

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV,
Abteilung für Infektiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Charakterisierung der immunologischen Eigenschaften von
HIV-Infizierten mit hohen Viruslasten und geringem CD4+
T-Zell-Verlust**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Lisa Gloning
aus
München
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Rika Draenert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Eberle
Priv. Doz. Dr. Karl-Heinz Herbinger
Priv. Doz. Dr. Reinhard Obst

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: ---

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Humane Immunschwäche Virus (HIV)	1
1.1.1	Geschichte	1
1.1.2	Taxonomie	1
1.1.3	Genomstruktur	2
1.2	Die akute HIV-Infektion	3
1.2.1	Übertragungswege	3
1.2.2	Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion	3
1.3	HIV und das Immunsystem	4
1.3.1	Die CD8+ T-Zellen	4
1.3.2	Die Effektorfunktionen der CD8+ T-Zellen	5
1.3.3	Die CD4+ T-Helferzellen	6
1.3.4	Die CD38-Expression als Zeichen der Immunaktivierung	7
1.3.5	Inhibitorische Signalwege der Immunerschöpfung	8
1.3.6	Das Oberflächenmolekül CD44	9
1.4	Natural hosts	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methodik	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	13
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	13
2.1.3	Medien	14
2.1.4	Antikörper	15
2.1.5	Peptide	15
2.1.6	Software	17
2.2	Methodik	17
2.2.1	Patienten	17
2.2.2	Versuchsablauf	19
2.2.3	Probenentnahme	20
2.2.4	PBMC-Isolierung aus Vollblut	20
2.2.5	Bestimmung der Zelldichte	22
2.2.6	Kryokonservierung der Zellen	22
2.2.7	Auftauen der Zellen	22
2.2.8	Peptide	23
2.2.9	Interferon- γ Elispot	24

2.2.10	Durchflusszytometrie.....	26
2.2.11	Statistische Auswertung.....	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Patienten.....	30
3.2	Die CD38-Expression als Zeichen der Immunaktivierung.....	34
3.3	Die PD-1-Expression als Zeichen der Immunerschöpfung.....	40
3.4	Der Aktivierungsmarker CD44	45
3.5	Die CD4-Zellen und die Expression von PD-1 und CD44.....	46
3.6	Anzahl und Stärke der CD8+ T-Zellantworten gemessen anhand der Interferon- γ -Produktion	48
3.7	Die Polyfunktionalität der CD8-Zellen als Maß der Immunerschöpfung	50
4	Diskussion	59
4.1	Patienten.....	59
4.2	Die CD38-Expression als Zeichen der Immunaktivierung.....	61
4.3	Die PD-1-Expression als Zeichen der Immunerschöpfung.....	63
4.4	Der Aktivierungsmarker CD44	67
4.5	Die CD8+ Immunantworten	69
4.6	Klinische Bedeutung und Ausblick.....	72
5	Literaturverzeichnis	74
6	Anhang.....	84
6.1	Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit.....	84
6.1.1	Publikation.....	84
6.1.2	Poster	84
6.2	Danksagung.....	85
6.3	Lebenslauf.....	86
6.4	Eidesstattliche Versicherung.....	87

Zusammenfassung

Die HIV-Infektion stellt eine der größten Herausforderungen unserer Gesellschaft dar. Mit über 34 Millionen HIV-Infizierten weltweit und einer bisher erfolglosen Impfstoffentwicklung sind wir heute weit davon entfernt, die Pandemie unter Kontrolle zu bringen. Seit einigen Jahren sind jedoch bestimmte Affenarten bekannt, die trotz jahrelanger Infektion mit dem Affenvirus SIV und hoher Viruslasten nicht ins Stadium AIDS fortschreiten. Ob diese sogenannten natürlichen Wirte der SIV-Infektion auch beim Menschen existieren, war bisher weitgehend unbekannt.

Für die vorliegende Studie rekrutierten wir daher therapie-naive Patienten, die in der Lage waren, trotz hoher Viruslasten die HIV-Infektion über viele Jahre zu kontrollieren, also überdurchschnittlich wenige CD4-Helferzellen verloren. Als Kontrollgruppe wurden Patienten rekrutiert, die im Verlauf durchschnittlich an CD4-Helferzellen verloren, mit der HIV-Infektion also fortschritten. Mit Hilfe des Elispots und der Durchflusszytometrie untersuchten wir anschließend die immunologischen Charakteristika dieser Patienten. Dafür wurden die Höhe der CD38-Expression als Zeichen der Immunaktivierung, die Höhe der PD-1-Expression als Zeichen der Immunerschöpfung, die Höhe der CD44-Expression als Zeichen der Antigenerfahrung, sowie die Anzahl, Stärke und Qualität der Effektorfunktionen der CD8⁺ und zum Teil der CD4⁺ T-Zellen verglichen.

Wir konnten zeigen, dass Patienten, die trotz hoher Viruslasten in der Lage sind, die HIV-Infektion über eine längere Zeit zu kontrollieren, eine sehr heterogene Gruppe sind. Insgesamt waren die CD38- und die PD-1-Expression bei jenen Patienten höher, die höhere Viruslasten aufwiesen. Die Gruppen unterschieden sich für die Mehrzahl der Patienten weder in der Höhe der CD44-Expression, noch in der Anzahl, Stärke oder Qualität ihrer Immunantworten. Allerdings gab es einige wenige Ausnahmen und damit Patienten, die durchaus die immunologischen Charakteristika der natürlichen Wirte aufzeigten. So gab es zwei Patienten, die trotz hoher Viruslasten über viele Jahre nur wenige CD4-Zellen verloren und eine geringe Immunaktivierung, sowie eine geringe Immunerschöpfung ihrer CD8⁺ T-Zellen aufwiesen.

Die Existenz der natürlichen Wirte der HIV-Infektion ist also wahrscheinlich. Für die Zukunft ist es wichtig, noch mehr solcher Patienten zu identifizieren und zusätzliche Marker zu untersuchen, die Ursache für die gute Kontrolle der Infektion sein könnten.

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
CD 4, 8, 38, 44, 107a, 160	Cluster of Differentiation 4, 8, 38, 44, 107a, 160
CO	Controller
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal Calf Serum
FSC	Forward Scatter
Gag	Group antigen
HIV-1, -2	Humanes Immunschwäche Virus-1, -2
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-2	Interleukin-2
LAG-3	Lymphocyte-Activation Gene 3
LTNP	Longterm-Nonprogressor
MACS	Multicenter AIDS Cohort Study
MHC	Major Histocompatibility Complex
Nef	Negative factor
NK	Negativkontrolle
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	Programmed Death-1
PHA	Phytohaemagglutinin
PR	Progressor
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SFC	Spot Forming Cells
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SSC	Side Scatter
Tim-3	T cell immunoglobulin mucin-3
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VL	Viruslast

1 EINLEITUNG

Im Jahr 1981 kam es in den USA bei einer Gruppe junger homosexueller Männer zu einer ungewöhnlichen Häufung von seltenen Erkrankungen wie Kaposi-Sarkomen und Pneumocystis-Pneumonien. In diesem Zusammenhang wurde erstmals die erworbene Immunschwäche AIDS (engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) beschrieben [1-4]. Zwei Jahre später, im Jahr 1983, konnte das Humane Immunschwäche Virus (HIV) als Erreger dieser Erkrankung identifiziert werden. [5, 6]. Inzwischen sind laut UNAIDS weltweit über 34 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Die Neuinfektionsrate lag im Jahr 2011 bei 2,5 Millionen pro Jahr und allein im Jahr 2011 starben 1,7 Millionen Menschen an AIDS. Die Immunschwäche hat sich damit seit ihrer Entdeckung zu einer weltweiten Epidemie entwickelt, die unbehandelt in der Regel tödlich verläuft. In einigen afrikanischen Ländern ist AIDS zur häufigsten Todesursache überhaupt avanciert und stellt somit eine enorme wirtschaftliche und soziale Herausforderung für unsere Gesellschaft dar [7].

1.1 Das Humane Immunschwäche Virus (HIV)

1.1.1 Geschichte

Das erste nachweislich HIV-positive menschliche Blutserum stammt aus dem Jahr 1959 und wurde in Afrika entdeckt [8]. Entwickelt hat sich das HI-Virus jedoch vermutlich bereits Anfang des letzten Jahrhunderts, als in Westafrika das Simian Immunodeficiency Virus (SIV) vom Affen auf den Menschen übertrat [9].

1.1.2 Taxonomie

Die SI-Viren der Affen und die HI-Viren der Menschen sind Retroviren und zählen zur Gattung der Lentiviren. Infektionen mit Lentiviren verlaufen meist chronisch und weisen eine lange klinische Latenzphase auf. SIV kann in mehrere Typen unterteilt werden, von denen mindestens zwei verantwortlich sind für die Entwicklung der beiden

eng verwandten HI-Viren HIV-1 und HIV-2 [10]: durch den Übertritt von SIVcpz der Schimpansen (*Pan troglodytes*) auf den Menschen entwickelte sich HIV-1, durch den Übertritt von SIVsm der Rußmangaben (*Cercocebus atys*) entstand HIV-2 [11-14]. Die meisten AIDS-Fälle werden weltweit von HIV-1 verursacht, wohingegen die HIV-2-Infektion hauptsächlich in Westafrika vorkommt und lediglich für weniger als 1% aller Infektionen verantwortlich ist. Zusätzlich ist HIV-2 deutlich weniger pathogen und spielt deshalb in der Pandemie eine untergeordnete Rolle [15].

1.1.3 Genomstruktur

Das Genom des HI-Virus besteht aus den drei Strukturgenen Gag (engl. *group antigen*), Pol (engl. *polymerase*) und Env (engl. *envelope*), sowie aus den sechs regulatorischen und akzessorischen Genen Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev und Nef [16, 17] (Abb. 1). Für die vorliegende Arbeit sind insbesondere zwei Gene von Bedeutung: das Gag- und das Nef-Gen. Das Gag-Gen zählt zu den Hauptgenen und codiert die Strukturproteine für das Kernstück des Virus [18]. Das Nef-Gen (engl. *negative factor*) zählt zu den akzessorischen Genen und ist essenziell für eine effiziente Virusproduktion, da es unter anderem den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche der infizierten Zellen herabreguliert sowie die Produktion von MHC Klasse I und II Molekülen verringert [19, 20]. Dadurch wird die antivirale Immunantwort gehemmt und gleichzeitig die Replikation des Virus gefördert [21, 22]. Die beiden Gene Gag und Nef sind für die zelluläre Immunantwort die immunogensten Teile von HIV, weshalb wir sie für unsere Studie auswählten.

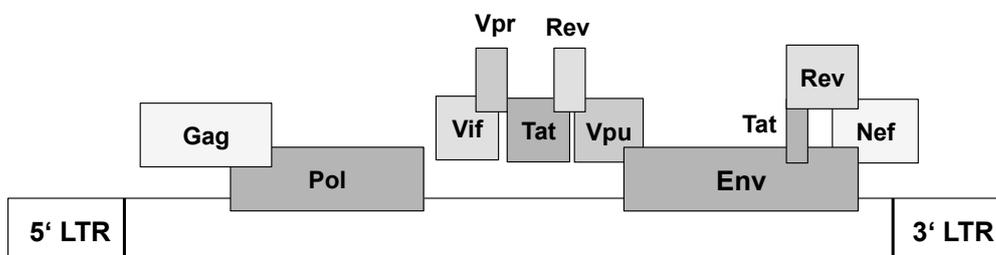


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des HIV-Genoms (nach [23]). Das Genom des HI-Virus besteht aus den drei Strukturgenen Gag (engl. *group antigen*), Pol (engl. *polymerase*) und Env (engl. *envelope*), sowie aus den sechs regulatorischen und akzessorischen Genen Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev und Nef. Des Weiteren wird das HIV-Genom von langen Sequenzwiederholungen flankiert, den sogenannten *Long Terminal Repeats* (LTR), die essenziell für die Replikation des HIV-Genoms sind.

1.2 Die akute HIV-Infektion

1.2.1 Übertragungswege

Die drei wichtigsten Übertragungswege für das HI-Virus sind Sexualkontakte, Blut und die vertikale Transmission von der Mutter auf das Kind [24]. Allerdings stellt die homo- oder heterosexuelle Übertragung mit 80% der Fälle den Hauptübertragungsweg dar [25].

1.2.2 Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion

Nach der Übertragung durch einen der oben genannten Wege infiziert das HI-Virus solche Zellen, die das CD4 Oberflächenmolekül exprimieren, u.a. dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen, insbesondere jedoch die CD4+ T-Lymphozyten (T-Helferzellen) [26, 27]. Das HI-Virus infiziert und zerstört dadurch jene Zellen, die für das menschliche Immunsystem essenziell sind.

Diese Phase der Primärinfektion verursacht in 40-90 % der Fälle eine vorübergehende grippeähnliche Symptomatik [28]. Während der akuten HIV-Infektion erfolgt eine starke Virusvermehrung, die zum Zelltod der infizierten Zellen und zu einer stetigen Neuinfektion von noch nicht infizierten Zellen führt. Dadurch sinkt die Zahl der CD4+ T-Zellen ab und gleichzeitig steigt die Viruslast im peripheren Blut an [29] (Abb. 2). Die akute Infektion dauert jedoch nur einige Wochen. Es schließt sich ein asymptomatisches Stadium an, das Jahre dauern kann, und in dem die Betroffenen scheinbar gesund sind. In diesem asymptomatischen Stadium sinkt die Viruslast durch die körpereigene Immunantwort auf ein individuell unterschiedliches Niveau (=Set-point-Viruslast) ab und die Zahl der CD4+ T-Zellen erholt sich [30, 31]. Ein Gleichgewicht stellt sich ein zwischen dem Untergang von Viren und der Produktion neuer Viren. Die Dauer dieser Latenzphase ist variabel und hält so lange an, bis das Immunsystem schließlich nicht mehr in der Lage ist, die Infektion in Schach zu halten. Die Zahl der CD4+ T-Zellen nimmt kontinuierlich ab [32] und es treten opportunistische Infektionen auf, die letztlich zum Tod der infizierten Personen führen. Verhindert werden kann dies nur durch eine medikamentöse antiretrovirale Therapie, mit der es allerdings nicht möglich ist, das HI-Virus komplett aus dem Körper zu eradizieren [33-37]. Damit ist eine Heilung der HIV-Infektion bis heute nicht möglich.

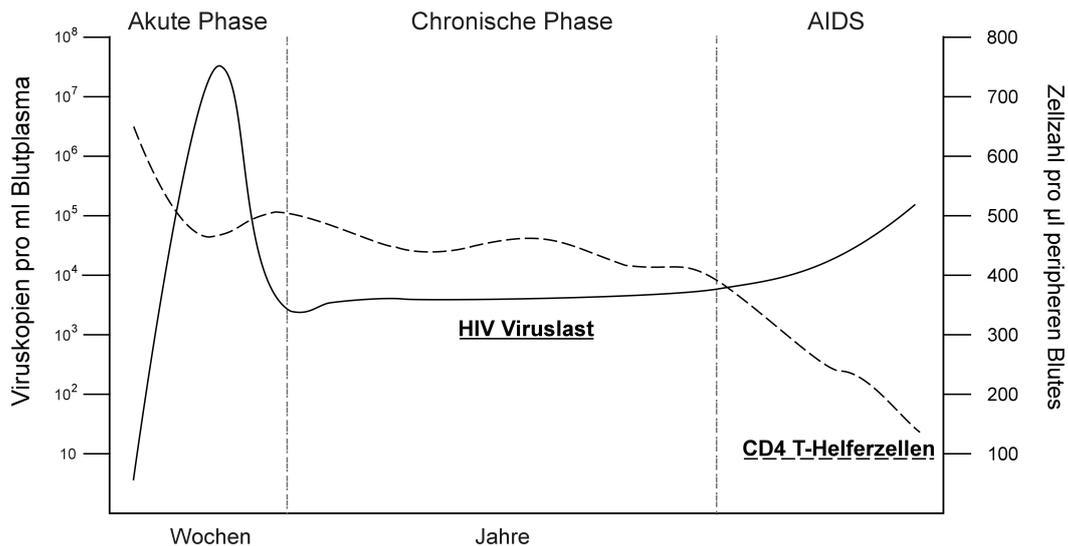


Abbildung 2: Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion. Auf der linken x-Achse ist die Höhe der Viruslast dargestellt, auf der rechten x-Achse die Höhe der CD4-Zellzahl, die y-Achse symbolisiert den Zeitverlauf. In der akuten Phase der HIV-Infektion steigt die Viruslast im Blut massiv an und gleichzeitig sinkt die CD4-Zellzahl ab. Am Ende der akuten Phase sinkt die Viruslast durch die körpereigene Immunabwehr wieder ab und die CD4-Zellzahl erholt sich. Es folgt eine asymptomatische, chronische Phase mit variabler Dauer, in der sich ein Gleichgewicht zwischen dem Untergang von Viren und der Produktion neuer Viren einstellt. Diese Latenzphase hält so lange an, bis das Immunsystem nicht mehr in der Lage ist, die Infektion in Schach zu halten. Die Zahl der CD4-Zellen nimmt kontinuierlich ab, es treten opportunistische Infektionen auf und das Stadium AIDS ist erreicht.

1.3 HIV und das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist wie die antiretrovirale Therapie nicht in der Lage, die HI-Viren komplett zu eliminieren und ein Fortschreiten der Erkrankung bis ins Stadium AIDS zu verhindern. Allerdings schafft es die körpereigene Immunabwehr, die Infektion zumindest zeitweise einzudämmen, und spielt damit eine zentrale Rolle in der Bekämpfung der HIV-Infektion. Ganz allgemein lässt sich das menschliche Immunsystem in die angeborene unspezifische und die erworbene spezifische Immunabwehr unterteilen. Beide Komponenten sind an der Abwehr des HI-Virus beteiligt, eine besondere Stellung nehmen jedoch die CD8⁺ T-Zellen und die infizierten CD4⁺ T-Helferzellen ein, die zur erworbenen Immunabwehr gezählt werden.

1.3.1 Die CD8⁺ T-Zellen

Die Hauptaufgabe von CD8⁺ T-Zellen ist die Zerstörung virusinfizierter oder maligner Zellen. Die CD8⁺ T-Zellen werden durch Zellen des angeborenen Immunsystems

aktiviert und können virusinfizierte oder maligne Zellen dann einerseits direkt, andererseits über lösliche Faktoren abtöten [38-41].

Bereits früh in der Geschichte der HIV-Forschung erkannte man die Schlüsselstellung der CD8⁺ T-Zellen in der Elimination HIV-infizierter Zellen [31, 42-44]. Diese zentrale Rolle ergab sich aus mehreren Beobachtungen: Im Jahr 1986 fanden Walker et al. heraus, dass die CD8⁺ T-Zellen die HIV-Replikation zumindest in vitro effektiv hemmen können [38]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Proliferation HIV-infizierter CD8⁺ T-Zellen und dem Absinken der Viruslast in der akuten Phase der HIV-Infektion besteht [31, 44]. In der akuten und chronischen Phase der HIV-Infektion können die virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen außerdem einen starken immunologischen Druck auf die Viren ausüben, der die Viren zu Fluchtmutationen zwingt [45-49]. Durch die Mutationen versuchen die HIV-Viren, der Identifizierung und Eliminierung durch die CD8⁺ T-Zellen zu entkommen. Die zentrale Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Kontrolle der Viruslast konnte auch in einigen Studien gezeigt werden, in denen eine Depletion der CD8⁺ T-Zellen in SIV-infizierten Rhesusaffen zu einem Anstieg der Viruslast und zu einem raschen Krankheitsfortschritt führte [50-52]. Wurden die CD8⁺ T-Zellen wieder hergestellt, so sank die Viruslast wieder ab [51]. Und schließlich wurde bei einem Teil jener Patienten, die die HIV-Infektion über einen längeren Zeitraum kontrollieren können, eine starke virus-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort für die gute Kontrolle der Infektion verantwortlich gemacht [53-55]. Die CD8⁺ Immunantwort nimmt also eine ganz entscheidende Rolle in der Abwehr der HIV-Infektion ein.

Dabei ist die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen zwar einerseits essenziell für die Elimination virusinfizierter Zellen und das Absinken der Viruslast. Andererseits resultiert die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen langfristig nicht in einer Kontrolle der HIV-Infektion durch das Immunsystem.

1.3.2 Die Effektorfunktionen der CD8⁺ T-Zellen

Ein Grund für das Versagen des Immunsystems in der Kontrolle der Infektion ist der Verlust mehrerer wichtiger Effektorfunktionen der CD8⁺ T-Zellen [56]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass weder die Anzahl noch die Stärke der CD8⁺ Immunantwort mit der Krankheitsprogression korreliert [57-61], sondern, dass vielmehr die Qualität der CD8⁺ Immunantwort entscheidend ist für die Kontrolle der Infektion [62]. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Zytotoxizität der CD8-Zellen [63]. Werden

die CD8⁺ T-Zellen durch andere Immunzellen aktiviert, so sezernieren sie zytotoxische Granula, die virusinfizierte Zellen in den Zelltod treiben können. Die Membran dieser zytotoxischen Granula enthält mehrere Glykoproteine, unter anderem das Glykoprotein CD107a. Durch die Sekretion der Granula fusioniert die Membran der CD8⁺ T-Zelle mit der Membran der zytotoxischen Granula, der Inhalt der Granula wird freigesetzt und das Protein CD107a wird durch die Fusion der beiden Membranen auf der Oberfläche der CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Die Expression von CD107a auf der Oberfläche CD8⁺ T-Zellen ist also ein Resultat der Degranulation der zytotoxischen Granula und kann als Marker für die zytolytische Funktion durchflusszytometrisch gemessen werden [64, 65]. Des Weiteren können aktivierte CD8⁺ Zellen proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), sowie das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) sezernieren. IFN- γ wird von vielen Zellen des Immunsystems gebildet und kann einerseits direkt die Virusreplikation infizierter Zellen hemmen, andererseits die Effektorfunktionen zahlreicher Immunzellen steigern und die Erkennung und Elimination virusinfizierter Zellen verbessern [66]. TNF- α ist an der Induktion der Apoptose virusinfizierter Zellen beteiligt und IL-2 ist ein autokrin wirkendes Zytokin, das als Wachstumsfaktor die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen unterstützt [67]. Es konnte gezeigt werden, dass nicht die einzelnen Funktionen, sondern gerade die Kombination mehrerer solcher Funktionen die CD8-Antworten effektiv machen. So wiesen jene Patienten, die in der Lage waren, die Infektion über längere Zeit zu kontrollieren, weit mehr Funktionen auf als solche Patienten, die rasch mit der Infektion fortschritten [62, 68].

Im Verlauf der Erkrankung führt die chronische Aktivierung des Immunsystems zu einem Verlust der Effektorfunktionen der CD8⁺ T-Zellen. Verlieren die CD8⁺ T-Zellen ihre Effektorfunktionen, so wird die Immunantwort jedoch ineffektiv. Dieser Verlust von Effektorfunktionen ist letztlich ein Zeichen für die Erschöpfung des Immunsystems und mit der Progression der HIV-Infektion assoziiert.

1.3.3 Die CD4⁺ T-Helferzellen

Neben den CD8⁺ T-Zellen spielen die CD4⁺ T-Helferzellen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr. Im Allgemeinen ist die Hauptaufgabe der CD4⁺ T-Zellen die Unterstützung des Immunsystems in der Bekämpfung von Pathogenen, im Speziellen sind sie wichtig bei der Abwehr der HIV-Infektion [69, 70]. So können die CD4⁺

Zellen einerseits CD8⁺ T-Zellen in die HIV-infizierte Schleimhaut locken und unterstützen dadurch eine frühzeitige Elimination der Viren [71]. Andererseits nehmen sie eine wichtige Rolle in der Generierung und Aufrechterhaltung von effektiven CD8⁺ T-Zellantworten und auch der B-Zellantworten ein [72, 73]. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass CD4-depletierte Mäuse nicht in der Lage sind, eine effektive antivirale CD8⁺ T-Zellantwort aufrecht zu erhalten [74, 75]. Werden die CD4-Zellen also durch das HI-Virus infiziert und sterben ab, so geht ein zentraler Bestandteil der Immunabwehr verloren.

Die Infektion der CD4⁺ Zellen wird durch den Kontakt der CD4-Zellen mit infizierten Zellen des angeborenen Immunsystems ermöglicht: gelangt das Virus in den Körper, so wird es zunächst im Bereich der Schleimhäute von dendritischen Zellen aufgenommen, zu den Lymphknoten transportiert und kann dort die CD4⁺ T-Helferzellen infizieren und zerstören [76, 77]. Besonders dramatisch zeigt sich der Untergang der CD4⁺ T-Zellen im Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe des Darms: hier befindet sich ein Großteil des CD4-Zellpools mit einem hohen Anteil an CD4⁺ Gedächtniszellen, der durch die HIV-Infektion schon im frühen Stadium massiv depletiert wird [78, 79]. Durch den Untergang der CD4-Zellen kommt es zu einem permanenten Übertritt von mikrobiellen Produkten aus dem Darm in das Blutsystem und dadurch zu einer chronischen systemischen Immunaktivierung [80, 81]. Ruhende, latent infizierte CD4-Zellen werden aktiviert und mit ihnen das ruhende Virusreservoir, wodurch wieder neue CD4-Zellen infiziert werden und verloren gehen. Letztlich kommt es also durch die chronische Aktivierung des Immunsystems zu einer ständigen Virusvermehrung und zu einem über Jahre hinweg kontinuierlichen Abfall der CD4-Helferzellen, der letztlich auch durch die körpereigene Immunabwehr nicht erfolgreich verhindert werden kann.

1.3.4 Die CD38-Expression als Zeichen der Immunaktivierung

Die chronische systemische Immunaktivierung ist eines der Hauptcharakteristika der HIV-Infektion. Einerseits ist die Immunaktivierung essenziell für die Bekämpfung des HI-Virus, andererseits treibt sie die virale Replikation voran, indem sie mit den aktivierten T-Zellen immer neue Ziele für das Virus schafft [82]. Eines der Zeichen dieser Immunaktivierung ist die vermehrte Expression des Glykoproteins CD38 auf der Oberfläche zahlreicher Immunzellen, unter anderem auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [83]. CD38 ist an der Regulation des intrazellulären Kalziumspiegels beteiligt und dadurch in der Lage, Zellen zu aktivieren [84]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt

werden, dass die Höhe der CD38-Expression mit einem Fortschreiten der HIV-Infektion korreliert [85-90]. Je höher die CD38-Expression, desto stärker die Immunaktivierung und desto schlechter die Prognose. Dabei ist CD38 als prognostischer Marker sogar noch besser geeignet als die Höhe der Viruslast oder CD4-Zellzahl [91]. Eine starke CD38-Expression ist also Ausdruck einer starken chronischen Immunaktivierung und mit der Unfähigkeit des Immunsystems assoziiert, die Infektion unter Kontrolle zu bringen [92].

1.3.5 Inhibitorische Signalwege der Immunerschöpfung

Eine Aktivierung des Immunsystems ermöglicht einerseits starke Immunantworten gegen Pathogene, andererseits macht sie Signalwege erforderlich, die überschießende und für den Körper schädliche Immunantworten begrenzen [93, 94]. Solche inhibitorischen Signalwege, die eine autoimmune Schädigung verhindern, hemmen die Immunzellen und verhindern dadurch andererseits auch effektive und zum Teil essenzielle Immunantworten [95].

Vor einigen Jahren konnten solche inhibitorischen Signalwege auch für die HIV-Infektion gezeigt werden. Mit dem Fortschreiten der Infektion werden zahlreiche inhibitorische Marker auf der Oberfläche der T-Zellen hochreguliert. Außerdem besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression dieser inhibitorischen Marker und dem Verlust von Effektorfunktionen. Zu diesen Markern zählen unter anderem LAG-3, Tim-3, CTLA-4, 2B4 und CD160 [96, 97]. Die größte Rolle spielt allerdings das Molekül Programmed Death-1 (PD-1 oder CD279) [98-100]. PD-1 wird von aktivierten CD4+ und CD8+ Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert und vermittelt ein Signal, das den Glukosestoffwechsel und damit die Energieversorgung der Zellen hemmt. Dadurch werden wichtige Funktionen der Zellen inhibiert und letztlich der Zelltod induziert [101]. Aus diesem Grund nimmt PD-1 eine ganz entscheidende Rolle in der Regulation der T-Zell-Antworten ein. In der akuten Infektion verhindert PD-1 eine überschießende Immunantwort und sorgt dafür, dass nach Eliminierung der Pathogene die Immunantwort herunter reguliert wird [102]. Werden die Pathogene jedoch nicht vollständig eliminiert, so geht die akute Infektion in eine chronische Phase über und PD-1 persistiert auf der Oberfläche der CD8+ T-Zellen. Dies führt langfristig zu einer Erschöpfung der Immunantwort [103]. Eine hohe PD-1-Expression in der chronischen Phase der Infektion trägt also entscheidend dazu bei, dass die Infektion nicht unter Kontrolle gehalten werden kann. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass sich

die T-Zell-Funktionen wieder verbessern, wenn PD-1 durch Antikörper blockiert wird [98-100, 104]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Doppelexpression von CD38 und PD-1, also die Kombination der Marker von Immunaktivierung und Immunerschöpfung, bei jenen Patienten, die rasch mit der Infektion fortschreiten, signifikant erhöht ist im Vergleich zu jenen Patienten, die in der Lage sind, die Infektion über einen längeren Zeitraum zu kontrollieren [105]. Letztlich ist also eine erhöhte PD-1-Expression als Zeichen der Immunerschöpfung der CD8⁺ und CD4⁺ Zellen ebenso wie eine erhöhte CD38-Expression als Zeichen einer starken Immunaktivierung mit einem Fortschreiten der HIV-Infektion assoziiert.

1.3.6 Das Oberflächenmolekül CD44

Das Glykoprotein CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, das auf zahlreichen Zellen exprimiert wird, unter anderem auf der Oberfläche CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [106]. Durch Bindung an das extrazelluläre Glykosaminoglykan Hyaluronsäure vermittelt CD44 den Kontakt zwischen verschiedenen Zellen untereinander, sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix und spielt damit eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur [107, 108]. Außerdem kann CD44 nach Bindung an einen Liganden den intrazellulären Kalziumspiegel erhöhen und dadurch Zellen aktivieren [109]. Werden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert, so wird CD44 auf ihrer Oberfläche hochreguliert und ihr Status ändert sich von „naive“ T-Zellen in Effektor- und Gedächtniszellen, die Pathogene eliminieren können [110]. Die Hochregulation von CD44 ist dabei essenziell in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von diesen Effektor- und Gedächtniszellen [111] und spielt eine Rolle in der Induktion von Effektorfunktionen [112, 113]. Das Oberflächenmolekül CD44 ist also ein Aktivierungsmarker, mit dem es möglich ist, aktivierte Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen von naiven T-Zellen zu unterscheiden [114].

1.4 Natural hosts

Das Simian Immunodeficiency Virus (SIV) gilt als Ursprung für das Humane Immunschwäche Virus HIV (vgl. 1.1.1 und 1.1.2). Wie das HI-Virus beim Menschen verursacht SIV bei bestimmten Affenarten das Immunschwächesyndrom AIDS. Gleichzeitig gibt es Arten wie die Rußmangaben (*Cercocebus atys*) oder die westlichen

Grünmeerkatzen (*Chlorocebus sabaeus*), die trotz jahrzehntelanger SIV-Infektion kein AIDS entwickeln [115]. Im Laufe der Evolution haben es diese Arten gelernt, gemeinsam mit dem Virus zu leben und zu überleben. Man nennt sie deshalb auch natürliche Wirte der SIV-Infektion, sogenannte „Natural hosts“.

Natural hosts sind durch hohe Viruslasten [116, 117] bei gleichzeitig hohen CD4-Helferzellzahlen gekennzeichnet. Anders als HIV-infizierte Menschen bzw. SIV-infizierte Affen, wie zum Beispiel SIV-infizierte Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), sinken Natural hosts also nicht kontinuierlich mit der CD4-Helferzellzahl ab und entwickeln damit kein Immunschwächesyndrom. Dabei ist das Virus, mit dem sie infiziert sind, klar pathogen [118, 119]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die spezifische Immunantwort der Natural hosts nicht besser ist als die der HIV-infizierten Menschen [120]. Eine Erklärung für die Kontrolle der SIV-Infektion durch die Natural hosts können also weder eine geringere Viruslast noch eine bessere Immunantwort oder nicht-pathogene Viren sein. Es existiert allerdings ein fundamentaler Unterschied zwischen fortschreitender und kontrollierter SIV-Infektion: bei Natural hosts fehlt die Immunaktivierung während der chronischen Phase der Infektion, die bei SIV-infizierten Rhesusaffen und HIV-infizierten Menschen entscheidend ist für eine permanente Virusvermehrung und das Fortschreiten der Infektion ins Stadium AIDS (vgl. 1.3.4) [121, 122]. Andererseits zeigen Natural hosts in der akuten Phase der Infektion sehr wohl eine starke Immunaktivierung [123, 124], sind aber im Gegensatz zu den SIV-infizierten Rhesusaffen und HIV-infizierten Menschen in der Lage, diese starke Immunaktivierung am Ende der akuten Phase herunter zu regulieren [125]. Ein Grund für die fehlende chronische Immunaktivierung könnte der im Vergleich zu HIV-infizierten Patienten nur sehr geringe Übertritt mikrobieller Produkte aus dem Darm in das Blutsystem sein [80]. Die genauen Mechanismen für die fehlende chronische Immunaktivierung sind allerdings bis heute nicht vollständig verstanden.

Auch beim Menschen sind Patienten bekannt, die in der Lage sind, ohne Therapie die HIV-Infektion über eine lange Zeit zu kontrollieren [126]. Diese sogenannten „Longterm-Nonprogressor (LTNP)“ machen nur ca. 1% aller HIV-Infizierten aus und es besteht ein entscheidender Unterschied zwischen ihnen und den Natural hosts: LTNP zeichnen sich durch eine niedrige Viruslast bei normaler CD4-Zellzahl aus [127]. Für die gute Kontrolle der Infektion werden unter anderem genetische Faktoren verantwortlich gemacht, wie zum Beispiel die Expression bestimmter MHC-Klasse-I-Moleküle wie HLA-B*57 und HLA-B*27 oder die homozygote Deletion von CCR5,

einem Ko-Rezeptor, der für den Eintritt des HI-Virus in die CD4+ T-Zelle benötigt wird [128]. Ein Teil der LTNP ist vermutlich auch in der Lage, die Virusreplikation effektiv zu hemmen [129]. Letztlich ist jedoch die Gesamtheit der verantwortlichen Mechanismen vielfältig und noch nicht vollständig bekannt. Die Existenz der LTNP lehrt uns allerdings, dass eine langfristige Kontrolle der HIV-Infektion möglich ist. Nur unzureichend bekannt ist aber bis heute, ob es auch Menschen gibt, die in der Lage sind, trotz hoher Viruslasten die HIV-Infektion über einen längeren Zeitraum zu kontrollieren, ob es also natürliche Wirte der HIV-Infektion gibt. Bisher gibt es hierzu nur sehr wenige Daten.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mit über 34 Millionen HIV-Infizierten weltweit und einer Neuinfektionsrate von 2,5 Millionen Menschen pro Jahr sind wir heute noch weit davon entfernt, die HIV-Pandemie unter Kontrolle zu bekommen [7]. Im Jahr 1984, ein Jahr nach der Entdeckung des HI-Virus durch Robert Gallo, Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier, verkündete die US-amerikanische Gesundheitsministerin Margaret Heckler auf einer Pressekonferenz, dass binnen zwei Jahren ein Impfstoff gegen das HI-Virus zur Verfügung stehen werde [130]. 30 Jahre und zahlreiche Rückschläge später ist eine solche Entwicklung nicht gelungen [131-133] und bis zum breiten Einsatz eines HIV-Impfstoffes ist es noch ein langer Weg. Allerdings gibt es auch Hoffnung: einige Affenarten sind in der Lage, die SIV-Infektion über eine sehr lange Zeit unbeschadet zu kontrollieren. Von diesen Natural hosts der SIV-Infektion haben wir bereits viel gelernt. Weitgehend unklar ist jedoch, ob sich diese Mechanismen, die hinter der Kontrolle der Infektion stecken, auch beim Menschen finden lassen, ob es also sogenannte „Natürliche Wirte der HIV-Infektion“ gibt. Da diese Erkenntnisse von zentraler Bedeutung für die Kontrolle der HIV-Infektion sein können, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit genau diesen Fragen.

Dafür wurden in unserer Infektionsambulanz Patienten rekrutiert, die in der Lage waren, trotz hoher Viruslasten die HIV-Infektion über viele Jahre zu kontrollieren, also überdurchschnittlich wenige CD4-Helferzellen verloren. Als Kontrollgruppe wurden Patienten rekrutiert, die im Verlauf durchschnittlich an CD4-Helferzellen verloren, mit der HIV-Infektion also fortschritten. Beide Gruppen wurden vor dem Beginn einer

antiretroviralen Therapie untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die immunologischen Charakteristika der einzelnen Gruppen zu beschreiben und Unterschiede herauszuarbeiten. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten Einblicke in die Pathogenese der HIV-Infektion geben und langfristig neue Ansätze für therapeutische Interventionen schaffen. Deshalb wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Besteht ein Unterschied in der Immunaktivierung zwischen den einzelnen Patientengruppen, gemessen anhand der CD38-Expression der CD8+ Zellen?
- 2) Besteht ein Unterschied in der Immunerschöpfung zwischen den einzelnen Patientengruppen, gemessen anhand der PD-1-Expression der CD4+ und der CD8+ Zellen?
- 3) Unterscheiden sich die einzelnen Patientengruppen in der CD44-Expression ihrer CD4+ und der CD8+ Zellen?
- 4) Unterscheiden sich die einzelnen Patientengruppen bezüglich der Anzahl und Stärke ihrer Immunantworten auf Viruspeptide?
- 5) Besteht ein Unterschied in der Qualität der Immunantwort zwischen den einzelnen Patientengruppen, gemessen anhand der Polyfunktionalität der CD8+ Zellen?

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Combitips plus	Eppendorf AG; Hamburg
Durchflusszytometer, FACSCanto II	Becton Dickinson; Heidelberg
EDTA Monovette, KE/ 9ml	Sarstedt; Nümbrecht
Elispot-Reader, ELR04	AID; Strassberg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson; Heidelberg
Freezing Container Mr. Frosty	Nalgene; Wiesbaden
Heizwasserbad, Modell 1083	GFL; Burgwedel
Inkubationsschrank, HeraCell®	Heraeus; Hanau
Multiscreen IP – 96 Well Elispotplatte	Millipore; Schwalbach
Nunc Kryo-Röhrchen 1,8 ml	Thermo Scientific; Langenselbold
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG; Hamburg
Sterilwerkbank,	NuAire Biological Safety Cabinets;
Model Labgard 437 Class II, Type A2	Plymouth; USA
Serologische Einmalpipette	TTP; Ibbenbüren
Sterilwerkbank, Safe 2010 Model 1.2	Heto-Holten; Allerød; Dänemark
Vortexgerät, Vortex-Genie® 2	IKA® Werke; Staufen
Zellkulturflasche, Filter	TPP; Ibbenbüren
Zellkulturplatte, 6- und 24-Loch	PAA; Cölbe
Zellzählsystem, CASY®1 Model TT	Schärfe System; Reutlingen
Zentrifuge, Centrifuge 5810R	Eppendorf AG; Hamburg
Zentrifuge, Sorvall Super T21	Thermo Scientific; Schwerte
Zentrifugenröhrchen	TPP; Ibbenbüren

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

AP Conjugate Substrate Kit (AP Color Reagent A and B; Tris HCl Buffer)	BioRad; München
---	-----------------

Biocoll (Ficoll®)	Biochrom; Berlin
Brefeldin A	Sigma Aldrich; Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA; Darmstadt
Dulbecco's PBS (1x)	PAA; Cölbe
FCS (fetal calf serum) Gold	PAA; Cölbe
Fixation Medium – Medium A	Invitrogen; Karlsruhe
Hank's BSS (1x)	PAA; Cölbe
HEPES Buffer Solution (1M)	PAA; Cölbe
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA; Cölbe
Monensin (BD Golgi Stop™)	Becton Dickinson; Heidelberg
PHA (Phytohaemagglutinin)	Sigma Aldrich; Taufkirchen
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA; Cölbe
Permeabilization Medium – Medium B	Invitrogen; Karlsruhe
RPMI1640, ohne L-Glutamin	PAA; Cölbe
Streptavidin-ALP	Mabtech; Hamburg
Tween-Lösung	Sigma Aldrich; Taufkirchen

2.1.3 Medien

R10:

RPMI1640 Grundmedium (ohne Glutamin) supplementiert mit 5 ml L-Glutamin [200 mM], 5 ml Penicillin [10.000 U/ml] / Streptomycin [10 mg/ml], 5 ml HEPES Puffer [1 M] und 50 ml FCS (hitzeinaktiviert, 1 h, 56°C).

Hanks:

Hank's Grundmedium (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)) (ohne Glutamin) supplementiert mit 5 ml L-Glutamin [200 mM], 5 ml Penicillin [10.000 U/ml] / Streptomycin [10 mg/ml] und 5 ml HEPES Puffer [1 M].

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Antikörper-Kombination A

Antigen	Markierung	Spezies	Bezugsquelle	je 10 ⁶ Zellen
CD8	Pacific blue	Mouse	BioLegend; San Diego (USA)	5 µl
CD44	PerCP-Cy5.5	Rat	BioLegend; San Diego (USA)	2 µl
CD107a	FITC	Mouse	Becton Dickinson; Heidelberg	15 µl
IFN-γ	APC	Mouse	BioLegend; San Diego (USA)	5 µl
IL-2	PE	Mouse	Becton Dickinson; Heidelberg	15 µl
TNF-α	PE/Cy7	Mouse	Becton Dickinson; Heidelberg	5 µl

2.1.4.2 Antikörper-Kombination B

Antigen	Markierung	Spezies	Bezugsquelle	je 10 ⁶ Zellen
CD4	PE/Cy7	Mouse	BioLegend; San Diego (USA)	10 µl
CD8	Pacific blue	Mouse	BioLegend; San Diego (USA)	5 µl
CD38	PE	Mouse	Becton Dickinson; Heidelberg	15 µl
CD44	PerCP-Cy5.5	Rat	BioLegend; San Diego (USA)	2 µl
CD279 (PD-1)	FITC	Mouse	BioLegend; San Diego (USA)	15 µl
IFN-γ	APC	Mouse	BioLegend; San Diego (USA)	5 µl

2.1.4.3 Elispot-Antikörper

hIFN-γ, mAb1-D1K Mabtech; Hamburg

hIFN-γ, mAb7-B6-1-Biotin Mabtech; Hamburg

2.1.5 Peptide

Alle Peptide wurden vom National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC; Potters Bar; England) bezogen.

2.1.5.1 Gag:

Peptid	Sequenz
1	MGARASVLSGGELDK
3	LRPGGKKKYKCLKHIV
5	LERFAVNPGLLETSE
7	LGQLQPSLQTGSEEL
9	TVATLYCVHQRIDVK
11	LEKIEEEQNKSKKKA
13	AAGTGNSSQVSQNY
15	VHQAISPRTLNAWVKVVEEK
17	AFSPEVIPMFSALSEGATPQ
19	DLNTMLNTVGGHQAAMQMLK
21	ETINEEAAEWDRVHPVHAGP
23	IAPGQMREPRGSDIAGTTST
25	LQEIQGWMTNPPVGEIY
27	KRWIILGLNKIVRMYSPSTI
29	LDIRQGPKEPFRDYVDRFYK
31	TLRAEQASQDVKNWMTETLL
33	VQNANPDCKTILKALGPAAT
35	LEEMMTACQGVGGPGHKARV
37	ANIMMQRGNFRNQRK
39	NCGKEGHIKNCRAP
41	WRCGREGHQMKDCTE
43	LGKIWPSYKGRPGNF
45	EPTAPPEESFRFGEE
47	QKQEPIDKELYPLTS

Peptid	Sequenz
2	GELDKWEKIRLRPGG
4	LKHIVWASRELERFA
6	LETSEGCRQILGQLQ
8	GSEELRSLYNTVATL
10	RIDVKDTKEALEKIE
12	SKKKAQAAAAAGTG
14	PIVQNLQGMVHQAIIISPRTL
16	NAWVKVVEEKAFSPEVIPMF
18	SALSEGATPQDLNMLNTVG
20	GHQAAMQMLKETINEEAAEW
22	DRVHPVHAGPIAPGQMREPR
24	GSDIAGTTSTLQEIQGWMTN
26	NPPVGEIYKRWIILGLNK
28	IVRMYSPSTILDIRQGPKEP
30	FRDYVDRFYKTLRAEQASQD
32	VKNWMTETLLVQNANPDCKT
34	ILKALGPAATLEEMMTACQG
36	AEAMSQVTNPANIMM
38	RNQRKTVKCFNCGKE
40	NCRAPRKKGCWRCGR
42	KDCTERQANFLGKIW
44	RPGNFLQSRPEPTAPPE
46	RFGEEKTPPQKQEPI
48	YPLTSLRSLFGNDPSSQ

Peptid	Position	Sequenz
SL9	Gag77-85	SLYNTVATL

2.1.5.2 Nef:

Peptid	Sequenz	Peptid	Sequenz
49	GGKWSKSSVVGWPTVRERMR	50	GGKWSKSSVVGWPTVRERMR
51	RAEPAADGVGAASRDLEKHG	52	AASRDLEKHGAITSSNTAAT
53	AITSSNTAATNAACAWLEAQ	54	NAACAWLEAQEEEEVGFVPT
55	EEEEVGFVPTPQVPLRPMTY	56	PQVPLRPMTYKAAVDLSHFL
57	KAAVDLSHFLKEKGGLEGLI	58	KEKGGLEGLIHSQRRQDILD
59	HSQRRQDILDLWIYHTQGYF	60	LWIYHTQGYFPDWQNYTPGP
61	PDWQNYTPGPGVRYPLTFGW	62	GVRYPPLTFGWICYKLVPEPD
63	CYKLVPEPDKVEEANKGEN	64	KVEEANKGENTSLLHPVSLH
65	TSLLHPVSLHGMDDPEREVL	66	GMDDPEREVLEWRFD SRLAF
67	EWRFD SRLAFHHVARELHPE	68	HHVARELHPEYFKNC

2.1.6 Software

FACS Diva Version 6.0

Becton Dickinson; Heidelberg

FlowJo Version 9.5.2

Tree Star Inc.; Ashland; USA

GraphPad Prism Version 6.0

GraphPad Software; La Jolla; USA

2.2 Methodik**2.2.1 Patienten**

Für die vorliegende Arbeit wurden HIV-1-positive, therapie-naive Patienten der Infektionsambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München rekrutiert. Alle Patienten wurden von einem Arzt mündlich und schriftlich über Inhalt, Vorhaben, Freiwilligkeit, Rücktrittsrecht und die mit der Studie verbundenen Risiken bei der Blutentnahme aufgeklärt. Die durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt und bei Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung wurde den Patienten Blut entnommen.

Insgesamt wurden 28 Patienten in die Studie eingeschlossen (Querschnittsstudie). Nach einem Abstand von zwei bis fünf Jahren wurde einem Teil der Patienten erneut Blut abgenommen, so dass für 16 Patienten jeweils zwei Zeitpunkte vorlagen (longitudinale Studie). Für die Querschnittsstudie wurden dabei jeweils die Daten des zweiten und damit aktuelleren Zeitpunktes verwendet. Wichtige Kriterien für den Einschluss in die Studie waren die Therapienaivität der Patienten, sowie eine Viruslast (VL) von mindestens 5.000 Kopien pro ml Blut zu jedem Zeitpunkt der Studie, um unsere Patienten klar von den LTNP abzugrenzen. LTNP sind durch Viruslasten unter 5.000 Kopien pro ml Blut gekennzeichnet, in letzter Zeit sogar unter 2.000 Kopien pro ml Blut [127]. Von jedem Patienten lagen uns Viruslasten und CD4-Helferzellzahlen über einen Zeitraum von mindestens vier Jahren vor (Median: 7 Jahre, range: 4-13 Jahre). Anhand dieser Daten teilten wir die Patienten in vier unterschiedliche Gruppen ein (Tab. 1):

Tabelle 1: Definitionen der Patientengruppen. VL= Viruslast. Die Patienten wurden anhand des Verlaufs ihrer Viruslasten und CD4-Zellzahlen in vier Gruppen eingeteilt. Aus diesen Definitionen ergab sich, dass Patienten der Gruppen 1a und 1b einen Anstieg der Viruslast über vier Jahre aufwiesen (Gruppe „VL-Anstieg“) und die Gruppen 2a und 2b mit ihrer Viruslast stabil blieben (Gruppe „VL konstant“). Zwei weitere Gruppen ergaben sich bei Betrachtung des Verlaufs der CD4-Zellzahl: Patienten der Gruppen 1a und 2a zeigten einen raschen Abfall der CD4-Zellzahl (Gruppe „CD4-Loser“), Patienten der Gruppen 1b und 2b keinen oder einen sehr geringen Abfall der CD4-Zellzahl über vier Jahre (Gruppe „CD4-Nonloser“).

	Gruppe	Definition	
VL-Anstieg	1a	Viruslast-Anstieg > 0,5log/ 4 Jahre CD4-Abfall > 60/ Jahr	} CD4-Loser } CD4-Nonloser
	1b	Viruslast-Anstieg > 0,5log/ 4 Jahre CD4-Abfall < 60/ Jahr	
VL konstant	2a	Viruslast-Abfall oder -Anstieg < 0,5log/ 4 Jahre CD4-Abfall > 60/ Jahr	
	2b	Viruslast-Abfall oder -Anstieg < 0,5log/ 4 Jahre CD4-Abfall < 60/ Jahr	

Die vier Gruppen unterschieden sich bezüglich ihres Verlaufs von Viruslast und CD4-Zellzahl über vier Jahre. Wir definierten einen Viruslastanstieg oder -abfall von < 0,5log in 4 Jahren als eine stabile (gleichbleibende) Viruslast. Dementsprechend werteten wir einen Viruslastanstieg > 0,5log in 4 Jahren als einen signifikanten Anstieg der Viruslast. Ein CD4-Abfall von < 60/ Jahr nahmen wir als besonders langsames Abfallen der CD4-Zellzahl an aus dem Grund, dass bereits in der Multicenter AIDS Cohort Study (MACS)-Kohorte ein CD4-Verlust von 60 Zellen pro Jahr als

Durchschnittswert evaluiert wurde [134]. Aus diesen Definitionen ergab sich, dass Patienten der Gruppe 1 (1a und 1b) einen kontinuierlichen Anstieg der Viruslast über vier Jahre aufwiesen (Gruppe „VL-Anstieg“), Patienten der Gruppe 2 (2a und 2b) jedoch eine stabile Viruslast (Gruppe „VL konstant“). Andererseits zeigten Patienten der Gruppen 1a und 2a einen durchschnittlich raschen Abfall der CD4-Zellzahl (= CD4-Loser), Patienten der Gruppen 1b und 2b keinen oder einen geringen Abfall bzw. sogar teilweise eine Zunahme der CD4-Zellzahl über vier Jahre (= CD4-Nonloser) (vgl. Tabelle 1, Klammern).

2.2.2 Versuchsablauf

In Abbildung 3 ist der zeitliche Ablauf der im Folgenden beschriebenen Versuche schematisch dargestellt.

Da alle Versuche mit zeitweise kryokonservierten Zellen erfolgten, wurde die Zellsuspension nach der Probenentnahme und der Isolierung der Lymphozyten zunächst eingefroren. Am Tag vor den Untersuchungen wurden die Zellen aufgetaut und am nächsten Tag die Elispot- und durchflusszytometrischen Untersuchungen durchgeführt. Sämtliche Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Materialien, Medien und Lösungen.

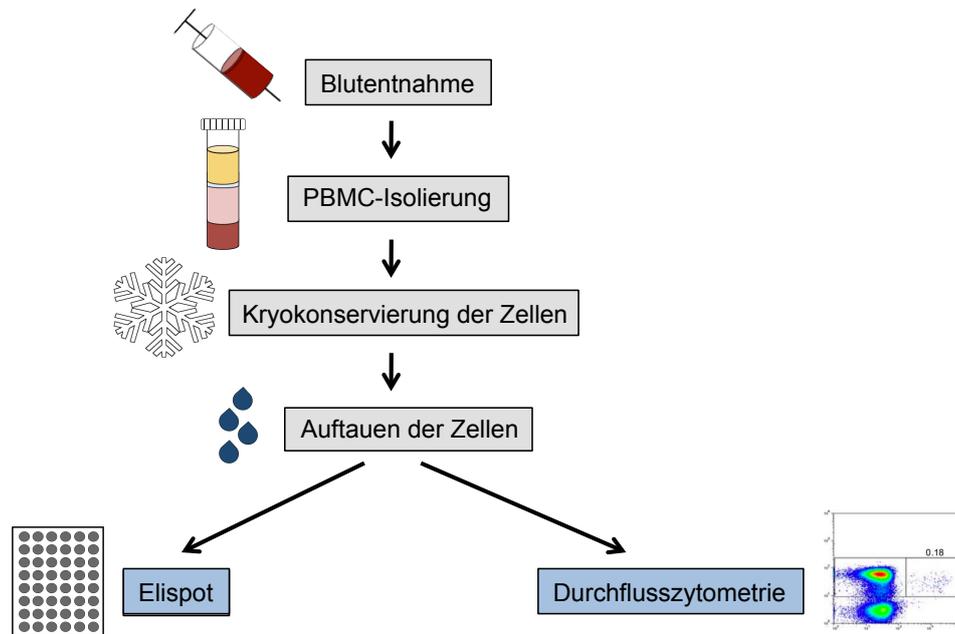


Abbildung 3: Schematisierte Darstellung des Versuchsablaufs. Nach der Blutentnahme wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zunächst isoliert und anschließend kryokonserviert. Einen Tag vor den Elispot- und den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die Zellen aufgetaut und die entsprechenden Untersuchungen einen Tag später durchgeführt.

2.2.3 Probenentnahme

Den Patienten wurden mittels Venenpunktion zwischen drei und sechs EDTA-Röhrchen (ca. 30 - 50 ml) Blut entnommen. Anschließend wurden mit Hilfe der Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR) die Viruslast, sowie mit Hilfe der Durchflusszytometrie (BD Tritest) die CD4+ T-Helferzellzahl des entsprechenden Patienten ermittelt. Im Anschluss wurde die uns interessierende Zellpopulation, die Lymphozytenpopulation, isoliert.

2.2.4 PBMC-Isolierung aus Vollblut

Lymphozyten zählen mit den Monozyten zu den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC- engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), die mit Hilfe der Dichtezentrifugation auf Ficoll isoliert wurden.

Ficoll ist ein neutrales hydrophiles Polysaccharid mit einer Dichte von 1,077 g/ml, das in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit dem antikoagulierten und unverdünnten Vollblut der EDTA-Röhrchen überschichtet wurde. Die einzelnen Zellpopulationen des

Blutes wurden durch Zentrifugation bei 1500 U/min (ca. 350 g) für 30 min. bei abgeschalteter Bremse durch Dichtegradienten aufgetrennt. Dabei verblieben die leichteren Thrombozyten in der obersten Plasma-Phase, während die Lymphozyten und Monozyten sich in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll sammelten. Die Erythrozyten und Granulozyten bildeten den Bodensatz (Abb. 4).

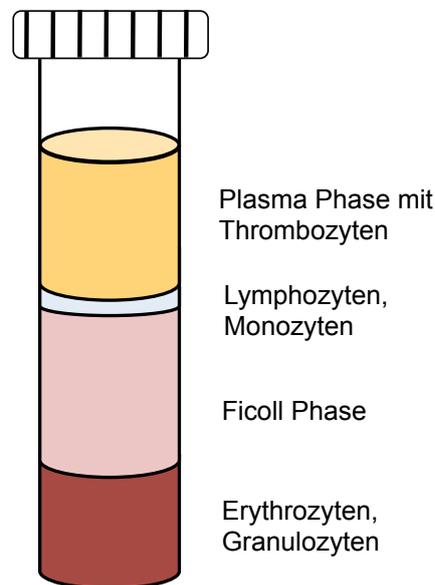


Abbildung 4: Zellisolierung durch Dichtezentrifugation auf Ficoll. Bei der Zentrifugation von Vollblut auf Ficoll wurden die verschiedenen Zellpopulationen durch Dichtegradienten aufgetrennt. Die Thrombozyten verblieben dabei in der obersten Plasma-Phase, die Lymphozyten und Monozyten sammelten sich in der Interphase und die Erythrozyten und Granulozyten bildeten den Bodensatz.

Die zu isolierenden Lymphozyten und Monozyten wurden anschließend mit einer Pipette abgenommen und in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Bei der Übertragung wurde stets auch ein Teil der oberen Plasma-Phase mit Thrombozyten, sowie Ficoll überführt. Deshalb wurde die Zellsuspension in drei Durchgängen gewaschen (10 min., RT, 1500 U/min). Die ersten zwei Waschvorgänge erfolgten mit Hank's Medium, der dritte mit R10 Medium. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und das Zellpellet bestehend aus mononukleären Zellen in 10 ml R10 resuspendiert.

2.2.5 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde mit dem automatischen Zählsystem Schärfe System GmbH Casy® 1 TT bestimmt. Für die Messung wurden von der Zellsuspension 50 µl entnommen und in 10 ml Casy®ton resuspendiert. Casy®ton ist eine isotone Salzlösung mit physiologischem pH-Wert. Durch die Isotonie stabilisiert die Lösung die Zellen, vermindert deren Aggregation und sorgt für die Erhaltung der ursprünglichen Zellgröße. Die Lösung mit den Zellen wurde mit einer Kapillare definierter Größe angesaugt und die einzelnen Zellen zwischen zwei Platinelektroden gezählt. Die Zelldichte wurde schließlich in Anzahl der Zellen pro 10 ml Lösung angegeben.

2.2.6 Kryokonservierung der Zellen

Für die Kryokonservierung wurde die Zellsuspension 10 min. bei 4°C mittels Zentrifugation bei 1500 U/min sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und die Zellen in 1 ml einer Einfrierlösung bestehend aus neun Teilen reinem FCS und einem Teil DMSO resuspendiert. Die restliche Einfrierlösung wurde zügig zugegeben und je 10-15 x 10⁶ Zellen pro ml Einfrierlösung auf gekühlte 1,8 ml Kryoröhrchen verteilt. In einem mit Isopropanol gefüllten Behälter wurden die Kryoröhrchen über Nacht auf -80°C gekühlt und am nächsten Tag zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

2.2.7 Auftauen der Zellen

Die in Stickstoff gefrorenen Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad rasch aufgetaut und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. 10 ml kaltes R10 wurde zugegeben und die Zellsuspension 10 min. bei 4°C und 1500 U/min zweimal gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und die Zellen in 5 ml R10 resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden für die automatische Bestimmung der Zelldichte entnommen, anschließend wurde mit R10 Medium aufgefüllt und ca. 1,5 x 10⁶ Zellen pro ml R10 in einer 25 cm³ Zellkulturflasche über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.8 Peptide

Grundlage aller verwendeten Peptide war die Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B von 2001 [135]. Verwendet wurden 15-20mer Peptide, die sich um bis zu 10 Aminosäuren überlappten und das gesamte Gag- und Nef- Produkt überspannten (Abb. 5 und 2.1.5). Die Peptide wiesen eine Reinheit von >70% auf.

Sequenz	<u>MGARASVLSGGELDKWEKIRLRPGGKKKYKCLKHIVWASRELERFA</u>
Peptid 1	MGARASVLSGGELDK
Peptid 2	GELDKWEKIRLRPGG
Peptid 3	LRPGGKKKYKCLKHIV
Peptid 4	LKHIVWASRELERFA

Abbildung 5: Beispiel für die überlappenden Peptide. Dargestellt sind die ersten vier Peptide des Gag-Produktes mit der Überlappung um bis zu 10 Aminosäuren.

2.2.8.1 Elispot

Für den Elispot wurden insgesamt 48 überlappende Peptide für das Gag-Produkt, sowie zusätzlich das Peptid SL9, und 20 überlappende Peptide für das Nef-Produkt verwendet (vgl. 2.1.5). Die Peptide wurden einzeln (1 Peptid pro Vertiefung der Elispot-Platte) verwendet. Somit konnten im Elispot die CD8⁺ T-Zellantworten auf einzelne Epitope und damit auch die Breite der HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort im Bereich von Gag und Nef bestimmt werden.

2.2.8.2 Durchflusszytometrie

In den durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgte die Stimulation der Zellen mit zwei verschiedenen Peptid-Pools, die beide eine Konzentration von 100 µg/ml aufwiesen. Dabei setzte sich der Gag-Pool aus den 48 überlappenden Gag-Peptiden und der Nef-Pool aus den 20 überlappenden Nef-Peptiden zusammen (vgl. 2.1.5). Im Gegensatz zum Elispot konnte deswegen hier nur die Stärke der CD8⁺ T-Zellantwort im Bereich von Gag und Nef ermittelt werden.

2.2.9 Interferon- γ Elispot

Der Interferon- γ Elispot (engl. *Enzyme-Linked-Immunospot-Assay*) stellt eine empfindliche Methode dar, um das Zytokin Interferon- γ nachzuweisen, das nach Stimulation von T-Zellen von diesen sezerniert wurde (Abb. 6).

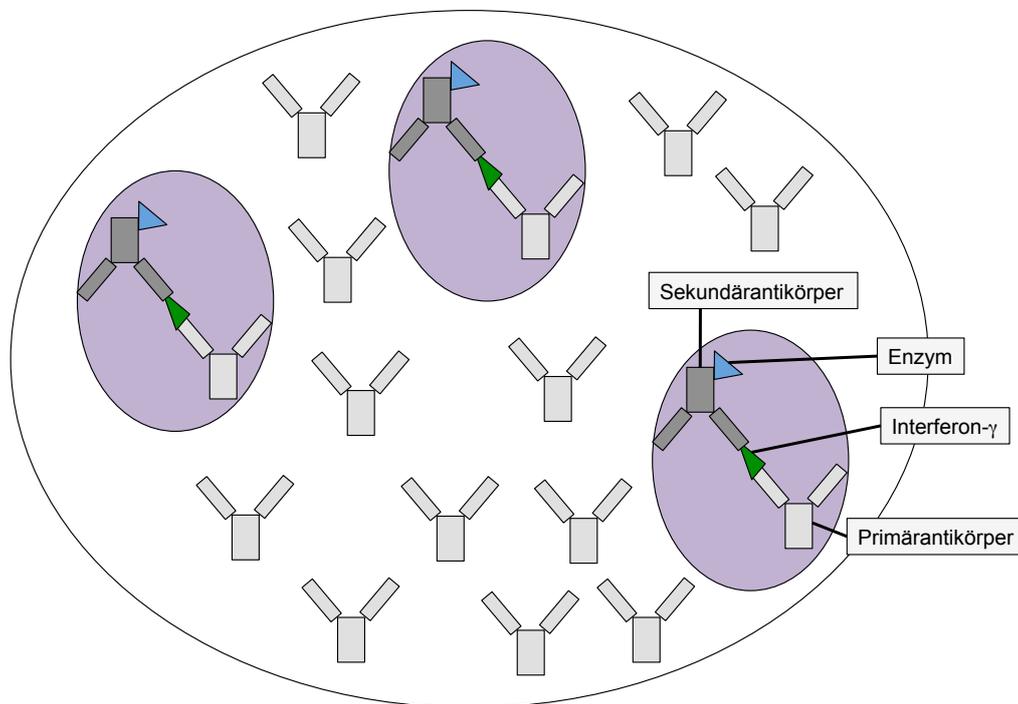


Abbildung 6: Schematisiertes Prinzip der Interferon- γ Elispot-Untersuchung. Eine Membran wurde mit einem Primärantikörper beschichtet, der gegen Interferon- γ gerichtet war. Anschließend wurde eine definierte Menge PBMC auf die Membran aufgebracht und mit Peptiden stimuliert, wodurch einige der Zellen Interferon- γ sezernierten. Als nächstes wurde ein Sekundärantikörper zugegeben, der ebenfalls gegen Interferon- γ gerichtet war. Durch eine enzymatische Reaktion wurden die Antikörper-Interferon- γ -Komplexe dann als lila Punkte sichtbar gemacht.

Zunächst wurden die 96 Wells der Elispot-Platte mit dem ersten Antikörper (mAb 1-DK1) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dafür wurden 5,5 μ l des ersten Antikörpers (1 mg/ml) in 11 ml sterilen PBS gelöst und je 100 μ l pro Well verteilt. Am folgenden Tag wurde die Platte sechsmal mit PBS und 1% FCS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und unspezifische Bindungen zu minimieren. Pro Well wurden 100.000 PBMC verteilt, sowie die entsprechenden überlappenden 48 Gag-Peptide, die 20 Nef-Peptide und das Peptid SL9, wobei in jedes Well jeweils ein Peptid mit einer Konzentration von 14 μ g/ml gegeben wurde. Die Negativkontrolle bestand aus Zellen ohne Peptid (insgesamt mindestens drei Wells), als Positivkontrollen wurden

Phytohaemagglutinin (PHA) und eine Mischung aus mehreren Epitopen des Influenza-, Epstein-Barr- und Cytomegalievirus (FEC) verwendet. Die Elispot-Platte wurde über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Platte wie oben beschrieben gewaschen und der zweite Antikörper (mAb 7B6-1-Biotin) wurde zugegeben. Dafür wurden wieder 5,5 µl des Antikörpers (1 mg/ml) in 11 ml sterilen PBS gelöst und je 100 µl pro Well verteilt. Die Platte wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert, erneut gewaschen, und anschließend wurde Streptavidin zugegeben. Nach erneuter Inkubation bei Raumtemperatur für 45 min. wurde die Platte gewaschen und je 100 µl einer Färbelösung aufgetragen, um die Antikörper-Interferon-γ-Komplexe als lila Punkte sichtbar zu machen. Die Färbelösung setzte sich zusammen aus 10 ml Tris-HCl-Puffer, 100 µl der Färbelösung A (AP Color Reagent A), sowie 100 µl der Färbelösung B (AP Color Reagent B). Die Platten wurden mit je 200 µl einer 0,05%-igen Tween-Lösung desinfiziert und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Elispot-Platten schließlich getrocknet, mit Hilfe des Elispot Lesegerätes (AID) ausgewertet und als „spot forming cells“ (SFC) je 10⁶ Zellen angegeben. Die Auswertung wurde wie folgt vorgenommen: eine Elispot-Platte wurde nur dann ausgewertet, wenn die Positivkontrollen auch tatsächlich positiv waren. Wenn die Negativkontrollen im Mittel unter fünf SFC/ 10⁶ Zellen aufwiesen, wurden die Spots in jedem Well einzeln gezählt und als SFC/ 10⁶ Zellen angegeben. Wiesen die Negativkontrollen im Mittel jedoch mehr als fünf SFC/ 10⁶ Zellen auf, so wurde ein Well nur dann als positiv gewertet, wenn die Anzahl der SFC/ 10⁶ Zellen diejenige der Negativkontrollen um mindestens das Dreifache übertraf. War dies der Fall, wurden auch hier die Spots einzeln gezählt und als SFC/ 10⁶ Zellen angegeben. Da sich die Peptide um bis zu zehn Aminosäuren überlappten (vgl. 2.2.8), bestand die Möglichkeit, dass sich eine Antwort auf ein und dieselbe Aminosäuresequenz im überlappenden Peptidbereich in zwei benachbarten Wells und damit doppelt zeigte. Da jedoch die Anzahl und Stärke der Immunantworten nicht überschätzt werden sollte, wurde bei Antworten auf benachbarte Peptide folgendermaßen vorgegangen [59]: für die Anzahl der Antworten wurde bei Antworten auf zwei benachbarte Peptide nur eine Antwort gezählt, bei Antworten auf mehrere benachbarte Peptide wurde jeweils die Anzahl der Antworten auf benachbarte Peptide addiert und eine Antwort subtrahiert. Für die Stärke der Antworten wurde bei Antworten auf zwei benachbarte Peptide nur die stärkere Antwort gewertet, bei Antworten auf mehrere benachbarte Peptide wurden alle

Antworten bis auf die schwächste Antwort in der Auswertung berücksichtigt. Schließlich wurden für die Ergebnisse der Median, sowie das Minimum und das Maximum der SFC/ 10^6 Zellen berechnet und als „range“ (Minimum – Maximum) angegeben.

2.2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern.

Die Stimulation der Zellen erfolgte in einer 24-Well-Platte. Pro Well wurden in 1 ml R10 Medium jeweils 1×10^6 Zellen suspendiert. Da für die spätere Färbung zwei unterschiedliche Kombinationen aus Antikörpern (Kombinationen A und B, vgl. 2.1.4.1 und 2.1.4.2) verwendet wurden, ergaben sich pro Patient insgesamt sechs Wells: jeweils ein Well für die Stimulation mit dem Gag-Pool, ein Well für die Stimulation mit dem Nef-Pool und je eine Negativkontrolle (NK) ohne Peptid. Unmittelbar nach der Verteilung der Zellen wurden je 20 μ l des entsprechenden Peptid-Pools zugegeben. In die Wells mit der Antikörperkombination A wurden zusätzlich jeweils 15 μ l des Antikörpers CD107a FITC verteilt. Die Platte wurde für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend wurden jeweils 10 μ l Brefeldin A (1 mg/ml) und je 0,7 μ l Monensin (BD Golgi StopTM) pro Well zugegeben, um eine Sekretion der produzierten Zytokine zu verhindern und dadurch deren intrazelluläre Akkumulation zu erreichen. Anschließend wurde die Platte für weitere fünf Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach der Stimulation wurden die Zellen in FACS-Tubes transferiert und einmal mit PBS und 1% FCS gewaschen (10 min., 4°C, 1500 rpm). Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörper-Kombinationen für die Oberflächenmoleküle gefärbt (vgl. 2.1.4.1 und 2.1.4.2). Dafür wurden die Antikörper in 50 μ l PBS gelöst und mit der Zellsuspension vermischt. Die optimale Menge von Antikörpern wurde in Vorversuchen durch eine Verdünnungsreihe ermittelt (vgl. 2.1.4.1 und 2.1.4.2). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden mit je 100 μ l Fixierlösung (Fix/ Perm Solution A) für 15 min. bei Raumtemperatur und Dunkelheit fixiert und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit je 100 μ l Permeabilisierungslösung (Fix/ Perm Solution B) für 15 min. bei

Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden Löcher in der Zellmembran erzeugt, die es den intrazellulären Antikörpern später ermöglichten, ins Zellinnere zu gelangen. Die Färbung der intrazellulären Zytokine erfolgte mit den entsprechenden Antikörper-Kombinationen (vgl. 2.1.4.1 und 2.1.4.2). Dafür wurden die Antikörper in 50 µl PBS gelöst und mit der Zellsuspension vermischt. Nach 30 min. Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in je 200 µl PBS resuspendiert und sofort gemessen.

2.2.10.1 FACS-Analyse und Auswertung

Die Messungen erfolgten am Durchflusszytometer FACSCantoII mit dem Programm FACS Diva Version 6.0. Für alle Proben wurden zwischen 100.000 und 500.000 Zellen gesammelt. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der FlowJo Software Version 9.5.2 analysiert und graphisch dargestellt. Die verschiedenen Zellpopulationen wurden zunächst anhand ihrer jeweiligen Größe und Granularität aufgetrennt (Abb. 7 A, D). In dieser Darstellung wurde auf die Lymphozyten gegatet. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (engl. *Forward Scatter*; Abk.: FSC) proportional zur Zelloberfläche und graphisch auf der x-Achse lokalisiert, das Seitwärtsstreulicht (engl. *Side Scatter*; Abk.: SSC) proportional zur Zellgranularität und auf der y-Achse zu finden. Anschließend wurde auf alle zu untersuchenden Zellpopulationen gegatet: zunächst auf die CD8⁺ bzw. CD4⁺ Zellpopulationen und anschließend auf alle weiteren zu untersuchenden Parameter (CD38, PD-1, CD44, IFN- γ , IL-2, CD107a, TNF- α). Beispielhaft ist das Vorgehen für die IFN- γ ⁺ CD8-Zellen dargestellt (Abb. 7 B, E und C, F).

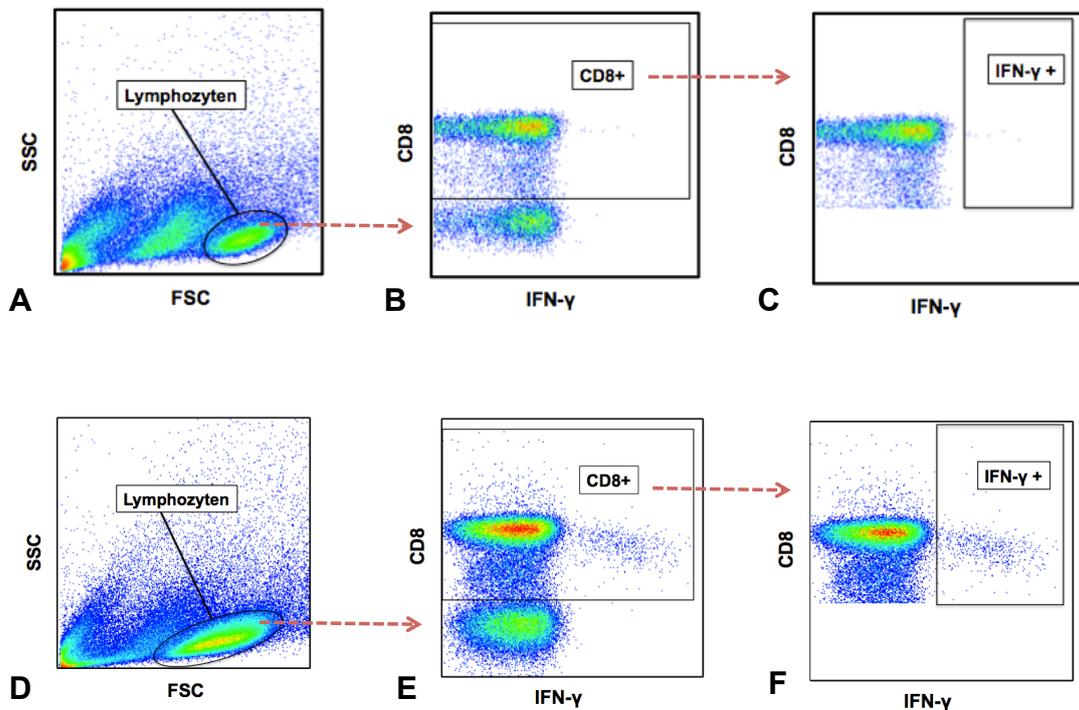


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der FACS-Auswertung. A-C: Negativkontrolle, D-F: Nef-stimulierte Zellen. In dieser Abbildung ist die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten anhand der IFN- γ + CD8-Zellen beispielhaft dargestellt. (A, D) Die verschiedenen Zellpopulationen wurden zunächst anhand ihrer jeweiligen Größe und Granularität aufgetrennt. Das Vorwärtsstreulicht (engl. *Forward Scatter*; Abk.: FSC) ist proportional zur Zelloberfläche und auf der x-Achse angeordnet, das Seitwärtsstreulicht (engl. *Side Scatter*; Abk.: SSC) ist proportional zur Zellgranularität und auf der y-Achse angeordnet. In dieser Darstellung wurde zunächst auf die Lymphozyten gated (B, E). Im nächsten Schritt wurden die CD8-Zellen auf der y-Achse gegen IFN- γ auf der x-Achse dargestellt. Jetzt wurde auf die CD8+ Zellen gated (C, F). In der letzten Darstellung finden sich nun nur noch die CD8+ Zellen, die CD8- (negativen) Zellen wurden entfernt. Hier wurde auf die IFN- γ + Zellen gated. Mit diesem letzten Schritt erhält man nun den Prozentsatz der IFN- γ + Zellen an allen CD8+ Zellen. Dieses Vorgehen wurde für alle anderen Parameter (CD38, PD-1, CD44, IL-2, CD107a, TNF- α , sowie entsprechend für die CD4+ Zellen) wiederholt.

Die Gesamtheit der CD8+ Zellen bezeichneten wir dabei als „bulk“ und die HIV-spezifischen CD8-Zellen definierten wir als IFN- γ + oder CD107a+ CD8+ T-Zellen. Nachdem alle Gates festgelegt waren, verwendeten wir für die Auswertung der Polyfunktionalität das Boolean-Gating der FlowJo-Software. Insgesamt ergaben sich dabei für die vier verschiedenen Funktionen 15 mögliche Kombinationen: vier Einzelfunktionen, sechs Doppelkombinationen, vier Dreifachkombinationen und eine Vierfachkombination (Tab. 2).

Tabelle 2: Kombinationen der Funktionen. Aus den vier Einzelfunktionen ergeben sich sechs Doppelkombinationen, vier Dreifachkombinationen und eine Vierfachkombination.

Funktionen	1			2				3			4		
IFN- γ	•			•	•	•			•	•	•		•
CD107a		•		•			•	•		•	•		•
TNF- α			•		•		•		•		•	•	•
IL-2				•		•		•	•		•	•	•

Ein Ergebnis wurde nur dann als positiv gewertet, wenn es die Negativkontrolle um mindestens das Zweifache übertraf. Für die Auswertung wurden die Negativkontrollen schließlich noch vom Ergebnis subtrahiert. Erfolgte die Darstellung nicht für Gag und Nef getrennt, so wurde der Mittelwert aus beiden Ergebnissen gebildet.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Software Version 6.0. Für den Vergleich zweier nicht gepaarter Gruppen (Intergruppenvergleich) wurde der Mann-Whitney-Test angewandt, für den Vergleich innerhalb einer Gruppe (Intragruppenvergleich) der Rangsummentest nach Wilcoxon. Um auf eine lineare Korrelation zu testen, wurde der Korrelationskoeffizient berechnet. Eine Gauß-Normalverteilung der Werte wurde aufgrund der teilweise geringen Patientenzahlen pro Gruppe nicht angenommen. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgesetzt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte jeweils als Einzeldatenpunkte mit Median.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patienten

Die 28 Patienten teilten sich folgendermaßen auf die einzelnen Gruppen auf: drei Patienten wiesen die Kriterien der Gruppe 1a auf, sieben Patienten zählten zur Gruppe 1b, fünf Patienten zur Gruppe 2a und 13 Patienten wurden in Gruppe 2b eingeordnet. In Tabelle 3 sind alle Patienten einzeln mit ihren klinischen Daten aufgelistet. Dass nur drei Patienten für die Gruppe 1a gefunden werden konnten, lag daran, dass wir für alle Gruppen das Kriterium anwandten, dass Viruslast und CD4-Zellzahl über vier Jahre vorliegen mussten. Patienten, die den Kriterien der Gruppe 1a (Viruslastanstieg und CD4-Abfall) entsprechen, beginnen in Deutschland meist rasch mit einer antiretroviralen Therapie und können so nicht über vier Jahre beobachtet werden.

Tabelle 3: Klinische Daten der Patienten. cp/ml = Kopien/ml; BE = Blutentnahme; PR = Progressor, CO = Controller (ursprüngliche Einteilung in unserer Datenbank, hier ohne Bedeutung); * negatives Vorzeichen bedeutet Abfall der Viruslast bzw. Anstieg der CD4-Zellzahl

ID	1. CD4 Zellzahl (/µl)	2. CD4 Zellzahl (/µl)	1. Viruslast (cp/ml)	2. Viruslast (cp/ml)	VL-Anstieg /4 Jahre (log)	CD4-Abfall /4 Jahre (Zellzahl)	Abstand 1. und 2. BE (Jahre)
Gruppe 1a							
PR 26	207		44.023		0,66	66	
PR 62	327		99.049		3,23	71	
PR 71	661	299	8.957	99.841	0,88	102	4
Gruppe 1b							
CO 07	464	455	19.024	93.803	1,20	29	2
CO 08	489		126.332		1,09	44	
CO 28	452	407	6.997	6.207	0,67	51	2
CO 47	339		8.853		0,95	24	
CO 58	563		52.410		1,05	14	
PR 32	153		312.816		1,09	38	
PR 57	543	432	12.282	101.491	0,84	-27*	4
Gruppe 2a							
CO 03	910	491	14.637	42.131	0,41	96	4
CO 04	553	452	39.116	45.053	0,11	64	2
CO 14	336	286	2.247	7.895	0,36	66	3
CO 17	776	274	8.967	43.113	0,49	79	5
PR 22	1327	379	335.211	17.807	-0,69*	178	4
Gruppe 2b							
CO 06	294	239	18.962	129.618	0,38	17	2
CO 13	363		7.732		0,40	6	
CO 15	474	471	16.636	33.007	0,23	48	4
CO 34	772	545	9.466	7.126	-0,10*	3	4
CO 43	255		10.250		0,08	8	
CO 44	795	950	6.655	6.766	0,31	-95*	4
PR 04	434	434	9.507	15.921	0,28	4	4
PR 13	432	267	27.904	16.171	-0,15*	8	2
PR 14	654		47.436		-0,15*	-24*	
PR 38	342		7.960		-0,11*	31	
PR 51	465		24.695		0,43	25	
PR 66	315	319	11.777	7.568	-0,37*	13	3
PR 83	233		45.490		0,08	57	

Die Viruslast ist der am besten untersuchte Parameter, der über das Fortschreiten der HIV-Infektion eine Vorhersage macht [134, 136-139]. Deswegen verglichen wir zunächst die Viruslasten der Patientengruppen. Die Viruslasten innerhalb und auch zwischen den einzelnen Gruppen variierten zum Teil stark (vgl. Tabelle 3 und Abb. 8). Dennoch unterschieden sich die Viruslasten der CD4-Loser (Gruppen 1a und 2a) und der CD4-Nonloser (Gruppen 1b und 2b) nicht signifikant voneinander ($p=0.45$). Der Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 2, also den Gruppen mit steigender und mit gleichbleibender Viruslast, war signifikant ($p=0.01$).

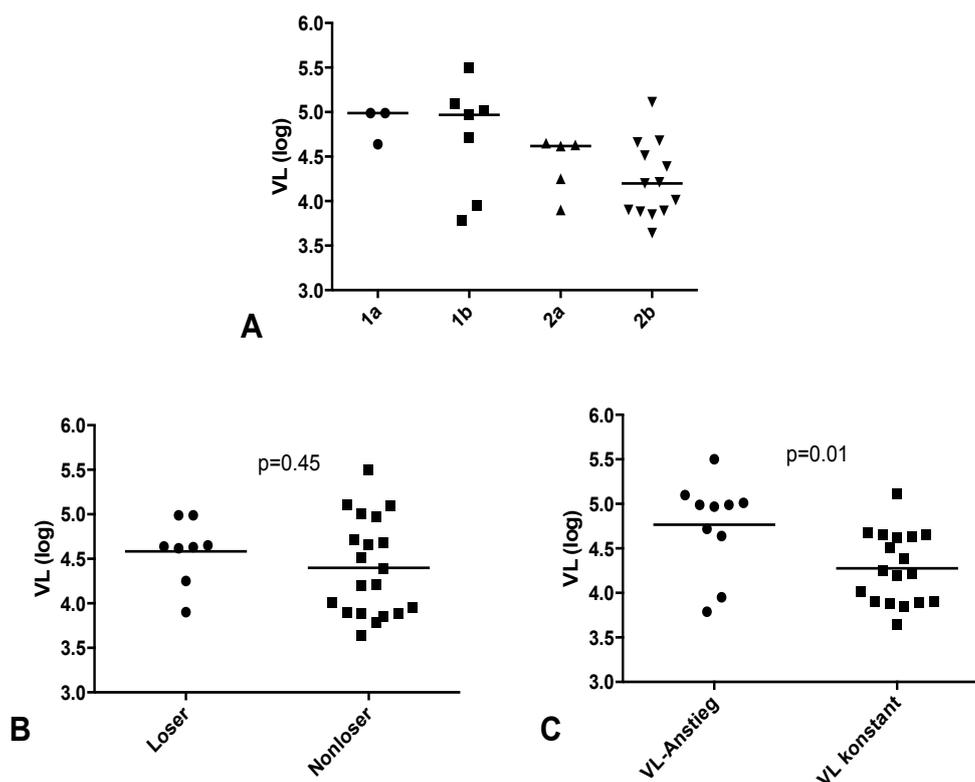


Abbildung 8: Logarithmische Darstellung der Viruslasten. A Dargestellt sind die Viruslasten der einzelnen Patienten mit dem jeweiligen Median einer Gruppe. Es zeigte sich ein Unterschied in der Höhe der Viruslasten innerhalb einer Gruppe und zwischen den einzelnen Gruppen. Die Mediane der Viruslasten der Gruppen 1a und 1b waren höher als die Mediane der Gruppen 2a und 2b. Gruppe 2b zeigte die geringsten Viruslasten (vgl. Tabelle 3). B Vergleich der Viruslasten von CD4-Loser (Gruppe 1a+2a) und CD4-Nonloser (Gruppe 1b+2b). Die Viruslasten der CD4-Loser unterschieden sich nicht signifikant von den Viruslasten der CD4-Nonloser ($p=0.45$). C Vergleich der Viruslasten der Gruppe 1 mit steigenden Viruslasten und der Gruppe 2 mit gleichbleibenden Viruslasten. Die Viruslasten der Gruppe 1 waren signifikant höher als die Viruslasten der Gruppe 2 ($p=0.01$).

Neben der Viruslast ist auch die Höhe der CD4-Zellzahl ein wichtiger prognostischer Marker für das Fortschreiten der HIV-Infektion [136, 140]. Aus diesem Grund verglichen wir als nächstes die Höhe der CD4-Zellzahlen der Patientengruppen.

Erwartungsgemäß wies die Gruppe 1a den geringsten Median auf (1a – 299 Zellen/ μl), die Mediane der anderen drei Gruppen unterschieden sich nur geringfügig voneinander (1b – 407 Zellen / μl , 2a – 379 Zellen / μl , 2b – 363 Zellen / μl). Beim Vergleich der Höhe der CD4-Zellzahlen zwischen den Gruppen Loser und Nonloser, sowie zwischen den Gruppen mit steigender und konstanter Viruslast, zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Loser - Nonloser: $p=0.34$, VL-Anstieg - VL konstant: $p=0.54$) (Abb. 9).

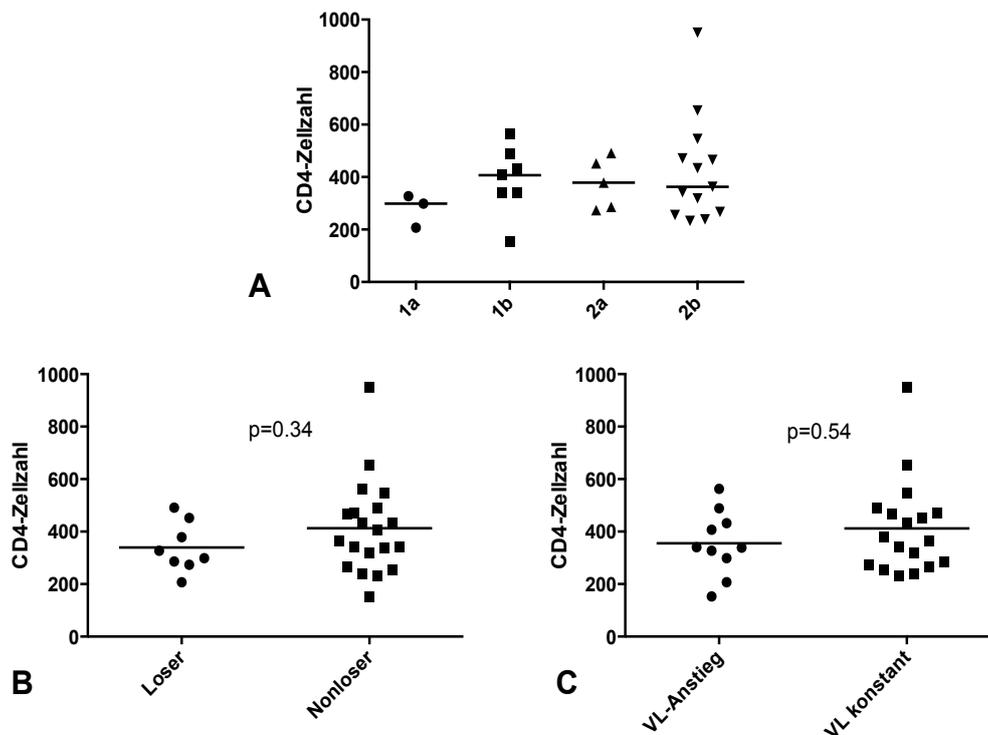


Abbildung 9: Vergleich der Höhe der CD4-Zellzahlen. Die CD4-Zellzahlen sind angegeben in CD4-Zellen pro μl peripheren Blutes. A Dargestellt sind die CD4-Zellzahlen der einzelnen Patienten mit dem jeweiligen Median einer Gruppe. Gruppe 1a wies den geringsten Median auf (1a – 299 Zellen / μl), die anderen drei Gruppen unterschieden sich nur geringfügig in der Höhe ihrer CD4-Zellzahl (Mediane: 1b – 407 Zellen / μl , 2a – 379 Zellen / μl , 2b – 363 Zellen / μl). B Vergleich der CD4-Zellzahlen von CD4-Loser (Gruppe 1a+2a) und CD4-Nonloser (Gruppe 1b+2b). Die CD4-Zellzahlen der CD4-Loser unterschieden sich nicht signifikant von den CD4-Zellzahlen der CD4-Nonloser ($p=0.34$). C Vergleich der CD4-Zellzahlen der Gruppe 1 mit steigenden Viruslasten und der Gruppe 2 mit gleichbleibenden Viruslasten. Die CD4-Zellzahlen der Gruppe 1 unterschieden sich nicht signifikant von den CD4-Zellzahlen der Gruppe 2 ($p=0.54$).

3.2 Die CD38-Expression als Zeichen der Immunaktivierung

Da der auffälligste Unterschied zwischen den Natural hosts der SIV-Infektion und der menschlichen HIV-Infektion die fehlende Immunaktivierung bei den Natural hosts ist [80, 121, 122], untersuchten wir zunächst die Immunaktivierung über die Höhe der CD38-Expression der CD8+ Zellen in den einzelnen Patientengruppen.

Wie zu erwarten, beobachteten wir, dass die Immunaktivierung für die Gruppe mit steigender Viruslast („VL-Anstieg“) sowohl für die bulk-, also auch für die HIV-spezifischen Zellen signifikant mit der Viruslast korrelierte (bulk: $r^2=0.43$, $p=0.04$, HIV-spezifisch: $r^2=0.45$, $p=0.03$) (Abb. 10 A, C). Je höher also die Viruslast, desto höher die CD38-Expression und damit die Immunaktivierung dieser Patienten. Für die Gruppe mit gleichbleibender Viruslast („VL konstant“) waren diese Korrelationen aufgehoben (bulk: $r^2=0.02$, $p=0.38$, HIV-spezifisch: $r^2=0.001$, $p=0.90$) (Abb. 10 B, D), ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Viruslast und der Höhe der CD38-Expression und damit der Immunaktivierung bestand für diese Gruppe also nicht.

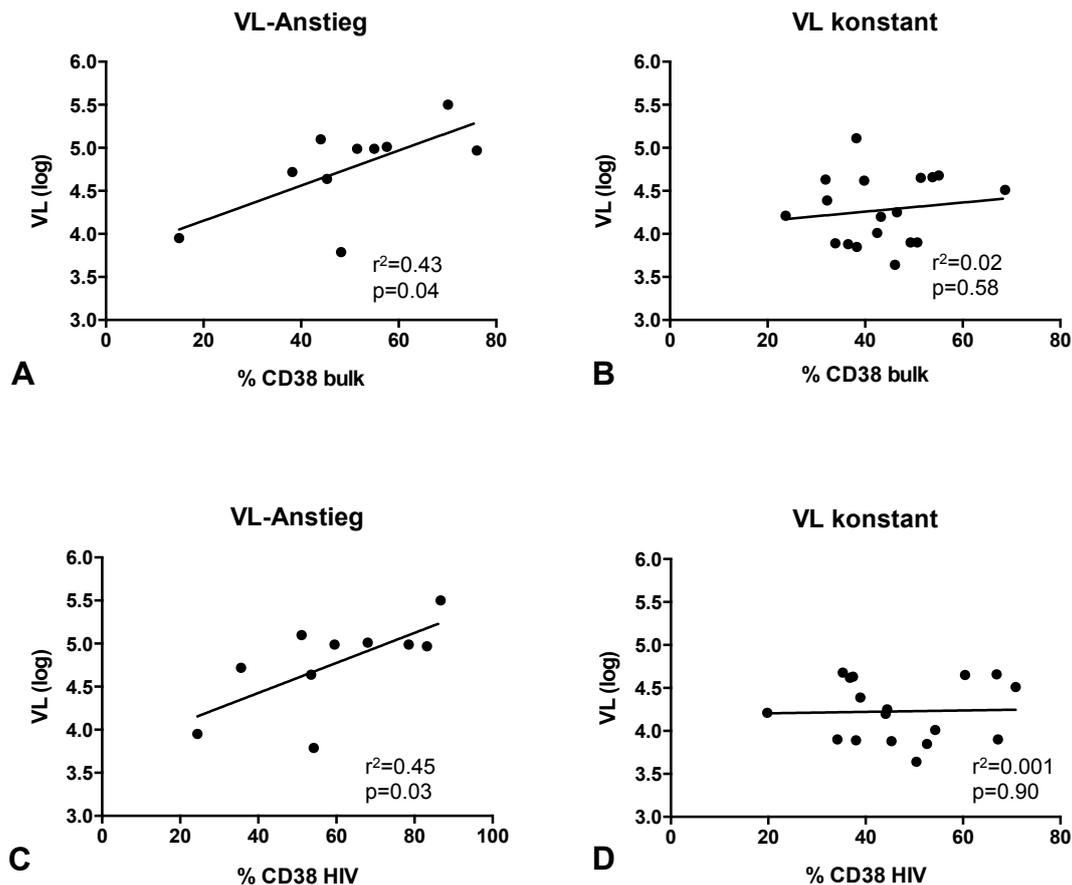


Abbildung 10: Korrelation der Expression von CD38 bulk bzw. CD38 HIV-spezifisch mit der Viruslast. VL (log) = logarithmische Viruslast A Die CD38-Expression aller CD8+ Zellen korrelierte für die Gruppe „VL-Anstieg“ signifikant mit der Viruslast ($r^2=0.43$, $p=0.04$). Je höher die Viruslast, desto höher war die CD38-Expression. B Für die Gruppe „VL konstant“ war diese Korrelation aufgehoben ($r^2=0.02$, $p=0.58$). Für diese Gruppe bestand also kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Viruslast und der Höhe der CD38-Expression aller CD8+ Zellen. C Dargestellt ist die CD38-Expression der HIV-spezifischen Zellen. Wie in A korrelierte für die Gruppe „VL-Anstieg“ die CD38-Expression signifikant mit der Viruslast ($r^2=0.45$, $p=0.03$). D Dargestellt ist die CD38-Expression der HIV-spezifischen Zellen. Wie in B war die Korrelation zwischen der CD38-Expression der HIV-spezifischen Zellen und der Viruslast aufgehoben ($r^2=0.001$, $p=0.90$). A-D Für die Gruppen mit steigender Viruslast galt also (sowohl für bulk Zellen, als auch für HIV-spezifische Zellen): es bestand eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Viruslast und der Höhe der CD38-Expression- je höher die Viruslast, desto höher die CD38-Expression. Für die Gruppen mit gleichbleibender Viruslast bestand dieser Zusammenhang nicht.

Betrachtete man die CD38-Expression der einzelnen Patientengruppen in der Querschnittsstudie, so wiesen die Gruppen 1a und 1b sowohl bei den bulk, als auch bei den HIV-spezifischen Zellen höhere CD38-Expressionen auf als die Gruppen 2a und 2b (Mediane: bulk: 1a – 51.5%, 1b – 48.2%, 2a – 46.5%, 2b – 42.5%, HIV-spezifisch: 1a – 59.2%, 1b – 54.2%, 2a – 44.4%, 2b – 44.7%) (Abb. 11 A, B). Patienten mit höheren Viruslasten wiesen also eine stärkere Immunaktivierung auf als Patienten mit geringeren Viruslasten. Beim Vergleich der CD38-Expression der bulk Zellen

gegenüber den HIV-spezifischen Zellen zeigte sich, dass die HIV-spezifischen Zellen generell eine höhere CD38-Expression als die bulk Zellen aufwiesen (Abb. 11 C).

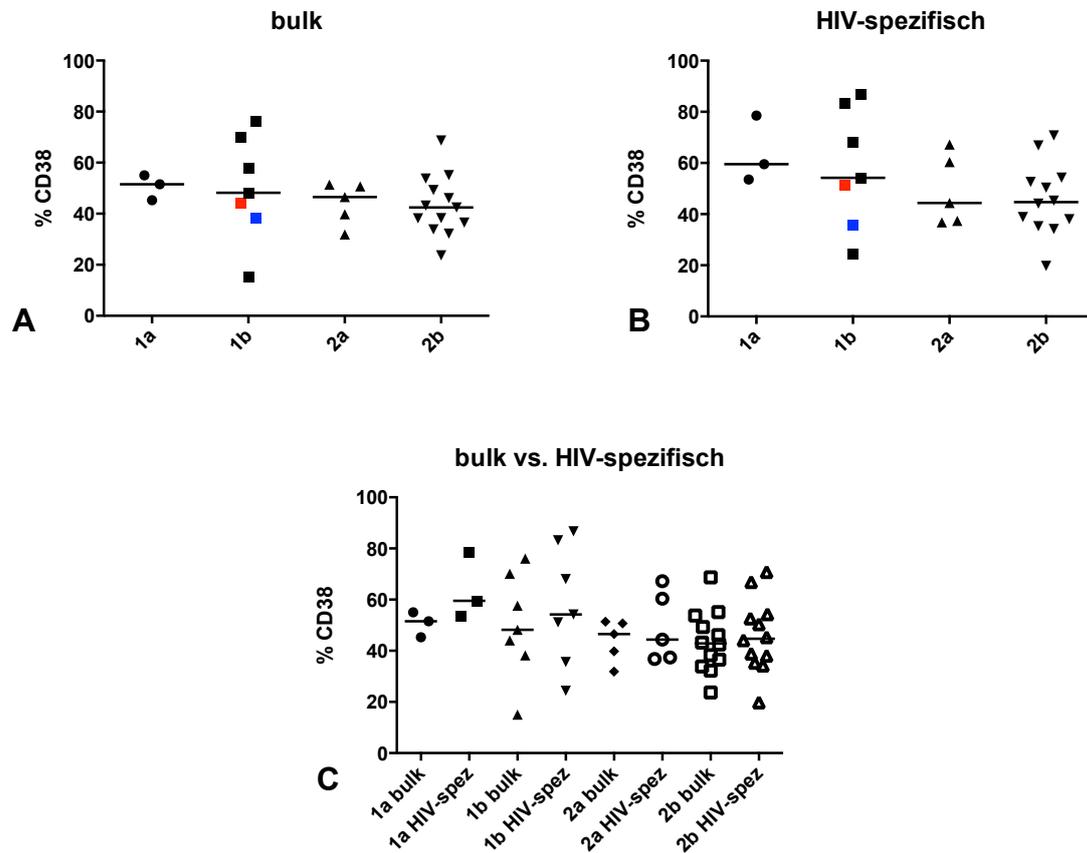


Abbildung 11: CD38-Expression der einzelnen Patientengruppen, bulk und HIV-spezifisch. A bulk: Die CD38-Expression der Gruppen 1a und 1b (Mediane: 1a – 51.5%, 1b – 48.2%) war geringfügig höher als die CD38-Expression der Gruppen 2a und 2b (Mediane: 2a – 46.5%, 2b – 42.5%). B HIV-spezifisch: Die CD38-Expression der Gruppen 1a und 1b (Mediane: 1a – 59.5%, 1b – 54.2%) war ebenfalls höher als die CD38-Expression der Gruppen 2a und 2b (Mediane: 2a – 44.4%, 2b – 44.7%). C bulk vs. HIV-spezifisch: Insgesamt war die CD38-Expression der HIV-spezifischen Zellen höher als die CD38-Expression der bulk-Zellen. •• Generell zeigte sich: in Gruppen mit höheren Viruslasten war auch die CD38-Expression höher. In Gruppe 1b fanden sich jedoch zwei Patienten, die trotz hoher Viruslast eine vergleichsweise geringe CD38-Expression aufwiesen. Dabei handelte es sich um die beiden Patienten CO 08 (roter Punkt, Viruslast: 126.332 cp/ml, CD38 bulk: 44.0%, CD38 HIV-spezifisch: 51.1%) und CO 58 (blauer Punkt, Viruslast: 52.410 cp/ml, CD38 bulk: 38.2%, CD38 HIV-spezifisch: 35.6%).

Beim direkten Vergleich der Höhe der CD38-Expression der Gruppen 1 und 2 ergab sich für die HIV-spezifischen Zellen ein signifikanter Unterschied ($p=0.01$), für die bulk Zellen bestand ein Trend ($p=0.14$) (Abb. 12).

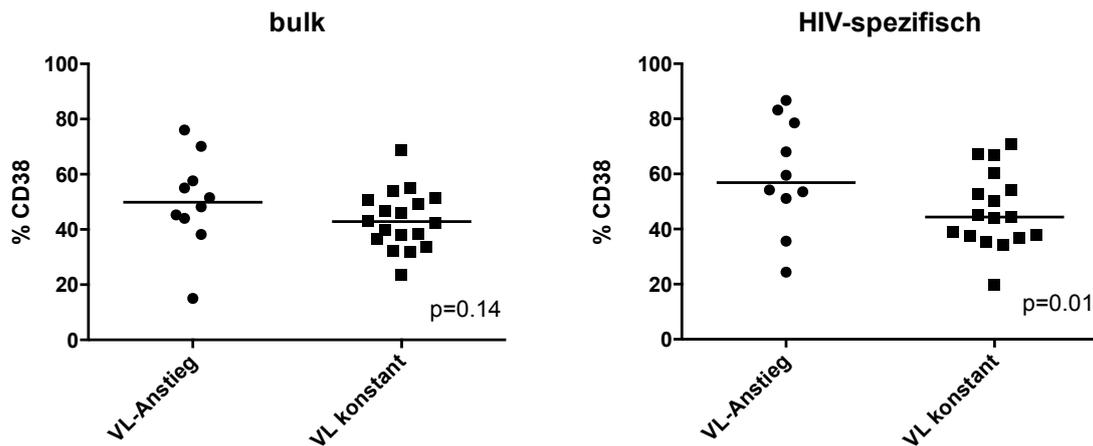


Abbildung 12: CD38-Expression- Vergleich der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“, bulk und HIV-spezifisch. Beim Vergleich der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den HIV-spezifischen Zellen. Die Gruppe mit steigender Viruslast wies signifikant höhere CD38-Expressionen auf als die Gruppe mit gleichbleibender Viruslast ($p=0.01$). Für die bulk Zellen konnte diese Signifikanz nicht gezeigt werden ($p=0.14$).

Die CD38-Expressionen der Loser und Nonloser unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander (bulk: $p=0.63$, HIV-spezifisch: $p=0.47$) (Abb. 13). Loser und Nonloser wiesen also eine ähnlich starke Immunaktivierung auf.

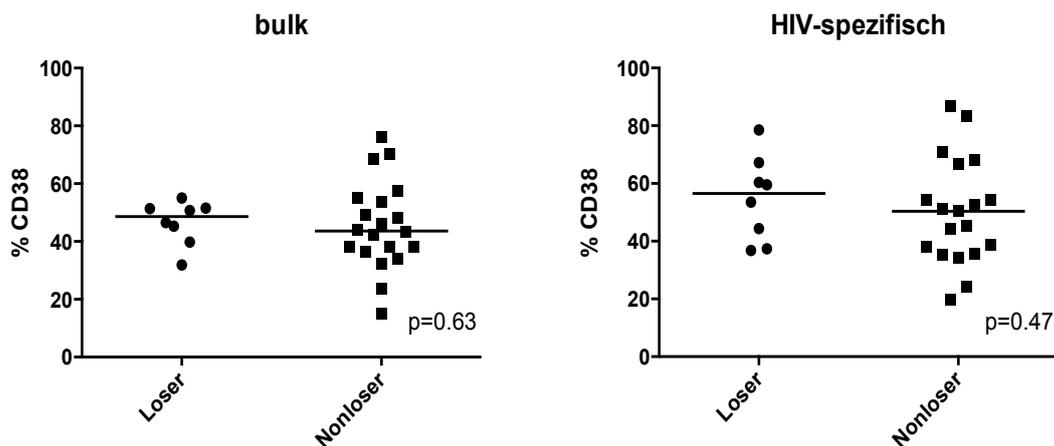
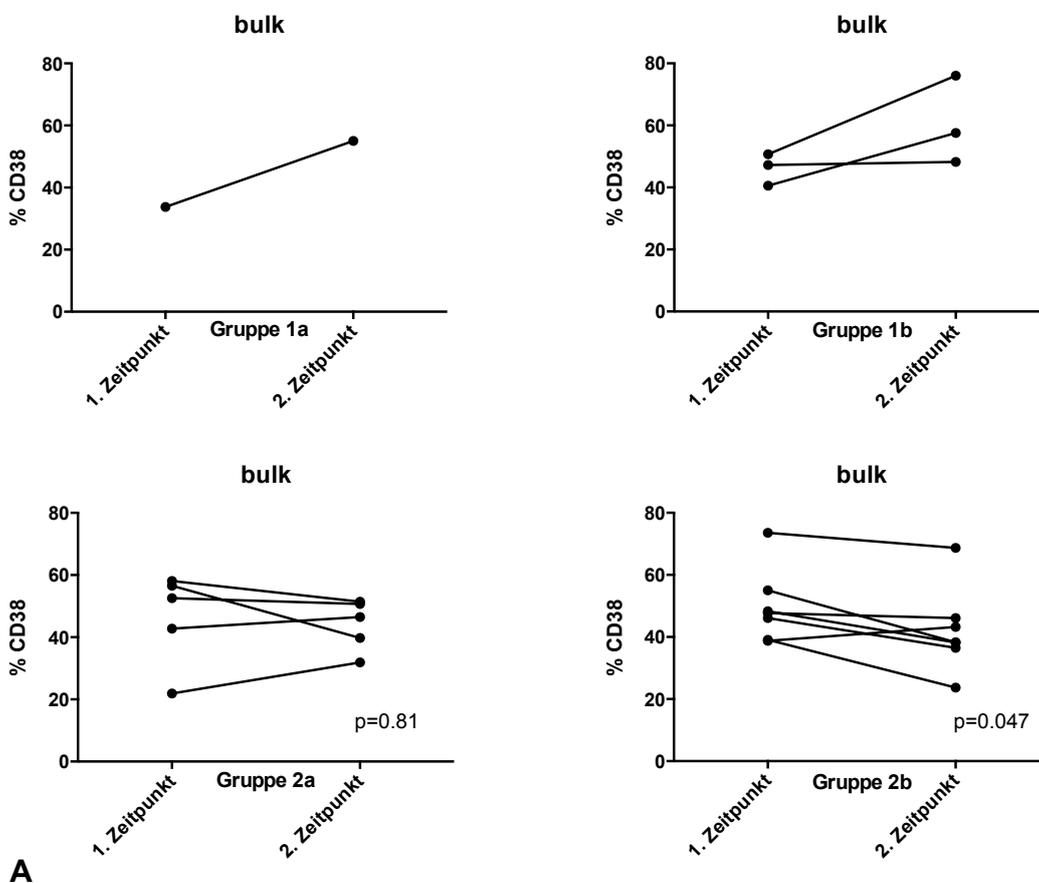


Abbildung 13: CD38-Expression- Vergleich der Gruppen Loser und Nonloser, bulk und HIV-spezifisch. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Loser und Nonloser, weder bei den bulk Zellen ($p=0.63$), noch bei den HIV-spezifischen Zellen ($p=0.47$). Patienten mit abfallender und gleichbleibender CD4-Zellzahl unterschieden sich also nicht in ihrer CD38-Expression.

Insgesamt war also die CD38-Expression in jenen Gruppen höher, die höhere Viruslasten aufwiesen, was zu den bereits publizierten Daten passt. Auffällig war hierbei allerdings die Gruppe 1b: hier fanden sich zwei Patienten (CO 08 und CO 58),

die trotz hoher Viruslast eine vergleichsweise geringe CD38-Expression aufwiesen (CO 08: Viruslast: 126.332 cp/ml, CD38 bulk: 44.0%, CD38 HIV-spezifisch: 51.1%, CO 58: Viruslast: 52.410 cp/ml, CD38 bulk: 38.2%, CD38 HIV-spezifisch: 35.6%) (Abb. 11; rote und blaue Datenpunkte).

Als nächstes betrachteten wir die Patientengruppen im longitudinalen Verlauf. Eine statistische Beurteilung der Einzelgruppen 1a und 1b war dabei aufgrund der geringen Patientenzahlen (ein bzw. drei Patienten) nicht möglich, in den Gruppen 2a (fünf Patienten) und 2b (sieben Patienten) allerdings schon. Dabei stellten wir fest, dass in Gruppe 2a trotz im Verlauf gering steigender Viruslast die CD38-Expression kaum zunahm. In Gruppe 2b sank bei den bulk Zellen die CD38-Expression im Verlauf sogar signifikant ab ($p=0.047$), trotz geringfügig zunehmender Viruslast im Verlauf. Für die HIV-spezifischen Zellen wurde diese Signifikanz nicht erreicht ($p=0.22$) (Abb. 14).



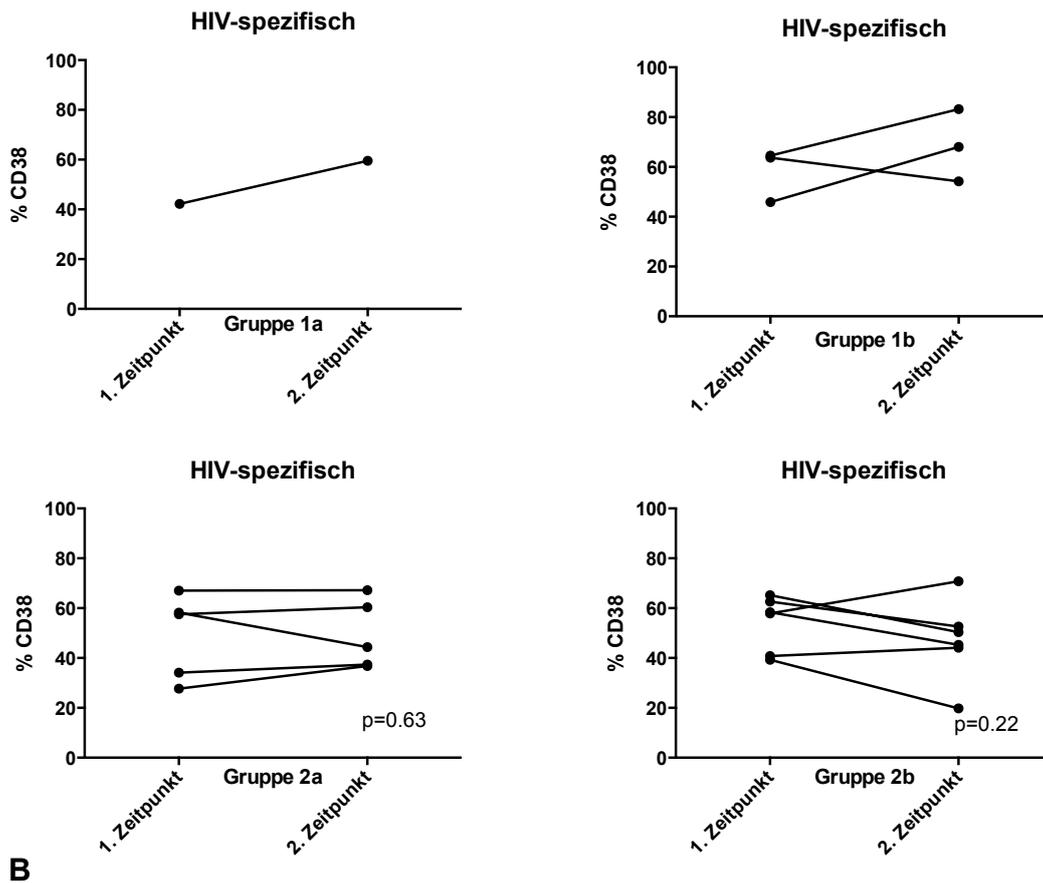


Abbildung 14: CD38-Expression im longitudinalen Verlauf, bulk und HIV-spezifisch. A Darstellung der CD38-Expression der bulk Zellen im longitudinalen Verlauf für alle Untergruppen separat. Die Gruppen 1a und 1b konnten aufgrund der geringen Patientenzahlen (ein Patient in Gruppe 1a, drei Patienten in Gruppe 1b) statistisch nicht beurteilt werden. In Gruppe 2a (fünf Patienten) nahm die CD38-Expression im longitudinalen Verlauf nur gering bis gar nicht zu, bei einem Patienten sank sie sogar (CO 03), trotz geringfügig ansteigender Viruslast im Verlauf. In Gruppe 2b (sieben Patienten) zeigte sich eine signifikante Abnahme der CD38-Expression im Verlauf ($p=0.047$). B Darstellung der CD38-Expression der HIV-spezifischen Zellen im longitudinalen Verlauf für alle Untergruppen separat. Die Gruppen 1a und 1b konnten ebenfalls aufgrund der geringen Patientenzahlen statistisch nicht beurteilt werden. In Gruppe 2a zeigte sich eine ähnliche Beobachtung wie für die bulk Zellen: die CD38-Expression nahm im longitudinalen Verlauf nur gering bis gar nicht zu und sank bei einem Patienten sogar ab, bei den HIV-spezifischen Zellen war dies der Patient PR22. In Gruppe 2b war für die HIV-spezifischen Zellen die Signifikanz der bulk Zellen aufgehoben. Es zeigte sich ebenfalls eine abnehmende Tendenz der CD38-Expression im Verlauf, aber ohne Signifikanz ($p=0.22$).

Zusammengefasst wiesen also Patienten mit höheren Viruslasten auch höhere CD38-Expressionen auf, allerdings mit wichtigen Ausnahmen. Ein Unterschied in der Höhe der CD38-Expression zwischen den Gruppen CD4-Loser und CD4-Nonloser zeigte sich jedoch nicht.

3.3 Die PD-1-Expression als Zeichen der Immunerschöpfung

Eine erhöhte PD-1-Expression ist ein Zeichen der Immunerschöpfung der CD8+ Zellen und mit einem vermehrten Zelltod assoziiert [98-101]. Die verschiedenen Patientengruppen könnten sich in der Höhe ihrer PD-1-Expression und damit im Erschöpfungsgrad der CD8+ Zellen unterscheiden. Da dies zu einer unterschiedlich guten Kontrolle der Infektion führen könnte, untersuchten wir im nächsten Schritt die Höhe der PD-1-Expression der CD8+ Zellen der Patienten.

Bei den Korrelationsuntersuchungen beobachteten wir entsprechende Ergebnisse wie bei der Expression von CD38: die Immunerschöpfung für die Gruppe mit steigender Viruslast („VL-Anstieg“) korrelierte sowohl für die bulk-, als auch für die HIV-spezifischen Zellen signifikant mit der Viruslast (bulk: $r^2=0.40$, $p=0.05$, HIV-spezifisch: $r^2=0.53$, $p=0.02$) (Abb. 15 A, C). Je höher also die Viruslast, desto höher die PD-1 Expression und damit die Immunerschöpfung dieser Patienten. Für die Gruppe mit gleichbleibender Viruslast („VL konstant“) waren diese Korrelationen wieder aufgehoben (bulk: $r^2=0.04$, $p=0.43$, HIV-spezifisch: $r^2=0.001$, $p=0.88$) (Abb. 15 B, D), ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Viruslast und der Höhe der PD-1-Expression und damit der Immunerschöpfung bestand also nicht.

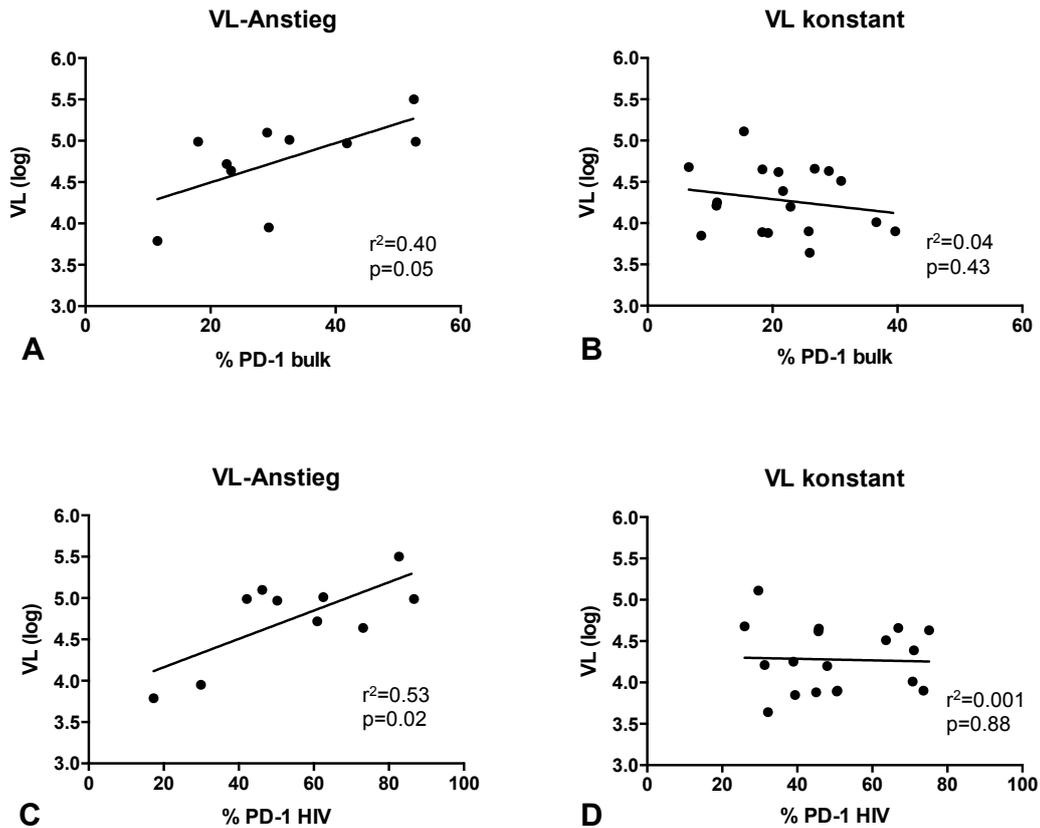


Abbildung 15: Korrelation der Expression von PD-1 bulk bzw. PD-1 HIV-spezifisch mit der Viruslast. VL (log) = logarithmische Viruslast A Die PD-1-Expression aller CD8+ Zellen korrelierte für die Gruppe „VL-Anstieg“ signifikant mit der Viruslast ($r^2=0.40$, $p=0.05$). Je höher die Viruslast, desto höher war die PD-1-Expression. B Für die Gruppe „VL konstant“ war diese Korrelation aufgehoben ($r^2=0.04$, $p=0.43$). Für diese Gruppe bestand also kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Viruslast und der Höhe der PD-1-Expression aller CD8+ Zellen. C Dargestellt ist die PD-1-Expression der HIV-spezifischen Zellen. Wie in A korrelierte für die Gruppe „VL-Anstieg“ die PD-1-Expression signifikant mit der Viruslast ($r^2=0.53$, $p=0.02$). D Dargestellt ist die PD-1-Expression der HIV-spezifischen Zellen. Wie in B war die Korrelation zwischen der PD-1-Expression der HIV-spezifischen Zellen und der Viruslast aufgehoben ($r^2=0.001$, $p=0.88$). A-D Für die Gruppen mit steigender Viruslast galt also (sowohl für bulk Zellen, als auch für HIV-spezifische Zellen): es bestand eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Viruslast und der Höhe der PD-1-Expression- je höher die Viruslast, desto höher die PD-1-Expression. Für die Gruppen mit gleichbleibender Viruslast bestand dieser Zusammenhang nicht.

Betrachtete man die PD-1-Expression der einzelnen Patientengruppen in der Querschnittsstudie, so wiesen die Gruppe 1b bei den bulk Zellen bzw. die Gruppe 1a bei den HIV-spezifischen Zellen die höchsten Mediane auf, die anderen drei Gruppen unterschieden sich kaum voneinander (Mediane: bulk: 1a – 23.3%, 1b – 29.3%, 2a – 21.0%, 2b – 21.7%, HIV-spezifisch: 1a – 73.1%, 1b – 50.3%, 2a – 45.8%, 2b – 48.0%) (Abb. 16 A, B). Allerdings gab es eine zum Teil sehr starke Streuung der PD-1-Expression innerhalb der Gruppen. Deshalb war eine eindeutige Aussage aufgrund der teilweise geringen Patientenzahlen innerhalb der Gruppen schwierig. Wie bei der

CD38-Expression zeigte sich, dass die HIV-spezifischen Zellen generell eine höhere PD-1-Expression als die bulk Zellen aufwiesen (Abb. 16 C). Dabei war der Unterschied in der Höhe der PD-1-Expression zwischen den bulk und den HIV-spezifischen Zellen für die Gruppen 2a und 2b sogar signifikant (p-Werte: 1a – $p=0.20$, 1b – $p=0.097$, 2a – $p=0.016$, 2b – $p<0.0001$).

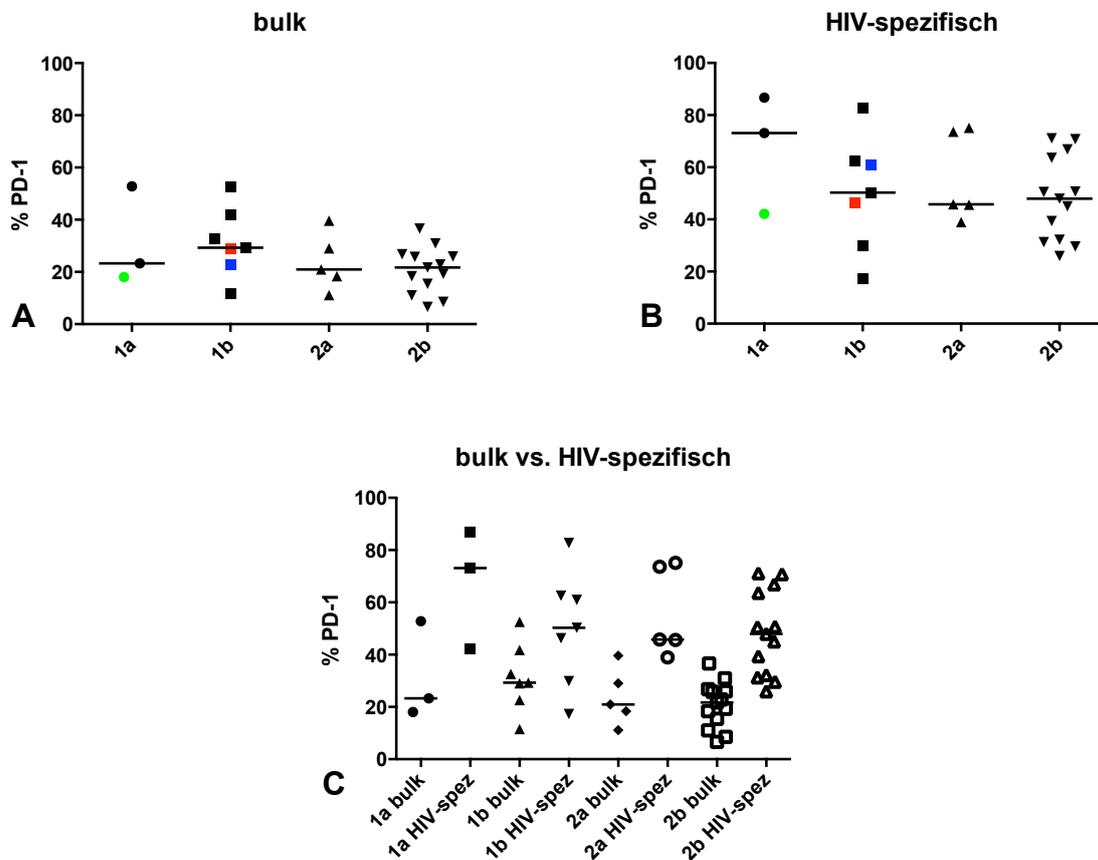


Abbildung 16: PD-1-Expression der einzelnen Patientengruppen, bulk und HIV-spezifisch. A bulk: Die PD-1-Expression der Gruppe 1b (Median: 1b – 29.3%) war geringfügig höher als die PD-1-Expression der Gruppen 1a, 2a und 2b (Mediane: 1a – 23.3%, 2a – 21.0%, 2b – 21.7%). B HIV-spezifisch: Die PD-1-Expression der Gruppe 1a (Median: 1a – 73.1%) war höher als die PD-1-Expression der Gruppen 1b, 2a und 2b (Mediane: 1b – 50.3%, 2a – 45.8%, 2b – 48.0%). C bulk vs. HIV-spezifisch: Insgesamt war die PD-1-Expression der HIV-spezifischen Zellen deutlich höher als die PD-1-Expression der bulk-Zellen. Für die Gruppen 2a und 2b erreichte dieser Unterschied Signifikanz (p-Werte: 1a – $p=0.20$, 1b – $p=0.097$, 2a – $p=0.016$, 2b – $p<0.0001$). •• Für die bulk Zellen galt: Patienten mit höheren Viruslasten wiesen auch höhere PD-1-Expressionen auf. Nicht galt dies für folgende Patienten: PR 62 (grüner Punkt) aus Gruppe 1a wies trotz hoher Viruslast und starkem Viruslast-Anstieg über die letzten vier Jahre (VL 99.049 cp/ml, VL-Anstieg 3,23 log/ 4 Jahre) sowohl bei den bulk, also auch bei den HIV-spezifischen Zellen nur eine geringe Immunerschöpfung auf (Median: bulk: 18.03%, HIV-spezifisch: 42.15%). Außerdem zeigten die beiden Patienten CO 08 (roter Punkt) und CO 58 (blauer Punkt) der Gruppe 1b, die bereits eine geringe CD38-Expression aufwiesen, auch eine geringe PD-1-Expression (CO 58 nicht für HIV-spezifisch), trotz hoher Viruslasten (CO 08: Viruslast: 126.332 cp/ml, PD-1 bulk: 29.05%, PD-1 HIV-spezifisch: 46.25%, CO 58: Viruslast: 52.410 cp/ml, PD-1 bulk: 22.59%, PD-1 HIV-spezifisch: 60.93%).

Da eine Aussage bezüglich der PD-1-Expression bei der Betrachtung der einzelnen Untergruppen schwierig war, verglichen wir wieder die Höhe der PD-1-Expression der Gruppen 1a+1b („VL-Anstieg“) gegenüber der Gruppen 2a+2b („VL konstant“). Hier zeigte sich für die bulk Zellen ein Trend zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Übergruppen ($p=0.058$) (Abb. 17 A). Patienten mit steigender Viruslast wiesen also eine stärkere Immunerschöpfung auf als Patienten mit gleichbleibender Viruslast. Für die HIV-spezifischen Zellen zeigte sich diese Beobachtung nicht, die beiden Gruppen mit steigender und mit gleichbleibender Viruslast unterschieden sich praktisch nicht in ihrer PD-1-Expression ($p=0.55$) (Abb. 17 B).

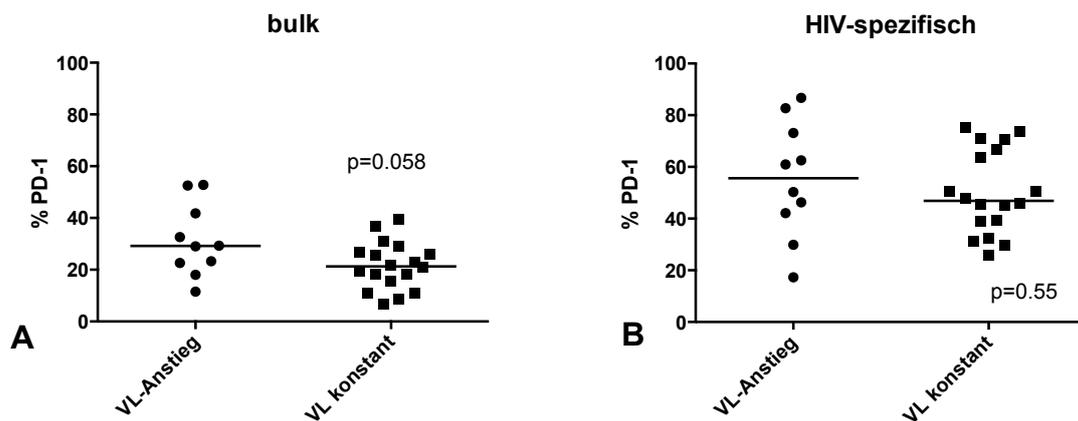


Abbildung 17: PD-1-Expression- Vergleich der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“, bulk und HIV-spezifisch. A Beim Vergleich der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ zeigte sich ein annähernd signifikanter Unterschied bei den bulk Zellen. Die Gruppe mit steigender Viruslast wies höhere PD-1-Expressionen auf als die Gruppe mit gleichbleibender Viruslast ($p=0.058$). B Für die HIV-spezifischen Zellen konnte dies nicht gezeigt werden ($p=0.55$), die beiden Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ wiesen praktisch keinen Unterschied bezüglich der Höhe ihrer PD-1-Expression auf.

Beim Vergleich der Loser und Nonloser machten wir die gleichen Beobachtungen wie bei der CD38-Expression: die PD-1-Expressionen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (bulk: $p=0.94$, HIV-spezifisch: $p=0.19$) (Abb. 18 A, B). Loser und Nonloser wiesen also eine ähnlich starke Immunerschöpfung auf.

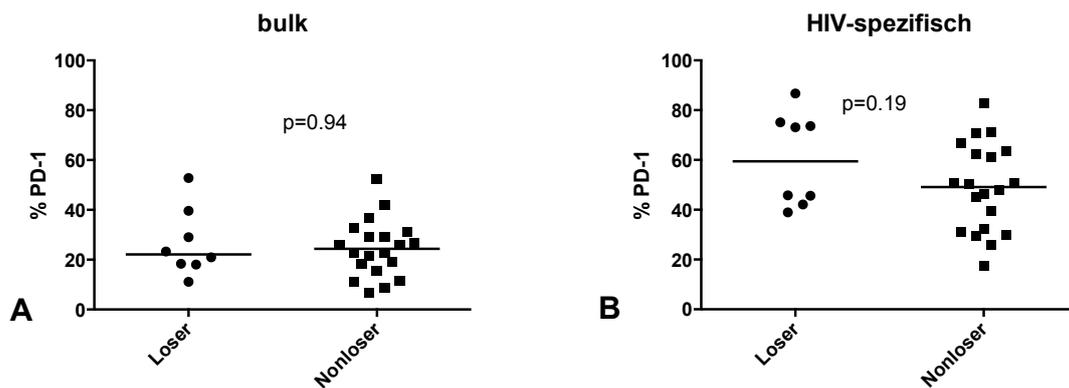


Abbildung 18: PD-1-Expression- Vergleich der Gruppen Loser und Nonloser, bulk und HIV-spezifisch. Beim Vergleich der Gruppen Loser und Nonloser zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der PD-1-Expression, weder bei den bulk Zellen ($p=0.94$) (A), noch bei den HIV-spezifischen Zellen ($p=0.19$) (B).

Insgesamt war also die PD-1-Expression zumindest bei den bulk Zellen in jenen Gruppen höher, die höhere Viruslasten aufwiesen. Auffällig waren hier wieder einzelne Patienten: in Gruppe 1a wies der Patient PR 62 trotz hoher Viruslast und starkem Viruslast-Anstieg über die letzten vier Jahre (VL 99.049 cp/ml, VL-Anstieg 3,23 log/ 4 Jahre) sowohl bei den bulk, also auch bei den HIV-spezifischen Zellen nur eine geringe Immunerschöpfung auf (Median: bulk: 18.03%, HIV-spezifisch: 42.15%). Außerdem zeigten die beiden Patienten CO 08 und CO 58 der Gruppe 1b, die bereits eine geringe CD38-Expression aufwiesen, auch eine geringe PD-1-Expression (CO 08 nicht für HIV-spezifisch), trotz hoher Viruslast (CO 08: Viruslast: 126.332 cp/ml, PD-1 bulk: 29.05%, PD-1 HIV-spezifisch: 46.25%, CO 58: Viruslast: 52.410 cp/ml, PD-1 bulk: 22.59%, PD-1 HIV-spezifisch: 60.93%) (Abb. 16; grüne, rote und blaue Datenpunkte). Diese beiden Patienten zeigten also trotz hoher Viruslast eine geringe Immunaktivierung und gleichzeitig eine geringe Immunerschöpfung.

Als nächstes betrachteten wir die Patientengruppen im longitudinalen Verlauf. Dabei ergab sich im Gegensatz zur CD38-Expression kein eindeutiger Trend innerhalb der Gruppen, weder bei den bulk, noch bei den HIV-spezifischen Zellen. Es gab Patienten, die im Verlauf mit der PD-1-Expression anstiegen und es gab Patienten, die im Verlauf mit der PD-1-Expression abfielen, unabhängig davon, zu welcher Gruppe sie gehörten (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst wiesen Patienten mit höheren Viruslasten auch höhere PD-1-Werte auf, allerdings wieder mit Ausnahmen, wie dies bereits bei der Untersuchung der CD38-

Expression zu beobachten war. Zusätzlich zeigte sich eine starke Streuung der PD-1-Werte auch innerhalb der einzelnen Gruppen.

3.4 Der Aktivierungsmarker CD44

Das Oberflächenmolekül CD44 ist ein Marker für Zellen mit Antigenerfahrung und essenziell in der Entwicklung von aktivierten Effektor- und Gedächtniszellen aus naiven T-Zellen, sowie in der Induktion von Effektorfunktionen [111-113]. Eine hohe CD44-Expression könnte deshalb möglicherweise zu einer guten Kontrolle der Infektion beitragen. Aus diesem Grund untersuchten wir als nächstes die Höhe der CD44-Expression der CD8+ Zellen bei den einzelnen Patienten.

Bei den Korrelationsuntersuchungen beobachteten wir, dass die CD44-Expression in keiner Gruppe mit der Viruslast korrelierte, weder bei den bulk, noch bei den HIV-spezifischen Zellen (Daten nicht gezeigt). Insgesamt war die CD44-Expression für alle Gruppen sowohl bei den bulk, als auch bei den HIV-spezifischen Zellen sehr hoch (range bulk: 66.3% - 96.00%, Daten nicht gezeigt; range HIV-spezifisch: 51.8% - 97.25%, Abb. 19). Beim Vergleich der einzelnen Gruppen unterschieden sich bei den bulk Zellen die Mediane der einzelnen Gruppen nur sehr gering voneinander (Mediane: 1a – 88.93%, 1b – 88.90%, 2a – 90.93%, 2b – 86.03%), es gab also keinen Unterschied in der CD44-Expression zwischen den einzelnen Gruppen (Daten nicht gezeigt). Bei den HIV-spezifischen Zellen jedoch zeigte die Gruppe 2a eine höhere CD44-Expression als die Gruppen 1b und 1a, die Gruppe 2b wies die geringste CD44-Expression auf (Mediane: 1a – 77.3%, 1b – 83.2%, 2a – 89.6%, 2b – 69,3%) (Abb. 19). Beim direkten Vergleich der bulk und der HIV-spezifischen Zellen zeigten die bulk Zellen in jeder Gruppe eine höhere CD44-Expression als die HIV-spezifischen Zellen (Daten nicht gezeigt).

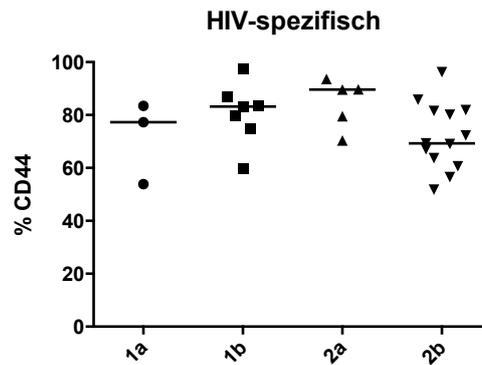


Abbildung 19: CD44-Expression der einzelnen Patientengruppen, HIV-spezifische Zellen. Die Gruppe 2a zeigte eine höhere CD44-Expression als die Gruppen 1b und 1a, die Gruppe 2b wies die geringste CD44-Expression auf (Mediane: 1a – 77.3%, 1b – 83.2%, 2a – 89.6%, 2b – 69,3%).

Beim Vergleich der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ bzw. der Gruppen Loser und Nonloser zeigte sich weder bei den bulk, noch bei den HIV-spezifischen Zellen ein Unterschied zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

Bei der Betrachtung der Patientengruppen im longitudinalen Verlauf zeigte sich kein eindeutiger Trend, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit stieg oder sank die CD44-Expression in Verlauf.

Insgesamt zeigten die Patienten also alle eine hohe CD44-Expression und die einzelnen Gruppen unterschieden sich nur gering voneinander.

Im nächsten Schritt interessierte uns, wie es mit der Doppel-Expression der CD8+ Zellen von PD-1 und CD44 aussah. Wir stellten fest, dass sich die PD-1-/ CD44-Expression genauso verhielt wie die alleinige PD-1-Expression. Dies galt für alle Querschnitts- und longitudinalen Untersuchungen, für alle Einzelgruppen und Übergruppen, sowie jeweils für die bulk und die HIV-spezifischen Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.5 Die CD4-Zellen und die Expression von PD-1 und CD44

Neben den CD8+ T-Zellen sind die CD4+ T-Zellen entscheidend an der Abwehr der HIV-Infektion beteiligt [69, 70]. Da eine Erschöpfung bzw. eine zu geringe Aktivierung der CD4+ Zellen ebenfalls zur mangelnden Kontrolle der HIV-Infektion beitragen und sich die einzelnen Gruppen diesbezüglich unterscheiden könnten, untersuchten wir als nächstes die Expression von PD-1 und CD44, sowie die Doppelexpression PD-1/ CD44

der CD4+ Zellen. Des Weiteren untersuchten wir die IFN- γ -Produktion der CD4+ Zellen, die allerdings insgesamt zu gering ausfiel, um sie statistisch auswerten zu können (Daten nicht gezeigt). Folglich konzentrierten wir uns auf die Gesamtheit der CD4+ Zellen („bulk“) und nicht auf die HIV-spezifischen CD4+ Zellen, da diese nicht zu definieren waren.

Bei den Korrelationsuntersuchungen beobachteten wir, dass die PD-1- und die CD44-Expression der CD4+ Zellen nicht mit der Viruslast korrelierten (Daten nicht gezeigt). Die PD-1-Expression war insgesamt gering (range: 3.40% - 39.1%) und dabei signifikant geringer als die PD-1-Expression der CD8+ T-Zellen ($p=0.0004$). Die Gruppe 1a wies die höchsten Werte an PD-1 auf (Median: 20.30%), während die Gruppen 1b, 2a und 2b sich kaum in ihrer PD-1-Expression unterschieden (Mediane: 1b – 14.31%, 2a – 13.08%, 2b – 11.72%) (Abb. 20).

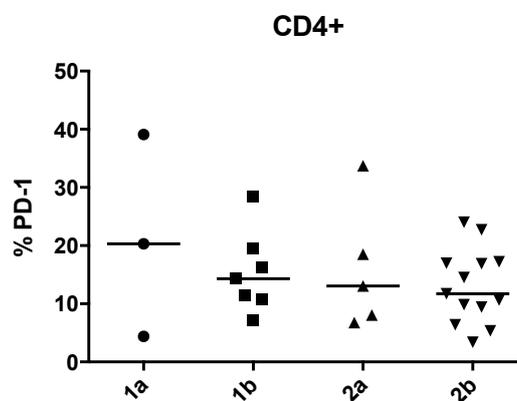


Abbildung 20: PD-1-Expression der CD4+ Zellen der einzelnen Patientengruppen. Die PD-1-Expression der CD4+ Zellen war insgesamt gering (range: 3.40% - 39.1%). Die Gruppe 1a wies dabei die höchsten Werte auf (Median: 20.30%), die Gruppen 1b, 2a und 2b unterschieden sich kaum in ihrer PD-1-Expression (Mediane: 1b – 14.31%, 2a – 13.08%, 2b – 11.72%).

Die CD44-Expression war insgesamt sehr hoch (range: 71.60% - 98.30%) und erreichte sogar noch höhere Werte als die CD44-Expression der CD8+ Zellen. Dabei wiesen die Gruppen 2a und 2b (Mediane: 2a – 96.14%, 2b – 94.17%) eine höhere CD44-Expression auf als die Gruppen 1a und 1b (Mediane: 1a – 89.70%, 1b – 93.77%). Beim Vergleich der PD-1- bzw. CD44-Expression der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ bzw. der Gruppen Loser und Nonloser ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Bei den longitudinalen Untersuchungen zeigte sich kein eindeutiger Trend, die PD-1- und die CD44-Expressionen nahmen bei den Patienten im Verlauf zu oder ab, auch innerhalb einer Gruppe. Auffällig war dabei

allerdings der Patient PR 57 aus Gruppe 1b, der bei steigender Viruslast und fehlendem CD4-Zellverlust bzw. sogar einer durchschnittlichen CD4-Zellzunahme von 27 Zellen pro Jahr, eine Abnahme seiner PD-1- und seiner CD44-Expression, sowie der Doppelexpression im Verlauf zeigte (PD-1: 12.88% auf 7.18%, CD44: 93,42% auf 92.81%, PD-1/ CD44: 12.00% auf 6.44%). Die Doppelexpression PD-1/ CD44 der CD4+ Zellen war, wie schon bei den CD8+ Zellen (vgl. 3.4) im Verhalten identisch wie die PD-1-Expression (alle Daten nicht gezeigt).

Insgesamt zeigte sich also bei der Untersuchung der PD-1- und der CD44-Expression der CD4+ Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

3.6 Anzahl und Stärke der CD8+ T-Zellantworten gemessen anhand der Interferon- γ -Produktion

In den bisher publizierten Studien fanden sich keine Unterschiede in der Anzahl und Stärke der HIV-spezifischen CD8+ T-Zellantwort zwischen Patientenkohorten, die sich bezüglich der Kontrolle der HIV-Infektion unterschieden, gemessen anhand der Interferon- γ -Produktion [59, 60]. Deshalb wollten wir untersuchen, ob dies auch für unsere Patientengruppen galt.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten waren zum Teil erheblich (siehe unten), ein Ergebnis, das wir ohne die Stimulation mit Einzelpeptiden nicht erhalten hätten. Zunächst beobachteten wir bei den Korrelationsuntersuchungen, dass die Anzahl und Stärke der IFN- γ -Antworten in keiner Gruppe mit der Viruslast korrelierte, weder für Gag und Nef gemeinsam, noch für Gag und Nef einzeln (Daten nicht gezeigt).

Beim Vergleich der einzelnen Patientengruppen in der Querschnittsstudie für Gag und Nef gemeinsam zeigte die Gruppe 1b die höchste Anzahl der IFN- γ -Antworten, allerdings mit großer Variationsbreite (Median: 20 Antworten, range: 1-24 Antworten). Die Gruppen 1a, 2a und 2b unterschieden sich kaum in ihrer Anzahl der Antworten (Mediane: 1a – 8 Antworten, 2a – 8 Antworten, 2b – 7 Antworten) (Abb. 21 A). Ähnliche Beobachtungen machten wir auch für die Stärke der Antworten: Gruppe 1b wies die stärksten Antworten auf, wieder mit großer Variationsbreite (Median: 7.980 SFC/ 10^6 Zellen, range: 280 – 20.789 SFC/ 10^6 Zellen). Die Gruppen 1a und 2a unterschieden sich kaum in der Stärke ihrer Antworten (Mediane: 1a – 6.260 SFC/ 10^6 Zellen, 2a – 6.010 SFC/ 10^6 Zellen), die Gruppe 2b wies jedoch eine geringere Stärke

auf (Median: 3.010 SFC/ 10^6 Zellen) (Abb. 21 B). Bei der Betrachtung der einzelnen Patienten stellten wir fest, dass die Anzahl und die Stärke der IFN- γ -Antworten positiv miteinander korrelierten, mit wenigen Ausnahmen wiesen Patienten mit einer höheren Anzahl an Antworten auch stärkere Antworten auf und umgekehrt (Daten nicht gezeigt).

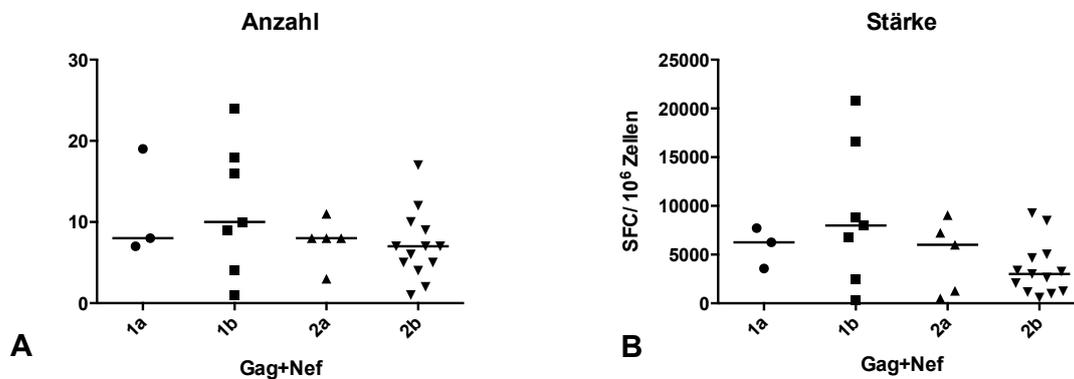


Abbildung 21: Anzahl und Stärke der IFN- γ -Antworten der einzelnen Patientengruppen, Gag und Nef gemeinsam. A Anzahl: Die Anzahl der IFN- γ -Antworten war in Gruppe 1b am höchsten, allerdings mit großer Variationsbreite (Median: 20 Antworten, range: 1-24 Antworten). Die Gruppen 1a, 2a und 2b unterschieden sich kaum in ihrer Anzahl der Antworten (Mediane: 1a – 8 Antworten, 2a – 8 Antworten, 2b – 7 Antworten). B Stärke: Die Stärke der IFN- γ -Antworten war in Gruppe 1b am höchsten, ebenso mit großer Variationsbreite (Median: 7.980 SFC/ 10^6 Zellen, range: 280 – 20.789 SFC/ 10^6 Zellen). Die Gruppen 1a und 2a unterschieden sich kaum in der Stärke ihrer Antworten (Mediane: 1a – 6.260 SFC/ 10^6 Zellen, 2a – 6.010 SFC/ 10^6 Zellen), die Gruppe 2b wies eine geringere Stärke auf (Median: 3.010 SFC/ 10^6 Zellen).

Beim Vergleich der Anzahl und Stärke der Antworten der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“, sowie der Gruppen Loser und Nonloser zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Gag und Nef gemeinsam) (Daten nicht gezeigt).

Für Gag und Nef einzeln zeigte sich, dass die Antworten auf Nef sowohl in Anzahl, als auch in Stärke zum Teil deutlich geringer waren als die Antworten auf Gag (Daten nicht gezeigt). Beachtet werden muss hier allerdings, dass das Gag-Gen deutlich länger ist als das Nef-Gen (vgl. 2.1.5). Die Antworten auf Gag und Nef einzeln verhielten sich genauso wie die Antworten auf Gag und Nef gemeinsam (keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen). Für Gag gab es allerdings eine Ausnahme: beim Vergleich der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Gruppe mit steigender Viruslast hatte signifikant mehr IFN- γ -Antworten auf Gag als die Gruppe mit gleichbleibender Viruslast ($p=0.045$). Für die Stärke der Antworten erreichte der Vergleich zwar keine Signifikanz, es zeigte sich jedoch ein eindeutiger Trend zwischen der Gruppe mit steigender und gleichbleibender Viruslast ($p=0.07$) (Abb. 22).

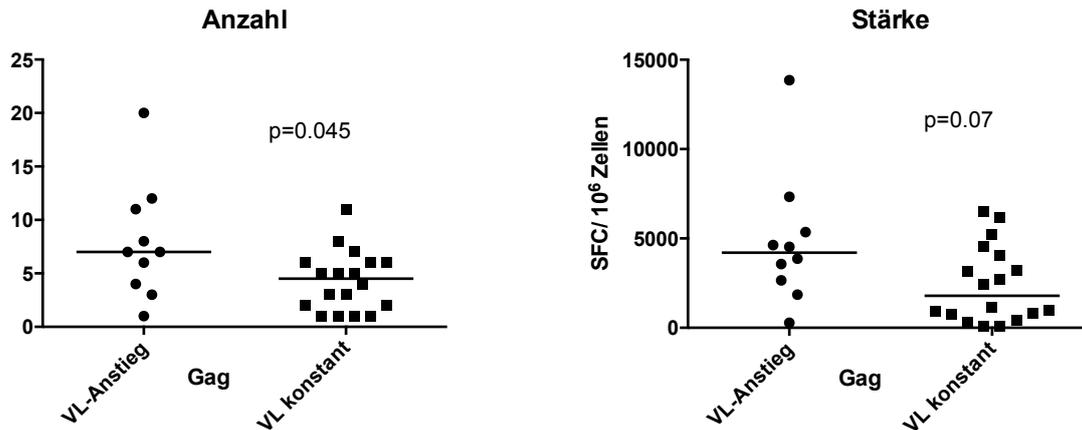


Abbildung 22: Anzahl und Stärke der IFN- γ -Antworten auf Gag, Vergleich der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“. Beim Vergleich der Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der IFN- γ -Antworten auf Gag: die Gruppe mit steigender Viruslast wies signifikant höhere Antworten auf als die Gruppe mit gleichbleibender Viruslast ($p=0.045$). Für die Stärke der Antworten konnte diese Signifikanz nicht gezeigt werden, es zeigte sich jedoch ein eindeutiger Trend ($p=0.07$).

Bei den longitudinalen Untersuchungen zeigte sich kein eindeutiger Trend innerhalb der Gruppen, weder für Gag und Nef gemeinsam, noch für Gag und Nef einzeln. Es gab Patienten, die im Verlauf mit der Anzahl und Stärke der IFN- γ -Antworten zunahmen oder abfielen, unabhängig davon, zu welcher Gruppe sie gehörten (Daten nicht gezeigt).

Wie in den bisher publizierten Studien zeigte sich also, bis auf eine Ausnahme, kein Unterschied in Anzahl und Stärke der IFN- γ -Antworten zwischen den einzelnen Patientengruppen.

3.7 Die Polyfunktionalität der CD8-Zellen als Maß der Immunerschöpfung

In den letzten Jahren hatte sich zunehmend gezeigt, dass die Immunantwort der CD8⁺ T-Zellen qualitativ besser ist, wenn die Zellen nicht nur eine einzige Effektorfunktion, wie z.B. die IFN- γ -Produktion, sondern eine Kombination von mehreren Funktionen, eine sogenannte Polyfunktionalität, zeigen [62]. Da die Polyfunktionalität der CD8⁺ T-Zellen zu einer guten Kontrolle der Infektion beitragen kann, untersuchten wir als nächstes die Qualität der Immunantworten der verschiedenen Patientengruppen, gemessen anhand der Kombinationen der vier Einzelfunktionen IFN- γ , CD107a, TNF- α und IL-2.

Die Vierfachkombination aus den vier Einzelfunktionen fiel in allen Gruppen sehr gering aus, deshalb wird im Folgenden nicht weiter darauf eingegangen. Die Auswertung erfolgte jeweils für Gag und Nef getrennt, da sich die Antworten in Anzahl und Stärke zum Teil deutlich unterschieden.

In Abbildung 23 sind die Einzel-, Doppel- und Dreifachfunktionen zunächst für alle Gruppen (1a, 1b, 2a, 2b) zusammen genommen dargestellt. Die meisten und stärksten Antworten zeigten sich für die Einzelfunktion Zytotoxizität CD107a, sowie bei den entsprechenden Kombinationen mit dieser Funktion. Insgesamt waren die Antworten auf Gag in Anzahl und Stärke meist höher als die Antworten auf Nef.

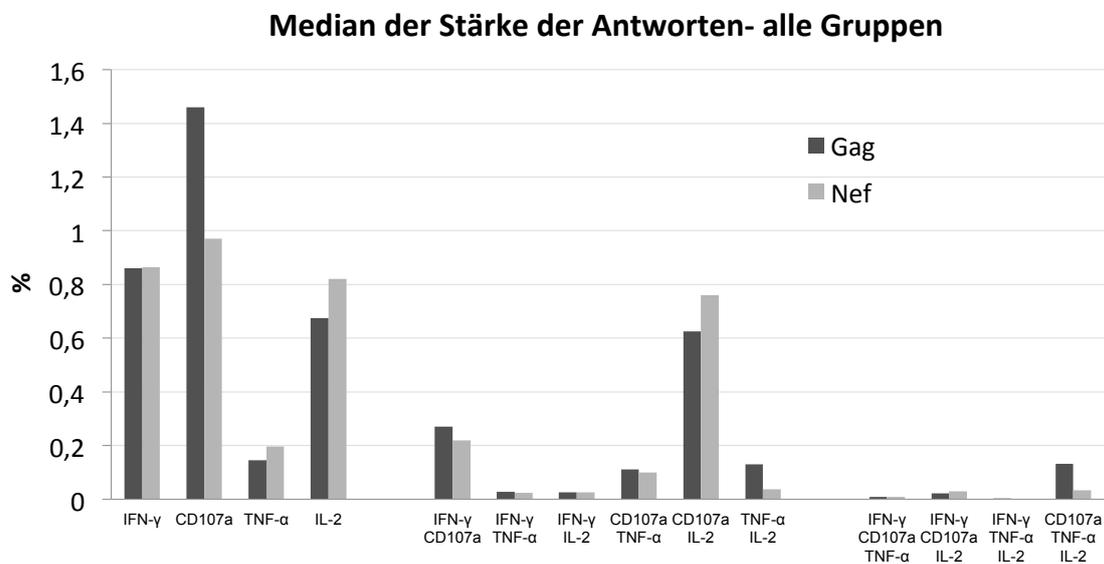
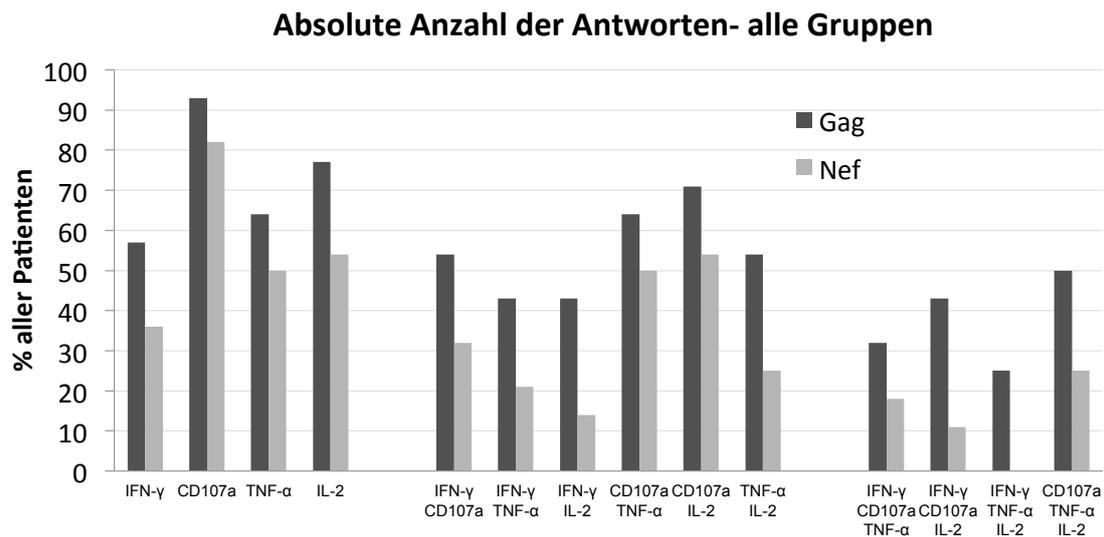
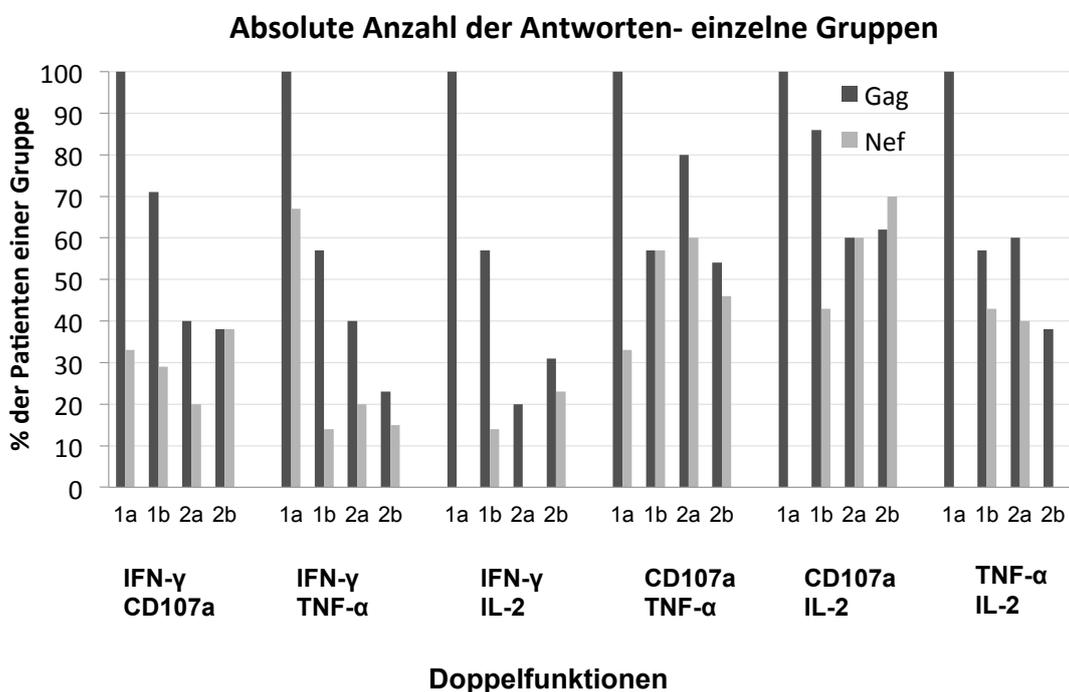
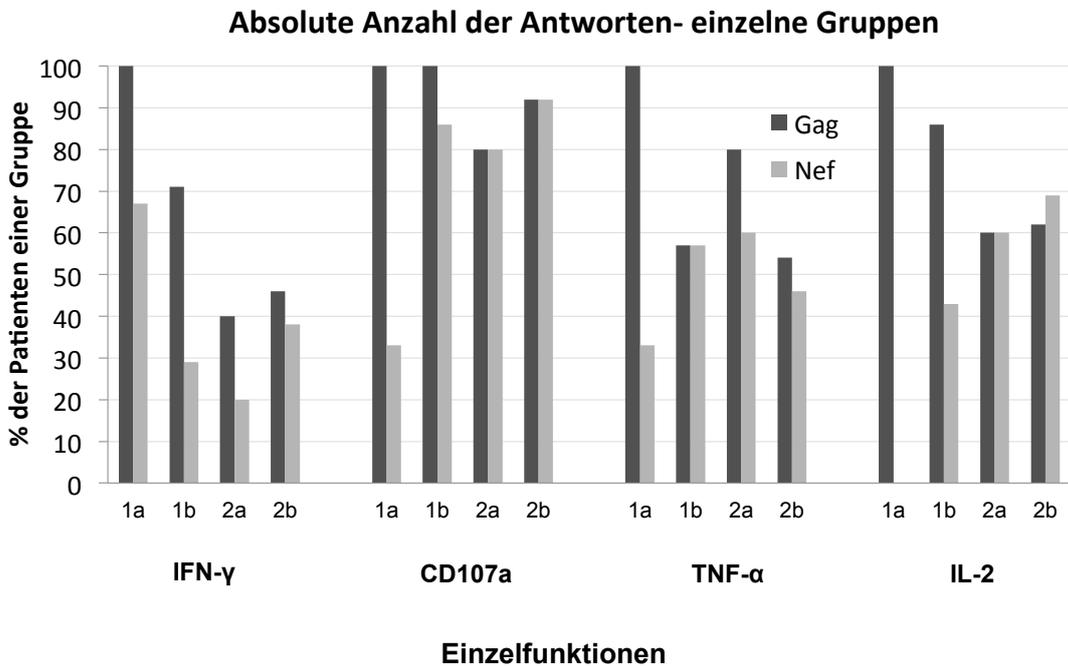


Abbildung 23: Anzahl und Stärke der Antworten für alle Gruppen zusammen. Dargestellt sind hier jeweils die Anzahl, sowie die Stärke der Antworten für die Einzel-, Doppel- und Dreifachkombinationen. Angegeben ist jeweils die Summe der Antworten aller vier Gruppen 1a, 1b, 2a und 2b zusammen. Die Anzahl der Antworten ist als Prozent aller 28 Patienten angegeben, die Stärke der Antworten als Median aller Antworten auf die entsprechende Einzel-, Doppel oder Dreifachfunktion.

Die meisten Patienten zeigten Antworten für die Einzelfunktionen CD107a (Gag: 93%, Nef: 82%) und IL-2 (Gag: 77%, Nef: 54%), gefolgt von der Funktion TNF- α (Gag: 64%, Nef: 50%). Die geringsten Antworten zeigten sich für IFN- γ (Gag: 57%, Nef: 36%). Bei den Funktionskombinationen zeigten die meisten Patienten eine Antwort auf die Doppelfunktion CD107a/ IL-2 (Gag: 71%, Nef: 54%) und für die Dreifachfunktion CD107a/ TNF- α / IL-2 (Gag: 50%, Nef: 25%). Für diese Doppel- und Dreifachfunktionen zeigten sich auch die stärksten Antworten, ebenso für die Einzelfunktion CD107a. Die Stärke der Einzelfunktion IFN- γ übertraf die Stärke der Einzelfunktion IL-2, am geringsten war die Antwort der Funktion TNF- α . Für die Anzahl der Antworten galt, dass es für jede Kombination mehr Antworten auf Gag als auf Nef gab. Für die Stärke der Antworten traf dies nicht immer zu.

Betrachtete man die Anzahl der Antworten für die einzelnen Gruppen getrennt, so zeigte sich, dass prozentual in Gruppe 1a die meisten Patienten Immunantworten aufwiesen. Dies galt bei Gag sowohl für alle Einzel-, als auch für alle Doppel- und Dreifachfunktionen, bei Nef war dies nicht so deutlich (Abb. 24). Allerdings war die Gruppe 1a die kleinste Gruppe mit nur drei Patienten, im Gegensatz zur Gruppe 1b (sieben Patienten) und zu den Gruppen 2a (fünf Patienten) und 2b (13 Patienten).



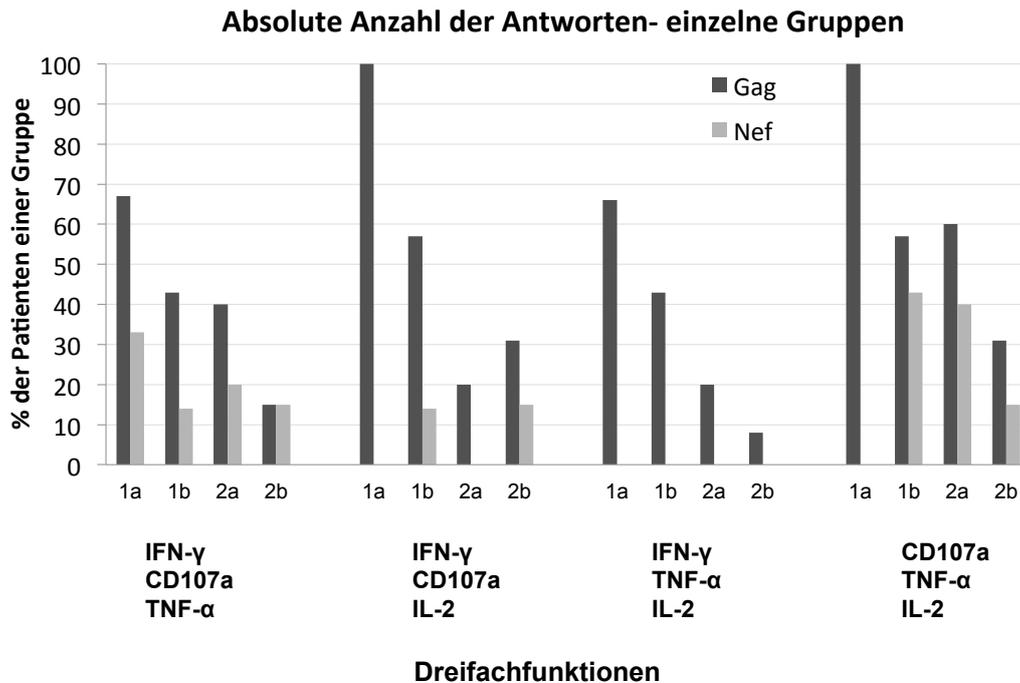


Abbildung 24: Anzahl der Antworten für die einzelnen Gruppen: Einzel-, Doppel- und Dreifachfunktionen. Dargestellt ist die Anzahl der Antworten für die vier Gruppen 1a, 1b, 2a und 2b getrennt. Die Anzahl der Antworten ist in Prozent aller Patienten der entsprechenden Gruppe angegeben. Bei Gag zeigten prozentual in Gruppe 1a die meisten Patienten Immunantworten. Beachtet werden muss allerdings, dass sich in Gruppe 1a lediglich drei Patienten befanden. Für die Einzelfunktionen IFN- γ , CD107a und IL-2, sowie für die meisten Doppel- und Dreifachfunktionen folgte der Gruppe 1a die Gruppe 1b an zweiter Stelle, nicht galt dies für die Einzelfunktion TNF- α , die Doppelfunktionen CD107a/TNF- α und TNF- α /IL-2, sowie die Dreifachfunktion CD107a/TNF- α /IL-2, hier folgte die Gruppe 2a an zweiter Stelle. Insgesamt zeigten für Gag die Gruppen mit steigender Viruslast (Gruppe 1a und 1b) einen höheren Prozentsatz an Patienten mit Immunantworten als die Gruppen mit gleichbleibender Viruslast (Gruppen 2a und 2b). Für Nef ließ sich keine eindeutige Aussage treffen, die Immunantworten in den Gruppen unterschieden sich stark für alle Funktionen.

Nicht jeder Patient zeigte also eine Antwort für jede Funktion. Deshalb gab es manche Einzelfunktionen bzw. Funktionskombinationen, für die es nur wenige Datenpunkte gab. Aus diesem Grund beurteilten wir für die Stärke der Antworten die Gruppen nicht einzeln im Querschnitt, sondern zusammengefasst als Gruppe „VL-Anstieg“ vs. Gruppe „VL konstant“ bzw. Loser vs. Nonloser. Sowohl für die Einzel-, als auch für die Doppel- und Dreifachkombinationen zeigte sich in der Mehrzahl der Fälle kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ bzw. Loser und Nonloser. Die CD8-Antworten unterschieden sich also nicht signifikant zwischen den einzelnen Gruppen. Beispielhaft ist hier die Doppelfunktion IFN- γ /CD107a Gag dargestellt (Abb. 25).

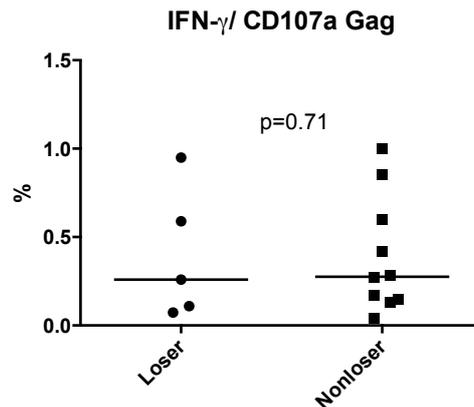


Abbildung 25: Beispielhafte Darstellung der CD8-Antworten. Die CD8-Antworten unterschieden sich in der Mehrzahl der Fälle nicht signifikant zwischen den Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ bzw. zwischen den Gruppen Loser und Nonloser. Beispielhaft sind hier die CD8-Antworten für die Doppelfunktion IFN- γ / CD107a Gag dargestellt. Die Gruppen mit Loser und Nonloser unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p=0.71$).

Es gab jedoch einige Ausnahmen: Bei den Einzelfunktionen zeigte sich für CD107a sowohl bei Gag, als auch bei Nef ein signifikanter Unterschied. Für Gag wies die Gruppe „VL-Anstieg“ signifikant höhere CD107a-Werte auf als die Gruppe „VL konstant“ ($p=0.02$), beim Vergleich der Gruppen Loser und Nonloser zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0.60$) (Abb. 26 A). Bei der Korrelationsuntersuchung der CD107a-Expression mit der Viruslast zeigte sich dann allerdings keine positive Korrelation (Daten nicht gezeigt). Für Nef wies die Gruppe Loser signifikant höhere CD107a-Werte auf also die Gruppe Nonloser ($p=0.03$), für die Gruppen mit steigender und mit gleichbleibender Viruslast zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0.48$) (Abb. 26 B).

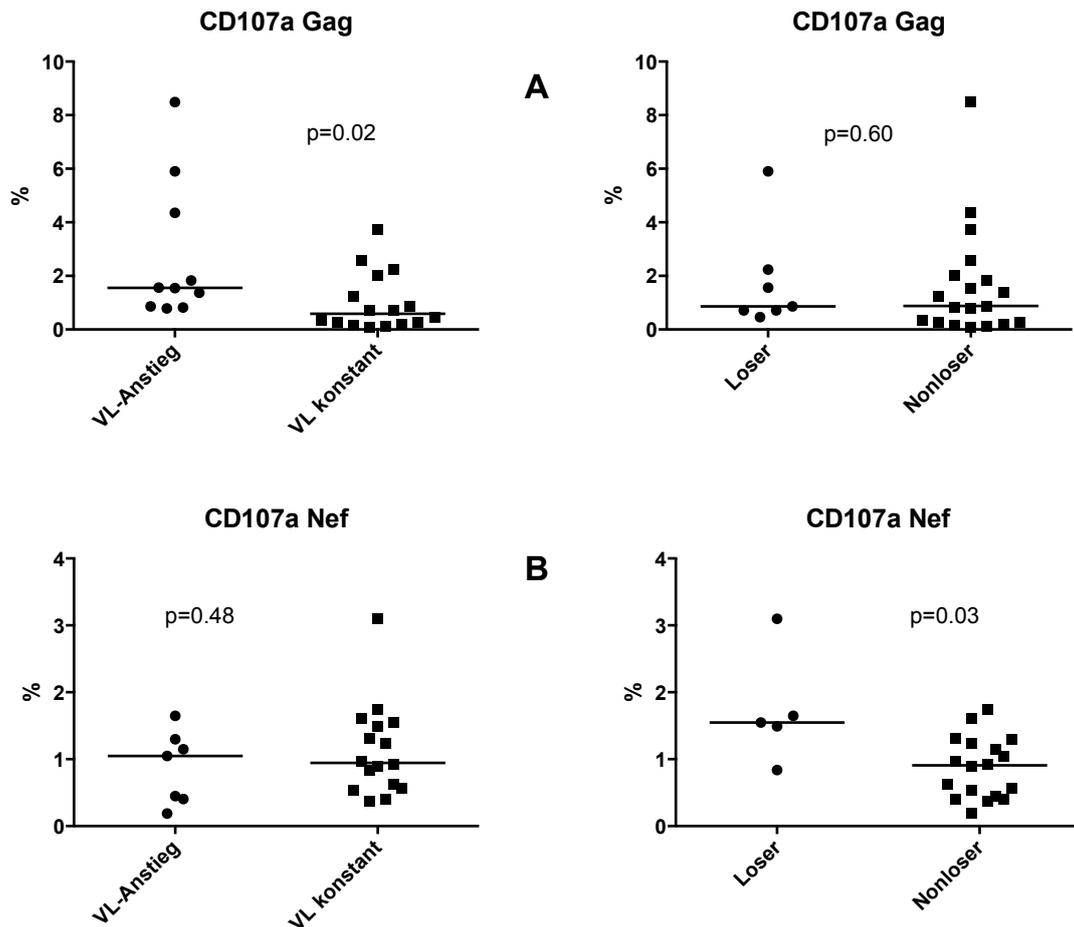


Abbildung 26: CD107a-Expression, Gag und Nef. A Für die Einzelfunktion CD107a wies die Gruppe „VL-Anstieg“ für Gag eine signifikant höhere CD107a-Expression auf als die Gruppe „VL konstant“ ($p=0.02$), zwischen den Gruppen Loser und Nonloser zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0.60$). B Für Nef galt: Die Gruppe Loser wies signifikant höhere CD107a-Werte auf als die Gruppe Nonloser ($p=0.03$), zwischen den Gruppen „VL-Anstieg“ und „VL konstant“ zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0.48$).

Bei den Doppelfunktionen zeigten sich für die Kombinationen CD107a/ TNF- α Gag und CD107a/ IL-2 Gag für die Gruppe „VL-Anstieg“ signifikant höhere Antworten als für die Gruppe „VL konstant“ ($p=0.03$ bzw. $p=0.04$) (Abb. 27), für die Gruppen Loser und Nonloser galt dies nicht ($p=1.00$ bzw. $p=0.89$) (nicht gezeigt).

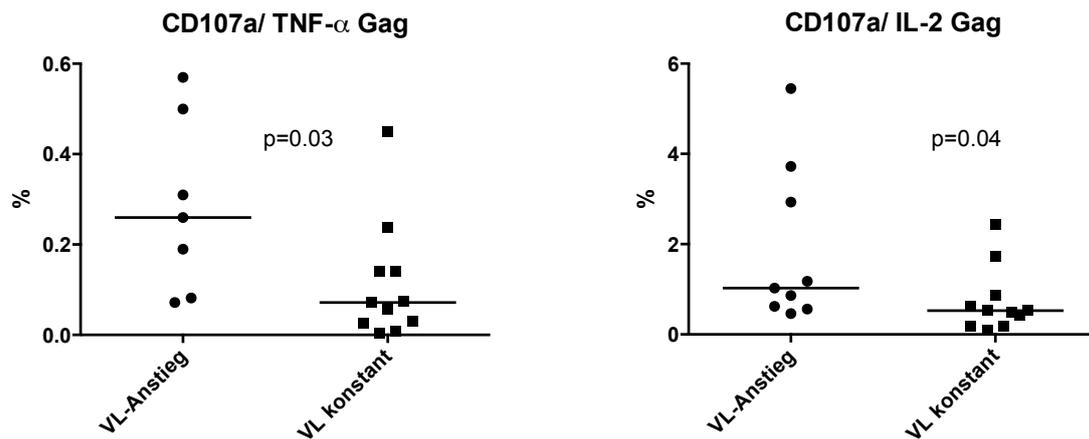


Abbildung 27: Doppelfunktionen- signifikante Unterschiede. Für die Kombinationen CD107a/ TNF- α Gag und CD107a/ IL-2 Gag zeigte die Gruppe „Viruslast-Anstieg“ signifikant höhere Antworten als für die Gruppe „VL konstant“ (p=0.03 bzw. p=0.04).

Für die longitudinalen Untersuchungen galt das Gleiche wie für die Querschnittsuntersuchungen: Nicht alle Patienten zeigten CD8+ T-Zellantworten für alle Funktionen. Da sich jedoch in den Querschnittsuntersuchungen für die Mehrzahl der Kombinationen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte, fassten wir die Gruppen 1a, 1b, 2a und 2b für diese nicht signifikanten Kombinationen zu einer gemeinsamen Gruppe zusammen. Im Folgenden sind die Ergebnisse für diese gemeinsame Gruppe dargestellt. Für die Mehrzahl der Kombinationen galt dabei, dass die CD8+ T-Zellantworten im longitudinalen Verlauf tendenziell abnahmen. Allerdings war diese Abnahme der CD8+ T-Zellantworten für keine Funktion bzw. Funktionskombination signifikant. Für jede Kombination gab es Patienten, die im Verlauf mit ihren CD8+ T-Zellantworten zunahmen oder abnahmen, meist gab es jedoch mehr Patienten, deren CD8+ T-Zellantworten sanken. Beispielhaft ist hier die Doppelfunktion IFN- γ / IL-2 Gag dargestellt (Abb. 28).

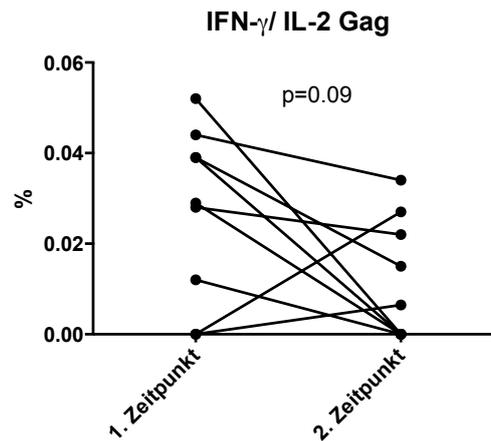


Abbildung 28: Doppelexpression IFN- γ / IL-2 Gag im longitudinalen Verlauf. Die meisten Patienten sanken im longitudinalen Verlauf mit ihren CD8-Antworten ab, allerdings nicht alle Patienten. Es zeigte sich keine Signifikanz für die Abnahme der Antworten ($p=0.09$).

Insgesamt zeigte sich also bei der Mehrzahl der Funktionskombinationen kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Patientengruppen, allerdings sind die zahlreichen Ausnahmen zu beachten.

4 DISKUSSION

4.1 Patienten

Nur sehr wenige HIV-infizierte Menschen sind in der Lage, die Infektion über eine lange Zeit zu kontrollieren, wodurch ein Fortschreiten ins Stadium AIDS verhindert wird. Diese sogenannten Longterm-Nonprogressor (LTNP) zeichnen sich durch eine stabile CD4-Zellzahl bei niedriger Viruslast aus [126, 127]. Die Gesamtheit der Mechanismen, die hinter der Kontrolle der HIV-Infektion stecken, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Bei den Affen sind andererseits schon seit Längerem sogenannte natürliche Wirte der SIV-Infektion bekannt, die trotz jahrelanger Infektion mit dem Affenvirus SIV nicht ins Stadium AIDS fortschreiten [115]. Zwischen den natürlichen Wirten der SIV-Infektion und den LTNP der HIV-Infektion existiert jedoch ein fundamentaler Unterschied: Natural hosts weisen sehr hohe Viruslasten bei normaler CD4-Zellzahl auf [116, 117, 121], anders als ein Teil der LTNP sind sie also nicht in der Lage, die SI-Viruslast niedrig zu halten- so wie die meisten Menschen nicht in der Lage sind, die HI-Viruslast zu kontrollieren. Es muss also Mechanismen geben, die, trotz einer ineffizienten Abtötung des Virus, vor dem Fortschreiten der Infektion ins Stadium AIDS schützen. Diese Mechanismen werden bei Affen intensiv erforscht, sie sind allerdings nur zum Teil verstanden. Nur unzureichend bekannt ist bis heute, ob solche Mechanismen auch beim Menschen existieren, ob es also natürliche Wirte der HIV-Infektion gibt, die trotz hoher Viruslasten ihre CD4-Zellzahl stabil halten können. Diese Erkenntnisse könnten aber entscheidend sein, um der langfristigen Kontrolle der HIV-Infektion ein Stück näher zu kommen.

Bisher existieren nur einige wenige Studien, die sich mit Patienten beschäftigt haben, die Charakteristika der Natural hosts, also eine hohe CD4-Zellzahl trotz hoher Viruslast, aufweisen [141, 142]. Unter anderem konnten Choudhary et al. zeigen, dass Patienten mit hoher Viruslast und hoher CD4-Zellzahl über Jahre hinweg eine vergleichsweise geringe Immunaktivierung aufweisen, gemessen über die Höhe der CD38-Expression der CD4+ und der CD8+ T-Zellen [141]. Allerdings wurden in dieser Studie lediglich drei Patienten mit Charakteristika der natürlichen Wirte untersucht und in den beiden Kontrollgruppen fanden sich jeweils nur vier Patienten. Eine statistische Aussage war

damit nicht möglich. Eine weitere Studie beschäftigte sich ebenfalls mit möglichen natürlichen Wirten der HIV-Infektion. So konnten Rotger et al. unter anderem ebenfalls zeigen, dass Patienten mit hoher Viruslast und hoher CD4-Zellzahl eine geringere Immunaktivierung aufwiesen als Patienten, die rasch mit der Infektion fortschritten [142]. Allerdings befanden sich auch in dieser Studie nur eine geringe Patientenzahl von sechs Patienten und außerdem keine longitudinalen Untersuchungen. Eine systematische Analyse der Immunaktivierung, der Immunerschöpfung, sowie insbesondere der Anzahl, Stärke und Qualität der CD8+ Immunantwort möglicher natürlicher Wirte der HIV-Infektion fehlte bis zur Durchführung unserer Studie.

Vor einigen Jahren war uns in unserer Ambulanz ein Patient aufgefallen, Patient CO 58, der trotz jahrzehntelanger HIV-Infektion und nur einer kurzen Therapiephase vor über 20 Jahren hohe Viruslasten aufwies, aber mit seiner CD4-Zellzahl stabil blieb (vgl. Tabelle 3). Ausgehend von diesem Patienten definierten wir vier verschiedene Patientengruppen, die sich durch den Verlauf ihrer Viruslasten und CD4-Zellzahlen über mindestens vier Jahre unterschieden. Wir wählten den Parameter Viruslast, da er stark mit dem Fortschreiten der HIV-Infektion korreliert: je höher die Viruslast, desto rascher der Krankheitsfortschritt [134, 136-139]. Damit ist der sogenannte „virale Set-Point“, die Höhe der Viruslast am Ende der akuten Phase der Infektion, ein starker Prädiktor für den weiteren Krankheitsverlauf [138]. Für die Gruppe 1a war es definitionsgemäß am schwierigsten, Patienten zu finden, da sie bei steigender Viruslast und abfallender CD4-Zellzahl meist schnell mit einer antiretroviralen Therapie beginnen und deswegen nicht über 4 Jahre ohne Therapie verfolgt werden können (wie es unsere Definition verlangte). Zwei der drei Patienten in Gruppe 1a wiesen einen CD4-Verlust nahe der Definitionsgrenze von 60 Zellen pro Jahr auf. Eine eindeutige Aussage über die Ergebnisse der Gruppe 1a kann also, auch aufgrund der geringen Patientenzahl, nicht immer getroffen werden. In die restlichen Gruppen konnten mehr Patienten eingeschlossen werden.

Natürliche Wirte der SIV-Infektion zeichnen sich durch hohe und stabile CD4-Zellzahlen [121], sowie durch eine stabile Viruslast im Verlauf aus [143, 144], ganz im Gegensatz zu jenen Patienten, die mit der Infektion fortschreiten und durch einen starken Anstieg der Viruslast im Verlauf gekennzeichnet sind [145].

Zunächst betrachteten wir die Viruslasten der einzelnen Patienten, da diese sich zum Teil deutlich voneinander unterschieden. So wies beispielsweise der Patient PR 32 aus Gruppe 1b mit 312.816 Kopien pro ml Blut die höchste Viruslast auf und unterschied

sich damit deutlich von Patient CO 28, ebenfalls aus Gruppe 1b, der mit 6.207 Kopien pro ml Blut die niedrigste Viruslast aufwies. Auch innerhalb einer Gruppe schwankten die Viruslasten also zum Teil stark. Entscheidendes Kriterium war für uns allerdings, dass sich die Viruslasten der CD4-Loser und -Nonloser nicht signifikant voneinander unterschieden, was auch der Fall war (vgl. Abb. 8).

Letztlich ist es jedoch fraglich, ob die von uns untersuchten CD4-Nonloser tatsächlich natürliche Wirte der HIV-Infektion sind. Am wahrscheinlichsten trifft dies auf Patient CO 58 aus der Gruppe der CD4-Nonloser zu, der eine geringe Immunaktivierung und gleichzeitig eine geringe Immunerschöpfung aufwies und seine CD4-Zellzahl über viele Jahre stabil hielt. Allerdings zeigte Patient CO 58 nur einen CD4-Verlust von 14 Zellen pro Jahr, also deutlich geringer als unsere Definitionsgrenze. Wir wollten uns jedoch mit unserer Definitionsgrenze an den durchschnittlichen CD4-Verlust der MACS-Kohorte, und damit etablierten Werten, halten. Außerdem könnte neben Patient CO 58 auch der Patient CO 08 ein natürlicher Wirt der HIV-Infektion sein, da er ebenfalls eine geringe Immunaktivierung und eine geringe Immunerschöpfung aufwies. CO 08 zeigte einen höheren CD4-Verlust von 44 Zellen pro Jahr, also deutlich näher an der Definitionsgrenze. Insgesamt ist es äußerst schwierig, natürliche Wirte der HIV-Infektion zu identifizieren. In der Zusammenschau unserer Beobachtungen mit denen aus der Literatur [141, 142] gehen wir jedoch davon aus, dass es natürliche Wirte der HIV-Infektion gibt. Da es sich jedoch bei den meisten Patienten unserer Studie eher nicht um natürliche Wirte der HIV-Infektion handelt, bezeichnen wir sie im Verlauf immer mit CD4-Nonloser.

Die vorliegende Studie ist der erste Versuch einer systematischen Analyse der Expression der Oberflächenmoleküle CD38, PD-1 und CD44 auf CD4+ und CD8+ Zellen, sowie der Anzahl, Stärke und Qualität der CD8-Antworten bei einer größeren Anzahl Patienten, die trotz hoher Viruslasten über viele Jahre mit ihrer CD4-Zellzahl konstant bleiben. Die Ergebnisse der einzelnen Parameter werden nun im Folgenden diskutiert.

4.2 Die CD38-Expression als Zeichen der Immunaktivierung

Die chronische, systemische Immunaktivierung ist eines der Hauptcharakteristika der fortschreitenden HIV-Infektion [146]. Interessanterweise entdeckte man, dass Natural

hosts der SIV-Infektion in der chronischen Phase der Infektion eine bedeutend geringere Immunaktivierung und einen geringeren Übertritt mikrobieller Produkte in das Blutsystem zeigen als SIV-infizierte Rhesusaffen oder HIV-infizierte Menschen [80, 121, 122]. Die fehlende chronische Immunaktivierung wird deshalb als einer der Hauptgründe für die gute Kontrolle der SIV-Infektion bei Natural hosts angesehen [147].

Ein Zeichen der chronischen Immunaktivierung ist die Expression des Glykoproteins CD38 auf der Oberfläche CD8⁺ T-Zellen [83]. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Höhe der Viruslast, als auch die Höhe der CD38-Expression mit dem Voranschreiten der Erkrankung korrelieren [85-90, 138, 148]. Je höher die Viruslast, desto höher also die CD38-Expression und umgekehrt. Diese Beobachtung konnte von uns teilweise bestätigt werden: in den Gruppen 1a und 1b, also den Gruppen mit den höheren Viruslasten, zeigte sich eine höhere CD38-Expression als in den Gruppen 2a und 2b und in der Gruppe mit steigender Viruslast korrelierte die Höhe der CD38-Expression signifikant mit der Höhe der Viruslast. Von den natürlichen Wirten der SIV-Infektion ist bekannt, dass sie bei ähnlich hoher Viruslast eine weitaus geringere Immunaktivierung aufweisen als SIV-infizierte Rhesusaffen [121, 122]. Eine ähnliche Beobachtung machten wir für die Gruppe mit stabiler Viruslast, denn hier war die positive Korrelation zwischen Viruslast und CD38-Expression aufgehoben. Interessanterweise sagt also auch beim Menschen die Höhe der Viruslast nicht immer die Höhe der Immunaktivierung voraus. Bemerkenswert waren diese Erkenntnisse insbesondere vor dem Hintergrund unserer Gruppeneinteilung: nur in der Gruppe mit stabiler Viruslast, eines der Kennzeichen der natürlichen Wirte der SIV-Infektion, war die Korrelation zwischen Viruslast und Immunaktivierung aufgehoben, in der Gruppe mit steigender Viruslast jedoch nicht. Dies deutet darauf hin, dass auch bei bestimmten therapie-naiven Menschen eine Entkopplung von Immunaktivierung und Viruslast vorhanden ist, wie auch bei den natürlichen Wirten der SIV-Infektion. Zusätzlich stellten wir fest, dass die Gruppe mit stabiler Viruslast bei den HIV-spezifischen Zellen eine signifikant geringere Immunaktivierung als die Gruppe mit steigender Viruslast zeigte. Dies stimmte mit der Beobachtung von Choudhary et al. überein, die bei den drei untersuchten Patienten mit stabilen CD4-Zellzahlen und hohen, aber stabilen Viruslasten eine signifikant geringere CD38-Expression als bei jenen Patienten mit steigenden Viruslasten und fallenden CD4-Zellzahlen zeigen konnten [141].

Bei unseren longitudinalen Untersuchungen ergab sich für die Gesamtheit der CD8+ T-Zellen eine weitere interessante Beobachtung: in Gruppe 2b, der Gruppe mit stabiler Viruslast und stabiler CD4-Zellzahl, beides Charakteristika der natürlichen Wirte der SIV-Infektion, zeigte sich eine signifikante Abnahme der CD38-Expression im Verlauf. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass eine geringe CD38-Expression eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Infektion spielt.

Allerdings zeigte sich beim direkten Vergleich der beiden Gruppen CD4-Loser und CD4-Nonloser kein signifikanter Unterschied in der CD38-Expression zwischen den beiden Gruppen. Es zeichnete sich aber ein Trend dahingehend ab, dass CD4-Nonloser geringere CD38-Expressionen aufweisen als CD4-Loser. Mögliche Gründe für die mangelnde Signifikanz könnten zum einen eine zu geringe Patientenzahl sein, um einen signifikanten Unterschied feststellen zu können. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die CD38-Expression als Zeichen der Immunaktivierung vielleicht doch keine Rolle für den guten Verlauf in unseren Gruppen spielt. Dagegen sprechen oben genannte Ausführungen und die Tatsache, dass es durchaus Patienten gab, wie zum Beispiel die Patienten CO 08 und CO 58 der Gruppe der CD4-Nonloser, die trotz hoher Viruslasten nur einen geringen CD4-Verlust und gleichzeitig eine geringe CD38-Expression aufwiesen. Viel wahrscheinlicher ist deshalb ein dritter Grund für die fehlende Signifikanz: wie auch bei LTNP der HIV-Infektion ist es bei Patienten mit hohen Viruslasten und stabilen CD4-Zellzahlen möglich, dass die Gruppe heterogen ist [149, 150]. Es könnte sein, dass eine geringe CD38-Expression bei lediglich einem Teil der Patienten für die gute Kontrolle der Infektion verantwortlich ist. Bei den restlichen Patienten der Gruppe könnten andere, noch zu untersuchende Parameter eine Rolle spielen. Für die Zukunft ist es also wichtig, die Patientengruppen zu vergrößern und zusätzliche Marker der Immunaktivierung zu identifizieren, die ebenfalls ein Grund für die gute Kontrolle der Infektion sein könnten.

4.3 Die PD-1-Expression als Zeichen der Immunerschöpfung

Die chronische Immunaktivierung führt langfristig zu einer Erschöpfung des Immunsystems und zu einem Verlust der Effektorfunktionen der CD4+ und der CD8+ T-Zellen [95]. Der wichtigste inhibitorische Marker, der mit dem Fortschreiten der Infektion auf der Oberfläche CD4+ und CD8+ T-Zellen hochreguliert wird und

wichtige Funktionen der Zellen hemmt, ist das Oberflächenmolekül PD-1 [96, 98-101]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Höhe der PD-1-Expression mit der Höhe der Viruslast korreliert [98, 99, 151, 152]. Andererseits konnte die positive Korrelation zwischen PD-1 und Viruslast nicht von allen Arbeitsgruppen bestätigt werden, jedoch zeigte sich hier ein Trend hin zu einer positiven Korrelation zwischen Höhe der Viruslast und Höhe der PD-1-Expression [100, 153]. Ähnliche Beobachtungen konnten auch wir bei unseren Untersuchungen machen. So korrelierte die PD-1-Expression in der Gruppe mit steigender Viruslast signifikant mit der Höhe der Viruslast, in der Gruppe mit stabiler Viruslast war diese Korrelation jedoch aufgehoben. Interessant ist dabei, dass wir die gleichen Beobachtungen bereits bei unseren Korrelationsuntersuchungen mit CD38 und Viruslast machen konnten, auch bei CD38 korrelierte die CD38-Expression nur in der Gruppe mit steigender Viruslast signifikant mit der Viruslast, in der Gruppe mit gleichbleibender Viruslast war diese Korrelation ebenfalls aufgehoben. Zusätzlich legen unsere Beobachtungen also einen Zusammenhang zwischen der CD38- und der PD-1-Expression nahe, der auch schon von unserer wie auch von einigen anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte [105, 154, 155]. Eine geringe PD-1-Expression könnte also letztlich ebenso wie eine geringe CD38-Expression in der chronischen Phase der Infektion zu einer stabilen Viruslast und zu einer Kontrolle der Infektion beitragen.

Bei der Betrachtung der einzelnen Gruppen zeigte sich bei unseren Untersuchungen, dass die HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen eine teilweise signifikant höhere PD-1-Expression aufwiesen als die Gesamtheit der CD8⁺ T-Zellen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen von Salisch et al. und Pettersen et al., die zeigen konnten, dass HIV-spezifische CD8⁺ T-Zellen signifikant höhere PD-1-Expressionen aufwiesen als die Gesamtheit der CD8⁺ T-Zellen [152, 156]. Zusätzlich verglichen Salisch et al. den Prozentsatz der PD-1⁺, HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zwischen LTNP und solchen Patienten, die rasch mit der Infektion fortschritten. Dabei stellten sie fest, dass für den Prozentsatz an PD-1⁺ Zellen bei LTNP und Patienten, die rasch mit der Infektion fortschritten, nur ein Trend bezüglich des Unterschieds bestand [152]. Ein Vergleich der PD-1-Expression der Gesamtheit der CD8⁺ T-Zellen zwischen den beiden Gruppen wurde nicht durchgeführt. Ähnliche Beobachtungen wie Salisch et al. konnten wir beim Vergleich der PD-1-Expression der beiden Gruppen mit stabiler bzw. ansteigender Viruslast machen. Bei den HIV-spezifischen CD8⁺ Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der PD-1-Expression der beiden Gruppen mit

stabiler und steigender Viruslast, jedoch zeigte sich bei unseren Untersuchungen auch kein Trend. Interessant ist jedoch, dass die Gruppe 1a der Gruppe der CD4-Loser für die PD-1-Expression der HIV-spezifischen Zellen den höchsten Median und damit höhere PD-1-Werte als die Gruppe der CD4-Nonloser aufwies. Für die Gesamtheit der CD8+ T-Zellen zeigte sich bei der Gruppe mit stabiler Viruslast eine tendenziell signifikant geringere PD-1-Expression als bei der Gruppe mit steigender Viruslast. Einerseits kann man also bestätigen, dass eine hohe PD-1-Expression in der chronischen Phase der Infektion mit einer mangelnden Kontrolle der Infektion und einem Anstieg der Viruslast assoziiert ist. Andererseits kann PD-1 nicht der einzige dafür verantwortliche Marker sein. Eine weitere Beobachtung, die für diese Vermutung spricht, ist die starke Streuung der PD-1-Expression auch innerhalb der einzelnen Patientengruppen, die auch Salisch et al. bei ihren Patienten beobachten konnten [152]. Nicht alle Patienten mit raschem Krankheitsfortschritt zeigten eine hohe PD-1-Expression. So gab es Patienten wie zum Beispiel den Patienten PR 62 aus Gruppe 1a, der trotz sehr hoher Viruslast und einem starken Viruslast-Anstieg nur eine vergleichsweise geringe PD-1-Expression aufwies. Zusätzlich zeigte sich bei unseren Untersuchungen beim Vergleich der Höhe der PD-1-Expression der beiden Gruppen CD4-Loser und CD4-Nonloser kein signifikanter Unterschied, obwohl es wieder einige Patienten gab, wie zum Beispiel die Patienten CO 08 und CO 58 der Gruppe der CD4-Nonloser, die trotz hoher Viruslasten nur einen geringen CD4-Verlust und gleichzeitig eine geringe CD38-Expression und eine geringe PD-1-Expression aufwiesen. Nur bei einem Teil der Patienten war also eine geringe PD-1-Expression mit einer stabilen Viruslast assoziiert, nicht jedoch bei allen Patienten. Über die PD-1-Expression in der chronischen Phase der SIV-Infektion bei Natural hosts ist nur sehr wenig bekannt. Zahn et al. konnten zeigen, dass zwischen den Natural hosts der SIV-Infektion und SIV-infizierten Rhesusaffen kein signifikanter Unterschied in der Höhe der PD-1-Expression der CD8+ T-Zellen bestand, beide Affenarten wiesen in der chronischen Phase der SIV-Infektion ähnlich hohe PD-1-Expressionen auf [157]. Allerdings galt dies nur für die Gesamtheit der CD8+ T-Gedächtniszellen, beim Vergleich der PD-1-Expression der beiden Untergruppen der Gedächtniszellen, Effektor- und zentrale Gedächtniszellen, zeigte sich, dass Natural hosts eine signifikant geringere PD-1-Expression der zentralen Gedächtniszellen aufwiesen als Rhesusaffen, bei den Effektor-Gedächtniszellen zeigte sich kein Unterschied [157]. Es könnte also sein, dass wir bei unseren Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied feststellen konnten, da wir die Gesamtheit der CD8+ T-Zellen bzw. die HIV-spezifischen CD8+ T-

Zellen betrachteten, nicht jedoch die einzelnen Untergruppen der Gedächtniszellen. Interessant wäre es also für die Zukunft, die PD-1-Expression auf den einzelnen Untergruppen der CD8⁺ T-Gedächtniszellen zu untersuchen.

Wie oben bereits erwähnt, wird PD-1 mit dem Fortschreiten der Infektion nicht nur auf der Oberfläche der CD8⁺ T-Zellen, sondern auch auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zellen hoch reguliert [158, 159]. Allerdings existieren weit weniger Studien über die Expression von PD-1 auf den CD4⁺ T-Zellen als auf den CD8⁺ T-Zellen.

Die CD4⁺ T-Zellen sind an der Abwehr der HIV-Infektion beteiligt [69, 70, 160-163]. Eine hohe PD-1-Expression auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zellen führt, ebenso wie eine hohe PD-1-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen, zu einem Verlust der T-Zellfunktionen und zum Fortschreiten der Infektion. So konnte gezeigt werden, dass LTNP eine geringere PD-1-Expression auf den CD4⁺ T-Zellen zeigen als jene Patienten, die rasch mit der Infektion fortschreiten [128, 159]. Zusätzlich kann durch eine Blockade von PD-1 die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen gesteigert und die CD4⁺ T-Zellfunktion verbessert werden [98, 158, 159, 164]. Eine hohe PD-1-Expression auf den CD4⁺ T-Zellen ist also neben einer hohen PD-1-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen ein Zeichen für die Erschöpfung der T-Zellantwort.

Sachdeva et al. konnten zeigen, dass die PD-1-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen höher ist als auf den CD4⁺ T-Zellen [155]. Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein. In mehreren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Höhe der PD-1-Expression der CD4⁺ T-Zellen mit der Höhe der Viruslast korreliert [98, 152, 158]. Bei unseren Untersuchungen konnten wir jedoch keine signifikanten Korrelationen zwischen der Höhe der PD-1-Expression und der Höhe der Viruslast feststellen, weder in der Gruppe mit stabiler, noch mit steigender Viruslast. Entsprechende Beobachtungen machten bereits Sachdeva et al. [155]. Ein Grund für die mangelnde Signifikanz bei unseren Untersuchungen könnte sein, dass wir uns nicht auf die HIV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, sondern auf die Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen konzentrierten. Die Mehrzahl der Studien über den Zusammenhang von PD-1 und Viruslast untersuchte die Höhe der PD-1-Expression auf der Oberfläche der HIV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen [98, 152, 158]. Bei unseren Untersuchungen fiel die IFN- γ -Produktion der CD4⁺ T-Zellen jedoch sehr gering aus, so dass eine HIV-spezifische CD4⁺ T-Zell-Population nicht definiert werden konnte.

Über die Höhe der PD-1-Expression der CD4⁺ T-Zellen bei natürlichen Wirten der SIV-Infektion existieren bisher keinerlei Daten. Bekannt ist allerdings, dass das Nef-Protein der Natural hosts die Eigenschaft hat, den CD3-Rezeptor auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zellen herunter zu regulieren [165, 166]. CD3 ist eine Schlüsselkomponente des T-Zell-Rezeptors und die verminderte CD3-Expression führt bei den natürlichen Wirten der SIV-Infektion gleichzeitig zu einer signifikant geringeren PD-1-Expression auf den CD4⁺ T-Zellen und dadurch zu einer verminderten T-Zell-Apoptose [165, 166]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine verminderte PD-1-Expression auch bei den natürlichen Wirten der SIV-Infektion zur guten Kontrolle der Infektion beitragen könnte. Das Nef-Protein der HIV-infizierten Menschen bzw. SIV-infizierten Rhesusaffen hat die Fähigkeit der Herabregulation des CD3-Rezeptors verloren, was eventuell einen entscheidenden Unterschied darstellt [165]. Beim Vergleich der PD-1-Expression auf der Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen zwischen den Gruppen mit steigender und stabiler Viruslast, sowie zwischen den Gruppen CD4-Loser und CD4-Nonloser konnten wir jedoch keine Unterschiede feststellen.

Zusammengefasst gibt es viele Hinweise darauf, dass eine geringe PD-1-Expression in der Kontrolle der HIV-Infektion eine wichtige Rolle spielt. Für unsere Gruppen fanden wir jedoch keine eindeutigen Hinweise dafür, dass Unterschiede in der PD-1-Expression auf den CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen Ursache für den unterschiedlichen Verlauf sind.

4.4 Der Aktivierungsmarker CD44

Naive CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen werden durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert. Daraufhin wandeln sich die naiven T-Zellen einerseits in kurzlebige Effektorzellen, andererseits in langlebige Gedächtniszellen um. Einer der Marker, der nach dem ersten Antigenkontakt auf der Oberfläche der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hochreguliert wird und an deren Aktivierung beteiligt ist, ist das Glykoprotein CD44 [106, 109, 110]. CD44 ist dabei essenziell in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Effektor- und Gedächtniszellen [111].

Es existieren bisher keinerlei Studien über die Rolle von CD44 in der chronischen SIV- bzw. HIV-Infektion. Da CD44 jedoch eine entscheidende Rolle in der Stimulierung der T-Zell-Immunantwort einnimmt [167], könnte eine hohe CD44-Expression möglicherweise zu einer besseren Kontrolle der Infektion beitragen. So konnten

Graham et al. zeigen, dass bei CD44-defizienten Mäusen im Vergleich zu nicht CD44-defizienten Mäusen die virus-spezifische CD8⁺ T-Zell-Expansion vermindert ist [168]. Zusätzlich konnten Blass et al. zeigen, dass eine Antikörperblockade von CD44 in *Toxoplasma gondii*-infizierten Mäusen zu einer mangelnden IFN- γ -Produktion durch CD4⁺ T-Zellen führt [169].

Bei unseren Untersuchungen stellten wir fest, dass die CD44-Expression in allen Patientengruppen sowohl bei den CD4⁺, als auch bei den CD8⁺ T-Zellen insgesamt sehr hoch war. Dies ist ein Zeichen für einen bereits stattgefundenen Antigenkontakt durch die Mehrzahl der T-Zellen. Dabei muss beachtet werden, dass wir die CD44-Expression im peripheren Blut untersuchten, nicht jedoch in den lymphatischen Organen wie dem Thymus, den Lymphknoten oder der Milz. CD8⁺ T-Zellen reifen im Thymus aus und werden anschließend in den sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten oder der Milz durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert. Die Aktivierung HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen und die Umwandlung von naiver T-Zelle in Effektor- oder Gedächtniszelle erfolgt also nicht im Blut, sondern in den sekundären lymphatischen Organen. Eine Untersuchung der Höhe der CD44-Expression auf der Oberfläche CD8⁺ T-Zellen in den lymphatischen Organen könnte deshalb weit geringere CD44-Werte ergeben.

Bei der Untersuchung der CD8⁺ T-Zellen fiel uns auf, dass die Gesamtheit der CD8⁺ T-Zellen höhere CD44-Werte aufwies als die HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. CD44 wird also vermutlich, anders als die beiden Marker CD38 und PD-1, nicht bevorzugt auf HIV-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu nicht-HIV-spezifischen T-Zellen hochreguliert. Die CD44-Expression korrelierte bei unseren Untersuchungen nicht mit der Viruslast. Zusätzlich konnten wir keine Unterschiede in der CD44-Expression zwischen den einzelnen Gruppen feststellen. Bei der Untersuchung der Doppelexpression von PD-1 und CD44 stellten wir sowohl bei den CD4⁺ T-Zellen, als auch bei den CD8⁺ T-Zellen fest, dass sich die Doppelexpression entsprechend der Einzelexpression von PD-1 verhielt, die Höhe der Doppelexpression wurde also hauptsächlich durch die Höhe der PD-1-Expression bestimmt. Eine eindeutige Aussage darüber, welche Rolle CD44 in der chronischen Phase der HIV-Infektion spielt und, ob eine hohe CD44-Expression essenziell ist für die Aufrechterhaltung der Effektorfunktionen oder vielmehr durch eine chronische T-Zell-Stimulierung zu einer Erschöpfung der T-Zell-Antworten führt, kann nicht gemacht werden. Klar ist jedoch, dass die CD44-vermittelten Signale wichtig für das Überleben der T-Zellen nach

Kontakt mit einem Antigen sind, da die Mehrzahl der von uns untersuchten Zellen hohe CD44-Werte zeigten.

4.5 Die CD8+ Immunantworten

Die CD8+ T-Zellen besitzen die Fähigkeit, virusinfizierte Zellen direkt oder über lösliche Faktoren zu eliminieren und nehmen dadurch eine Schlüsselstellung in der Kontrolle der HIV-/ SIV-Infektion ein [39-43]. Dennoch sind die meisten Menschen trotz anfänglich guter CD8-Antworten nicht in der Lage, die Infektion zu kontrollieren. Mit der Zeit erschöpfen die CD8+ T-Zellen, die Immunantwort wird ineffektiv und die Erkrankung schreitet fort.

Die Rolle der CD8+ T-Zellen in der Kontrolle der Infektion bei natürlichen Wirten der SIV-Infektion ist bisher nicht vollständig geklärt. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die natürlichen Wirte der SIV-Infektion durchaus CD8+ T-Zellantworten auf das SI-Virus zeigen [157, 170] und in der akuten Phase der SIV-Infektion sind starke polyfunktionelle SIV-spezifische T-Zell-Antworten für einen Rückgang der Viruslast verantwortlich [171]. Andererseits führt die Depletion der CD8+ T-Zellen in den natürlichen Wirten der SIV-Infektion nur zu einem geringen Anstieg der Viruslast und hat, im Gegensatz zur CD8-Depletion in Rhesusaffen oder in anderen nicht-natürlichen Wirten der SIV-Infektion, keinerlei Effekt auf die Krankheitsprogression [172-174].

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Anzahl und Stärke der CD8+ Immunantworten in den unterschiedlichen Patientengruppen. Dafür verwendeten wir den Interferon- γ -Elispot, der den Vorteil der Stimulation mit Einzelpeptiden hat im Vergleich zur Stimulation mit einem Pool aus mehreren Peptiden bei der Durchflusszytometrie. Durch die Stimulation mit Einzelpeptiden kann festgestellt werden, wie viele Virusepitope vom Patienten erkannt werden und wie stark die Antworten auf jedes einzelne Peptid sind. Außerdem ist die Elispot-Untersuchung sehr sensitiv und stellt auch schwache Antworten dar im Vergleich zur Durchflusszytometrie [157, 175].

Bei den Elispot-Untersuchungen konnten wir feststellen, dass weder die Anzahl, noch die Stärke der IFN- γ -Antworten mit der Viruslast korrelierten. Innerhalb der einzelnen Gruppen variierten die Anzahl und Stärke der Antworten zum Teil stark und beim

Vergleich der Gruppen mit stabiler und steigender Viruslast, sowie bei den Gruppen CD4-Loser und CD4-Nonloser konnten wir keinen signifikanten Unterschied feststellen, ebenso wenig bei den longitudinalen Untersuchungen. Diese Beobachtungen stimmen mit zahlreichen Studien überein, in denen gezeigt werden konnte, dass keine Korrelation zwischen der Anzahl und Stärke der IFN- γ -Antwort und der Viruslast besteht [57-59, 61]. Eine niedrige Viruslast ist also nicht zwingend das Resultat einer besonders starken IFN- γ -Antwort. Zusätzlich ist zu beachten, dass IFN- γ die letzte Funktion ist, die bei erschöpften CD8⁺ T-Zellen verloren geht [56], deshalb ist eine starke IFN- γ -Produktion nicht immer gleichbedeutend mit einer potenten Immunantwort [60, 67]. Gleiche Beobachtungen wie bei den HIV-infizierten Menschen wurden auch beim Vergleich der Anzahl und Stärke der INF- γ -Antworten bei natürlichen Wirten der SIV-Infektion und Rhesusaffen gemacht. Natürliche Wirte der SIV-Infektion und Rhesusaffen wiesen ähnlich starke IFN- γ -Antworten auf [120, 157, 170] und weder bei den Rhesusaffen, noch bei den natürlichen Wirten der SIV-Infektion korrelierten die Anzahl und Stärke der IFN- γ -Antworten mit der Viruslast oder der Höhe der CD4-Zellzahl [120, 170]. Besonders starke Antworten sind also vermutlich nicht verantwortlich für die Kontrolle der SIV-Infektion.

Bemerkenswert war allerdings, dass sich bei unseren Untersuchungen eine Ausnahme zeigte: Die Gruppe mit steigender Viruslast zeigte bei den Antworten auf Gag signifikant mehr IFN- γ -Antworten als die Gruppe mit stabiler Viruslast. Diese Beobachtung war deshalb auffällig, da Immunantworten auf Gag als protektiver gelten als die Immunantworten auf Nef und mit einer geringeren Viruslast und einer höheren CD4-Zellzahl assoziiert sind [129, 176-180]. Allerdings konnten bereits Addo et al. in ihren Untersuchungen zeigen, dass zu den Patienten mit den stärksten Antworten sowohl ein LTNP mit einer Viruslast unter 50 Kopien pro ml Blut, also auch ein Patient mit raschem Krankheitsfortschritt und hoher Viruslast zählten [59]. Die signifikant höhere Anzahl der Immunantworten auf Gag, die wir zeigen konnten, muss also nicht gleichbedeutend sein mit einer besseren Kontrolle der Infektion.

Bis auf eine Ausnahme zeigte sich also kein Unterschied in der Quantität der Immunantworten zwischen den verschiedenen Patientengruppen. Deshalb untersuchten wir im nächsten Schritt die Qualität der Immunantworten mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass eine Kombination mehrerer Funktionen der CD8⁺ T-Zellen, die sogenannte Polyfunktionalität, die Immunantwort

besonders effektiv macht [62]. Mit dem Fortschreiten der Infektion geht diese Polyfunktionalität jedoch verloren und die Immunantwort wird ineffektiv [56].

Man würde also erwarten, dass jene Patienten, die nur gering mit der CD4-Zellzahl absinken und die Infektion über einen längeren Zeitraum kontrollieren, besonders polyfunktionelle CD8⁺ Antworten aufweisen. Da IFN- γ die letzte Funktion ist, die verloren geht, würde man zusätzlich erwarten, dass prozentual die meisten Patienten IFN- γ -Antworten zeigen. Bemerkenswert sind deshalb unsere Ergebnisse, da in allen Gruppen zusammengenommen prozentual die meisten Patienten nicht IFN- γ -Antworten, sondern CD107a- und IL-2-Antworten zeigten. Dies galt auch für die Doppel- und Dreifachfunktionen: die meisten Patienten zeigten Antworten für die Kombinationen mit CD107a und IL-2. Auffällig war außerdem, dass prozentual die meisten Patienten der Gruppe 1a Immunantworten zeigten, also die Patienten jener Gruppe, die rasch mit der Infektion fortschritt. Dies galt, zumindest bei Gag, sogar für alle Einzel-, Doppel- und Dreifachfunktionen. Eingeschränkt wird dieses Ergebnis allerdings durch die Tatsache, dass sich in Gruppe 1a nur drei Patienten befanden. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, müssten hier noch weitere Studien mit einer größeren Patientenzahl folgen.

Nicht jeder Patient zeigte für jede Funktionskombination Immunantworten. Dies war jedoch bereits aus vorangegangenen Studien bekannt [181]. Beim Vergleich der Gruppen mit stabiler und steigender Viruslast, sowie der Gruppen CD4-Loser und CD4-Nonloser konnten wir für die meisten Einzelfunktionen und Funktionskombinationen keinen signifikanten Unterschied feststellen. Die Patientengruppen unterschieden sich also, bis auf wenige Ausnahmen, nicht in der Qualität ihrer Immunantworten. Von den LTNP ist zwar bekannt, dass sie besonders polyfunktionelle Antworten aufweisen [62, 182]. Bei den natürlichen Wirten der SIV-Infektion konnte jedoch gezeigt werden, dass die polyfunktionellen T-Zellantworten gegen das SI-Virus nicht höher sind als die polyfunktionellen T-Zellantworten von SIV-infizierten Rhesusaffen oder HIV-infizierten Menschen [157, 170]. Eine starke polyfunktionelle Immunantwort wird also bei den natürlichen Wirten der SIV-Infektion nicht für die gute Kontrolle der Infektion verantwortlich gemacht.

Zusätzlich konnten Zahn et al. feststellen, dass natürliche Wirte der SIV-Infektion sogar annähernd signifikant geringere IFN- γ ⁺, IL-2⁺, und TNF- α ⁺ Immunantworten aufwiesen als SIV-infizierte Rhesusaffen [157]. Ähnliches zeigten wir bei den wenigen signifikanten Ausnahmen: interessanterweise wiesen gerade jene Gruppen, die mit der

Viruslast anstiegen oder CD4+ T-Zellen verloren, die stärkeren Immunantworten auf. Dabei ist es möglich, dass bestimmte HIV-/ SIV-spezifische Immunantworten besser dafür geeignet sind, durch eine starke Immunaktivierung eine vermehrte Immunpathologie statt einer besseren Kontrolle der Infektion zu vermitteln und so zu einem Fortschreiten der Infektion beitragen [121].

Letztlich ist es fraglich, ob die CD8+ Immunantwort in der Kontrolle der SIV-Infektion der Natural hosts eine Rolle spielt. Viele Wissenschaftler sind der Ansicht, dass sich die Ko-Adaptation der natürlichen Wirte der SIV-Infektion und des SI-Virus langsam über die letzten Jahrtausende entwickelt hat [183-185]. So ist es wahrscheinlich, dass die natürlichen Wirte es geschafft haben, eine von den CD8+ T-Zellen weitgehend unabhängige Kontrolle der SIV-Infektion zu erreichen und, dass andere Mechanismen in der Kontrolle der Infektion eine Rolle spielen. Auf der anderen Seite ist es unwahrscheinlich, dass eine potente CD8+ Immunantwort für die Kontrolle der HIV-Infektion keine Rolle spielt. Umso wichtiger ist es, noch mehr über die immunologischen Mechanismen zu lernen, die es den natürlichen Wirten der SIV-Infektion ermöglichen, die Infektion auch ohne eine potente CD8+ Immunantwort über einen langen Zeitraum zu kontrollieren.

4.6 Klinische Bedeutung und Ausblick

Die natürlichen Wirte der SIV-Infektion sind bereits seit vielen Jahren bekannt. Unklar war jedoch bisher, ob es auch natürliche Wirte der HIV-Infektion gibt, also Patienten, die in der Lage sind, die HIV-Infektion trotz hoher Viruslasten über einen langen Zeitraum zu kontrollieren. Ziel der vorliegenden Studie war es, solche Patienten zu finden und die immunologischen Mechanismen zu identifizieren, die für die gute Kontrolle der Infektion trotz hoher Viruslasten verantwortlich sind. Wir sind der Meinung, dass es durchaus Patienten mit Merkmalen der natürlichen Wirte gibt. Allerdings sind diese Patienten sicherlich sehr selten. Um Vergleichsuntersuchungen durchzuführen, mussten die Patientengruppen ausreichend groß sein. Dadurch waren die Patientengruppen heterogen und es existieren vermutlich unterschiedliche Gründe für eine Kontrolle der HIV-Infektion. Für weitere Studien wäre es wünschenswert, die Patientengruppen noch weiter zu vergrößern. Des Weiteren ist es für die Zukunft wichtig, zusätzliche Marker zu untersuchen, die Ursache für die Kontrolle der Infektion

sein können. Mit der vorliegenden Studie konnten wichtige Erkenntnisse über die immunologischen Charakteristika bei einer bisher nur unzureichend untersuchten Gruppe gewonnen werden. Sie leisten deshalb einen wichtigen Beitrag für die Wissenschaft. Nun müssen weitere Untersuchungen folgen, die an die Ergebnisse der vorliegenden Studie anknüpfen, um der Kontrolle der HIV-Infektion noch ein Stück näher zu kommen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Gottlieb, M.S., H.M. Schanker, and P.T. Fan, *Pneumocystis pneumonia--Los Angeles*. MMWR Weekly, 1981. **30**: p. 250-2.
2. Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
3. Masur, H., et al., *An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1431-8.
4. Siegal, F.P., et al., *Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1439-44.
5. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
6. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 497-500.
7. UNAIDS. *World AIDS Day Report 2012*. 2012; Available from: <http://www.unaids.org/en/>.
8. Zhu, T., et al., *An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic*. Nature, 1998. **391**: p. 594-7.
9. Worobey, M., et al., *Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 661-4.
10. Clavel, F., et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. **233**(4761): p. 343-6.
11. Hirsch, V.M., et al., *An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2*. Nature, 1989. **339**(6223): p. 389-92.
12. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science, 2000. **287**(5453): p. 607-14.
13. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS Pandemic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006841.
14. Locatelli, S. and M. Peeters, *Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population*. AIDS, 2012. **26**(6): p. 659-73.
15. Reeves, J.D. and R.W. Doms, *Human immunodeficiency virus type 2*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 6): p. 1253-65.
16. Subbramanian, R.A. and E.A. Cohen, *Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 6831-5.
17. Miller, R.H. and N. Sarver, *HIV accessory proteins: emerging therapeutic targets*. Mol Med, 1995. **1**(5): p. 479-85.
18. Wong-Staal, F., *The AIDS virus. What we know and what we can do about it*. West J Med, 1991. **155**(5): p. 481-7.
19. Collins, K.L., et al., *HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 397-401.

20. Lama, J., A. Mangasarian, and D. Trono, *Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner*. *Curr Biol*, 1999. **9**(12): p. 622-31.
21. Miller, M.D., M.B. Feinberg, and W.C. Greene, *The HIV-1 nef gene acts as a positive viral infectivity factor*. *Trends Microbiol*, 1994. **2**(8): p. 294-8.
22. Ross, T.M., A.E. Oran, and B.R. Cullen, *Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein*. *Curr Biol*, 1999. **9**(12): p. 613-21.
23. Greene, W.C., *Regulation of HIV-1 gene expression*. *Annu Rev Immunol*, 1990. **8**: p. 453-75.
24. UNAIDS. *Prevention - Fast facts*. 2009; Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/presscentre/fastfactsaboutshiv/>.
25. Royce, R.A., et al., *Sexual transmission of HIV*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(15): p. 1072-8.
26. Dalglish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. *Nature*, 1984. **312**(5996): p. 763-7.
27. Klatzmann, D., et al., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. *Nature*, 1984. **312**(5996): p. 767-8.
28. Kahn, J.O. and B.D. Walker, *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(1): p. 33-9.
29. Clark, S.J., et al., *High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection*. *N Engl J Med*, 1991. **324**(14): p. 954-60.
30. Daar, E.S., et al., *Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. *N Engl J Med*, 1991. **324**(14): p. 961-4.
31. Koup, R.A., et al., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. *J Virol*, 1994. **68**(7): p. 4650-5.
32. Ho, D.D., et al., *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. *Nature*, 1995. **373**(6510): p. 123-6.
33. Dinoso, J.B., et al., *Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(23): p. 9403-8.
34. Lewin, S.R. and C. Rouzioux, *HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials?* *AIDS*, 2011. **25**(7): p. 885-97.
35. Chun, T.W., et al., *Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(24): p. 13193-7.
36. Chun, T.W., et al., *HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(11): p. 3250-5.
37. Finzi, D., et al., *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy*. *Nat Med*, 1999. **5**(5): p. 512-7.
38. Walker, C.M., et al., *CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication*. *Science*, 1986. **234**(4783): p. 1563-6.
39. Cocchi, F., et al., *Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells*. *Science*, 1995. **270**(5243): p. 1811-5.

40. Levy, J.A., C.E. Mackewicz, and E. Barker, *Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells*. Immunol Today, 1996. **17**(5): p. 217-24.
41. Yang, O.O., et al., *Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 3120-8.
42. Walker, B.D., et al., *HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals*. Nature, 1987. **328**(6128): p. 345-8.
43. Plata, F., et al., *AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders*. Nature, 1987. **328**(6128): p. 348-51.
44. Borrow, P., et al., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 6103-10.
45. Borrow, P., et al., *Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 205-11.
46. Goulder, P.J., et al., *Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 212-7.
47. Price, D.A., et al., *Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1890-5.
48. Evans, D.T., et al., *Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1270-6.
49. O'Connor, D.H., et al., *Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 493-9.
50. Matano, T., et al., *Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 164-9.
51. Schmitz, J.E., et al., *Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes*. Science, 1999. **283**(5403): p. 857-60.
52. Jin, X., et al., *Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques*. J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 991-8.
53. Cao, Y., et al., *Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection*. N Engl J Med, 1995. **332**(4): p. 201-8.
54. Klein, M.R., et al., *Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1365-72.
55. Migueles, S.A., et al., *HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1061-8.
56. Wherry, E.J. and R. Ahmed, *Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5535-45.
57. Gea-Banacloche, J.C., et al., *Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 1082-92.

58. Betts, M.R., et al., *Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection.* J Virol, 2001. **75**(24): p. 11983-91.
59. Addo, M.M., et al., *Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load.* J Virol, 2003. **77**(3): p. 2081-92.
60. Draenert, R., et al., *Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection.* J Virol, 2004. **78**(2): p. 630-41.
61. Frahm, N., et al., *Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities.* J Virol, 2004. **78**(5): p. 2187-200.
62. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells.* Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
63. Migueles, S.A., et al., *Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control.* Immunity, 2008. **29**(6): p. 1009-21.
64. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation.* J Immunol Methods, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.
65. Peters, P.J., et al., *Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes.* J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1099-109.
66. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma.* Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
67. Makedonas, G. and M.R. Betts, *Polyfunctional analysis of human t cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection.* Springer Semin Immunopathol, 2006. **28**(3): p. 209-19.
68. Ferre, A.L., et al., *Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control.* Blood, 2009. **113**(17): p. 3978-89.
69. Rosenberg, E.S., et al., *Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia.* Science, 1997. **278**(5342): p. 1447-50.
70. Kaufmann, D.E., et al., *Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides.* J Virol, 2004. **78**(9): p. 4463-77.
71. Nakanishi, Y., et al., *CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help.* Nature, 2009. **462**(7272): p. 510-3.
72. Virgin, H.W., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Redefining chronic viral infection.* Cell, 2009. **138**(1): p. 30-50.
73. Yi, J.S., M.A. Cox, and A.J. Zajac, *T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion.* Immunology, 2010. **129**(4): p. 474-81.
74. Battagay, M., et al., *Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4+ T-cell-deficient mice.* J Virol, 1994. **68**(7): p. 4700-4.
75. von Herrath, M.G., et al., *CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge.* J Virol, 1996. **70**(2): p. 1072-9.
76. Spira, A.I., et al., *Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques.* J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 215-25.

77. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
78. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 761-70.
79. Mattapallil, J.J., et al., *Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1093-7.
80. Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
81. Klatt, N.R., et al., *Compromised gastrointestinal integrity in pigtail macaques is associated with increased microbial translocation, immune activation, and IL-17 production in the absence of SIV infection*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(4): p. 387-98.
82. Douek, D.C., L.J. Picker, and R.A. Koup, *T cell dynamics in HIV-1 infection*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 265-304.
83. Ho, H.N., et al., *Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens*. J Immunol, 1993. **150**(7): p. 3070-9.
84. Deaglio, S., K. Mehta, and F. Malavasi, *Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors*. Leuk Res, 2001. **25**(1): p. 1-12.
85. Giorgi, J.V. and R. Detels, *T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study*. Clin Immunol Immunopathol, 1989. **52**(1): p. 10-8.
86. Giorgi, J.V., et al., *Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1993. **6**(8): p. 904-12.
87. Liu, Z., et al., *Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up*. Cytometry, 1996. **26**(1): p. 1-7.
88. Liu, Z., et al., *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**(2): p. 83-92.
89. Liu, Z., et al., *CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **18**(4): p. 332-40.
90. Hazenberg, M.D., et al., *Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS*. AIDS, 2003. **17**(13): p. 1881-8.
91. Giorgi, J.V., et al., *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**(4): p. 859-70.
92. Chun, T.W., et al., *Relationship between the frequency of HIV-specific CD8+ T cells and the level of CD38+CD8+ T cells in untreated HIV-infected individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2464-9.
93. Shik, D. and A. Munitz, *Regulation of allergic inflammatory responses by inhibitory receptors*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(5): p. 700-9.
94. Linsley, P.S., et al., *Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule*. Science, 1992. **257**(5071): p. 792-5.
95. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.

96. Wherry, E.J., et al., *Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection*. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 670-84.
97. Jones, R.B., et al., *Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection*. *J Exp Med*, 2008. **205**(12): p. 2763-79.
98. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression*. *Nature*, 2006. **443**(7109): p. 350-4.
99. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction*. *Nat Med*, 2006. **12**(10): p. 1198-202.
100. Petrovas, C., et al., *PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection*. *J Exp Med*, 2006. **203**(10): p. 2281-92.
101. Riley, J.L., *PD-1 signaling in primary T cells*. *Immunol Rev*, 2009. **229**(1): p. 114-25.
102. Brown, K.E., et al., *Role of PD-1 in regulating acute infections*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(3): p. 397-401.
103. Shin, H. and E.J. Wherry, *CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(4): p. 408-15.
104. Velu, V., et al., *Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade*. *Nature*, 2009. **458**(7235): p. 206-10.
105. Vollbrecht, T., et al., *Impact of changes in antigen level on CD38/PD-1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells in chronic, untreated HIV-1 infection*. *J Med Virol*, 2010. **82**(3): p. 358-70.
106. Naor, D., R.V. Sionov, and D. Ish-Shalom, *CD44: structure, function, and association with the malignant process*. *Adv Cancer Res*, 1997. **71**: p. 241-319.
107. Sneath, R.J. and D.C. Mangham, *The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia*. *Mol Pathol*, 1998. **51**(4): p. 191-200.
108. Goodison, S., V. Urquidi, and D. Tarin, *CD44 cell adhesion molecules*. *Mol Pathol*, 1999. **52**(4): p. 189-96.
109. Bourguignon, L.Y., et al., *Hyaluronic acid-induced lymphocyte signal transduction and HA receptor (GP85/CD44)-cytoskeleton interaction*. *J Immunol*, 1993. **151**(12): p. 6634-44.
110. Tough, D.F., et al., *Stimulation of memory T cells by cytokines*. *Vaccine*, 2000. **18**(16): p. 1642-8.
111. Baaten, B.J., et al., *Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 23.
112. Seth, A., et al., *T-cell-receptor-independent activation of cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes mediated through CD44 and gp90MEL-14*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(17): p. 7877-81.
113. Rafi-Janajreh, A.Q., P.S. Nagarkatti, and M. Nagarkatti, *Role of CD44 in CTL and NK cell activity*. *Front Biosci*, 1998. **3**: p. d665-71.
114. Mitchell, D.M. and M.A. Williams, *An activation marker finds a function*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 9-11.
115. Silvestri, G., et al., *Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(11): p. 3148-54.
116. Goldstein, S., et al., *Wide range of viral load in healthy african green monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus*. *J Virol*, 2000. **74**(24): p. 11744-53.
117. Pandrea, I., et al., *Simian immunodeficiency viruses replication dynamics in African non-human primate hosts: common patterns and species-specific differences*. *J Med Primatol*, 2006. **35**(4-5): p. 194-201.

118. Hirsch, V.M., et al., *Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication.* J Virol, 1995. **69**(2): p. 955-67.
119. Goldstein, S., et al., *Plateau levels of viremia correlate with the degree of CD4+-T-cell loss in simian immunodeficiency virus SIVagm-infected pigtailed macaques: variable pathogenicity of natural SIVagm isolates.* J Virol, 2005. **79**(8): p. 5153-62.
120. Dunham, R., et al., *The AIDS resistance of naturally SIV-infected sooty mangabeys is independent of cellular immunity to the virus.* Blood, 2006. **108**(1): p. 209-17.
121. Silvestri, G., et al., *Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia.* Immunity, 2003. **18**(3): p. 441-52.
122. Sumpter, B., et al., *Correlates of preserved CD4(+) T cell homeostasis during natural, nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection of sooty mangabeys: implications for AIDS pathogenesis.* J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1680-91.
123. Bosinger, S.E., et al., *Global genomic analysis reveals rapid control of a robust innate response in SIV-infected sooty mangabeys.* J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3556-72.
124. Jacquelin, B., et al., *Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response.* J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3544-55.
125. Estes, J.D., et al., *Early resolution of acute immune activation and induction of PD-1 in SIV-infected sooty mangabeys distinguishes nonpathogenic from pathogenic infection in rhesus macaques.* J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6798-807.
126. Lambotte, O., et al., *HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication.* Clin Infect Dis, 2005. **41**(7): p. 1053-6.
127. Gaardbo, J.C., et al., *Thirty Years with HIV Infection-Nonprogression Is Still Puzzling: Lessons to Be Learned from Controllers and Long-Term Nonprogressors.* AIDS Res Treat, 2012. **2012**: p. 161584.
128. Deeks, S.G. and B.D. Walker, *Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy.* Immunity, 2007. **27**(3): p. 406-16.
129. Saez-Cirion, A., et al., *Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses.* J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7828-37.
130. Walker, B.D. and D.R. Burton, *Toward an AIDS vaccine.* Science, 2008. **320**(5877): p. 760-4.
131. Gilbert, P.B., et al., *HIV-1 virologic and immunologic progression and initiation of antiretroviral therapy among HIV-1-infected subjects in a trial of the efficacy of recombinant glycoprotein 120 vaccine.* J Infect Dis, 2005. **192**(6): p. 974-83.
132. Buchbinder, S.P., et al., *Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial.* Lancet, 2008. **372**(9653): p. 1881-93.
133. Rerks-Ngarm, S., et al., *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand.* N Engl J Med, 2009. **361**(23): p. 2209-20.

134. Mellors, J.W., et al., *Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection*. JAMA, 2007. **297**(21): p. 2349-50.
135. LosAlamosDatabase. *HIV Sequence Database Compendium*. 2001; Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2001/HIV1prot eins.pdf>.
136. Loveday, C. and A. Hill, *Prediction of progression to AIDS with serum HIV-1 RNA and CD4 count*. Lancet, 1995. **345**(8952): p. 790-1.
137. Mellors, J.W., et al., *Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion*. Ann Intern Med, 1995. **122**(8): p. 573-9.
138. Mellors, J.W., et al., *Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma*. Science, 1996. **272**(5265): p. 1167-70.
139. Segesdi, J., et al., *Plasma HIV-1 load and disease progression in HIV-infected patients in Hungary*. Pathol Oncol Res, 1998. **4**(1): p. 52-5.
140. Mellors, J.W., et al., *Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection*. Ann Intern Med, 1997. **126**(12): p. 946-54.
141. Choudhary, S.K., et al., *Low immune activation despite high levels of pathogenic human immunodeficiency virus type 1 results in long-term asymptomatic disease*. J Virol, 2007. **81**(16): p. 8838-42.
142. Rotger, M., et al., *Comparative transcriptomics of extreme phenotypes of human HIV-1 infection and SIV infection in sooty mangabey and rhesus macaque*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2391-400.
143. Pandrea, I., et al., *High levels of SIVmnd-1 replication in chronically infected Mandrillus sphinx*. Virology, 2003. **317**(1): p. 119-27.
144. Pandrea, I., et al., *Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts*. Trends Immunol, 2008. **29**(9): p. 419-28.
145. Simon, V., D.D. Ho, and Q. Abdool Karim, *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*. Lancet, 2006. **368**(9534): p. 489-504.
146. Sodora, D.L. and G. Silvestri, *Immune activation and AIDS pathogenesis*. AIDS, 2008. **22**(4): p. 439-46.
147. Silvestri, G., et al., *Divergent host responses during primary simian immunodeficiency virus SIVsm infection of natural sooty mangabey and nonnatural rhesus macaque hosts*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4043-54.
148. Deeks, S.G., et al., *Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load*. Blood, 2004. **104**(4): p. 942-7.
149. Pereyra, F., et al., *Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy*. J Infect Dis, 2008. **197**(4): p. 563-71.
150. Emu, B., et al., *HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5398-407.
151. Zhang, J.Y., et al., *PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4671-8.
152. Salisch, N.C., et al., *Inhibitory TCR coreceptor PD-1 is a sensitive indicator of low-level replication of SIV and HIV-1*. J Immunol, 2010. **184**(1): p. 476-87.

153. Yamamoto, T., et al., *Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8⁺ T-cell exhaustion in HIV infection*. Blood, 2011. **117**(18): p. 4805-15.
154. Sauce, D., et al., *PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status*. AIDS, 2007. **21**(15): p. 2005-13.
155. Sachdeva, M., et al., *Immune exhaustion occurs concomitantly with immune activation and decrease in regulatory T cells in viremic chronically HIV-1-infected patients*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010. **54**(5): p. 447-54.
156. Pettersen, F.O., K. Tasken, and D. Kvale, *Combined Env- and Gag-specific T cell responses in relation to programmed death-1 receptor and CD4 T cell loss rates in human immunodeficiency virus-1 infection*. Clin Exp Immunol, 2010. **161**(2): p. 315-23.
157. Zahn, R.C., et al., *Simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CD8⁺ T-cell responses in vervet African green monkeys chronically infected with SIVagm*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11577-88.
158. D'Souza, M., et al., *Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4⁺ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction*. J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1979-87.
159. Kaufmann, D.E., et al., *Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4⁺ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1246-54.
160. Zajac, A.J., et al., *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2205-13.
161. Day, C.L. and B.D. Walker, *Progress in defining CD4 helper cell responses in chronic viral infections*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1773-7.
162. Munier, M.L. and A.D. Kelleher, *Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(1): p. 6-15.
163. Sette, A., et al., *Selective CD4⁺ T cell help for antibody responses to a large viral pathogen: deterministic linkage of specificities*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 847-58.
164. Porichis, F., et al., *Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade*. Blood, 2011. **118**(4): p. 965-74.
165. Schindler, M., et al., *Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1055-67.
166. Schindler, M., et al., *Inefficient Nef-mediated downmodulation of CD3 and MHC-I correlates with loss of CD4⁺T cells in natural SIV infection*. PLoS Pathog, 2008. **4**(7): p. e1000107.
167. Hertweck, M.K., F. Erdfelder, and K.A. Kreuzer, *CD44 in hematological neoplasias*. Ann Hematol, 2011. **90**(5): p. 493-508.
168. Graham, V.A., A.L. Marzo, and D.F. Tough, *A role for CD44 in T cell development and function during direct competition between CD44⁺ and CD44⁻ cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(4): p. 925-34.
169. Blass, S.L., E. Pure, and C.A. Hunter, *A role for CD44 in the production of IFN-gamma and immunopathology during infection with Toxoplasma gondii*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5726-32.
170. Wang, Z., et al., *Th-1-type cytotoxic CD8⁺ T-lymphocyte responses to simian immunodeficiency virus (SIV) are a consistent feature of natural SIV infection in sooty mangabeys*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 2771-83.
171. Meythaler, M., et al., *Early induction of polyfunctional simian immunodeficiency virus (SIV)-specific T lymphocytes and rapid disappearance*

- of SIV from lymph nodes of sooty mangabeys during primary infection.* J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5151-61.
172. Barry, A.P., et al., *Depletion of CD8+ cells in sooty mangabey monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus reveals limited role for immune control of virus replication in a natural host species.* J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8002-12.
173. Schmitz, J.E., et al., *Inhibition of adaptive immune responses leads to a fatal clinical outcome in SIV-infected pigtailed macaques but not vervet African green monkeys.* PLoS Pathog, 2009. **5**(12): p. e1000691.
174. Gaufin, T., et al., *Experimental depletion of CD8+ cells in acutely SIVagm-infected African Green Monkeys results in increased viral replication.* Retrovirology, 2010. **7**: p. 42.
175. Streeck, H., N. Frahm, and B.D. Walker, *The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research.* Nat Protoc, 2009. **4**(4): p. 461-9.
176. Edwards, B.H., et al., *Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma.* J Virol, 2002. **76**(5): p. 2298-305.
177. Masemola, A., et al., *Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load.* J Virol, 2004. **78**(7): p. 3233-43.
178. Zuniga, R., et al., *Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control.* J Virol, 2006. **80**(6): p. 3122-5.
179. Kiepiela, P., et al., *CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load.* Nat Med, 2007. **13**(1): p. 46-53.
180. Peretz, Y., C.M. Tsoukas, and N.F. Bernard, *HIV Gag-specific immune responses predict the rate of CD4 decline.* AIDS, 2008. **22**(10): p. 1222-4.
181. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, *T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 247-58.
182. Owen, R.E., et al., *HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses.* AIDS, 2010. **24**(8): p. 1095-105.
183. Hirsch, V.M., *What can natural infection of African monkeys with simian immunodeficiency virus tell us about the pathogenesis of AIDS?* AIDS Rev, 2004. **6**(1): p. 40-53.
184. Silvestri, G., *Naturally SIV-infected sooty mangabeys: are we closer to understanding why they do not develop AIDS?* J Med Primatol, 2005. **34**(5-6): p. 243-52.
185. VandeWoude, S. and C. Apetrei, *Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses.* Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(4): p. 728-62.

6 ANHANG

6.1 Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

6.1.1 Publikation

In Vorbereitung.

6.1.2 Poster

Gloning L, Bühler S, Vollbrecht T, Roider J, Stirner R, Bogner J, Draenert R. Identifikation und Charakterisierung von HIV-Infizierten, die trotz hoher Viruslast überdurchschnittlich langsam CD4-Zellen verlieren (=CD4-Nonloser).

(Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Juni 2013, Innsbruck)

6.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Infektionsambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Betreuung von Frau PD Dr. med. Rika Draenert durchgeführt.

Zunächst danke ich Herrn Prof. J. Bogner für die Aufnahme in die Infektionsambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter Rika Draenert. Ohne sie und die Möglichkeit, in ihrem Labor und unter ihrer Betreuung das Projekt durchzuführen, wäre die Arbeit nie zustande gekommen. Zum größten Dank verpflichtet bin ich ihr jedoch für ihre großartige und unermüdliche Unterstützung, ihr außerordentliches Engagement und ihre unschätzbare wertvolle Zuverlässigkeit, mit der sie mich in jeder einzelnen Phase dieser Arbeit begleitete. Eine hervorragendere Betreuung hätte ich mir nicht erträumen können.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei unserer medizinisch-technischen Assistentin Renate Stirner für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, sowie ihre herausragende persönliche und fachliche Unterstützung.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Thomas Vollbrecht für seine fachliche Unterstützung zu Beginn dieser Arbeit, sowie bei Nadja Henrich für die Bereitstellung der Viruslasten und CD4-Zellzahlen.

Mein Dank gilt außerdem all jenen Patienten, die ihr Blut für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stellten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund für die liebevolle Unterstützung danken, sowie ganz besonders meiner Schwester Anna Gloning und ihrem Freund Andreas Breunig für die unermüdliche Hilfe bei der inhaltlichen und insbesondere bei der graphischen Gestaltung meiner Doktorarbeit.

6.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Lisa Sophia Alexandra Gloning
Geburtstag und -ort	27.02.1987, München
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1997 – 2006	Käthe-Kollwitz-Gymnasium, München
06/2006	Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2007	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München
08/2009	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

03/2010	Pädiatrie, Hospital Antonio Lorena, Cusco, Perú
08/2010	Innere Medizin, Klinikum Dritter Orden, München
09/2011	Pädiatrie, Hausärztliche Praxis, München
03/2012	Innere Medizin, Abteilung für Infektiologie, Medizinischen Klinik und Poliklinik IV, München

Praktisches Jahr

12/2012 – 04/2013	Pädiatrie, Kinderklinik Dritter Orden, München
04 – 05/2013	Allgemeine Chirurgie, Seespital Horgen, Horgen, Schweiz
06 – 07/2013	Allgemeine Chirurgie und Kinderchirurgie, Klinikum Dritter Orden, München
08 – 11/2013	Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, München

6.4 Eidesstattliche Versicherung

Glöning, Lisa Sophia Alexandra

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Charakterisierung der immunologischen Eigenschaften von HIV-Infizierten mit
hohen Viruslasten und geringem CD4+ T-Zell-Verlust**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Lisa Glöning