Virusbeladung in den Lymphknoten, die einen direkten Einfluß auf den hohen Aktivierungsstatus der LNMC haben könnte.

Gegenläufig zu den Aktivierungsmarkern stieg die zu Therapiebeginn deutlich verringerte Expression von CD28 auf CD8⁺ T-Zellen im Verlauf der Therapie in Blut und Lymphknoten kontinuierlich an und erreichte im Lymphknoten nach 6 Monaten normale Werte, während sie im Blut auch nach 12 Monaten Therapie trotz des beobachteten Anstiegs um ein Drittel niedriger lag als bei Normalkontrollen. Dies stimmt mit publizierten Daten zur Normalisierung der Costimulationsfähigkeit von PBMC unter Therapie überein⁸⁸. Nur eine Studie befaßte sich bisher mit dem Verlauf der Expression von CD28 im Lymphknoten²¹; sie bestätigte zwar die vor Therapie erniedrigte Expression von CD28 auf PBMC und die im Verhältnis höhere Expression auf LNMC, beschrieb jedoch im Gegensatz zu den hier daargestellten Ergebnissen unter Therapie eine Abnahme der CD28⁺ CD8⁺ LNMC.

Auch bei B-Zellen kam es unter Therapie zu einer deutlichen Abnahme der anfangs erhöhten Proliferation und Aktivierung (gemessen an der Expression von CD38) der PBMC und LNMC. Im Gegensatz zur Proliferation von T-Lymphozyten war die Proliferationsrate von B-Zellen im Lymphknoten signifikant höher als im Blut. Der gesteigerte Anteil proliferierender B-Zellen im Lymphknoten ist darauf zurückzuführen, daß der überwiegende Anteil der Virusreplikation im Verlauf der Infektion in den Keimzentren stattfindet. Antigen-präsentierende Zellen könnten hier den B-Zellen virale Antigene präsentieren, was eine verstärkte Proliferation spezifischer B-Zellen zur Folge hätte. Alternativ könnten sie direkt durch aktivierte T-Zellen, z.B. durch CD40/jCD40L-Interaktion, stimuliert werden. Es stehen keine Normalwerte für die Expression eines Aktivierungsmarkers auf B-Zellen im Vergleich zu HIV-Infizierten zur Verfügung; die verstärkte Proliferation von B-Zellen im Lymphknoten wurde auch von Lempicki *et al* beschrieben¹⁰¹. Die erhobenen Daten belegen, daß HIV nicht nur die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten beeinflusst, sondern auch direkt oder indirekt (über die Wechselwirkung der B-Zellen mit T-Helfer-Zellen oder APCs) einen wesentlichen Einfluß auf den Aktivierungsstatus der B-Zellen ausübt. Das histologische Korrelat dieses Phänomens ist die folliculäre Hyperplasie, die als charakteristische Veränderung bei HIV-Infektionen gilt.

Die überwiegende Anzahl der Patienten in der relativ frühen Phase des Infektionsverlaufs, in der Patienten für die Studie rekrutiert wurden, weisen R5-trope HIV-Stämme auf¹⁸⁰. Zur Abschätzung der Menge an potentiellen Targetzellen für die HIV-Replikation analysierten wir

daher nicht nur Aktivierungs- und Proliferationsmarker, sondern auch die Expression des CCR5-Korezeptors auf CD4⁺ T-Zellen. Das Fehlen eines Unterschieds zwischen den Therapiearmen ist ein weiteres Argument gegen eine Beeinflussung der Menge an Targetzellen für die HIV-Replikation durch Hydroxyurea als Grundlage des adjuvanten antiretroviralen Effekts.

Um die Veränderung der Immunregulation nicht nur auf phänotypischer, sondern auch auf funktioneller Ebene zu charakterisieren, erfolgten Untersuchungen der Zytokin-Produktion nach *in vitro*-Stimulation. Im Rahmen ihrer pleiotropen Effekte spielen Zytokine eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Immunantwort im Verlauf einer Infektion. Eine Schlüsselrolle im Zusammenspiel der Zytokine kommt dabei den Interleukinen (IL)-12 und IL-4 zu, die hauptsächlich für die Polarisierung zu einer zellulären (IL-12) oder einer humoralen (IL-4) Immunantwort verantwortlich gemacht werden^{130, 162}. Schon relativ früh wurde deutlich, daß die HIV-Infektion zu Störungen der Zytokin-Produktion führt³²⁻³⁴, jedoch konnte diese bisher nicht genau charakterisiert werden. Die in dieser Arbeit gesammelten Daten sprechen für einen Einfluss der antiretroviralen Therapie im Sinne einer Tendenz zur Verbesserung der antigeninduzierten Produktion von IL-2 und IFN- γ ohne daß sie jedoch einen (positiven oder negativen) Einfluss von Hydroxyurea erkennen lassen.

Die Einleitung einer antiretroviralen Therapie ermöglicht, das biologische System der chronischen HIV-Infektion durch eine definierte Intervention zu beeinflussen und sein Verhalten daraufhin zu analysieren. Dieses Vorgehen erlaubt Schlußfolgerungen auf das Verhalten des Systems im „steady state“. In dieser Studie wurde die Validität der beobachteten Veränderungen durch HAART durch die quasi konträre biologische Situation verifiziert, indem die Therapie bei einer Gruppe von Patienten unterbrochen wurde. Diese Therapiepause erfolgte in individueller Absprache mit den Patienten, wobei die Wünsche der Patienten nach einer eventuellen Fortführung der Therapie den Ausschlag gaben.

Angesichts des fehlenden Effekts von Hydroxyurea auf die meisten der analysierten Parameter wurden zur Untersuchung der endogenen Immunkontrolle der Virusreplikation Patienten der COSMIC-Studie, die eine Vierfachkombinationstherapie mit adjuvantischem IL-2 erhalten hatten¹⁷⁰, hinzugezogen.

Obwohl die 15 ausgewählten Patienten optimal vorbehandelt waren und ihre Plasmavirämie im Median über ein Jahr unterhalb der sensitiven Nachweisgrenze von 25 RNA-Kopien/ml

lag, zeigten alle innerhalb kurzer Zeit (median 3 Wochen) einen Wiederanstieg der Viruslast, der bei 14 Patienten den prätherapeutischen Werten entsprach. 13 Patienten waren in der Lage, nach dem Durchlaufen eines Maximums die Viruslast ohne Therapie wieder zu senken. Bei 10 Patienten mußte trotzdem nach einer dreimonatigen Pause eine Therapie wiedereingeleitet werden. Die restlichen fünf Patienten kontrollierten die Plasmavirämie auf relativ niedrigem Niveau; dies entsprach jedoch den prätherapeutischen Werten. Das Absetzen von HAART bei Patienten, die in der chronischen Phase der HIV-Infektion behandelt wurden, führte auch in anderen Studien unweigerlich zum „rebound“ der Plasmavirämie ^{30, 38, 60, 73, 77, 124, 138, 152}.

Auch die vielversprechenden Daten von Patienten, die noch vor oder während der Serokonversion behandelt wurden, und in denen nach sequenziellen Therapieunterbrechungen eine verstärkte Immunantwort gemessen werden konnte ^{103, 133, 149, 183}, müssen seit neuestem relativiert werden. Zu den Gründen für den (teilweise erst nach über 600 Tagen Therapiepause) beobachteten Verlust der Immunkontrolle über die Virusreplikation wurden die graduelle genetische Evolution des infizierenden Virus ¹⁸⁵ mit konsekutivem immunologischen „escape“ oder potentielle Superinfektionen mit einem zweiten Virus ⁴ identifiziert.

In den COSMIC- und ARCHY-Studien führte eine *quasi* Normalisierung der absoluten CD4⁺ Zellzahl zu keiner Veränderung des virologischen „set points“. Dies spricht für frühzeitig – während der Primärinfektion -- entstandene qualitative Defizite im T-Zell-Repertoire, die später durch HAART nicht ausgeglichen werden können.

Einhergehend mit der steigenden Plasmavirämie sank die Zahl der CD4⁺ T-Zellen, während die der CD8⁺ T-Zellen zunahm. Dies hatte die Reversion der vor Therapiestop normalisierten CD4⁺/CD8⁺ Ratio zur Folge. Die während der Therapiepause rasch sinkenden T-Helfer-Zellzahlen und/oder ein geringerer relativer Anteil dieser Zellen wurden bei den meisten Untersuchungen zu Therapieunterbrechungen beobachtet ^{38, 58, 60, 138, 192}; nur eine Arbeitsgruppe stellte keine Veränderungen fest ^{152, 153}.

Der parallel zum Wiedereinsetzen der Virusreplikation beobachtete Anstieg der späten Aktivierungsmarker HLA-DR und CD38 und des Proliferationsmarkers Ki-67 zeigt, daß die unter Therapie erreichte Normalisierung des Aktivierungsstatus der Lymphozyten von der Präsenz des Antigens moduliert wird ³⁸. Dies wird nach Wiedereinführung der Therapie durch

die daraufhin abnehmende Aktivierung der Zellen bei sinkender Viruslast nochmals verdeutlicht. Gleichzeitig kam es zu einer Verringerung der Expression der frühen Aktivierungsmarker¹¹⁰. Eine mögliche Erklärung für die verringerte Expression früher bei gleichzeitiger Hochregulierung später Aktivierungsmarker ist die durch HIV angeregte Ausreifung der Zellen in einen terminal differenzierten Status.

Auch andere Arbeiten befaßten sich mit der Veränderung der Expression von späten Aktivierungs- und Proliferationsmarkern nach Therapieunterbrechung; größtenteils stimmen die Ergebnisse mit den hier beschriebenen überein^{38, 60, 132, 152, 153}. Der Verlauf der frühen Aktivierungsmarker ist in anderen Studien zu Therapieunterbrechungen bisher nicht untersucht worden, so daß keine Vergleiche angestellt werden können.

Die Herunterregulation des costimulatorischen Markers CD28 in der Therapiepause steht im Gegensatz zum Anstieg dieses Markers unter Einleitung der Therapie. Da die verringerte Expression sowohl auf naiven als auch auf Memory-T-Zellen messbar war, ist sie wahrscheinlich kein Indiz für eine Ausdifferenzierung in Effektor-Zellen, die als CD28-negativ beschrieben wurden¹⁴, jedoch ausschließlich in der CD45RO⁺ Population zu finden sein sollten.

Die Ergebnisse der Analysen zum Nachweis HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen weisen darauf hin, daß es im Gegensatz zur Rekonstitution der T-Zellimmunität gegenüber opportunistischen Erregern durch die HAART¹³ nicht zu einer qualitativen Verbesserung der HIV-spezifischen CTL-Antwort kommt. Diese Interpretation wird dadurch erhärtet, daß die Untersuchungen unter Verwendung dreier unterschiedlicher Techniken erfolgten. Die untersuchten Patienten zeigten während der Therapiepause zwar durchaus einen gegenüber dem Zeitpunkt des Therapiestops erhöhten Anteil HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, dieser entsprach jedoch den zu Baseline (also vor Einsetzen der Therapie) gemessenen Werten, die während der Therapie sanken. Die von anderen Gruppen veröffentlichte Aussage, daß Therapieunterbrechungen zu einer Verbesserung der HIV-spezifischen Immunität führen^{59, 138, 153}, kann so nicht getroffen werden, da in den untersuchten Kohorten keine Baseline-Werte zur Verfügung standen. Bemerkenswert ist auch, daß die Stärke der HIV-spezifischen Antworten direkt mit der Viruslast korreliert, und dadurch bei Wiedereinsetzen der Therapie nach der Therapiepause wieder abnimmt. Diese Korrelation der Plasmavirämie mit der Stärke der HIV-spezifischen CTL wurde von einigen Gruppen bestätigt^{17, 22, 23}, während andere entweder eine negative Korrelation zwischen den beiden Parametern^{28, 42, 131, 178} oder gar keine

Korrelation finden ^{1, 37, 62}. Diese Diskrepanzen sind durch die sehr unterschiedlichen Methoden und untersuchten Kohorten zu erklären. Darüber hinaus liegen in den meisten Fällen Querschnittstudien und nicht longitudinale Beobachtungen wie in unserer Analyse zugrunde. In longitudinalen Analysen ist eine Korrelation der Immunantwort mit dem treibenden Antigen durchaus plausibel.

Zusätzlich konnte in Untersuchungen der HIV-spezifischen CTL-Antworten im Lymphknoten gezeigt werden, daß es sich bei den meisten der „neuen“ Antworten bei Therapieunterbrechungen um die Expansion von im Lymphknoten vorhandenen spezifischen Zellen handelte ⁵. Der erhoffte Effekt einer „endogenen Vakzinierung“ durch die Expression viraler Antigene bei wiedereinsetzender Virusreplikation wird also bei chronisch infizierten Patienten nicht erreicht -- weder bei einer vorhergehenden Behandlung mit einer immunstimulierenden noch mit einer immunsuppressiven Therapie.

Eine weitere interessante Beobachtung bei der Therapieunterbrechung ist die verstärkte Expression des Integrins CD103, das als Marker für „recent thymic emigrants“ postuliert wurde ¹¹³. Da die Produktion naiver T-Zellen durch den Thymus („thymic output“) in der HIV-Infektion reduziert ist, wäre eher eine Verminderung der Expression mit wiedereinsetzender Virusreplikation zu erwarten. Die in der untersuchten Kohorte fehlende Korrelation mit dem Anteil an „T cell receptor rearrangement excision circle“ (TREC)-enthaltenden Lymphozyten legt den Schluß nahe, daß es sich hier um eine Erhöhung des Anteils an CD103-exprimierenden, intraepithelialen Lymphozyten (IEL) zu handeln scheint. Der formale Nachweis konnte allerdings mangels eines weiteren Markers für IEL nicht erbracht werden. Es bleibt offen, warum diese Zellen bei verstärkter Virusreplikation in die Blutzirkulation eintreten.

Abschließend läßt sich feststellen, daß Hydroxyurea keine sinnvolle adjuvante immunmodulatorische Therapie für chronisch HIV-infizierte Patienten darzustellen scheint, die mit HAART behandelt werden. Der Therapiearm ohne Hydroxyurea zeigte größtenteils vergleichbare Werte für immunologische Parameter und für die Anzahl proviraler DNA-Kopien. Die nach sechs Monaten Therapie beobachtete signifikante Verminderung der Plasmavirämie bei Patienten, die mit Hydroxyurea behandelt wurden, hatte keinen Bestand nach weiteren sechs Monaten Dreifachkombinationstherapie, der Effekt war also nicht von Dauer. Angesichts der zumindest theoretischen Mutagenität eines Zytostatikums kommt eine

länger andauernde Behandlung nur in Frage, wenn seine Wirksamkeit eindeutig bewiesen werden kann; in dieser Studie kam es jedoch zu keiner Beeinflussung der Viruslatenz, ebensowenig der Viruskontrolle nach Absetzen der Therapie.

5 Zusammenfassung

Mit der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapien wurden Morbidität und Mortalität der HIV-Infektion dramatisch verringert. Das Ziel einer vollständigen Eradikation des Virus nach wenigen Jahren Therapie erwies sich jedoch mit den z.Z. zur Verfügung stehenden Medikamenten als nicht erreichbar. Daher werden weitere Therapieansätze, die eine immunmodulatorische Komponente beinhalten, in Erwägung gezogen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde in einer randomisierten, prospektiven Studie der Einfluß einer Dreifachkombinationstherapie mit oder ohne adjuvantem Hydroxyurea auf virologische und immunologische Parameter untersucht. Im Verlauf eines Jahres wurden dabei die Auswirkungen der Therapie auf die beiden Kompartimente Blut und Lymphknoten analysiert. Zusätzlich wurde bei einem Teil der Patienten eine kontrollierte Therapiepause durchgeführt und deren Effekte auf HIV-spezifische CTL-Antworten untersucht.

Allgemein kam es unter Therapie zu einer signifikanten Abnahme der Plasmavirämie, die mit der Verringerung der Immunaktivierung korrelierte. Unter Hydroxyurea wurde ein signifikant stärkerer Abfall der HIV-RNA-Kopien beobachtet, der erwartete Einfluß auf die HIV-DNA-Beladung blieb jedoch aus. Ebenso zeigte Hydroxyurea keine deutlichen Auswirkungen auf den Aktivierungsstatus der Lymphozyten.

Der Vergleich zwischen Lymphozyten aus Blut und lymphatischem Gewebe ergab eine signifikante Korrelation der meisten untersuchten Parameter zwischen PBMC und LNMC, jedoch waren häufig auch signifikante Unterschiede in der Höhe der Expression zu beobachten. Während Messungen an PBMC also nicht für die Erstellung eines Gesamtbildes der Lymphozyten extrapoliert werden können, entsprechen Verläufe in longitudinalen Studien, die an PBMC untersucht werden, in den meisten Fällen der Situation im Lymphknoten.

Die durchgeführte Therapieunterbrechung führte bei allen Patienten zu einem Wiederanstieg der Plasmavirämie auf prätherapeutische Werte und korrelierte mit der Immunaktivierung. Parallel dazu konnte auch eine Verstärkung der HIV-spezifischen CTL-Antworten gemessen werden. Diese war jedoch nur relativ: bei longitudinaler Betrachtung der HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zeigte sich, daß auch vor Therapiebeginn die CTL-Antwort deutlich stärker war als zu Therapiestop, so daß die in der Therapiepause gemessenen HIV-spezifischen Lymphozyten wie die Viruslast den vor Einführung der Therapie etablierten Setpoint wieder erreichten. (d.h. es kommt weder zu einer Veränderung des individuellen virologischen noch

des immunologischen „set points“, der wahrscheinlich in der Frühphase der Infektion determiniert wird und durch bisherige Therapien unbeeinflusst bleibt.)

Insgesamt zeigte sich, daß Hydroxyurea keine deutliche Verbesserung gegenüber einer klassischen Dreifachkombination darstellt. Angesichts der Toxizität (v.a. der theoretischen Mutagenität) kommt es daher u.E. als adjuvantes Therapeutikum mit dem Ziel einer Beeinflussung der Virulenz und/oder der Viruskontrolle nicht in Frage.

6 Abkürzungsverzeichnis

AICD	activation induced cell death
AIDS	acquired immune deficiency syndrome (erworbenes Immundefizienzsyndrom)
BrdU	Bromodeoxyuridin
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalovirus
DC	dendritic cell (dendritische Zelle)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOT	directly observed treatment (direkt beobachtete Behandlung)
FDC	follikuläre dendritische Zelle
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	human immune deficiency virus (Humanes Immundefizienzvirus)
HU	Hydroxyurea
ICS	intracellular cytokine staining
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN- α	Interferon- α
IL	Interleukin
LMNC	lymph node mononuclear cells (mononukleäre Lymphknotenzellen)
LTNP	long term non progressor
LTR	long terminal repeat
m1, 3, 6, 9, 12	Monat 1, 3, 6, 9, 12
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NES	nuclear export signal (nukleäres Exportsignal)
NNRTI	Nicht-Nukleosidanaloger Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	nukleosidanaloger Reverse-Transkriptase-Inhibitor
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre periphere Blutzellen)
PE	Probenentnahme
PI	Proteaseinhibitor
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

RRE	rev responsive element
RTE	recent thymic emigrant
SFC	spot forming cell
STI	structured treatment interruption (strukturierte Therapieunterbrechung)
RT	reverse Transkriptase
S/B	Screening/Baseline
TAR	transactivating response element
Tat	transactivator of transcription
TREC	T cell receptor rearrangement excision circle
VL	Viruslast

7 Literaturverzeichnis

1. **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.R. Goulder, E.S. Rosenberg, M. Altfeld, and B.D. Walker.** 2003. Comprehensive epitope analysis of HIV-1-specific T cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* **77**: 2081-2092.
2. **Aerzte-ohne-Grenzen,** 2002. Nachahmerprodukte für südafrikanische HIV/Aids-Patienten, in *Akut:www.Aerzte-ohne-Grenzen.de*. p. 5.
3. **Altfeld, M., E.S. Rosenberg, R. Shankarappa, J.S. Mukherjee, F.M. Hecht, R.L. Eldridge, M.M. Addo, S.H. Poon, M.N. Phillips, G.K. Robbins, P.E. Sax, S. Boswell, J.O. Kahn, C. Brander, P.J. Goulder, J.A. Levy, J.I. Mullins, and B.D. Walker.** 2001. Cellular Immune Responses and Viral Diversity in Individuals Treated during Acute and Early HIV-1 Infection. *J Exp Med* **193**: 169-180.
4. **Altfeld, M., T.M. Allen, X.G. Yu, M.N. Johnston, D. Agrawal, B.T. Korber, D.C. Montefiori, D.H. O'Connor, B.T. Davis, P.K. Lee, E.L. Maier, J. Harlow, P.J.R. Goulder, C. Brander, E.S. Rosenberg, and B.D. Walker.** 2002. HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus.[comment]. *Nature* **420**: 434-439.
5. **Altfeld, M., J. van Lunzen, N. Frahm, X.G. Yu, C. Schneider, R.L. Eldridge, M.E. Feeney, D. Meyer-Olson, H.J. Stellbrink, and B.D. Walker.** 2002. Expansion of pre-existing, lymph node-localized CD8+ T cells during supervised treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *Journal of Clinical Investigation* **109**: 837-43.
6. **Altfeld, M.A., B. Livingston, N. Reshamwala, P.T. Nguyen, M.M. Addo, A. Shea, M. Newman, J. Fikes, J. Sidney, P. Wentworth, R. Chesnut, R.L. Eldridge, E.S. Rosenberg, G.K. Robbins, C. Brander, P.E. Sax, S. Boswell, T. Flynn, S. Buchbinder, P.J. Goulder, B.D. Walker, A. Sette, and S.A. Kalams.** 2001. Identification of Novel HLA-A2-Restricted Human Immunodeficiency Virus Type 1-

- Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Epitopes Predicted by the HLA-A2 Supertype Peptide-Binding Motif. *J Virol* **75**: 1301-1311.
7. **Andrake, M.D. and A.M. Skalka.** 1996. Retroviral Integrase, Putting the Pieces Together. *J Biol Chem* **271**: 19633-36.
 8. **Angel, J.B., K.G. Parato, A. Kumar, S. Kravcik, A.D. Badley, C. Fex, D. Ashby, E. Sun, and D.W. Cameron.** 2001. Progressive human immunodeficiency virus-specific immune recovery with prolonged viral suppression. *J Infect Dis* **183**: 546-54.
 9. **anonymous.** 2001. Brazil plans to make generic AIDS drugs. *Nature* **412**: 848.
 10. **Appay, V., D.F. Nixon, S.M. Donahoe, G.M. Gillespie, T. Dong, A. King, G.S. Ogg, H.M. Spiegel, C. Conlon, C.A. Spina, D.V. Havlir, D.D. Richman, A. Waters, P. Easterbrook, A.J. McMichael, and S.L. Rowland-Jones.** 2000. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* **192**: 63-75.
 11. **Arno, A., L. Ruiz, M. Juan, M.K. Zayat, T. Puig, M. Balague, J. Romeu, R. Pujol, W.A. O'Brien, and B. Clotet.** 1998. Impact on the immune system of undetectable plasma HIV-1 RNA for more than 2 years. *AIDS* **12**: 697-704.
 12. **Autran, B., G. Carcelain, T.S. Li, C. Blanc, D. Mathez, R. Tubiana, C. Katlama, P. Debre, and J. Leibowitch.** 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* **277**: 112-6.
 13. **Autran, B., G. Carcelain, T.S. Li, G. Gorochov, C. Blanc, M. Renaud, M. Durali, D. Mathez, V. Calvez, J. Leibowitch, C. Katlama, and P. Debre.** 1999. Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunol Lett* **66**: 207-11.
 14. **Azuma, M., J.H. Phillips, and L.L. Lanier.** 1993. CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol* **150**: 1147-59.
 15. **Bart, P.A., J.Y. Meuwly, J.M. Corpataux, S. Yerly, P. Rizzardi, S. Fleury, M. Munoz, C. Knabenhans, C. Welbon, G. Pantaleo, and P.R. Meylan.** 1999. Sampling lymphoid tissue cells by ultrasound-guided fine needle aspiration of lymph nodes in HIV-infected patients. Swiss HIV Cohort Study. *Aids* **13**: 1503-9.
 16. **Bart, P.A., G.P. Rizzardi, G. Tambussi, J.P. Chave, A.G. Chapuis, C. Graziosi, J.M. Corpataux, N. Halkic, J.Y. Meuwly, M. Munoz, P. Meylan, W. Spreen, H. McDade, S. Yerly, L. Perrin, A. Lazzarin, and G. Pantaleo.** 2000. Immunological

- and virological responses in HIV-1-infected adults at early stage of established infection treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **14**: 1887-97.
17. **Betts, M.R., D.R. Ambrozak, D.C. Douek, S. Bonhoeffer, J.M. Brenchley, J.P. Casazza, R.A. Koup, and L.J. Picker.** 2001. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* **75**: 11983-91.
 18. **Biron, F., F. Lucht, D. Peyramond, A. Fresard, T. Vallet, F. Nugier, J. Grange, S. Malley, F. Hamedi-Sangsari, and J. Vila.** 1995. Anti-HIV activity of the combination of didanosine and hydroxyurea in HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **10**: 36-40.
 19. **Biron, F., F. Lucht, D. Peyramond, A. Fresard, T. Vallet, F. Nugier, J. Grange, S. Malley, F. Hamedi-Sangsari, and J. Vila.** 1996. Pilot clinical trial of the combination of hydroxyurea and didanosine in HIV-1 infected individuals. *Antiviral Res* **29**: 111-3.
 20. **Bohler, T., U. Wintergerst, R. Linde, B.H. Belohradsky, and K.M. Debatin.** 2001. CD95 (APO-1/Fas) expression on naive CD4(+) T cells increases with disease progression in HIV-infected children and adolescents: effect of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Journal of Infectious Diseases* **184**: 1225-7.
 21. **Bucy, R.P., R.D. Hockett, C.A. Derdeyn, M.S. Saag, K. Squires, M. Sillers, R.T. Mitsuyasu, and J.M. Kilby.** 1999. Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *Journal of Clinical Investigation* **103**: 1391-8.
 22. **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.
 23. **Buseyne, F., D. Scott-Algara, F. Porrot, B. Corre, N. Bellal, M. Burgard, C. Rouzioux, S. Blanche, and Y. Rivière.** 2002. Frequencies of ex vivo activated HIV-1-specific IFN-g producing CD8+ T cells in infected children correlate positively with plasma viral load. *J. Virol.* **76**: 12414-22.
 24. **Calzado, M.A., A. MacHo, C. Lucena, and E. Munoz.** 2000. Hydroxyurea inhibits the transactivation of the HIV-long-terminal repeat (LTR) promoter. *Clin Exp Immunol* **120**: 317-23.

25. **Carmichael, A., X. Jin, P. Sissons, and L. Borysiewicz.** 1993. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *Journal of Experimental Medicine* **177**: 249-56.
26. **Champagne, P., G.S. Ogg, A.S. King, C. Knabenhans, K. Ellefsen, M. Nobile, V. Appay, G.P. Rizzardi, S. Fleury, M. Lipp, R. Forster, S. Rowland-Jones, R.P. Sekaly, A.J. McMichael, and G. Pantaleo.** 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* **410**: 106-11.
27. **Chiasson, M.A., L. Berenson, W. Li, S. Schwartz, T. Singh, S. Forlenza, B.A. Mojica, and M.A. Hamburg.** 1999. Declining HIV/AIDS mortality in New York City. *J Acquir Immune Defic Syndr* **21**: 59-64.
28. **Chouquet, C., B. Autran, E. Gomard, J.M. Bouley, V. Calvez, C. Katlama, D. Costagliola, and Y. Riviere.** 2002. Correlation between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection. *AIDS* **16**: 2399-407.
29. **Chun, T.W., L. Stuyver, S.B. Mizell, L.A. Ehler, J.A. Mican, M. Baseler, A.L. Lloyd, M.A. Nowak, and A.S. Fauci.** 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13193-7.
30. **Chun, T.W., R.T. Davey Jr, D. Engel, H.C. Lane, and A.S. Fauci.** 1999. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* **401**: 874-875.
31. **Chun, T.W., D. Engel, S.B. Mizell, C.W. Hallahan, M. Fischette, S. Park, R.T. Davey Jr, M. Dybul, J.A. Kovacs, J.A. Metcalf, J.A.M. Mican, M.M. Berrey, L. Corey, H.C. Lane, and A.S. Fauci.** 1999. Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4+ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nature Medicine* **5**: 651-655.
32. **Clerici, M., F.T. Hakim, D.J. Venzon, S. Blatt, C.W. Hendrix, T.A. Wynn, and G.M. Shearer.** 1993. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest* **91**: 759-65.
33. **Clerici, M. and G.M. Shearer.** 1993. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* **14**: 107-11.

34. **Clerici, M. and G.M. Shearer.** 1994. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* **15**: 575-81.
35. **Clotet, B., L. Ruiz, C. Cabrera, A. Ibanez, M.P. Canadas, G. Sirera, J. Romeu, and J. Vila.** 1996. Short-term anti-HIV activity of the combination of didanosine and hydroxyurea. *Antiviral Ther* **1**: 189-93.
36. **Cohen Stuart, J.W., M.D. Hazebergh, D. Hamann, S.A. Otto, J.C. Borleffs, F. Miedema, C.A. Boucher, and R.J. de Boer.** 2000. The dominant source of CD4+ and CD8+ T-cell activation in HIV infection is antigenic stimulation. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **25**: 203-11.
37. **Dalod, M., M. Dupuis, J.C. Deschemin, D. Sicard, D. Salmon, J.F. Delfraissy, A. Venet, M. Sinet, and J.G. Guillet.** 1999. Broad, intense anti-human immunodeficiency virus (HIV) ex vivo CD8(+) responses in HIV type 1-infected patients: comparison with anti-Epstein-Barr virus responses and changes during antiretroviral therapy. *J Virol* **73**: 7108-16.
38. **Davey, R.T., Jr., N. Bhat, C. Yoder, T.W. Chun, J.A. Metcalf, R. Dewar, V. Natarajan, R.A. Lempicki, J.W. Adelsberger, K.D. Miller, J.A. Kovacs, M.A. Polis, R.E. Walker, J. Falloon, H. Masur, D. Gee, M. Baseler, D.S. Dimitrov, A.S. Fauci, and H.C. Lane.** 1999. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15109-14.
39. **Debatin, K.M., A. Fahrig-Faissner, S. Enenkel-Stoodt, W. Kreuz, A. Benner, and P.H. Krammer.** 1994. High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Research in Immunology* **145**: 146-51; discussion 155-8.
40. **Donehower, R.C.** 1992. An overview of the clinical experience with hydroxyurea. *Semin Oncol* **19**: 11-9.
41. **Dybul, M., T.W. Chun, D.J. Ward, K. Hertogs, B. Larder, C.H. Fox, J.M. Orenstein, B.F. Baird, Y. Li, L.G. Green, D. Engel, S. Liu, J.M. Mican, and A.S. Fauci.** 2000. Evaluation of lymph node virus burden in human immunodeficiency virus-infected patients receiving efavirenz-based protease inhibitor--sparing highly active antiretroviral therapy. *Journal of Infectious Diseases* **181**: 1273-9.
42. **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.
43. **Emery, S., W.B. Capra, D.A. Cooper, R.T. Mitsuyasu, J.A. Kovacs, P. Vig, M. Smolskis, L.D. Saravolatz, H.C. Lane, G.A. Fyfe, and P.T. Curtin.** 2000. Pooled analysis of 3 randomized, controlled trials of interleukin-2 therapy in adult human immunodeficiency virus type 1 disease.[comment]. *J Infect Dis* **182**: 428-34.
44. **Espersen, C., B. Pakkenberg, E. Harder, G. Pallesen, J. Gerstoft, B.K. Pedersen, and H. Ullum.** 2001. High levels of CD8-positive lymphocytes expressing CD45RO, granzyme B, and Ki-67 in lymph nodes of HIV-infected individuals are not associated with increased mortality. *AIDS Research & Human Retroviruses* **17**: 287-93.
45. **Fahey, J.L., J.M. Taylor, R. Detels, B. Hofmann, R. Melmed, P. Nishanian, and J.V. Giorgi.** 1990. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* **322**: 166-72.
46. **Ferbas, J., A.H. Kaplan, M.A. Hausner, L.E. Hultin, J.L. Matud, Z. Liu, D.L. Panicali, H. Nerng-Ho, R. Detels, and J.V. Giorgi.** 1995. Virus burden in long-term survivors of human immunodeficiency virus (HIV) infection is a determinant of anti-HIV CD8+ lymphocyte activity. *J Infect Dis* **172**: 329-39.
47. **Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L.M. Carruth, C. Buck, R.E. Chaisson, T.C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D.D. Ho, D.D. Richman, and R.F. Siliciano.** 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**: 1295-300.
48. **Finzi, D., J. Blankson, J.D. Siliciano, J.B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T.C. Quinn, R.E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R.F. Siliciano.** 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* **5**: 512-7.
49. **Fleury, S., R.J. de Boer, G.P. Rizzardi, K.C. Wolthers, S.A. Otto, C.C. Welbon, C. Graziosi, C. Knabenhans, H. Soudeyns, P.A. Bart, S. Gallant, J.M. Corpataux, M. Gillet, P. Meylan, P. Schnyder, J.Y. Meuwly, W. Spreen, M.P. Glauser, F. Miedema, and G. Pantaleo.** 1998. Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat Med* **4**: 794-801.

50. **Fleury, S., G.P. Rizzard, A. Chapuis, G. Tambussi, C. Knabenhans, E. Simeoni, J.Y. Meuwly, J.M. Corpataux, A. Lazzarin, F. Miedema, and G. Pantaleo.** 2000. Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5393-8.
51. **Foli, A., F. Lori, R. Maserati, C. Tinelli, L. Minoli, and J. Lisziewicz.** 1997. Hydroxyurea and didanosine is a more potent combination than hydroxyurea and zidovudine. *Antiviral Ther* **2**: 31-8.
52. **Frahm, N., P.J.R. Goulder, and C. Brander.** 2002. Total assessment of HIV specific CTL responses: Epitope clustering, processing preferences and the impact of HIV sequence heterogeneity*, *in* B.T. Korber, et al. (ed.), Book. Theoretical Biology and Biophysics Group: Los Alamos National Laboratory., Los Alamos, NM, USA.
53. **Frahm, N., C.M. Adams, R. Draenert, M.E. Feeney, K. Sango, N.V. Brown, D. SenGupta, T. Simonis, F.M. Marincola, A.G. Wurcel, D.R. Stone, C.J. Russell, P. Adolf, D. Cohen, T. Roach, A. StJohn, A. Khatri, B.T. Korber, J. Szinger, K. Davies, J. Mullins, P.J.R. Goulder, B.D. Walker, and C. Brander.** manuscript in preparation. Identification of highly immunodominant regions in HIV by comprehensive CTL screening of ethnically diverse populations.
54. **Frahm, N., H.J. Stellbrink, B. Meyer, C. Hoffmann, C. Loeliger, J.E. Schmitz, M. Kuroda, P. Champagne, G. Pantaleo, M. Altfeld, B.D. Walker, J. van Lunzen, and C.a.A.S. Groups.** manuscript in preparation. Therapy interruption in chronic HIV infection leads to rapid rebound of viral load and lymphocyte activation despite enhancement of CTL responses.
55. **Frankel, A.D. and J.A. Young.** 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**: 1-25.
56. **Furtado, M.R., D.S. Callaway, J.P. Phair, K.J. Kunstman, J.L. Stanton, C.A. Macken, A.S. Perelson, and S.M. Wolinsky.** 1999. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy.[comment]. *N Engl J Med* **340**: 1614-22.
57. **Gao, W.Y., D.G. Johns, S. Chokekuchai, and H. Mitsuya.** 1995. Disparate actions of hydroxyurea in potentiation of purine and pyrimidine 2',3'-dideoxynucleoside activities against replication of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8333-7.

58. **Garcia, F., M. Plana, G.M. Ortiz, S. Bonhoeffer, A. Soriano, C. Vidal, A. Cruceta, M. Arnedo, C. Gil, G. Pantaleo, T. Pumarola, T. Gallart, D.F. Nixon, J.M. Miro, and J.M. Gatell.** 2001. The virological and immunological consequences of structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *Aids* **15**: F29-40.
59. **Garcia, F., M. Plana, M. Arnedo, G.M. Ortiz, J.M. Miro, L. Lopalco, F. Lori, R. Pumarola, T. Gallart, and J.M. Gatell.** 2003. A cytostatic drug improves control of HIV-1 replication during structured treatment interruptions: a randomized study. *AIDS* **17**: 43-51.
60. **García, F., M. Plana, C. Vidal, A. Cruceta, W.A. O'Brien, G. Pantaleo, T. Pumarola, T. Gallart, J.M. Miró, and J.M. Gatell.** 1999. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* **13**: F79-F86.
61. **Garrigue, I., I. Pellegrin, B. Hoen, B. Dumon, M. Harzic, M.H. Schrive, D. Sereni, and H. Fleury.** 2000. Cell-associated HIV-1-DNA quantitation after highly active antiretroviral therapy-treated primary infection in patients with persistently undetectable plasma HIV-1 RNA. *AIDS* **14**: 2851-5.
62. **Gea-Banacloche, J.C., S.A. Migueles, L. Martino, W.L. Shupert, A.C. McNeil, M.S. Sabbaghian, L. Ehler, C. Prussin, R. Stevens, L. Lambert, J. Altman, C.W. Hallahan, J.C. de Quiros, and M. Connors.** 2000. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV- infected progressors and long-term nonprogressors. *J Immunol* **165**: 1082-92.
63. **Gerdes, J., H. Lemke, H. Baisch, H.H. Wacker, U. Schwab, and H. Stein.** 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology* **133**: 1710-5.
64. **Giorgi, J.V., Z. Liu, L.E. Hultin, W.G. Cumberland, K. Hennessey, and R. Detels.** 1993. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* **6**: 904-12.
65. **Giovannetti, A., F. Ensoli, F. Mazzetta, M. De Cristofaro, M. Pierdominici, D.S. Muratori, V. Fiorelli, and F. Aiuti.** 1999. CCR5 and CXCR4 chemokine receptor expression and beta-chemokine production during early T cell repopulation induced by highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol* **118**: 97-94.

66. **Goulder, P.J., M.A. Altfeld, E.S. Rosenberg, T. Nguyen, Y. Tang, R.L. Eldridge, M.M. Addo, S. He, J.S. Mukherjee, M.N. Phillips, M. Bunce, S.A. Kalams, R.P. Sekaly, B.D. Walker, and C. Brander.** 2001. Substantial Differences in Specificity of HIV-specific Cytotoxic T Cells in Acute and Chronic HIV Infection. *J Exp Med* **193**: 181-194.
67. **Gray, C.M., J. Lawrence, J.M. Schapiro, J.D. Altman, M.A. Winters, M. Crompton, M. Loi, S.K. Kundu, M.M. Davis, and T.C. Merigan.** 1999. Frequency of class I HLA-restricted anti-HIV CD8+ T cells in individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Immunol* **162**: 1780-8.
68. **Graziosi, C., G. Pantaleo, K.R. Gantt, J.P. Fortin, J.F. Demarest, O.J. Cohen, R.P. Sekaly, and A.S. Fauci.** 1994. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science* **265**: 248-52.
69. **Guay, L.A., P. Musoke, T. Fleming, D. Bagenda, M. Allen, C. Nakabiito, J. Sherman, P. Bakaki, C. Ducar, M. Deseyve, L. Emel, M. Mirochnick, M.G. Fowler, L. Mofenson, P. Miotti, K. Dransfield, D. Bray, F. Mmiro, and J.B. Jackson.** 1999. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* **354**: 795 – 802.
70. **Gulick, R.M., J.W. Mellors, D. Havlir, J.J. Eron, C. Gonzalez, D. McMahon, L. Jonas, A. Meibohm, D. Holder, W.A. Schleif, J.H. Condra, E.A. Emini, R. Isaacs, J.A. Chodakewitz, and D.D. Richman.** 1998. Simultaneous vs sequential initiation of therapy with indinavir, zidovudine, and lamivudine for HIV-1 infection: 100-week follow-up. *Jama* **280**: 35-41.
71. **Hammer, S.M., K.E. Squires, M.D. Hughes, J.M. Grimes, L.M. Demeter, J.S. Currier, J.J.J. Eron, J.E. Feinberg, H.H.J. Balfour, L.R. Deyton, J.A. Chodakewitz, and M.A. Fischl.** 1997. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team.[comment]. *N Engl J Med* **337**: 725-33.
72. **Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider.** 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-60.
73. **Harrigan, P.R., M. Whaley, and J.S.G. Montaner.** 1999. Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral therapy. *AIDS* **13**: F59-F62.

74. **Hatano, H., S. Vogel, C. Yoder, J.A. Metcalf, R. Dewar, R.T. Davey, Jr., and M.A. Polis.** 2000. Pre-HAART HIV burden approximates post-HAART viral levels following interruption of therapy in patients with sustained viral suppression. *Aids* **14**: 1357-63.
75. **Hazenberg, M.D., J.W. Stuart, S.A. Otto, J.C. Borleffs, C.A. Boucher, R.J. de Boer, F. Miedema, and D. Hamann.** 2000. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* **95**: 249-55.
76. **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 [see comments]. *Nature* **373**: 123-6.
77. **Ho, D.D. and L. Zhang.** 2000. HIV-1 rebound after anti-retroviral therapy. *Nat Med* **6**: 736-7.
78. **Hofmann, B., P. Nishanian, J.L. Fahey, I. Esmail, A.L. Jackson, R. Detels, and W. Cumberland.** 1991. Serum increases and lymphoid cell surface losses of IL-2 receptor CD25 in HIV infection: distinctive parameters of HIV-induced change. *Clin Immunol Immunopathol* **61**: 212-24.
79. **Hogan, C.M. and S.M. Hammer.** 2001. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med* **134**: 978-96.
80. **Hufert, F.T., J. van Lunzen, G. Janossy, S. Bertram, J. Schmitz, O. Haller, P. Racz, and D. von Laer.** 1997. Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. *AIDS* **11**: 849-57.
81. **Janeway, C.A. and P. Travers.** 1995. *Immunologie*. 2. ed, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
82. **Jobe, O., K. Ariyoshi, A. Marchant, S. Sabally, T. Corrah, N. Berry, S. Jaffar, and H. Whittle.** 1999. Proviral load and immune function in blood and lymph node during HIV-1 and HIV-2 infection. *Clinical & Experimental Immunology* **116**: 474-8.
83. **Jung, A., R. Maier, J.P. Vartanian, G. Bocharov, V. Jung, U. Fischer, E. Meese, S. Wain-Hobson, and A. Meyerhans.** 2002. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* **418**: 144.

84. **Kalams, S.A. and B.D. Walker.** 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* **188**: 2199-204.
85. **Kalams, S.A., S.P. Buchbinder, E.S. Rosenberg, J.M. Billingsley, D.S. Colbert, N.G. Jones, A.K. Shea, A.K. Trocha, and B.D. Walker.** 1999. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **73**: 6715-20.
86. **Kalams, S.A., P.J. Goulder, A.K. Shea, N.G. Jones, A.K. Trocha, G.S. Ogg, and B.D. Walker.** 1999. Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **73**: 6721-8.
87. **Kaslow, R.A., M. Carrington, R. Apple, L. Park, A. Munoz, A.J. Saah, J.J. Goedert, C. Winkler, S.J. O'Brien, C. Rinaldo, R. Detels, W. Blattner, J. Phair, H. Erlich, and D.L. Mann.** 1996. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature Medicine* **2**: 405-11.
88. **Kaufmann, G.R., J.J. Zaunders, P. Cunningham, and D.A. Cooper.** 1999. Phenotypic analysis of CD8+ T lymphocytes in a cohort of HIV type 1-infected patients treated with saquinavir, zidovudine, and two nucleoside analogs for 1 year, and association with plasma HIV type 1 RNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**: 963-72.
89. **Kilby, J.M., S. Hopkins, T.M. Venetta, B. DiMassimo, G.A. Cloud, J.Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M.R. Johnson, M.A. Nowak, G.M. Shaw, and M.S. Saag.** 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**: 1302-7.
90. **Kishimoto, T., H. Kikutani, A.E.G.K. von dem Borne, S.M. Goyert, D.Y. Mason, M. Miyasaka, L. Moretta, K. Okumura, S. Shaw, T.A. Springer, K. Sugamurak, and H. Zola,** eds.1998. *Leukocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens.*, Garland Publishing: New York, NY.
91. **Klein, S.A., J.M. Dobbmeyer, T.S. Dobbmeyer, M. Pape, O.G. Ottmann, E.B. Helm, D. Hoelzer, and R. Rossol.** 1997. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS* **11**: 1111-8.

92. **Kline, M.W., N.R. Calles, C. Simon, and H. Schwarzwald.** 2000. Pilot study of hydroxyurea in human immunodeficiency virus-infected children receiving didanosine and/or stavudine [In Process Citation]. *Pediatr Infect Dis J* **19**: 1083-6.
93. **Kovacs, J.A., S. Vogel, J.M. Albert, J. Falloon, R.T.J. Davey, R.E. Walker, M.A. Polis, K. Spooner, J.A. Metcalf, M. Baseler, G. Fyfe, and H.C. Lane.** 1996. Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* **335**: 1350-6.
94. **Kovacs, J.A., R.A. Lempicki, I.A. Sidorov, J.W. Adelsberger, B. Herpin, J.A. Metcalf, I. Sereti, M.A. Polis, R.T. Davey, J. Tavel, J. Falloon, R. Stevens, L. Lambert, R. Dewar, D.J. Schwartzentruber, M.R. Anver, M.W. Baseler, H. Masur, D.S. Dimitrov, and H.C. Lane.** 2001. Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *Journal of Experimental Medicine* **194**: 1731-41.
95. **Lafeuillade, A., C. Poggi, N. Profizi, C. Tamalet, and O. Costes.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 kinetics in lymph nodes compared with plasma. *Journal of Infectious Diseases* **174**: 404-7.
96. **Lafeuillade, A., C. Poggi, C. Tamalet, and N. Profizi.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 dynamics in different lymphoid tissue compartments. *Journal of Infectious Diseases* **176**: 804-6.
97. **Lafeuillade, A., C. Tamalet, C. Poggi, P. Pellegrino, C. Tourres, and J. Izopet.** 1997. Antiretroviral effect of zidovudine-didanosine combination on blood and lymph nodes. *AIDS* **11**: 67-72.
98. **Lafeuillade, A., H. Khiri, S. Chadapaud, G. Hittinger, and P. Halfon.** 2001. Persistence of HIV-1 resistance in lymph node mononuclear cell RNA despite effective HAART. *AIDS* **15**: 1965-9.
99. **Lafeuillade, A., C. Poggi, S. Chadapaud, G. Hittinger, M. Chouraqui, E. Delbeke, and S. Apollo.** 2001. HIV-1 induction-maintenance at the lymph node level: the "Apollo-97" Study. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **28**: 154-7.
100. **Landay, A.L., J. Bethel, and S. Schnittman.** 1998. Phenotypic variability of lymphocyte populations in peripheral blood and lymph nodes from HIV-infected individuals and the impact of antiretroviral therapy. DATRI 003 Study Group.

- Division of AIDS Treatment Research Initiative. *AIDS Research & Human Retroviruses* **14**: 445-51.
101. **Lempicki, R.A., J.A. Kovacs, M.W. Baseler, J.W. Adelsberger, R.L. Dewar, V. Natarajan, M.C. Bosche, J.A. Metcalf, R.A. Stevens, L.A. Lambert, W.G. Alvord, M.A. Polis, R.T. Davey, D.S. Dimitrov, and H.C. Lane.** 2000. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13778-83.
 102. **Levacher, M., F. Hulstaert, S. Tallet, S. Ullery, J.J. Pocidalo, and B.A. Bach.** 1992. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clinical & Experimental Immunology* **90**: 376-82.
 103. **Lisziewicz, J., E. Rosenberg, J. Lieberman, H. Jessen, L. Lopalco, R. Siliciano, B. Walker, and F. Lori.** 1999. Control of HIV despite the discontinuation of antiretroviral therapy [letter]. *N Engl J Med* **340**: 1683-4.
 104. **Lloyd, T.E., L. Yang, D.N. Tang, T. Bennett, W. Schober, and D.E. Lewis.** 1997. Regulation of CD28 costimulation in human CD8+ T cells. *J Immunol* **158**: 1551-8.
 105. **Lori, F., A. Malykh, A. Cara, D. Sun, J.N. Weinstein, J. Lisziewicz, and R.C. Gallo.** 1994. Hydroxyurea as an inhibitor of human immunodeficiency virus-type 1 replication. *Science* **266**: 801-5.
 106. **Lori, F., G. Malykh, A. Foli, R. Maserati, A. de Antoni, L. Minolli, D. Padrini, A. degli Antoni, E. Barchi, H. Jessen, M.A. Wainberg, R.C. Gallo, and J. Lisziewicz.** 1997. Combination of a Drug Targeting the Cell with a Drug Targeting the Virus Controls Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance. *AIDS Research and Human Retroviruses* **13**: 1403-1409.
 107. **Lori, F.** 1999. Hydroxyurea and HIV: 5 years later--from antiviral to immune-modulating effects. *AIDS* **13**: 1433-42.
 108. **Lori, F., M.G. Lewis, J. Xu, G. Varga, D.E. Zinn, Jr., C. Crabbs, W. Wagner, J. Greenhouse, P. Silvera, J. Yalley-Ogunro, C. Tinelli, and J. Lisziewicz.** 2000. Control of SIV rebound through structured treatment interruptions during early infection. *Science* **290**: 1591-3.

109. **Mahalingam, M., A. Pozniak, T.J. McManus, D. Vergani, and M. Peakman.** 1995. Cell cycling in HIV infection: analysis of in vivo activated lymphocytes. *Clin Exp Immunol* **102**: 481-6.
110. **Maino, V.C., M.A. Suni, J.J. Ruitenber, and R.M. Smith-McCollum,** FastImmune Assay System., Becton Dickinson.
111. **Markowitz, M., M. Saag, W.G. Powderly, A.M. Hurley, A. Hsu, J.M. Valdes, D. Henry, F. Sattler, A. La Marca, J.M. Leonard, and e. al.** 1995. A preliminary study of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease, to treat HIV-1 infection. *N Engl J Med* **333**: 1534-9.
112. **Mathez, D., P. Bagnarelli, I. Gorin, C. Katlama, G. Pialoux, G. Saimot, P. Tubiana, P. De Truchis, J.P. Chauvin, R. Mills, R. Rode, M. Clementi, and J. Leibowitch.** 1997. Reductions in viral load and increases in T lymphocyte numbers in treatment-naive patients with advanced HIV-1 infection treated with ritonavir, zidovudine and zalcitabine triple therapy. *Antivir Ther* **2**: 175-83.
113. **McFarland, R.D., D.C. Douek, R.A. Koup, and L.J. Picker.** 2000. Identification of a human recent thymic emigrant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4215-20.
114. **Meylan, P.R., P. Burgisser, C. Weyrich-Suter, and F. Spertini.** 1996. Viral load and immunophenotype of cells obtained from lymph nodes by fine needle aspiration as compared with peripheral blood cells in HIV-infected patients. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **13**: 39-47.
115. **Migueles, S.A., M.S. Sabbaghian, W.L. Shupert, M.P. Bettinotti, F.M. Marincola, L. Martino, C.W. Hallahan, S.M. Selig, D. Schwartz, J. Sullivan, and M. Connors.** 2000. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2709-14.
116. **Mitty, J.A., V.E. Stone, M. Sands, G. Macalino, and T. Flanigan.** 2002. Directly observed therapy for the treatment of people with human immunodeficiency virus infection: a work in progress. *Clinical Infectious Diseases* **34**: 984-90.
117. **Mocroft, A., M. Youle, A. Moore, C.A. Sabin, S. Madge, A.C. Lepri, M. Tyrer, C. Chaloner, D. Wilson, C. Loveday, M.A. Johnson, and A.N. Phillips.** 2001. Reasons for modification and discontinuation of antiretrovirals: results from a single treatment centre. *AIDS* **15**: 185-94.

118. **Mohri, H., S. Bonhoeffer, S. Monard, A.S. Perelson, and D.D. Ho.** 1998. Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science* **279**: 1223-7.
119. **Mohri, H., A.S. Perelson, K. Tung, R.M. Ribeiro, B. Ramratnam, M. Markowitz, R. Kost, A. Hurley, L. Weinberger, D. Cesar, M.K. Hellerstein, and D.D. Ho.** 2001. Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *Journal of Experimental Medicine* **194**: 1277-87.
120. **Montaner, J.S., C. Zala, B. Conway, J. Raboud, P. Patenaude, S. Rae, M.V. O'Shaughnessy, and M.T. Schechter.** 1997. A pilot study of hydroxyurea among patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV) disease receiving chronic didanosine therapy: Canadian HIV trials network protocol 080. *Journal of Infectious Diseases* **175**: 801-6.
121. **Moore, J.P., Y. Cao, D.D. Ho, and R.A. Koup.** 1994. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **68**: 5142-55.
122. **Moore, J.P.** 1997. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* **276**: 51-2.
123. **Mosier, D.E.** 1995. HIV results in the frame. CD4+ cell turnover.[comment]. *Nature* **375**: 193-4; author reply 198.
124. **Neumann, A.U., R. Tubiana, V. Calvez, C. Robert, T.S. Li, H. Agut, B. Autran, C. Katlama, and t.C.S. Group.** 1999. HIV-1 rebound during interruption of highly active antiretroviral therapy has no deleterious effect on reinitiated treatment. *AIDS* **13**: 677-683.
125. **Nicholson, J.K., S.W. Browning, R.L. Hengel, E. Lew, L.E. Gallagher, D. Rimland, and J.S. McDougal.** 2001. CCR5 and CXCR4 expression on memory and naive T cells in HIV-1 infection and response to highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* **27**: 105-15.
126. **Nokta, M.A., X.D. Li, J. Nichols, A. Pou, D. Asmuth, and R.B. Pollard.** 2001. Homeostasis of naive and memory T cell subpopulations in peripheral blood and lymphoid tissues in the context of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **183**: 1336-42.
127. **Norris, P.J. and E.S. Rosenberg.** 2002. CD4+ T helper cells and the role they play in viral control. *Journal of Molecular Medicine* **80**: 397-405.

128. **Novitsky, V., P. Gilbert, T. Peter, M.F. McLane, S. Gaolekwe, N. Rybak, I. Thior, T. Ndung'u, R. Marlink, T.H. Lee, and M. Essex.** 2003. Association between Virus-Specific T-Cell Responses and Plasma Viral Load in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Infection. *J Virol* **77**: 882-90.
129. **O'Brien, S.J., X. Gao, and M. Carrington.** 2001. HLA and AIDS: a cautionary tale. *Trends Mol Med* **7**: 379-81.
130. **O'Garra, A. and K. Murphy.** 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol* **6**: 458-66.
131. **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.
132. **Orenstein, J.M., N. Bhat, C. Yoder, C. Fox, M.A. Polis, J.A. Metcalf, J.A. Kovacs, J. Falloon, R.E. Walker, H. Masur, H.C. Lane, and R.T. Davey.** 2000. Rapid activation of lymph nodes and mononuclear cell HIV expression upon interrupting highly active antiretroviral therapy in patients after prolonged viral suppression. *AIDS* **14**: 1709-15.
133. **Ortiz, G.M., D.F. Nixon, A. Trkola, J. Binley, X. Jin, S. Bonhoeffer, P.J. Kuebler, S.M. Donahoe, M.A. Demoitie, W.M. Kakimoto, T. Ketas, B. Clas, J.J. Heyman, L. Zhang, Y. Cao, A. Hurley, J.P. Moore, D.D. Ho, and M. Markowitz.** 1999. HIV-1-specific immune responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy. *The Journal of Clinical Investigation* **104**: R13-R18.
134. **Ostrowski, M.a., S.J. Justement, A. Catanzaro, C.A. Hallahan, L.A. Ehler, S.B. Mizell, P.N. Kumar, J.A. Mican, T.W. Chun, and A.S. Fauci.** 1998. Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J Immunol* **161**: 3195-201.
135. **Pakker, N.G., D.W. Notermans, R.J. de Boer, M.T. Roos, F. de Wolf, A. Hill, J.M. Leonard, S.A. Danner, F. Miedema, and P.T. Schellekens.** 1998. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* **4**: 208-14.
136. **Palella, F.J., Jr., K.M. Delaney, A.C. Moorman, M.O. Loveless, J. Fuhrer, G.A. Satten, D.J. Aschman, and S.D. Holmberg.** 1998. Declining morbidity and mortality

- among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**: 853-60.
137. **Pantaleo, G. and A.S. Fauci.** 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* **50**: 825-54.
138. **Papasavvas, E., G.M. Ortiz, R. Gross, J. Sun, E.C. Moore, J.J. Heymann, M. Moonis, J.K. Sandberg, L.A. Drohan, B. Gallagher, J. Shull, D.F. Nixon, J.R. Kostman, and L.J. Montaner.** 2000. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 and CD8 T cell responses in chronically infected persons after temporary treatment interruption. *J Infect Dis* **182**: 766-75.
139. **Perelson, A.S., P. Essunger, Y. Cao, M. Vesanen, A. Hurley, K. Saksela, M. Markowitz, and D.D. Ho.** 1997. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**: 188-91.
140. **Perrin, L., S. Yerly, F. Marchal, G.A. Schockmel, B. Hirschel, C.H. Fox, and G. Pantaleo.** 1998. Virus burden in lymph nodes and blood of subjects with primary human immunodeficiency virus type 1 infection on bitherapy. *Journal of Infectious Diseases* **177**: 1497-501.
141. **Piguet, V., Y.L. Chen, A. Mangasarian, M. Foti, J.L. Carpentier, and D. Trono.** 1998. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *Embo J* **17**: 2472-81.
142. **Pitcher, C.J., C. Quittner, D.M. Peterson, M. Connors, R.A. Koup, V.C. Maino, and L.J. Picker.** 1999. HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* **5**: 518-25.
143. **Plaeger, S., H.Z. Bass, P. Nishanian, J. Thomas, N. Aziz, R. Detels, J. King, W. Cumberland, M. Kemeny, and J.L. Fahey.** 1999. The prognostic significance in HIV infection of immune activation represented by cell surface antigen and plasma activation marker changes. *Clin Immunol* **90**: 238-46.
144. **Ramzaoui, S., F. Jouen-Beades, F. Michot, F. Borsa-Lebas, G. Humbert, and F. Tron.** 1995. Comparison of activation marker and TCR V beta gene product expression by CD4+ and CD8+ T cells in peripheral blood and lymph nodes from HIV-infected patients. *Clinical & Experimental Immunology* **99**: 182-8.

145. **Ravot, E., G. Tambussi, H. Jessen, C. Tinelli, A. Lazzarin, J. Lisziewicz, and F. Lori.** 2000. Effects of hydroxyurea on T cell count changes during primary HIV infection [letter]. *Aids* **14**: 619-22.
146. **Rizzardi, G.P., G. Tambussi, P.A. Bart, A.G. Chapuis, A. Lazzarin, and G. Pantaleo.** 2000. Virological and immunological responses to HAART in asymptomatic therapy-naive HIV-1-infected subjects according to CD4 cell count. *AIDS* **14**: 2257-63.
147. **Rizzardi, G.P., A. Harari, B. Capiluppi, G. Tambussi, K. Ellefsen, D. Ciuffreda, P. Champagne, P.A. Bart, J.P. Chave, A. Lazzarin, and G. Pantaleo.** 2002. Treatment of primary HIV-1 infection with cyclosporin A coupled with highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* **109**: 681-8.
148. **Rosenberg, E.S., J.M. Billingsley, A.M. Caliendo, S.L. Boswell, P.E. Sax, S.A. Kalams, and B.D. Walker.** 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**: 1447-50.
149. **Rosenberg, E.S., M. Altfeld, S.H. Poon, M.N. Phillips, B.M. Wilkes, R.L. Eldridge, G.K. Robbins, R.T. D'Aquila, P.J. Goulder, and B.D. Walker.** 2000. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection [In Process Citation]. *Nature* **407**: 523-6.
150. **Rosenzweig, M., M.A. DeMaria, D.M. Harper, S. Friedrich, R.K. Jain, and R.P. Johnson.** 1998. Increased rates of CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte turnover in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6388-93.
151. **Ruiz, L., J. van Lunzen, A. Arno, H.J. Stellbrink, C. Schneider, M. Rull, E. Castella, I. Ojanguren, D.D. Richman, B. Clotet, K. Tenner-Racz, and P. Racz.** 1999. Protease inhibitor-containing regimens compared with nucleoside analogues alone in the suppression of persistent HIV-1 replication in lymphoid tissue [see comments]. *AIDS* **13**: F1-8.
152. **Ruiz, L., J. Martinez-Picado, J. Romeu, R. Paredes, M.K. Zayat, S. Marfil, E. Negrodo, G. Sirera, C. Tural, and B. Clotet.** 2000. Structured treatment interruption in chronically HIV-1 infected patients after long-term viral suppression. *AIDS* **14**: 397-403.
153. **Ruiz, L., G. Carcelain, J. Martinez-Picado, S. Frost, S. Marfil, R. Paredes, J. Romeu, E. Ferrer, K. Morales-Lopetegui, B. Autran, and B. Clotet.** 2001. HIV

- dynamics and T-cell immunity after three structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* **15**: F19-27.
154. **Rutschmann, O.T., M. Opravil, A. Iten, R. Malinverni, P.L. Vernazza, H.C. Bucher, E. Bernasconi, P. Sudre, D. Leduc, S. Yerly, L.H. Perrin, and B. Hirschel.** 1998. A placebo-controlled trial of didanosine plus stavudine, with and without hydroxyurea, for HIV infection. The Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* **12**: F71-7.
155. **Sachsenberg, N., A.S. Perelson, S. Yerly, G.A. Schockmel, D. Leduc, B. Hirschel, and L. Perrin.** 1998. Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *Journal of Experimental Medicine* **187**: 1295-303.
156. **Sanne, I., R.A. Smego, Jr., and B.V. Mendelow.** 2001. Systematic review of combination antiretroviral therapy with didanosine plus hydroxyurea: a partial solution to Africa's HIV/AIDS problem? *Int J Infect Dis* **5**: 43-8.
157. **Schlossman, S.F., L. Bousnell, W. Gilks, J.M. Harlan, T. Kishimoto, C. Morimoto, J. Ritz, S. Shaw, R.L. Silverstein, T.A. Springer, T.F. Tedder, and R.F. Todd,** eds. 1995. *Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.*, Oxford University Press: London, UK.
158. **Schluter, C., M. Duchrow, C. Wohlenberg, M.H. Becker, G. Key, H.D. Flad, and J. Gerdes.** 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Journal of Cell Biology* **123**: 513-22.
159. **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.
160. **Schubert, U., L.C. Anton, I. Bacik, J.H. Cox, S. Bour, J.R. Bennink, M. Orłowski, K. Strebel, and J.W. Yewdell.** 1998. CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol* **72**: 2280-8.
161. **Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J.M. Heard.** 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules induced by HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**: 338-42.

162. **Seder, R.A. and W.E. Paul.** 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* **12**: 635-73.
163. **Shearer, G.M. and M. Clerici.** 1992. T helper cell immune dysfunction in asymptomatic, HIV-1-seropositive individuals: the role of TH1-TH2 cross-regulation. *Chem Immunol* **54**: 21-43.
164. **Shearer, G.M.** 1998. HIV-induced immunopathogenesis. *Immunity* **9**: 587-93.
165. **Shearer, G.M. and M. Clerici.** 1998. Cytokine profiles in HIV type 1 disease and protection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 2**: S149-52.
166. **Silvestris, F., P. Cafforio, M.A. Frassanito, M. Tucci, A. Romito, S. Nagata, and F. Dammacco.** 1996. Overexpression of Fas antigen on T cells in advanced HIV-1 infection: differential ligation constantly induces apoptosis. *AIDS* **10**: 131-41.
167. **Sousa, A.E., A.F. Chaves, M. Doroana, F. Antunes, and R.M. Victorino.** 1999. Kinetics of the changes of lymphocyte subsets defined by cytokine production at single cell level during highly active antiretroviral therapy for HIV-1 infection. *J Immunol* **162**: 3718-26.
168. **Sprent, J. and D. Tough.** 1995. HIV results in the frame. CD4+ cell turnover.[comment]. *Nature* **375**: 194.
169. **Stellbrink, H.J., J. van Lunzen, C. Schneider, J.P. Jacobs, B. Raschdorff, G. Grosschupff, R.M. Steinman, and P. Racz.** 1998. Kinetics of productive and latent HIV infection in lymphatic tissue and peripheral blood during triple-drug combination therapy with or without additional interleukin-2. *Journal of Experimental Medicine* **187**: 949-59.
170. **Stellbrink, H.J., J. van Lunzen, M. Westby, E. O'Sullivan, C. Schneider, A. Adam, L. Weitner, B. Kuhlmann, C. Hoffmann, S. Fenske, P.S. Aries, O. Degen, C. Eggers, H. Petersen, F. Haag, H.A. Horst, K. Dalhoff, C. Mocklinghoff, N. Cammack, K. Tenner-Racz, and P. Racz.** 2002. Effects of interleukin-2 plus highly active antiretroviral therapy on HIV-1 replication and proviral DNA (COSMIC trial). *AIDS* **16**: 1479-87.
171. **Stewart, G.J., L.J. Ashton, R.A. Biti, R.A. Ffrench, B.H. Bennetts, N.R. Newcombe, E.M. Benson, A. Carr, D.A. Cooper, and J.M. Kaldor.** 1997. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS* **11**: 1833-8.

172. **Tamalet, C., A. Lafeuillade, J. Fantini, C. Poggi, and N. Yahi.** 1997. Quantification of HIV-1 viral load in lymphoid and blood cells: assessment during four-drug combination therapy. *AIDS* **11**: 895-901.
173. **Tenner-Racz, K., H.J. Stellbrink, J. van Lunzen, C. Schneider, J.P. Jacobs, B. Raschdorff, G. Grosschupff, R.M. Steinman, and P. Racz.** 1998. The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. *J Exp Med* **187**: 949-59.
174. **Trachtenberg, E.A. and H.A. Erlich.** 2001. A Review of the Role of the Human Leukocyte Antigen (HLA) System as a Host Immunogenic Factor Influencing HIV Transmission and Progression to AIDS, *in* B.T. Korber, et al. (ed.), Book. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, NM.
175. **Trepel, F.** 1974. Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klinische Wochenschrift* **52**: 511-5.
176. **Turner, B.G. and M.F. Summers.** 1999. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**: 1-32.
177. **UNAIDS and WHO,** 2002. AIDS epidemic update., Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO): Geneva.
178. **van Baalen, C.A., O. Pontesilli, R.C. Huisman, A.M. Geretti, M.R. Klein, F. de Wolf, F. Miedema, R.A. Gruters, and A.D. Osterhaus.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol* **78**: 1913-8.
179. **van der Ende, M.E., M. Schutten, B. Raschdorff, G. Grossschupff, P. Racz, A.D. Osterhaus, and K. Tenner-Racz.** 1999. CD4 T cells remain the major source of HIV-1 during end stage disease. *AIDS* **13**: 1015-9.
180. **van't Wout, A.B., N.A. Kootstra, G.A. Mulder-Kampinga, N. Albrecht-van Lent, H.J. Scherpbier, J. Veenstra, K. Boer, R.A. Coutinho, F. Miedema, and H. Schuitemaker.** 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *Journal of Clinical Investigation* **94**: 2060-7.
181. **Vanham, G., L. Kestens, J. Vingerhoets, G. Penne, R. Colebunders, M. Vandenbruaene, J. Goeman, J.L. Ceuppens, K. Sugamura, and P. Gigase.** 1994.

- The interleukin-2 receptor subunit expression and function on peripheral blood lymphocytes from HIV-infected and control persons. *Clin Immunol Immunopathol* **71**: 60-8.
182. **Varmus, H.** 1988. Retroviruses. *Science* **240**: 1427-35.
183. **Vila, J., F. Nugier, G. Bargues, T. Vallet, D. Peyramond, F. Hamed-Sangsari, and J.M. Seigneurin.** 1997. Absence of viral rebound after treatment of HIV-infected patients with didanosine and hydroxycarbamide [letter]. *Lancet* **350**: 635-6.
184. **von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, and D. Trono.** 1993. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* **67**: 4945-55.
185. **Walker, B.D., T.M. Allen, M. Altfeld, X.G. Yu, P.J. Goulder, M.M. Addo, R. Draenert, C. Brander, N. Frahm, M.N. Johnston, C. Corcoran, H. Trong, P.K. Lee, E.L. Maier, K. O'Sullivan, R.L. Eldridge, E.S. Rosenberg, C. Hess, and A. Luster.** 2003. Immune Control and Immune Failure in HIV Infection. in *10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Boston, MA, USA.
186. **Wasmuth, J.C., K.H. Klein, F. Hackbarth, J.K. Rockstroh, T. Sauerbruch, and U. Spengler.** 2000. Prediction of imminent complications in HIV-1-infected patients by markers of lymphocyte apoptosis. *J Acquir Immune Defic Syndr* **23**: 44-51.
187. **Wei, X., S.K. Ghosh, M.E. Taylor, V.A. Johnson, E.A. Emini, P. Deutsch, J.D. Lifson, S. Bonhoeffer, M.A. Nowak, B.H. Hahn, and et al.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection [see comments]. *Nature* **373**: 117-22.
188. **Westby, M., J.B. Marriott, M. Guckian, S. Cookson, P. Hay, and A.G. Dalgleish.** 1998. Abnormal intracellular IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) production as HIV-1-associated markers of immune dysfunction. *Clin Exp Immunol* **111**: 257-63.
189. **Wolthers, K.C., G. Bea, A. Wisman, S.A. Otto, A.M. de Roda Husman, N. Schaft, F. de Wolf, J. Goudsmit, R.A. Coutinho, A.G. van der Zee, L. Meyaard, and F. Miedema.** 1996. T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4+ T cell turnover. *Science* **274**: 1543-7.
190. **Wong, J.K., M. Hezareh, H.F. Gunthard, D.V. Havlir, C.C. Ignacio, C.A. Spina, and D.D. Richman.** 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* **278**: 1291-5.
191. **Yu, X.G., M.M. Addo, E.S. Rosenberg, W.R. Rodriguez, P.K. Lee, C.A. Fitzpatrick, M.N. Johnston, D. Strick, P.J. Goulder, B.D. Walker, and M. Altfeld.**

2002. Consistent patterns in the development and immunodominance of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8⁺ T-cell responses following acute HIV-1 infection. *Journal of Virology* **76**: 8690-701.
192. **Zhang, L., C. Chung, B.S. Hu, T. He, Y. Guo, A.J. Kim, E. Skulsky, X. Jin, A. Hurley, B. Ramratnam, M. Markowitz, and D.D. Ho.** 2000. Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* **106**: 839-45.
193. **Zhang, Z.Q., D.W. Notermans, G. Sedgewick, W. Cavert, S. Wietgreffe, M. Zupancic, K. Gebhard, K. Henry, L. Boies, Z. Chen, M. Jenkins, R. Mills, H. McDade, C. Goodwin, C.M. Schuwirth, S.A. Danner, and A.T. Haase.** 1998. Kinetics of CD4⁺ T cell repopulation of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1154-9.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Medizinischen Kern- und Poliklinik, Abteilung für Infektiologie am Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg angefertigt.

Ein großes Dankeschön geht an

... vor allem PD Dr. Hans-Jürgen Stellbrink und Dr. Jan van Lunzen, die das Entstehen dieser Arbeit nicht nur finanziell möglich gemacht haben. Durch teilweise kontroverse, doch immer humorvolle Diskussionen ist es ihnen gelungen, die Geschicke der Arbeitsgruppe und damit meiner Doktorarbeit in produktive Bahnen zu lenken. Besonders dankbar bin ich auch dafür, daß sie mir ermöglicht haben, „über den Tellerrand hinauszuschauen“ und einen Teil dieser Arbeit bei drei weltweit renommierten Arbeitsgruppen durchzuführen (na gut, bei der dritten bin ich mir mit dem „weltweit“ nicht so sicher...).

...Prof. Bruce Walker und Prof. Giuseppe Pantaleo für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in den schönen Städten Boston und Lausanne.

...Dr. Michael Westby, Dr. Eithne O’Sullivan und Dr. Marcus Altfeld dafür, daß sie mich unter ihre Fittiche genommen haben.

... der Dissertationsgutachterin Dr. Iris Bruchhaus und dem Disputationsgutachter Prof. Dr. Lothar Renwrantz, die sozusagen die Katze im Sack gekauft haben.

... dem Disputationsgutachter PD Dr. Friedrich Haag, der zusagen mußte, obwohl er krank war.

... Janine, die mir die Normalkontrollwerte zur Verfügung gestellt hat und bei meinem ersten Vortrag Händchen halten mußte (und dafür sogar in VIER Flugzeuge gestiegen ist!).

... den beiden Birgits – ohne sie wäre ich verzweifelt!

... den „Mädels“ aus der Routine für die tatkräftige Unterstützung am FACS und für die Verlängerung meines Lebens um etliche Minuten -- wir haben viel gelacht!

... Schwester Heidi für alles

... Ingrid für die ausführlichen Nicht-Mediziner-Kommentare

... Roland dafür, daß er nicht so gedrängelt hat (ob es sonst wohl schneller gegangen wäre?)

... allen Molis, weil sie mir die Immunologie nahegebracht haben

... meinen Eltern für ihre Geduld (sollte man seinen Doktor nicht nach drei Jahren haben???)