

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Medizinische Klinik I
(Direktor Prof. Dr. H. Greten)

**Die chronische HIV-Infektion - Einfluss einer hochaktiven antiretroviralen
Therapie (HAART) mit und ohne Interleukin-2 (IL-2) auf Lymphozyten-
Subpopulationen in Blut und Lymphknoten.**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich der Universität vorgelegt von

J o h a n n e s L a u e r

aus Heidelberg

Hamburg 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. med. Wagener

Referent: Prof. Dr. med. H. Greten

Koreferent: PD. Dr. med. Sobottka

Auszüge der Daten wurden als persönliche Präsentationen im Rahmen

- der 4th ECEAR, European Conference on Experimental AIDS-Research, im Juni 1999 in Tampere, Finnland
 - des 8. deutschen AIDS-Kongress, im Juli 2001 in Berlin, Deutschland
- vorgelegt.

1. Einleitung	1
1.1. HIV - Erstbeschreibung und Epidemiologie	1
1.2. Das HI-Virus	1
1.3. Der natürliche Krankheitsverlauf	2
1.3.1. Die primäre HIV-Infektion, klinische Befunde	2
1.3.2. Die primäre HIV-Infektion, Immunologie	3
1.3.3. Die initiale Viruskontrolle	5
1.3.4. Die Rolle sekundärer lymphatischer Gewebe in der HIV-1 Infektion	5
1.3.5. Die Phase der klinischen Latenz	6
1.3.6. Progression zu AIDS	6
1.3.7. CD4-Zellverlust	7
1.4. Prognostische Marker	8
1.5. Therapie der HIV-Infektion	8
1.6. Rationale einer Therapie mit Interleukin-2	9
2. Fragestellung	11
3. Patienten, Material und Methoden	12
3.1. Patientenrekrutierung und Studiendesign	12
3.1.1. Patienten	12
3.1.2. Normalkontrollen	12
3.2. Aufarbeitung der Mononukleären Zellen	13
3.2.1. Zeitpunkte der Probenentnahme	13
3.2.2. Aufarbeitung von PBMC	14
3.2.2. Aufarbeitung von LNMC	14
3.3. Vorbereitung der Lymphozyten für die Durchflusszytometrie	15
3.3.1. Extrazelluläre Färbungen	15
3.3.2. Intrazelluläre Färbungen	15
3.4. FACS-Daten-Acquisition	18
3.5. FACS-Daten-Analyse	19
3.6. Quadrantenstatistik	19
3.7. Statistische Auswertung	20
4. Ergebnisse	21
4.1. Charakterisierung von Patienten in der chronischen Infektion	21
4.1.1. T-Zell-Subpopulationen in der chronischen HIV-Infektion	21
4.1.1.1. CD3+CD4+/CD8+ PBMC in der chronischen HIV-Infektion	21
4.1.1.2. CD3+ CD4+/CD8+ LNMC in der chronischen HIV-Infektion	21
4.1.2. CD45RO <i>hi</i> RA- und CD45RA <i>hi</i> RO- T-Zellen in der chronischen HIV-Infektion	21
4.1.2.1. CD4+ PBMC, CD45RO <i>hi</i> RA- und CD45RA <i>hi</i> RO-, in der chronischen HIV-Infektion	21
4.1.2.2. CD4+ LNMC, CD45RO <i>hi</i> RA- und CD45RA <i>hi</i> RO-, in der chronischen HIV-Infektion	22
4.1.2.3. CD8+ PBMC, CD45RO <i>hi</i> RA- und CD45RA <i>hi</i> RO-, in der chronischen HIV-Infektion	22
4.1.2.4. CD8+ LNMC, CD45RO <i>hi</i> RA- und CD45RA <i>hi</i> RO-, in der chronischen HIV-Infektion	22

4.1.3. Immunaktivierung in der chronischen HIV-Infektion	22
4.1.3.1. CD4+ PBMC, Aktivierungsstatus in der chronischen HIV-Infektion	22
4.1.3.2. CD4+ LNMC, Aktivierungsstatus in der chronischen HIV-Infektion	22
4.1.3.3. CD8+ PBMC, Aktivierungsstatus in der chronischen HIV-Infektion	23
4.1.3.4. CD8+ LNMC, Aktivierungsstatus in der chronischen HIV-Infektion	23
4.1.4. Lymphozyten-Proliferation in der chronischen HIV-Infektion	25
4.1.4.1. CD4+ PBMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion	25
4.1.4.2. CD4+ LNMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion	25
4.1.4.3. CD8+ PBMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion	26
4.1.4.4. CD+8 LNMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion	26
4.1.4.5. B-Zellen PBMC/LNMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion	26
4.2. Korrelation von Aktivierung und Proliferation mit viraler Replikation	26
4.3. Therapie-Einfluss auf die Plasmaviruslast	26
4.4. Therapie-Einfluss auf T- Zell-Subpopulationen in Blut und Lymphknoten	27
4.4.1. CD3+ CD4+/CD8+ PBMC nach im Median 12 Monaten Therapie	27
4.4.2. CD3+ CD4+/CD8+ LNMC nach im Median 12 Monaten Therapie	28
4.5. Therapie-Einfluss auf Effektor/Memory und naive T-Zellen in PB und LK	28
4.5.1. PBMC, CD4-Effektor/Memory und naive T-Zellen nach 12 Monaten Therapie	28
4.5.2. PBMC, CD8-Effektor/Memory und naive T-Zellen nach 12 Monaten Therapie	29
4.5.3. LNMC, CD4-Effektor/Memory und naive T-Zellen nach 12 Monaten Therapie	30
4.5.4. LNMC, CD8-Effektor/Memory und naive T-Zellen nach 12 Monaten Therapie	30
4.6. Therapie-Einfluss auf Immunaktivierung in Blut und Lymphknoten	30
4.6.1. PBMC, CD4+, Aktivierungsstatus nach 12 Monaten Therapie	30
4.6.2. PBMC, CD8+, Aktivierungsstatus nach 12 Monaten Therapie	31
4.6.3. LNMC, CD4+, Aktivierungsstatus nach 12 Monaten Therapie	32
4.6.4. LNMC, CD8+, Aktivierungsstatus nach 12 Monaten Therapie	33
4.7. Therapie-Einfluss auf T- und B-Zell-Proliferation in Blut und Lymphknoten	33
4.7.1. PBMC, CD4+, Ki-67-Expression nach 12 Monaten Therapie	33
4.7.2. PBMC, CD8+, Ki-67-Expression nach 12 Monaten Therapie	35
4.7.3. LNMC, CD4+, CD8+, B-Zellen, Ki-67-Expression nach 12 Monaten Therapie	35
5. Diskussion	55
5.1. Immunologische Veränderungen bei chronischer HIV-Infektion	55
5.2. Einfluss von HAART	56
5.3. Einfluss von IL-2	58
5.4. Vergleich von Blut und Lymphknoten	60
6. Zusammenfassung	63
7. Literaturverzeichnis	64
Danksagung	82
Lebenslauf	83
Erklärung	84

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ag	Antigen
AICD	Activation induced cell death
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrom
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ART	Antiretrovirale Therapie
BD	Becton Dickinson, Leimen
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Center for Disease Controle
CLA	Commen Leucocyte Antigen (CD45)
CPT	Cell Preperation Tube® (Becton Dickensen, Leimen)
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D4T	Stavudin
DC	Dendritische Zellen
Ddl	Didanosin
DMSO	Methylsulfoxid Dimethylsulfoxid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälber Serum
FDC	Folikulär Dendritische Zellen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GC	Germinal center (Keimzentrum)
HAART	Hoch Aktive Antiretrovirale Therapie
HEV	High Endothelial Venules
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus, Typ 1
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
Ind	Indinavir
ISH	In-Situ-Hybridisierung
Lk	Lymphknoten
LNMC	Mononukleäre Zellen des Lymphknoten
MHC II	Major Histokompatibility Complex II
Nel	Nelfinavir
NK	Natürliche Killerzellen
NRTI	Nukleosidaler Inhibitor der Reversen-Transkriptase
NoK	Normalkontrolle
Pat.	Patient
PB	(peripheres) Blut
PBMC	Mononukleäre Zellen des Blutes
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCP	Pneumocystis carinii Pneumonie
PE	Phycoerythrin
PI	Protease Inhibitor
RT	Reverse Transkriptase
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Kulturmedium
Saq	Saquinavir
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SSC	Side scatter
STI	Supervised/structured Therapy Interuption
TNF	Tumornekrose Faktor
TCR	T-Zell-Rezeptor
VI	Viruslast

1. Einleitung

1.1. HIV - Erstbeschreibung und Epidemiologie

Als pathologisches Agens der bis dahin ätiologisch unklaren, erworbenen Immunschwäche AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrom) wurde 1983 HIV (Human Immunodeficiency Virus), zunächst unter den Namen LAV (lymphadenopathy associated virus, Montagnier et al) und HTLV III (Human T-lymphotropic virus, Gallo et al), beschrieben. Ende 2000 waren nach Schätzungen der WHO 36,1 Mio Menschen weltweit mit HIV infiziert, davon 25,3 Mio allein in Afrika südlich der Sahara [146]. Aufgrund des Übertragungsmodus durch Genitalsekrete, Blut und Blutprodukte sind v.a. Homosexuelle, i.v.-Drogenabhängige, Empfänger von Blutbestandteilen (in abnehmendem Anteil), aber zunehmend auch Heterosexuelle, Frauen in steigender Zahl, betroffen.

1.2. Das HI-Virus

Das CD4-Molekül wurde schon früh als notwendiger Rezeptor für die Bindung von HIV-1, HIV-2 und SIV an die Zielzelle identifiziert [29]. CD4 wird v.a. von T-Helfer-Lymphozyten und in geringerer Dichte auf Makrophagen, Monozyten, Dendritischen Zellen und Mikrogliazellen exprimiert. Funktionell ist der Co-Rezeptor CD4 auf T-Zellen Teil des TCR/CD3-Komplexes, bindet an HLA-Klasse II, das von APC und B-Zellen exprimiert wird, und trägt so zu einer Aktivierung der T-Zellen bei. Neben CD4 sind weitere Rezeptoren notwendig, um eine Fusion von HIV mit der Wirtszelle zu ermöglichen. Die bekanntesten sind CXCR4 und CCR5. In der frühen Infektion dominieren HI-Viren, die vornehmlich über CCR5 mit der Wirtszelle fusionieren (sog. R5-, Non-syncycien-induzierende- oder makrophagotrope Stämme), später sog. X4-Stämme mit hohen Replikationsraten, lymphotrope oder syncytiuminduzierende Stämme genannt. Retroviren sind dadurch charakterisiert, dass ihr in Form von RNA vorliegendes Genom mit Hilfe einer viruseigenen Reversen Transkriptase (RT) in DNA umgeschrieben und in das Wirtsgenom integriert werden kann. Die Aktivität der RT ist vom Aktivierungsstatus der Wirtszelle abhängig [132]. Inhibitoren der RT verhindern durch Hemmung der DNA-Synthese und der reversen Transkription die aktive Virusreplikation. Durch Transport des Präintegrationskomplexes durch Gag p17, Vpr und Integrase gelangt Virus-kodierende DNA in den Nucleus. Die Insertion in Form der vollständigen viralen DNA ist Voraussetzung für die Etablierung des replikationsfähigen Provirus. Nicht integrierte DNA besitzt eine Halbwertszeit von nur wenigen Tagen [153, 125]. Die Expression der HIV-Gene wird durch komplexe Interaktion von cis-aktivierenden, viralen und zellulären Faktoren beeinflusst. In ruhenden Zellen liegt die DNA extragenomisch vor, kann aber im Rahmen eines Aktivierungsereignisses weiter prozessiert und integriert werden [18]. Promoter-Sequenzen können durch Bindung von

wirtseigenen Regulatorproteinen (zelluläre Transkriptionsfaktoren: NF κ B, Sp1) verstärkt werden. Co-Infektionen mit anderen Viren (CMV, EBV, HHV-6, HSV-1, HSV-2) können auf diesem Wege Replikationssignale an den Promoter/Enhancer-Region des Provirus verstärken [60, 23]. Virale Proteine werden im Cytoplasma durch eine viruseigene Protease gespalten, zu Virionen arrangiert und durch „Budding“ aus der Wirtszelle ausgeschleust. Eine infizierte Zelle synthetisiert pro Infektionszyklus ca. 10^5 Viruspartikel, von denen aber nur wenige infektiös sind [34]. Durch den therapeutischen Einsatz von Inhibitoren der Protease kann der Anteil nicht-infektiöser Partikel noch erhöht werden.

1.3. Der natürliche Krankheitsverlauf der HIV-Infektion

Der natürliche Krankheitsverlauf der Infektion ist durch die kontinuierliche Replikation von Viren im lymphatischen Gewebe, dem primären Zielorgan der Infektion, charakterisiert. Die Replikation geht mit einer Aktivierung von CD4+ Lymphozyten, Einwanderung von cytotoxischen T-Zellen (CTL) in die Keimzentren der Lk, der folliculären Hyperplasie mit nachfolgender Zerstörung des Netzwerkes der folliculären Dendritischen Zellen (FDC) und konsekutiv mit einer fortschreitenden CD4+-T-Zelldepletion einher. Klinisch spiegelt sich dies in einer Verminderung der CD8+-T-Zell vermittelten zytotoxischen Immunantwort und Störung der Immunglobulinsynthese wieder. Die HIV-spezifische Immunantwort ist breit, kann aber die Virusreplikation in den meisten Fällen nicht kontrollieren [70, 101, 107]. Opportunistische Infektionen sind im Vollstadium von AIDS die Folge. Moderne antiretrovirale Therapien haben geholfen, die Virusreplikation zu begrenzen, den CD4-Zellverlust zu limitieren und die Mortalität zu senken.

1.3.1. Die primäre HIV-Infektion, klinische Befunde

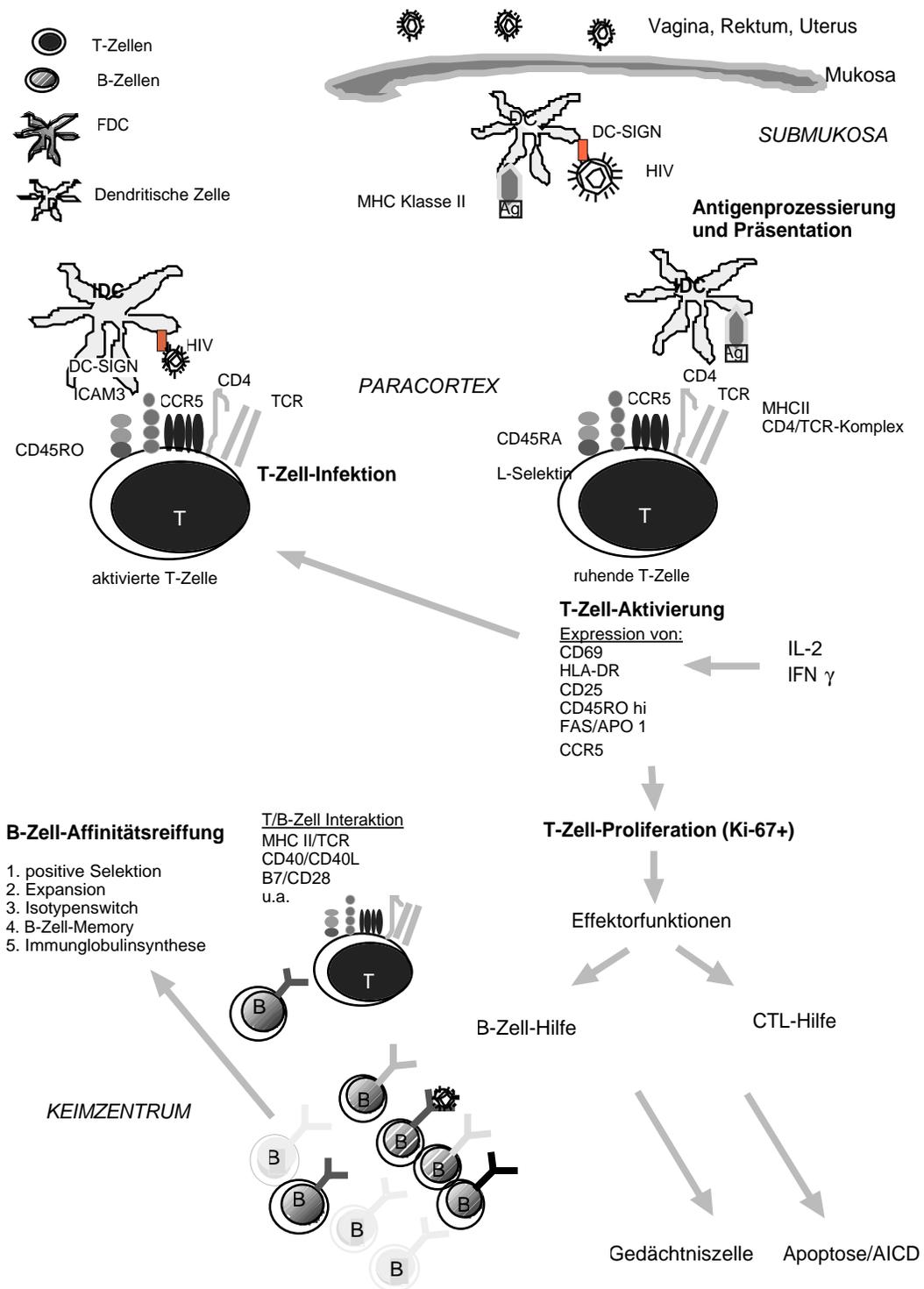
Retrospektiv beschreiben 50-93% der HIV-Infizierten in der Zeit der Serokonversion ein Stadium akuten Krankheitsgefühls [26, 33]. Das Intervall zwischen Infektion und dem Auftreten klinischer Symptome variiert bei den meisten Pat. zwischen zwei und acht Wochen, kann aber auch subklinisch verlaufen. Die Symptomatik der primären HIV-1-Infektion werden als vergleichbar denen einer Mononukleose oder Virus-Grippe beschrieben. Lymphadenopathie, Fieber und Nachtschweiß stellen die am häufigsten beschriebenen Symptome dar. Die CD4+-T-Zellen sind unter die Normalwerte von 800-1000/ μ l erniedrigt, steigen später wieder an, erreichen aber meist ihren Ausgangswert nicht. Die Zahl der CD8+ T-Zellen im Blut steigt dagegen und bedingt eine Inversion der CD4/CD8-Ratio charakteristischer Weise auf unter 1 [96, 105]. Drei bis sechs Monate nach Infektion erreicht die Virämie ein konstantes Niveau („virologischer setpoint“), welches einem Equilibrium zwischen Virusproduktion und Elimination entspricht und *interindividuell* stark variiert, *intraindividuell* aber relativ stabil ist. Interindividuelle Unterschiede der HIV-spezifischen Immunkompetenz tragen ihren Anteil dazu bei („immunologischer

Setpoint“). Es konnte gezeigt werden, dass das Niveau der Virämie ca. sechs Monaten post infectionem die Prognose bzgl. klinischer Komplikationen entscheidend mitbestimmt [88].

1.3.2. Die primäre HIV-Infektion, Immunologie

Die Mehrzahl der HIV-Infektionen wird über Geschlechtsverkehr und somit durch Schleimhautkontakte übertragen. Experimente mit SIV-infizierten Affen [63, 126, 128] lassen darauf schließen, dass Dendritische Zellen (DC) in der Lamina Propria der Schleimhäute (z.B. unterhalb des cervicovaginalen Epithels, aber auch orale, nasopharyngeale oder rektale Mukosa, s. Abb. 1, S. 4) zu den ersten Zellen gehören, die mit dem HI-Virus in Kontakt treten. Diese können selbst infiziert werden [63]. Neuere Arbeiten [46] konnten zeigen, dass HIV aber auch über Gp 120 an einen Rezeptor Dendritischer Zellen (DC-SIGN) gebunden werden kann, ohne prozessiert zu werden. Virionen werden rezeptorgebunden in regionäre Lymphknoten transportiert, wo DC-SIGN mit ICAM 3 auf CD4+ Zellen in Kontakt tritt, HIV in enge räumliche Nähe zu Fusions-Rezeptoren bringt und so eine Infektion von Zellen diesen Phänotyps katalysiert. Darüber hinaus kommt DC durch die Prozessierung und Präsentation von Ag über MHC II DC eine Bedeutung in der Initiierung einer HIV-spezifischen Immunantwort zu. Dieser Vorgang der klonalen Selektion findet vornehmlich in der T-Zell-abhängigen Zone der Lymphknoten statt. Selektierte Klone unterstützen die B-Zellreifung in Keimzentren der Sekundärfollikel. Aktivierte T-Zellen beginnen auf sekundäre Signale hin (z.B. IL-2) zu proliferieren und durchlaufen eine Entwicklung zu Effektorzellen, die in einer Veränderung des Cytokinprofils (IL-2, IFN γ bzw. IL-4, IL-6, IL10) und des Phänotyps erkennbar wird. Es kommt zum Wechsel der CLA- (Common leucocyte antigen) Isoform. CD45RA wird herunterreguliert und dafür vornehmlich CD45RO exprimiert. Als Aktivierungsmarker auf T-Lymphozyten wird früh CD69, später CD25 (α -Untereinheit des hochaffinen IL-2-Rezeptors), HLA-DR und (auf CD8+) CD38 exprimiert. Co-stimulatorische Moleküle wie CD28 und Homing-Liganden wie CD62L werden in reduzierter Dichte gefunden. Auch der Beta-Chemokin-Rezeptor CCR5 wird während der Zellaktivierung verstärkt exprimiert [9], so dass virusspezifische Zellen in dieser Phase der Lymphozytenaktivierung selbst zu Ziel-Zellen werden können [114]. Durch diese Veränderungen des Phänotypus wird auch das Migrationsverhalten der Lymphozyten beeinflusst. Aktivierte Lymphozyten migrieren in der Folge präferenziell durch parenchymatöse Organe (Lunge, Leber u.a.). Nach Elimination eines Antigens gehen Effektorzellen physiologischer Weise in Apoptose über (Activation Induced Cell Death, AICD), und nur wenige werden zu Memory-Lymphozyten.

Abbildung 1: Immunpathogenese der HIV-Infektion.



T-Zell-Infektion (A), Aktivierung (B) in Submukosa und Paracortex des Lk. Zellinteraktionen und B-Zell-Affinitätsreifung (D) im Keimzentren des Lk. (Urheberschaft der Grafik liegt beim Verfasser)

Naive Lymphozyten wandern durch efferente Lymphbahnen aus, finden über den Ductus thoracicus Anschluss an die Blutbahn und rezirkulieren über HEV in sekundär lymphatische Gewebe bis sie auf ihr durch den TCR definiertes, spezifisches Antigen treffen.

Das Virus repliziert v.a. in CD4+ Lymphozyten in den Sekundärfollikeln der lymphatischen Gewebe [64, 134, 102] und wird von dort aus in die Blutzirkulation abgegeben. So kommt es von den regionären Lymphknoten zu einer Streuung der Viren innerhalb des lymphatischen Gewebes (Lk, Milz, Tonsillen, Peyer'sche Plaques der Darmmukosa) [20, 38, 102] wie auch in das ZNS. Dieser Vorgang ist vergesellschaftet mit einem temporären Anstieg von Virus-RNA im Plasma [128].

1.3.3. Die initiale Viruskontrolle

Verschiedene Komponenten der HIV spezifischen Immunantwort tragen zu der initialen Kontrolle der Virus-Replikation bei (a) HIV-spezifische Cytotoxizität durch CTL, (b) HIV-spezifische CD4+ T-Helfer-Zellen, (c) neutralisierende Ak und (d) weitere humorale Faktoren (RANTES, Typ-I IFN, IFN- γ). CD4+ Lymphozyten üben hierbei eine zentrale Rolle in der Koordination dieser Mechanismen aus [109].

HIV spezifischen CTL kommt die größte Bedeutung in der Kontrolle der Virusreplikation zu. [11, 15, 70, 118]. Sie sind sowohl gegen Struktur- (gag, env), wie auch Regulator-Proteine (tat, rev) gerichtet [138]. Der Verlust der HIV-spezifischen CTL ist im Laufe der asymptomatischen Phase mit dem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert.

1.3.4. Die Rolle sekundärer lymphatischer Gewebe in der HIV-1 Infektion

Das lymphatische Gewebe stellt, wie zuvor beschrieben, das primäre Zielorgan der HIV-Infektion dar. Das Mikromilieu des Lymphknotens ist durch eine enge räumliche Assoziation von Ag-präsentierenden Zellen, (Dendritische, B-Zellen, Makrophagen) und Lymphozyten charakterisiert. In Paracortex und Lymphfollikel des Lk finden sich massenhaft CD4+ Zellen, die als potentielle Ziel-Zellen fungieren.

Histologische Veränderungen der Lymphknoten-Architektur sind früh als Charakteristika der HIV-Infektion beschrieben worden. Das FDC-Netzwerk expandiert, und die Follikel werden u.a. durch B-Zell-Proliferation hyperplastisch, was für die in vielen Fällen klinisch zu beobachtende Lymphadenopathie verantwortlich gemacht wird. Es kommt zur Einwanderung von CD8+-T-Lymphozyten in Paracortex und in Keimzentren, die in letzteren gewöhnlich nicht zu beobachten sind. FDC der Keimzentren können, wie in Versuchen mittels In-Situ-Hybridisierung gezeigt werden konnte, zellfreies Virus/Virus-RNA zunächst über Komplement-Rezeptoren, später auch in Form von Ag-Ak-Komplexen über Fc-Rezeptoren binden, ein Mechanismus, der physiologischerweise in der Generierung und Unterhaltung von Memory-Lymphozyten eine

wichtige Rolle spielt. FDC können selbst nicht infiziert werden [131], auf diese Weise aber zu einer Neuinfektion von durch Keimzentren migrierende T-Lymphozyten beitragen. So kann eine chronische Aktivierung und Infektion auch in Abwesenheit einer de-novo-Synthese unterhalten werden [38, 57].

Die meisten infizierten CD4⁺ sind aktivierte Zellen, die innerhalb weniger Tage zu Grunde gehen. Der Anteil der in Apoptose befindlichen Lymphozyten ist hoch. Wenige Lymphozyten differenzieren zu Memory-Lymphozyten und können zu ruhenden, infizierten Gedächtnis-Zellen revertieren [50]. Diese können entweder in die Peripherie ausgeschleust werden oder in latent infizierter Form in den Keimzentren verweilen. In vitro ist es möglich, in diesen durch Cytokin-Stimulation eine Virus-Replikation zu induzieren [43, 150].

1.3.5. Die Phase der klinischen Latenz

Nachdem eine chronische Infektion etabliert ist, treten Pat. in eine Phase ein, die klinisch wenig symptomatisch verläuft und ohne Therapie sieben bis zehn Jahre andauert. Eine persistierende Lymphadenopathie ist häufig. Es wird in dieser Phase fast regelhaft HIV-1-RNA im Plasma nachgewiesen werden. Nur wenige der zirkulierenden T-Helfer-Zellen im Blut sind infiziert [41]. Die Zahl der CD4⁺ Zellen im Blut zeigt sich nur wenig vermindert. Besonders CD4⁺ Zellen in Keimzentren, aber auch in T-Zell-abhängigen Zonen der Lk, wie auch in deren Korrelaten in Peyer'sche Plaques, MALT, Waldeyer'schem Rachenring, Tonsillen, Adenoiden und der Milz, tragen kontinuierlich zu einer de-novo-Synthese bei [38, 102]. Mit diesen Befunden einhergehend beobachtet man auch grundlegende morphologische Veränderungen innerhalb des Lk. Es kommt jetzt aus weitestgehend unbekanntem Gründen zu einer fortschreitenden Zerstörung des FDC-Netzwerkes und später zur vollständigen Involution der Keimzentren [102].

1.3.6. Progression zu AIDS

Der Großteil der mit HIV-1 Infizierten entwickelt, je nach virologischen und individuellen immunologischen Voraussetzungen, mit einem T-Zell-Verlust einhergehend die Immunschwäche AIDS. Ohne eine ART (Antiretrovirale Therapie) entwickeln Infizierte diese nach im Median 10 Jahren [78] und bei Zellzahlen von im Median 50 CD4⁺ Lymphozyten/ μ l [133]. Diese Zeitspanne variiert interindividuell jedoch. Es werden Krankheitsverläufe beobachtet, die rapide innerhalb von ein bis zwei Jahren zu AIDS führen („fast-progressors“), und solche, bei denen die Pat. über zehn Jahre mit relativ stabilen CD4⁺-Zellzahlen leben, ohne Symptome zu zeigen („longterm-non-progressors“, LTNP) [77].

Die genetische Variation der HIV-Stämme in einem Individuum steigt mit der Krankheitsprogression. Das Erscheinen von X4-Stämmen mit höheren Replikationsraten in vitro ist in dieser Phase zu beobachten.

Das Fortschreiten der Infektion zur manifesten, erworbenen Immunschwäche, wie sie sich mit dem Auftreten von opportunistischen Infektionen (wie typische und/oder atypische Mycobakteriosen, Candidosen, Pneumocystis Carinii Pneumonien, cerebrale Toxoplasmose, Salmonellosen, Mikrosporidien, Makrosporidien, CMV-Retinitiden, HSV/CMV-Encephalitiden, Cryptosporidiose, Kryptokokkose), Malignomen und neurologischen Symptomen präsentiert, ist charakterisiert durch den Anstieg der Virämie, Verlust von CD4+ Zellen, Untergang der Lk-Architektur, reduziertes Ansprechen auf Ag, dem Verlust der Ag-Bindung im Lk über FDC sowie einer Abnahme der HIV-spez. CTL-Antwort. CD4+ Lymphozyten im lymphatischen Gewebe sind, bei stetig fallenden T-Helfer Zellzahlen im Blut, bis in die späte Infektion hinein jedoch konstant.

1.3.7. CD4-Zellverlust

Die genauen Mechanismen, die zum Verlust der CD4+ Lymphozyten beitragen, sind noch immer nicht hinreichend geklärt.

Der Verlust der CD4 könnte durch den cytopathischen Effekt des HIV selbst verursacht werden. Die Zahl der infizierten T-Helfer-Zellen ist jedoch zu klein, um diesen hinreichend zu erklären. Nach wie vor besteht so das Paradoxon, dass wenig infizierte Zellen (ca. 0,1%) zum völligen Kollaps des Immunsystems führen. Der Abfall der im Blut zirkulierenden CD4+ Lymphozyten wurde v.a. auf einen gesteigerten Umsatz zurückgeführt [60, 102, 139]. Es wurde unter Verwendung mathematischer Modelle für die chronische HIV-Infektion ein bis zu 70 fach erhöhter Zellumsatz von CD4+ Zellen beschrieben [61, 142]. Diese Daten berechnen die Zerstörung und Regeneration von 10^9 Zellen/Tag. Der erhöhte Umsatz würde demnach letzten Endes, eine endliche Regenerationskapazität vorausgesetzt, zu einer Erschöpfung dieser und damit zu den beobachteten T-Zellverlusten, führen. Der Verlust von CD4+ Lymphozyten kann aber auch Ausdruck einer insuffizienten Produktion in primär lymphatischen Organen sein. Es konnte ein Verlust naiver (CD45RA+) CD4+ [135] und CD8+ [107] Lymphozyten gefunden werden, der auf einen suppressiven Einfluss von HIV auf primäre lymphatische Organe (Thymus, Knochenmark) zurückgeführt wurde [65]. Die Umverteilung von Lymphozyten aus dem Blut in lymphatisches Gewebe, das sog. Lymphozyten-„Trapping“ [51], kann in der chronischen Phase der Infektion einen Beitrag zu reduzierten Zellzahlen im Blut liefern, ohne einen erhöhten Zellumsatz annehmen zu müssen [111].

Noch bevor es zum terminalen Abfall der T_{Helfer} -Zellen und der Progression zu AIDS kommt, können funktionelle Defekte wie die reduzierte Synthese von IL-2 [148] und in der Erkennung von Recall-Ag gezeigt werden [120]. Dies deutet daraufhin, dass v.a. die präferentiell infizierten Gedächtniszellen (phänotypisch CD45RO+) in ihrer Funktion gestört sind.

1.4. Prognostische Marker

CD4-Zellzahl im Blut und Höhe der Viruslast [88] gelten als zuverlässige Parameter in der Einschätzung des Erkrankungsstadiums. Sie stellen wichtige Größen in der klinischen Praxis im Hinblick auf die Initiierung einer Therapie und im Therapiemonitoring dar.

HIV-Replikation ist mit einem Status der chronischen Immunaktivierung assoziiert. Immunaktivierung konnte als unabhängiger prognostischer Parameter identifiziert werden [10, 47, 79]. Humorale (β 2-Microglobulin, Neopterin) wie auch zelluläre Marker der Immunaktivierung (CD45R0, HLA-DR) stellen sich mit zunehmender Dauer der Infektion erhöht dar [7, 13, 48]. Die Expression von CD38 [79], HLA-DR [84] und das Fehlen von CD28 [21, 53, 66] auf CD8+ - nicht jedoch der Aktivierungsstatus der CD4+ T-Lymphozyten [47] - sind als prognostischer Marker beschrieben worden. Sie übertreffen die Messung der CD4-Zellzahl, einigen Autoren zufolge, in ihrem prädiktiven Wert [10, 84]. CD8+CD28- sind z.T. mit einer cytotoxischen Effektor Funktion [5, 44] und mit HIV spezifischer Aktivität [62] assoziiert. Auch die CD38+ Expression auf CD8+ korreliert mit CTL Aktivität [137]. Eine chronische zelluläre Aktivierung (V.a. CD4+) begünstigt eine erhöhte HIV-Replikation, welche wiederum zu weiterer Aktivierung und in der Folge zur Krankheitsprogression beiträgt. Chronische Infektionen wie TBC, HSV, Influenza und/oder eine parasitäre Besiedlung [23] tragen zu einem beschleunigten Krankheitsverlauf bei [8]. Eine breite Immunaktivierung resultiert in Anergie und AICD. Immunaktivierung kann so, im Rahmen der Induktion eines gesteigerten Zellumsatzes von T-Helfer-Zellen, zu dem Bild der durch HIV induzierten Immundefizienz beitragen.

1.5. Therapie der HIV- Infektion

Zur Zeit der hier dargestellten Studie waren antiretrovirale Medikamente aus zwei Stoffgruppen zur Therapie der HIV-Infektion zugelassen: Nukleosidale Reverse Transkriptase- (NRTI) und Protease-Inhibitoren (PI).

Erstere konkurrieren nach Phosphorylierung zu Triphosphaten mit den Nukleotiden des Wirtes um die Bindung an die Reverse Transkriptase. Der Einbau der Metaboliten in die DNS führt in der Folge zu einem vorzeitigen Kettenabbruch. NRTI.s können so kaum Einfluss auf die Virusproduktion aus bereits infizierten Zellen nehmen, sehr wohl jedoch auf eine Neuinfektion. Protease-Inhibitoren wirken über eine Hemmung der HIV-Protease, deren Funktion es ist, die viralen Polyproteine in funktionsfähige Endprodukte zu spalten. Dieser Vorgang läuft während oder kurz nach dem Ausknospen des Virus von der Wirtsmembran ab. Die Hemmung der HIV-Proteasen hat die Bildung von unreifen, nicht infektiösen Virionen zur Folge. In verschiedenen Arbeiten konnte ein positiver Effekt dieser Therapeutika auf die Reduktion der Plasma-Viruslast und den Anstieg der CD4-Zellzahl gezeigt werden [4, 24, 68, 73, 103].

1.6. Rationale einer Therapie mit Interleukin-2

Interleukin-2 ist ein pleiotropes Zytokin mit regulierendem Effekt auf eine Reihe von Leukozyten-Linien und wird als primärer Wachstumsfaktor für T-Zellen angesehen [123]. Interleukin-2 ist ein gut untersuchtes 15-20 kDa Glykoprotein. Es wird von aktivierten T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+) sezerniert und reguliert auto- und parakrin Wachstum und Differenzierung von CD4+ T Zellen selbst [119, 123], B- und NK-Zellen [80]. Sein Rezeptor ist ein Heterotrimer, bestehend aus einer α -, β - und γ -Kette. Die Anwesenheit der α -Kette (CD25) resultiert in der höchsten Affinität für den Liganden, die 1000-fach über der des Rezeptor in Form des $\beta\gamma$ -Dimers liegt. Der niedrig-affine Rezeptor wird von naiven Lymphozyten (und NK-Zellen) exprimiert, ein Aktivierungssignal resultiert in der Expression der α -Kette. Rekombinantes IL-2 besitzt nach subkutaner Applikation eine HWZ von 3 Stunden. Es ist für die Therapie des Nierenzellcarcinoms zugelassen und besitzt dort seine Berechtigung in der Expansion tumorspezifischer CTL [110].

Sekundäre und tertiäre Cytokine (TNF- α , IFN- γ u.a.), von NK-Zellen und Makrophagen synthetisiert, werden im Menschen für systemische Symptome (Abgeschlagenheit, Übelkeit, Fieber und „capillary leak“) verantwortlich gemacht, die zumeist dosisabhängig sind. Das Regime, welches in der hier vorgestellten Studie gewählt wurde, entspricht dem einer intermediären Dosierung, die - aufgrund der im Vergleich zu einer Ultrahochdosis- oder Hochdosis-Therapie (150 bzw. 15 Mio/d) weniger ausgeprägten Nebenwirkungen - ambulant durchführbar ist [31, 76]. Die Applikation in subkutaner Form hat sich als gut verträglich und in der Wirkung auf CD4 Zellzahlen als der der intravenösen ebenbürtig erwiesen [76].

Wie zuvor erwähnt, ist eine Verschiebung des Cytokinprofils von einem TH₁- (IL-2, IFN γ) zu einem TH₂-Profil (IL-4, IL-6, IL-10) im Rahmen der HIV-Infektion beschrieben worden. Dieser soll zu der zu beobachtenden zellulären Immundysfunktion bei erhöhter humoraler Immunstimulation in Form einer Hypergammaglobulinämie und Eosinophilie beitragen. Eine Therapie mit IL-2 könnte so helfen, das IL-2-Defizit zu reduzieren, eine zelluläre Immunantwort zu mediieren und reziprok die Ausschüttung von Zytokinen des TH₂-Profils zu limitieren.

Es konnte im Mausmodell (LCMV) die Wichtigkeit des Cytokins in der Generierung und Erhaltung einer virusspezifischen CTL-Aktivität gezeigt werden [28]. IL-2 verstärkt die durch CD8+ Lymphozyten des Blutes (PBMC) und des Lymphknotens (LNMC) medierte Suppression einer HIV-Replikation durch Expansion von CTL und durch humorale Faktoren [69]. Die Rationale einer immunmodulatorischen Therapie liegt aber v.a. darin begründet, dass die CD4+ Zellzahl mit HAART allein nur langsam regeneriert werden kann. Therapien, die die Expansion reifer Lymphozyten unterstützen, sollten ein breites Immunrepertoire erhalten helfen [25].

Interleukin-2 ist in der HIV-Infektion bereits in verschiedenen kleineren Studien in unterschiedlichen Zyklus-Intervallen [71, 119, 122] und Dosierungen [31, 80], Applikationsformen [71, 76], in frühen [80, 121] und in fortgeschrittenen Stadien [121, 3, 83] in Kombination mit NRTI, seltener mit PI, untersucht worden. Das lymphatische Gewebe ist bisher nur selten [155] untersucht worden.

2. Fragestellung

CD4 Zellverlust, Chronische Immunaktivierung, sowohl der CD4+ wie auch der CD8+ T-Lymphozyten, und kontinuierliche Virusreplikation im lymphatischen Gewebe sind Charakteristika der Infektion mit HIV [40]. Die persistierende Immunaktivierung verstärkt die Immundefizienz und hat entscheidenden Anteil an der Immunpathogenese der HIV-Infektion [39, 49, 101, 153].

Es soll hier untersucht werden, ob eine Beziehung zwischen Höhe der Viruslast und zellulären immunologischen Parametern (CD4-/CD8-Zellzahl, Aktivierungsgrad und Proliferation) vor Einleitung einer Therapie besteht.

Es soll beurteilt werden, ob der Umsatz der T- und B-Zellen in der chronischen HIV-Infektion auch im lymphatischem Gewebe über das Maß in einer HIV negativen Kontrollgruppe gesteigert ist.

Es soll untersucht werden, ob eine immunmodulatorische Therapie mit IL-2 höhere CD4-Zellzahlen im Blut generiert als eine HAART allein und ob auch im Lymphknoten der Anteil der CD4-Zellen gesteigert werden kann.

Es soll untersucht werden, welche Subpopulationen, naive oder Effektor-/Memory, unter den beiden Therapieansätzen zu einem Anstieg der Zellzahlen beitragen.

Es soll beurteilt werden, inwieweit der Grad der Immunaktivierung durch HAART \pm IL-2 beeinflusst wird und ob das Niveau einer HIV negativen Normalkontrolle erreicht werden kann.

Es ist ein Ziel dieser Arbeit zu erarbeiten, ob der Anteil proliferierender Zellen unter HAART abnimmt und ob eine Normalisierung der Fraktion proliferierender LNMC und PBMC bei supprimierter Virusreplikation erreicht werden kann.

Es soll ausgehend von der Phänotypisierung der generierten Zellen der therapeutische Nutzen einer immunmodulatorischen Therapie im Hinblick auf eine Immunrestitution gegenüber HAART kritisch bewertet werden.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. Patientenrekrutierung und Studiendesign

3.1.1. Patienten

Die hier vorgestellten Pat. wurden in der Infektionsambulanz der Medizinischen Poliklinik des Universitätsklinikum Eppendorf (UKE) und den HIV-Schwerpunktpraxen in Kiel, Lübeck, Hannover und Hamburg im Zeitraum zwischen Juni 1997 und Oktober 1997 für die sog. COSMIC-Studie (Cooperative Study on Immune Modulation of Immunity and Chemotherapy) rekrutiert. Diese offene, randomisierte, Phase III Multicenter-Studie war unter der Fragestellung konzipiert worden, welche antiretroviralen und immunologischen Effekte eine Kombinationstherapie mit den NRTI Stavudin (d4T, Zerit[®]) und Lamivudin (3TC, Epivir[®]), sowie mit den PI Saquinavir (Invirase[®]) und Nelfinavir (Viracept[®]) mit und ohne zusätzlicher Gabe von r-Interleukin-2 (Aldesleukin, Proleukin[®]) s.c. habe. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg lag vor.

In dieser Arbeit wurden die Daten von 31 Pat. (29 Männer und 2 Frauen) analysiert. Insgesamt wurden 55 Pat. in die Studie eingeschlossen.

Nach Sicherstellung der Einschlusskriterien (s. Tab. 1, S. 13) wurde den Pat. in Lokalanästhesie ein axillärer Lymphknoten entnommen. Anschließend wurden sie in einen der beiden Therapiearme randomisiert.

1. mit:

Stavudin 2 x 30-40mg oral	beginnend an Tag 0
+ Lamivudin 2 x 150 mg oral	beginnend an Tag 0
+ Saquinavir 3 x 600 mg oral	beginnend an Tag 0 (3 x 3 Kapseln a 200 mg)
+ Nelfinavir 3 x 750 mg oral	beginnend an Tag 0 (3 x 3 Kapseln a 250 mg)

2. mit zusätzlich:

Aldesleukin 9 MU s.c. für 5 Tage im Abstand von sechs Wochen in acht Zyklen, beginnend an Tag 28.

3.1.2. Normalkontrollen

10 HIV-seronegative Personen im Alter zwischen 21 und 44 Jahren, 9 Männer, 1 Frau, dienten als Normalkontrollen für PBMC.

Lymphknotenbiopsien aus Operationsmaterial von HIV-negativen Pat. (n=5) der Klinik für Chirurgie des UK Eppendorf unter Ausschluß von Entzündungen und Tumorerkrankungen dienten als LNMC-Kontrollgruppe.

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien der COSMIC-Studie.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> - Alter der Pat. zwischen 18 und 70 Jahren - Asymptomatischer klinischer Status - Nachweisbare HIV-Plasmavirämie - CD4+ Lymphozytenzahl über 350 Zellen/l bei Einschluss und in drei Monaten vor Einschluss - Nachgewiesene HIV-1-Infektion - Schriftliche Einverständniserklärung - Erwartete Lebenserwartung über 4 Wochen - Negativer Schwangerschaftstest bei Frauen innerhalb einer Woche vor Studienbeginn - Innerhalb vier Wochen vor Studienbeginn keine antiretrovirale Therapie 	<ul style="list-style-type: none"> - Bekannte oder vermutete Unverträglichkeit für eine der Substanzen - Bei vorbehandelten Pat. vorherige Einnahme von Didanosin (DDI), Stavudin (d4T) oder Lamivudin (3TC) - Vorherige Einnahme eines Protease-Inhibitors - Akute behandlungsbedürftige Infektion oder Tumor - Andere schwere Begleiterkrankungen - Aktive Hepatitis B oder C-Infektion - Sehr schlechte Venenverhältnisse - Akute Durchfallserkrankungen - Anomalien in Klinik oder Labor vom WHO-Grad III oder IV innerhalb 4 Wochen vor Studienbeginn - Angeborene oder erworbene hämorrhagische Diathesen - Begleitende immunmodulatorische Therapien (z.B. β-Interferon, Corticosteroide, Chemotherapeutika) - Schwangere, bzw. stillende Frauen, keine sichere Kontrazeption - Teilnahme an anderen Therapiestudien innerhalb 30 Tagen vor Aufnahme in die Studie - Unfähig, das aufgeklärte und informierte Einverständnis zu geben - Begründete Zweifel an der Therapietreue (Compliance) - Begleitende Therapien mit inhibierender oder induzierender Wirkung auf mikrosomale Leberenzyme (wie z.B. Rifabutin, Rifampicin, Phenytoin) oder Kumulationsrisiko anderer Medikamente (wie z.B. Astemizol, Terfenadin) - Zeichen einer peripheren Polyneuropathie - Signifikante kardiopulmonale oder renale Begleiterkrankung - Zustand nach Organtransplantation

3.2. Aufarbeitung der Mononukleären Zellen

3.2.1. Zeitpunkte der Probenentnahme

Sowohl zum Zeitpunkt des Screening als auch in kurzer zeitlicher Nähe zur ersten Lymphknotenentnahme, aber vor Beginn der Therapie, sowie im Folgenden an Tag 14 der Therapie, nach 28 Tagen und jedem weiteren Monat wurden sowohl die Viruslast (Roche Amplicor®), als auch absolute CD4- und CD8- Zellzahlen durchflusszytometrisch aus Vollblut

bestimmt. Zusätzlich wurden zur Aufarbeitung von mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) zu jedem Termin 40 ml Vollblut in CPT (cell-preparation-tubes[®], BD Leimen) asserviert. Nachdem die Viruslast in dem hier verwendeten Test (Roche Amplicor[®]) mindestens 6 Monate unter der Nachweisgrenze von 25 RNA-Kopien pro ml verblieben war, wurde eine zweite Lymphknotenentnahme vorgenommen und erneut LNMC isoliert.

3.2.1. Aufarbeitung von PBMC

CPT[®] wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Durch 20 minütige Zentrifugation bei 1500g und Raumtemperatur wurden PBMC von Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Nach einem Waschschriff mit PBS (1x) in 50ml Endvolumen und erneuter Zentrifugation für acht Minuten bei 580g (1800 Rpm) und 4°C wurde das Zellpellet in 5 ml RPMI-1640-Zellmedium resuspendiert. Nach einer apparativen Zellzahlbestimmung wurden die PBMC zu 5×10^6 pro ml Zellsuspension mit

Einfriermedium:	30% RPMI 1640-Zellmedium (Amimed)
	30% Gelifundol
	(Oxypolygelatine, Biotest GmbH, Dreieich)
	20% DMSO
	(Methylsulfoxid Dimethylsulfoxid, Fluka Chemika)
	20% FCS (Fötale Kälber Serum)

im Verhältnis 1:1 gemischt, zügig in einen Thermoregulator überführt und bei -80°C 24 h aufbewahrt. Die Zellen wurden anschliessend bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung in flüssigen Stickstoff asserviert.

3.2.2. Aufarbeitung von LNMC

Zur Analyse der Lymphozyten des lymphatischen Gewebes wurden vollständige Lymphknotenbiopsien verwendet. Anders als Feinnadelpunktionen aus Darm oder Tosillen ist die Wahrscheinlichkeit, repräsentatives Gewebe zu treffen, ungleich höher und ermöglicht die Gewinnung größerer Zellmengen.

Lymphknoten wurden jedem der Pat. an zwei Zeitpunkten durch einen Mitarbeiter der Abteilung für Chirurgie des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE), Hamburg, in Lokalanästhesie aus der Axilla entnommen und bei 4°C in 0,9%iger NaCl Lösung transportiert. Ohne Unterbrechung der Kühlkette wurde die Lymphknoten weiterverarbeitet. Durch mechanische Desintegration wurden LNMC in RPMI-Zellmedium in Suspension genommen. Durch Pipettieren der Suspension über einen 70µm Falcon-Filter wurde ein Übertreten größerer Gewebstücke verhindert. Die Zellsuspension wurde nun vergleichbar den PBMC bei 4°C, 1800 Upm (entspr. 580g), 8 min. zentrifugiert, dekantiert und in 5ml Kulturmedium resuspendiert. Im Folgenden wurden 5×10^6 Lymphozyten pro

Färbe-Puffer: 0,1% Saponin
(Guillaja Bark, Sigma chemical, St. Louis)
0,1% BSA (Bovines Serum Albumin)
0,01% Azid
in PBS (1x)

resuspendiert, zentrifugiert (8 min, 4 °C, 580g) und dekantiert. In 100 µl Färbe-Puffer (s.o.) und somit in Anwesenheit von 0,1% Saponin wurden die Zellen erneut, diesmal in Anwesenheit von Anti-Ki-67-Ak, 25 min. im Dunkeln und bei 4°C inkubiert.

Tabelle 3: In der FACS-Analyse von PBMC und LNMC verwendete Ak mit Hersteller, Zellklon und Funktion.

Antikörper	Klon	detektierte Zellen, Funktion	Fluoreszenz-Koppelung	Quelle
Anti-CD3	SK7	T-Zellen, TCR/CD3 Komplex	-PerCP	BD, Leimen
Anti-CD4	SK3	T-Helfer-Zellen	-FITC, -PerCP, APC	BD, Leimen
Anti-CD8	SK1	Co-Rezeptor Cytotoxische/Supressor T-Zellen, NK-Zellen	- FITC, - PerCP, - APC	BD, Leimen
Anti-CD19	4G7	reife B-Zellen	- PE	BD, Leimen
Anti-CD25 (Anti-IL-2R)	2A3	α- Untereinheit des hochaffinen IL-2-Rezeptors, spät auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert	- PE	BD, Leimen
Anti-CD28	7LX	Co-Rezeptor, B7.1, B7.2 auf B- Zellen/ APC sind Liganden	- PE	BD, Leimen
Anti-CD38	HB7	Aktivierungsmarker auf T-Zellen, NADase	- PE	BD, Leimen
Anti-CD45RA	L48	Phosphorylase, 220kd Isoform des CLA, naive T-Zellen	- PE - FITC	BD, Leimen Pharmingen
Anti-CD45RO	UCHL-1	Phosphorylase, 180kd Isoform des CD45 CLA, Effektor/Memory-T- Zellen	- PE - FITC	Pharmingen
Anti-CD69	L78	früher Aktivierungsmarker (6h) auf T-Lymphozyten	- PE	BD, Leimen
Anti-CD95/FAS	DX2	Apoptose-Marker	- FITC	BD, Leimen
Anti-HLA-DR	L243	später Aktivierungsmarker (24h) auf Lymphozyten	- FITC, - PE	BD, Leimen
Anti-Ki-67, „nuclear antigen“	MIB 1	intranukleär, exprimiert in G1 bis Mitose	- FITC	DAKO, Dänemark

Tabelle 4: Antikörper-Panel zur Färbung von PBMC.

Konjugat	PerCP	FITC	PE	APC
1		Anti-Maus- γ 1a	Anti-Maus- γ 2a	
2	Anti CD3	Anti CD4	Anti-CD8	
3	Anti CD4	Anti CD62L	Anti-CD45 RA	Anti-CD45 RO
4	Anti CD8	Anti CD62L	Anti-CD45 RA	Anti-CD45 RO
5	Anti CD4	Anti-CD45 RO	Anti-CD25	
6	Anti CD8	Anti-CD45 RO	Anti-CD25	
7	Anti CD4	Anti- HLA-DR	Anti-CD45 RO	
8	Anti CD8	Anti- HLA-DR	Anti-CD45 RO	
9	Anti CD4	Anti-CD57	Anti-CD69	
10	Anti CD8	Anti-CD45 RA	Anti-CD28	
11	Anti CD8	Anti-CD45 RO	Anti-CD38	
12	Anti CD8	Anti- HLA-DR	Anti-CD28	
13	Anti CD4	Anti-CD95/FAS	Anti-CD28	
14	Anti CD3	Anti-Ki-67	Anti-CD19	
15	Anti CD4	Anti-Ki-67	Anti-CD45 RA	Anti-CD45 RO
16	Anti CD8	Anti-Ki-67	Anti-CD45 RA	Anti-CD45 RO

Tabelle 5: Antikörper-Panel zur Färbung von LMNC.

Konjugat	PerCP	FITC	PE	APC
1		Anti-Maus- γ 1a	Anti-Maus- γ 2a	
2	Anti CD3	Anti CD4	Anti-CD8	
3	Anti CD4	Anti CD62L	Anti-CD45 RA	Anti-CD45 RO
4	Anti CD8	Anti CD62L	Anti-CD45 RA	Anti-CD45 RO
5	Anti CD4	Anti- HLA-DR	Anti-CD25	Anti-CD45 RO
6	Anti CD8	Anti- HLA-DR	Anti-CD25	Anti-CD45 RO
7	Anti CD4	Anti-CD57	Anti-CD69	
8	Anti CD8	Anti-CD45 RA	Anti-CD28	
9	Anti CD8	Anti-CD45 RO	Anti-CD38	
10	Anti CD8	Anti- HLA-DR	Anti-CD28	
11	Anti CD4	Anti-CD95/FAS	Anti-CD28	
12	Anti CD3	Anti-Ki-67	Anti-CD19	
13	Anti CD4	Anti-Ki-67	Anti-CD45 RA	Anti-CD45 RO
14	Anti CD8	Anti-Ki-67	Anti-CD45 RA	Anti-CD45 RO

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lymphozyten in 2 ml

Wasch-Puffer: 0,3% Saponin
 0,1% BSA (Bovines Serum Albumin)
 0,01% Azid
 in PBS (1x)

aufgenommen. Dort verblieben sie für 5 min., um die Zellmembranen abschließend so stark zu permeabilisieren, dass nicht-antigengebundene Ak aus dem Zellinneren ausgewaschen

werden konnten. Die Zellen wurden dann zentrifugiert, dekantiert, einmal mit Färbepuffer (s.o.) gewaschen und anschließend in

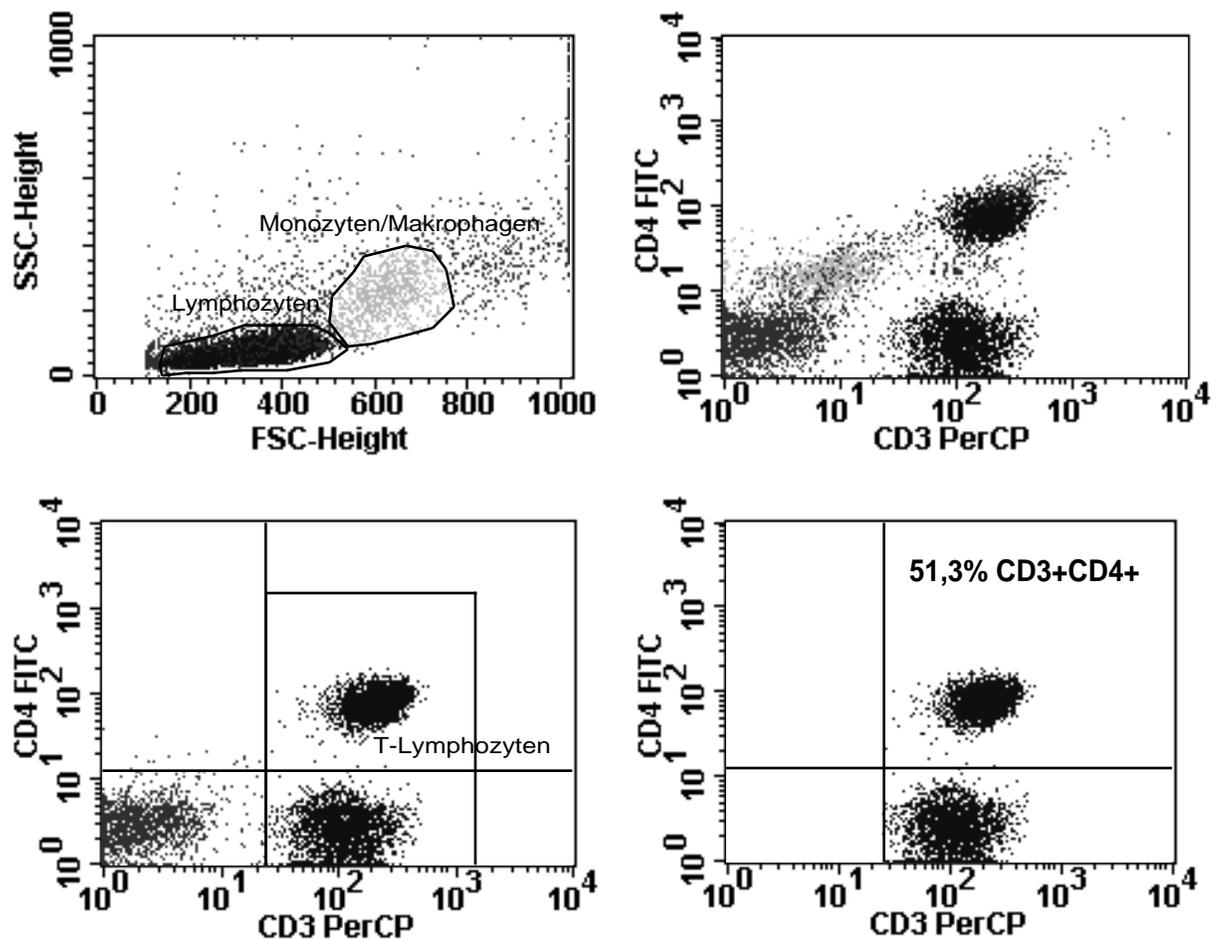
BSA-Puffer:	0,1% BSA (Bovines Serum Albumin)
	0,01% Azid (NaO3)
	in PBS (1x)

von überschüssigen Ak befreit. Abschließend wurden die Lymphozyten in 1% PFA fixiert und innerhalb von 24 Stunden gemessen.

3.4. FACS-Daten-Acquisition

Alle FACS-Messungen wurden auf demselben Gerät (FACScalibur[®], Becton Dickinson, Leimen), durchgeführt. Zur Aquirierung und Analyse wurde die vom Hersteller empfohlene Software CellQuest[™], Version 3.1.3, Becton Dickinson 1997, genutzt. Instrumenteneinstellungen für FSC und SSC wurden linear, FL1-H, FL2-H, FL3-H, FL4-H logarithmisch gewählt, Isotypen-Kontrolle wurden in Acquisitions Histogramm verwendet, um Verstärker einzustellen und um negative Populationen zu definieren. Durch die Einstellung der Kompensation konnte eine aufgrund überlappender Emissionsspektren der Fluorochrome irrtümlich doppelte Positivität der Zellen, vermieden werden. Es wurden für zu vergleichende Zeitpunkte identische Geräteeinstellungen gewählt. Es wurden stets 10 000 Ereignisse ermittelt.

Abbildung 2: Beispiel für die hier durchgeführte Form des „Gating“ von Lymphozytensubpopulationen



3.5. FACS-Daten-Analyse

Die Daten aus der jeweiligen Negativ-Kontrolle dienen dazu, unspezifische Bindung zu diskriminieren und Quadranteneinrichtung zu optimieren. Alle erfassten Ereignisse eines „file“ wurden wie folgt bearbeitet: Es wurde im „Lifegate“ eine Lymphozyten-Region bestimmt und als Gate 1 definiert, welches für vergleichende Datensätze beibehalten wurde. Für die weiteren Parameter FLH-1, -2, -3 und -4 wurden ebenfalls Regionen festgelegt und diese in Verknüpfung mit G1 (=R1) als neue Gates definiert (z.B. G2= R2 And G1, G3 = R3 And G1 u.s.w.). In der Analyse wurde, um Anteile einer Merkmals exprimierenden Population in Prozent ausdrücken zu können, in der Quadranten-Statistik entsprechend auf diese Gates Bezug genommen (vgl. Abb. 2, S. 19).

3.6. Quadrantenstatistik

Der Statistik zugrunde liegende Werte wurden ermittelt, indem durch eine entsprechende „Gating“-Strategie die gesuchte Subpopulation in einem Dot-Plot-Diagramm dargestellt und Prozentanteile mittels Quadrantenstatistik automatisch ermittelt wurden (vgl. Abb. 2, S. 19). Um absolute Zellzahlen der Subpopulationen CD4+CD45RAhi/μl, CD4+CD45R0hi/μl, CD8+CD45RAhi/μl, CD8+CD45R0hi/μl, CD8+CD45R0+HLA-DR/μl, CD8+CD45RO+CD38+/μl,

CD4+Ki67+/ μ l und CD8+Ki-67+/ μ l zu erhalten, wurden prozentuale Anteile mit den absoluten Zellzahlen (CD4+ und CD8+) des jeweiligen Zeitpunktes multipliziert.

3.7. Statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden zunächst in einer Datenbank (Microsoft-Excel[®] 5.0) gesammelt. Es wurden für jede Größe zu jedem Zeitpunkt der Median mit Standardabweichung bestimmt. Daten für Lk und PBMC wurden getrennt analysiert. Folgende Analysen wurden durchgeführt:

- 1.) Test auf Homogenität der Prä-Therapie Werte (Wilcoxon 2-Sample Test).
- 2.) Test auf Normalverteilung: Bestimmung des PROBN (Probability of normal distributed values) getrennt nach Zeitpunkten vor und nach Therapie. Bei Werten $> 0,2$ wurde von einer Normalverteilung ausgegangen.
- 3.) Analyse der Differenzen der Werte zwischen Post- und Prä-Therapie auf Signifikanz. Bei Normalverteilung ($\text{PROBN} > 0,2$) Verwendung von T-Test, bei $\text{PROBN} < 0,2$ Verwendung des Sign-Test. p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen, p-Werte sind als deskriptive Maßzahlen aufzufassen.
- 4.) Korrelationsanalyse für den Zusammenhang von prä-therapeutischen Daten und der VL vor Therapiebeginn. Für die normalverteilten Variablen wurde der Pearson-, für *nicht* normalverteilte der Spearman-Korrelationskoeffizient angewendet.
- 5.) Zur statistischen Auswertung zum Vergleich von Patienten-Daten mit denen der Normalkontrolle vor und nach Therapie wurde durch Mann-Whitney-U-Test angewandt.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung von Patienten in der chronischen HIV-Infektion

Die 31 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pat. stellen die ersten von insgesamt 55 Randomisierten dar. Bei ihnen war mit dem jeweiligen Therapie-Regime für mindestens sechs Monate eine Suppression der Plasma-Virusbelastung unter die Nachweisgrenze des Tests (25 RNA Kopien/ml) erreicht worden. 29 Männer und 2 Frauen mit einem Alter von Median 32 ± 9 Jahren wurden erfasst. Die Viruslast betrug im Median 4,37 log. In der Untersuchung der Parameter auf Homogenität vor Beginn der Therapie zeigten sich weder im Lymphknoten (Lk) noch im Blut (PB) signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsarmen. Vergleich der Baseline-Werte zu Normalkontrolle berechnet durch Mann-Whitney U-Test.

4.1.1. T-Zell-Subpopulationen in der chronischen HIV-Infektion

4.1.1.1. CD3+CD4+/CD8+ PBMC, in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 6, S. 27) Es bestand bereits in der hier vorgestellten, asymptomatischen Patientengruppe im Vergleich zu der HIV-negativen Kontrollgruppe ($956 \pm 336/\mu\text{l}$, $p=0,004$) mit $473 \pm 162/\mu\text{l}$ eine deutliche CD4+ Lymphozytopenie (s. Abb. 9, S. 38), und mit $959 \pm 316/\mu\text{l}$ ($486 \pm 148/\mu\text{l}$, $p<0,001$) eine CD8+ Lymphozytose (s. Abb. 10, S. 38). Es resultierte die Umkehr der CD4/CD8-Ratio (abs.) auf $0,5 \pm 0,2$ (NoK: $1,8 \pm 0,54$, s. Abb. 8, S. 37). Auch prozentual war der Anteil der CD8+ im Blut innerhalb der CD3+ T-Lymphozyten gegenüber einem HIV negativen Kollektiv signifikant erhöht ($57 \pm 11\%$ vs. $35 \pm 5\%$, $p=0,001$) und CD3+CD4+ erniedrigt ($41 \pm 10\%$ vs. $61 \pm 9\%$, $p<0,001$, s. Abb. 12, S. 39).

4.1.1.2. CD3+ CD4+/CD8+ LNMC, in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 6, S. 27) Auch im Lymphknoten zeigte sich der Anteil der CD8+ mit $39 \pm 11\%$ im Vergleich zu der HIV negativen Gruppe ($24 \pm 9\%$ $p=0,001$) erhöht, der Anteil CD4+ Lymphozyten mit $60 \pm 11\%$ (NoK: $77 \pm 9\%$, $p=0,001$) signifikant erniedrigt. Absolute Zellzahlen waren im Lk nicht zu erheben (s. Abb. 11, S. 39).

4.1.2. CD45RO^{hi}RA- und CD45RA^{hi}RO-T-Zellen in der chronischen HIV-Infektion

4.1.2.1. CD4+ PBMC, CD45RO^{hi}RA- und CD45RA^{hi}RO- in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 7, S. 29) Im Hinblick auf die Expression der CD45-Isoformen bestanden vor Therapiebeginn bereits statistisch signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe. Der Anteil des Effektor/Memory-Phänotyps (CD45RO^{hi}RA-) der CD4+ T-Lymphozyten war mit $36 \pm 10\%$ im Vergleich zu der Kontrollgruppe (NoK: $28 \pm 8\%$, $p=0,093$) erhöht (s. Abb. 17, S. 41). Reziprok waren Zellen des naiven Phänotyps CD4+CD45RA^{hi}RO- des Blutes mit $41 \pm 11\%$ erniedrigt, ohne dass dieser Unterschied signifikant gewesen wäre (NoK: $48 \pm 9\%$, $p=0,130$). In absoluten Zellzahlen jedoch waren CD4CD45RO^{hi}RA- ($155 \pm 75/\mu\text{l}$ vs. NoK: $259 \pm 70/\mu\text{l}$, $p=0,002$), ebenso wie CD4+CD45RA^{hi}RO- PBMC ($187 \pm 89/\mu\text{l}$ vs. NoK: $435 \pm 226/\mu\text{l}$, $p=0,001$, s. Abb. 18, S. 41) hochsignifikant reduziert.

4.1.2.2. CD4+ LNMC, CD45ROhiRA- und CD45RAhiRO-, in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 7, S. 29) Anders als im Blut präsentierte sich der größte Teil ($40 \pm 13\%$) der CD4+ im Lk phänotypisch als naiv (CD4+CD45RAhiRO-) (s. Abb. 21, S. 43), ein Anteil höher als der in der Normalkontrolle (Nok: $33 \pm 17\%$), aber nicht auf signifikantem Niveau ($p=0,203$). Ein Anteil von in Median lediglich $34 \pm 12\%$ der CD4+ wies vor Beginn der Therapie den Effektor/Memory-Phänotyp CD45ROhiRA- auf, gegenüber $48 \pm 17\%$ in der Nok, $p=0,31$.

4.1.2.3. CD8+ PBMC, CD45ROhiRA- und CD45RAhiRO-, in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 7, S. 29) Prozentual mit $22 \pm 11\%$ (Nok: $14 \pm 7\%$, $p=0,101$, s. Abb. 19, S. 42) und in absoluten Zellzahlen mit $235 \pm 174/\mu\text{l}$ (Nok: $52 \pm 55/\mu\text{l}$, $p=0,002$, s. Abb. 18, S. 42) waren im Blut vor Therapie CD8+CD45ROhiRA- signifikant erhöht. Aber auch die Frequenz der phänotypisch naiven CD8+CD45RAhiRO- ($472 \pm 195/\mu\text{l}$) war im Vergleich zur Kontrollgruppe im Blut ($324 \pm 79/\mu\text{l}$, $p=0,006$) signifikant erhöht. Prozentual überwogen entsprechend naive CD8+ Lymphozyten ($45 \pm 12\%$ vs. Nok: $69 \pm 11\%$, $p=0,002$).

4.1.2.4. CD8+ LNMC, CD45ROhiRA- und CD45RAhiRO-, in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 7, S. 29) Anders als in der Population der CD4+ überwog bei Therapiebeginn im Lk der CD8+ Effektor/Memory-Typ CD8+ROhiRA- mit $43 \pm 13\%$ (Nok: $60 \pm 17\%$, $p=0,186$, s. Abb. 21, S. 43). Lediglich $33 \pm 14\%$ (Nok: $25 \pm 14\%$, $p=0,482$) entsprachen dem naiv Phänotypus, CD8+RAhiRO-.

4.1.3. Immunaktivierung in der chronischen HIV-Infektion

4.1.3.1. CD4+ PBMC, Aktivierungsmarker in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 8, S. 31) Frühe (CD69+ $4 \pm 3\%$, NoK: $1 \pm 1\%$, $p=0,027$) und späte (HLA-DR+ $9 \pm 5\%$ (NoK: $3 \pm 2\%$, $p=0,001$) Aktivierungsmarker wurden auf CD4+ PBMC im Vergleich zu HIV-negativen vor Therapiebeginn signifikant erhöht exprimiert (s. Abb. 29, S. 47 und Abb. 31, S. 48). Insbesondere CD4+CD45RO+ Effektorzellen zeigten mit einem Anteil HLA-DR exprimierender Zellen von $16 \pm 7\%$ (NoK: $6 \pm 4\%$, $p=0,002$) ein signifikant erhöhtes Maß der Aktivierung (s. Abb. 29, S. 47). Entsprechend dem Anstieg anderer Aktivierungsmarker in dieser Zellpopulation war auch CD95/FAS mit $44 \pm 15\%$ (NoK: $32 \pm 9\%$, $p=0,011$) signifikant stärker exprimiert (s. Abb. 31, S. 48). Kein statistisch signifikanter Unterschied bestand im Hinblick auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 (IL-2-Rezeptor) auf CD4+ ($28 \pm 11\%$ vs. NoK: $27 \pm 10\%$, $p=0,525$, s. Abb. 31, S. 48).

4.1.3.2. CD4+ LNMC, Aktivierungsmarker in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 8, S. 31) Auch im Lk war der Anteil CD25 ($23 \pm 8\%$ vs. $27 \pm 5\%$, $p=0,129$) exprimierender Helfer-Zellen im Lymphknoten im Vergleich zur HIV-negativen Gruppe nicht signifikant verändert (s. Abb. 30, S. 48). Der Anteil der CD69 exprimierenden CD4-Lymphozyten war im Lk 9-fach höher als im PB, ohne sich jedoch in der Höhe von einer Kontrollgruppe zu unterscheiden ($36 \pm 8\%$ vs. NoK $38 \pm 13\%$, $p=0,341$, s. Abb. 30, S. 48). Die Expression von HLA-DR auf CD4+ war im Lk mit Median $19 \pm 11\%$ (NoK: $8 \pm 5\%$, $p<0,001$) signifikant erhöht, insbesondere auf

CD45RO+ (s. Abb. 28, S. 47) (CD4+CD45RO+HLA-DR+: $36 \pm 14\%$ vs. $20 \pm 6\%$, $p=0,001$), wenn auch auf niedrigerem Niveau als auf CD8+ (s.u.). Fas-exprimierende Zellen waren im Lymphknoten in niedrigerer Frequenz detektierbar als im Blut und im Vergleich zur NoK nicht signifikant erhöht ($36 \pm 12\%$ vs. NoK $29 \pm 11\%$, $p=0,77$, s. Abb. 30, S. 48).

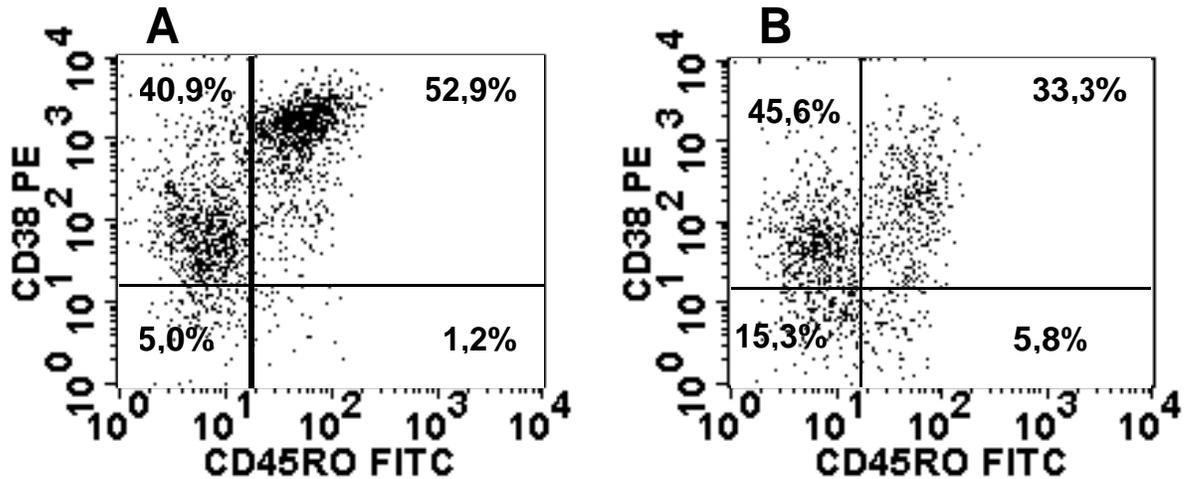
4.1.3.3. CD8+ PBMC, Aktivierungsmarker in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 9, S. 32)

Der Grad der Aktivierung der CD8+ PBMC war höher als der der CD4+ des Blutes. Hochsignifikant war auch der Unterschied zu der HIV-negativen Kontrollgruppe. Signifikant erhöht war der Anteil der CD8+HLA-DR- ($47 \pm 13\%$ vs. $11 \pm 9\%$, $p<0,001$, s. Abb. 27, S. 49) und CD8+CD38+ ($83 \pm 10\%$ vs. $65 \pm 10\%$, $p=0,004$, s. Abb. 35, S. 50) PBMC, besonders der CD45RO+ (s. Abb. 33, S. 49) (CD8+CD45RO+HLA-DR+: $59 \pm 12\%$ vs. $21 \pm 8\%$, $p<0,001$, CD8+CD45RO+CD38+: $77 \pm 13\%$ vs. $38 \pm 11\%$, $p<0,001$). Entsprechend signifikant erniedrigt präsentierte sich die Fraktion der CD8+CD28+ PBMC ($46 \pm 12\%$ vs. $85 \pm 15\%$, $p<0,001$, s. Abb. 35, S. 50). Kein signifikanter Unterschied bestand vor Beginn der Therapie für die Expression von CD25 ($3 \pm 5\%$ vs. $3 \pm 6\%$, $p=0,568$, s. Abb. 35, S. 50). Auffällig hier der Unterschied der Höhe im Vergleich zu CD4+ PBMC.

4.1.3.4. CD8+ LNMC, Aktivierungsmarker in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 9, S. 32)

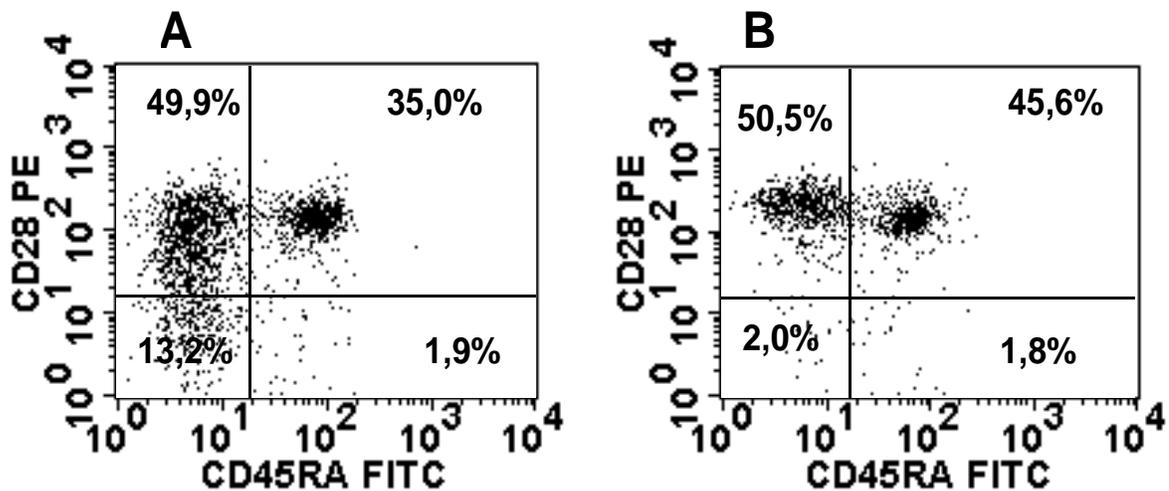
Ein vergleichbares Niveau der zellulären Aktivierung konnte in der Population der CD8+ des Lk gesehen werden. Ein Anteil von $51 \pm 11\%$ der CD8+ im Lk exprimierten den späten Aktivierungsmarker HLA-DR (NoK: $16 \pm 12\%$, $p<0,001$, s. Abb. 32, S. 49) und $94 \pm 5\%$ der CD8+ Lymphozyten CD38 (NoK: $53 \pm 19\%$, $p=0,003$), davon $47 \pm 12\%$ (NoK: $10 \pm 13\%$, $p<0,001$) in höchster Dichte (s. Abb. 34, S. 50). Besonders die Subpopulation der CD45RO+ zeichnete sich, wie auch im Blut, durch eine erhöhte Expression dieser Aktivierungsmarker aus (s. Abb. 32, S. 49) (CD8+CD45RO+HLA-DR+: $76 \pm 11\%$, $p=0,065$; CD8+CD45RO+CD38+: $95 \pm 15\%$, $p=0,003$). CD8+ mit dem Co-Rezeptor CD28 zeigten sich im Vergleich zum Normkollektiv auf im Median $80 \pm 11\%$ erniedrigt (s. Abb. 34, S. 50), NoK: $94 \pm 3\%$, $p=0,001$). CD25, wurde, wie im Blut, von lediglich $3 \pm 2\%$ der CD8+ Lymphozyten exprimiert (NoK. $5 \pm 7\%$, $p=0,28$), ohne sich von der NoK signifikant zu unterscheiden (s. Abb. 34, S. 50).

Abbildung 3: Aktivierung von CD8+ LNMC, Darstellung als „dot plot“ in der Durchflußzytometrie.



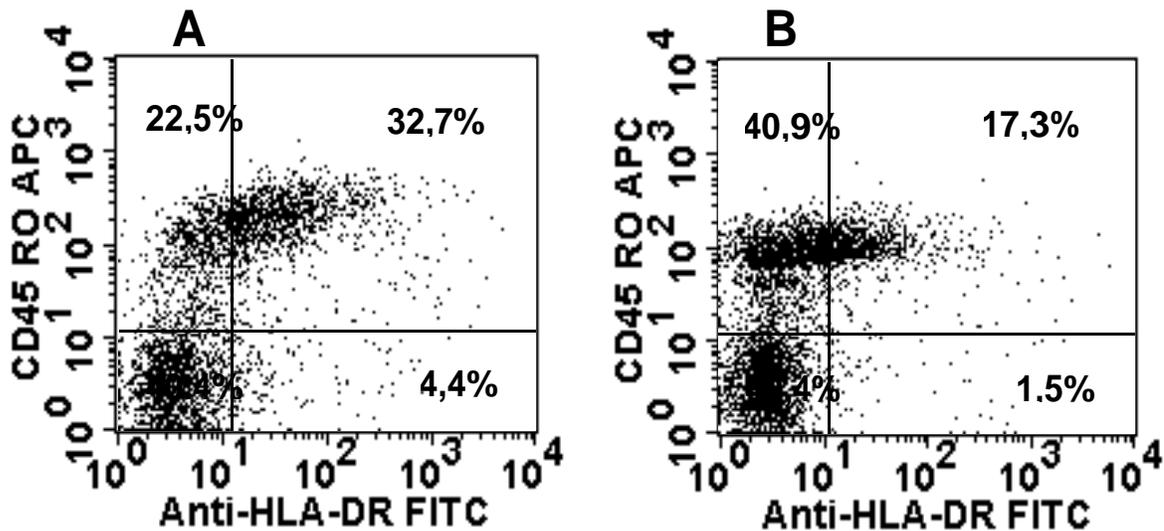
Repräsentative FACS-Analysen von CD8+ Lymphozyten des Lymphknoten unter Berücksichtigung des Memory-Markers CD45RO und des Aktivierungsmarkers CD38. (A) vor Beginn einer Therapie, (B) nach 12 Monaten unter HAART. Angabe des prozentualen Anteils der Gesamt CD8+ im jeweiligen Quadranten exemplarisch dargestellt (Pat 1002).

Abbildung 4: Expression von CD28 auf naiven (CD45RA+) CD8+ LNMC, Darstellung als „dot plots“ in der Durchflußzytometrie.



Repräsentative FACS-Analyse von CD8+ Lymphozyten des Lymphknoten unter Berücksichtigung von CD45RA und des Co-Rezeptors CD28. Zunahme des naiven Phänotyps CD8+CD45RA^{hi}CD28⁺, vor Therapie (A) und nach 12 Mo (B). Angabe des prozentualen Anteils der Gesamt-CD8+ im jeweiligen Quadranten dargestellt (Pat. 1002).

Abbildung 5: Aktivierung von CD4+ LNMC, Darstellung als „dot plots“ in der Durchflußzytometrie.



Repräsentative FACS-Analyse von CD4+ Lymphozyten des Lymphknotens unter Berücksichtigung des Memory/Effektor-Markers CD45RO und des späten Aktivierungsmarkers HLA-DR vor (A) und nach 12 Mo Therapie (B). Abnahme des Grades der Aktivierung auch in CD4+ Subpopulation.

4.1.4. Lymphozyten-Proliferation in der chronischen HIV-Infektion

4.1.4.1. CD4+ PBMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 10, S. 34) In der chronischen HIV-Infektion konnte bei Betrachtung der Gesamtgruppe mit im Median $2,4 \pm 2\%$ (NoK: $1,2 \pm 2,2\%$, $p=0,031$) ein signifikant gesteigerter Anteil Ki-67-exprimierender CD4+ PBMC befundet werden (s. Abb. 40, S. 52). V.a. die Population der CD45RO+ Zellen war es, die mit im Median $4,9 \pm 3,3\%$ über den Werten der Kontrolle lag ($2,1 \pm 0,9\%$, $p=0,027$). Während der prozentuale Anteil der Proliferierenden über dem Niveau der NoK lag, waren diese in absoluten Zellzahlen mit CD4+Ki-67+ $11 \pm 11/\mu\text{l}$ (NoK: $11 \pm 7/\mu\text{l}$, $p=0,343$) nicht verändert.

Ein nur geringer und im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlicher Anteil naiver CD4+CD45RA+ Zellen exprimierte Ki-67+ ($0,7 \pm 0,8\%$ vs. $0,2 \pm 0,4\%$, $p=0,28$).

4.1.4.2. CD4+ LNMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 10, S. 34) Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde vor Initiierung einer Therapie im Median von $5,7 \pm 5\%$ der CD4+ T-Lymphozyten des Lk exprimiert (s. Abb. 39, S. 52). Dies war im Vergleich zu HIV-negativen ($3,1 \pm 0,9\%$, $p=0,05$), signifikant erhöht, und stellte sich ausgeprägter als in der gleichen Population des Blutes dar. Vergleichbar mit dem Blut und dem Aktivierungsstatus der Lymphozyten war v.a. die Population der CD45RO+ Zellen mit einem Anteil von $4,9 \pm 3,3\%$ erhöht (NoK: $2,1 \pm 0,9\%$, $p=0,265$).

Wie im Blut auch, exprimierte im Lymphknoten eine geringe Fraktion phänotypisch naiver T-Helfer-Zellen (CD4+CD45RA+) Ki-67 ($2,4 \pm 4,8\%$ vs. NoK: $1,6 \pm 0,8\%$), ohne signifikanten Unterschied zur Normalkontrolle ($p=0,71$).

4.1.4.3. CD8+ PBMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 10, S. 34) Ausgeprägter als in der CD4+ Population stellte sich der Anteil proliferierender CD8+ PBMC dar ($4,6 \pm 5\%$ vs. $0,9 \pm 1\%$, $p < 0,001$, s. Abb. 40, S. 52), auch hier mit $8,3 \pm 6,7\%$ insbesondere in der Fraktion der CD45RO+ (NoK: $2,8 \pm 1,0\%$, $p = 0,001$). Der Anteil phänotypisch naiver (CD4+CD45RA+) CD8+ mit Expression von Ki-67 war im Vergleich zu HIV-negativen signifikant erhöht ($3,4 \pm 4,5\%$ vs. $0,4 \pm 0,8\%$, $p = 0,017$).

4.1.4.4. CD8+ LNMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 10, S. 34) Den größten Anteil proliferierender T-Lymphozyten machte im Lk CD8+ aus: Median $7,1 \pm 5\%$ (NoK: $2,7 \pm 1,2\%$) der CD8+ LNMC exprimierten Ki-67, signifikant höher als in der HIV-negativen Gruppe ($p = 0,007$, s. Abb. 39, S. 52), auch hier besonders ausgeprägt in der Subpopulation der Memory/Effektor-Lymphozyten CD8+CD45RO+ ($8,7 \pm 5\%$ vs. $2,0 \pm 1,2\%$, $p = 0,004$). Auch ein geringer Anteil CD8+CD45RA+ des Lk exprimierten Ki-67, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu HIV-negativen Individuen ($1,2 \pm 2,3\%$ vs. NoK $1,5 \pm 1,2\%$, $p = 0,20$).

4.1.4.5. B-Zellen PBMC/LNMC, Ki-67-Expression in der chronischen HIV-Infektion: (vgl. Tab. 10, S. 34) Der größte Unterschied in der Fraktion proliferierender Lymphozyten zum Zeitpunkt des Therapiebeginns zu der Kontrollgruppe wurde bei B-Zellen gesehen (s. Abb. 39 und 40, S. 52). Gegenüber der NoK war der Anteil Ki-67 exprimierender B-Zellen im Lk hochsignifikant erhöht ($30 \pm 16\%$ vs. $2,4 \pm 3,7\%$, $p = 0,002$). Auch der Anteil proliferierender B-Zellen im PB war, wenn auch nicht statistisch signifikant ($p = 0,13$), mit $4 \pm 3\%$ erhöht.

4.2. Korrelation von Aktivierung und Proliferation mit viraler Replikation

P-Werte wurden als Pearson bzw. Spearman-Korrelations-Koeffizient berechnet (s. Methoden). Die Höhe der Plasmaviruslast korrelierte bei Studienbeginn signifikant mit dem Anteil Ki-67-exprimierender CD4+ ($p = 0,036$, s. Abb. 38, S. 51) und CD8+ Lymphozyten ($p = 0,022$, s. Abb. 39, S. 51), sowie CD8+RO+Ki-67+ ($p = 0,0211$). Auch der Anteil proliferierender CD4+- und CD8+-Lymphozyten untereinander korrelierte hoch signifikant ($p = 0,001$). Darüberhinaus korrelierte der Anteil aktivierter CD8+ Lymphozyten (CD8+CD45RO+HLA-DR+) mit der Höhe der Viruslast ($p = 0,042$).

4.3. Therapie-Einfluss auf die Plasmaviruslast

Voraussetzung für eine zweite Lk-Entnahme war in dieser Studie die stabile Suppression der Plasmaviruslast unter die Nachweisgrenze von 25 Kopien HIV-RNA/ml. Unabhängig vom Randomisationszweig sank die virale Belastung bei der Gesamtgruppe innerhalb von Median 3 Monaten (range: 1-7 Monate) unter die Nachweisgrenze des Tests (s. Abb. 7, S. 37). Weder das Ausmaß der Reduktion noch die Dauer bis zum Erreichen der Nachweisgrenze unterschieden sich zwischen den Behandlungsarmen. Der Abfall der Virämie stellte sich zweiphasig dar. Bereits in den ersten zwei Wochen fiel die Virämie um Median zwei Log-

Stufen, in den darauffolgenden zwei Monaten um eine weitere. Lediglich zwei Pat. zeigten eine intermittierend nachweisbare, minimale Plasmavirämie, sogenannte „blips“.

P-Werte wurden durch T-Test für normalverteilte Variablen, durch Sign-Test für nicht-normalverteilte berechnet. Statistische Signifikanz der Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe wurden durch Mann-Whitney-U-Test berechnet.

4.4. Therapie-Einfluss auf T – Zell-Subpopulationen in Blut und Lymphknoten

4.4.1. CD3+ CD4+/CD8+ PBMC nach in Median 12 Monaten Therapie: (vgl. Tab. 6, S. 27)

Die Zahl der T-Helfer-Zellen stieg in der Gesamt-Gruppe um Median 463 ± 262 Zellen/ μl auf 936 ± 258 / μl nach Median zwölf Monaten ($p < 0,001$; NoK: 956 ± 336 / μl , s. Abb. 9, S. 38). Dies entspricht einem Anstieg von + 98%. Der Anstieg der CD4+ Lymphozyten in der IL-2-Gruppe zeigt sich hier mit $+497 \pm 164$ / μl (445 ± 143 / μl auf 942 ± 182 / μl , +111%, $p < 0,014$), gegenüber $+159 \pm 283$ Zellen/ μl (527 ± 173 / μl auf 686 ± 273 / μl , +30%, $p < 0,001$) in der HAART-Gruppe ausgeprägter. In beiden Therapiearmen bestand nach Abschluss der Beobachtung kein signifikanter Unterschied zur HIV-negativen Kontrollgruppe (IL-2: $p = 0,526$, HAART: $p = 0,364$). Vier Pat. zeigten über 12 Monate einen CD4-Zellanstieg von weniger als 100/ μl (Pat. 1002, 1030, 1031, 1038).

Tabelle 6: T-Zell-Subpopulationen prozentual und absolut in PB und prozentual im Lk. Asterisk (*) entspricht Signifikanz ($p < 0,05$) im Unterschied zu Normalkontrolle (rechts), „fett“-gedruckt gibt Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu t_0 der HIV-positiven Patientengruppe an.

		HAART		HAART + IL-2		Kontrollen
		t=0	t=12 Mo.	t=0	t=12 Mo.	
HIV-RNA	Plasma	4,255 log	1,39 log	4,585 log	1,39 log	ND
abs. CD4+/ μl	PBMC	527 ± 173 *	686 ± 274	445 ± 143 *	942 ± 182	956 ± 336
%CD3+CD4+	PBMC	42 ± 9 *	55 ± 9	35 ± 10 *	49 ± 9 *	62 ± 9
%CD3+CD4+	LNMC	60 ± 7 *	77 ± 7	61 ± 12 *	79 ± 8	77 ± 9
abs. CD8+/ μl	PBMC	959 ± 195 *	716 ± 156 *	1049 ± 373 *	1003 ± 224 *	486 ± 148
%CD3+CD8+	PBMC	56 ± 10 *	44 ± 9 *	60 ± 10	45 ± 10 *	35 ± 5
%CD3+CD8+	LNMC	39 ± 7 *	23 ± 7	37 ± 13 *	21 ± 8	24 ± 9
Ratio CD4/CD8	PBMC	$0,5 \pm 0,2$ *	$1,0 \pm 0,4$ *	$0,5 \pm 0,2$ *	$1,0 \pm 0,5$ *	$1,8 \pm 0,5$
Ratio CD4/CD8	LNMC	$1,5 \pm 0,4$ *	$3,3 \pm 1,5$	$1,6 \pm 0,6$ *	$3,8 \pm 1,2$	$3,2 \pm 1,2$

Die Zahl der CD3+CD8+ sank unter Betrachtung der Gesamtgruppe von Median 959 ± 316 Zellen/ μl auf 786 ± 231 / μl (-19,5%, $p < 0,001$) (NoK: 486 ± 148 / μl , s. Abb. 10, S. 38).

Die Reduktion der CD8+ war in der mit HAART therapierten Gruppe signifikant (959 ± 195 auf 716 ± 157 CD8+/ μl , entsprechend -25%, $p = 0,039$), während unter HAART+IL-2 kein statistisch signifikanter Unterschied zum Ausgangswert bestand (1049 ± 373 auf 1003 ± 224

CD8+/ μ l, entsprechend -4%, $p=0,357$). Auch nach im Median 12 Monaten Therapie blieb der Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p<0,001$).

Die CD4+/CD8+-Ratio stieg in beiden Behandlungsarmen um $+0,5 \pm 0,2$ auf $1,0 \pm 0,4$ (bzw. $1,0 \pm 0,5$) an (HAART: $p=0,001$, HAART+IL-2: $p=0,005$), ohne Unterschied zwischen den Therapieregimen (s. Abb. 8, S. 37).

Auch prozentual fand sich im Blut signifikante Veränderungen im Verhältnis der T-Lymphozyten-Subpopulationen. Der Anteil der CD3+CD4+ stieg in der mit HAART allein behandelten Population von $42 \pm 9\%$ auf im Median $55 \pm 9\%$, unter Interleukin-2 von $35 \pm 10\%$ auf Median $49 \pm 9\%$ hochsignifikant an (NoK: $62 \pm 9\%$, $p<0,001$, s. Abb. 12, S. 38).

Der Anteil der CD8+ sank unter Interleukin-2 von im Median $60 \pm 10\%$ auf $45 \pm 10\%$ und unter HAART von $56 \pm 12\%$ auf $44 \pm 9\%$ (NoK: $35 \pm 5\%$, s. Abb. 12, S. 39). Werte nach einem Jahr Therapie verblieben signifikant über der HIV-negativen Kontrollgruppe (IL-2: $p=0,012$ bzw. HAART: $0,017$).

Die CD4+/CD8+-Ratio stieg unabhängig vom Therapieregime signifikant ($p=0,002$) an (s. Abb. 8, S. 37). Kein Randomisationszweig erreichte jedoch Werte der Kontrollgruppe ($1,79 \pm 0,54$, IL-2: $p=0,016$, HAART: $p=0,049$).

4.4.2. CD3+ CD4+/CD8+ LNMC, nach im Median 12 Monaten Therapie: (vgl. Tab. 6, S. 27) Auch im Lymphknoten stieg im Verlauf der Therapie der Anteil der CD3+CD4+ auf im Median $79 \pm 8\%$ an (unter IL-2, $p<0,001$) bzw. $77 \pm 7\%$ (unter HAART; $p<0,001$, s. Abb. 11, S. 39), statistisch nicht unterschiedlich von denen der Normalkontrolle ($77 \pm 9\%$, IL-2: $p=0,56$, HAART: $p=0,8$). Entsprechend fiel die Fraktion der CD8+ auch im Lymphknoten signifikant auf $21 \pm 8\%$ (IL-2, $p<0,001$) bzw. $23 \pm 7\%$ (HAART, $p<0,001$, NoK: $24 \pm 9\%$). Die CD4+/CD8+-Ratio stieg im Lymphknoten auf $3,3 \pm 1,3$ (NoK: $3,2 \pm 1,2$, s. Abb. 8, S. 37). Ratio, CD4- und CD8- Fraktion zeigten sich so nach 12 Monaten statistisch vollständig normalisiert. CD4+/CD8+-Ratio in Lk und PB korrelierten dabei, v.a. nach Therapie, hochsignifikant ($p<0,001$) miteinander (s. Abb. 13 und 14, S. 40).

4.5. Therapie-Einfluss auf 45ROhiRA- und CD45RAhiRO- T-Zellen in Blut und Lymphknoten: (vgl. Tab. 7, S. 29) CD4+ Lymphozyten wurden im Hinblick auf die Expression der CD45-Isoformen RA und RO, Marker für naive bzw. Effektor/Memory-Lymphozyten, zu fünf Zeitpunkten im Blut, wie auch zu zwei Zeitpunkten im Lk differenziert.

4.5.1. PBMC, CD4+ Effektor/Memory und naive T-Zellen nach im Median 12 Monaten Therapie: Bis Mo 1 zeigten sich zwischen den betrachteten Gruppen prozentual nur geringe Veränderungen in der Expression der CLA-Isoformen (s. Abb. 17, S. 41). Während in der Folge bis Mo 3 in der HAART-Gruppe der Anteil naiver T-Helferzellen bis zu einem maximalen Anteil von $50 \pm 15\%$ anstieg ($p=0,399$) und sich bis Mo 12 mit $44 \pm 8\%$ ($48 \pm \%$ in NoK) der Normalkontrolle anglich (HAART: $p=0,347$, nicht signifikant), bewirkte IL-2 ab Tag

28 v.a. einen Anstieg des Effektor/Memory-Phänotyps CD4+CD45RA^{hi}RO⁻ bis auf $45 \pm 11\%$ (NoK: $28 \pm 8\%$), damit signifikant höher als in der Kontrolle ($p=0,005$).

So stieg die CD4+ RA:RO-Ratio innerhalb der mit HAART alleine therapierten Pat. auf im Median $1,5 \pm 0,8\%$, während diese unter IL-2 zugunsten des Effektor/Memory Phänotyps sogar sank (s. Abb. 15, S. 40).

Auch in absoluten Zellzahlen betrachtet (s. Abb. 16, S. 41) imponierte ab Mo 1 ein signifikant höherer Anstieg der Effektor/Memory-CD4+ Lymphozyten bis auf $484 \pm 110/\mu\text{l}$, ($p<0,001$), was nach im Median 12 Monaten Werten 1,9-fach über denen der Normalkontrolle ($259 \pm 70/\mu\text{l}$, $p=0,002$) und 2,2-fach über denen der HAART Gruppe ($216 \pm 105/\mu\text{l}$) entsprach. CD4-Zellzahlen vom naiven Phänotyp (CD45RA^{hi}), zeigten ebenfalls signifikante Veränderungen (IL-2: +113%, $p=0,019$; HAART:+51%, $p=0,003$).

Tabelle 7: Verteilung naiver und Memory-/Effektor-T-Lymphozyten prozentual und absolut in Lk und Pb mit und ohne immunmodulatorische Therapie. Asterisk (*) entspricht Signifikanz ($p<0,05$) im Unterschied zu Normalkontrolle (rechts), „fett“-gedruckt zeigt Signifikanz ($p<0,05$) im Vergleich zu t_0 der HIV-positiven an.

		HAART		HAART + IL-2		Kontrollen
		t=0	t=12 Mo.	t=0	t=12 Mo.	
%CD4+ ‚memory‘	PBMC	36 ± 9	31 ± 9	37 ± 10	45 ± 11 *	28 ± 8
%CD4+ ‚memory‘	LNMC	34 ± 10	42 ± 12	33 ± 14	46 ± 13	48 ± 17
%CD4+ ‚naiv‘	PBMC	42 ± 12	46 ± 10	41 ± 10	32 ± 11 *	48 ± 9
%CD4+ ‚naiv‘	LNMC	40 ± 10	33 ± 11	42 ± 14	32 ± 10	33 ± 17
abs. CD4+ ‚memory‘/μl	PBMC	142 ± 95 *	215 ± 100	161 ± 49 *	460 ± 114 *	259 ± 70
abs. CD4+ ‚naiv‘/μl	PBMC	199 ± 84 *	295 ± 213	165 ± 93 *	352 ± 123 *	435 ± 226
CD4+ RA:RO Ratio	LNMC	1,2 ± 0,8 *	0,8 ± 0,9	1,2 ± 1,3 *	0,7 ± 0,6	0,8 ± 1,5
CD4+ RA:RO Ratio	PBMC	1,2 ± 0,9 *	1,5 ± 0,8	1,1 ± 0,6 *	0,8 ± 0,5 *	1,8 ± 0,7
%CD8+ ‚memory‘	PBMC	24 ± 11 *	15 ± 5	18 ± 11 *	14 ± 8	14 ± 78
%CD8+ ‚memory‘	LNMC	45 ± 13	37 ± 12	40 ± 11	32 ± 8 *	36 ± 17
%CD8+ ‚naiv‘	PBMC	42 ± 13 *	58 ± 9 *	47 ± 10 *	51 ± 12 *	69 ± 11
%CD8+ ‚naiv‘	LNMC	31 ± 13	42 ± 17	35 ± 14	45 ± 9	43 ± 14
abs. CD8+ ‚memory‘/μl	PBMC	211 ± 136 *	98 ± 28	252 ± 200 *	130 ± 117 *	52 ± 55
abs. CD8+ ‚naiv‘/μl	PBMC	433 ± 142	400 ± 147	472 ± 206 *	463 ± 155 *	324 ± 79
CD8+ RA:RO Ratio	LNMC	0,6 ± 1,0	1,0 ± 3,4	0,8 ± 1,2	1,3 ± 0,7	0,8 ± 1,5
CD8+ RA:RO Ratio	PBMC	1,9 ± 3,3	3,6 ± 2,5	2,4 ± 1,9	3,5 ± 2,7	4,9 ± 7,5

4.5.2. PBMC, CD8+ Effektor/Memory und naive T-Zellen nach im Median 12 Monaten

Therapie: (vgl. Tab 7, S. 29) Auch in der Fraktion der CD8+ Lymphozyten ließen sich ähnliche Phänomene beschreiben (s. Abb. 18 und 19, S. 42). Unter HAART stieg der Anteil der „naiven“ CD8+CD45RA^{hi}RO⁻ von $42 \pm 13\%$ auf $56 \pm 9\%$ (NoK: $69 \pm 11\%$) nach im Median 12 Monaten an ($p=0,06$). Entsprechend sank der Anteil der CD8+ Lymphozyten vom Effektor/Memory-Phänotyp unter HAART von $24 \pm 11\%$ auf $13 \pm 7\%$ (NoK: $14 \pm 7\%$, $p=0,024$).

Daraus resultierte ein Anstieg der CD45RA^{hi}/CD45RO^{hi}-Ratio auf $4,3 \pm 2,7\%$ (NoK: $4,9 \pm 7,5\%$, s. Abb. 20, S. 43)

Naive CD8⁺ Zellen waren unter HAART in absoluten Zellzahlen stabil ($433/\mu\text{l}$ auf $402/\mu\text{l}$). CD8⁺ Effektor/Memory-Zellen verschwanden aber zunehmend aus dem Blut. Ein signifikanter Abfall von $211 \pm 136/\mu\text{l}$ auf $98 \pm 39/\mu\text{l}$, (entsprechend -53%), konnte beobachtet werden ($p=0,178$). Dieser Wert war am Ende des Beobachtungszeitraumes aber noch immer zweifach ($98 \pm 39/\mu\text{l}$) gegenüber Gesunden ($52 \pm 55/\mu\text{l}$) erhöht ($p=0,072$).

Auch unter HAART+IL-2 kam es im Blut zu einer signifikanten Reduktion der CD8+CD45RO^{hi}-Zellen von $252 \pm 200/\mu\text{l}$ auf $131 \pm 117/\mu\text{l}$ (-48% , $p=0,002$), und (weniger ausgeprägt) auch der naiven CD8+CD45RA^{hi}RO⁻ ($p=0,66$). Prozentual stieg der Anteil der naiven CD8-Lymphozyten unter immunmodulatorischer Therapie lediglich von $47 \pm 10\%$ auf $51 \pm 12\%$ (NoK: $69 \pm 11\%$), was sich als nicht signifikant darstellte ($p=0,645$), auch der Anteil der Memory-/Effektor-Lymphozyten war unter Interleukin-Therapie im Gegensatz zu der mit HAART behandelten Gruppe stabil (von $14 \pm 7\%$ auf $15 \pm 8\%$ ($p=0,18$; NoK: $69 \pm 11\%$)).

4.5.3. LNMC, CD4+ Effektor/Memory und naive T-Zellen nach im Median 12 Monaten Therapie: (s. Abb. 21, S. 43) Der Anteil der CD4+CD45RO^{hi} stieg von Median $33 \pm 14\%$ auf $46 \pm 13\%$ (IL-2, $p=0,12$) bzw. $34 \pm 10\%$ auf $42 \pm 12\%$ (HAART, $p=0,046$) und damit auf Werte an, welche nicht von denen der NoK unterschiedlich waren (NoK: $48 \pm 17\%$, $p=0,8$ bzw. $0,33$). Der Anstieg war im IL-2 Behandlungsarm stärker ausgeprägt, der Unterschied nach 12 Monaten zur Kontrollgruppe aber nicht signifikant. Der Anteil der naiven CD4+CD45RA^{hi}RO⁻ Lymphozyten nahm entsprechend von im Median $42 \pm 14\%$ auf $32 \pm 10\%$ (IL-2, $p=0,157$) bzw. $40 \pm 10\%$ auf $33 \pm 11\%$ (HAART, $p=0,083$) ab (NoK: $33 \pm 17\%$).

4.5.4. LNMC, CD8+ Effektor/Memory und naive T-Zellen nach im Median 12 Monaten Therapie: (s. Abb. 21, S. 43) Die Abnahme der CD3+CD8⁺ im lymphatischen Gewebe ging mit einer Verschiebung der Subpopulationen zugunsten der naiven Phänotypen einher, was dem allgemeinen Trend in diesem Kompartiment zu einer Normalisierung entsprach. Diese Entwicklung war in beiden Patientengruppen gleichermaßen zu beobachten. Der Anteil der naiven CD8⁺ nahm so von im Median $35 \pm 14\%$ auf $45 \pm 9\%$ (IL-2, $p=0,016$) bzw. $34 \pm 10\%$ auf $42 \pm 12\%$ (HAART, $p=0,001$) signifikant zu (NoK: $43 \pm 17\%$), der Anteil der Effektor-/Memory-Zellen nahm entsprechend von im Median $40 \pm 11\%$ auf $32 \pm 8\%$ (IL-2, $p=0,038$) bzw. $45 \pm 13\%$ auf $37 \pm 12\%$ (HAART, $p=0,010$) ab (NoK: $36 \pm 12\%$). Die RA:RO Ratio für CD8⁺ im Lk stieg so von $0,8 \pm 1,2$ auf $1,3 \pm 0,7$ zugunsten der naiven CD8⁺ an (NoK: $0,4 \pm 0,6$).

4.6. Therapie-Einfluss auf Immunaktivierung in Blut und Lymphknoten

Die Veränderungen in Bezug auf den Aktivierungsstatus der T-Lymphozyten zeigte sich in Lk und Blut, unter Therapie in der CD8⁺ ausgeprägter als in der der CD4⁺ Subpopulation.

4.6.1. PBMC, CD4+, Aktivierungsstatus nach im Median 12 Monaten Therapie: (s. Tab. 8, S. 31) Unter Therapie fiel der Anteil der HLA-DR⁺ exprimierenden CD4⁺ von $11 \pm 5\%$ auf 5

$\pm 4\%$ (IL-2, $p=0,001$) bzw. von $9 \pm 5\%$ auf $5 \pm 3\%$ (HAART, $p=0,014$, s. Abb. 22, S. 44). Der Anteil der CD25-positiven CD4+ stieg in dem mit IL-2 therapierten Kollektiv von $26 \pm 2\%$ auf Median $50 \pm 14\%$ ($p<0,001$, s. Abb. 22, S. 44), während dieser in der mit HAART behandelten Gruppe mit $34 \pm 11\%$ unverändert ($p=0,288$) blieb (NoK 27%). Sowohl der Anteil der CD4+CD69+ ($4 \pm 3\%$, s. Abb. 31, S. 48) wie auch der von CD4+CD28+ (s. Abb. 24, S. 45) im peripheren Blut zeigte im Beobachtungsintervall keine signifikanten Veränderungen. Der Anteil der den Oberflächenmarker CD95/FAS tragenden Zellen näherte sich in der HAART Gruppe lediglich an normale Werte an (s. Abb. 31, S. 48) (von $50 \pm 11\%$ auf $36 \pm 12\%$, $p=0,568$), ohne statistisch deren Niveau zu erreichen ($p=0,088$, NoK: $32 \pm 9\%$). Im Gegensatz dazu war in der IL-2-Gruppe unter Therapie ein Anstieg für CD4+FAS+ zu sehen, dieser Anstieg war jedoch statistisch nicht signifikant ($44 \pm 13\%$ auf $50 \pm 11\%$; $p=0,7$).

Tabelle 8: Verteilung von Aktivierungsmarkern auf CD4+ T-Lymphozyten prozentual in Lk und Pb mit und ohne immunmodulatorische Therapie. Asterisk (*) entspricht Signifikanz ($p<0,05$) im Unterschied zu Normalkontrolle (rechts), „fett“-gedruckt zeigt Signifikanz ($p<0,05$) im Vergleich zu t_0 der HIV-Positiven.

		HAART		HAART + IL-2		Kontrollen
		t=0	t=12 Mo.	t=0	t=12 Mo.	
%CD4+HLA-DR+	PBMC	9 ± 4 *	5 ± 3	11 ± 5 *	5 ± 4	3 ± 2
%CD4+HLA-DR+	LNMC	26 ± 12 *	14 ± 5 *	18 ± 8 *	18 ± 9 *	8 ± 5
%CD4+CD45RO+HLA-DR+	PBMC	16 ± 7 *	8 ± 5 *	16 ± 6 *	7 ± 5	6 ± 4
%CD4+CD45RO+HLA-DR+	LNMC	40 ± 14 *	24 ± 8	31 ± 12 *	26 ± 11	20 ± 6
%CD4+CD25+	PBMC	34 ± 8	34 ± 10	26 ± 10	48 ± 14 *	27 ± 10
%CD4+CD25+	LNMC	24 ± 8	28 ± 10	20 ± 7	34 ± 11	27 ± 5
%CD4+CD28+	PBMC	99 ± 4	99 ± 5	98 ± 5	99 ± 4	99 ± 2
%CD4+CD28+	LNMC	99 ± 4	100 ± 2	100 ± 3	100 ± 4	100 ± 3
%CD4+CD69+	PBMC	4 ± 2	5 ± 2	3 ± 3	3 ± 2	$1 \pm 1,4$
%CD4+CD69+	LNMC	36 ± 7	36 ± 8	35 ± 9	35 ± 6	38 ± 13
%CD4+FAS/APO-1	PBMC	50 ± 16 *	36 ± 12	47 ± 11 *	50 ± 11 *	32 ± 9
%CD4+FAS/APO-1	LNMC	38 ± 12 *	30 ± 12	34 ± 12	34 ± 11	29 ± 11

Diese Beobachtung ist in engem Zusammenhang mit der Entwicklung der CD45RO^{hi}RA-Subpopulation zu sehen, da die Expression von FAS mit der Konversion zur leichteren CD45-Isoform CD45RO vergesellschaftet ist und diese, wie oben beschrieben, unter dem Einfluss von IL-2 anstieg.

4.6.2. PBMC, CD8+, Aktivierungsstatus nach im Median 12 Monaten Therapie: (s. Tab. 9, S.32) Der Anteil der CD8+ PBMC, die den späten Aktivierungsmarker HLA-DR exprimierten, nahm in der Gesamt-Gruppe unter Therapie von $47 \pm 13\%$ auf $24 \pm 11\%$ ab (s. Abb. 23, S.44 und Abb. 33, S. 44). Diese Veränderung war hoch signifikant ($p<0,001$), erreichte aber statistisch das Niveau der Kontrollgruppe nicht ($11 \pm 9\%$, $p=0,014$ bzw. $p=0,028$). Der Anteil der CD38 tragenden CD8+ Lymphozyten nahm (Mo 1: 77%, Mo 5: 71%,

Mo 9: 66%) auf Werte vergleichbar denen in der HIV-negativen Gruppe (Nok.: $65 \pm 10\%$) ab ($68 \pm 13\%$, $p < 0,001$, s. Abb. 35, S. 50). Die Reduktion von sowohl CD38 als auch HLA-DR war auf CD8+CD45RO+ Effektorzellen am ausgeprägtesten (s. Abb. 26, S. 46). Der Anteil des Co-Rezeptors CD28 auf ruhenden, naiven CD8+ Lymphozyten (s. Abb. 35, S. 50) war am Ende des Beobachtungsintervalls bis auf $56 \pm 8\%$ (IL-2) bzw. $61 \pm 10\%$ (HAART) angestiegen (NoK: $85 \pm 15\%$, $p = 0,0014$), was jedoch noch signifikant niedriger war als in der Normalkontrolle ($p = 0,003$ bzw. $p = 0,015$).

Tabelle 9: Verteilung von Aktivierungsmarkern auf CD8+ T-Lymphozyten prozentual in Lk und Pb mit und ohne immunmodulatorische Therapie. Asterisk (*) entspricht Signifikanz ($p < 0,05$) im Unterschied zur Normalkontrolle (rechts), „fett“-gedruckt zeigt Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu t_0 der HIV-Positiven.

		HAART		HAART + IL-2		Kontrollen
		t=0	t=12 Mo.	t=0	t=12 Mo.	
%CD8+HLA-DR+	PBMC	46 ± 8 *	24 ± 10 *	49 ± 16 *	24 ± 11 *	11 ± 9
%CD8+HLA-DR+	LNMC	51 ± 9 *	26 ± 9 *	51 ± 12 *	27 ± 8 *	16 ± 12
%CD8+CD45RO+HLA-DR+	PBMC	56 ± 9 *	34 ± 11	60 ± 14 *	32 ± 12	21 ± 8
%CD8+CD45RO+HLA-DR+	LNMC	78 ± 10 *	45 ± 11	73 ± 12 *	43 ± 14	27 ± 15
%CD8+CD25+	PBMC	4 ± 6	5 ± 11	3 ± 2	9 ± 6	3 ± 7
%CD8+CD25+	LNMC	3 ± 3	5 ± 6	3 ± 1	10 ± 4	5 ± 7
%CD8+CD28+	PBMC	46 ± 10 *	61 ± 15 *	36 ± 12 *	56 ± 8 *	85 ± 15
%CD8+CD28+	LNMC	80 ± 9 *	95 ± 3	80 ± 13 *	96 ± 6	94 ± 3
%CD8+CD38+	PBMC	82 ± 7 *	61 ± 16	83 ± 11 *	68 ± 14	65 ± 9
%CD8+CD38+	LNMC	95 ± 3 *	72 ± 9	94 ± 6 *	67 ± 12	53 ± 19
%CD8+CD45RO+CD38+	PBMC	75 ± 14	41 ± 14	78 ± 13	43 ± 15	38 ± 11
%CD8+CD45RO+CD38+	LNMC	96 ± 14	66 ± 28	90 ± 16	61 ± 27	71 ± 17

IL-2 zeigte, wie auch in der CD4+ Subpopulation, in der CD8+ Lymphozytensubpopulation einen signifikanten Einfluss auf die Expression der α -Untereinheit des hochaffinen IL-2-Rezeptors, CD25 (s. Abb.22, S.44 und Abb. 31, S. 48). In der IL-2-Gruppe war der Anstieg von $3 \pm 5\%$ auf $9 \pm 6\%$ hochsignifikant ($p = 0,001$), während diese Zellfraktion in der HAART-Gruppe unverändert blieb ($4 \pm 7\%$ auf $5 \pm 9\%$, $p = 0,753$). Das Niveau war aber weit unter dem der CD4+ Population.

4.6.3. LNMC, CD4+, Aktivierungsstatus nach im Median 12 Monaten Therapie: (s. Tab. 8, S. 31) Der Anteil der aktivierten CD4+ Lymphozyten des Lk zeigte sich im Verlauf der Therapie relativ stabil. Der frühe Aktivierungsmarker CD69 war im Beobachtungszeitraum in beiden Randomisationsarmen auf dem Niveau der HIV-neg. Gruppe stabil (s. Abb. 30, S. 48), war im Lk aber allgemein höher exprimiert als im PB ($35 \pm 5\%$ auf $35 \pm 6\%$ unter IL-2-Regime bzw. $36 \pm 7\%$ auf $36 \pm 8\%$ unter HAART).

Der Anteil der HLA-DR exprimierenden CD4+ Lymphozyten sank im Lk unter HAART von $26 \pm 12\%$ auf $14 \pm 5\%$ ($p = 0,039$) und blieb unter einer immunmodulatorischen Therapie konstant

bei $18 \pm 8\%$ (NoK: $8 \pm 5\%$, s. Abb. 28, S. 47). In beiden Gruppen wurden Werte erreicht, die sich, im Gegensatz zu PBMC, signifikant von denen einer HIV negativen Population unterschieden ($p=0,015$ bzw. $p=0,013$). Insbesondere die Population der CD45R0^{hi} Effektor-/Memory-Lymphozyten trug zu diesem Abfall bei (IL-2: $31 \pm 12\%$ auf $26 \pm 11\%$, $p=0,012$; HAART: $40 \pm 14\%$ auf $24 \pm 8\%$, $p=0,002$). Während es zu einer Abnahme des Anteils aktivierter CD4+Lymphozyten kam, war wie im PB eine Zunahme des Anteils CD25 exprimierender Zellen unter dem Einfluss von IL-2 zu beobachten (s. Abb. 30, S. 48). In der IL-2-Gruppe fand sich im Lymphknoten ein Anstieg der CD4+CD25+ Subpopulation von $20 \pm 7\%$ auf $34 \pm 11\%$ ($p<0,001$). In der HAART-Gruppe war das Niveau ($28 \pm 12\%$, $p=0,057$) nach im Median zwölf Monaten dem in der HIV-neg. Gruppe mit $27 \pm 5\%$ vergleichbar (NoK: $27 \pm 5\%$, $p=0,669$). Der Anteil der CD95/Fas+ (s. Abb. 30, S. 48) T-Lymphozyten nahm unter HAART im Lk signifikant von $38 \pm 12\%$ auf $30 \pm 12\%$ ab ($p=0,039$), einem Anteil vergleichbar dem in der Kontrollgruppe ($29 \pm 11\%$, $p=0,95$). Der Anteil der FAS positiven CD4-Lymphozyten innerhalb der IL-2-Gruppe verblieb mit $34 \pm 12\%$ stabil.

4.6.4. LNMC, CD8+, Aktivierungsstatus nach im Median 12 Monaten Therapie: (s. Tab. 9, S.32) Ähnlich den Veränderungen im peripheren Blut präsentierte sich im Lymphknoten neben der globalen Abnahme des Anteils der CD8-positiven T-Lymphozyten - der Anteil der aktivierten CD8+ Lymphozyten signifikant reduziert. Die Abnahme der Fraktion der HLA-DR+ und CD38+ CD8+ zeigten sich auf $26 \pm 8\%$ (HLA-DR+, $p<0,001$) bzw. auf $69 \pm 11\%$ (CD38+, $p<0,001$) hochsignifikant herabgesetzt (s. Abb. 32, S. 48 und Abb. 34, S. 50). Der niedrige Anteil in der Normalkontrolle (NoK: CD8+HLA-DR+: $16 \pm 12\%$; CD8+CD38+: $53 \pm 19\%$) wurde in Bezug auf HLA-DR jedoch nicht erreicht (IL-2: $p=0,036$ bzw HAART: $0,043$). Der Anteil der CD28-exprimierenden CD8+ (s. Abb. 34, S. 50) stieg als weiteres Zeichen einer Deaktivierung der LNMC von 80 ± 13 auf $96 \pm 6\%$ (IL-2) bzw. $95 \pm 3\%$ (HAART) auf das Niveau der Normalkontrolle ($p<0,001$, NoK: $94 \pm 3\%$). Der Anstieg des Anteils der den IL-2 Rezeptor (CD25, s. Abb. 34, S. 50) exprimierenden CD8+ Lymphozyten im Lymphknoten präsentierte sich, ähnlich wie im Blut, in der IL-2-Gruppe höher als in der Gruppe ohne immunmodulatorische Therapie. (IL-2: von $3 \pm 1\%$ auf $10 \pm 4\%$, $p<0,001$; HAART: $3 \pm 3\%$ auf $5 \pm 6\%$, $p=0,003$)

4.7. Therapie-Einfluss auf T- und B-Zell-Proliferation in Blut und Lymphknoten

4.7.1. PBMC, CD4+, Ki-67-Expression nach im Median 12 Monaten Therapie: (s. Tab. 10, S. 34) Der prätherapeutisch signifikant erhöhte Anteil Ki-67-positiver CD4+ PBMC fiel in beiden Therapiegruppen bis zum Zeitpunkt der zweiten Lk-Untersuchung signifikant ab (IL-2: von $2,3 \pm 0,6\%$ auf $1,2 \pm 0,6\%$, $p=0,112$ bzw. unter HAART: $2,6 \pm 1,6\%$ auf $1,8 \pm 1\%$, $p=0,011$) und näherte sich nach einjähriger Therapie dem Anteil in der Kontrollgruppe an (s. Abb. 40, S. 52 und Abb. 41, S. 53) (IL-2: $p=0,648$ bzw. HAART: $p=0,404$). Dieser Abfall war in beiden Behandlungsarmen nur grenzwertig signifikant. Um den Effekt der angestiegenen CD4-

Zellzahlen zu berücksichtigen, wurden prozentuale Werte auf absolute, in Proliferation befindliche Zellen umgerechnet (s. Abb. 42, S. 53). Hier zeigte sich, dass nach in Median 12 Monaten Therapie mit 12 ± 10 (IL-2) bzw. 13 ± 7 (HAART) CD4+Ki-67+ Zellen pro μl im Vergleich zu Baseline-Werten konstante Zellzahlen erhoben werden konnten. 5 von 20 Pat. zeigten aber Anstiege der proliferierenden Zellen bis Maximal $41/\mu\text{l}$ ($15-41/\mu\text{l}$, Nok $13/\mu\text{l}$), drei davon in der mit IL-2 therapierten Gruppe. Um den Verlauf innerhalb der 12 Monate besser analysieren zu können, wurden für 10 Pat. (IL-2 n=5, HAART n=5) Daten zu den Zeitpunkten Mo 1, Mo 3, Mo 6, Mo 9 und Mo 12 analysiert (s. Abb. 41 und 42, S. 53). Diese zeigten für CD4+ prozentual bis Mo 3 einen schnellen Abfall, zeitlich parallel zum Abfall der Viruslast, gefolgt von einer konstanten Phase niedriger Proliferation auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Interindividuelle Unterschiede waren erheblich.

Tabelle 10: Anteil proliferierender T-Lymphozyten prozentual in Lk und PB mit und ohne immunmodulatorischer Therapie. Asterisk (*) entspricht Signifikanz ($p < 0,05$) im Unterschied zu Normalkontrolle (rechts), „fett“-gedruckt zeigt Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu t_0 der HIV-Positiven.

		HAART		HAART + IL-2		Kontrollen
		t=0	t=12 Mo.	t=0	t=12 Mo.	
%CD4+Ki-67+	PBMC	2,6 \pm 1,6 *	1,8 \pm 1	2,3 \pm 1*	1,2 \pm 0,6	1,2 \pm 2,2
%CD4+Ki-67+	LNMC	7,6 \pm 5 *	3,5 \pm 1,7	5,4 \pm 4,0 *	1,6 \pm 1,8	3,1 \pm 0,9
%CD4+CD45RO+Ki-67+	PBMC	5,0 \pm 3	3,2 \pm 2	4,1 \pm 3	1,8 \pm 1	2,1 \pm 1,3
%CD4+CD45RO+Ki-67+	LNMC	8,3 \pm 3,8 *	3,6 \pm 1,6	5,5 \pm 5,9	3,1 \pm 1,7	3,1 \pm 1,7
%CD8+Ki-67+	PBMC	5,3 \pm 6 *	1,5 \pm 1	4,5 \pm 2 *	1,3 \pm 0,6	0,9 \pm 1,0
%CD8+Ki-67+	LNMC	7,7 \pm 6,7 *	3,0 \pm 2,9	6,7 \pm 6,4 *	1,2 \pm 2,1	2,7 \pm 1,2
%CD8+CD45RO+Ki-67+	PBMC	9,8 \pm 7,6 *	2,7 \pm 1	6,7 \pm 5,7 *	3,1 \pm 1	2,8 \pm 1,9
%CD8+CD45RO+Ki-67+	LNMC	9,9 \pm 6,5 *	2,1 \pm 2,4	7,5 \pm 6,5 *	1,9 \pm 2,1	2,0 \pm 1,7
%CD3-Ki-67+	PBMC	3,9 \pm 3,7	1,9 \pm 1,7	4,0 \pm 2,2	2,3 \pm 1,4	2,0 \pm 2
%CD3-Ki-67+	LNMC	35 \pm 18 *	6 \pm 14	26,9 \pm 14,9 *	5,0 \pm 6,8	2,4 \pm 3,7
abs. CD4+Ki-67+/ μl	PBMC	13 \pm 13	12 \pm 10	11 \pm 6	13 \pm 9	11 \pm 7
abs. CD8+Ki-67+/ μl	PBMC	52 \pm 62 *	11 \pm 5	43 \pm 17 *	13 \pm 7	4 \pm 5

Vor dem Hintergrund der durch IL-2 nur unwesentlich beeinflussten langfristigen CD4-Zell-Proliferation, wurden Untersuchungen innerhalb eines Zyklus durchgeführt (n=3, s. Abb. 43-45, S. 54). Hier zeigte sich, dass IL-2 kurzfristig einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation von CD4+ T-Lymphozyten hatte, welche sich eine Woche nach dem Zyklus bereits vollständig normalisiert präsentierte. Die Ki-67-Expression ging mit der Expression von Aktivierungsmarkern einher (s. Abb. 6, S. 36).

4.7.2. PBMC, CD8+, Ki-67-Expression nach im Median 12 Monaten Therapie: (s. Tab. 11, S. 34) Der Anteil der CD8+Ki-67+ Zellen sank in beiden Randomisationszweigen (s. Abb. 40, S. 52 und Abb. 41 und 42, S. 53). In der IL-2 Gruppe von Median $4,5 \pm 2\%$ auf $1,3 \pm 0,6\%$,

in der HAART-Population von $5,3 \pm 6\%$ auf $1,5 \pm 1\%$ ($p < 0,001$), annäherungsweise auf das Niveau der Normalkontrolle ($p = 0,13$ bzw. $p = 0,13$).

Im Unterschied zu der CD4+ Subpopulation war in der CD8+ Population auch nach Umrechnung auf absolute Zellzahlen ein einheitlicher Trend zu beobachten. Von signifikant ($p < 0,001$) erhöhten Zahlen fiel die Zahl der in Proliferation befindlichen CD8+ in beiden Gruppen signifikant auf 11 ± 5 respektive 13 ± 7 Zellen/ μl ab ($p = 0,003$ bzw. $0,002$). Auch in der engmaschiger durchgeführten Untersuchung eines Subkollektivs zeigte sich die Abnahme der proliferierenden Zellen zeitlich eng mit dem Abfall der Plasmavirusbelastung vergesellschaftet.

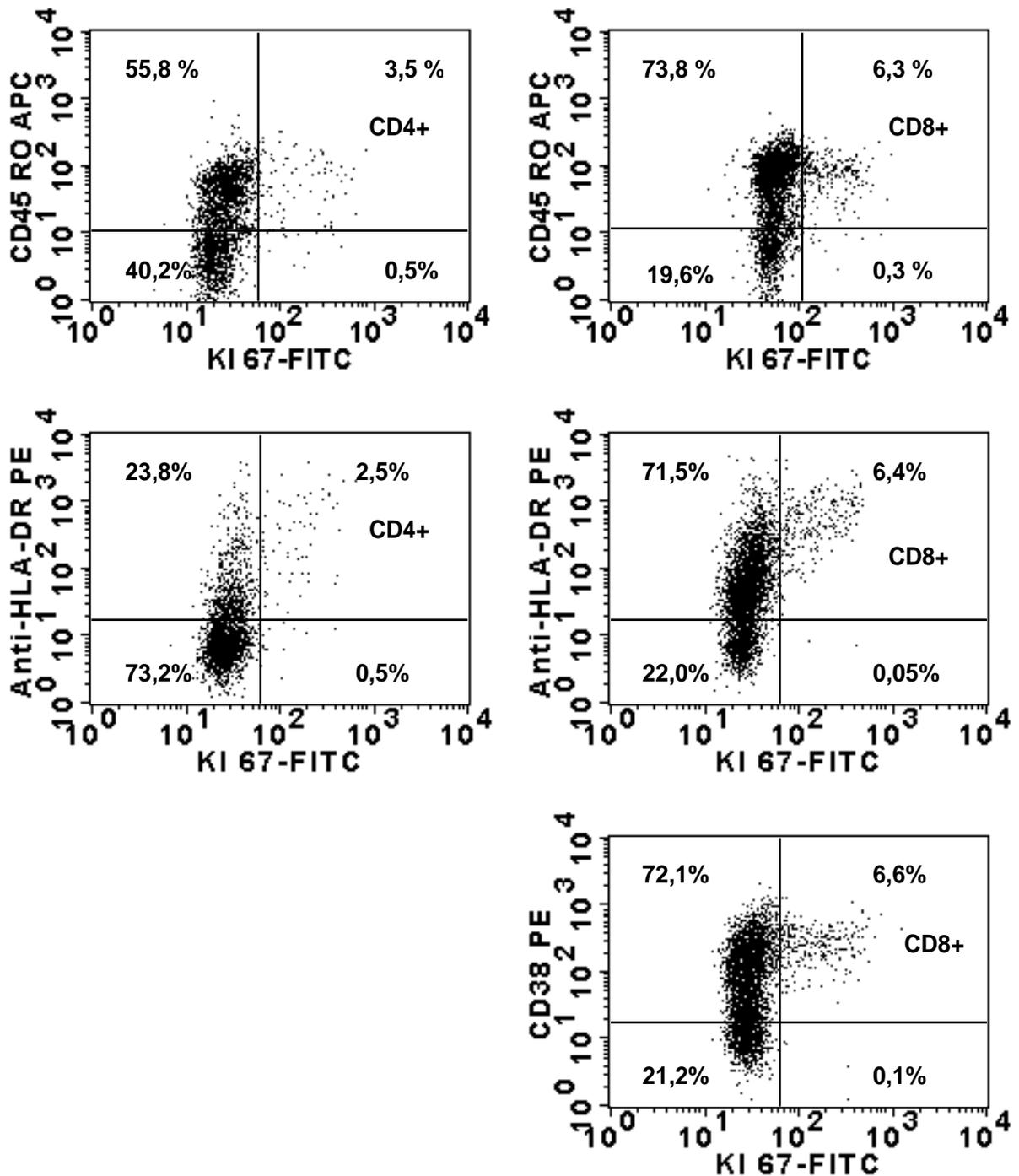
Wie oben erwähnt, zeigte IL-2 innerhalb eines Zyklus von 5 Tagen einen deutlichen Einfluss auf Expression von Ki-67 (s. Abb. 42, S. 53; Abb. 7, S. 37). Der Anstieg der CD8+Ki-67+ war in allen 3 untersuchten Individuen größer als in der CD4+ Population (s. Abb. 37-39, S. 54).

Der kurzfristige Einfluss von IL-2 auf CD8-Proliferation war besonders ausgeprägt, aber wie in der CD4-Population nicht über das Ende des IL-2-Zyklus hinaus anhaltend.

4.7.3. LNMC-CD4+, CD8+, B-Zellen, Ki-67-Expression nach im Median 12 Monaten

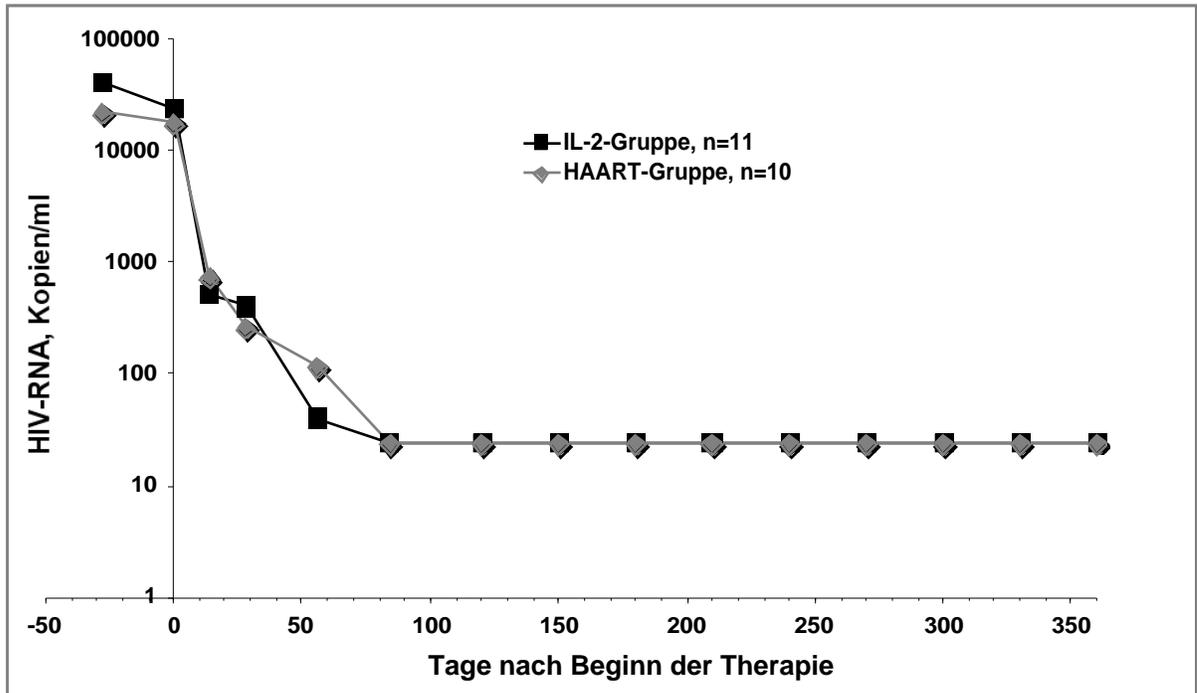
Therapie: (s. Tab. 11, S. 34) Auch die vor Therapie erhöhte Fraktion der proliferierenden T- und B-Zellen des Lk zeigte im Verlauf eine nahezu vollständige Normalisierung (s. Abb. 39, S. 52). Die mit im Median $27 \pm 16\%$ (IL-2) bzw. $35 \pm 18\%$ (HAART) erhöhte Fraktion der Ki-67+ B-Zellen ($p = 0,001$) sank im Verlauf der Therapie in Blut und Lymphknoten auf im Median $5 \pm 7\%$ (IL-2) bzw. $6 \pm 14\%$ (HAART). Auch CD4+ und CD8+ Lymphozyten folgten diesem Trend. CD4+ LNMC fielen von $5,4 \pm 4\%$ (IL-2) bzw. $7,6 \pm 5\%$ (HAART) auf $1,6 \pm 1,8\%$ (IL-2) bzw. $3,5 \pm 1,7\%$ (HAART), CD8+ fielen von $6,7 \pm 6,4\%$ (IL-2) bzw. $7,7 \pm 7\%$ (HAART) auf $1,2 \pm 2,1\%$ (IL-2) bzw. $3,0 \pm 2,9\%$ (HAART). Es bestand zum Zeitpunkt der 2. Lk- Biopsie kein statistischer Unterschied im Vergleich zu der HIV-negativen Kontrollgruppe.

Abbildung 6: Zusammenhang von Aktivierung und Proliferation auf Einzelzellebene, Darstellung in der Durchflußzytometrie.



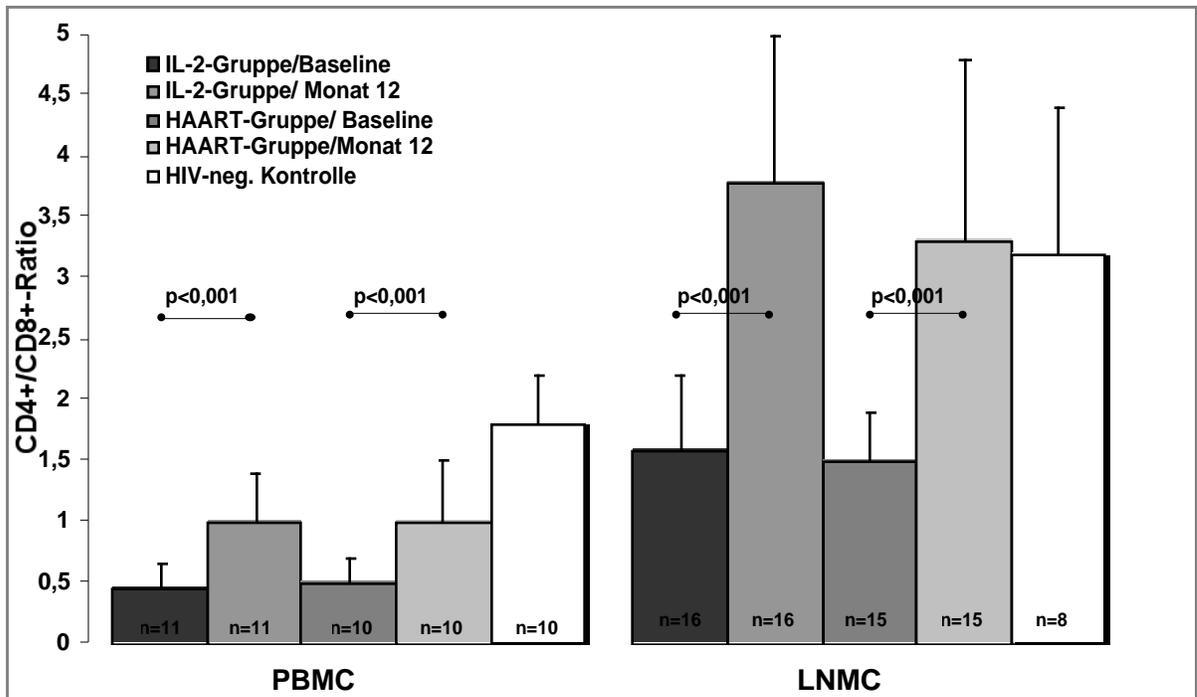
Exemplarische Darstellung von CD4+, links, und CD8+, rechts, LNMC im Hinblick auf Aktivierung und Proliferation in „dot plots“ (Pat. 1032). Ki-67-Expression geht auf Einzelzellebene mit Expression der Aktivierungsmarker CD45RO, HLA-DR und CD38 einher.

Abbildung 7: Entwicklung der Plasmaviruslast unter HAART ± IL-2.



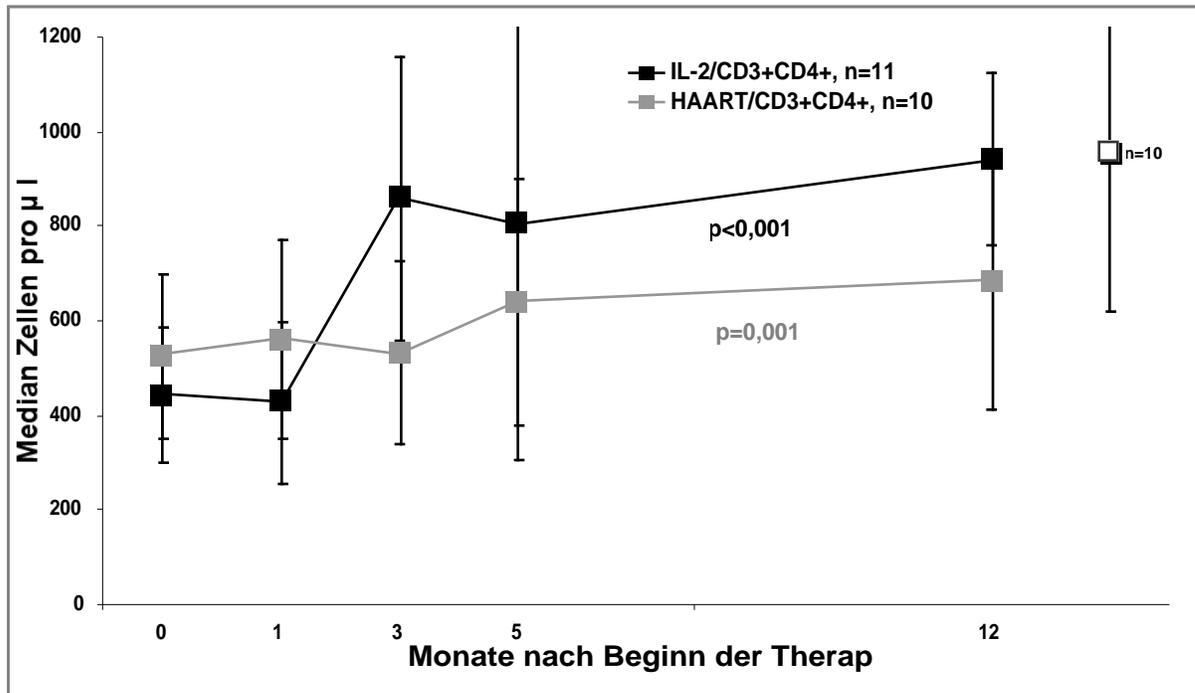
Angaben in RNA-Kopien/ml. IL-2 besitzt keinen Einfluss auf Ausmaß oder Zeitdauer bis zum Erreichen der Nachweisgrenze.

Abbildung 8: Entwicklung der CD4+/CD8+ Ratio in Blut und Lk unter HAART ± IL-2.



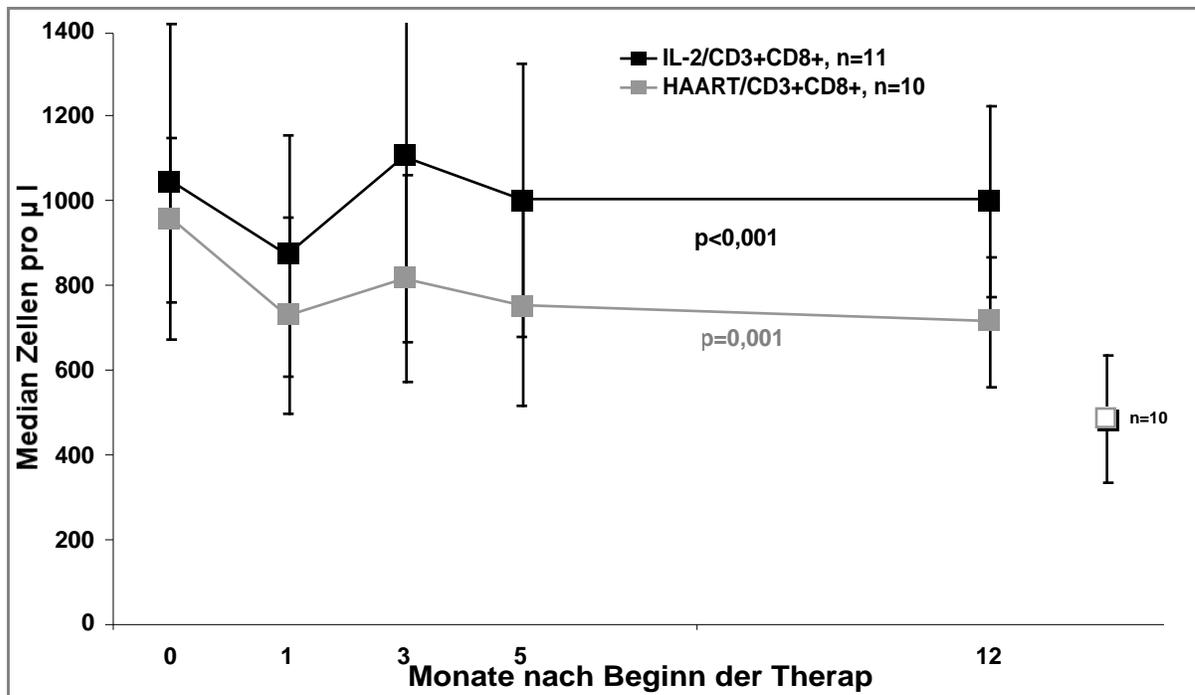
CD4+/CD8+-Ratio in Blut und Lk vor Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk Biopsie nach im Median 12 Monaten. Werte als Median+ Standardabweichung.

Abbildung 9: Entwicklung von absoluten CD4+ PBMC unter HAART ± IL-2.



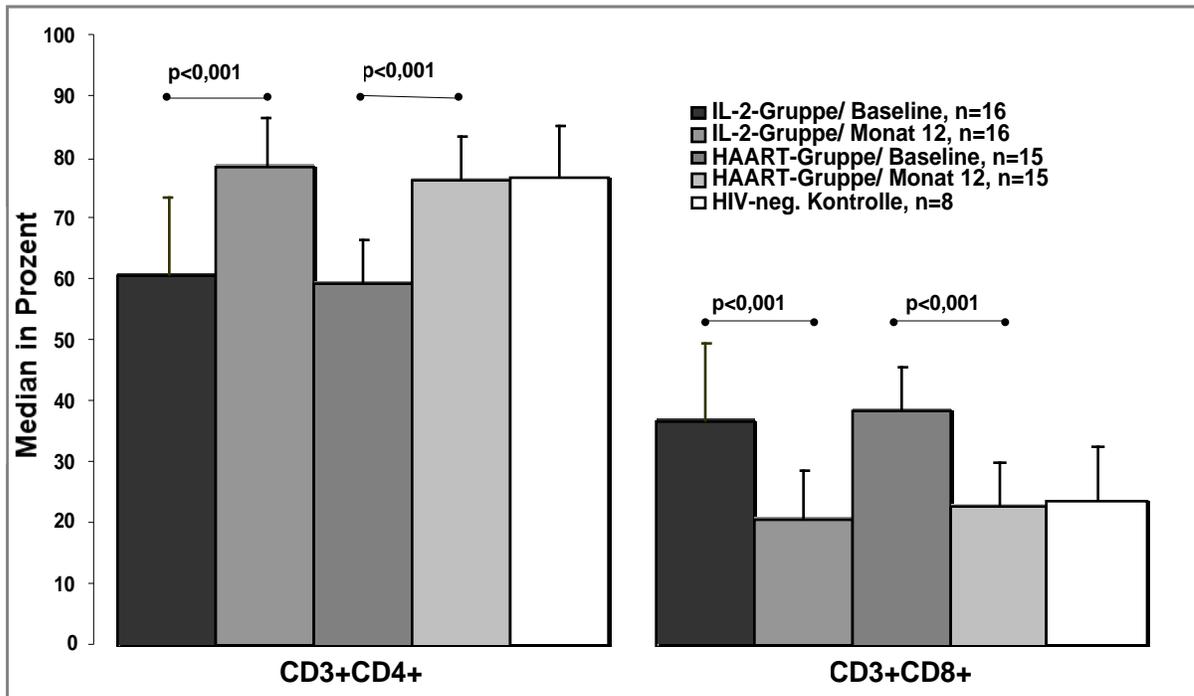
Darstellung der Entwicklung von CD3+CD4+ PBMC/μl unter HAART mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 10: Entwicklung von absoluten CD8+ PBMC unter HAART ± IL-2.



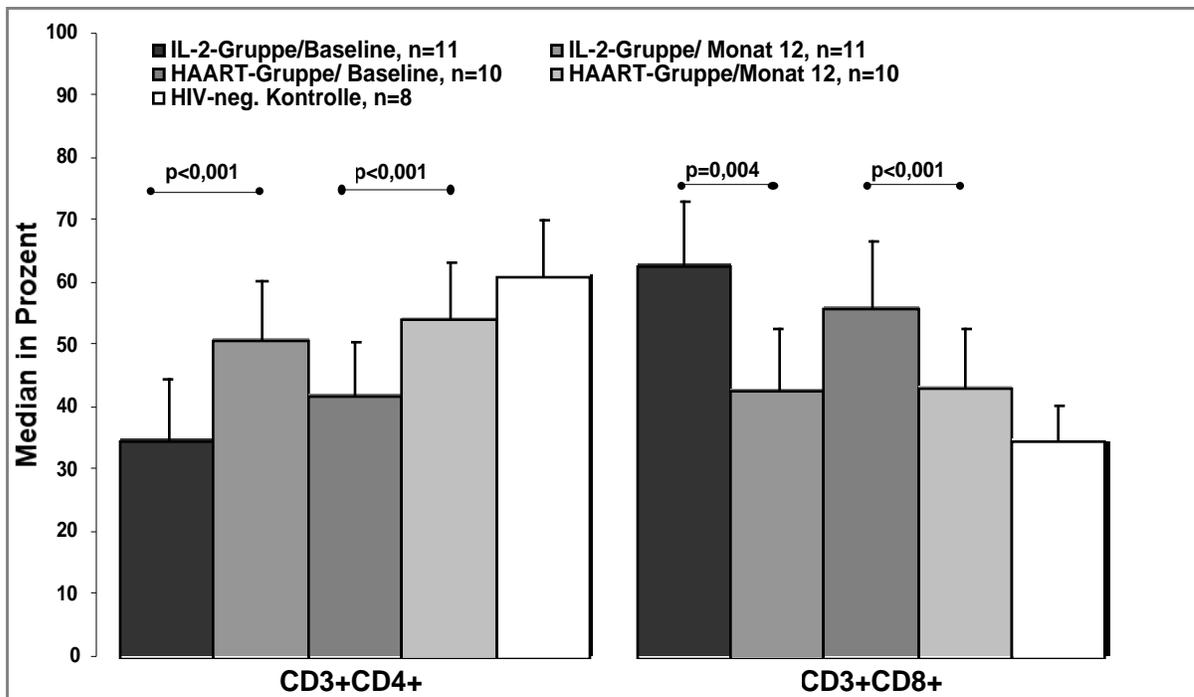
Darstellung der Entwicklung von CD3+CD8+ PBMC/μl unter HAART mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 11: Entwicklung von T-Zell-Subpopulationen des Lk unter HAART ± IL-2.



T-Lymphozyten Subpopulationen im Lymphknoten vor Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk-Biopsie nach im Median 12 Monaten. Werte als Median Prozent + Standardabweichung. Normalkontrolle zum Vergleich weiß.

Abbildung 12: Entwicklung von T-Zell-Subpopulationen des Blutes unter HAART ± IL-2.



T-Lymphozyten Subpopulationen im Blut vor Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk-Biopsie nach im Median 12 Monaten. Werte als Median Prozent + Standardabweichung. Normalkontrolle zum Vergleich weiß.

Abbildung 13: Korrelation von PBMC und LNMC CD4+/CD8+ Ratio vor HAART.

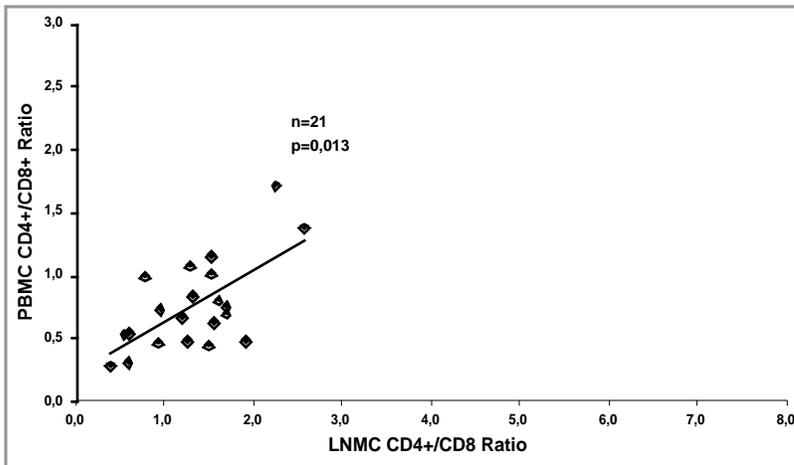


Abbildung 14: Korrelation von PBMC und LNMC CD4+/CD8+ Ratio nach HAART.

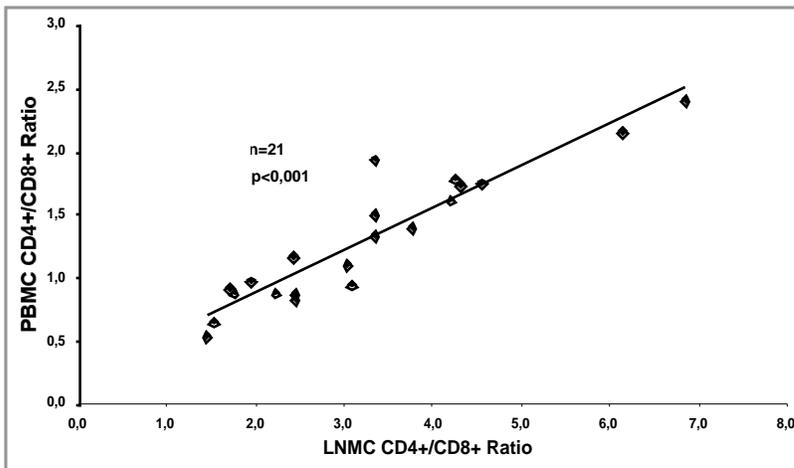
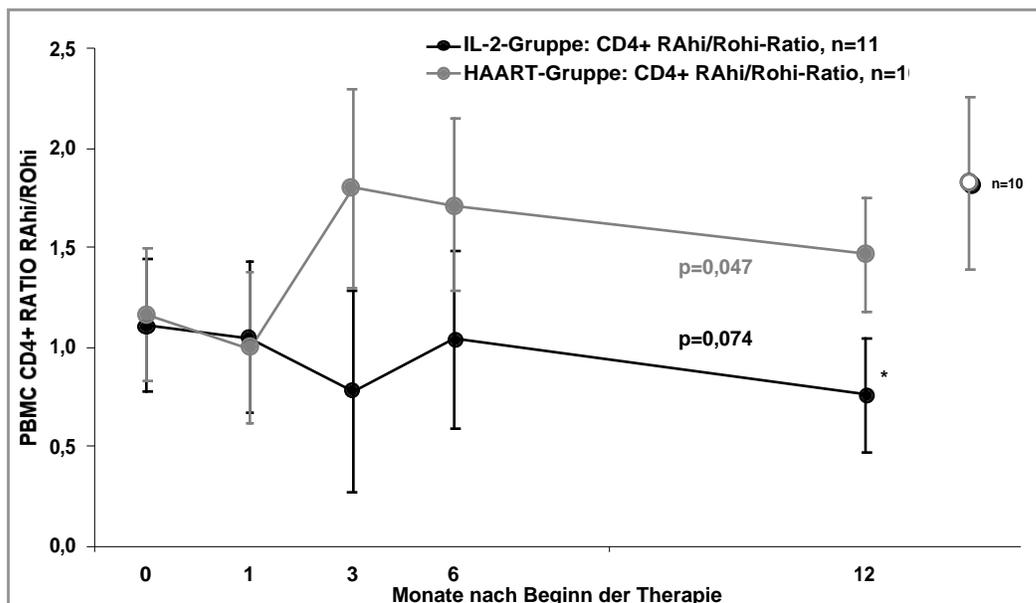
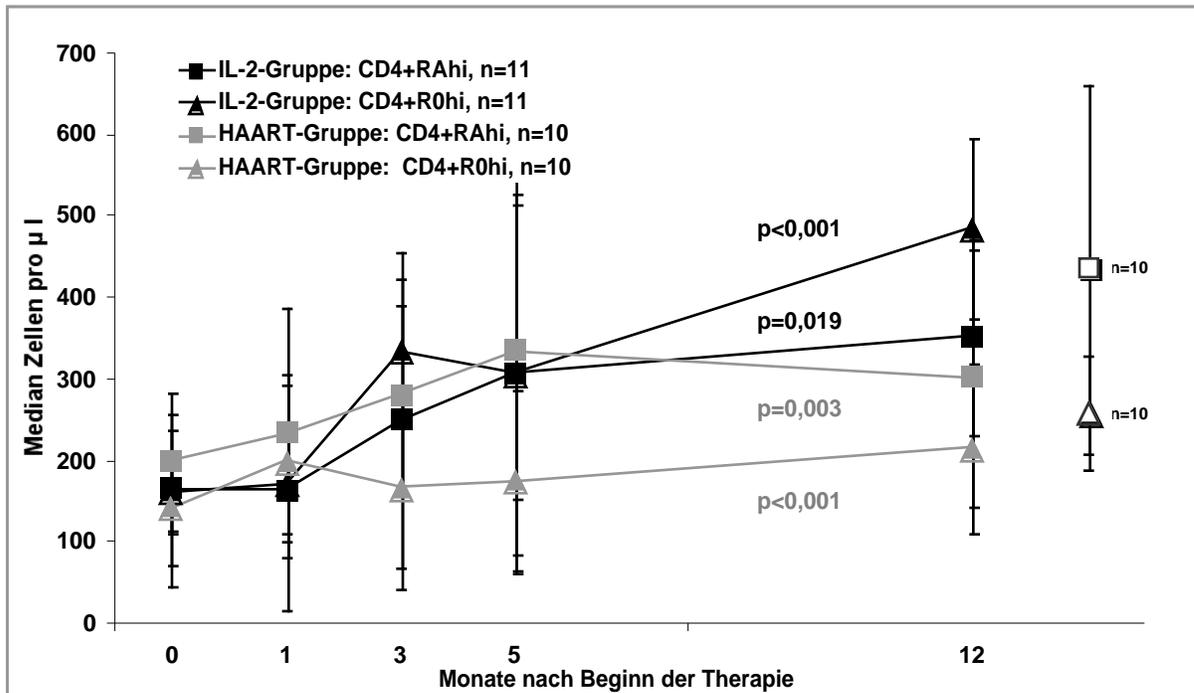


Abbildung 15: CD4+ CD45RAhi/ROhi-Ratio PBMC unter HAART ± IL-2.



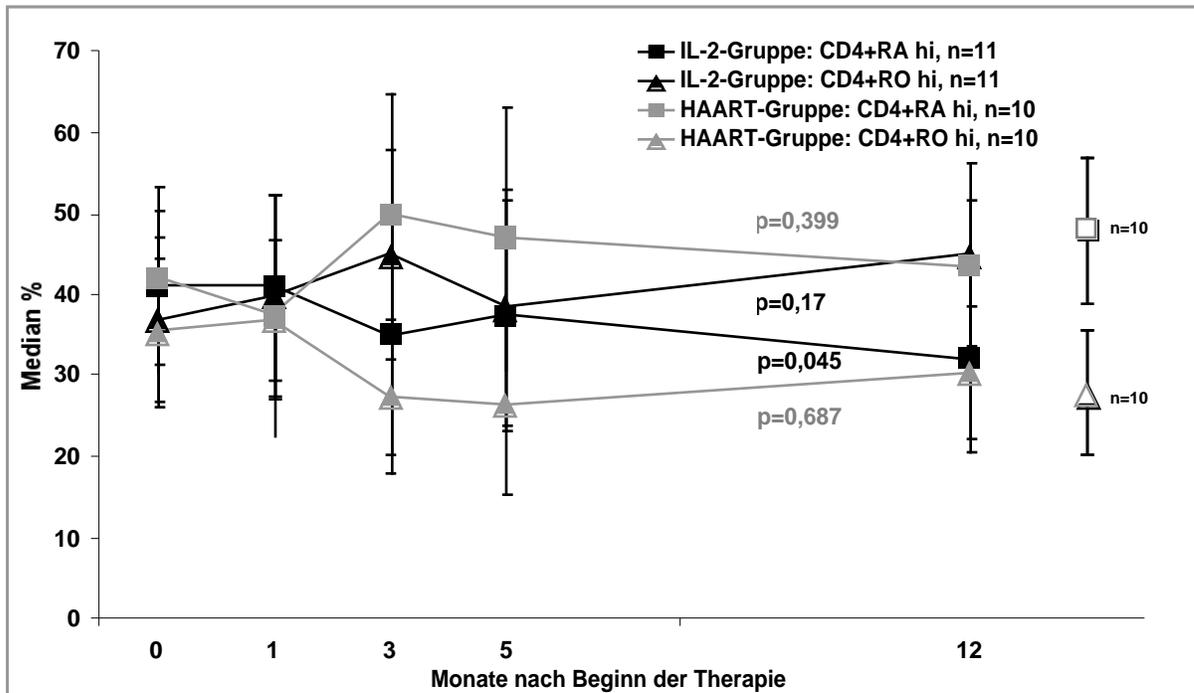
Entwicklung der CD4+ CD45RAhi/ROhi-Ratio unter HAART + IL-2 (schwarz) bzw. HAART alleine (grau) über 12 Monate. Normalkontrolle rechts (weiß). Median ± Standardabweichung. * Signifikanz zu Kontrollgruppe.

Abbildung 16: CD4-Subpopulationen des Blutes, CD45-Differenzierung unter HAART ± IL-2 (absolut).



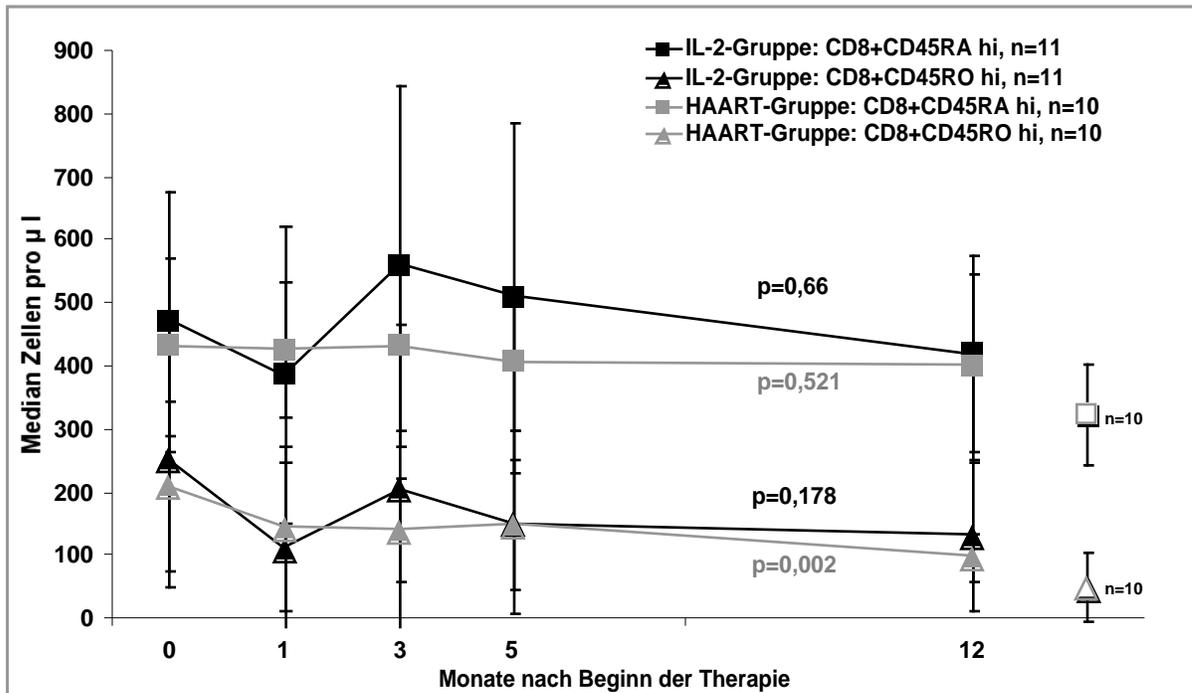
Absoluter Zellzahlen der CD4+ Subpopulationen des Blutes vom naiven (Quadrate) und Effektor/Memoryzell-Typ (Dreiecke) unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 17: CD4-Subpopulationen des Blutes, CD45-Differenzierung unter HAART ± IL-2 (prozentual).



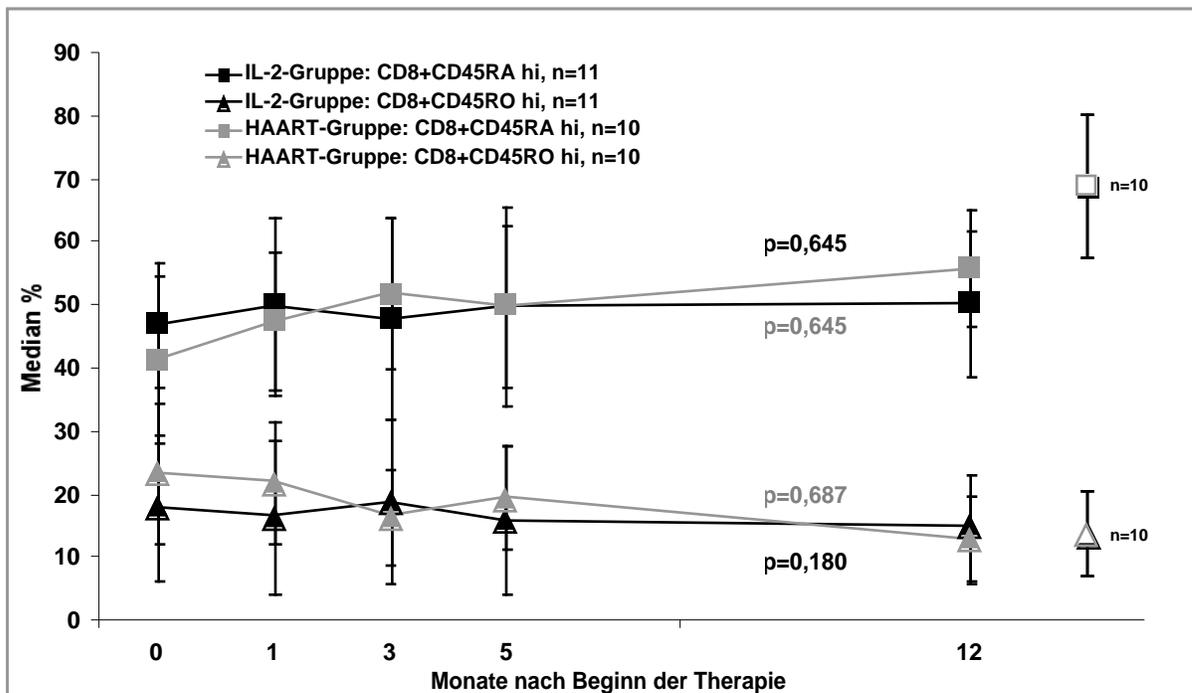
Prozentuale Anteile der CD4+ Subpopulationen des Blutes vom naiven (Quadrate) und Effektor/Memoryzell-Typ (Dreiecke) unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 18: CD8-Subpopulationen des Blutes, CD45-Differenzierung unter HAART ± IL-2 (absolut).



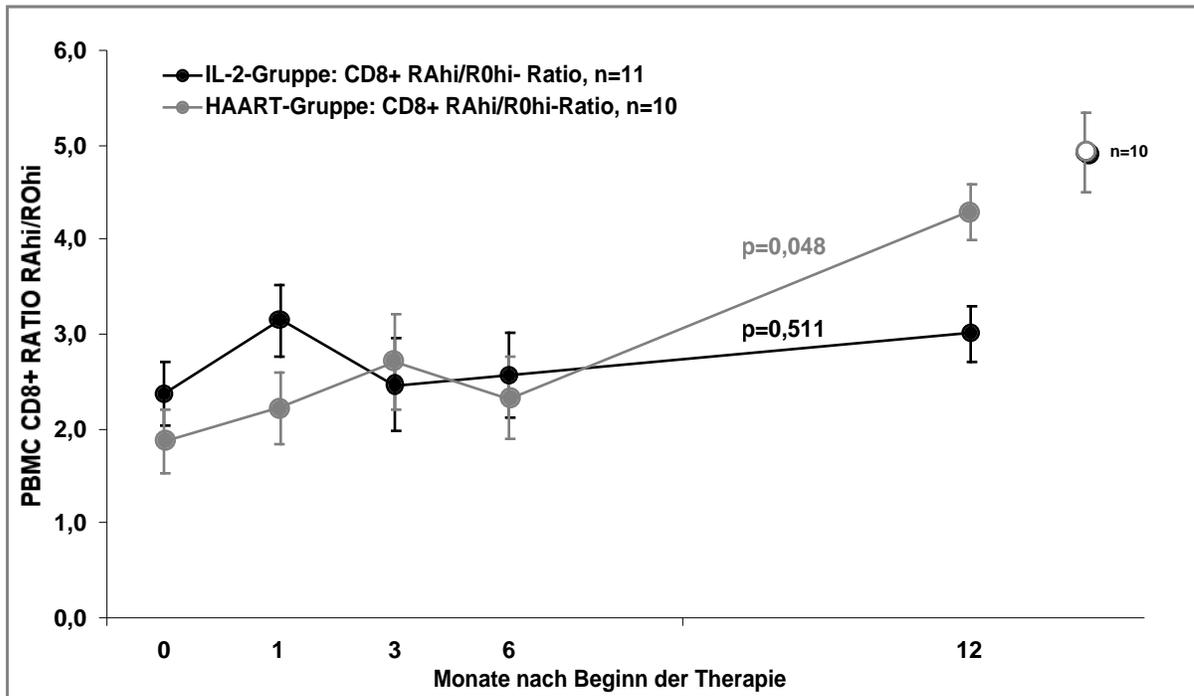
Entwicklung absoluter Zellzahlen der CD8+ Subpopulationen des Blutes vom naiven (Quadrate) und Effektor/Memoryzell-Typ (Dreiecke) unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 19: CD8-Subpopulationen des Blutes, CD45-Differenzierung unter HAART ± IL-2 (prozentual).



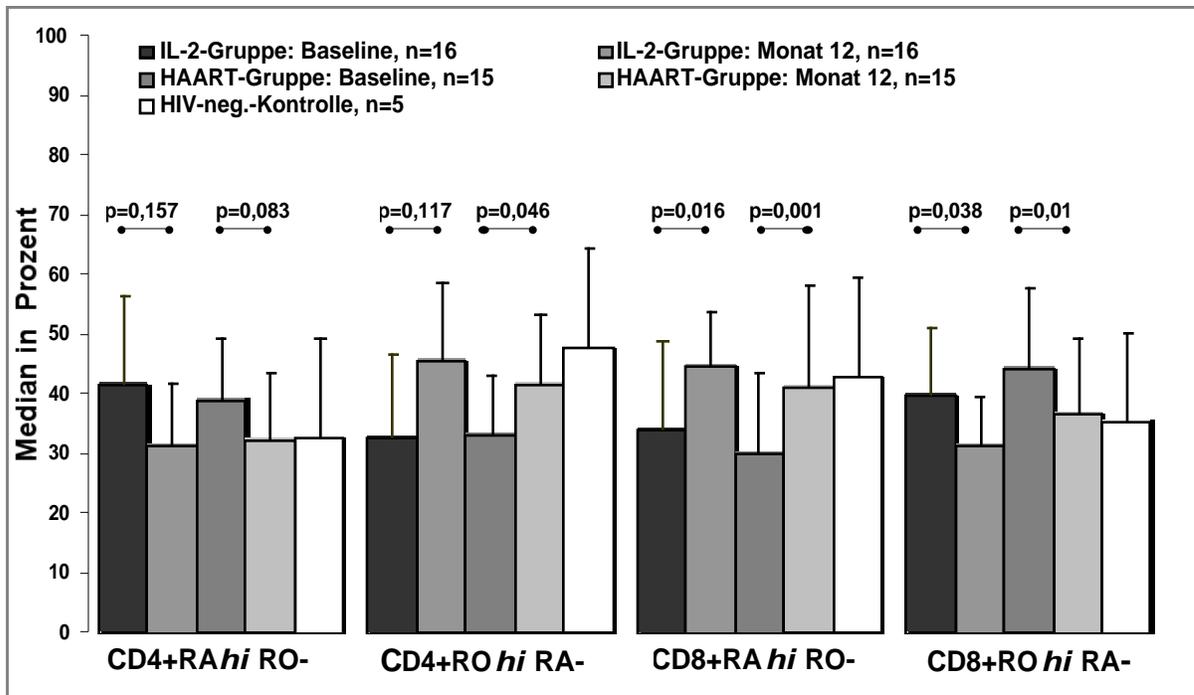
Prozentualer Anteile der CD8+ Subpopulationen des Blutes vom naiven (Quadrate) und Effektor/Memoryzell-Typ (Dreiecke) unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 20: CD8+ PBMC, Entwicklung der CD45RAhi/ROhi-Ratio unter HAART ± IL-2.



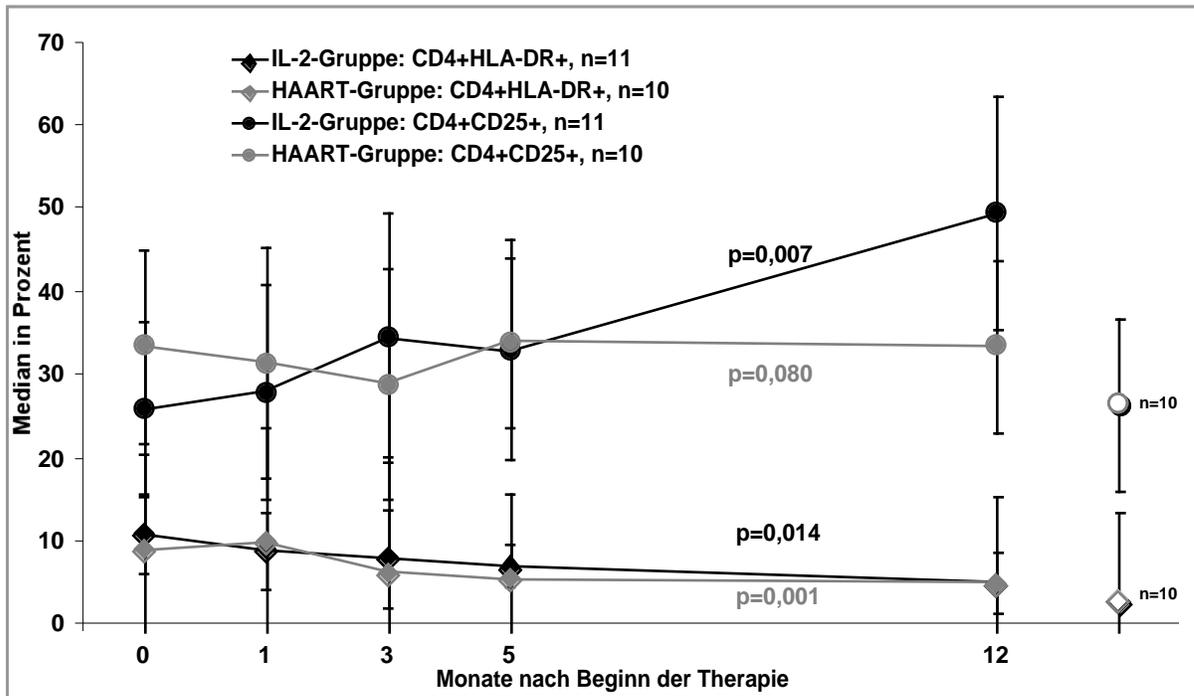
HAART + IL-2 schwarz, HAART grau. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 21: CD4+ und CD8+ LNMC, CD45-Isoformen unter HAART ± IL-2.



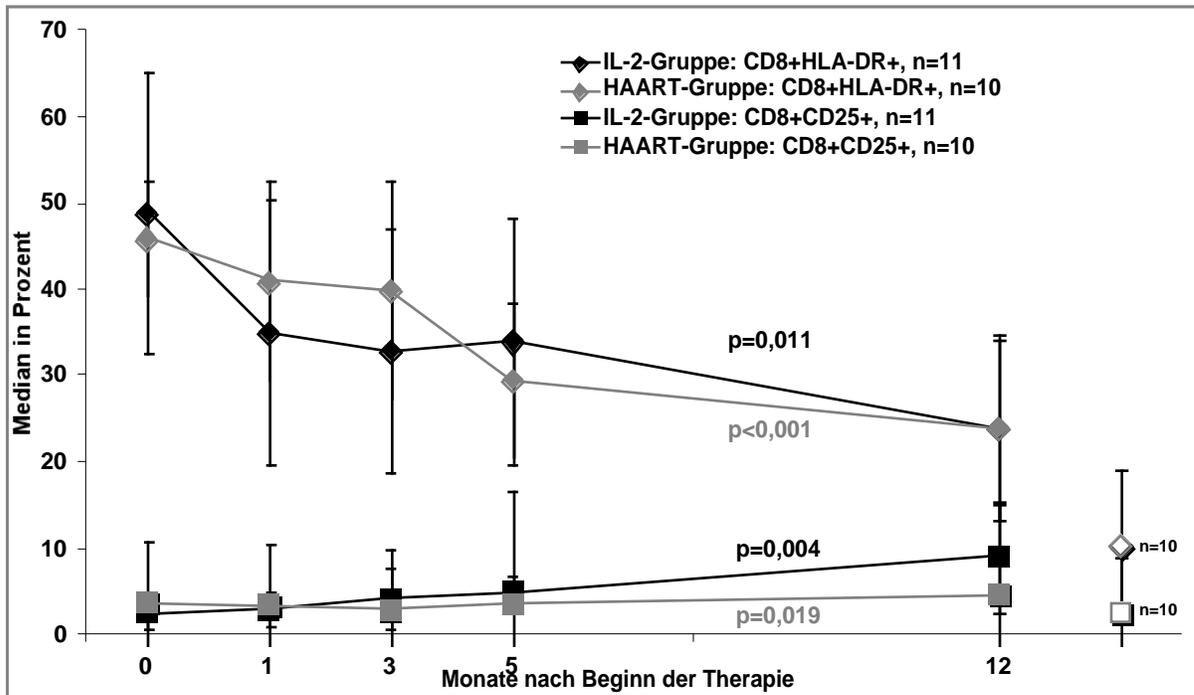
Prozentuale Anteile der CD4+ und CD8+ Subpopulationen des Lk vom naiven und Effektor/Memoryzell-Typ vor Therapiebeginn und nach im Median 12 Monaten. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median + Standardabweichung.

Abbildung 22: Aktivierungsmarker auf CD4+ PBMC unter HAART ± IL-2.



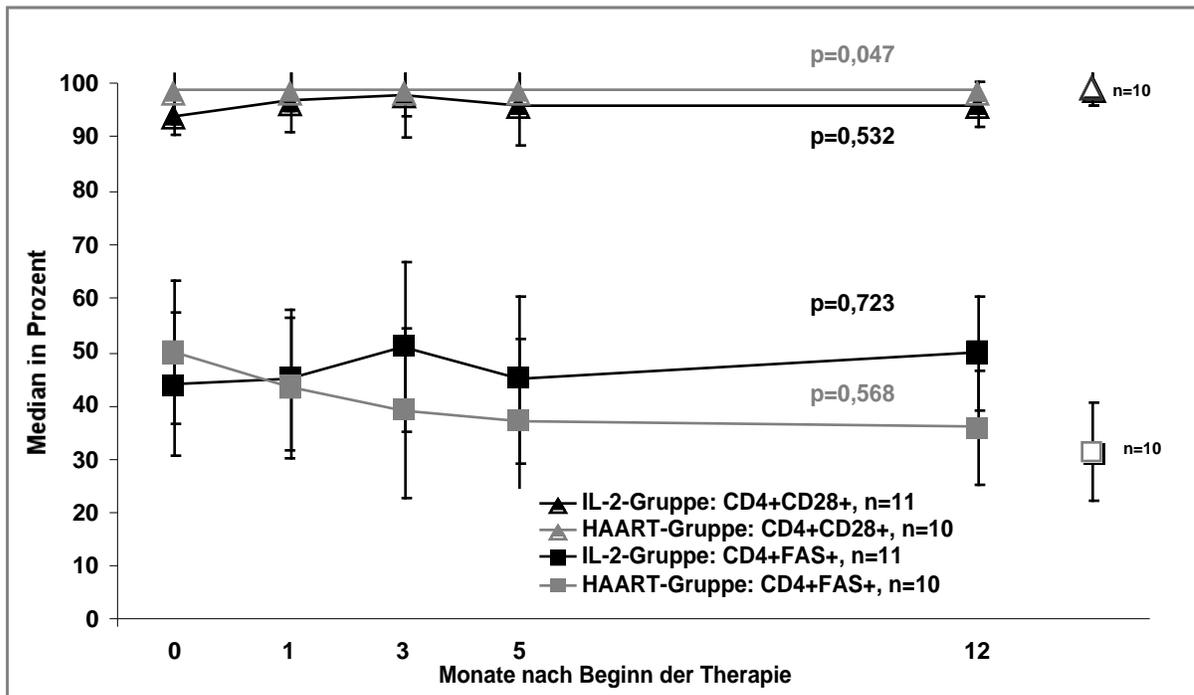
Entwicklung prozentualer Anteile der Aktivierungsmarker HLA-DR (Rauten) und CD25 (Kreise) auf CD4+ PBMC unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 23: Aktivierungsmarker auf CD8+ PBMC unter HAART ± IL-2.



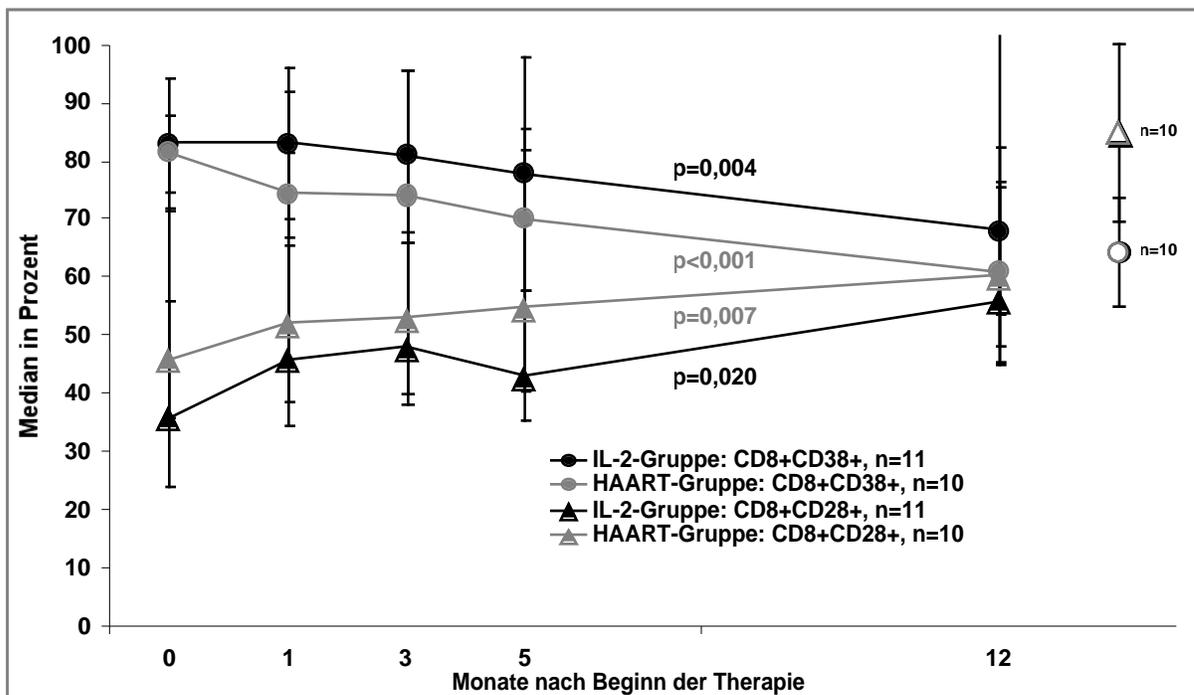
Entwicklung prozentualer Anteile der Aktivierungsmarker HLA-DR (Rauten) und CD25 (Quadrate) auf CD8+ PBMC unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 24: Aktivierungsmarker auf CD4+ PBMC unter HAART ± IL-2.



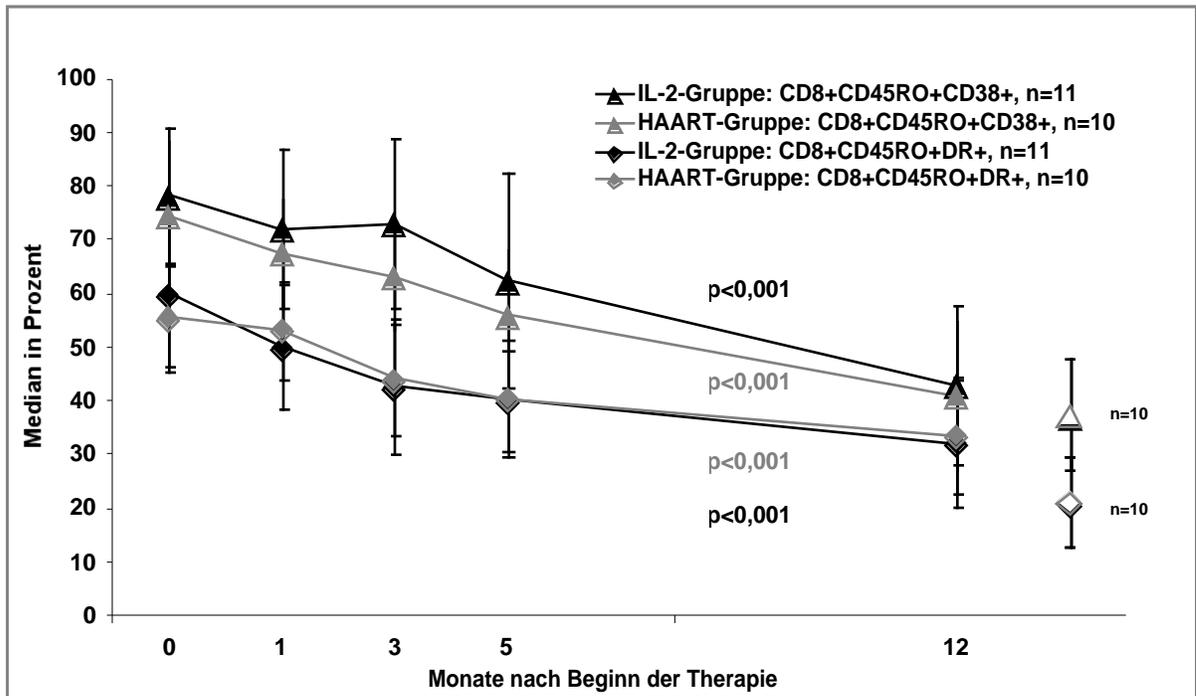
Entwicklung prozentualer Anteile der CD4+ PBMC mit Expression des Co-Rezeptors CD28 (Quadrate) und des Aktivierungs- und Apoptosemarkers CD95/FAS (Dreiecke) unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 25: Aktivierungsmarker auf CD8+ PBMC unter HAART ± IL-2.



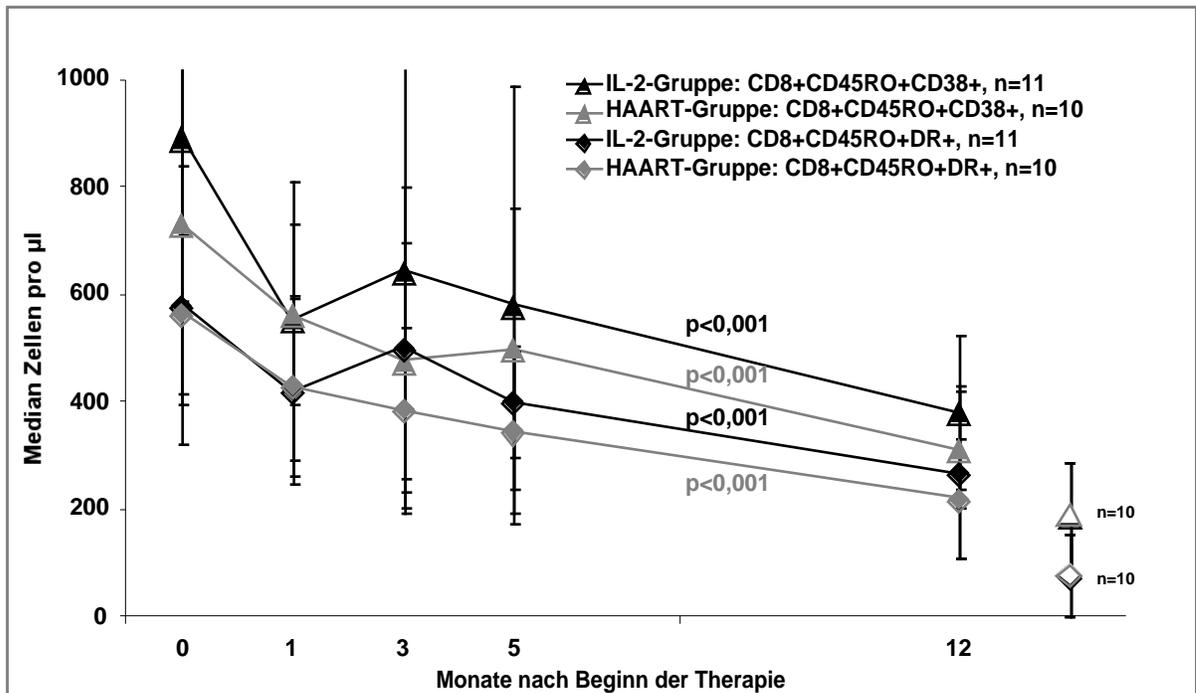
Darstellung der Entwicklung prozentualer Anteile der CD8+ PBMC mit Expression des Co-Rezeptors CD28 (Dreiecke) und des Aktivierungsmarkers CD38 (Kreise) unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung. Deaktivierung im Vgl. zur Normalkontrolle (weiß) nach einem Jahr unvollständig.

Abbildung 26: Aktivierungsmarker auf CD8+CD45RO+ PBMC unter HAART ± IL-2 (prozentual).



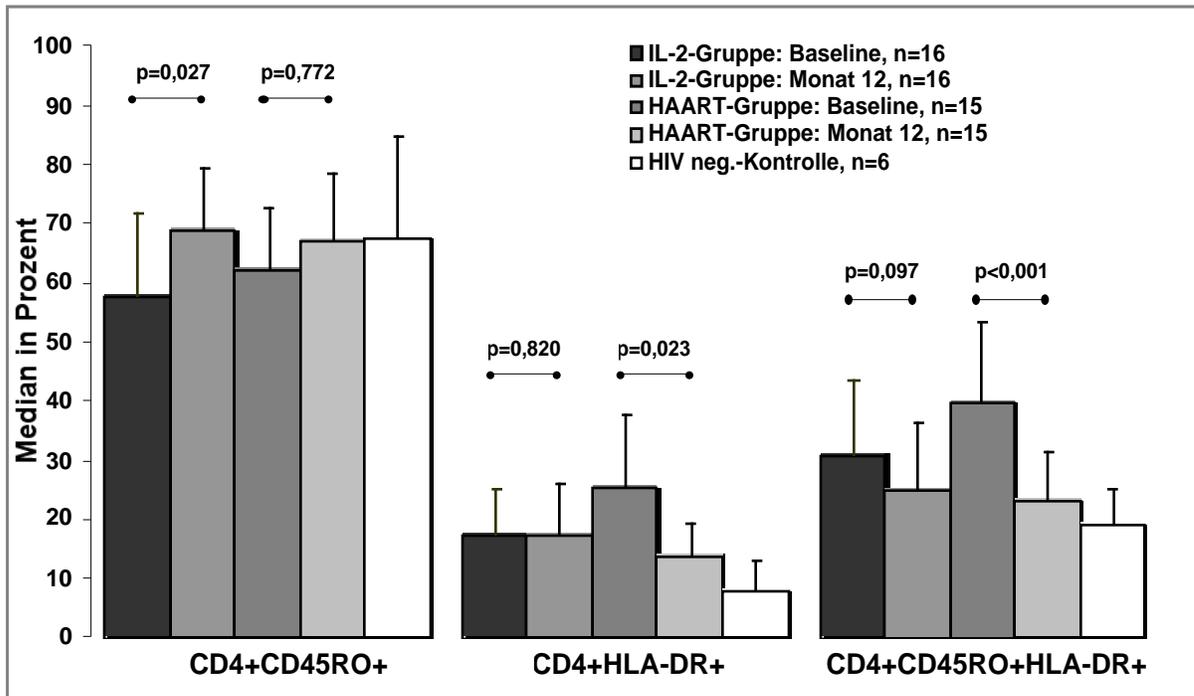
Entwicklung der Anteile der CD8+ PBMC mit Expression der Aktivierungsmarker HLA-DR (Rauten) und CD38 (Dreiecke) auf CD45RO+ unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung. Unvollständige Deaktivierung von CD8-Effektor-Lymphozyten unter HAART±IL-2 nach 1 Jahr.

Abbildung 27: Aktivierungsmarker auf CD8+CD45RO+ PBMC unter HAART ± IL-2 (absolut).



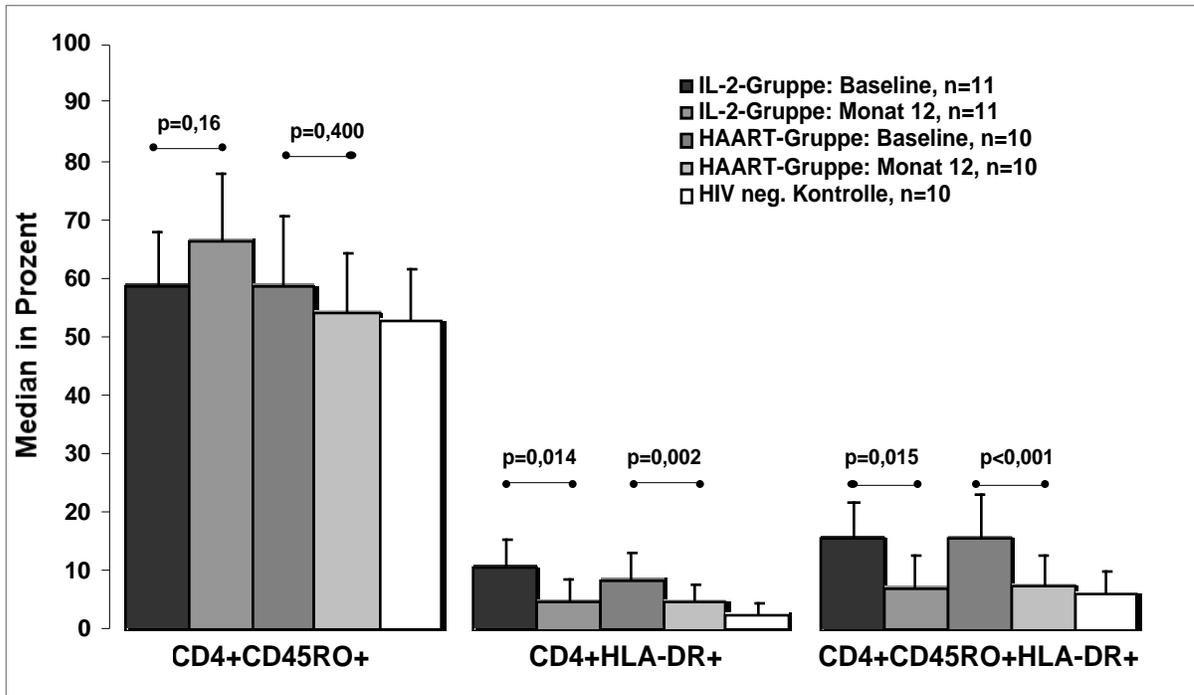
Entwicklung absoluter Zellzahlen der CD8+ PBMC mit Expression der Aktivierungsmarker HLA-DR (Rauten) und CD38 (Dreiecke) auf CD45RO+ unter Therapie mit (schwarz) und ohne (grau) IL-2 über 12 Monate. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 28: Aktivierungsmarker auf CD4+ LNMC unter HAART ± IL-2.



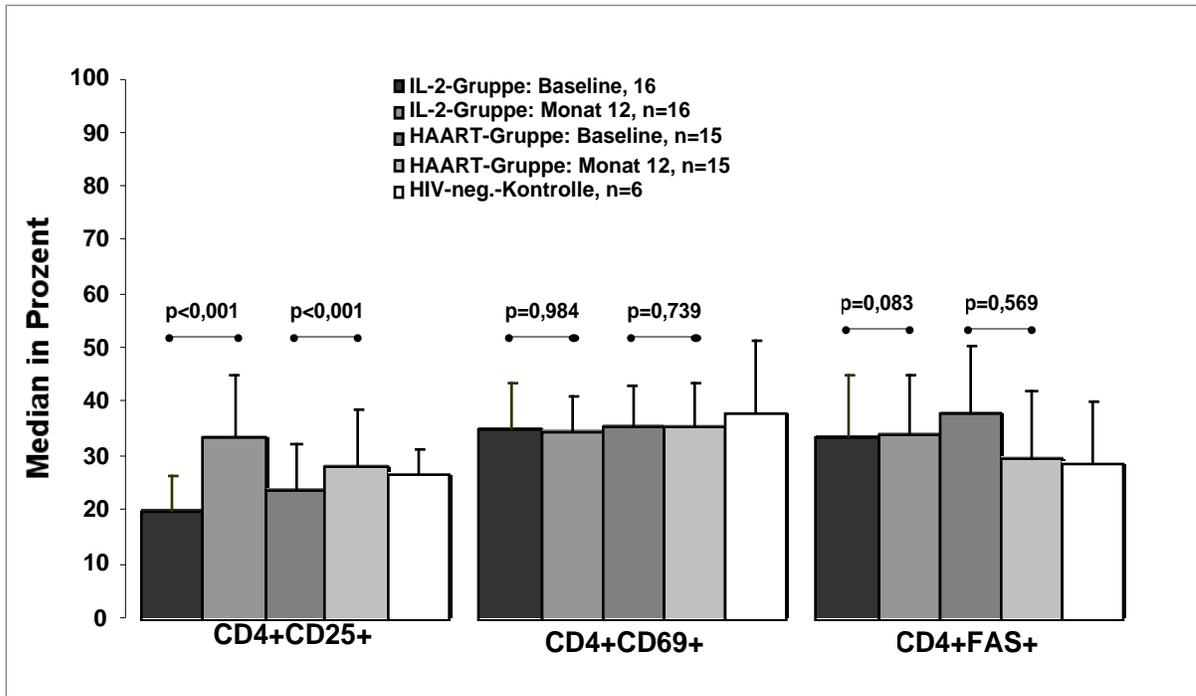
Anteil der aktivierten CD4+-Effektor-Zellen im Lymphknoten vor Beginn einer Therapie und zum Zeitpunkt der 2. LK-Biopsie nach im Median 12 Monaten. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 29: Aktivierungsmarker auf CD4+ PBMC unter HAART ± IL-2.



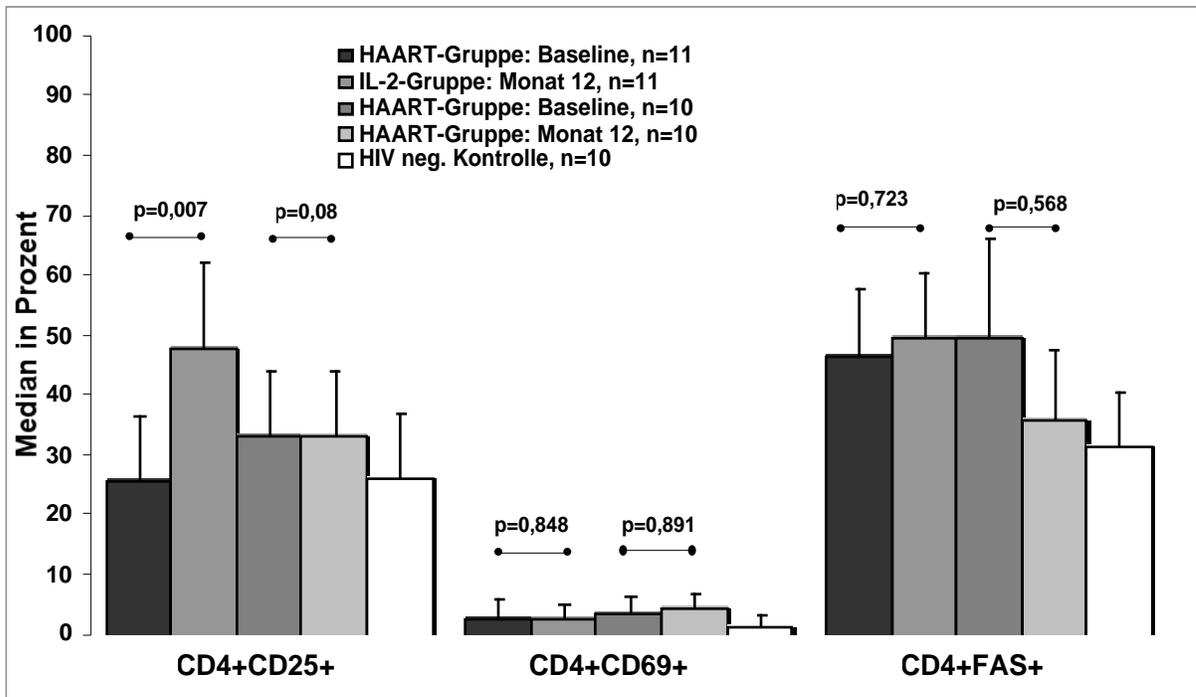
Anteil aktivierter CD4+-Effektor-Zellen im Blut vor Beginn einer Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk-Biopsie nach im Median 12 Monaten. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 30: Aktivierungsmarker auf CD4+ LNMC unter HAART ± IL-2.



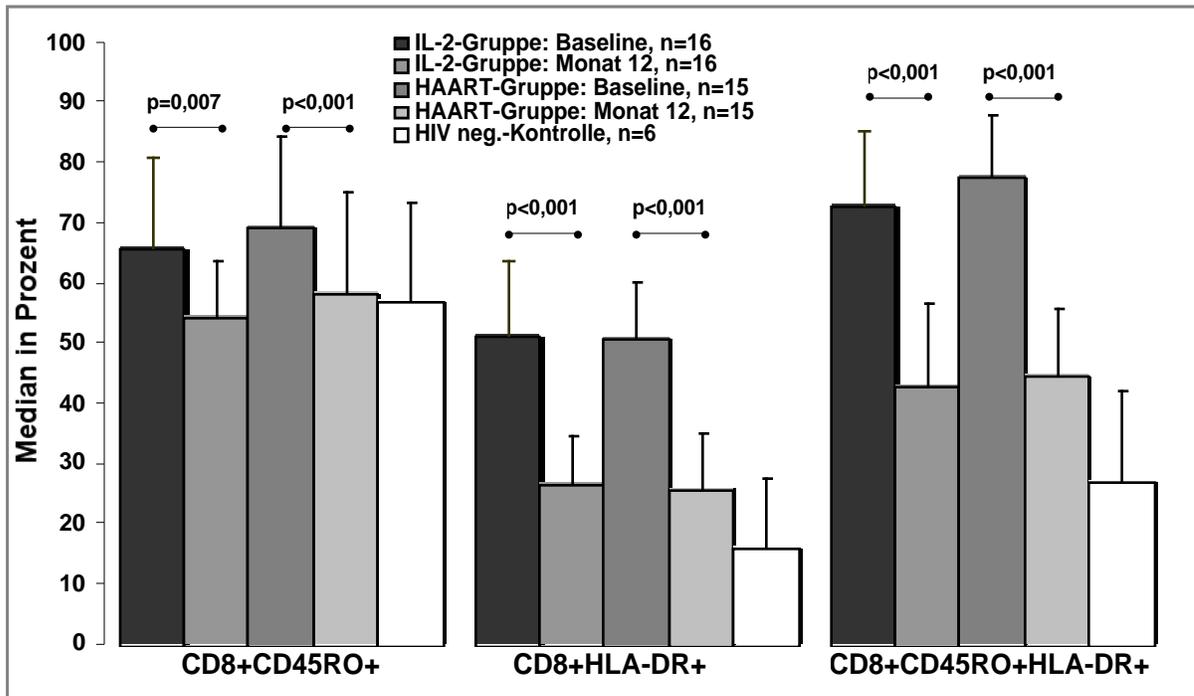
Anteil der CD4+ LNMC mit Expression von CD25, CD69 und FAS vor Beginn einer Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk-Biopsie. Normalkontrolle zum Vergleich weiß. Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 31: Aktivierungsmarker auf CD4+ PBMC unter HAART ± IL-2.



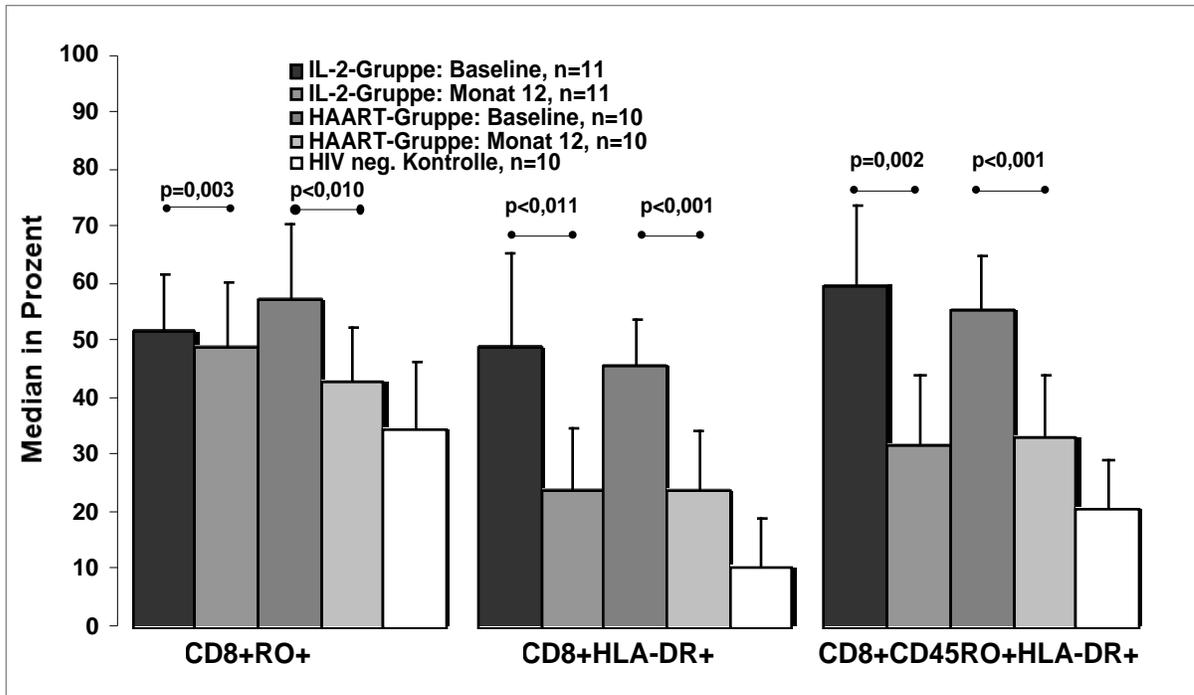
Anteil der CD4+ PBMC mit Expression von CD25, CD69 und FAS vor Beginn einer Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk-Biopsie. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 32: Aktivierungsmarker auf CD8+ LNMC unter HAART ± IL-2.



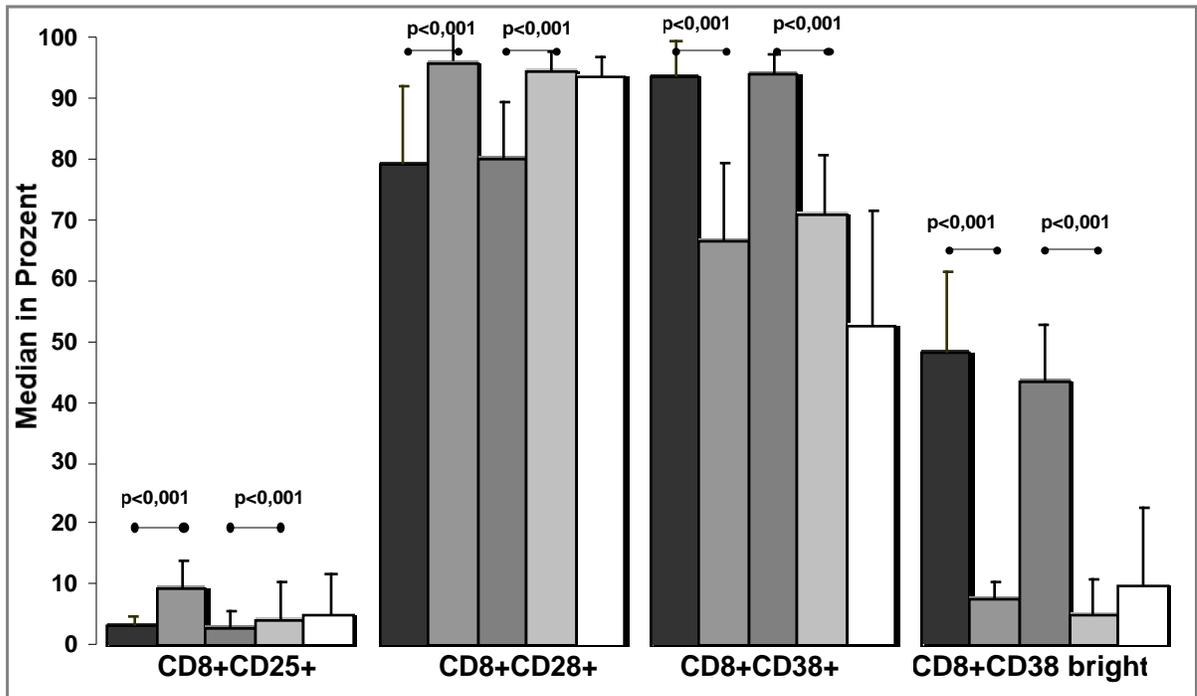
LNMC, Anteil der aktivierten CD8+ T-Lymphozyten im Lymphknoten vor Beginn einer Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk-Biopsie nach im Median 12 Monaten. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 33: Aktivierungsmarker auf CD8+ PBMC unter HAART ± IL-2.



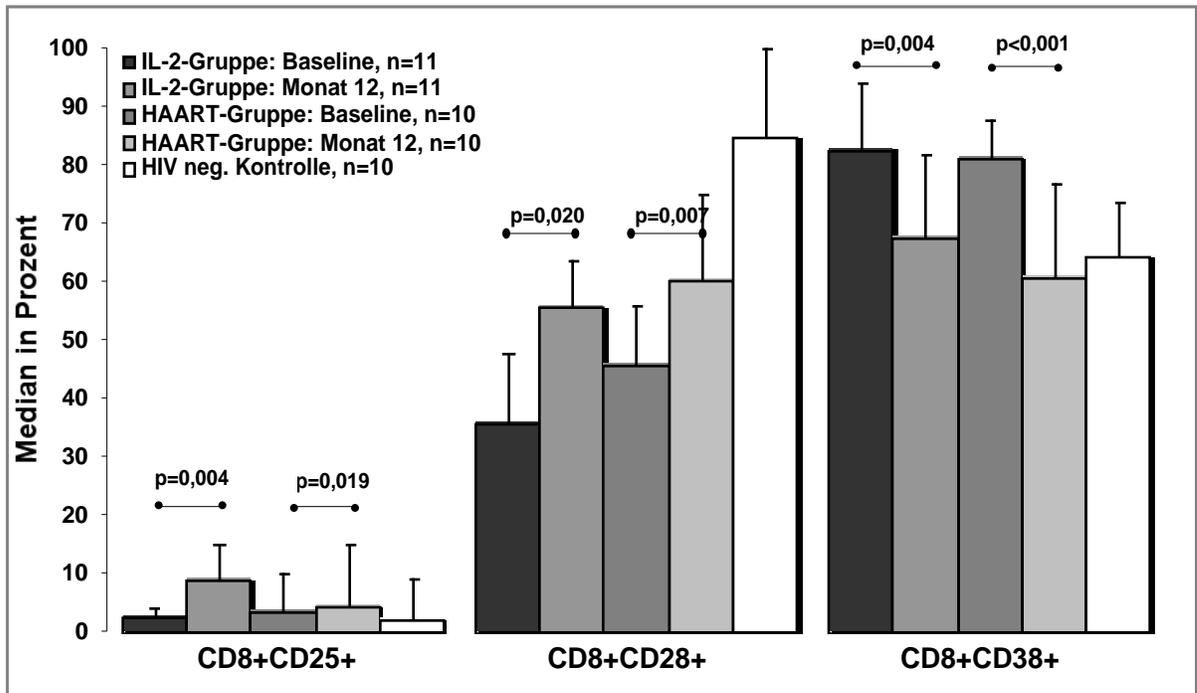
PBMC, Anteil der aktivierten CD8+ T-Lymphozyten vor Beginn einer Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk-Biopsie nach im Median 12 Monaten. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 34: Aktivierungsmarker auf CD8+ LNMC unter HAART ± IL-2.



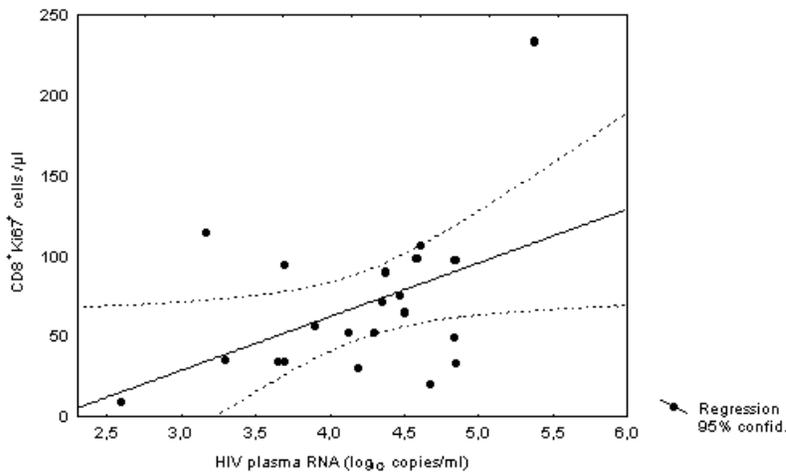
LNMC, Anteil der aktivierten CD8+ T-Lymphozyten im Lymphknoten vor Beginn einer Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk-Biopsie nach Median 12 Monaten. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 35: Aktivierungsmarker auf CD8+ PBMC unter HAART ± IL-2.



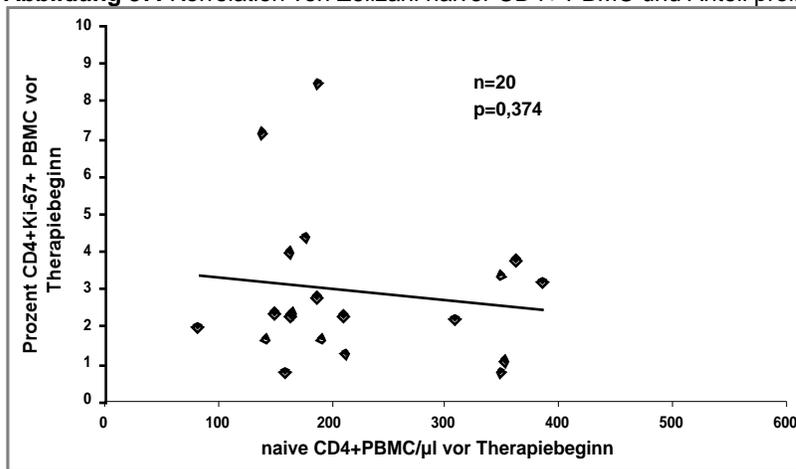
PBMC, Anteil der aktivierten CD8+ T-Lymphozyten im Lymphknoten vor Beginn einer Therapie und zum Zeitpunkt der 2. Lk-Biopsie nach Median 12 Monaten. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 36: Korrelation von CD8+ Lymphozyten-Proliferation im Blut mit VI vor Therapiebeginn.



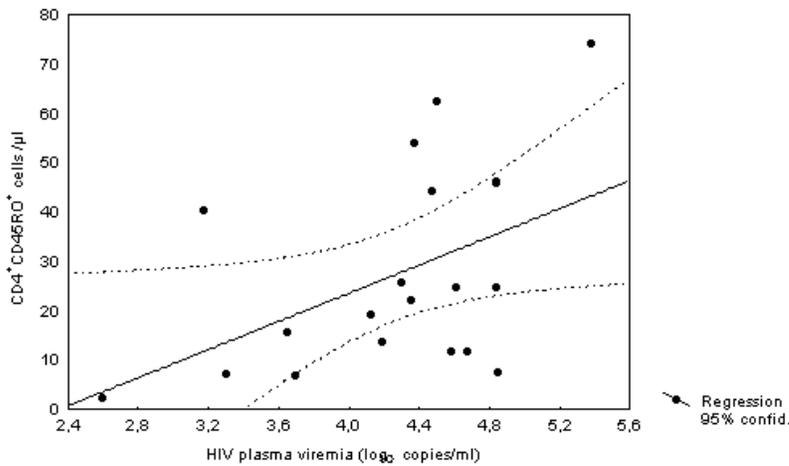
Korrelation von CD8+Ki-67+ und Plasmaviruslast (log) bei Therapiebeginn. n=21, p=0,037.

Abbildung 37: Korrelation von Zellzahl naiver CD4+ PBMC und Anteil proliferierender CD4+ bei Therapiebeginn.



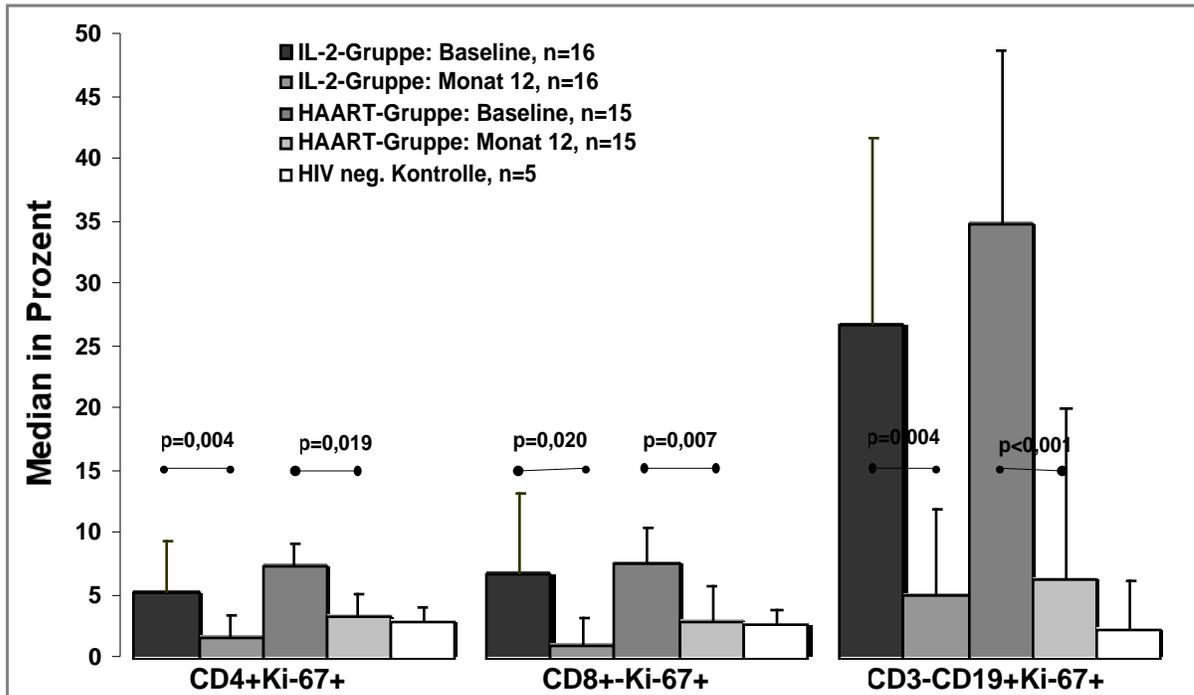
Bei Therapiebeginn besteht keine Korrelation zwischen CD4+ Ki-67+ PBMC und CD4+CD45RAhi/µl

Abbildung 38: Korrelation der proliferierenden (Ki-67+) CD4+CD45RO+ PBMC mit Plasmaviruslast vor Therapiebeginn.



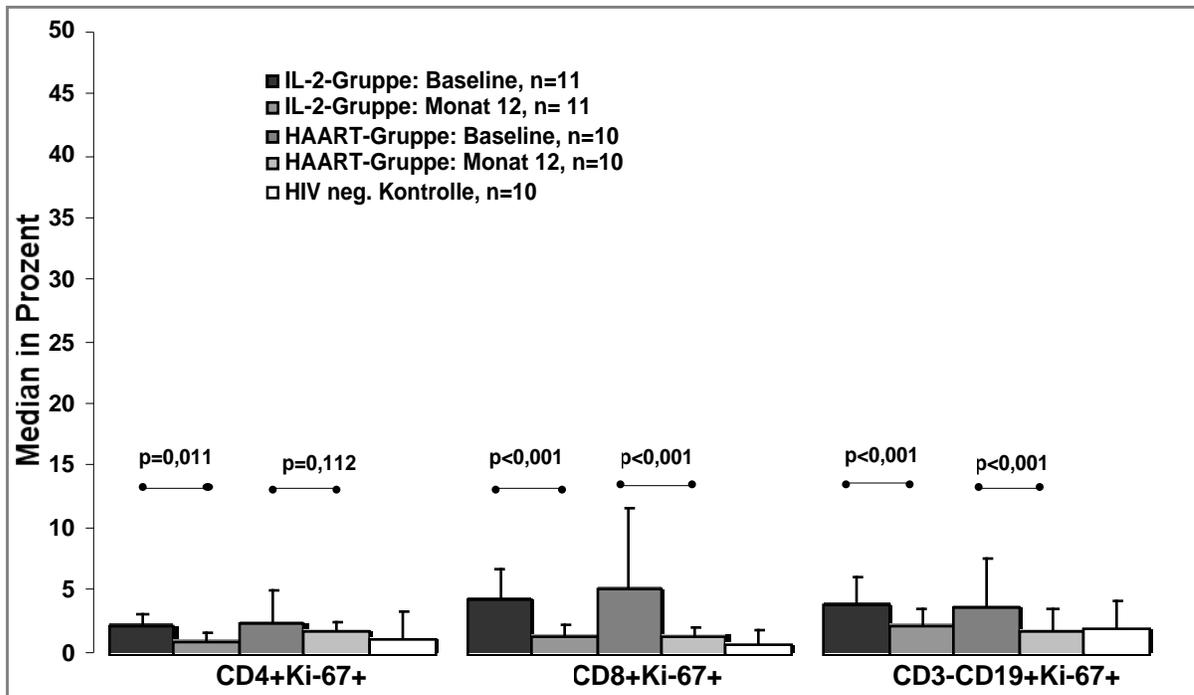
Korrelation von Viruslast und Anteil CD4+CD45RO+Ki-67+ PBMC vor Beginn einer ART. n=19, p=0,024.

Abbildung 39: Entwicklung der Proliferation von LNMC-Subpopulationen unter HAART ± IL-2.



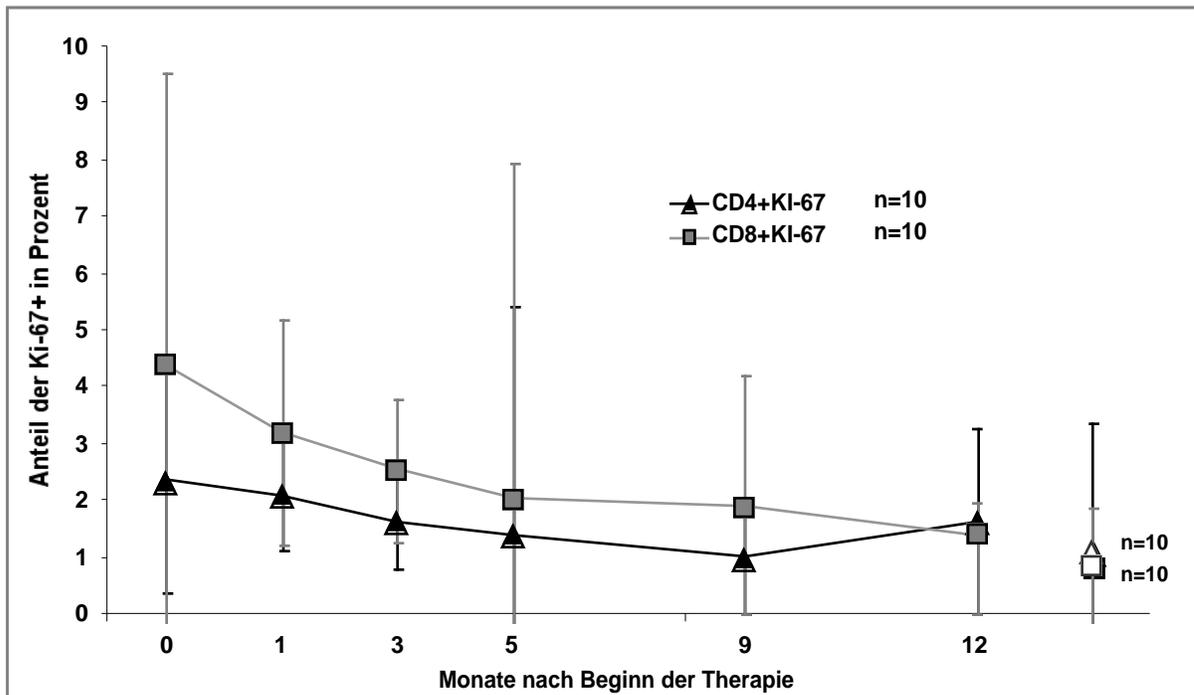
Anteil Ki-67 exprimierender LNMC (T- und B-Zellen) vor Beginn einer Therapie und nach Median 12 Mo unter HAART ± IL-2. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 40: Entwicklung der Proliferation von PBMC-Subpopulationen unter HAART ± IL-2.



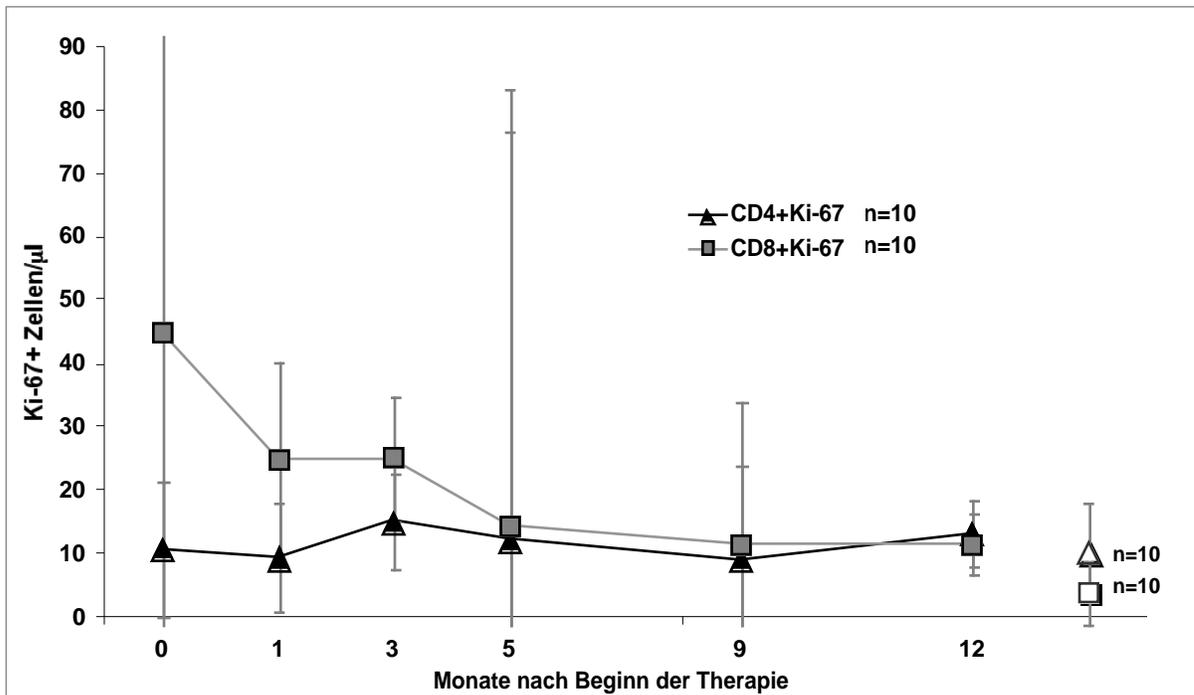
Anteil Ki-67 exprimierender PBMC (T- und B-Zellen) vor Beginn einer Therapie und nach Median 12 Mo unter HAART ± IL-2. Normalkontrolle zum Vergleich rechts (weiß). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 41: T-Zell-Proliferation im Verlauf von 12 Monaten unter HAART ± IL-2 (prozentual).



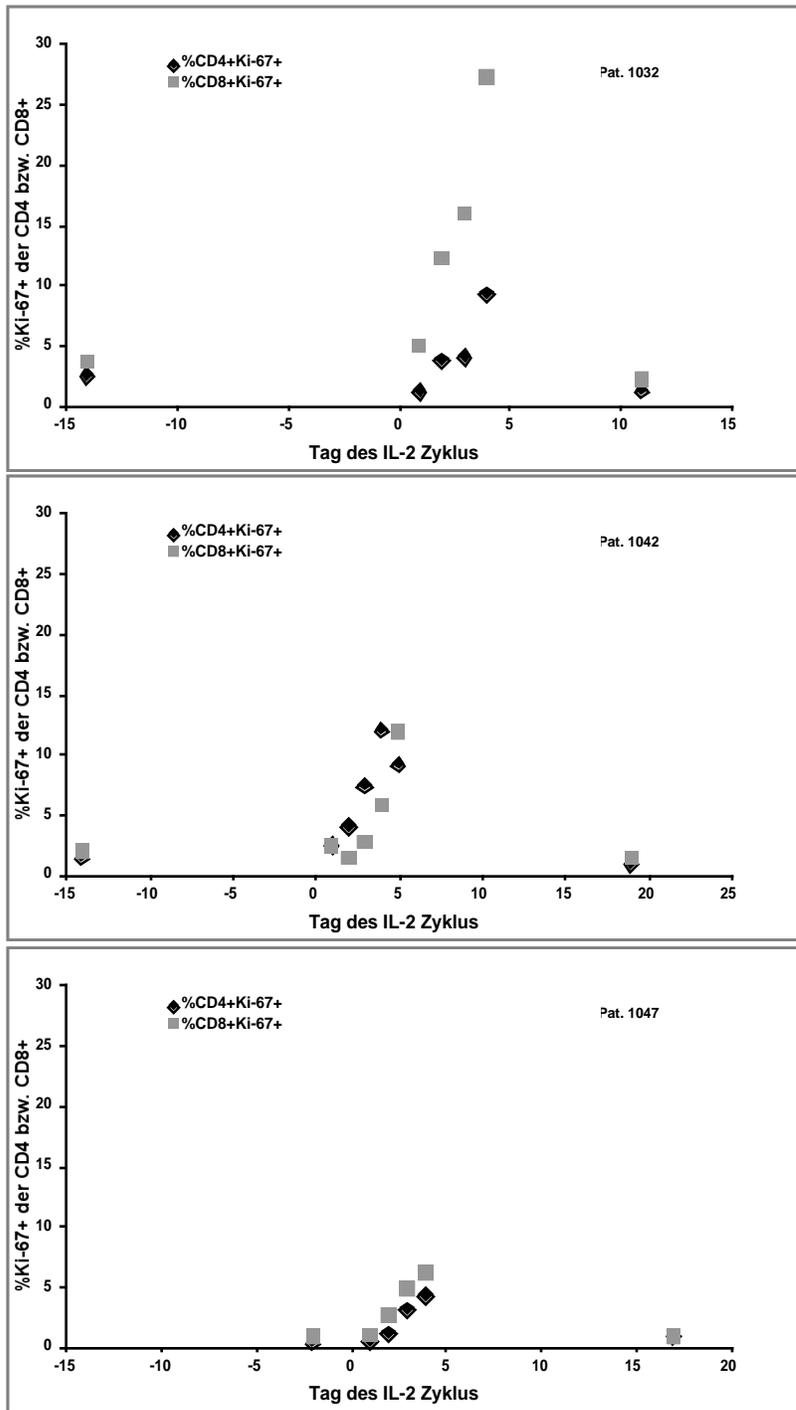
Anteil proliferierender (%) T-Lymphozyten im Verlauf eines 12-monatigen Beobachtungsintervall unter HAART ± IL-2 im Vergleich zu einer HIV-negativen Kontrollgruppe (weiß, rechts). Werte als Median ± Standardabweichung. Abfall der Fraktion proliferierender Lymphozyten parallel zum Abfall der VL, besonders ausgeprägt bei CTL.

Abbildung 42: T-Zell-Proliferation im Verlauf von 12 Monaten unter HAART ± IL-2 (absolut).



Absolute Zahl der T-Lymphozyten/µl in Proliferation im Verlauf eines 12-monatigen Beobachtungsintervall unter HAART ± IL-2 im Vergleich zu einer HIV-negativen Kontrollgruppe (weiß, rechts). Werte als Median ± Standardabweichung.

Abbildung 43-45: CD4+ und CD8+ PBMC-Proliferation innerhalb eines IL-2 Zyklus.



Darstellung von CD4+Ki-67+ (schwarz) und CD8+Ki-67+ (grau) Lymphozyten innerhalb eines Zyklus (Tag 0 bis 5) mit 9 Mio U IL-2/d, sowie davor und danach (n=3).

5. Diskussion

5.1. Immunologische Veränderungen bei chronischer HIV-Infektion

In der chronischen HIV-Infektion konnte in der vorliegenden Untersuchung, in Übereinstimmung mit anderen Gruppen [96], neben einer signifikanten Reduktion der CD4+ Lymphozyten im Blut eine CD8-Lymphozytose beobachtet werden. Insbesondere phänotypisch naive CD4+ und CD8+ PBMC zeigten sich signifikant reduziert, was u.a. Benito et al [7] bzw. Roederer et al [107] zuvor beschreiben konnten.

Die Verwendung von CD45RO und CD45RA zur Bestimmung von funktionell naiven und Effektor/Memory-Lymphozyten alleine ist umstritten. Insbesondere CD62L, als Homing-Ligand für die Migration über HEV in lymphatische Gewebe, aber auch CD29 für Memory, CD26 [155] und CCR7 sind verwendet worden, um naive von Effektor-/Memory-Lymphozyten zu unterscheiden. Der Zusammenhang der Expression von CD45RA^{hi} und CD45RO^{hi} zu funktionellen Unterschieden in der Prozessierung von Neo- und Recall Ag sind von Young et al [152] deutlich gemacht worden, weshalb die hier verwendete Definition ihre Berechtigung findet. Daneben hat sich CD62L als äußerst kryolabil erwiesen und eignet sich so nicht für die vorliegende Untersuchung.

Erniedrigte Zahlen naiver PBMC im natürlichen Krankheitsverlauf [107, 135] sind als Indiz für eine Störung der Regeneration dieser Zellen aus primären lymphatischen Organen gewertet worden [148]. HIV Replikation könnte demnach die CD4+ Regeneration blockieren [45, 58, 86], indem Progenitor-Zellen des KM infiziert werden [65]. Es kann aber auch eine Verschiebung in den Pool der Effektor-/Memory-Lymphozyten zu einem solchen Verlust beitragen.

Neben dem CD4-Zellverlust ist der Status der chronischen Immunaktivierung ein zentrales Charakteristikum der HIV-Infektion. Ein signifikant erhöhter Anteil von CD4+ und der größte Teil der CD8+ Lymphozyten war in Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen im Lk und Blut im Vergleich zu einer Normalkontrolle aktiviert [25]. Das Ausmaß der Aktivierung korreliert bei Therapiebeginn mit der Höhe der Plasma-Viruslast. Es ist unklar ob Aktivierung und Proliferation durch HIV-spezifische Expansion, Stimulation durch kreuzreaktive Antigene oder Zytokin-medierte „bystander“-Aktivierung induziert wird.

Es wurde in der Literatur lange kontrovers diskutiert, ob der Umsatz von CD4+ und/oder CD8+-Lymphozyten in der chronischen Phase der HIV-Infektion erhöht ist, welches die treibende Kraft ist und in wie weit diese (im Sinne eines erhöhten Gesamtumsatzes) zum Verlust von CD4-Zellen beiträgt. Zellumsatz ist als Funktion von Proliferation und Zelluntergang zu verstehen, wobei sich diese Mechanismen in Gesunden Individuen die Waage halten. Polarisierende Arbeiten zu diesem Thema berechneten aus dem CD4-Zellanstieg unter HAART einen 70-fach erhöhten Umsatz von CD4-Zellen in der HIV-Infektion [61] („tap and drain“-Modell = high turn over/ accelerated destruction modell).

Andere beschrieben in Untersuchungen mit verschiedenen Techniken zwar einen erheblich gesteigerten Umsatz von CD8+, nicht aber von CD4+-Lymphozyten [149] und schlossen auf die supprimierende Wirkung von HIV auf primäre lymphatische Organe als entscheidende Ursache für den T-Zell-Verlust („regenerative-failure“-Modell) [45, 58, 59, 86].

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Anteil proliferierender Zellen mit Hilfe der Detektion des nukleären-Ag Ki-67 bestimmt. Der Anteil proliferierender (Ki-67+) CD4+, CD8+ und B-Lymphozyten war in der asymptomatischen Phase der Infektion gegenüber einem Normalkollektiv in Lk und Blut signifikant erhöht. In absoluten Zellzahlen jedoch war der Anteil proliferierender CD4+, anders als der der CD8+, gegenüber einer Normalkontrolle nicht deutlich gesteigert. Bei Sachsenberg et al waren im Gegensatz dazu auch absolute Zahlen der CD4+Ki-67+-Lymphozyten erhöht [116]. Proliferationsraten für CD4 und CD8 waren in der hier vorliegenden Untersuchung wie auch bei Lempicki et al [75] im Lk ausgeprägter als im Blut. Eine Korrelation der Fraktionen proliferierender T-Zell-Subpopulationen untereinander und im Verhältnis zu der Höhe der Viruslast konnte - wie bei Hellerstein et al und Rosenzweig et al [58, 112] - hier ebenfalls gezeigt werden [75]. Die Tatsache, dass auch B- und NK-Zellen in ihrem Umsatz gesteigert waren, konnte von Mohri et al im SIV-Modell [91] und von Lempicki et al für den menschlichen Lk [75] bestätigt werden. Eine Korrelation bei Therapiebeginn zu Gesamt- oder naiven CD4-Zellzahl, wie von anderen bei Zellzahlen <100/µl [56] als Hinweis auf homöostatische Mechanismen beschrieben worden ist, bestand bei den hier untersuchten Pat. mit Zellzahlen >350/µl nicht. Insbesondere aktivierte Lymphozyten mit dem Effektor/Memory-Phänotyp CD45ROhi können als Zellen mit gesteigerten Umsatz angesehen werden [37, 75, 116]. Der Zusammenhang von Aktivierung und Proliferation konnte hier auf Einzelzellebene deutlich gemacht werden. Eine gesteigerte PBMC-Proliferation ist von anderen Virus-Infektionen wie CMV [139], EBV, HBV [130] und VZV [93] bekannt.

Die zentrale Rolle des erhöhten Zellumsatzes in der Pathogenese von HIV ist durch verschiedene Veröffentlichungen – zum Teil mit Hilfe von anderen Techniken (Bromodeoxyuridine, H²-Glucose) – gesichert [56, 58, 75, 91, 92, 99, 112, 116, 134, 157]. Die gute Übereinstimmung von Daten bei Messungen von Ki-67 bzw. H²-Glucose konnte inzwischen von Mohri et al demonstriert werden [92].

5.2. Einfluss von HAART

Es konnte hier gezeigt werden, dass eine antiretrovirale Kombinationstherapie zu einem rapiden Abfall der Virusbelastung [20, 97], sowie zu einem signifikanten Anstieg der CD4+-Zellzahlen im Blut [4, 85, 100, 157] beiträgt. HAART bewirkt einem Abfall der CD8+ T-Lymphozyten in Blut und Lk. Ein Anstieg der CD4-Zellzahlen unter HAART geht mit einer verbesserten Immunfunktion gegenüber Recall-Ag (z.B. Tuberkulin, CMV) und folglich

reduzierter Mortalität und Morbidität einher [4, 54, 67, 74]. Eine klinisch relevante Verbesserung der Immunantwort gegenüber HIV selbst konnte bisher nicht gezeigt werden. Ein Anstieg der naiven T-Lymphozyten, und damit eine Zunahme der TCR-Vielfalt (gegenüber Effektorzellhäufigkeit) wird als ein wichtiger Aspekt einer vollständigen Immunrestitution angesehen. Um beurteilen zu können, durch welche Subpopulationen der CD4-Zell-Anstieg generiert wird, wurden T-Lymphozyten nach deren Expression der CLA-Isoformen, CD45RA und CD45RO, typisiert.

Der Anstieg der T-Helfer-Zellen unter HAART war hier im ersten Monat durch einen Anstieg sowohl von Effektor/Memory- als auch vom naiven Phänotyp bedingt, in den folgenden dominierte der naive Phänotyp. Der zu beobachtende initiale Anstieg beider Populationen (45RA^{hi} und RO^{hi}) ist *nicht* im Einklang mit Veröffentlichungen, nach denen unter CD4⁺ zunächst ein Anstieg der Effektor/Memory-Population zu erwarten gewesen wäre [4, 17, 25, 68, 74]. Die steigende CD4-Zellzahl in den ersten 4 Wochen unter HAART war diesen Autoren zufolge in der Redistribution der CD45RO⁺ aus dem lymphatischen Gewebe, in einer zweiten Phase als Repopulation neugebildeter naiver Lymphozyten aus dem Thymus begründet. Naive CD4⁺ PBMC erreichten aber unter HAART auch nach einem Jahr nicht das Niveau der Kontrollgruppe. Andere konnten nach einem Jahr vergleichbare Daten erheben [4, 25, 36, 56, 74, 100, 121] und auch nach zwei Jahren konnte mit HAART keine vollständige Normalisierung des naiven Zellpools erreicht werden [98]. Physiologische Zellzahlen für naive CD4⁺ Lymphozyten konnte nach 1 Jahr lediglich in einer Gruppe erreicht werden, die innerhalb von 2 Wochen nach Serokonversion mit einer Therapie begonnen hatte [156]. Auch in anderen Situationen, in denen T-Zellen unabhängig von einer Infektion mit HIV erheblich reduziert werden, wie etwa im Rahmen einer ablativen Chemotherapie, zeigte sich der Wiederanstieg der naiven CD4⁺ interindividuell variabel, langsam und unvollständig [82]. Die Fähigkeit zur Regeneration eines naiven Zellpools ist mit der Regeneration primär lymphatischer Organe [4, 35, 74, 82, 100] und der Thymusgröße [124] in ein kausales Verhältnis gebracht worden. Die Beobachtung, dass auch bei Pat. nach Resektion des Thymus ein Anstieg der naiven CD4⁺ Population zu beobachten ist [55], stellt letzteren Zusammenhang aber in Frage.

Die Regeneration phänotypisch naiver T-Lymphozyten unter HAART ist nicht notwendigerweise auf die Regeneration der primären lymphatischen Organe alleine zurückzuführen. Expansion peripherer Pools naiver Zellen ohne Veränderung des Phänotyps [127], die bereits erwähnte Repopulation aus lymphatischem Gewebe [36] und eine phänotypische Reversion von RO⁺ zu RA⁺ [6, 140, 87, 90] sind mögliche Mechanismen.

Neben der Regeneration der CD4-Zellzahlen und einer TCR-Variabilität stellt die Reduktion der chronischen Immunaktivierung ein zentrales Ziel der Therapie der HIV-Infektion dar. Aktivierung führt zu Infektion von Zielzellen, Integration von Virusgenom und Replikation.

Auch nach einer einjährigen Therapie jedoch präsentieren sich Aktivierungsparameter *nicht* vollständig normalisiert. Ein großer Teil der aktivierten Zellen ist wahrscheinlich HIV-spezifisch [94, 145]. Die zentrale Rolle der CD8+ in der Kontrolle der Virusreplikation konnte im SIV-Modell demonstriert werden, wo die Entfernung von CD8 Lymphozyten in vivo zu einem Anstieg der Virämie führte [118]. Mit Reduktion der Virusbelastung unter HAART zeigen sich diese Zellen in ihrer Frequenz reduziert. Im Rahmen von STI (Supervised/structured Therapy Interruption) ist gezeigt worden, dass diese HIV-spezifischen, aktivierten CD8+, mit dem Wiederanstieg der VL erneut nachweisbar werden [30, 75, 136], was den engen Zusammenhang von CTL-Frequenz und Virusreplikation unterstreicht.

Warum stellt sich die Deaktivierung bei maximal supprimierter Virusreplikation nach einem Jahr unvollständig dar? In 50% der hier untersuchten Pat. mit maximal supprimierter Plasmaviruslast konnten im Lk produktiv infizierte Zellen, wenn auch in deutlich reduzierter Form, detektiert werden (Daten nicht vorgestellt, Zusammenarbeit mit Prof. P. Racz und Dr. K. Tenner-Racz, Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg). Eine weitere Erklärung für die persistierende zelluläre Immunaktivierung ist, dass subklinische Infektionen einer vollständigen Normalisierung entgegenwirken könnten [23, 99], was besonders in Ländern mit hohen Durchseuchungsraten für parasitäre Infektionen [8, 23] eine Rolle zu spielen scheint.

Es muß unterstrichen werden, dass die Grenze der Tests von 25 RNA-Kopien pro ml Plasma keine biologische ist. Sensiblere Methoden müssen etabliert werden, um Unterschiede in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze detektieren zu können und so interindividuelle Unterschiede in der Höhe der Immunaktivierung einordnen zu können.

Verschiedene Arbeiten haben sich inzwischen - wie hier - mit dem Einfluss von HAART auf T-Zell-Proliferation im Blut [45, 56, 72] und unter Berücksichtigung des lymphatischen Gewebes [156, 157] befasst. In Blut und Lk sank der Anteil Ki-67-exprimierender CD4+ und CD8+ uniform auf ein Niveau, das statistisch nicht von dem der Kontrollgruppe zu unterscheiden war. Die gute Korrelation zur Höhe der Viruslast zu Beginn der Therapie und der enge zeitliche Zusammenhang zu deren Abfall legt den Verdacht nahe, dass es sich um ein Phänomen handelt, das sich durch die Auseinandersetzung mit dem Antigen im jeweiligen Kompartiment erklären läßt.

5.3. Einfluss von Interleukin-2

Intermittierende Gabe von IL-2 resultiert im Blut in einem - in absoluten Zellzahlen - höheren CD4-Zell-Anstieg als in der Gruppe mit einer antiretroviralen Vierfachkombination. Daten über Monat 12 hinaus wurden hier nicht erhoben, andere Autoren beschreiben aber im Blut einen anhaltenden Effekt auch drei [3] bzw. sechs Monate [121] nach Abschluss der immunmodulatorischen Therapie. Pat. in der hier vorgestellten Untersuchung befanden sich in einer immunologisch stabilen Situation mit CD4 Zellzahlen >350/µl. David et al. [32]

konnten mit einer IL-2-Therapie auch bei Pat. mit einem fortgeschrittenen Immundefekt und zuvor fehlendem Ansprechen auf HAART einen Anstieg der CD4-Zellzahl auf über 200/ μ l erzielen. Der Anstieg zeigte sich hier mit Beginn der IL-2-Gabe ab Tag 28 in den ersten drei Monaten besonders ausgeprägt. Neben einem Einfluss auf CD4+ konnte auch ein Effekt auf den Rückgang der CD8+ PBMC beobachtet werden. Unter Einfluss von IL-2 zeigte sich der unter HAART deutliche Abfall der CD8+ signifikant geringer ausgeprägt, was als Indiz auf eine Expansion auch anderer als der CD4+ zurückgeführt werden kann. Neben CD8+ stellen auch NK-Zellen eine Zielpopulation von IL-2 dar [81].

Der Einfluss von IL-2 auf die Verteilung der CD45-Isoformen RA und RO ist bei verschiedenen Autoren betrachtet worden [3, 25, 31, 76, 121, 143, 155]. Es wurden jedoch heterogene Daten erhoben. In der vorliegenden Arbeit war es unter IL-2 v.a. der Effektor-/Memory-Phänotyp, der zu der Repopulation mit CD4+ Lymphozyten beitrug, was in einer Inversion der RA/RO-Ratio resultierte. In absoluten Zahlen konnte der Einfluss von IL-2 auf *beide* Populationen gezeigt werden. Dies ist im Einvernehmen mit Veröffentlichungen anderer Autoren [76]. Auch bei Arno et al [3] stiegen unter IL-2 Memory CD45RO+ in den ersten 4 Wochen statistisch signifikant über das prätherapeutische Niveau an, während naive CD4+ diese Signifikanz erst ab Monat 6 erreichten. Zanussi et al [155] beschrieb ebenfalls einen signifikanten Anstieg beider Phänotypen. Bei Connors et al [25], sowie bei Davey et al [31] war die Ratio unter IL-2 Einfluss – anders als hier – zugunsten von naiven T-Lymphozyten verschoben. Bei Connors et al konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass auch unter IL-2 die TCR-Vielfalt im Vergleich zu einem HIV-negativen Kollektiv nicht vollständig regeneriert wird [25], was für die periphere Expansion vorbestehender Effektor-Klone oder Verlängerung von deren Überlebenszeit auf Einzelzellebene spräche [25]. Eine Repopulation mit postthymisch expandierten Lymphozyten durch IL-2 würde so keinen Vorteil gegenüber einer HAART im Hinblick auf die Erkennung von Neo-Antigenen bieten, sondern lediglich das TCR-Spektrum zu Beginn einer Therapie expandieren helfen. Eine Therapie mit IL-2 müsste demzufolge initiiert werden, solange Lücken im TCR-Repertoire noch ohne klinische Relevanz sind.

Im Hinblick auf die klinische Relevanz von Infektionen, welche v.a. durch Memory-Zellen kontrolliert werden, könnte die Expansion von „kleinen“ Zellklonen gegenüber HAART im weiteren Krankheitsverlauf einen Vorteil bieten. Auch HIV-spezifische Effektorzellen könnten so expandiert werden. Die Expansion virusspezifischer Effektorzellen unter dem Einfluss von Interleukin-2 könnte zu einer Suppression der Virusreplikation beitragen. Studien mit immunmodulatorischen Regimen und Therapiepausen im Sinne einer endogenen Vakzinierung wurden begonnen, Daten liegen jedoch zur Zeit noch nicht vor. Es ist unklar, ob die expandierten Effektor-/Memory-Lymphozyten (insbesondere LNMC) HIV-spezifisch sind. Eine Expansion derjenigen Klone, die im natürlichen Krankheitsverlauf keine

ausreichende Viruskontrolle erreichen, dürfte jedoch keinen klinischen Benefit aufweisen. Ob der Mechanismus einer Expansion von HIV-spezifischen Effektorzellen durch eine durch IL-2 gesteigerte Anzahl von CD4+CCR5+ Zielzellen aufgehoben wird [144, 158], kann hier nicht beurteilt werden. Untersuchungen mit Nachweis von proviraler DNA, insbesondere im Lymphknoten wären hier notwendig. Ein positiver Effekt auf provirale DNA in einem Regime mit zwei NRTI konnte gezeigt werden [154], andere konnten diesen, in kleinen Fallzahlen, nicht nachweisen [129].

Die hier unter HAART beobachtete Deaktivierung war unter zusätzlicher Interleukin-2-Applikation unvollständig und schloss CD4- und CD8-Lymphozyten mit ein. Im Vergleich zu der mit HAART alleine therapierten Gruppe ist dies möglicherweise dadurch erklärbar, dass die sonst durch AICD („activation induced cell death“) eliminierten Lymphozyten unter HAART weiterhin detektierbar bleiben. Es ist beschrieben worden, dass IL-2 die Rate der aktivierten, in Apoptose befindlichen Zellen reduziert [27]. Prince et al konnte zeigen, dass IL-2 in vitro die Lebensdauer von CD8+CD38+HLA-DR+ verlängert [104], ein Mechanismus, der über die Expression von Bcl-2 [1, 19, 32] beeinflusst zu werden scheint. Ob ein Teil der Zellen in den naiven, ruhenden Status (CD45RA^{hi}RO⁻, CD69⁻, HLA-DR⁻, CD25⁻) zurückkehrt und ob der Zelltod nur zeitlich aufgeschoben wird, kann hier nicht beantwortet werden. Kurzfristig führt IL-2 innerhalb eines Applikationszyklus von wenigen Tagen zu einem Anstieg sowohl der Aktivierungs- als auch der Proliferationsmarker, der schon wenige Tage später nicht mehr nachweisbar ist. CD25 nimmt als Aktivierungsmarker und als IL-2 Rezeptor, welcher in Anwesenheit von IL-2 selbst (parakrine, autokrine und exogen zugeführt) verstärkt exprimiert wird, eine Sonderstellung ein. Welche biologische Bedeutung die CD25⁺ Population besitzt bleibt unklar. Prätherapeutische Anteile der CD25⁺ waren nicht signifikant niedriger als in einer HIV-negativen Kontrollgruppe.

Der kurz- und langfristige Einfluss von Interleukin-2 als hochwirksames Proliferationssignal in vitro auf die Expression von Ki-67 in Lymphozyten des Blutes und des Lk verdient besondere Beachtung. Die Expansion von Lymphozyten als Mechanismus der Repopulation mit CD4⁺ unter HAART ist postuliert worden, ohne Proliferation auf Einzelzellebene zu demonstrieren [140]. Es konnte hier an Einzelfällen demonstriert werden, dass der Einfluss von IL-2 auf CD4-Zellzahlen kurzfristig auf dessen Wirkung innerhalb eines Applikationszyklus auf die Proliferation von präformierten, peripheren Lymphozyten zurückzuführen ist. Eine signifikant höhere Fraktion proliferierender Lymphozyten nach einem Jahr war aber nicht nachweisbar. Der Einfluss war auch in der Subpopulation der CD8⁺ Lymphozyten festzustellen.

5.4. Vergleich von Blut und Lymphknoten

Im lymphatischen Gewebe befinden sich mit 98% der weitaus größte Anteil der Körper-Lymphozyten, davon 50-60% in Lymphknoten. Die meisten Untersuchungen zu

Lymphozytendistribution in der HIV-Infektion basieren auf Daten aus dem Blut, wohingegen die größte Ag-Konzentration in den Keimzentren des lymphatischen Gewebe zu finden ist. Daten zu Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten im Lk kommen so eine besondere Bedeutung zu.

Entsprechend der immunologischen Bedeutung der Lk als Ort der Auseinandersetzung mit dem Ag zeigte sich die Aktivierung von Effektorzellen und die Proliferation [75] im Lk ausgeprägter als im Blut und in der CD8+ Population stärker als in der der CD4+.

Im Lymphknoten ist der Anteil der CD8+ normalerweise niedrig, im Kontext einer HIV-Infektion jedoch wandern CTL ein. Die CD4+/CD8+-Ratio ist daher zugunsten der CD8+ Lymphozyten verschoben. Diese CD8+ besitzen den Phänotyp aktivierter Effektorzellen. Histologische Untersuchungen des Lymphknotens konnten zeigen, dass eine solche CD8-Zell-Proliferation v.a. in der T-Zone stattfindet [134]. CD4+ Zellen, vornehmlich phänotypisch CD45RO+, dagegen exprimierten diesen Veröffentlichungen zufolge Ki-67 v.a. in Keimzentren und in geringerem Maße in der T-Zell-Zone [134]. Chronische Immunaktivierung ist in der HIV-Infektion vergesellschaftet mit einer erhöhten Rate der Apoptose von CD4 Zellen im lymphatischen Gewebe [95]. Eine reduzierte Apoptoserate sollte zu einem Anstieg der CD4 Zellzahlen beitragen.

Anders als im Blut ist in der CD4+ Subpopulation des Lymphknoten physiologischerweise der dominierende Phänotyp CD45RO^{hi}. Im Kontext einer HIV-Infektion aber ist, den hier generierten Daten zufolge, der Anteil naiver Lymphozyten (CD45RA^{hi}) erhöht, ein Indiz dafür, dass Migrationsmechanismen in der HIV-Infektion verändert sind. Wang et al konnte zeigen, dass CD4-Lymphozyten auf HIV-Exposition hin verstärkt CD62L exprimieren und folgern, dass so ein gesteigerter Influx naiver Lymphozyten in lymphatische Gewebe unterhalten werden könnte [141].

Der Einfluss der Therapie war im Lk und Blut in beiden Therapiearmen unter Berücksichtigung aller hier verwendeten Lymphozytenmarker gleichsinnig [12, 13, 35, 41].

Es kam unter HAART im Lk zu einer vollständigen Normalisierung der CD4+/CD8+-Ratio [11]. Das so erreichte Niveau der Ratio im Lk entspricht dem Normalwert [16]. Immunhistologische Untersuchungen unter HAART konnten mit fallender Ag-Konzentration eine Abnahme der CD8+ Frequenz im Lk demonstrieren [131]. Zum unter HAART zu beobachtende Anstieg der absoluten Zellzahlen im Lk lässt sich in dieser Untersuchung keine Stellung nehmen [72]. Bei einer fehlenden oder wenig präzisen Bezugsgröße sind Veröffentlichungen, die absolute Zellzahlen im lymphatischen Gewebe anzugeben versuchen, kritisch zu bewerten. Ein Anstieg der absoluten CD4-Zellzahl innerhalb des lymphatischen Gewebes erscheint bei einem Rückgang des Lymphozyten-„trapping“, der Immunaktivierung, reduziertem Antigen und der hier in 7 von 15 Fällen vorbestehenden Lymphknotenhyperplasie im Gegenteil eher unwahrscheinlich. Dass es unter IL-2 auch im Lk, zumindest innerhalb der

Zyklen, wie auch im Blut zu einer lokalen Expansion der CD4+ kommt, ist dagegen anzunehmen. Es ist jedoch *prozentual* unter IL-2-Administration in Blut und Lk kein Unterschied in der Verteilung der T-Lymphozyten-Populationen erkennbar. Die unzureichende Konzentration des Zytokins im lymphatischen Gewebe dürfte als Ursache nicht in Frage kommen, da mit der erhöhten Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors, CD25, in diesem Kompartiment langfristige biologische Effekte erzielt werden. Es ist vorstellbar, dass der Abfall der CD8+ Effektor-Zellen, wie hier im Blut beobachtet, auch im lymphatischen Gewebe durch Interleukin-2 limitiert wird.

Dem lymphatischen Gewebe kommt auch in Zukunft bei der Untersuchung von neuen Therapie Strategien eine wichtige Rolle zu. So konnte vor kurzem durch die Arbeit von Altfeld et al [2] gezeigt werden, dass HIV-Epitope, die unter HAART von CTL im peripheren Blut neu erkannt zu werden scheinen [108; 115], bereits vor Initiierung einer Therapie im Lk nachzuweisen waren. Insbesondere die Evaluation immunmodulatorischer Therapien bedarf daher der Einbeziehung der anatomischen Kompartimente, in denen die Immunantwort generiert wird.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: CD4+-Depletion und chronische Immunaktivierung sind Charakteristika der chronischen HIV-Infektion. Das lymphatische Gewebe stellt das größte Reservoir für HIV dar. Bisher konnte unter einer hoch aktiven Kombinationstherapie (HAART) keine vollständige Immunrestitution erzielt werden, weshalb ein immunmodulatorischer Therapieansatz mit Interleukin-2 (IL-2) unternommen wurde.

Patienten, Material und Methoden: ‚COSMIC-Studie‘: offen, randomisiert, Multicenter-Phase III-Studie. 31 asymptomatische, therapie-naive HIV-1-Infizierte, CD4+ > 350/µl. Randomisation: HAART (Saquinavir, Nelfinavir, Lamivudin, Stavudin) ± IL-2 s.c. (9 Mio.U/d, alle 6 Wo. über 5 Tage). Axilläre Lymphknotenentnahmen vor Therapiebeginn und nach Median 12 Monaten. Lymphozytensubpopulationen (CD3,CD4,CD8), Proliferation (Ki-67+) und Immunaktivierung (CD69, CD25, CD28, HLA-DR, CD38, CD45RO, FAS) wurden an kryokonservierten LNMC und PBMC durchflusszytometrisch untersucht, naive Lymphozyten wurden als CD45RA^{hi}RO⁻, Effektor/Memory-Lymphozyten als CD45RO^{hi}RA⁻ definiert

Ergebnisse: Proliferation und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten zeigten sich in Lymphknoten *und* Blut gegenüber einem Normalkollektiv signifikant gesteigert. Die Plasma-Viruslast korrelierte signifikant mit Lymphozytenproliferation und Immunaktivierung in Blut und Lk. Prozentuale Werte von CD4+ und CD8+ zeigten sich im Lk nach Median 12 Monaten unabhängig vom Therapieregime auf Werte einer HIV negativen Kontrollgruppe normalisiert. Im Blut bewirkte IL-2 einen stärkeren Anstieg der CD4+ Zellzahlen, ohne jedoch die CD4+/CD8+-Ratio zu verbessern. In beiden Gruppen trugen CD4+CD45RA^{hi} und CD4+CD45RO^{hi} zum Anstieg bei. Unter IL-2 kam es zur Umkehr der CD45RA^{hi}/CD45RO^{hi}-Ratio zugunsten des Effektor-/Memory-Phänotyps. Immunaktivierung und Proliferation in Lk *und* PB normalisierten sich im Vergleich zu einem HIV-negativen Kollektiv unter Therapie. Diese Normalisierung war aber unvollständig. IL-2-Applikation resultierte in einem überschießenden Anstieg von CD25-exprimierenden CD4+ und CD8+ Zellen in Lk und PB. Der Abfall des Anteils proliferierender T-Lymphozyten im PB zeigte sich zeitlich eng mit Abfall der Plasma-Viruslast assoziiert.

Schlußfolgerung: T- und B-Zellproliferation sind mit Immunaktivierung und Virusreplikation eng verknüpft. Der Zellumsatz sinkt unter beiden Regimen signifikant. Die Immundeaktivierung ist unvollständig unter HAART. IL-2 besitzt im Blut einen positiven Effekt auf die absolute CD4-Zellzahl, der jedoch prozentual weder im Lk noch im PB signifikant ist. HAART+IL-2 expandiert vorwiegend Effektor/Memory-Lymphozyten, was in der Generierung von HIV-spezifischen keinen Vorteil gegenüber HAART darstellen dürfte. Funktionelle Analysen zu HIV-spezifischen Immunantwort, insbesondere im lymphatischen Gewebe, sind notwendig.

- 1 Adachi Y, Oyaizu N, Than S, McCloskey TW, Pahwa S
IL-2 rescues in vitro lymphocyte apoptosis in patients with HIV infection: correlation with its ability to block culture-induced down-modulation of Bcl-2. *J Immunol* 1996 *157*: 4184-93.
- 2 Altfeld M, van Lunzen J, Frahm N, Yu X, Schneider C, Eldridge R, Feeney E, Meyer-Olson D, Stellbrink HJ., Walker BD
Expansion of pre-existing, lymph node-localized CD8+ T cells during supervised treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *J Clin Invest* 2002 *109*: 837-43
- 3 Arno A, Ruiz L, Juan M, Jou A, Balague M, Zayat MK, Marfil S, Martinez-Picado J, Martinez MA, Romeu J, Pujol-Borrell R, Lane C
Efficacy of Low-Dose Subcutaneous Interleukin-2 to Treat Advanced Human immunodeficiency Virus Type 1 in person with <250/ μ L CD4 T Cells and Undetectable plasma Virus Load. *J Infect Dis* 1999 *180*: 56-60.
- 4 Autran B, Li T, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J
Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapie on CD4+ T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease. *Science* 1997 *277*: 112-116.
- 5 Barker E, Bossart KN, Fujimura SH, Levy JA
CD28 costimulation increases CD8+ cell suppression of HIV replication. *J Immunol* 1997 *159*: 5123-31.
- 6 Bell E, Sparshott S, Bunce C
CD4+ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen- a unifying concept. *Immunology Today* 1998 *19*: 60-64.
- 7 Benito J, Zabay J, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, Fernandez-Cruz E
Quantitative Alterations of the Functionally Distinct Subsets of CD4 and CD8 T Lymphocytes in Asymptomatic HIV infection: Changes in the Expression of CD45RA, CD45R0,CD11b, CD38, HLA-DR and CD25 Antigens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1997 *14*: 128-135.
- 8 Bentwich Z, Kalinkovich A, Weisman Z
Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of African AIDS. *Immunol Today* 1995 *16*: 187-91.
- 9 Bleul C, Wu L, Hoxie J, Springer T, Mackay C
The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T-lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997 *94*: 1925-1930.

- 10 Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, Timms A, Winter M, Baptista L, Johnson MA, Lee CA, Phillips AN
Increased Numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-infected patients. *AIDS* 1996 *10*: 827-834.
- 11 Borrow P, Lewicki H, Hahn B, Shaw G, Oldstone M
Virusspecific CD8+ cytotoxic T-Lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994: 6103-6110.
- 12 Bouscarat F, Levacher M, Landman R, Muffat-Joly M, Girard PM, Saimot AG, Brun-Vezinet F, Sinet M
Changes in blood CD8+ lymphocyte activation status and plasma HIV RNA levels during antiretroviral therapy. *Aids* 1998 *12*: 1267-73.
- 13 Bouscarat F, Levacher-Clergeot M, Dazza MC, Strauss KW, Girard PM, Ruggeri C, Sinet M
Correlation of CD8 lymphocyte activation with cellular viremia and plasma HIV RNA levels in asymptomatic patients infected by human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996 *12*: 17-24.
- 14 Brinchman J, Rosok B, Spurkland A
Activation and Proliferation of CD8+ T cells in Lymphoid Tissues of HIV-1-Infected Individuals in the Absence of the High-Affinity IL-2 Receptor. *J Acquir Immun Defic Syndr Hum Retro* 1998 *19*: 332-338.
- 15 Brodie SJ, Patterson BK, Lewinsohn DA, Diem K, Spach D, Greenberg PD, Riddell SR, Corey L
HIV-specific cytotoxic T lymphocytes traffic to lymph nodes and localize at sites of HIV replication and cell death [see comments]. *J Clin Invest* 2000 *105*: 1407-17.
- 16 Bryan C, Eastman P, Conner J, Baier K, Durham J
Clinical utility of a lymphnode normal range obtained by flow cytometry. *Ann NY Acad Sci* 1993 *677*: 404-406.
- 17 Bucy R, Hockett R, Derdeyn C, Saag M, Squires K, Sillers M, Mitsuyasu R, Kilby J
Initial increase in blood CD4+ lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissue. *J Clin Invest* 1999 *103*: 1391-1398.
- 18 Bukrinsky M, Stanwick T, Dempsey M, Stevenson M
Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 1991 *254*: 423-427.

- 19 Caggiari L, Zanussi S, Bortolin MT, D'Andrea M, Nasti G, Simonelli C, Tirelli U, De Paoli P
Effects of therapy with highly active anti-retroviral therapy (HAART) and IL-2 on CD4+ and CD8+ lymphocyte apoptosis in HIV+ patients. *Clin Exp Immunol* 2000 *120*: 101-6.
- 20 Cavert W, Notermans DW, Staskus K, Wietgreffe SW, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Zhang ZQ, Mills R, McDade H, Schuwirth CM, Goudsmit J
Kinetics of response in lymphoid tissue to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science* 1997 *276*: 960-964.
- 21 Choremi-Papadopoulou H, Panagiotou N, Samouilidou E, Kontopidou F, Viglis V, Antoniadou A, Kosmidis J, Kordossis T
CD28 costimulation and CD28 expression in T lymphocyte subsets in HIV-1 infection with and without progression to AIDS. *Clin Exp Immunol* 2000 *119*: 499-506.
- 22 Clark AG, Holodniy M, Schwartz DH, Katzenstein DA, Merigan TC
Decrease in HIV provirus in peripheral blood mononuclear cells during zidovudine and human rIL-2 administration. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992 *5*: 52-9.
- 23 Clerici M, Butto S, Lukwiya M, Saresella M, Declich S, Trabattoni D, Pastori C, Piconi S, Fracasso C, Fabiani M, Ferrante P, Rizzardini G
Immune activation in africa is environmentally-driven and is associated with upregulation of CCR5. Italian-Ugandan AIDS Project. *Aids* 2000 *14*: 2083-92.
- 24 Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA, Bassett RL, Timpone J, Baruch A, Jones M, Facey K, Whitacre C, McAuliffe VJ, Friedman HM, Merigan TC
Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1996 *334*: 1011-1017.
- 25 Connors M, Kovacs J, Krevat S, Gea-Banacloche J, Sneller M, Flannigan M, Metcalf J, Walker R, Falloon J, Baseler M, Stevens R, Feuerstein I
HIV infection induces changes in CD4+ T-cell phenotype and depletions within the CD4+ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiretroviral or immune-based therapies. *nature Medicine* 1997 *3*: 533-540.
- 26 Cooper D, Gold J, McLean P
Acute AIDS retrovirus infection: definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1995: 537-540.
- 27 Cordiali P, Solmone P, Viora M, Vanacore P, Pugliese O, Giglio A, Carprilli F, Ameglio F
Apoptosis in HIV infection: protective role of IL-2. *Journal of Biologic Regulators and Homeostatic Agents* 1994 *8*: 60-64.

- 28 Cousens LP, Orange JS, Biron CA
Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 1995 155: 5690-9.
- 29 Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA
The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984 312: 763-7.
- 30 Dalod M, Fiorentino S, Delamare C, Rouzioux C, Sicard D, Guillet JG, Gomard E
Delayed virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte activity in an HIV-infected individual with high CD4+ cell counts: correlations with various parameters of disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996 12: 497-506.
- 31 Davey RT, Jr., Chaitt DG, Albert JM, Piscitelli SC, Kovacs JA, Walker RE, Falloon J, Polis MA, Metcalf JA, Masur H, Dewar R, Baseler M
A randomized trial of high- versus low-dose subcutaneous interleukin-2 outpatient therapy for early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1999 179: 849-58.
- 32 David D, Nait-Ighil L, Dupont B, Maral J, Gachot B, Theze J
Rapid Effect of Interleukin-2 therapy in Human Immunodeficiency virus-Infected patients whose CD4 Cell Counts Increase Only Slightly in Response to combined Antiretroviral Treatment. *J Infect Dis* 2001 183: 730-735.
- 33 de Jong MD, Hulsebosch HJ, Lange JM
Clinical, virological and immunological features of primary HIV-1-infection. *Genitourin Med.* 1991: 367-373.
- 34 Dimitrov D, Martin M
Nature scientific correspondence. *nature* 1995 375: 194-195.
- 35 Douek D, McFarland R, Keiser P, Gage E, Massey J, Haynes B, Polis M, Haase A, Feinberg M, Sullivan J, Jamieson B, Zack J
Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998 396: 690-695.
- 36 Dyrhol-Riise A, Voltersvik P, Rosok B, Olofsson J, Asjö B
Normalization of CD4+ cell Numbers and reduced levels of Memory CD8+ Cells in Blood and Tonsillar Tissue after Highly active Antiretroviral therapy in Early HIV Type-1 Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000 16: 191-201.

- 37 Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, Harley CB, Villeponteau B, West MD, Giorgi JV
Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS* 1996: F17-F22.
- 38 Embretson J, Zupancic M, Ribas J, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase A
Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993 362: 359-62.
- 39 Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, Giorgi JV
The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1990 322: 166-172.
- 40 Fauci A
Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993 262: 1011-1018.
- 41 Feinberg M, Greene W
Molecular insights into human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *Curr Opin Immunol* 1992 4: 466-474.
- 42 Ferbas J, Kaplan AH, Hausner MA, Hultin LE, Matud JL, Liu Z, Panicali DL, Nereng-Ho H, Detels R, Giorgi JV
Virus burden in long-term survivors of human immunodeficiency virus (HIV) infection is a determinant of anti-HIV CD8+ lymphocyte activity. *J Infect Dis* 1995 172: 329-39.
- 43 Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth L, Buck C, Chaisson R, Quinn T, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M
Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science* 1997 278: 1295-1300.
- 44 Fiorentino S, Dalod M, Olive D, Guillet JG, Gomard E
Predominant involvement of CD8+CD28- lymphocytes in human immunodeficiency virus-specific cytotoxic activity. *J Virol* 1996 70: 2022-6.
- 45 Fleury S, De Boer R, Rizzardi G, Wolthers K, Otto S, Welbon C, Graziosi C, Knabenhans C, Soudeyans H, Bart P, Gallant S, Corpataux J
Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat Med* 1998 4: 794-801.
- 46 Geijetenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, Vliet SJ, Van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, Kewal-Ramani VN, Littmann DR, Figdor CG, Van Looyk Y
DC-SIGN, a Dendritic Cell-specific HIV-1-Binding protein that enhances trans-Infection of T cells. *Cell* 2000 100: 587-597.

- 47 Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R
Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999 179: 859-70.
- 48 Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T, Montagnier L
Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV infected persons: the increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 1996 156: 3509.
- 49 Gowda S, Stein B, Mohaghehpour N, Benike C, Engleman E
Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 1989 142: 773-780.
- 50 Graziosi C, Pantaleo G
Analysis of virologic and immunologic events in HIV infection. *Pathobiology* 1998 66: 123-127.
- 51 Grossman Z, Herberman RB
T-cell homeostasis in HIV infection is neither failing nor blind: modified cell counts reflect an adaptive response of the host. *Nat Med* 1997 3: 486-90.
- 52 Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC
Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992 175: 331-40.
- 53 Gruters RA, Terpstra FG, De Goede RE, Mulder JW, De Wolf F, Schellekens PT, Van Lier RA, Tersmette M, Miedema F
Immunological and virological markers in individuals progressing from seroconversion to AIDS. *Aids* 1991 5: 837-44.
- 54 Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ, Feinberg JE, Balfour HH, Jr., Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA
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. *N Engl J Med* 1997 337: 725-733.
- 55 Haynes BF, Hale LP, Weinhold KJ, Patel DD, Liao HX, Bressler PB, Jones DM, Demarest JF, Gebhard-Mitchell K, Haase AT, Bartlett JA
Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1999 103: 453-60.

- 56 Hazenberg MD, Cohen Stuart JWT, Otto SA, Borleffs C, Boucher R, DeBoer F, Miedema F, Hamann D
T-Cell Division is in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: A longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 2000 95: 249-255.
- 57 Heath S, Tew J, Szakal A, Burton G
Follicular dendritic cells and HIV infectivity. *Nature* 1995: 740-744.
- 58 Hellerstein M, Hanley M, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune J
Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med* 1999 5: 83-89.
- 59 Hellerstein M, McCune J
T Cell Turnover in HIV-1 Disease. *Immunity* 1997 7: 583-589.
- 60 Heng M, Heng S, Allen S
Co-infection and synergy of human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus. *Lancet* 1994 343: 255-258.
- 61 Ho D, Neumann A, Perelson A, Chen W, Leonard J, Markowitz M
Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995 373: 123-126.
- 62 Ho H, Hultin L, Mitsuyasu R, Matud J, Hausner M, Bockstoce D, Chou C, O'Rourke S, Taylor J, Giorgi J
Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens. *J Immunol* 1993 150: 3070-3079.
- 63 Hu J, Gardner MB, Miller CJ
Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol* 2000 74: 6087-95.
- 64 Hufert FT, van Lunzen J, Janossy G, Bertram S, Schmitz J, Haller O, Racz P, von Laer D
Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. *AIDS* 1997 11: 849-57.
- 65 Jenkins M, Hanley MB, Moreno MB, Wieder E, McCune JM
Human immunodeficiency virus-1 infection interrupts thymopoiesis and multilineage hematopoiesis in vivo. *Blood* 1998 91: 2672-8.

- 66 Kammerer R, Iten A, Frei PC, Burgisser P
Expansion of T cells negative for CD28 expression in HIV infection. Relation to activation markers and cell adhesion molecules, and correlation with prognostic markers. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1996 185: 19-25.
- 67 Katzenstein DA, Hammer SM, Hughes MD, Gundacker H, Jackson JB, Fiscus S, Rasheed S, Elbeik T, Reichman R, Japour A, Merigan TC, Hirsch MS
The relation of virologic and immunologic markers to clinical outcomes after nucleoside therapy in HIV-infected adults with 200 to 500 CD4 cells per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Virology Study Team. *N Engl J Med* 1996 335: 1091-8.
- 68 Kelleher AD, Carr A, Zaunders J, Cooper DA
Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-specific protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis* 1996 173: 321-9.
- 69 Kinter AL, Bende SM, Hardy EC, Jackson R, Fauci AS
Interleukin 2 induces CD8+ T cell-mediated suppression of human immunodeficiency virus replication in CD4+ T cells and this effect overrides its ability to stimulate virus expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 92: 10985-9.
- 70 Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD
Temporal association of cellular immune responses with initial control of viremia in primary HIV-1 Infection. *J Virol* 1994: 4650-4655.
- 71 Kovacs J, Dewar R, Vogel S, Albert J, Falloon J, Davay R, Walker R, Polis M, Spooner K, Metcalf J, Baseler M, Fyfe G
Controlled trial of Interleukin-2 Infusions in patients infected with the Human Immunodeficiency Virus. *N. Engl. J. Med.* 1996: 1350-1356.
- 72 Lafeuillade A, Chouraqui M, Hittinger G, Poggi C, Delbeke E
Lymph node expansion of CD4+ lymphocytes during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1997 176: 1378-82.
- 73 Lafeuillade A, Poggi C, Tamalet C, Profizi N, Tourres C, Costes O
Effects of a combination of zidovudine, didanosine, and lamivudine on primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1997 175: 1051-5.

- 74 Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, Kotzin BL, Fox L, Chiozzi MH, Leonard JM, Rousseau F, Wade M
Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 1998 *178*: 70-9.
- 75 Lempicki R, Kovacs J, Baseler M, Adelsberger J, Dewar R, Natarajan V, Bosche M, Metcalf J, Stevens R, Lambert L, Alvord W, Polis M
Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 *97*: 13778-13783.
- 76 Levy Y, Capitant C, Houhou S, Carriere I, Viard JP, Goujard C, Gastaut JA, Oksenhendler E, Boumsell L, Gomard E, Rabian C, Weiss L
Comparison of subcutaneous and intravenous interleukin-2 in asymptomatic HIV-1 infection: a randomised controlled trial. ANRS 048 study group. *Lancet* 1999 *353*: 1923-9.
- 77 Lifson A
Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: Immunological and virological characteristics. *J Infect Dis* 1991 *163*: 959-5.
- 78 Lifson A, Rutherford T, Jaffe H
The natural history of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1988 *158*: 1360-7.
- 79 Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV
Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997 *16*: 83-92.
- 80 Losso M, Belloso W, Emery S, Benetucci J, Cahn P, Lasala M, Lopardo G, Salomon H, Saracco M, Nelson E, Law M, Davey R
A Randomized, Contolled, Phase II Trial Comparing Escalating Doses of Subcutaneous Interleukin-2 plus Antiretrovirals versus Antiretrovirals Alone in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with CD4+ Cell counts > 350/mm³. *J Infect Dis* 2000 *181*: 1614-1621.

- 81 Lotze MT, Matory YL, Ettinghausen SE, Rayner AA, Sharrow SO, Seipp CA, Custer MC, Rosenberg SA
In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2. *J Immunol* 1985 *135*: 2865-2875.
- 82 Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE
T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 1993 *82*: 2585-94.
- 83 Macmahon D, Armstrong J, Huang X, Rinaldo C, Gupta P, Whiteside T, Pazin G, Tripoli C, Ho M
A Phase 1 study of subcutaneous recombinant interleukin-2 in patients with advanced HIV disease while on Zidovudine. *AIDS* 1994 *8*: 59-66.
- 84 Mahalingham M, Peakman M, Davies T, Pozniak A, McManus T, Vergani D
T cell activation and disease severity in HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1993 *93*: 337-343.
- 85 Markowitz M, Saag M, Powderly WG, Hurley AM, Hsu A, Valdes JM, Henry D, Sattler F, La Marca A, Leonard JM
A preliminary study of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease, to treat HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995 *333*: 1534-9.
- 86 McCune J, Hanley M, Cesar D, Halvorsen R, Hoh R, Schmidt D, Wieder E, Deeks S, Siler S, Neese R, Hellerstein M
Factors influencing T-cell turnover in HIV-1-seropositive patients. *J Clin Invest* 2000 *105*: R1-R8.
- 87 McLean A, Michie C
In vivo estimates of division and death rates of human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 *92*: 3707-3711.
- 88 Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Jr., Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, Gupta P
Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann. Intern. Med.* 1995: 573-579.
- 89 Meyaard L, Miedema F
Programmed death of T cells in the course of HIV infection. *Adv Exp Med Biol* 1995 *374*: 115-20.

- 90 Michie C, McLean A, Alcock C, Beverley P
Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 1992 360: 264-265.
- 91 Mohri H, Bonhoeffer S, Monard S, Perelson A, Ho D
Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science* 1998 279: 1223-1227.
- 92 Mohri H, Perelson AS, Tung K, Ribeiro RM, Ramratnam B, Markowitz M, Kost R, Hurley A, Weinberger L, Cesar D, Hellerstein MK, Ho DD
Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J Exp Med* 2001 194: 1277-87.
- 93 Mongkolsapaya J, Jaya A, Callan M
Antigen-specific expansion of cytotoxic T lymphocytes in acute measles virus infection. *J Virol* 1999 73: 67-71.
- 94 Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J, Ahmed R
Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998 8: 177-87.
- 95 Muro-Cacho C, Pantaleo G, Fauci AS
Analysis of Apoptosis in Lymph Nodes of HIV-Infected Persons. *J Immunol* 1995 154: 5555-5566.
- 96 Niu M, Stein D, Schnittman S
Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: review of pathogenesis and early treatment intervention in humans and animal retrovirus infections. *J Infect Dis* 1993 168: 1490-1501.
- 97 Notermans DW, Jurriaans S, de Wolf F, Foudraine NA, de Jong JJ, Cavert W, Schuirth CM, Kauffmann RH, Meenhorst PL, McDade H, Goodwin C, Leonard JM
Decrease of HIV-1 RNA levels in lymphoid tissue and peripheral blood during treatment with ritonavir, lamivudine and zidovudine. Ritonavir/3TC/ZDV Study Group. *AIDS* 1998 12: 167-73.
- 98 Notermans DW, Pakker NG, Hamann D, Foudraine NA, Kauffmann RH, Meenhorst PL, Goudsmit J, Roos MT, Schellekens PT, Miedema F, Danner SA
Immune reconstitution after 2 years of successful potent antiretroviral therapy in previously untreated human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *J Infect Dis* 1999 180: 1050-6.

- 99 Orendi J, Bloem A, Borleffs J, Wijnholds F-N, De Vos N, Nottet H, Visser M, Snippe H, Verhoef J, Boucher C
Activation and Cell Cycle Antigens in CD4+ and CD8+ T Cells Correlate with Plasma Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) RNA Level in HIV-1 infection. *J Infect Dis* 1998 *178*: 1279-1287.
- 100 Pakker N, Notermans D, DeBoer R, Roos M, DeWolf F, Hill A, Leonard J, Danner S, Miedema F, Schellekens P
Biphasic kinetics of peripheral blood T-cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: A composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998 *4*: 208-214.
- 101 Pantaleo G, Fauci A
New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* 1995: 487-512.
- 102 Pantaleo G, Graziosi C, Demarest J, Butini L, Montroni M, Fox C, Orenstein J, Kotler D, Fauci A
HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinical latent stage of disease. *Nature* 1993 *362*: 355-358.
- 103 Perelson A, Neumann A, Markowitz M, Leonard J, Ho D: HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral generation Time. *Science* 1996 *271*: 1582-1586.
- 104 Prince HE, Jensen ER
HIV-related alterations in CD8 cell subsets defined by in vitro survival characteristics. *Cell Immunol* 1991 *134*: 276-86.
- 105 Quinn T Acute primary HIV infection. *Jama* 1997 *278*: 58-62.
- 106 Reimann KA, Tenner-Racz K, Racz P, Montefiori DC, Yasutomi Y, Lin W, Ransil BJ, Letvin NL
Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Virol* 1994 *68*: 2362-70.
- 107 Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA
CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest* 1995 *95*: 2061-6.
- 108 Rosenberg ES, Altfeld M, Poon S, Phillips M, Wilkes BM, Eldridge G, Robbins G, D'Aquila R, Goulder PJ, Walker BD
Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection *Nature* 2000 *407*: 6803-523-6.

- 109 Rosenberg ES, Walker BD
HIV type 1-specific helper T cells: a critical host defense. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998 *14 Suppl 2*: S143-7.
- 110 Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT
Observations on the systemic administration of autologous lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985 *316*: 1485-92.
- 111 Rosenberg Y, Anderson A, Pabst R
HIV-induced decline in blood CD4/CD8 ratios: viral killing or altered lymphocyte trafficking. *Immunology Today* 1998 *19*: 10-16.
- 112 Rosenzweig M, DeMaria M, Harper D, Friedrich S, Jain R:
Increased rates of CD4+ and CD8+ T lymphocyte turnover in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 *95*: 6388-6393.
- 113 Rosok BI, Bostad L, Voltersvik P, Bjerknes R, Olofsson J, Asjo B, Brinchmann JE
Reduced CD4 cell counts in blood do not reflect CD4 cell depletion in tonsillar tissue in asymptomatic HIV-1 infection. *AIDS* 1996 *10*: F35-8.
- 114 Rottman JB, Ganley KP, Williams K, Wu L, Mackay CR, Ringler DJ
Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am J Pathol* 1997 *151*: 1341-51.
- 115 Ruiz L, Carcelain G, Martinez-Picado J, Frost S, Marfil S, Paredes R, Romeu J, Ferrer E, Morales-Lopetegui K, Autran B, Clotet B.
HIV dynamics and T-cell immunity after three structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection *Aids* 2001 *15*: 9 F15-17
- 116 Sachsenberg N, Perelson A, Yerly S
Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Clin Pathol* 1998 *187*: 1295-1303.
- 117 Sawhney N, Hall P
Ki-67-Structure, Function, and new antibodies. *J. of Pathology* 1992 *168*: 161-162.
- 118 Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA
Control of Viremia in Simian Immunodeficiency Virus Infection by CD8+ Lymphocytes. *Science* 1999 *283*: 857-860.

- 119 Schwartz D, Skowron G, Merigan T
Safety and effects of interleukin 2 plus zidovudine in asymptomatic individuals infected with human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991 4: 11-23.
- 120 Shearer G, Clerici M
Early T-helper cell defects in HIV-infection. *AIDS* 1991 5: 245-253.
- 121 Silvestri G, Munoz-Calleja C, Bagnarelli P, Piedimonte G, Clementi M
Early increase of CD4+CD45RA+ and CD4CD95- cells with conserved repertoire induced by antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *J Exp Immunol* 1998 111: 3-11.
- 122 Simonelli C, Zanussi S, Sandri S, Comar M, Lucenti A, Talamini R, Bortolin MT, Giacca M, De Paoli P, Tirelli U:
Concomitant therapy with subcutaneous interleukin-2 and zidovudine plus didanosine in patients with early stage HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998 20: 20-7.
- 123 Smith K
Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science* 1988 240: 1169-1176.
- 124 Smith KY, Valdez H, Landay A, Spritzler J, Kessler HA, Connick E, Kuritzkes D, Gross B, Francis I, McCune JM, Lederman MM
Thymic size and lymphocyte restoration in patients with human immunodeficiency virus infection after 48 weeks of zidovudine, lamivudine, and ritonavir therapy. *J Infect Dis* 2000 181: 141-7.
- 125 Spina C, Guatelli J, Richman D
Establishment of a stable, inducible form of human immunodeficiency virus type 1 DNA in quiescent CD4 lymphocytes in vitro. *J Virol* 1995 69: 2977-2988.
- 126 Spira A, Marx P, Patterson B
Cellular Targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of Simian Deficiency virus into macaques. *J Exp Med* 1996: 215-225.
- 127 Sprent J, Tough D, Sun S
Factors controlling the turnover of T memory cells. *Immunol Rev* 1997 156: 79-85.
- 128 Stahl-Hennig C, Steinman R, Tenner-Racz K, Pope M, Stolte N, Mätz-Rensing K, Grobschupff G, Raschdorff B, Hunsmann G, Racz P
Rapid infection of oral Mucosal-Associated Lymphoid Tissue with Simian Immunodeficiency Virus. *Science* 1999 285: 1261-1265.

- 129 Stellbrink H, Hufert F, Tenner-Racz K, Lauer J, Schneider C, Albrecht H, Van Lunzen J, Racz P
Kinetics of productive and latent HIV infection in lymphatic tissue and peripheral blood during triple-drug combination therapy with or without interleukin-2. *Antiviral Therapy* 1998 3: 209-214.
- 130 Stellbrink H, Poppelbaum J, Degen O, Frahm N, Meyer B, Van Lunzen J
Increased CD4+T Cell Proliferation in HIV Infection Is Not Primarily Homeostatic and Reflects T Cell Activation Induced by Virus Replication.; 8th Conference on retroviruses and opportunistic infection (Chicago 2001).
- 131 Stellbrink HJ, van Lunzen J, Hufert FT, Froschle G, Wolf-Vorbeck G, Zollner B, Albrecht H, Greten H, Racz P, Tenner-Racz K
Asymptomatic HIV infection is characterized by rapid turnover of HIV RNA in plasma and lymph nodes but not of latently infected lymph-node CD4+ T cells. *AIDS* 1997 11: 1103-10.
- 132 Stevenson M, Stanwick T, Dempsey M, Lamonic C
HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J* 1990 9: 1551-60.
- 133 Taylor J
CD4+ T-cell number at time of acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Epidemiol* 1995 141: 645-651.
- 134 Tenner-Racz K, Stellbrink H-J, Van Lunzen J, Schneider C, Jacobs J, Raschdorff B, Großschupff G, Steinmann R, Racz R
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.* 1998 187: 949-959.
- 135 Ullum H, Lepri AC, Victor J, Skinhoj P, Phillips AN, Pedersen BK
Increased losses of CD4+CD45RA+ cells in late stages of HIV infection is related to increased risk of death: evidence from a cohort of 347 HIV-infected individuals. *Aids* 1997 11: 1479-85.
- 136 Van Lunzen J, Frahm N, Schmitz E, Kuroda M, Hoffmann C, Meyer B, Lauer J, Degen O, Tenner-Racz K, Racz P, Stellbrink H
Treatment Interruption (TI) Leads to a Rapid Recurrence of Immunological Changes and Viral Load in Chronic HIV-1 Infection.; 8th Conference on retroviruses and opportunistic infection (Chicago 2001).

- 137 Vanham G, Kestens L, Penne G, Goilav C, Gigase P, Colebunders R, vandenbruaene M, Goeman J, Van der Groen G, Ceuppens J
Subset markers of CD8(+) cells and their relation to enhanced cytotoxic T-cell activity during human immunodeficiency virus infection. *J Clin Immunol* 1991 Nov; 11: 345-356.
- 138 Wagner R, Leschonsky B, Harrer E, Paulus C, Weber C, Walker B
Molecular and functional analysis of a conserved CTL epitope in HIV-1 p24 recognized from a long-term non-progressor: constraints on immune escape associated with targetting a sequence essential for viral replication. *J. Immunol.* 1999 162: 3727-3734.
- 139 Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ
Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 1997 99: 1739-50.
- 140 Walker R, Careter C, Muul L, Natarajan V, Herpin B, Leitman S, Klein H, Mullen C, Metcalf J, Baseler M, Falloon J, Davey R
Peripheral expansion of pre-existing mature T cells is an important means of CD4+ T-cell regeneration HIV-infected adults. *Nat. Med.* 1998 4: 852-856.
- 141 Wang L, Robb CW, Cloyd MW
HIV induces homing of resting T lymphocytes to lymph nodes. *Virology* 1997 228: 141-52.
- 142 Wei X, Ghosh S, Taylor M, Johnson V, Emini E, Deutsch P, Lifson J, Bonhoeffer S, Nowak M, Hahn B, Saag M, Shaw G
Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995 373: 117-122.
- 143 Weiss L, Ancuta P, Girard PM, Bouhlal H, Roux A, Cavaillon NH, Kazatchkine MD
Restoration of Normal Interleukin-2 Production by CD4+ T Cells of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients after 9 Months of Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* 1999 180: 1057-1063.
- 144 Weissman D, Dybul M, Daucher MB, Davey RT, Jr., Walker RE, Kovacs JA
Interleukin-2 up-regulates expression of the human immunodeficiency virus fusion coreceptor CCR5 by CD4+ lymphocytes in vivo. *J Infect Dis* 2000 181: 933-8.
- 145 Westby M, Marriott JB, Guckian M, Cookson S, Hay P, Dalgleish AG
Abnormal intracellular IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) production as HIV-1-associated markers of immune dysfunction. *Clin Exp Immunol* 1998 111: 257-63.

- 146 WHO/UNAIDS: Report on global HIV/AIDS epidemic; , World Health Organization (WHO)/ Joint United Nations Programme on HIV/AIDS(UNAIDS) 2000).
- 147 Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Goulder PJ, Kelleher A, Sewell AK, O'Callaghan CA, Rowland-Jones SL, Callan MF, McMichael AJ
Oligoclonal expansions of CD8(+) T cells in chronic HIV infection are antigen specific. *J Exp Med* 1998 *188*: 785-90.
- 148 Wolthers K, Schuitemaker H, Miedema F
Rapid CD4+T-cell turnover in HIV-1 infection: a paradigm revisited. *Immunology Today* 1998 *19*: 44-48.
- 149 Wolthers K, Wisman G, Otto S, De Roda Husman A-M, Schaft N, De Wolf F, Goudsmit J, Coutinho R, Van der Zee A, Meyaard L, Miedema F
T Cell Telomere Length in HIV-1 Infection: No Evidence for Increased CD4+ T-Cell Turnover. *Science* 1996 *274*: 1543-1547.
- 150 Wong J, Hezareh M, Günthard H, Havlir D, Ignacio C, Spina C, Richman D
Recovery of Replication-Competent HIV Despite Prolonged Suppression of Plasma Viremia. *Science* 1997 *278*: 1291-1294.
- 151 Wong JK, Gunthard HF, Havlir DV, Zhang ZQ, Haase AT, Ignacio CC, Kwok S, Emini E, Richman DD
Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 *94*: 12574-9.
- 152 Young JL, Ramage JM, Gaston JS, Beverley PC
In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur. J. Immunol.* 1997: 2383-2389.
- 153 Zack J, Arrigo S, Weitsman S, Go A, Haislip A, Chen I
HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990 *61*: 213-222.
- 154 Zanussi S, Simonelli C, Bortolin MT, D'Andrea M, Comar M, Tirelli U, Giacca M, De Paoli P
Dynamics of provirus load and lymphocyte subsets after interleukin 2 treatment in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999 *15*: 97-103.
- 155 Zanussi S, Simonelli C, Bortolin MT, D'Andrea M, Crepaldi C, Vaccher E, Nasti G, Politi D, Barzan L, Tirelli U, De Paoli P
Immunological changes in peripheral blood and in lymphoid tissue after treatment of HIV-infected subjects with highly active anti-retroviral therapy (HAART) or HAART + IL-2. *Clin Exp Immunol* 1999 *116*: 486-92.

- 156 Zaunders J, Cunningham P, Kelleher A, Kaufmann G, Jaramillo A, Wright R, Smith D, Grey P, Vizzard J, Carr A, Cooper D
Potent Antiretroviral Therapie of Primary Human Immundeficiency Virus Type 1 (HIV-1) infection: Partial Normalization of T lymphocyte Subsets and limited reduction of HIV-1 DNA Despite Clearance of Plasma Viremia. *J Infect Dis* 1999 *180*: 320-329.
- 157 Zhang Z-Q, Notermans D, Sedgewick G, Cavert W, Wietgreffe S, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Boies L, Chen Z, Jenkins M, Mills R
Kinetics of CD4+ T cell repopulation of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 *95*: 1154-1159.
- 158 Zou W, Foussat A, Houhou S, Durand-Gasselini I, Dulioust A, Bouchet L, Galanaud P, Levy Y, Emilie D
Acute upregulation of CCR-5 expression by CD4+ T lymphocytes in HIV- infected patients treated with interleukin-2. ANRS 048 IL-2 Study Group. *Aids* 1999 *13*: 455-63.

Ich danke PD Dr. Hans-Jürgen Stellbrink und Dr. Jan Van Lunzen für das interessante Thema und die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit, allen Patienten und den sie betreuenden Schwerpunktpraxen in Hamburg, Kiel, Lübeck, Hannover und Kiel, den Mitarbeiterinnen des Institutes für Immunologie des UKE zwischen 1997 und 2000 für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich danke Sohila Nazem, Nicole Frahm und Jannine Poppelbaum für die Hilfe bei dem Asservieren der Zellsuspensionen, Ingrid Stahmer für die Vermittlung fundierten immunologischen Wissens, PD Frieder Haag und der Firma Becton Dickensen für die Schulung in der Durchflußzytometrie. Heidi Günther, Frau Doris Elshani und den Mitarbeitern der medizinischen Poliklinik für Blutentnahmen und Koordination der Patiententermine. Prof. P. Racz und Frau Dr. K. Tenner-Racz für die Kooperation die Lymphknoten-Analysen betreffend. FACScalibur für technische Stabilität, auch bei wenigen „events“. Meinen Eltern für meine Gene und all ihre Unterstützung in Studium und Promotion und insbesondere Frau Susanne Hermfisse für Korrekturen, ihre unermessliche Geduld und Nachsicht bei all den ausgefallenen Urlaubstagen.

L e b e n s l a u f

Name: Johannes Lauer

geboren am: 19.09.1971

Geburtsort: Heidelberg

Wohnhaft: Lisztstr. 5, 22763 Hamburg

Eltern: Prof. Dr. med. Hans H. Lauer und Dipl. Psych. Hiltrud Lauer

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1977-1981 Emil von Behring Grundschule, Marburg

1981-1991 Gymnasium Philippinum, Marburg

1988-1989 Gig Harbour High School, Wa., USA

- Abitur

Zivildienst:

1991-1992 Universitätsklinikum Marburg, chirurgische Klinik

Studium der Humanmedizin: 1993-2000, Universität Hamburg

1995 Ärztliche Vorprüfung

1996 erstes Staatsexamen

1999 zweites Staatsexamen

1999-2000 praktisches Jahr

2000 Ärztliche Prüfung

1993-1997 Studentische Hilfskraft, Abteilung für Innere Medizin, AK Altona, Hamburg.

1997-2000 Studentische Laborkraft, Institut für Immunologie, Arbeitsgruppe HIV, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg.

seit 1997 Promotion zum Thema: Die chronische HIV-Infektion, Einfluß einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) mit und ohne Interleukin-2 (IL-2) auf Lymphozytensubpopulationen in Lymphknoten und Blut.

Ärztliche Tätigkeit

01.01.2001-30.06.2002 Arzt im Praktikum, Medizinischen Kern- und Poliklinik, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg.

seit 01.07.02 Assistenzarzt in Weiterbildung, Abteilung für Innere Medizin, Krankenhaus Bethesda AK Bergedorf, Hamburg.

.....
Hamburg, den 04.12.02 (Johannes Lauer)

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

(Johannes Lauer)