

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und –Klinische Immunologie der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Arndt Borkhardt

**B-Zelldifferenzierung bei Kindern und Jugendlichen –
HIV-Infizierte im Vergleich mit Immungesunden**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Sujal Ghosh

2008

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez.: Univ.-Professor Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Professor Dr. med. Tim Niehues

Koreferent: Univ.-Professor Dr. med. Hartmut Hengel

1 EINLEITUNG	1
1.1 Geschichtlicher Überblick	1
1.2 Humanes Immundefizienz Virus	1
1.2.1 Entdeckung / Klassifizierung	1
1.2.2 Molekularbiologie	2
1.3 Vertikale Transmission	2
1.4 Diagnostik, klinischer Verlauf und Klassifikation der HIV-Infektion bei Kindern	3
1.5 Immunpathophysiologie der HIV-Infektion	4
1.5.1 T-Lymphozyten	4
1.5.2 B-Lymphozyten	4
1.5.3 Entwicklung der B-Zellreihe	5
1.5.4 B-Zellaktivierung - Interaktion T-Zelle / B-Zelle	6
1.5.5 Entwicklung Memory B-Zelle	7
1.5.6 Pathophysiologie der B-Lymphozyten bei der HIV-Infektion	9
1.6 Fragestellung der Dissertation	11
2 PATIENTEN UND METHODEN	12
2.1 Patienten	12
2.2 Immunphänotypisierung T-Lymphozyten und Viruslast	14
2.3 B-Lymphozyten	14
2.3.1 Verarbeitung der Blutproben	14
2.3.2 Durchflußzytometrie	15
2.3.3 Ermittlung der B-Zellsubtypen – B-Zelldifferenzierung	16
2.4 Quantitative Erfassung der Immunglobuline	18
2.5 Statistische Auswertung	18
3 RESULTATE	19
3.1 B-Zellzahl	19
3.1.1 Normalwerte	19
3.1.2 Gesamt B-Zellzahl bei HIV	20
3.2 B-Zelldifferenzierung	21
3.2.1 Physiologische B-Zelldifferenzierung: altersabhängige Entwicklung der Subpopulationen in der Kontrollgruppe	22
3.2.2 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	24

3.2.3 Vergleich: HIV infizierte Kinder und Kontrollgruppe – matched-pair-Analyse.....	24
3.2.4 Einfluss und Effektivität der ART	26
3.2.5 Vergleich: HIV infizierte Kinder und Kontrollgruppe – Altersgruppen	27
3.2.6 Longitudinale Veränderungen der B-Zelldifferenzierung	29
3.2.7 Korrelation der CD27 – Expression mit der CD4-Zellzahl	35
3.3 Folgen einer veränderten B-Zelldifferenzierung	36
3.3.1 Klinische / immunologische Stadien und B-Zelldifferenzierung	36
3.3.2 Immunglobulin-Spiegel	37
3.3.3 Korrelation Immunglobulinsekretion mit B-Zelldifferenzierung und Viruslast.....	39
4 DISKUSSION	40
5 LITERATUR	48
ANHANG	56
ZUSAMMENFASSUNG	59
Danksagung.....	i
Erklärung.....	ii
Curriculum Vitae	iii

AIDS Aquired Immunodeficiency Syndrome
 ART Antiretrovirale Therapie
 BCR B-Zell Rezeptor
 bDNA branched desoxyribonucleic acid
 CD cluster of differentiation
 CDC Center for Disease Control and Prevention
 DNA desoxyribonucleic acid
 EDTA ethylenediaminetetraacetic acid
 ELISA enzyme linked immunosorbent assay
 FACS fluorescence activated cell sorter
 FITC fluorescein isothiocyanate
 FSC forward scatter
 gp Glykoprotein
 HAART Highly Active Antiretroviral Therapy
 HIV Humanes Immunodefizienz Virus
 Ig Immunglobulin
 IL Interleukin
 kD Kilodalton
 NRTI Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
 NNRTI Nicht-Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
 PBMC peripheral blood mononuclear cell
 PBS phosphat buffered saline
 PCR polymerase chain reaction
 PE phycoerythrin
 PerCP peridinin chlorophyll protein
 PI Proteaseinhibitor
 RNA ribonucleic acid
 ssRNA single-stranded ribonucleic acid
 SSC sideward Scatter
 TCR T-Zell Rezeptor
 TNF Tumornekrosefaktor
 WHO World Health Organisation

1 EINLEITUNG

1.1 Geschichtlicher Überblick

Im Sommer 1981 folgte die erste Beschreibung von AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome) der ungewöhnlichen Häufung von atypischen Pneumocystis Carinii Pneumonien und Hauttumoren (Kaposi-Sarkom) in Los Angeles und New York. Bei diesen Fällen handelte es sich ausschließlich um homosexuelle Männer. In den folgenden Monaten wurde die Krankheit sowohl bei männlichen als auch weiblichen i.v. Drogenabhängigen beobachtet. Ebenfalls betroffen waren Empfänger von Bluttransfusionen und Hämophile. 1983 wurde das HIV von einem Patienten erstmalig isoliert. Die erste intrauterine Infektion mit HIV datiert retrospektiv 1967 in Norwegen; dieses Kind erkrankte 1969 an AIDS.

Für das Jahr 2005 berichtete die WHO von etwa 40 Millionen mit dem HIV infizierten Erwachsenen und Kindern. Alleine 4 Millionen Kinder unter 15 Jahren sind seit Beginn der Epidemie mit dem Virus infiziert, von denen 90% durch ihre Mutter infiziert wurden (UNAIDS 2006).

Kinder sind besonders gefährdet das Terminalstadium AIDS zu erreichen, da ihre Immunabwehr sich im Aufbau befindet. Während in den industrialisierten Ländern, in denen aufgrund einer perinatalen Transmissionsprophylaxe sich nur 5 % der HIV-Kinder befinden, eine postnatale antiretrovirale Therapie die Zahl pädiatrischer AIDS-Fälle drastisch vermindert hat, sieht es in der Dritten Welt, vornehmlich auf dem afrikanischen Kontinent anders aus. Alleine 2003 infizierten sich 700,000 Neugeborene mit HIV; 500,000 Kinder starben an AIDS.

1.2 Humanes Immundefizienz Virus

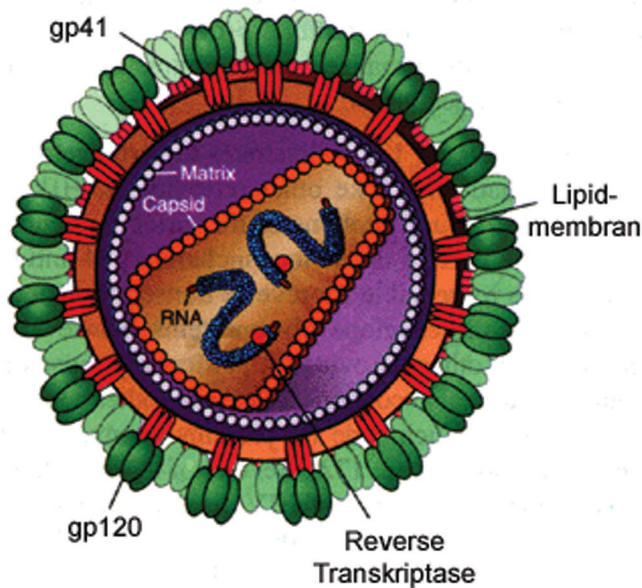
1.2.1 Entdeckung / Klassifizierung

Als HIV wird seit 1986 das Retrovirus benannt, das für die Immunschwäche AIDS verantwortlich gemacht wird (Coffin, Haase et al. 1986). Das Virus wurde zwei Jahre nach Auftreten der ersten AIDS-Fälle entdeckt (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983; Gallo, Sarin et al. 1983). HIV gehört spezieller zu den Lentiviren, welche sich durch lange Inkubationszeiten und eine Lipidaußenschicht auszeichnen.

Unterschieden wird hauptsächlich zwischen HIV-1 und HIV-2, während der Typ 1 der virulentere Erreger ist, welcher die meisten HIV-Fälle darstellt. HIV-2 ist vor allem in Westafrika aufzufinden (Reeves and Doms 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich mit HIV-1 infizierte Patienten untersucht.

1.2.2 Molekularbiologie

Abb. (1) Struktur HIV (Kasper, Fauci et al. 2005)



Das Virus hat einen Durchmesser von ca. 120nm. HIV-1 besteht aus zwei identischen einzelsträngigen RNA, eingeschlossen durch ein konisches Nukleokapsid aus dem viralen Protein p24. Das Kapsid bildet mit der ssRNA, den Coreproteinen (p24 Kapsid, p18 Matrix) und den Enzymen reverse Transkriptase eine Einheit. Um das Kapsid ist die

Plasmamembran, die vom Wirten abstammt. Die doppelte Lipidmembran, die den äußeren Mantel darstellt, trägt die Glykoproteine gp120 und gp41.

1.3 Vertikale Transmission

Anders als bei der Betreuung von HIV infizierten Erwachsenen werden in der pädiatrischen Ambulanz vorwiegend vertikal infizierte Patienten betreut. Hierbei handelt es sich um Kinder, die sich durch das mütterliche Blut mit dem Virus schon während oder vor der Geburt infiziert haben. Bei horizontal Infizierten findet die Virustransmission postnatal hauptsächlich durch Bluttransfusionen und Geschlechtsverkehr statt. HIV kann während der Schwangerschaft, während der Geburt und durch Stillen von der Mutter auf ihr Kind übertragen werden (Chakraborty 2005). Eine Ansteckung des Kindes im 1. bzw. 2. Trimenon ist sehr selten. Ab der 30. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt nimmt die Häufigkeit der Transmission stetig zu, so dass die perinatale Übertragungsrate am höchsten ist. Durch eine HIV-Transmissionsprophylaxe kann die Übertragungsrate von 20% auf ca. 2% gesenkt werden.

1.4 Diagnostik, klinischer Verlauf und Klassifikation der HIV-Infektion bei Kindern

Neugeborene HIV-infizierter Mütter erhalten während der Schwangerschaft über die Plazenta maternale HIV-spezifische Antikörper und so einen kurzzeitigen „Nestschutz“ gegen die Erreger. Dieser „Schutz“ endet spätestens nach 18 Monaten mit dem endgültigen Abbau der Immunglobuline, und so kann im herkömmlichen ELISA eine Infektion nicht früher ausgeschlossen werden. HIV-RNA kann jedoch mittels PCR direkt nachgewiesen werden.

Das Center for Disease Control and Prevention (CDC) definiert eine Klassifikation der HIV-Infizierten, die sowohl Klinik als auch immunologische Punkte berücksichtigt. Eine Rückstufung ist grundsätzlich nicht möglich.

Tab. (1) Einteilung in CDC-Klassifikation (siehe Anhang für Symptomzuordnung)

Immunologische Kategorien	Klinische Kategorien			
	N)	A)	B)	C)
CD4-Zellzahl (/µlBlut)	Klinisch unauffällig	Milde Symptome	Mässige Symptome	Schwere Symptome
Alter (<12 Mo. / 1-5 J. / 6-12 J.)				
Keine Immunschwäche (>1500/>1000/>500)	N1	A1	B1	C1
Mäßiger Defekt (750-1500/500-1000/200-500)	N2	A2	B2	C2
Schwere Immunschwäche (<750/<500/<200)	N3	A3	B3	C3

Bei Abwesenheit einer antiretroviralen Therapie ist die Inkubationszeit bei Kindern wesentlich kürzer als bei Erwachsenen. Die klinische Manifestation kann sehr unspezifisch sein. Lymphadenopathien assoziiert mit Hepatosplenomegalie können als Frühzeichen auftreten. Im ersten Jahr können Krankheiten wie Soorstomatitis, Husten, Gedeih- und Entwicklungsstörungen und rezidivierende Infekte auftreten (Niehues 2006). Schließlich kommt es zum Auftreten opportunistischer Erkrankungen, wie z.B. die Pneumocystis Carinii Pneumonie. AIDS ist das Terminalstadium der HIV-Erkrankung und wird unter anderem definiert durch das Auftreten von Infektionen mit opportunistischen Erregern, Versagen der zellulären Immunantwort, Auftreten maligner Neoplasien (Lymphom, Kaposi-Sarkom) oder durch Auftreten einer AIDS-Enzephalopathie.

1.5 Immunpathophysiologie der HIV-Infektion

Das klassische Modell des Immunsystems unterscheidet die natürliche von der spezifischen, die zelluläre von der humoralen Abwehr, wobei alle Komponenten sich gegenseitig steuern.

1.5.1 T-Lymphozyten

Bestandteile der zellulären, spezifischen Abwehr sind die T-Lymphozyten. Die HIV-Erkrankung ist in erster Linie eine Immunerkrankung, die T-Lymphozyten befällt, die das CD4-Antigen tragen (Ho, Neumann et al. 1995). CD4 tragende T-Helferzellen haben eine zentrale Aufgabe im Abwehrsystem. Neben der Stimulierung von zytotoxischen T-Lymphozyten bei der Eliminierung von infizierten und maligne entarteten Zellen sind die Helferzellen ebenfalls für die Reifung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen zuständig, die für die Antikörperproduktion benötigt werden.

1.5.2 B-Lymphozyten

B-Zellen sind in erster Linie Träger der spezifischen humoralen Abwehr. Neben der Differenzierung zu Memory B-Zellen und Plasmazellen, zeigen Untersuchungen der letzten Jahre, dass auch Aufgaben der angeborenen Abwehr, wie z.B. Antigenpräsentation, direkter Angriff auf Fremdkörper und Sekretion polyreaktiver Antikörper Funktionen dieser Zellen sind (Viau and Zouali 2005).

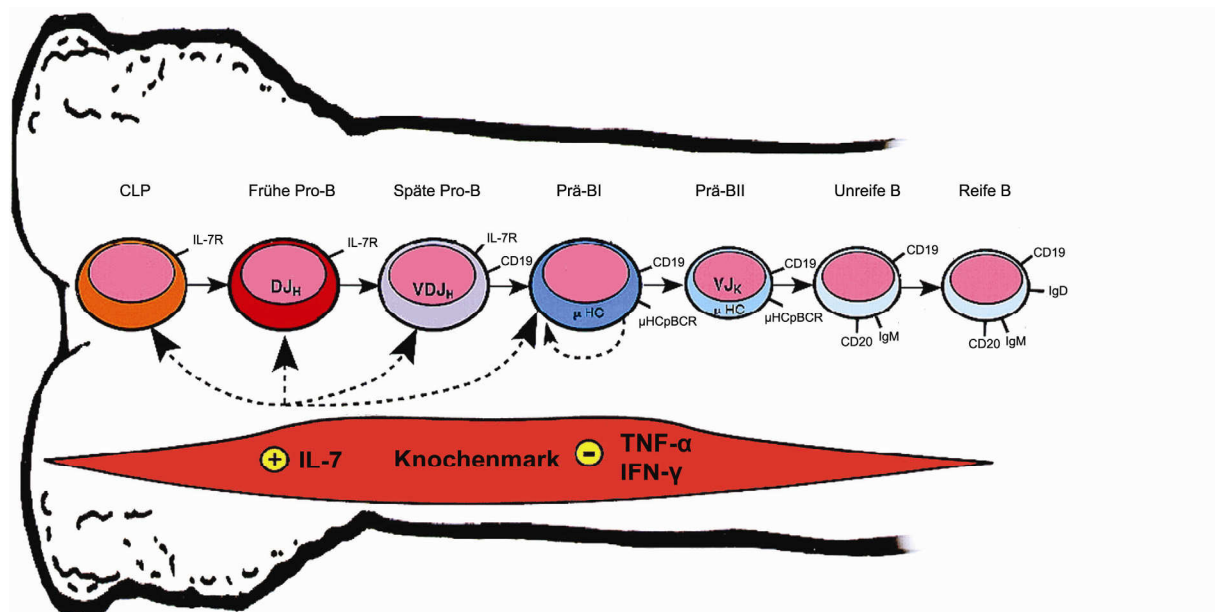
1.5.3 Entwicklung der B-Zellreihe

Zellen der B-Zelllinie unterlaufen in ihrer Differenzierung charakteristischen Veränderungen. Dabei unterscheiden wir eine antigenunabhängige Entwicklung zur naiven, reifen B-Zelle in der fetalen Leber, bzw. Knochenmark. In den sekundären lymphatischen Organen findet nach Antigenkontakt eine terminale Differenzierung zu Memory B-Zellen und Antikörper produzierenden Plasmazellen statt.

Abb. (2) B-Zellentwicklung im Knochenmark (modifiziert nach LeBien 2000)

Aus der Vorläuferzelle (*CLP* = common lymphoid progenitor) entwickelt sich über VDJ-Genrekombination der B-Zellrezeptor: Umlagerung des Immunglobulinschwerkettengens (*D-JH*-Kombination in der frühen Pro B-Zelle) → Durch *V-DJH*-Rekombination in der späten Pro-B-Zelle entsteht die intakte μ HC-Kette, welches als Teil des prä-B-Zellrezeptors auf der Oberfläche ab der Prä-B-Zelle (μ HCpBCR) exprimiert wird.

Anschließend findet die Umlagerung des Immunglobulinleichtkettengens (*V-JK*) statt. Dies führt zu einer Expression kompletter Immunglobulinmoleküle (*IgM*). Die unreife B-Zelle ist noch nicht fähig zur Auslösung einer Immunantwort. Erst durch die Selektion der Umgebung (Überprüfung der Selbsttoleranz, Vernichten autoreaktiver B-Zellen) erfolgt die Entlassung ins periphere Blut als reife, naive B-Zelle) Dabei wird *IgD* mit *IgM* als Oberflächenmolekül mitexprimiert. *CD19* wird bereits vor der Prä-B-Zellentwicklung, *CD20* erst anschließend exprimiert. Stimulierend auf die B-Zellentwicklung im Knochenmark ist in der Stromazelle produziert IL-7 und der zugehörige IL-7 Rezeptor (*IL-7R*) auf der frühen und späten Pro-B-Zelle, während *TNF- α* und *IFN- γ* inhibierend wirken.



Im Knochenmark (siehe Abb.2) entwickelt sich die B-Zelle aus den Vorläuferzellen. Auf der Progenitor- B-Zelle finden sich einige für B-Zellen typische Oberflächenantigene. In erster Linie wird ab hier durch Genrekombination (VDJ-Rekombination) der B-Zellrezeptor in Form eines Oberflächenimmunglobulins IgM produziert (Coupland, Hummel et al. 2000; LeBien 2000; Wang, Zhang et al. 2003). Die unreife B-Zelle unterzieht sich einer Selektion zur Selbsttoleranz und wird anschließend in den peripheren B-Zell-Pool als reifer naiver B-Lymphozyt entlassen (Rajewsky 1996; Grimaldi, Hicks et al. 2005). Als B-Zellmarker wurde in dieser Arbeit CD20 verwendet. Dieses 32 kD schwere Phosphoprotein wird im Gegensatz zu CD19 erst nach der Pre-B-Zellentwicklung, vor der Expression von zytoplasmatischen Schwereketten an die Oberfläche gebracht und in der terminal differenzierten Plasmazelle wieder abgebaut (Stashenko, Nadler et al. 1980; Bofill, Janossy et al. 1985; Kansas and Dailey 1989). Studien belegen, dass CD20 auch für die B-Zellaktivierung und Differenzierung eine Rolle spielt (Tedder, Boyd et al. 1985).

Ein weiteres Oberflächenantigen, das schließlich die reife B-Zelle von der unreifen trennt, ist das membranständige Immunglobulin D, welches in der letzten Entwicklungsphase im Knochenmark mit dem Immunglobulin M koexprimiert wird (Herzenberg, Black et al. 1980; Campana, Janossy et al. 1985) (siehe auch Memory B-Zelle). IgD, welches im Zuge der weiteren Differenzierung (siehe unten) wieder verloren geht, wurde in dieser Arbeit, zusammen mit CD20, zur Bestimmung der reifen B-Zellen bestimmt.

1.5.4 B-Zellaktivierung - Interaktion T-Zelle / B-Zelle

Die naiven B-Zellen besiedeln nun periphere lymphatische Organe, wo sie in Primärfollikeln auf Antigenkontakt warten. Im Keimzentrum der Follikel befindet sich eine Mikroumgebung, in der die B-Zelle durch Antigenpräsentation aktiviert werden kann. Neben der direkten unabhängigen Aktivierung durch bakterielle Polysaccharide, polymere Proteine und Lipopolysaccharide (Viau and Zouali 2005) ist die T-Zell abhängige Aktivierung von entscheidender Bedeutung. Antigenpräsentierende Zellen (APC) innerhalb des Maschenwerks der Follikel präsentieren CD4⁺ T-Helferzellen Antigenbestandteile und fördern die Helferzellen zur Aktivierung und Kostimulation. Durch Hochregulierung bestimmter Oberflächenmarker können antigenspezifische B-Zellen aktiviert werden. Hier kommt hauptsächlich das nun auf der T-Zelle hochregulierte Antigen CD154 zum Einsatz um komplementär an der B-Zelle CD40 zu binden und diese zu aktivieren.

In der Keimzentrumsreaktion verdrängen antigenaktivierte B-Zellen naive B-Zellen an den Rand (Mantelzone). Weiterhin transformieren die aktivierten B-Zellen nun zu Zentroblasten und expandieren durch verstärkte Proliferation. Bei verstärkter Stimulation entstehen Zentrozyten, wovon 90% durch Apoptose untergehen. Die übrigen 10% haben sich auf das zu erfassende Antigen spezialisiert, wobei durch somatische Hypermutation nur Zentrozyten übrig bleiben, deren Immunglobulin ein korrespondierendes Antigen bindet - Affinitätsreifung (Rajewsky 1996; Ghia, Prato et al. 2004). Terminal differenziert sich der Zentrozyt in langlebige Plasmazellen, wobei oft ein Klassenwechsel von IgM nach IgG bzw. IgA stattfindet. Ebenso kann sich die Zelle in Memory B-Zellen umwandeln (Lane 1996; Coupland, Hummel et al. 2000).

Bei Reexposition mit dem gleichen Antigen tritt nun die sekundäre Immunantwort in Kraft. Memory B-Zellen erkennen das Antigen und differenzieren zu Plasmazellen, um eine raschere Antikörperantwort zu gewährleisten.

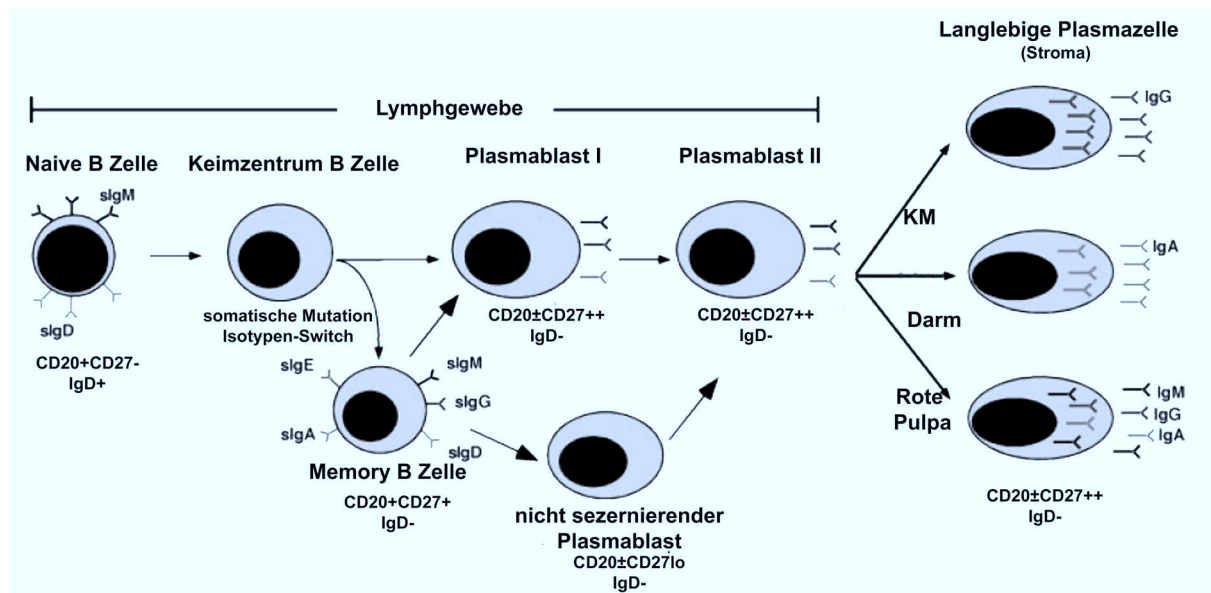
1.5.5 Entwicklung Memory B-Zelle

Bei der Differenzierung zu Memory B-Zellen finden charakteristische Veränderungen an der B-Zelloberfläche statt. Schon früh wurde erkannt, dass das Oberflächenimmunglobulin D sezerniert wird und IgD⁺ Zellen Vorstufen von IgD⁻ Memory B-Zellen darstellen. Es wurde gezeigt, dass im Allgemeinen IgD⁺ Zellen eine Antikörperreaktion mit niedriger Affinität im Gegensatz zu IgD⁻ Zellen aufweisen (Herzenberg, Black et al. 1980). Hierbei bekommt der später entdeckte Memory B-Marker CD27 eine entscheidende Rolle um die Entwicklung von naiven B-Zellen zu Memory B-Zellen zu beschreiben. CD27, ein 120-kDa Typ I Transmembranglykoprotein, welches der TNF Rezeptorfamilie angehört, wird neben T-Zellen, NK-Zellen auch auf Memory B-Zellen exprimiert.

Umstritten ist bei B-Zellen die Einordnung von Intermediärstufen welche den Verlust der IgD noch nicht vollzogen haben (CD27⁺IgD⁺). Viele Autoren betrachten die Stärke der Expression von CD27 als entscheidendes Kriterium und definieren danach die Umwandlungsfrequenz zu Plasmazellen (Avery, Ellyard et al. 2005). Grundsätzlich besteht der Konsens, dass CD27 als Zentroblast erworben wird (Agematsu, Hokibara et al. 2000; Xiao, Hendriks et al. 2004). Aus dem oben Erwähnten wird in dieser Arbeit CD27⁺IgD⁺ für intermediäre Zellen, und CD27⁺IgD⁻ für Memory-Zellen verwendet.

Abb. (3) Terminale B-Differenzierung in der Peripherie (Avery, Ellyard et al. 2005)

Im lymphatischen Gewebe werden naive B Zellen durch Antigene und kostimulierende Faktoren aktiviert. In der Keimzentrumsreaktion proliferieren die B Zellen. Durch somatische Hypermutation und Isotypen-Switch (Wechsel der Immunglobulinklasse) entstehen Zentrozyten, deren Immunglobulin ein korrespondierendes Antigen bindet. Entweder differenzieren Zentrozyten weiter zu Memory B-Zellen oder zu Plasmablasten. Ebenso können Plasmablasten bei Reexposition mit einem spezifischen Antigen direkt aus Memory B-Zellen entstehen. Plasmablasten können je nach Expression von CD38 (nicht in der Grafik) in frühe (CD38-) oder späte (CD38+) Formen unterteilt werden, welche sich anschließend in langlebige antikörpersezernierende Plasmazellen differenzieren. CD20, als Marker der reifen B-Zelle, wird auf Plasmazellen nicht mehr differenziert.



Der entsprechende Ligand CD70 (CD27L), ein Typ II transmembranäres Glykoprotein, befindet sich hauptsächlich auf aktivierten T-Helferzellen (CD4+, CD45RO+) (Agematsu, Kobata et al. 1994; Agematsu, Kobata et al. 1995; Tesselaar, Gravestien et al. 1997). Denkbar sind im Grunde genommen Interaktionen zwischen zwei T-Zellen, als auch zwischen T-Zelle und B-Zelle. Die Bindung zwischen Memory B-Zelle und T-Helferzelle durch CD40-CD154 und auch CD27-CD70 trägt zur Regulierung der Aktivität bei. Sowohl die Differenzierung zu Plasmazellen, als auch die folgende Antikörpersekretion hängen von dieser Stimulation ab (Kobata, Jacquot et al. 1995; Agematsu, Nagumo et al. 1998; Nagumo, Agematsu et al. 1998). Jedoch konnte gezeigt werden, dass kein synergistischer Effekt besteht. Vielmehr werden unterschiedliche B-Zellantworten durch die Ligation obengenannter Antigene erreicht (Jacquot, Kobata et al. 1997).

1.5.6 Pathophysiologie der B-Lymphozyten bei der HIV-Infektion

Eine abnorme B-Zellaktivierung ist ein wichtiges Kennzeichen einer HIV-Infektion. Dabei stehen direkte Schäden ausgelöst durch das Virus indirekten Schäden durch die CD4 T-Zelldysfunktion und -depletion gegenüber.

Hyperaktivierung: Paradoxerweise beobachtet man eine Hyperaktivierung der B-Zellen (Amadori, Zamarchi et al. 1989; Amadori, Zamarchi et al. 1991) mit einer entsprechenden Hypergammaglobulinämie. Bezüglich der sezernierten Antikörper sind HIV-spezifische als auch unspezifische Antikörper zu beobachten. Während gerade bei Beginn der Infektion die spontane Sekretion HIV-spezifischer Immunglobuline überwiegt, findet kurz danach auch eine polyklonale Aktivierung statt (Shirai, Cosentino et al. 1992; Zamarchi, Barelli et al. 2002). Präsenz zirkulierender Immunkomplexe und Autoantikörper gegen zelleigene (z.B. CD8-Zellen) Strukturen sind weitere Bestandteile der Hyperaktivierung (Wang, Horowitz et al. 1999).

Umstritten ist die Ursache der Hyperaktivierung. Grundsätzlich wird neben der Hypergammaglobulinämie auch eine verstärkte Sekretion von B-Zell stimulierenden Faktoren beobachtet, wie z.B. BLys, einem B-Zell spezifischen Stimulatorprotein (Rodriguez, Valdez et al. 2003). IL-6 und TNF- α scheinen eine Rolle zu spielen, Korrelationen zwischen IL-10 und dem Auftreten von B-Zell-Lymphomen wurden von Autoren beschrieben. Ebenfalls scheint eine vermehrte Expression von CD154 auf CD4+T-Helferzellen für die Hyperaktivierung verantwortlich zu sein (Muller, Aukrust et al. 1998; Moir, Lapointe et al. 1999; Martinez-Maza and Breen 2002), während andere Autoren eine normale Expression von CD154 beobachten (Moir, Ogwaro et al. 2003).

B-Zelldysfunktion: Trotz Hyperaktivierung sind die B-Zellen infizierter Patienten vermindert stimulierbar gegenüber in-vitro Stimulation, mit z.B. monoklonalen antiCD40-Antikörper und Staphylococcus aureus Cowan I Partikel (Conge, Tarte et al. 1998), als auch mit Mitogenen wie dem Pokeweed Mitogen (Miedema, Petit et al. 1988). Bakterielle Infekte aufgrund schwacher humoraler Immunantwort sind gehäuft bei den Patienten zu beobachten.

Maligne Neoplasien: B-Zellen weisen bei in-vitro Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) eine Transformation auf. Eine Vielzahl von Malignomen ist mit dem Virus assoziiert,

jedoch sind besonders immunsupprimierte Patienten betroffen (Ambinder 2001). Dies führt zu einer erhöhten Rate an EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen bei HIV-Patienten (Grulich, Wan et al. 2000; Martinez-Maza and Breen 2002).

Direkter Befall der B-Zelle: Obwohl CD4-T-Zellen als Hauptangriffsort im Mittelpunkt stehen, ist mittlerweile belegt, dass auch B-Zellen direkt dem Virus ausgesetzt sind. Nicht-transformierte Zellen können nicht durch das HIV direkt infiziert werden, jedoch können das Virus bzw. seine Produkte direkt die B-Zelle aktivieren. Teile des gp41 envelope Proteins induzieren die Aktivierung. Die VH3-Domäne der Zelle kann als Rezeptor fungieren. B-Zellen bei HIV-Infizierten haben zwar wenig HLA-DR und CD21 auf der Oberfläche, dennoch kann bei hoher Viruslast auch der CD21 Komplement-Rezeptor das Virion binden (Jakubik, Saifuddin et al. 2000; Malaspina, Moir et al. 2002). Wenige HIV-Stämme sind in der Lage HIV-Rezeptoren auf der B-Zelle zu induzieren (Moir, Lapointe et al. 1999).

Fehlende Differenzierung: Eine Dysfunktion von T-Zellen ist möglicherweise mit einer Dysfunktion der B-Zelldifferenzierung assoziiert. Mehrere Autoren haben von einer Abnahme CD27 positiver Memory B-Zellen und von einer Erhöhung naiver B-Zellen bei Erwachsenen berichtet (De Milito, Morch et al. 2001; Chong, Ikematsu et al. 2004). Das lösliche Antigen sCD27, welches durch proteolytische Aktivität von Memory B-Zellen abgeworfen wird, scheint durch erhöhte Spiegel die Hyperaktivität des Immunsystems wieder zu geben (Widney, Gundapp et al. 1999).

In Studien bei HIV infizierten Erwachsenen sieht man eine Rekonstitution der B-Zellen durch die ART. Sowohl eine verbesserte B-Zellantwort, als auch eine vermehrte Memory B-Zellzahl werden bei einer Senkung der Viruslast beobachtet (Morris, Binley et al. 1998; Fournier, Baillat et al. 2002; Chong, Ikematsu et al. 2004). Der Spiegel des löslichen Antigen sCD27 nimmt im Zuge einer ART ab (De Milito, Aleman et al. 2002).

Diese Arbeit setzt sich als Ziel, die Memory B-Zellbildung bei vertikal infizierten Kindern und Jugendlichen zu untersuchen.

1.6 Fragestellung der Dissertation

Im Fokus dieser Arbeit steht eine durch HIV verursachte, von der Norm abweichende B-Zelldifferenzierung. Um eine eventuelle Dysfunktion zu erfassen, werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

B-Zellzahl

- Wie verändert sich die B-Zellzahl (CD20-Expression) im Altersverlauf bei gesunden Kindern?
- Unterscheidet sich die B-Zellzahl bei HIV infizierten im Vergleich zu gesunden Kindern?
- Inwiefern wirkt sich eine effektive Therapie der HIV-Infektion auf die B-Zellzahl aus?

B-Zelldifferenzierung

- Wie verändert sich die B-Zelldifferenzierung (CD27 / IgD Expression) im Altersverlauf bei gesunden Kindern?
- Wie sind die Normwerte für Naive, Intermediäre und Memory B-Zellen bei Kindern und Jugendlichen?
- Unterscheidet sich die B-Zelldifferenzierung bei HIV infizierten Kindern im Vergleich zu gesunden Kindern?
- Gibt es eine Korrelation zwischen B-Zelldifferenzierung und Viruslast?
- Gibt es Veränderungen der B-Zelldifferenzierung im longitudinalen Verlauf?

Bekanntlich sind T-Helferzellen maßgeblich an der Differenzierung der B-Zellen beteiligt. Folglich leitet sich diese Fragestellung ab:

- Wie korreliert die B-Zelldifferenzierung mit der Anzahl an CD4 T-Helferzellen?

Mögliche Folgen einer veränderten B-Zelldifferenzierung

- Wie korreliert die B-Zelldifferenzierung mit dem Krankheitszustand (immunologisches Stadium / klinisches Stadium)?
- Wie korreliert die B-Zelldifferenzierung mit quantitativ erhobenen Immunglobulin-Spiegeln?

2 PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Patienten

Das Patientenkollektiv besteht aus **48 HIV infizierten Kindern und Jugendlichen** (9,36 Jahre \pm 4,15 Jahre), die in der Immunologie-Ambulanz der Klinik für Kinder- Onkologie –Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zwischen Januar 2003 und Juli 2005 betreut wurden. Kinder werden von der Analyse ausgeschlossen, wenn nicht zu mindestens 2 Zeitpunkten Daten zur vollständigen B-Zelldifferenzierung, T-Zellkonstitution und Viruslast vorliegen (CD3, CD4, CD20, CD27, IgD).

Tab. (2) Patientencharakteristik: HIV-Patienten und Kontrollgruppe

Alter, CD4+ - Zellzahlen und Prozentzahlen, altersbezogene Prozentzahlen (ABP) und log Viruslastwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die klinische und immunologische Stadieneinteilung erfolgt nach der CDC-Klassifikation (siehe Tab. 1)

Mögliche Prognosefaktoren	HIV-Patienten UKD (n=48)	Kontrollgruppe (n=62)	t-test
Alter (Jahre)	9,36 \pm 4,15	6,03 \pm 3,97	p<0,001
Geschlecht			
Männlich	15	37	
Weiblich	33	25	
Klinisches Stadium			
A	33		
B	8		
C	7		
Immunologisches Stadium			
1	21		
2	18		
3	9		
Viruslast (log Kopien/ml)	2,15 \pm 1,61		
>500 Eq/ml	25		
<500 Eq/ml	23		
CD4+ Zellen (T-Helfer)			
%	28 \pm 10	37 \pm 9	
Anzahl/ μ l	845 \pm 408	1240 \pm 717	
ABP	84 \pm 34	101 \pm 39	p=0,02

Tab. (3) Therapiekombination in der Gesamtgruppe

NRTI: AZT = Azidothymidin, 3TC = Lamivudin, D4T = Stavudin, DDI = Didanosin, ABC = Abacavir, TDF = Tenofovir

NNRTI: EFV = Efavirenz, NVP = Nevirapin

PI: NFV = Nelfinavir, LPV = Lopinavir (*in Kombination mit Ritonavir), RIT = Ritonavir

	Anzahl Patienten
Keine Therapie	<u>5</u>
1 Substanzklasse	<u>3</u>
NRTI	
3TC+ABC	1
DDI+D4T	2
2 Substanzklassen	<u>39</u>
2 NRTI + NNRTI	
3TC + ABC + NVP	1
3TC + ddi + EFV	2
3TC + AZT + EFV	3
2 NRTI + PI	
3TC + AZT + NFV	8
3TC + d4T + RIT	1
3TC + ABC + NFV	2
3TC + AZT + RIT	2
AZT + TDF + NFV	2
AZT + ABC + NFV	1
AZT + ABC + LPV*	1
D4T + DDI + NFV	11
NNRTI + PI	
LPV*+EFV	5
3 Substanzklassen	<u>1</u>
NRTI + NNRTI + PI	
3TC + LPV* + EFV	1

Zusätzlich wurde zur Beurteilung der T-Zellzahlen eine Beziehung zum altersspezifischen Normbereich (ABP = altersbezogene Prozentzahlen) vorgenommen (Comans-Bitter, de Groot et al. 1997). Das Kollektiv wird unterteilt in Patienten mit Viruslast > 500Eq/ml und Patienten mit Viruslast < 500Eq/ml. 43 Kinder werden entweder durch eine Zweifach- oder Dreifachtherapie aus einer Kombination von Protease-Inhibitoren und Nukleosidischen und Nicht-Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren behandelt. 5 Kinder erhielten aufgrund stabiler CD4-Zahlen und niedriger Viruslast keine antiretrovirale Therapie. (Patientenkollektiv siehe auch Tab. 3).

Als **Kontrollgruppe** (KG), sowohl auch zur Erstellung von Normwerten bezüglich der B-Zellsubpopulationen, dienen insgesamt **62 Kinder** (6,03 Jahre \pm 3,97 Jahre). Davon sind 40 immungesunde Kinder aus der Klinik für Kinderchirurgie bzw. aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf. Es werden ausschließlich Kinder einbezogen, die sich dort einem Elektiveingriff unterziehen, und die zum Zeitpunkt des Eingriffes weder Entzündungen, Zeichen allergischer Reaktionen noch chronische Erkrankungen vorweisen. Zusätzlich werden 22 Kinder untersucht, die zum Ausschluss einer Immundefizienz in der Kinderklinik abgeklärt werden und bei denen sich trotz intensiver Untersuchung kein Hinweis auf eine veränderte Immunfunktion findet.

2.2 Immunphänotypisierung T-Lymphozyten und Viruslast

Zur Standarddiagnostik bei der HIV-Infektion gehört die T-Zellphänotypisierung (CD3, CD4, CD8). Die CD4-Helferzellzahl ist u.a. wichtig für die Indikation zur Therapie bei infizierten Kindern. Die Viruslast wird durch quantitative PCR bestimmt.

2.3 B-Lymphozyten

Die Analyse der membranständigen Antigene CD20, CD27 und des membranständigen Immunglobulins D dient der Erfassung der B-Zellsubpopulationen. An Blutproben des oben genannten Patientenkollektivs und der oben beschriebenen Kontrollpersonen werden die Untersuchungen durchgeführt.

2.3.1 Verarbeitung der Blutproben

Als Blutprobe wird mit EDTA behandeltes Blut einer peripheren Venenpunktion (EDTA, Vacutainersystem) genutzt. Dazu werden die Proben sofort, jedoch maximal innerhalb von 6 Stunden nach Gewinnung verarbeitet.

Aus 4 ml Blut wird initial 150 μ l Blut für die spezielle B-Zellfärbung aliquotiert. Um im FACS später eine bessere Aussage über die Verteilung der B-Zellpopulationen zu treffen, wird das folgende Verfahren für die B-Zelldifferenzierung verwendet.

B-Zellaliquot (I): Das B-Zellaliquot mit 150 μ l Blut wird nach Zugabe von 3 ml Phosphatpuffer PBS (pH 7,3, NaCl 8,0g, KCl 0,2g, KH₂PO₄ 0,25g, Na₂HPO₄ 1,35g, Aq.dest. ad 1000ml) bei 1200 Upm und 20°C für 7 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und erneut nach Zugabe von 3 ml PBS

zentrifugiert. Ein zweites Mal wird der Überstand verworfen und das Aliquot-Röhrchen mit dem Sediment steht für die B-Zellfärbung zur Verfügung.

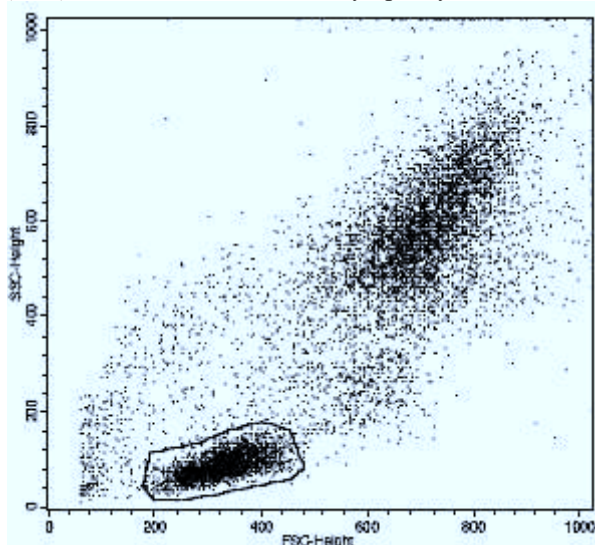
Zellsuspension (II): Der Rest der Blutprobe, welche zur Bestimmung der T- und sonstigen Zellen dient, wird bei 20°C, 1200 Upm, 7 min, Bremse 9 zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Blutplasmas wird die Zellphase 1:1 mit PBS verdünnt. Das Blutplasma wird für eine zukünftige Erfassung von Mediatoren und Zytokinen konserviert und eingefroren. Die Zellsuspension steht für die Routine T-Zellfärbung und für die Negativ-Kontrolle zur Verfügung.

2.3.2 Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrie und Antikörperfärbung

Die analytische Durchflußzytometrie ermöglicht, Zellen zu identifizieren, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt sind. In den vorliegenden Untersuchungen werden pro Messung jeweils 10000 Events (=Zellen) untersucht. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe für die Oberflächenantigene sind FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein). Es werden zu jeder Zelle fünf Informationen gespeichert (Größe, Granularität und drei verschiedene Fluoreszenzen). Die Fluoreszenzanalyse wird mit einem FACSCalibur Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson mit einem Argon-Laser durchgeführt.

Abb. (4) Darstellung peripherer mononukleärer Zellen in der Vorwärts- (FSC) und 90° Seitwärtsstreuung (SSC) Dabei befinden sich die Lymphozyten im markierten Bereich („Gate“).



Es werden direkte Färbungen durchgeführt, bei denen die Antigene mit Fluorochromkonjugiertem Primärantikörper nachgewiesen werden. Die Färbung erfolgt in Polystyrolröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg). Für die T-Zellfärbung und die Negativkontrolle wird jeweils 100µl der Zellsuspension (II), für die B-Zellfärbung das Sediment des B-Zellaliquots (I) eingesetzt. Es werden 40µl des jeweiligen Antikörpergemisches auf jedes Aliquot pipettiert und für 10 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der 10 Minuten werden die Röhrchen mit 2ml Lysing-Solution aufgefüllt und nach Ablauf von 10 Minuten bei 20°C, 1200 Upm, 7 min, Bremse 9 zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und nach Zugabe von 3 ml PBS bei 1200 Upm und 20°C für 7 Minuten erneut zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand wiedermals verworfen und ein drittes Mal nach Zugabe von 3 ml PBS zentrifugiert. Der Überstand wird ein letztes Mal verworfen und diesmal für die durchflußzytometrische Analyse mit 200 µl PBS resuspendiert.

Die Färbungen erfolgen mit monoklonalen Antikörpern von Becton Dickinson (BD) und Immunotech (Imm) in folgenden Kombinationen:

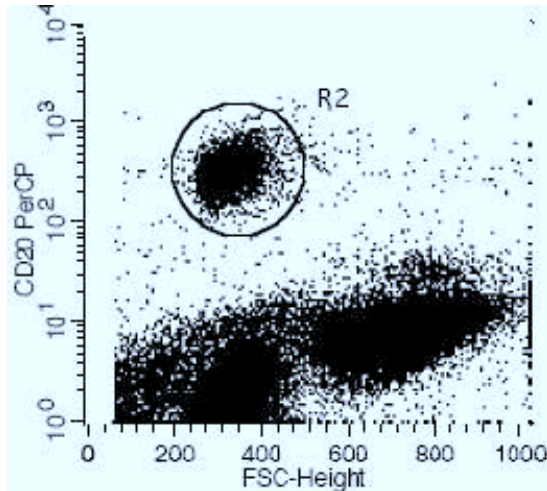
- **T-Zellfärbung:** anti-CD8 FITC (BD) / anti-CD4 PE (BD) / anti-CD3 PerCP (BD)
- **B-Zellfärbung:** anti-IgD FITC (BD) / anti-CD27 PE (Imm) / anti-CD20 PerCP (BD)
- **Negativkontrolle:** Maus-IgG1 FITC (BD) / Maus-IgG2a PE (BD) / Maus-IgG1 PerCP (BD)

2.3.3 Ermittlung der B-Zellsubtypen – B-Zelldifferenzierung

Gating

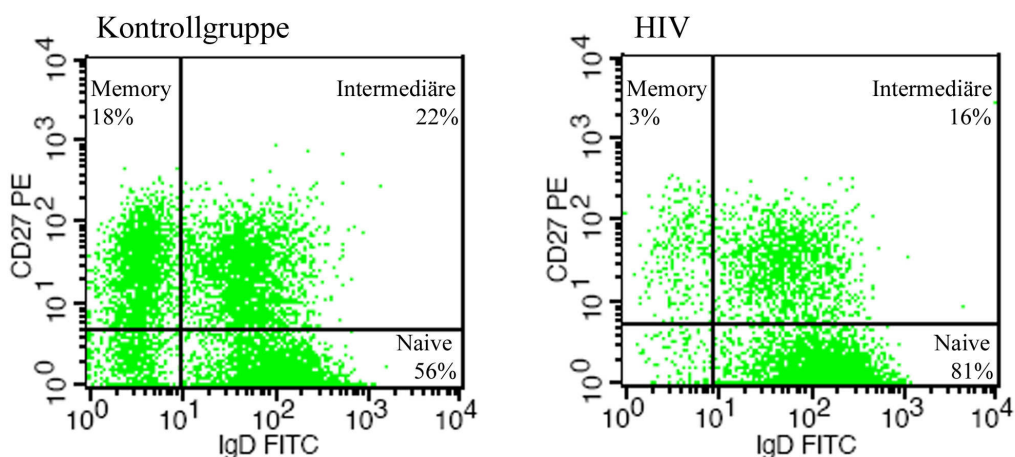
Abbildung 5: Darstellung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) in der Vorwärts- (FSC) und CD20-Fluoreszenzmessung. Dabei befinden sich durch die Verwendung des B-Zellmarkers CD20 im markierten Bereich die B-Zellen (R2). Abb. 6 analysiert zur Oberflächenantigendifferenzierung der B-Zelle die Antigene ausschließlich in diesem Bereich (Gate)

Abb. (5) PBMC in der Vorwärts- (FSC) und CD20-Fluoreszenzmessung



B-Zelldifferenzierung: Messung der Fluoreszenzaktivität an allen in Abb. 5 markierten (Gate) Zellen (=B-Lymphozyten). Dabei entspricht der linke obere Quadrant den CD27 positiven, IgD negativen (Memory B-Zellen), der rechte untere Quadrant den IgD positiven, CD27 negativen (Naive B-Zellen), der rechte obere Quadrant den CD27 und IgD positiven Zellen (Intermediäre B-Zellen)

Abb. (6) B-Zelldifferenzierung: Messung der Fluoreszenzaktivität an allen in Abb. 4 markierten (Gate R2) Zellen (=B-Zellen) Links Individuum Kontrollgruppe (gated events: 10000, 9½ Jahre); Rechts HIV-Patient (gated events: 10000, 9½ Jahre): Im Vergleich zum Individuum der Kontrollgruppe ist rechts (HIV) die Anzahl der Memory B-Zellen (CD27+, IgD-) vermindert und die Anzahl der Naiven B-Zellen (CD27-, IgD+) erhöht



2.4 Quantitative Erfassung der Immunglobuline

Die Erfassung des Plasmaspiegels der Immunglobuline folgt durch Immunnephelometrie von Serum bzw. Plasma des Patienten (Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Universitätsklinikum Düsseldorf). Die Immunglobuline IgG, IgA und IgM werden erfasst. Die Referenzbereiche entsprechen der Standardisierung nach CRM (Certified Reference Material) 470, einem Referenzmaterial, um Plasmaproteine in Assays trotz verschiedener Laborbedingungen untereinander vergleichen zu können (Johnson and Whicher 2001). 5 der 48 Kinder aus der HIV-Kohorte wurden wegen nicht ermittelten Immunglobulinwerten in dem entsprechenden Kapitel (3.3.2) nicht mitbewertet.

2.5 Statistische Auswertung

Die mit der FACSCalibur erfasste Oberflächenantigenexpression von CD4 und CD8 wurde als Relation auf die gesamte T-Zellpopulation (CD3) bezogen. Die B-Zelldifferenzierungsmarker CD27 und IgD wurde als Relation auf die gesamte B-Zellpopulation (CD20) bezogen. Die Angaben beziehen sich auf die absolute Anzahl im peripheren Blut, bzw. den prozentualen Anteil an allen Zellen. Bei der B-Zelldifferenzierung ist der prozentuale Anteil der entsprechenden Subpopulation an allen B-Zellen angeführt. Alle folgenden aufgeführten Zahlen entsprechen den Medianen mit der zugehörigen Interquartildistanz. Unterschiede zwischen den HIV Infizierten und Kontrollpersonen in der Expression wurden mit dem Students t Test berechnet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

Für den Vergleich zwischen HIV infizierten Kindern und der Kontrollgruppe wurden zwei Verfahren angewandt. Einerseits wurden aus beiden Kohorten 23 jeweils altersgleiche Paare gebildet (Matching) und das so das ganze Spektrum (2 Jahre – 18 Jahre) der beiden Gruppen erfasst (Kap. 3.2.3). Andererseits wurde aus beiden Kohorten Altersgruppen gebildet und diese in ihrer Vollständigkeit miteinander verglichen (Kap. 3.2.5).

Die statistische Auswertung und Erstellung von Graphen erfolgte vollständig mit der Software Microsoft Excel (Microsoft Corporation) und OriginPro (OriginLab).

3 RESULTATE

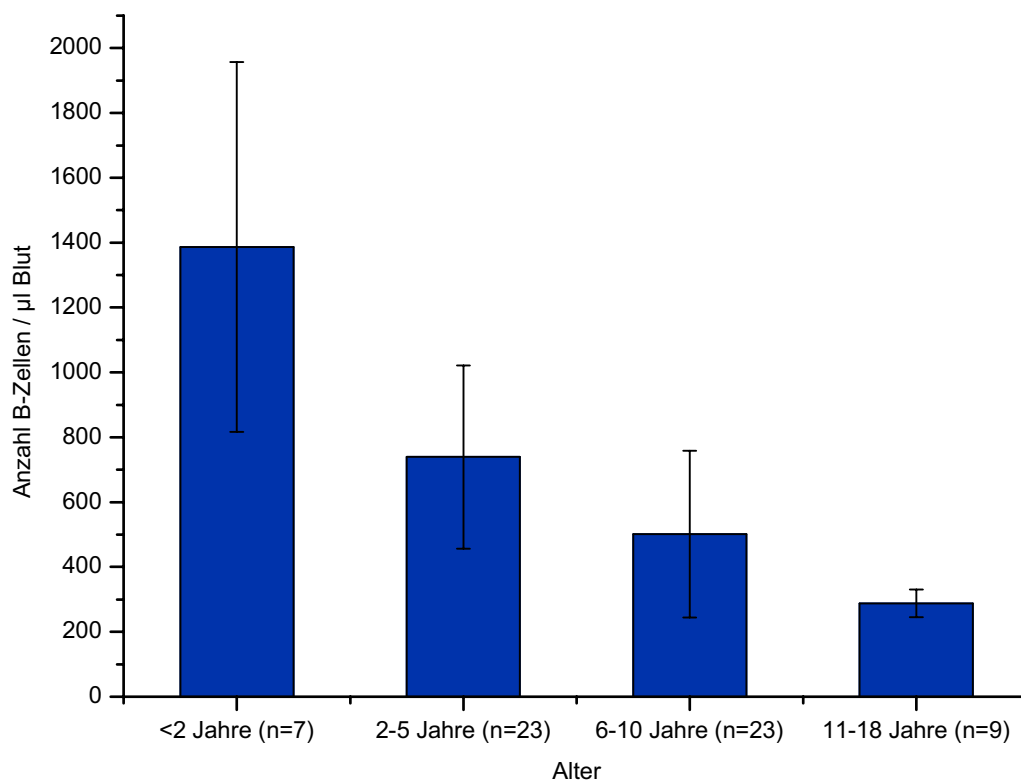
3.1 B-Zellzahl

CD20 ist ein Oberflächenantigen, welches die B-Zelle im Zuge ihrer Reifung im Knochenmark im Endstadium exprimiert (s. Abb. 2). So ist der Pool an CD20+ Lymphozyten als reifer B-Zellpool im peripheren Blut anzusehen, der sowohl Naive, Intermediäre als auch Memory B-Zellen umfasst.

3.1.1 Normalwerte

Es ist eine deutliche Abnahme der B-Zellen, sowohl im Anteil, als auch bei der absoluten Anzahl mit steigendem Alter festzustellen. Die Werte der Kontrollgruppe entsprechen weitgehend den Werten aus der Literatur (Abb. 7 und Tab. 4)

Abb. (7) Anzahl der B-Zellen (CD20+) in der Kontrollgruppe



Tab. (4) B-Zellen in der Kontrollgruppe

Vergleich der erhobenen B-Zellzahl / B-Zellanteil mit Werten aus der Literatur* (Hannet, Erkeller-Yuksel et al. 1992), Prozentualer Anteil und absolute Anzahl der B-Zellen im peripheren Blut, Median + Interquartildistanz

B-Zellanteil an Gesamtlymphozyten

Alter	<2 Jahre	2-5 Jahre	6-10 Jahre	11-18 Jahre
UKD	25% ± 4%	20% ± 8%	19% ± 7%	15% ± 5%
Literatur*	25% ± 6%	24,5% ± 3,5%	17% ± 5%	

B-Zellzahl / µl Blut

Alter	<2 Jahre	2-5 Jahre	6-10 Jahre	11-18 Jahre
UKD	1387 ± 570	739 ± 283	501 ± 257	288 ± 43
Literatur*	1000 ± 500	1000 ± 300	400 ± 100	

3.1.2 Gesamt B-Zellzahl bei HIV

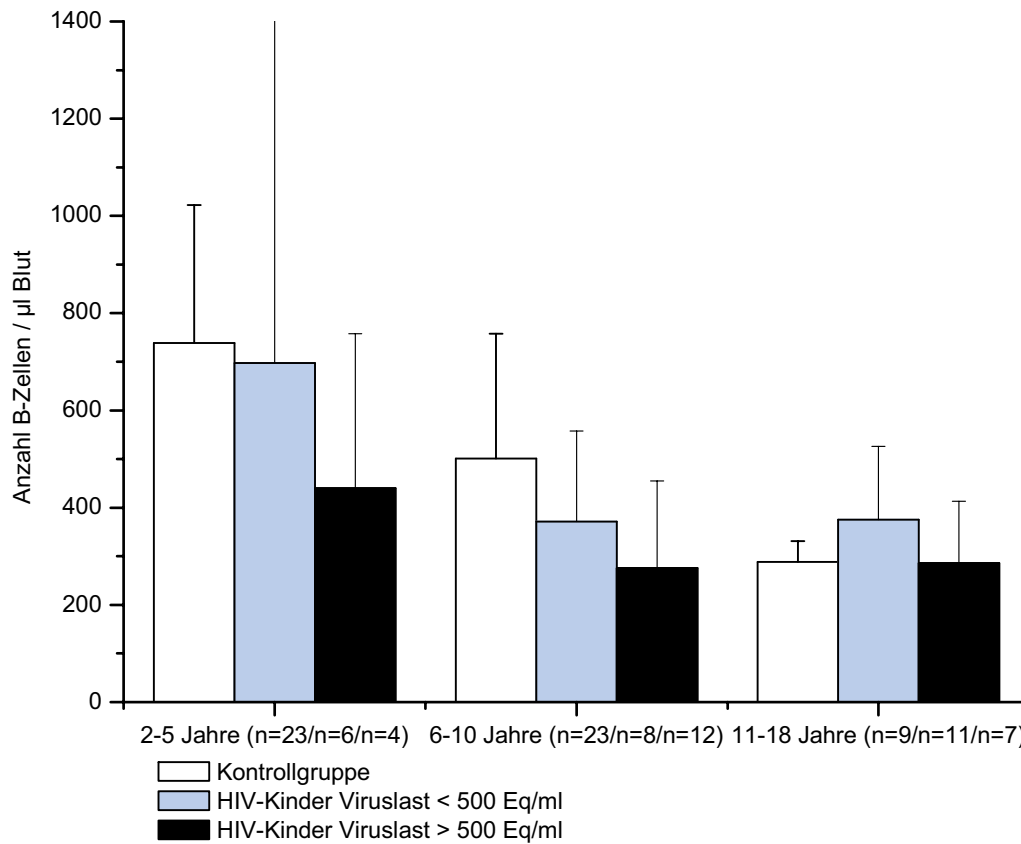
Ein Vergleich der B-Zellzahlen zwischen der Kontrollgruppe und den HIV infizierten Kindern (HIV) ergab eine Reduktion der B-Zellzahl bei HIV infizierten Kindern in den Altersgruppen 2-5 Jahre und 6-10 Jahre.

Tab. (5) Anzahl der B-Zellen (CD20+) / µl Blut im Vergleich

	KONTROLLGRUPPE	HIV	
2-5 Jahre	739 ± 283	524 ± 681	p=0,67
6-10 Jahre	501 ± 257	320 ± 187	p=0,09
11-18 Jahre	288 ± 43	319 ± 170	p=0,11

Eine Aufteilung der HIV infizierten Kinder in Patienten mit einer Viruslast über und unter 500 Eq/ml, ergab eine Reduktion der B-Zellzahl bei HIV-Patienten mit einer hohen Viruslast im Vergleich mit der Kontrollgruppe in allen Altersgruppen. Bei Kindern mit niedriger Viruslast ist diese Reduktion rückläufig.

Abb. (8) Anzahl der B-Zellen (CD20+) / μ l Blut bei verschiedenen Altersgruppen



3.2 B-Zelldifferenzierung

Bei erniedrigter B-Zellzahl stellt sich die Frage, welche B-Subpopulationen betroffen sind. Aufgrund der Entwicklungsreihe des B-Lymphozyten kann man anhand der Oberflächenantigene den Differenzierungsgrad der B-Zelle definieren:

CD20+ IgD+ CD27-	Naive B-Zelle
CD20+ IgD+ CD27+	Intermediäre B-Zelle
CD20+ IgD- CD27+	Memory B-Zelle

3.2.1 Physiologische B-Zelldifferenzierung: altersabhängige Entwicklung der

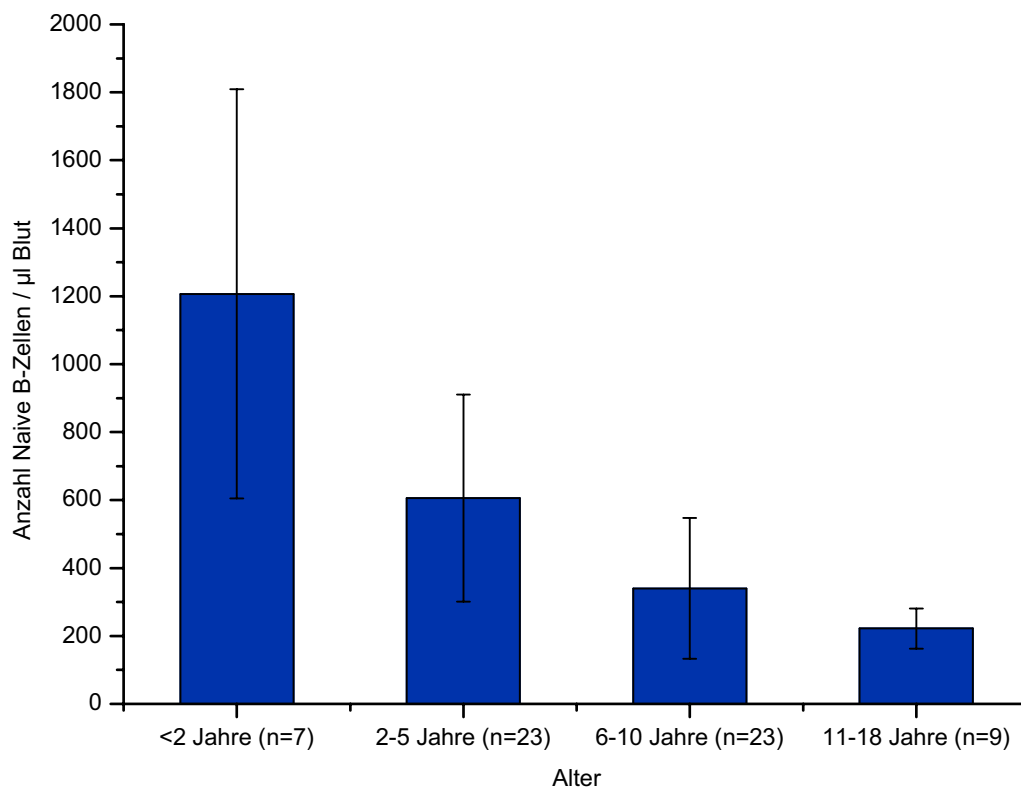
Subpopulationen in der Kontrollgruppe

Die Ergebnisse in der Kontrollgruppe zeigen eindeutig eine ontogenetische Entwicklung der B-Zellreihe. Mit zunehmendem Alter nehmen die Naiven B-Zellen ab, während ein deutlicher Anstieg des Anteils der Memory B-Zellen zu beobachten ist.

3.2.1.1 Naive B-Zellen:

Der Anteil Naiver B-Zellen an allen B-Zellen nimmt mit zunehmendem Alter beträchtlich ab (<2J Median 90% \pm 7%; 11-18J Median 71% \pm 15% $p < 0,001$). Ebenfalls signifikant ist die Abnahme der absoluten Anzahl der Naiven B-Zellen (<2J Median 1207 \pm 602 Zellen/ μ l; 11-18J Median 222 \pm 59 Zellen/ μ l $p < 0,00001$) (s. Abb. 9).

Abb. (9) Anzahl der Naiven B-Zellen (CD20+IgD+CD27-) in der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Altersgruppe



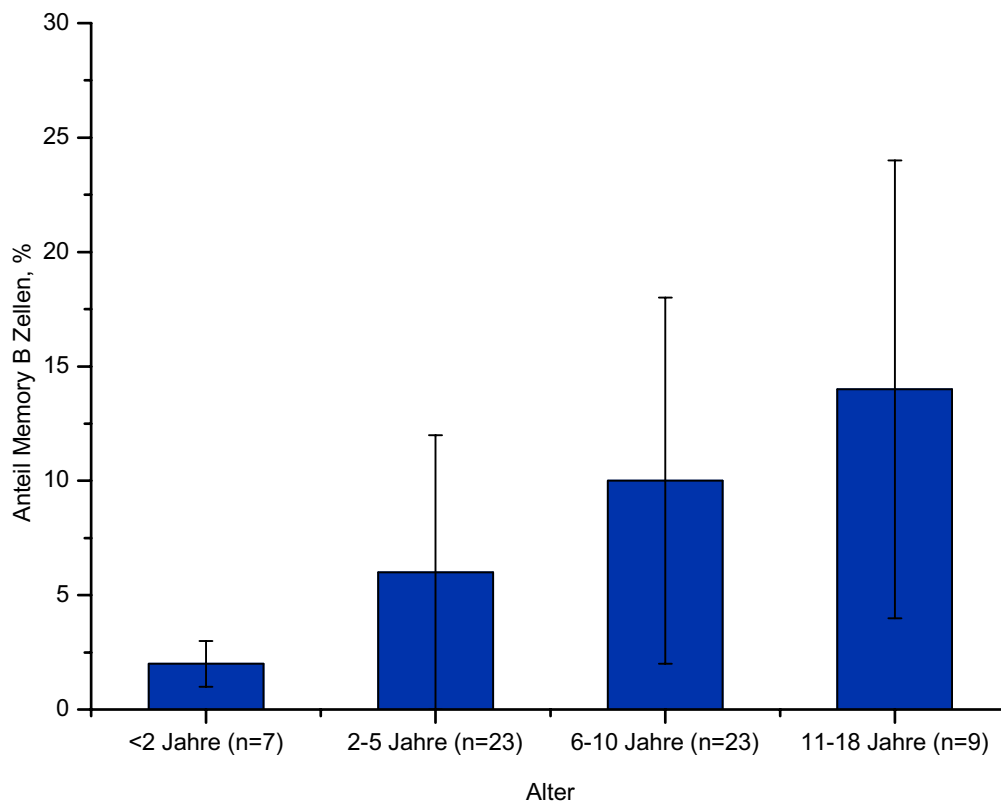
3.2.1.2 Intermediäre B-Zellen:

In der Kontrollgruppe ist einerseits eine Halbierung der Anzahl der Intermediären B-Zellen mit zunehmendem Alter festzustellen (<2J Median 70 ± 33 Zellen/ μl ; 11-18J Median 34 ± 17 Zellen/ μl $p < 0,01$), während sich der Anteil an allen B-Zellen verdoppelt (<2J Median $5\% \pm 4\%$; 11-18J Median $11\% \pm 5\%$ $p < 0,001$).

3.2.1.2 Memory B-Zellen:

Der relative Anteil an Memory B-Zellen nimmt mit dem Alter zu. Bezüglich der absoluten Memory B-Zellzahl ist der Anstieg nicht signifikant (<2J Median 23 ± 20 Zellen/ μl ; 11-18J Median 32 ± 16 Zellen/ μl $p = 0,56$). In Anbetracht der Tatsache, dass die gesamte B-Zellzahl abnimmt, sieht man eine signifikante Zunahme des relativen Anteils der Memory B-Zellen (<2J Median $2\% \pm 1\%$; 11-18J Median $14\% \pm 10\%$ $p < 0,001$) (s. Abb. 10).

Abb. (10) Anteil der Memory B-Zellen (CD20+IgD-CD27+) an allen B-Zellen in der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Altersgruppe



3.2.2 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Tab. (6) B-Zelldifferenzierung in der Kontrollgruppe

oben: Anteil der B-Subpopulationen an allen B-Zellen in Abhängigkeit von der Altersgruppe (Angaben in %), Median ± Interquartildistanz

unten: Anzahl der B-Subpopulationen in der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Altersgruppe (Anzahl Zellen / µl), Median ± Interquartildistanz

Anteil, %	< 2 Jahre (n=7)	2-5 Jahre (n=23)	6-10 Jahre (n=23)	11-18 Jahre (n=9)
Naive B-Zellen	90 ± 7	82 ± 10	76 ± 13	71 ± 15
Intermediäre B-Zellen	5 ± 4	9 ± 5	11 ± 5	11 ± 5
Memory B-Zellen	2 ± 1	6 ± 6	10 ± 8	14 ± 10

Anzahl, µl	< 2 Jahre (n=7)	2-5 Jahre (n=23)	6-10 Jahre (n=23)	11-18 Jahre (n=9)
Naive B-Zellen	1207 ± 602	606 ± 305	340 ± 207	222 ± 59
Intermediäre B-Zellen	70 ± 33	57 ± 45	56 ± 46	34 ± 17
Memory B-Zellen	23 ± 20	46 ± 28	50 ± 31	32 ± 16

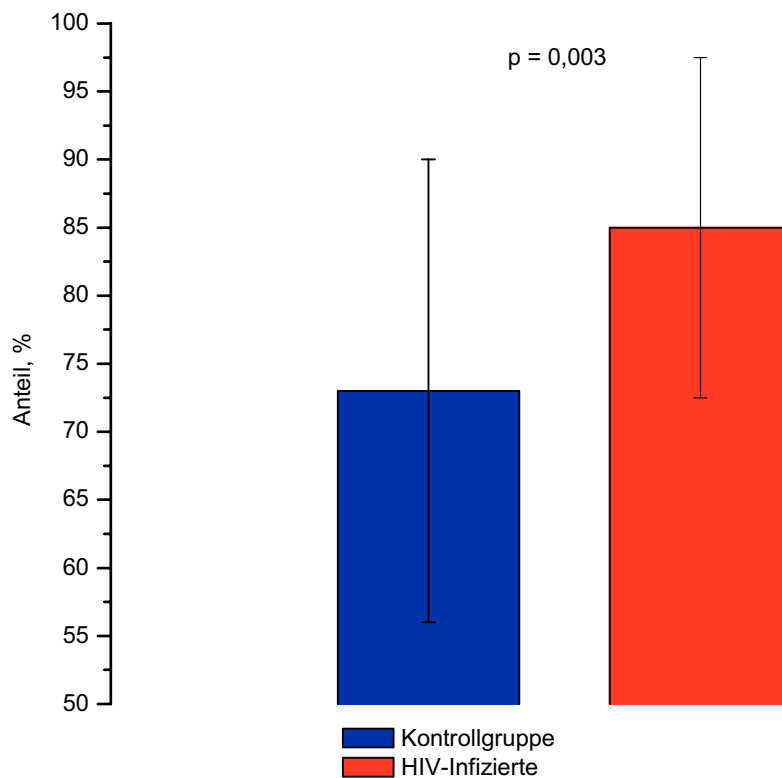
3.2.3 Vergleich: HIV infizierte Kinder und Kontrollgruppe – matched-pair-Analyse

Jeweils 23 Patienten aus jeder Kohorte (HIV infizierte Kinder und Kontrollgruppe) werden dem Alter entsprechend zueinander gematcht, um einen Alterseffekt zu minimieren.

Naive B-Zellen

Der Anteil der Naiven B-Zellen an der Gesamt B-Zellzahl bei den infizierten Kindern ist signifikant höher (ANTEIL Median Kontrolle 73% ± 17% vs. HIV 85% ± 13% p=0,003) (s. Abb. 11). Der Vergleich zwischen HIV-Patienten und der Kontrollgruppe bezüglich der Naiven B-Zellzahl ergab kein signifikantes Ergebnis (ANZAHL Median Kontrolle 306 ± 290 Zellen/µl vs. HIV 303 ± 185 Zellen/µl p=0,397), jedoch ist dieser aufgrund einer insgesamt erniedrigten Gesamt B-Zellzahl nicht aussagekräftig.

Abb. (11) Anteil der Naiven B-Zellen an allen B-Zellen (CD20+IgD+CD27-) im direkten Vergleich in der matched-pair Analyse



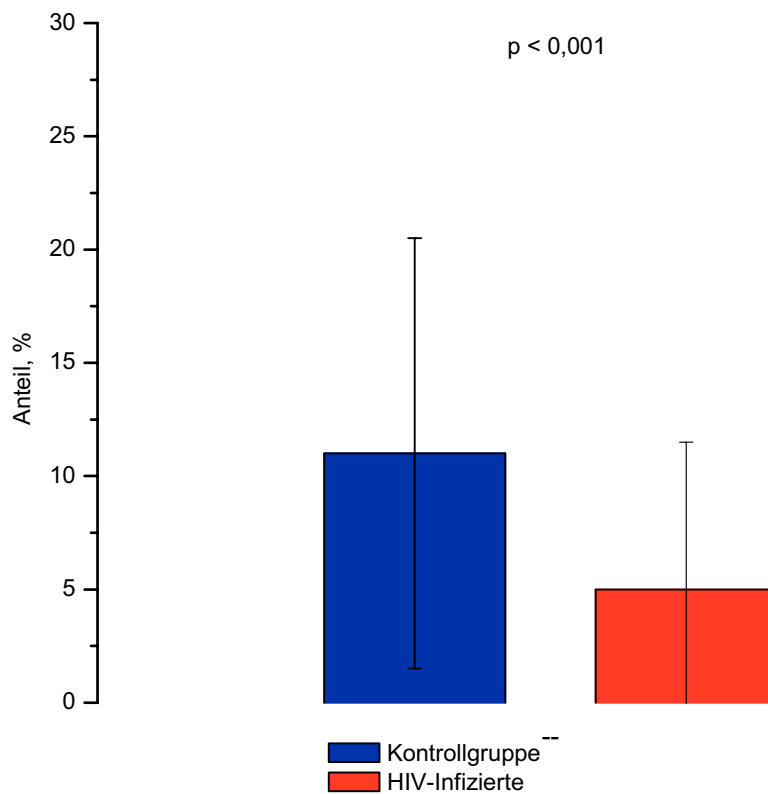
Intermediäre B-Zellen

Beim Anteil der Intermediären B-Zellen an der Gesamt B-Zellzahl besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten. Die HIV-Infektion ist assoziiert mit einer Abnahme dieser Zellpopulation (ANTEIL Median Kontrolle $11\% \pm 6\%$ vs. HIV $8\% \pm 7\%$ $p=0,015$). Bei der Anzahl lässt sich ebenfalls eine Verminderung der Zellzahl beobachten (ANZAHL Median Kontrolle 46 ± 48 Zellen/ μ l vs. HIV 28 ± 34 Zellen/ μ l), ebenso wie bei den Naiven B-Zellen ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ($p=0,079$).

Memory B-Zellen

Sowohl beim Anteil an allen B-Zellen als auch bei der absoluten Anzahl sind Memory B-Zellen bei HIV infizierten Patienten signifikant vermindert. (ANTEIL Median Kontrolle $11\% \pm 10\%$ vs. HIV $5\% \pm 7\%$ $p<0,001$; ANZAHL Median Kontrolle 40 ± 28 Zellen/ μ l vs. HIV 20 ± 31 Zellen/ μ l $p=0,008$)

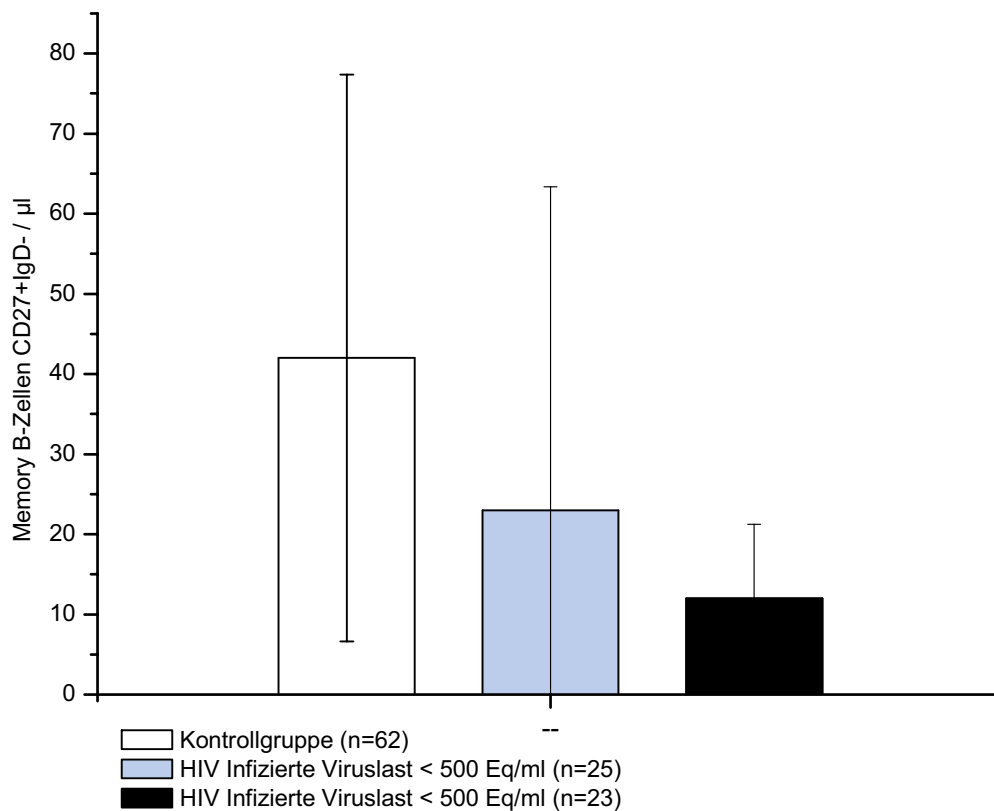
Abb. (12) Anteil der Memory B-Zellen an allen B-Lymphozyten (CD20+IgD-CD27+) im direkten Vergleich in der matched-pair Analyse



3.2.4 Einfluss und Effektivität der ART

Als Folge einer effektiven HAART ist die Viruslast bei HIV infizierten Kindern supprimiert. Dementsprechend werden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt: Patienten mit einer Viruslast unter 500 Eq/ml sind als weitgehend effektiv supprimiert zu betrachten, während Patienten mit höherer Viruslast (>500 Eq/ml) als weniger effektiv therapiert gesehen werden. Im direkten Vergleich zwischen der Kontrollgruppe, Patienten mit niedriger Viruslast <500 Eq/ml und Patienten mit hoher Viruslast >500 Eq/ml, ergeben sich signifikante Unterschiede bei den Memory B-Zellen (ANZAHL Median Kontrolle: 42 ± 35 Zellen/ μ l; HIV <500 Eq/ml 23 ± 40 Zellen/ μ l; HIV >500 Eq/ml 12 ± 9 Zellen/ μ l; $p < 0,012$ zwischen allen Kohorten). Mit zunehmender Viruslast sinkt die Anzahl an absoluten Memory B-Zellen, allerdings zeigt sich in dieser Untersuchung kein direkter Zusammenhang. Eine Korrelation zwischen dem Logarithmus der Viruslast und der Anzahl der Memory B-Zellen wies keine Assoziation zwischen den beiden Faktoren auf ($r = -0,33$).

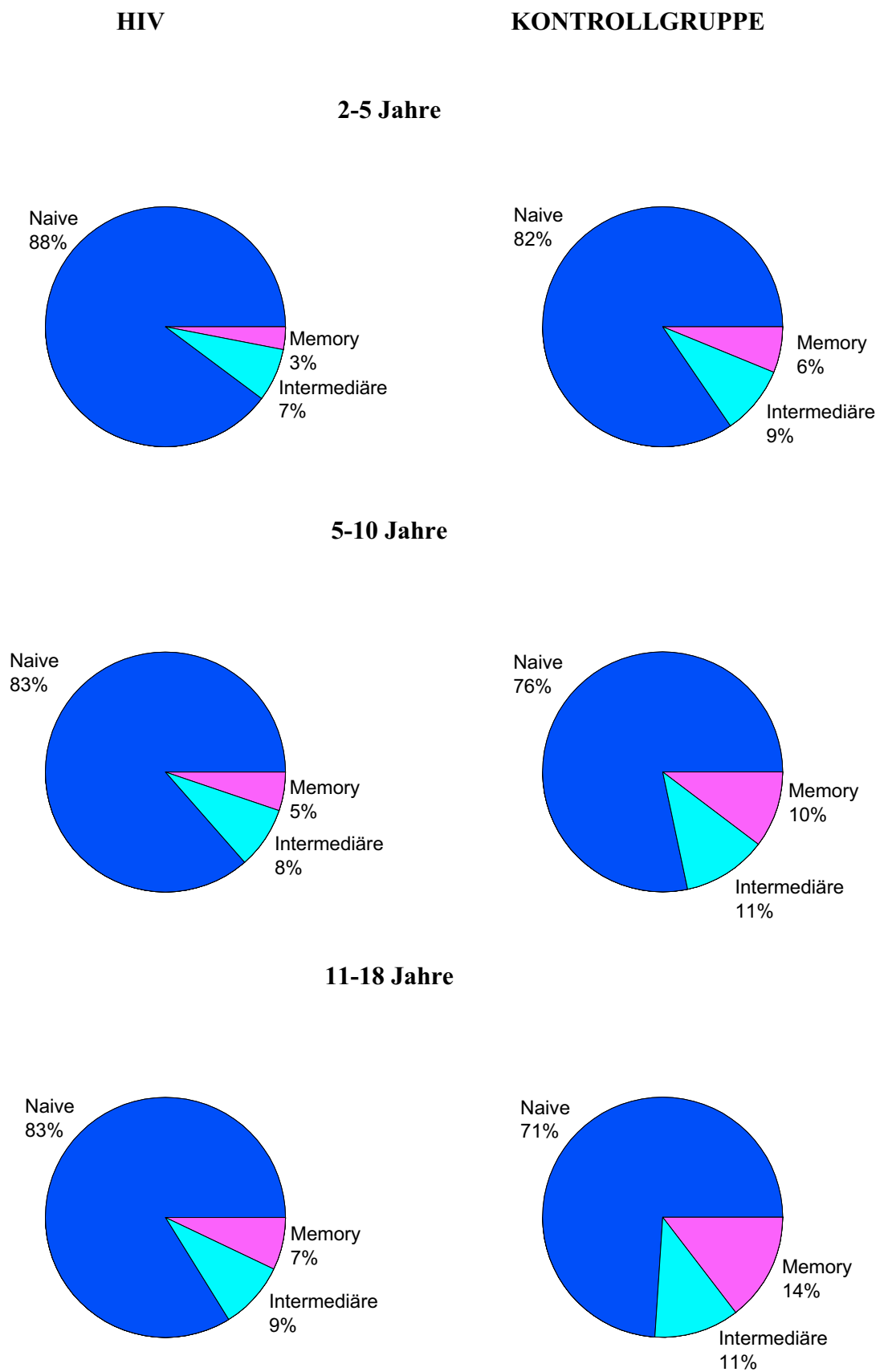
Abb. (13) Memory B-Zellen im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und HIV infizierten Kindern mit niedriger und hoher Viruslast



3.2.5 Vergleich: HIV infizierte Kinder und Kontrollgruppe – Altersgruppen

Man beobachtet einen erhöhten Anteil an Naiven B-Zellen bei HIV infizierten Kindern, jedoch eine erniedrigte Zellzahl. Grund dieser Diskrepanz ist die verminderte Gesamt B-Zellzahl bei HIV infizierten Patienten. Grundsätzlich ist bezüglich des Anteils der Naiven in allen Alterklassen ein signifikanter Unterschied erkennbar. Bezüglich der Entwicklung im Alter lässt sich feststellen, dass bei HIV infizierten Kindern, ebenso wie in der gesunden Kontrollgruppe eine Abnahme der Anteile Naiver B-Zellen als auch der Zellzahlen aufzufinden ist. Man beobachtet sowohl einen verminderten Anteil, als auch eine verminderte Anzahl an Intermediären B-Zellen bei HIV infizierten Kindern im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Bezüglich der Memory B-Zellen bestehen in jeder Altersgruppe signifikante Unterschiede. Sowohl die absolute Anzahl an Memory B-Zellen, als auch der Anteil der Memory B-Zellen an allen B-Lymphozyten ist bei HIV infizierten Kindern vermindert.

Abb. (14) B-Zelldifferenzierung im Vergleich zwischen HIV infizierten Kindern und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit vom Alter

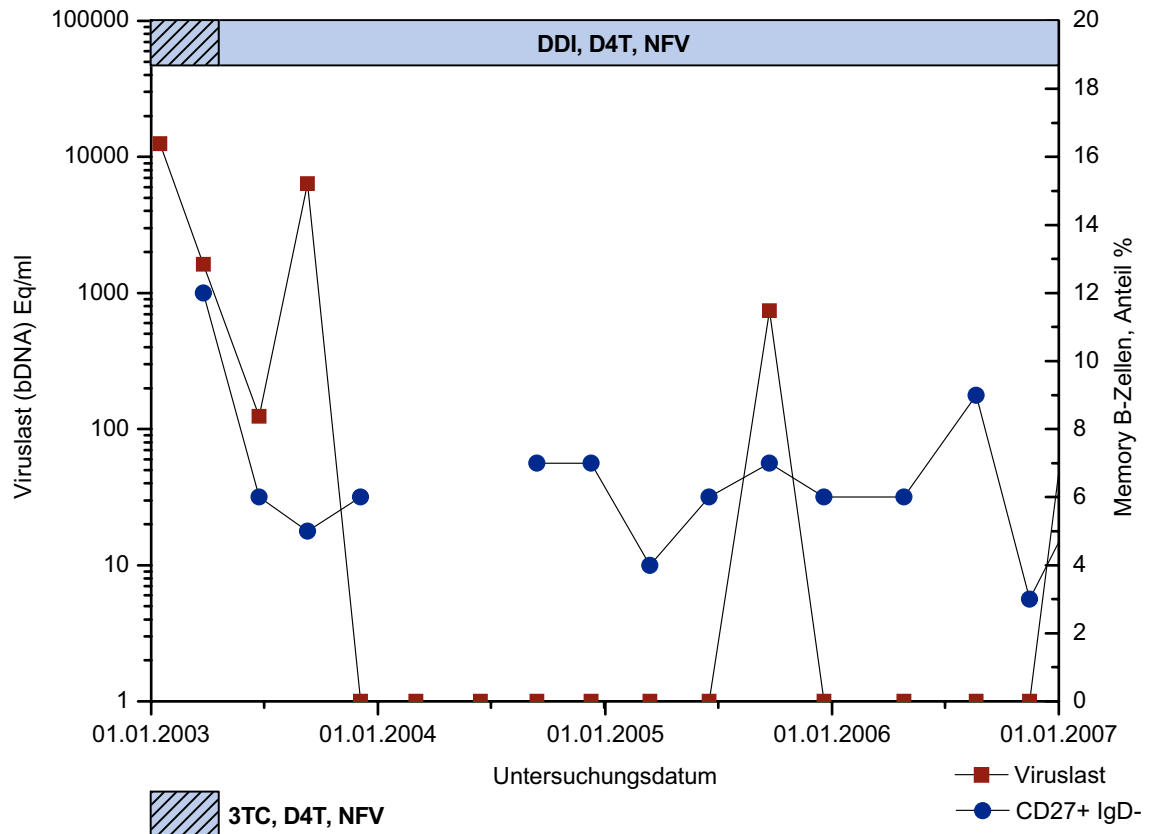


3.2.6 Longitudinale Veränderungen der B-Zelldifferenzierung

Sechs HIV infizierte Patienten aus unserem Kollektiv wurden in Hinblick auf die B-Zelldifferenzierung und Viruslast auch longitudinal untersucht. Hierzu werden individuelle Krankheits- und Therapieverläufe dargestellt.

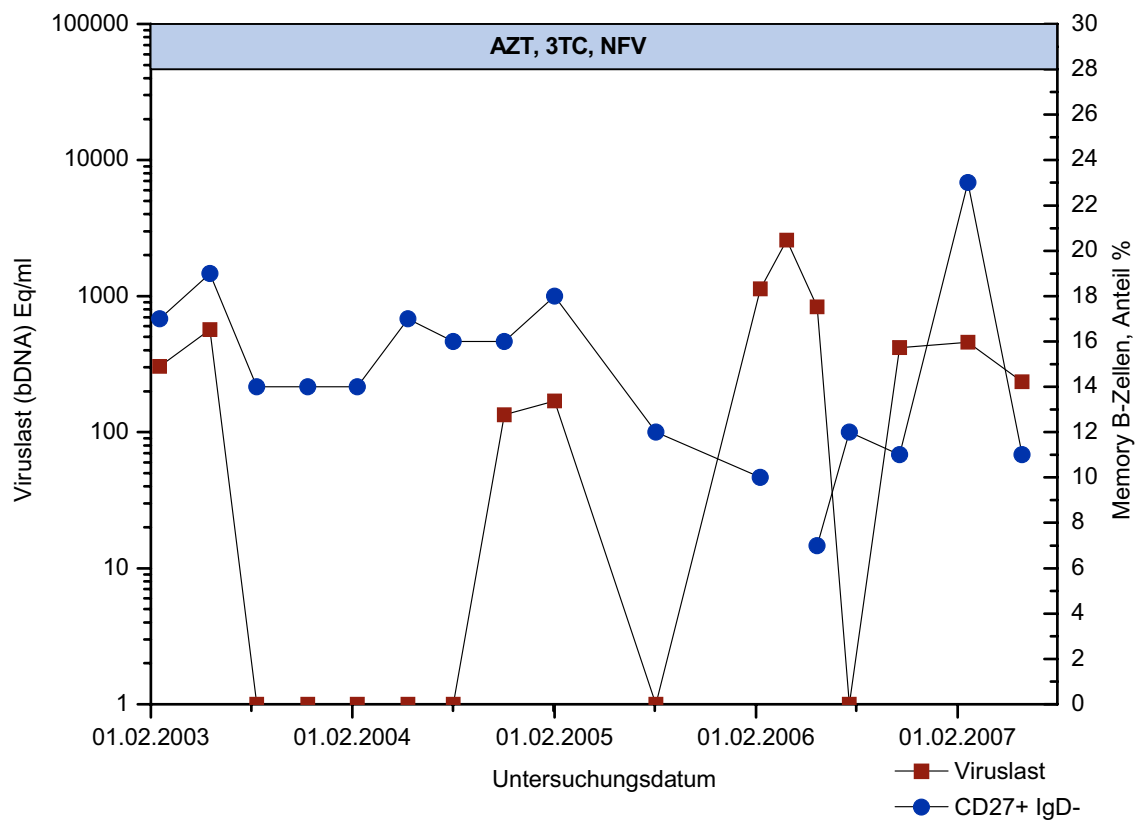
Patient A ist ein 14jähriger Junge (*1989), welcher initial mit einer Kombinationstherapie Lamivudin (3TC), Stavudin (D4T) und Nelfinavir (NFV) behandelt wird. Anfang 2003 entwickelt sich eine Lymphadenopathie. Einhergehend mit einer unzureichenden Suppression der Viruslast und einer Resistenz gegen Lamivudin (3TC) erfolgt im März 2003 der Austausch von 3TC gegen Didanosin (DDI). Neben weiteren Viruslastspitzen aufgrund mangelnder Compliance kommt es zu einer erfolgreichen Viruslastreduktion. Der Anteil an Memory-B-Zellen ist am Anfang des Beobachtungszeitraumes tendenziell mit Abnahme der Viruslast, steigt jedoch im längeren Verlauf wieder bei effektiver Senkung der Viruslast an.

Abb. (15) Longitudinaler Verlauf Memory B-Zellen / Viruslast - Patient A



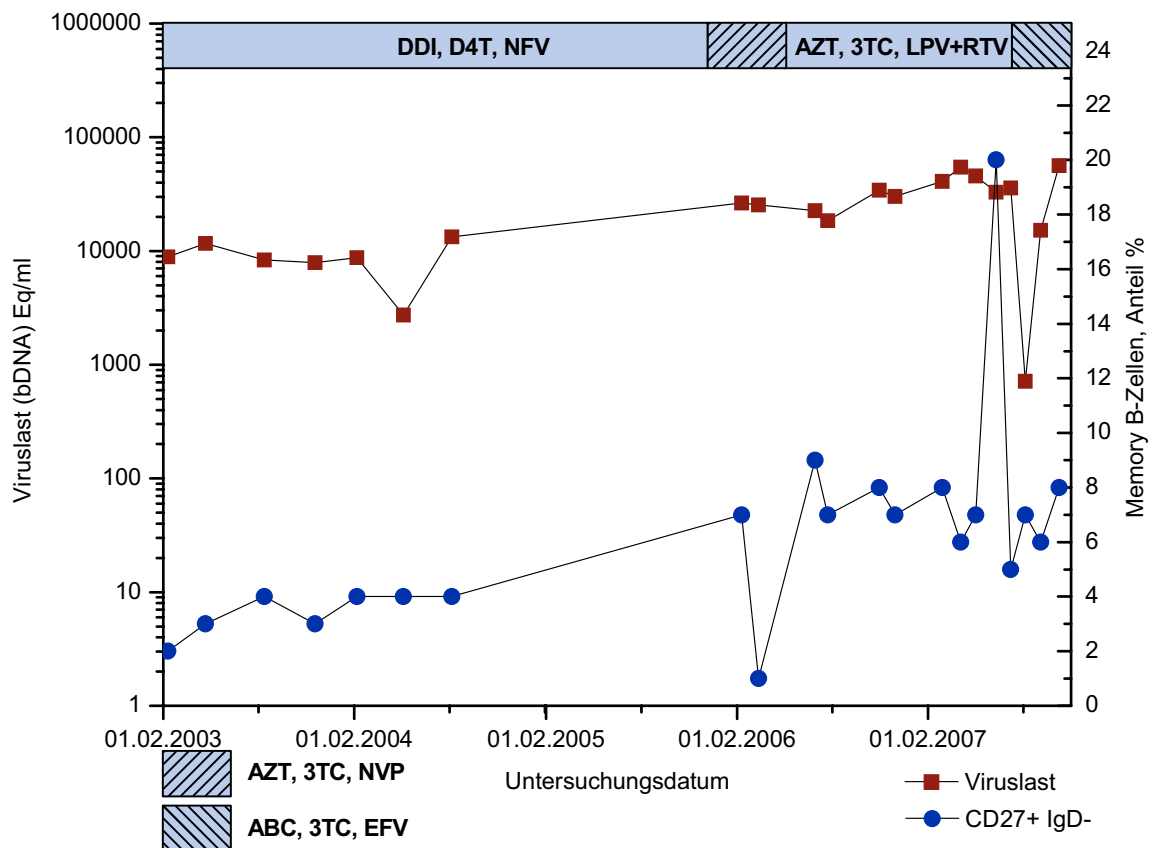
Patient C ist ein 13jähriges Mädchen (*1990) und wird mit einer antiretroviralen Therapie bestehend aus Zidovudin (AZT), Lamivudin (3TC) und Nelfinavir (NFV) behandelt. Wir beobachten eine weitgehende Suppression der Viruslast unter der Therapie. Complianceprobleme sind verantwortlich für intermittierendes Aufsteigen der Viruslast. Wir beobachten einen Memory B-Anteil zwischen 10% und 20% ohne einen direkten Zusammenhang mit der Viruslast.

Abb. (17) Longitudinaler Verlauf Memory B-Zellen / Viruslast - Patient C



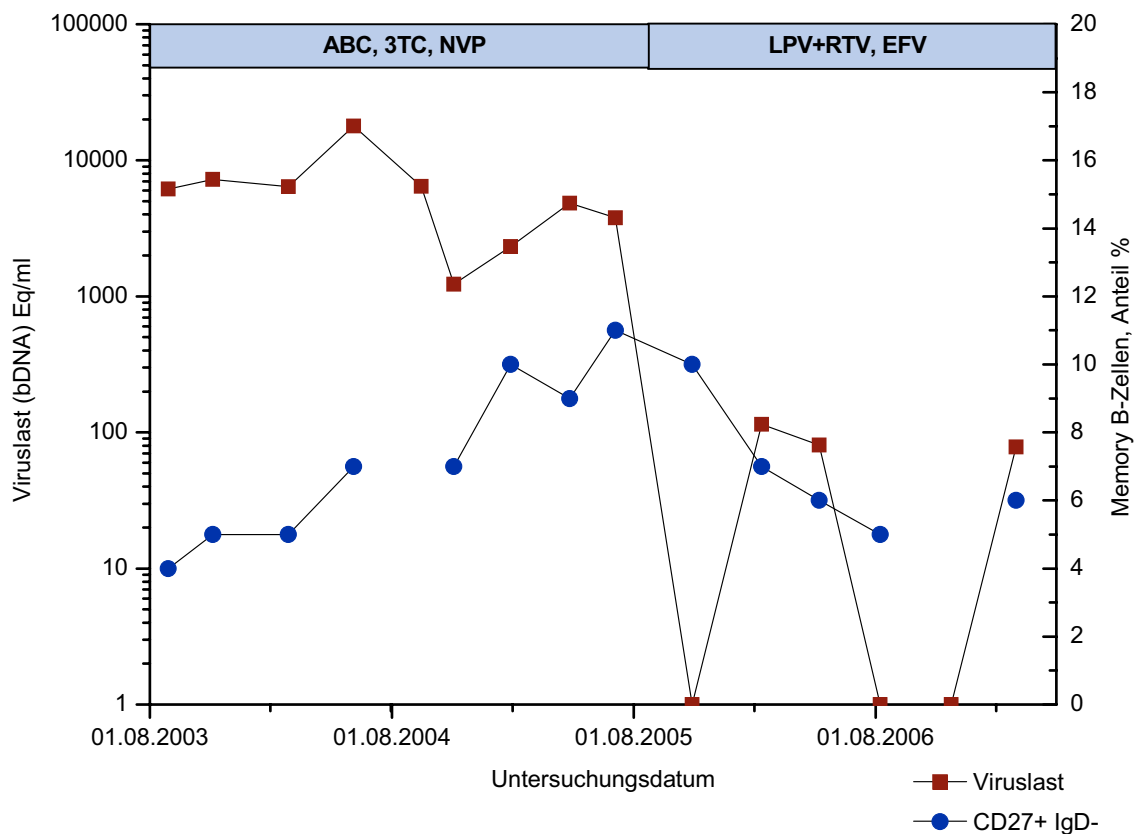
Patient D ist ein 14-jähriges Mädchen (*1989) und wird initial mit einer antiretroviralen Therapie bestehend aus Didanosin (DDI), Stavudin (D4T) und Nelfinavir (NFV) behandelt. Eine fehlende Compliance bezüglich der Medikamenteneinnahme und später entdeckte Resistenzen gegen die meisten Proteaseinhibitoren und allen NNRTIS führen zu einer residuellen Virusreplikation mit Viruslasten über 10000 Kopien. Die Therapie wird auf Zidovudin (AZT), Lamivudin (3TC) und Lopinavir / Ritonavir (LPV+RTV) gewechselt. Aufgrund einer Therapiepause ab dem Frühjahr 2007, werden bei Progression des Immundefekts seit Mai 07 zusätzlich Immunglobuline verabreicht. Wir beobachten im Laufe der Jahre eine stetig zunehmende Viruslast mit auch kontinuierlich ansteigenden Anteilen an Memory-B-Zellen. Im Juli 07 wird auf Abacavir (ABC), Lamivudin (3TC) und Efavirenz (EFV) gewechselt, mit anschließender Abnahme der Viruslast. Bei konstanten Memory B-Zellen steigt bei weiterer fehlender Compliance die Viruslast erneut.

Abb. (18) Longitudinaler Verlauf Memory B-Zellen / Viruslast – Patient D



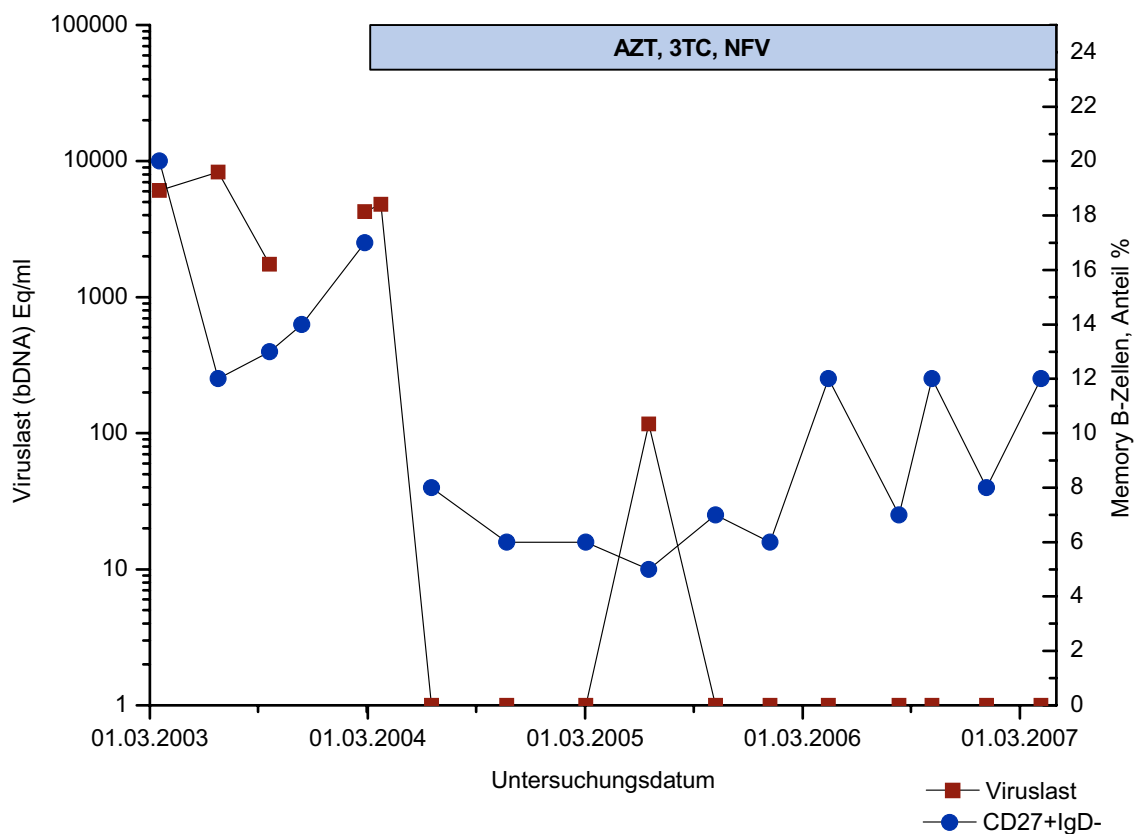
Patient E ist ein 14-jähriger (*1989) Junge mit einer initialen antiretroviralen Therapie mit Abacavir (ABC), Lamivudin (3TC) und Nevirapin (NVP). Bei zunächst stabilen CD4-Zellzahlen, Viruslast (10^3 und 10^4) und Klinik wird die Therapie beibehalten. Ende Oktober 2005 wird schließlich aufgrund neu erfasster Resistenzen auf Efavirenz (EFV), Lopinavir / Ritonavir (LPV+RTV) gewechselt. Unter dieser Therapie ist soweit eine weitgehende Suppression der Virämie direkt nach Therapiewechsel zu beobachten. Der Anteil der Memory B-Zellzahlen ist bis zur Therapieumstellung leicht ansteigend, sinkt jedoch direkt nach erfolgreicher Reduktion der Viruslast.

Abb. (19) Longitudinaler Verlauf Memory B-Zellen / Viruslast – Patient E



Patient F ist ein 13jähriges Mädchen (*1991), welche initial ohne Therapie stabile Viruslastwerte und CD4-Zellzahlen aufweist. Aufgrund beginnender HIV-assoziiierter Erkrankungen (persistierender Luftwegsinfekt, Herpes zoster) wird im April 2004 die Therapieindikation gestellt. Eine HAART mit Zidovudin (AZT), Lamivudin (3TC) und Nelfinavir (NFV) wird eingeleitet, worunter die Virämie effektiv supprimiert ist. Unmittelbar mit Rückgang der Viruslast, sinkt auch der Anteil der Memory B-Zellzahlen. Nach einer längeren Phase kommt es jedoch wieder zu einer Zunahme des Zellanteils.

Abb. (20) Longitudinaler Verlauf Memory B-Zellen / Viruslast - Patient F

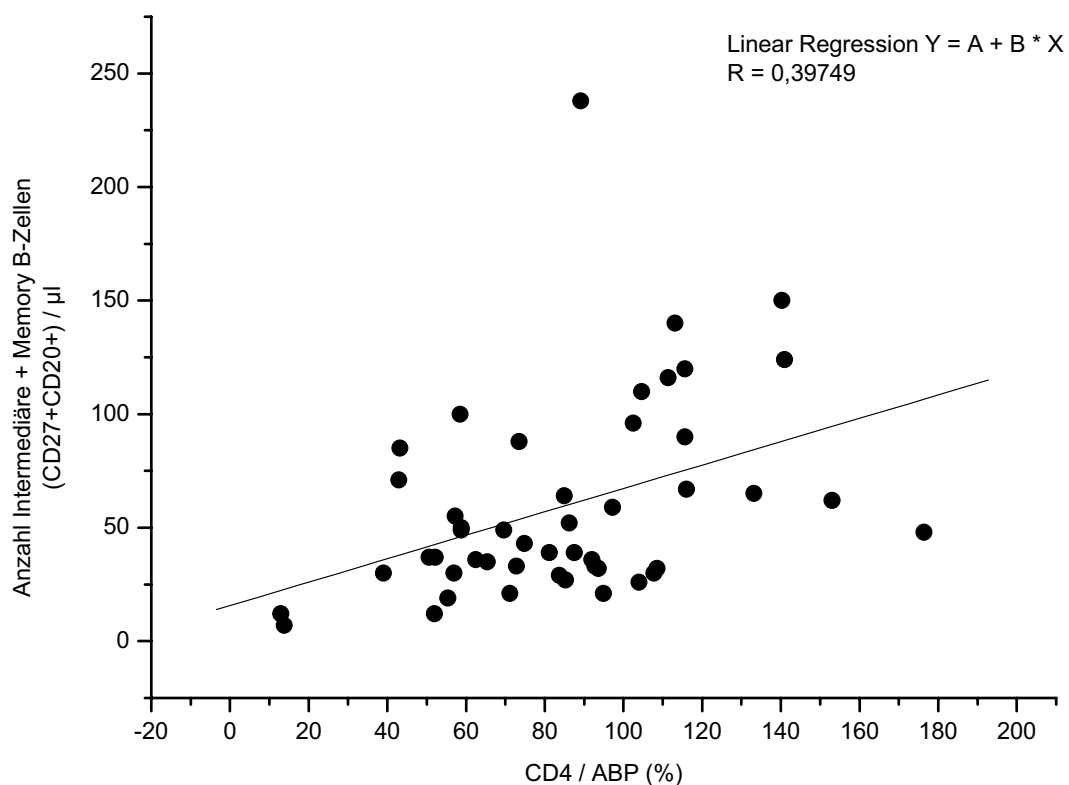


3.2.7 Korrelation der CD27 – Expression mit der CD4-Zellzahl

Bekanntlich ist eine Stimulation durch CD4-T-Helferzellen essentiell für die B-Zellaktivierung und -differenzierung. Es ergibt sich die Frage, ob eine Verminderung der CD4-Zellzahl auch zur Minderung der B-Zelldifferenzierung führt. Sowohl für die Entwicklung zur Intermediären B-Zelle, als auch die weitere Differenzierung zur Memory B-Zelle bedarf es der Hilfe durch CD4-Zellen. In dieser Korrelation wird deshalb die gesamte CD27-Expression auf B-Zellen (CD20+) als Differenzierungsmarker untersucht.

Um eine mögliche Korrelation zwischen der CD4-Zellzahl und der Zahl an Intermediären und Memory B-Zellen (CD27+ CD20+) festzustellen, werden die CD4 Zahlen nicht absolut dargestellt, sondern als Beziehung zum altersspezifischen Normbereich aufgetragen. Sowohl die HIV-Patienten, als auch die Kontrollgruppe werden untersucht. Dabei zeigt sich bei beiden Kohorten (HIV infizierte Kinder $r=0,40$; Kontrollgruppe $r=0,35$) eine mäßige Korrelation.

Abb. (21) Korrelation zwischen CD27+ und CD4+ Zellen bei HIV infizierten Kindern



3.3 Folgen einer veränderten B-Zelldifferenzierung

3.3.1 Klinische / immunologische Stadien und B-Zelldifferenzierung

Während bisher der Einfluss der Viruslast auf die B-Zelldifferenzierung untersucht wurde, ist in einer weiteren Gegenüberstellung zusätzlich die CDC-Klassifikation berücksichtigt worden, um eventuell einen Zusammenhang zwischen B-Zelldifferenzierung und klinischen / immunologischen Faktoren zu sichern.

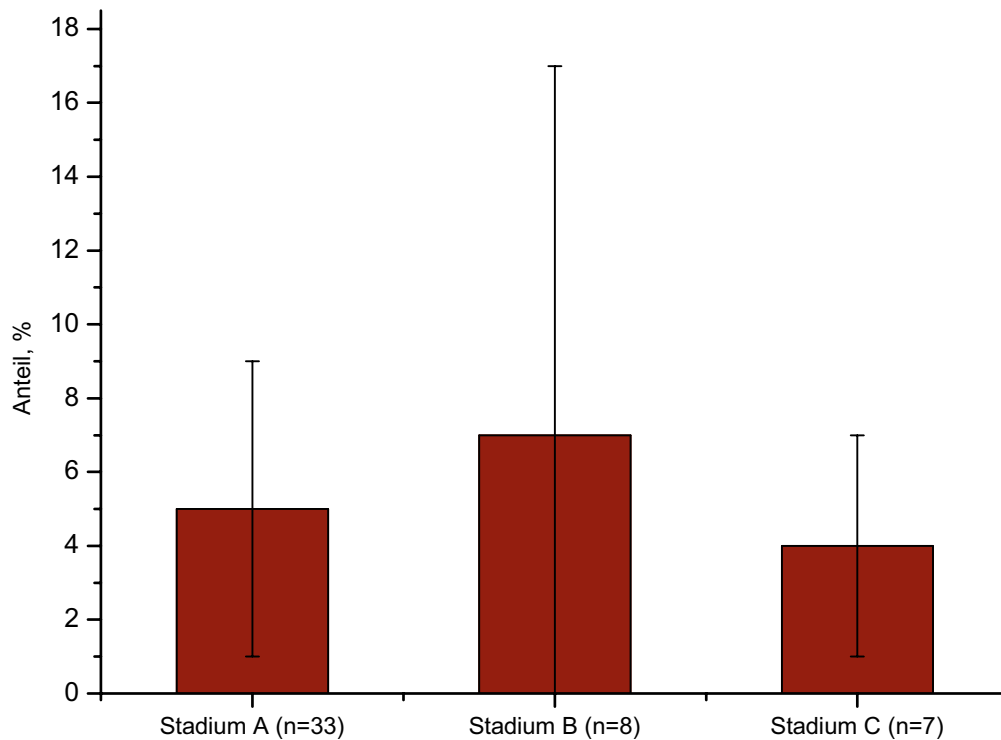
Dabei sind jedoch sowohl in der klinischen als auch immunologischen Stadieneinteilung bei den Patienten zwischen den einzelnen CDC-Kategorien keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Tab. 7).

Tab. (7) Tabellarische Gegenüberstellung der B-Zellsubpopulationen in Abhängigkeit des klinischen und immunologischen Stadiums

(NAIV = Naive B-Zellen; INT = Intermediäre B-Zellen; MEM = Memory B-Zellen; Prozentualer Anteil und absolute Anzahl der B-Zellen im peripheren Blut, Median + Interquartildistanz)

	ANZAHL (Zellen/ μ l)			ANTEIL AN B-ZELLEN (%)		
	NAIV	INT	MEM	NAIV	INT	MEM
Klinisches Stadium						
Stadium A	303 \pm 173	28 \pm 21	16 \pm 13	86 \pm 9	7 \pm 5	5 \pm 4
Stadium B	231 \pm 161	41 \pm 31	33 \pm 33	76 \pm 16	10 \pm 9	7 \pm 10
Stadium C	260 \pm 129	16 \pm 19	12 \pm 5	87 \pm 13	6 \pm 8	4 \pm 3
Immunologisches Stadium						
Stadium 1	308 \pm 166	36 \pm 29	24 \pm 31	83 \pm 14	8 \pm 6	6 \pm 6
Stadium 2	273 \pm 226	24 \pm 19	15 \pm 11	86 \pm 6	8 \pm 3	4 \pm 3
Stadium 3	275 \pm 95	13 \pm 18	14 \pm 4	88 \pm 16	5 \pm 11	5 \pm 3

Abb. (22) Anteil der Memory B-Zellen an allen B-Lymphozyten (CD20+IgD+CD27-) in Abhängigkeit vom klinischen Stadium. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen klinischen Stadien bezüglich des Anteils der Memory B-Zellen (Stadium A: 5%±4% - Stadium B: 7%±10% - Stadium C: 4%±3%)



3.3.2 Immunglobulin-Spiegel

Mittels Immunnephelometrie wird der Immunglobulin-Spiegel im Serum der HIV-Patienten bestimmt. Die Ig-Spiegel (IgG, IgA, IgM) bei den Patienten werden mit den Referenzwerten nach CRM-Standard verglichen (s. Tab. 8). Kinder und Jugendliche über ein Jahr werden nach den etablierten Kontrollwerten in 5 Kategorien eingeteilt. 1-3 Jahre, 3-5 Jahre, 6-9 Jahre, 10-13 Jahre und Erwachsene – Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit der B-Zelldifferenzierung werden hier die oben bereits definierten Altersklassen benutzt.

Immunglobuline IgG, IgA, IgM: Im Vergleich der einzelnen Altersgruppen ist der mediane Immunglobulin G Spiegel im oberen Referenzbereich, bzw. darüber. Die Mediane der anderen Immunglobulin-Spiegel (IgA und IgM) und ihre Streuung sind im Referenzbereich angesiedelt und lassen so keine Rückschlüsse auf eine vermehrte Sekretion zu. Die Hypergammaglobulinämie ist insofern hauptsächlich auf die hohen Immunglobulin G Spiegel zurückzuführen.

Tab. (8) Immunglobulin-Spiegel bei HIV infizierten Kindern

IgG

Alter	Median	±Interquartildistanz	Referenz CRM
2 - 5 Jahre	1270 mg / dl	755 mg / dl	350 – 1300 mg / dl
6 – 10 Jahre	1390 mg / dl	405 mg / dl	600 – 1300 mg / dl
11 – 18 Jahre	1310 mg / dl	375 mg / dl	700 – 1600 mg / dl

IgA

Alter	Median	±Interquartildistanz	Referenz CRM
2 - 5 Jahre	52 mg / dl	116 mg / dl	30 – 180 mg / dl
6 – 10 Jahre	165 mg / dl	85 mg / dl	60 – 220 mg / dl
11 – 18 Jahre	244 mg / dl	171 mg / dl	70 – 400 mg / dl

IgM

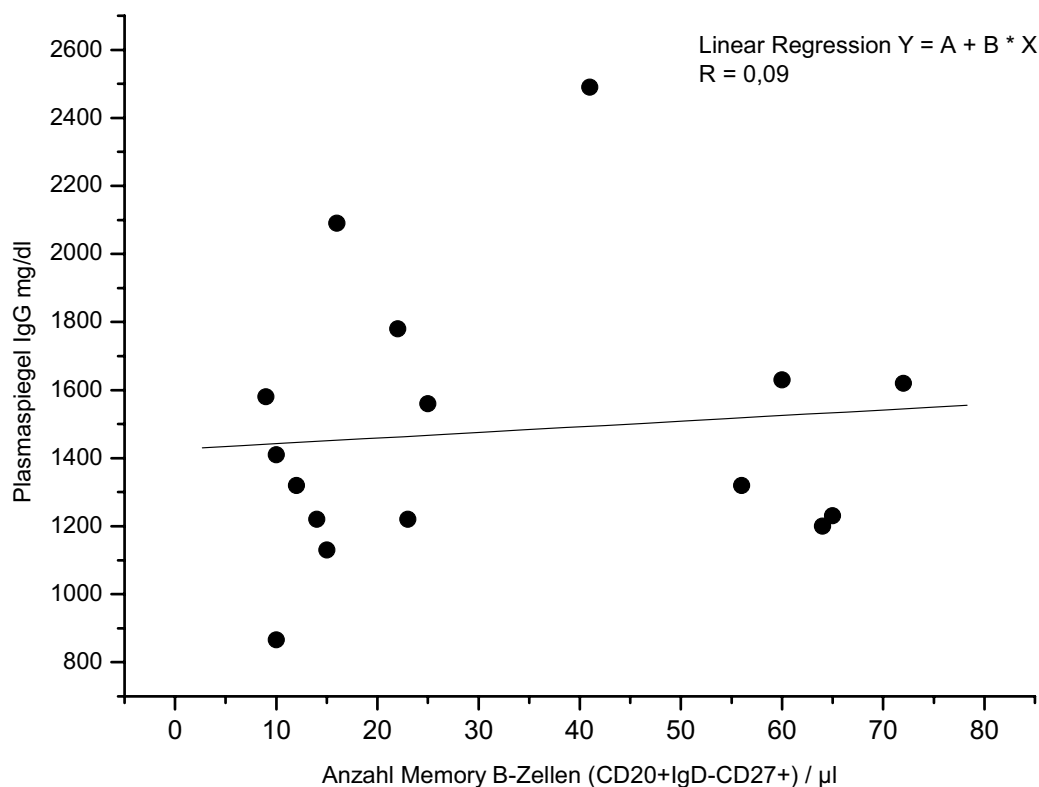
Alter	Median	±Interquartildistanz	Referenz CRM
2 - 5 Jahre	86 mg / dl	61 mg / dl	40 – 180 mg / dl
6 – 10 Jahre	78 mg / dl	61 mg / dl	40 – 160 mg / dl
11 – 18 Jahre	90 mg / dl	94 mg / dl	40 – 230 mg / dl

3.3.3 Korrelation Immunglobulinsekretion mit B-Zelldifferenzierung und Viruslast

Immunglobuline werden durch Sekretion von Plasmazellen gebildet. Diese entstehen entweder durch direkte Aktivierung Naiver B-Zellen oder Reaktivierung vorhandener Memory B-Zellen. Insofern interessiert die Fragestellung, ob eine Korrelation der Immunglobulin G-Spiegel mit der Anzahl an Memory B-Zellen existiert. Ebenso ist zu prüfen, inwiefern die Hypergammaglobulinämie mit einer erhöhten Viruslast einhergeht.

Eine Korrelation der Immunglobulin G-Spiegel mit der CD27-Expression auf B-Zellen (Memory und Intermediäre B-Zellen) konnte in keiner Altersgruppe gefunden werden. Ebenso besteht keine starke Korrelation zwischen den Immunglobulin G Spiegeln und der Viruslast.

Abb. (23) Korrelation zwischen dem IgG Spiegel und CD27+ Zellen (Memory B-Zellen) bei HIV infizierten Kindern



4 DISKUSSION

Bei der HIV-1 Infektion ist ein Schaden des Immunsystems schon in der frühen asymptomatischen Phase nachweisbar. Der Schaden, der den T- und B-Zellarm der Immunabwehr betrifft, wird sowohl durch das Virus selbst als, auch durch die virusinduzierte Immunaktivierung verursacht (Chakraborty 2005). Das Immunsystem beim Neugeborenen und heranwachsenden Kind ist im Gegensatz zum Erwachsenen in der Entwicklungsphase. Umso wichtiger scheint die Bereitstellung einer intakten Abwehr beim infizierten Kind. Neben der zellulären Immunität ist auch eine funktionierende humorale Immunität für die Eindämmung der Ausbreitung des Virus im Körper und die Abwehr opportunistischer Infektionen entscheidend. Die Mechanismen, die der B-Zelldysfunktion zugrunde liegen sind noch unzureichend erforscht. In der vorliegenden Studie haben wir vor allem die Auswirkung der Infektion auf die B-Zelldifferenzierung untersucht und die B-Zellfunktion anhand der Immunglobulin-Plasmaspiegel quantifiziert.

B-Zellzahl:

Bezüglich der Anzahl der B-Lymphozyten steht die Untersuchung

- der Zellzahl im Altersverlauf
- des Unterschiedes zwischen HIV-Infizierten und gesunden Kindern
- der Auswirkung einer effektiven Therapie

im Vordergrund.

Generell lässt sich eine Abnahme der B-Zellzahl bei Kindern mit zunehmendem Alter feststellen. Im Vergleich zwischen HIV infizierten Kindern und der Kontrollgruppe finden wir eine signifikante Reduktion der B-Zellzahl und des B-Zellanteils an allen Lymphozyten. Shearer beschreibt ähnlich zu unseren Ergebnissen die Lymphozytensubpopulationen in einer Kohorte von 600 Neugeborenen HIV infizierter Mütter, von denen 93 Neugeborene infiziert sind. Es wird neben einer signifikanten Reduktion der B-Zellzahl auch ein erniedrigter B-Zellanteil beschrieben (Shearer, Easley et al. 2000)

Ein Grund für die B-Zellabnahme wäre die Hyperaktivierung und Ausdifferenzierung zu Plasmazellen, welche möglicherweise die Hypergammaglobulinämie verursachen (Shirai,

Cosentino et al. 1992; Nagase, Agematsu et al. 2001; Martinez-Maza and Breen 2002; Zamarchi, Barelli et al. 2002). Plasmazellen verlieren den klassischen B-Zellmarker CD20 und werden daher in unserer Untersuchung nicht erfasst (Kansas and Dailey 1989; LeBien 2000). Ebenso wird eine verstärkte B-Zellmigration aus der Peripherie in sekundäre lymphatische Organe (Homing) diskutiert (Roy, Kim et al. 2002). Analog zu T-Helferzellen (Chen and Cloyd 1999), deren Depletion u.a. auch durch ein verändertes Homing erklärt werden kann, weisen auch Untersuchungen an B-Zellen veränderte Oberflächenmarker wie IL-8R und BLR1 auf, die auf verstärkte Wanderungsbewegungen schließen lassen (Forster, Schweigard et al. 1997; Jinquan, Moller et al. 1997). Andererseits ist auch eine direkte Infektion der B-Zellen mit HIV beschrieben. So kann teilweise der CD21 Komplement-Rezeptor HIV binden und integrieren (Malaspina, Moir et al. 2002). Ob jedoch die B-Zelle dann als Reservoir fungiert oder analog zur CD4 T-Helferzelle der infizierte Lymphozyt untergeht ist unzureichend erforscht. Eine wesentliche quantitative Veränderung der B-Zellen aufgrund eines direkten Befalls ist eher unwahrscheinlich. Auf eine mögliche durch HIV induzierte Apoptose von B-Zellen wird weiter unten eingegangen.

Die in unserer Untersuchung dargestellte negative Korrelation zwischen Höhe der Viruslast und der Anzahl der B-Zellen lässt auf eine direkte Wirkung durch das Virus schließen. Eine wirksame antiretrovirale Therapie mit Suppression der Virämie geht mit einer höheren Anzahl an B-Zellen in allen Altersgruppen einher.

B-Zelldifferenzierung:

Bezüglich der B-Zelldifferenzierung liegt der Fokus auf

- dem Altersverlauf bei gesunden Kindern
- dem Vergleich zwischen HIV infizierten und gesunden Kindern
- einer möglichen Korrelation zwischen den unterschiedlich differenzierten B Zellen mit der Viruslast und den CD4-Zellzahlen.

Untersuchungen des B-Zellphänotyps bei HIV infizierten Kindern finden sich nur vereinzelt. So beschreiben Rodriguez et al. eine Verminderung von CD23+ und CD62L+ B-Zellen. Diese beiden Oberflächenmarker sind noch unzureichend erforscht. CD23+ wird schwach auf unreifen B-Zellen exprimiert, und im Rahmen einer Aktivierung hochreguliert, bevor es vor der weiteren Differenzierung zur Memory B-Zelle / Isotypen-Switch wieder herunterreguliert

wird. Weiterhin wird CD23 als low-affinity-Rezeptor für IgE beschrieben, welcher im Rahmen von Autoimmun-, lymphoproliferativen und rheumatischen Erkrankungen vermehrt exprimiert wird. CD62L wird auch im Rahmen von hyperaktivierten Zuständen der B-Zelle zunächst exprimiert, bevor es wieder herunterreguliert wird (Rodriguez, Thomas et al. 1996). Ibegbu et al. untersuchten vornehmlich die CD5 Expression auf CD19+ B-Zellen bei Kindern im Alter bis zu acht Jahren und Erwachsenen. Es fand sich bei HIV infizierten Kindern eine verminderte Anzahl an CD5+ B-Zellen, während dieser Befund bei Erwachsenen nicht bestätigt wurde (Ibegbu, Spira et al. 1994).

Die Differenzierung mittels der Marker IgD und CD27 in Naive, Intermediäre und Memory B-Zellen ist inzwischen gut etabliert (Agematsu, Hokibara et al. 2000). Wir zeigen, dass schon physiologischerweise bei der Kontrollgruppe der Anteil und die Anzahl der Naiven B-Zellen mit steigendem Alter abnehmen. Analog dazu nimmt der Anteil an Memory B-Zellen zu. Die absolute Zellzahl ist weniger aussagekräftig, da mit steigendem Alter die Gesamt B-Zellzahl abnimmt (siehe oben). Eine relative Zunahme der Memory B-Zellen im Altersverlauf ist durch eine zunehmende Ausreifung des Immunsystems und Kontakt mit Fremdartigen im Laufe des Lebens bedingt. Eine Analogie zum T-Zellsystem ist anzunehmen (De Paoli, Battistin et al. 1988). Interessanterweise nehmen die Memory B-Zellen im hohen Alter wieder ab (Chong, Ikematsu et al. 2005).

Im Vergleich zwischen HIV infizierten Kindern und der Kontrollgruppe sind die absolute Anzahl und der Anteil an Memory B-Zellen bei den infizierten Kindern signifikant vermindert. Analog dazu ist der Anteil der Naiven B-Zellen erhöht. Bei Kindern gibt es diesbezüglich in der Literatur keine Daten. Mehrere Autoren haben einen Verlust der Memory B-Zellfunktion bei HIV infizierten Erwachsenen beschrieben (De Milito, Morch et al. 2001; Nagase, Agematsu et al. 2001; Chong, Ikematsu et al. 2004). Grundsätzlich stehen viele Mechanismen zur Diskussion, die den Verlust von Memory B-Zellen erklären könnten. Die T-Zelldepletion könnte als Folge der gestörten T-B-Zellinteraktion zu einer verminderten B-Zelldifferenzierung führen. In Anbetracht der pathologischen Hyperaktivierung könnten Memory B-Zellen eine terminale Differenzierung zu langlebigen Plasmazellen (1) oder eine Fas-vermittelte Apoptose (2) durchlaufen.

(1) Eine vermehrte CD70 Expression (Ligand von CD27) auf T-Zellen fördert die Differenzierung zu Plasmazellen und ist bei erwachsenen HIV Infizierten im Blut und im

Knochenmark beschrieben (Nagumo, Agematsu et al. 1998; Nagase, Agematsu et al. 2001). Da Plasmazellen oft im Knochenmark lokalisiert sind, wäre eine zeitgleiche Untersuchung von peripherem Blut und Knochenmarkproben sinnvoll. Im klinischen Alltag gibt es zurzeit keine Indikationen für routinemäßige Knochenmarkspunktionen bei HIV infizierten Kindern, so dass Daten bei Kindern fehlen.

(2) Studien belegen eine vermehrte Expression des Apoptosemarkers Fas, als auch des Fas-Liganden auf B-Zellen, vor allem auf Memory-, aber auch auf Naiven B-Zellen. Ein autokriner apoptotischer Kreislauf könnte zur Memory B-Zellreduktion beitragen (Samuelsson, Sonnerborg et al. 1997; De Milito, Morch et al. 2001; Moir, Malaspina et al. 2004; Titanji, Chiodi et al. 2005)

Die Einteilung der Patienten nach Viruslast zeigt eine Abnahme der Memory B-Zellzahl mit zunehmender Virämie. So kann eine effektive ART die Memory B-Zellzahl möglicherweise steigern, welches auch von anderen Autoren bei Erwachsenen beobachtet wird (Chong, Ikematsu et al. 2004). Ob jedoch im Sinne einer Rekonstitution durch eine effektive ART neben der quantitativen auch eine qualitative Wiederherstellung der B-Zellen zustande kommt, müssen andere Studien noch aufweisen. Hierzu ist die Bestimmung der Plasmazellen von Nutzen, um den Ort des B-Zelldefekts genau zu lokalisieren. Andererseits sind Impfstudien für die spezifische Antikörperfunktion aussagekräftig (siehe unten). Es gibt allerdings auch Studien bei Erwachsenen, die keinen Unterschied bezüglich Memory B-Zellen zwischen unbehandelten und ART-Patienten feststellen und so von einer im Infektionsverlauf frühen Memory B-Zelldepletion ausgehen, die durch eine Therapie nicht korrigiert werden kann (De Milito, Morch et al. 2001).

Bei der HIV-Infektion steht die CD4-Depletion im Vordergrund und gilt neben der Viruslast als wichtigstes Monitoring. Die Interaktion zwischen CD4 T-Helferzelle und der B-Zelle ist wichtig für die weitere B-Zelldifferenzierung. Die vorliegende Untersuchung zeigte sowohl bei der Kontrollgruppe, als auch bei HIV infizierten Kindern eine positive Korrelation zwischen der CD27-Expression auf B-Zellen und dem altersbezogenen CD4-Anteil. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein Mangel an CD4-Zellen zur unzureichenden Differenzierung der B-Zelle führt. Einige andere Autoren konnten teilweise keine Korrelation feststellen, verweisen jedoch auf eine Assoziation der CD27-Expression und der CD70-Expression welche bei HIV-Infizierten pathologisch erhöht ist (De Milito, Morch et al. 2001). Es ist

unklar, inwieweit umgekehrt eine niedrige Memory B-Zahl zu entsprechend niedriger CD4-Zellzahl führt.

Beim Kind könnte im Vergleich zu Erwachsenen eine Rekonstitution eher vorstellbar sein, da das Immunsystem sich noch in der Reifungsphase befindet. Am besten eignen sich Longitudinalanalysen, um zu beurteilen, ob eine effektive ART mit einer erhöhten Memory B-Zellzahl einhergeht. Hierzu haben wir bei sechs Patienten den longitudinalen Verlauf über vier Jahre beobachtet. Aus diesen sechs Patientenverläufen lassen sich keine direkten Gesetzmäßigkeiten ableiten. Es lässt sich die Tatsache bestätigen, dass Patienten mit einer hohen Viruslast auch im gesamten Beobachtungszeitraum einen niedrigen Anteil an Memory-B-Zellen aufweisen, welches die Daten unserer Querschnittsuntersuchung bestätigt. Im Einzelverlauf entwickelt sich der Memory-B-Zellanteil unterschiedlich, und so ist z.T. bei Rückgang der Viruslast auch ein Rückgang der Gedächtniszellzahl zu verzeichnen. Interessanterweise nimmt der Memory-B-Zellanteil bei zwei Patienten, deren Viruslast nach einem Therapiewechsel erfolgreich supprimiert wurde, mittelfristig zu. Andererseits beobachten wir bei einer Patientin, trotz stetig steigender Viruslast ebenfalls eine Zunahme des Memory B-Zellanteils. Für eine bessere Interpretation sind longitudinale Verläufe in einem größeren Zeitraum mit Berücksichtigung der Therapie und Klinik entscheidend.

Klinische Folgen einer veränderten B-Zelldifferenzierung:

Um unmittelbare Folgen der erniedrigten Memory B-Zellzahl zu beobachten, wird

- eine Korrelation mit dem Krankheitszustand (CDC)
- eine Korrelation mit Immunglobulinspiegeln

vorgenommen.

Einen Zusammenhang zwischen der Memory B-Zellzahl / Anteil und der Einteilung des Patienten in ein bestimmtes Stadium konnte nicht ermittelt werden. Ein wesentlicher Grund hierfür kann sein, dass die CDC-Klassifikation nicht die tatsächliche Situation wiedergibt. So ist nach der aktuellen Klassifikation eine Rückstufung auch bei Suppression der Viruslast unter die Nachweisgrenze, Erholung immunologischer Werte und klinischer Besserung nicht möglich.

Die HIV-Infektion geht aufgrund der pathologischen B-Zellaktivierung mit einer Hypergammaglobulinämie einher. Auch in der vorliegenden Untersuchung spiegelt sich diese wieder. Gerade das Immunglobulin G ist im oberen Normbereich bzw. darüber. Die Reduktion der Memory B-Zellzahl würde sich durch die erhöhte Sekretion von Immunglobulinen erklären lassen, wenn man davon ausgeht, dass die Memory B-Zellen sich aufgrund der HIV-Infektion vermehrt zu Plasmazellen weiter differenzieren. Jedoch würde hierbei eine negative Korrelation (höhere Spiegel bei niedriger Memory B-Zellzahl) diese These weiter stärken.

In Bezug auf die Memory-B-Zellfunktion ist von Bedeutung, inwiefern eine Rekonstitution durch eine effektive ART möglich ist. Unter HAART wird bei Kindern und Jugendlichen eine Immunrekonstitution des T-zellulären Arms erreicht (Niehues 2001). Eine verringerte Aktivierung des Immunsystems wird von einigen Autoren als Ursache diskutiert (Resino, Galan et al. 2004). Eine Untersuchung der Memory B-Zellfunktion würde vor allem die Erfassung spezifischer Antikörper auf Antigenstimulation beinhalten. Die Hypergammaglobulinämie korreliert in unserer Untersuchung mit der Viruslast. Die führt zur Annahme, dass eine effektive ART die Hypergammaglobulinämie rückgängig macht (IRHIC 2004).

Vorangegangene Arbeiten unserer Klinik bezüglich einer funktionellen Rekonstitution nach HAART befassen sich mit der Untersuchung an einer Kohorte von 9 HIV infizierten Kindern auf Gesamtstimulierbarkeit im Lymphozytentransformationstest (LTT) sowohl auf Mitogene als auch auf das Recall-Antigen Tetanus-Toxoid (Jebran 2007). Nach zweijähriger HAART ist im LTT die Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch die Mitogene PHA, OKT3, PWM und SAC deutlich höher als vor Beginn der HAART, jedoch im weiteren Verlauf trotz weitergehender Therapie abnehmend. Die Stimulierbarkeit mit dem Recall-Antigen Tetanus-Toxoid war nach durchschnittlich 7 jähriger Therapie und Tetanus-Boosterung signifikant gesteigert. Auch ohne Boosterung waren spezifische Antikörper nachweisbar. Bei allen 9 Kindern konnte nach der Booster-Impfung mit Tetanus-Toxoid der Status der sicheren Immunität erreicht werden.

Auch andere Autoren beschreiben bei Patienten mit einer HAART eine deutliche Immunrekonstitution, welche sich durch eine gute Impfantwort äußert. Patienten mit schlechtem Tetanusausgangstitern trotz durchgemachter Grundimmunisierung mit DTaP

erreichen Wochen nach HAART Beginn und erneuter Boosterimpfung mit Tetanustoxoid einen ausreichenden, langfristigen Impfschutz (Rosenblatt, Song et al. 2005). Ebenso sind auch Lebendimpfstoffe, wie Masern / Mumps / Röteln bei einer erfolgreichen HAART für einen Dauerimpfschutz geeignet. Oft versagt hier auch bei einer Grundimmunisierung die Impfantwort (Arpadi, Markowitz et al. 1996). Während bei einer starken Virämie und starker Immunsuppression diese Impfstoffe sogar kontraindiziert sind, kann nach Immunrekonstitution nach Impfung eine zufrieden stellende Impfantwort beobachtet werden (Berkelhamer, Borock et al. 2001; Levin, Gershon et al. 2001; Melvin and Mohan 2003; Lima, De Menezes Succi et al. 2004).

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen bezüglich der Memory B-Zellfunktion, unterstützen die Impfstudien die Annahme einer vollständigen Rekonstitution, sowohl quantitativ als auch qualitativ.

In Anbetracht der intensiven Bemühungen um einen HIV-Impfstoff ist die Zahl HIV-spezifischer Memory B-Zellen ebenso interessant. Unsere Arbeit umfasst alle Memory B-Zellen die gegen verschiedene Antigene gerichtet sind. In der Literatur finden sich Untersuchungen bezüglich HIV-spezifischer Memory B-Zellen. Diese werden anhand von Stimulationsversuchen an isolierten B-Zellen und anschließender spezifischer Antikörpermessung im ELISA erfasst. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der HIV-spezifischen Memory B-Zellen mit Abnahme der Viruslast im Rahmen einer ART (Fondere, Huguet et al. 2003).

Unsere vorliegende Arbeit zeigt deutlich eine Abnahme der Gesamt B-Zellzahlen und der Memory B-Zellzahlen bei HIV-infizierten Kindern im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Ein Einfluss des Alters wurde durch gematchte Paare als auch Vergleiche zwischen Altersgruppen weitgehend ausgeschaltet. Eine pathologische Hyperaktivität führt zu gesteigerten Immunglobulinspiegeln. Eine effektive ART lässt auf eine Immunrekonstitution schließen, da Memory-B-Zellzahlen bei Patienten mit einer niedrigeren Viruslast und höheren altersbezogenen CD4-Zellanteilen höher sind als in der Vergleichsgruppe der Infizierten mit einer stärkeren Immunsuppression.

Die derzeitigen Empfehlungen zur Therapie HIV infizierter Kinder sehen keine regelmäßige intravenöse Immunglobulin-Gabe vor. Aus dieser Untersuchung und aus den Ergebnissen

dieser Arbeit zeigt sich aber, dass ein kleiner Teil der HIV infizierten Kinder trotz erfolgreicher HAART einen zum Teil erheblichen B-Zelldefekt in Bezug auf B-Zellzahl, B-Zelldifferenzierung (z.B. Abnahme der Memory-B-Zellen) und Fähigkeit z.B. spezifische Antikörper aufweist. Dieser B-Zelldefekt kann sich klinisch in Form rezidivierender, zum Teil schwerer Infektionen manifestieren, so dass in zukünftigen Untersuchungen zu klären sein wird, welche Kinder von einer regelmäßigen Substitution mit Immunglobulinen profitieren könnten.

5 LITERATUR

- Agematsu, K., S. Hokibara, et al. (2000). "CD27: a memory B-cell marker." Immunol Today 21(5): 204-6.
- Agematsu, K., T. Kobata, et al. (1994). "Role of CD27 in T cell immune response. Analysis by recombinant soluble CD27." J Immunol 153(4): 1421-9.
- Agematsu, K., T. Kobata, et al. (1995). "Direct cellular communications between CD45R0 and CD45RA T cell subsets via CD27/CD70." J Immunol 154(8): 3627-35.
- Agematsu, K., H. Nagumo, et al. (1998). "Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction." Blood 91(1): 173-80.
- Amadori, A., R. Zamarchi, et al. (1989). "HIV-1-specific B cell activation. A major constituent of spontaneous B cell activation during HIV-1 infection." J Immunol 143(7): 2146-52.
- Amadori, A., R. Zamarchi, et al. (1991). "B cell activation during HIV-1 infection. II. Cell-to-cell interactions and cytokine requirement." J Immunol 146(1): 57-62.
- Ambinder, R. F. (2001). "Epstein-Barr virus associated lymphoproliferations in the AIDS setting." Eur J Cancer 37(10): 1209-16.
- Arpadi, S. M., L. E. Markowitz, et al. (1996). "Measles antibody in vaccinated human immunodeficiency virus type 1-infected children." Pediatrics 97(5): 653-7.
- Avery, D. T., J. I. Ellyard, et al. (2005). "Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage." J Immunol 174(7): 4034-42.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science 220(4599): 868-71.
- Berkelhamer, S., E. Borock, et al. (2001). "Effect of highly active antiretroviral therapy on the serological response to additional measles vaccinations in human immunodeficiency virus-infected children." Clin Infect Dis 32(7): 1090-4.

- Bofill, M., G. Janossy, et al. (1985). "Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus." J Immunol 134(3): 1531-8.
- Campana, D., G. Janossy, et al. (1985). "Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue." J Immunol 134(3): 1524-30.
- CDC Center for Disease Control and Prevention (1994). "1994 Revised Classification System for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children Less Than 13 Years of Age." Morb Mortal Wkly Rep 43(RR-12): 1-10.
- Chakraborty, R. (2005). "HIV-1 infection in children: a clinical and immunologic overview." Curr HIV Res 3(1): 31-41.
- Chen, J. J. and M. W. Cloyd (1999). "The potential importance of HIV-induction of lymphocyte homing to lymph nodes." Int Immunol 11(10): 1591-4.
- Chong, Y., H. Ikematsu, et al. (2004). "Selective CD27+ (memory) B cell reduction and characteristic B cell alteration in drug-naive and HAART-treated HIV type 1-infected patients." AIDS Res Hum Retroviruses 20(2): 219-26.
- Chong, Y., H. Ikematsu, et al. (2005). "CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances." Int Immunol 17(4): 383-90.
- Chong, Y., H. Ikematsu, et al. (2004). "Increased frequency of CD27- (naive) B cells and their phenotypic alteration in HIV type 1-infected patients." AIDS Res Hum Retroviruses 20(6): 621-9.
- Coffin, J., A. Haase, et al. (1986). "What to call the AIDS virus?" Nature 321(6065): 10.
- Comans-Bitter, W. M., R. de Groot, et al. (1997). "Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations." J Pediatr 130(3): 388-93.
- Conge, A. M., K. Tarte, et al. (1998). "Impairment of B-lymphocyte differentiation induced by dual triggering of the B-cell antigen receptor and CD40 in advanced HIV-1-disease." AIDS 12(12): 1437-49.
- Coupland, S. E., M. Hummel, et al. (2000). "[Lymphatic system and differentiation of B and T lymphocytes]." Pathologe 21(2): 106-12.

- De Milito, A., S. Aleman, et al. (2002). "Plasma levels of soluble CD27: a simple marker to monitor immune activation during potent antiretroviral therapy in HIV-1-infected subjects." Clin Exp Immunol 127(3): 486-94.
- De Milito, A., C. Morch, et al. (2001). "Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection." AIDS 15(8): 957-64.
- De Paoli, P., S. Battistin, et al. (1988). "Age-related changes in human lymphocyte subsets: progressive reduction of the CD4 CD45R (suppressor inducer) population." Clin Immunol Immunopathol 48(3): 290-6.
- Fondere, J. M., M. F. Huguet, et al. (2003). "Detection of peripheral HIV-1-specific memory B cells in patients untreated or receiving highly active antiretroviral therapy." AIDS 17(16): 2323-30.
- Forster, R., G. Schweigard, et al. (1997). "Abnormal expression of the B-cell homing chemokine receptor BLR1 during the progression of acquired immunodeficiency syndrome." Blood 90(2): 520-5.
- Fournier, A. M., V. Baillat, et al. (2002). "Dynamics of spontaneous HIV-1 specific and non-specific B-cell responses in patients receiving antiretroviral therapy." AIDS 16(13): 1755-60.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science 220(4599): 865-7.
- Ghia, P., G. Prato, et al. (2004). "Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly." Blood 103(6): 2337-42.
- Grimaldi, C. M., R. Hicks, et al. (2005). "B cell selection and susceptibility to autoimmunity." J Immunol 174(4): 1775-81.
- Grulich, A. E., X. Wan, et al. (2000). "B-cell stimulation and prolonged immune deficiency are risk factors for non-Hodgkin's lymphoma in people with AIDS." AIDS 14(2): 133-40.
- Hannet, I., F. Erkeller-Yuksel, et al. (1992). "Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations." Immunol Today 13(6): 215, 218.
- Herzenberg, L. A., S. J. Black, et al. (1980). "Memory B cells at successive stages of differentiation. Affinity maturation and the role of IgD receptors." J Exp Med 151(5): 1071-87.

-
- Ho, D. D., A. U. Neumann, et al. (1995). "Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection." Nature 373(6510): 123-6.
- Ibegbu, C., T. J. Spira, et al. (1994). "Subpopulations of T and B cells in perinatally HIV-infected and noninfected age-matched children compared with those in adults." Clin Immunol Immunopathol 71(1): 27-32.
- IRHIC - Italian Register for HIV in Children (2004). "Combined antiretroviral therapy reduces hyperimmunoglobulinemia in HIV-1 infected children." AIDS 18(10): 1423-8.
- Jacquot, S., T. Kobata, et al. (1997). "CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling." J Immunol 159(6): 2652-7.
- Jakubik, J. J., M. Saifuddin, et al. (2000). "Immune complexes containing human immunodeficiency virus type 1 primary isolates bind to lymphoid tissue B lymphocytes and are infectious for T lymphocytes." J Virol 74(1): 552-5.
- Jebran, A. F. (2007). "Impfprotektion für HIV infizierte Kinder mit Langzeitimmunrekonstitution unter HAART." Dissertationsschrift.
- Jinquan, T., B. Moller, et al. (1997). "Chemotaxis and IL-8 receptor expression in B cells from normal and HIV-infected subjects." J Immunol 158(1): 475-84.
- Johnson, A. M. and J. T. Whicher (2001). "Effect of certified reference material 470 (CRM 470) on national quality assurance programs for serum proteins in Europe." Clin Chem Lab Med 39(11): 1123-8.
- Kansas, G. S. and M. O. Dailey (1989). "Expression of adhesion structures during B cell development in man." J Immunol 142(9): 3058-62.
- Kasper, D. L., A. S. Fauci, et al. (2005). Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill.
- Kobata, T., S. Jacquot, et al. (1995). "CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 92(24): 11249-53.
- Lane, P. (1996). "Development of B-cell memory and effector function." Curr Opin Immunol 8(3): 331-5.

- LeBien, T. W. (2000). "Fates of human B-cell precursors." Blood 96(1): 9-23.
- Levin, M. J., A. A. Gershon, et al. (2001). "Immunization of HIV-infected children with varicella vaccine." J Pediatr 139(2): 305-10.
- Lima, M., R. C. De Menezes Succi, et al. (2004). "Rubella immunization in human immunodeficiency virus type 1-infected children: cause for concern in vaccination strategies." Pediatr Infect Dis J 23(7): 604-7.
- Malaspina, A., S. Moir, et al. (2002). "Human immunodeficiency virus type 1 bound to B cells: relationship to virus replicating in CD4+ T cells and circulating in plasma." J Virol 76(17): 8855-63.
- Martinez-Maza, O. and E. C. Breen (2002). "B-cell activation and lymphoma in patients with HIV." Curr Opin Oncol 14(5): 528-32.
- Melvin, A. J. and K. M. Mohan (2003). "Response to immunization with measles, tetanus, and Haemophilus influenzae type b vaccines in children who have human immunodeficiency virus type 1 infection and are treated with highly active antiretroviral therapy." Pediatrics 111(6 Pt 1): e641-4.
- Miedema, F., A. J. Petit, et al. (1988). "Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs." J Clin Invest 82(6): 1908-14.
- Moir, S., R. Lapointe, et al. (1999). "CD40-Mediated induction of CD4 and CXCR4 on B lymphocytes correlates with restricted susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection: potential role of B lymphocytes as a viral reservoir." J Virol 73(10): 7972-80.
- Moir, S., A. Malaspina, et al. (2004). "Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily." J Exp Med 200(7): 587-99.
- Moir, S., K. M. Ogwaro, et al. (2003). "Perturbations in B cell responsiveness to CD4+ T cell help in HIV-infected individuals." Proc Natl Acad Sci U S A 100(10): 6057-62.
- Morris, L., J. M. Binley, et al. (1998). "HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy." J Exp Med 188(2): 233-45.

-
- Muller, F., P. Aukrust, et al. (1998). "Possible role of interleukin-10 (IL-10) and CD40 ligand expression in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in human immunodeficiency virus infection: modulation of IL-10 and Ig production after intravenous Ig infusion." Blood 92(10): 3721-9.
- Nagase, H., K. Agematsu, et al. (2001). "Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis." Clin Immunol 100(2): 250-9.
- Nagumo, H., K. Agematsu, et al. (1998). "CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells." J Immunol 161(12): 6496-502.
- Niehues, T. (2001). "HIV Infektion im Kindesalter - T-Zellrekonstruktion nach antiretroviraler Therapie."
- Niehues, T. (2006). "Antiretrovirale Therapie bei Kindern." HIV.NET 2006: 375-392.
- Rajewsky, K. (1996). "Clonal selection and learning in the antibody system." Nature 381(6585): 751-8.
- Reeves, J. D. and R. W. Doms (2002). "Human immunodeficiency virus type 2." J Gen Virol 83(Pt 6): 1253-65.
- Resino, S., I. Galan, et al. (2004). "HIV-infected children with moderate/severe immune-suppression: changes in the immune system after highly active antiretroviral therapy." Clin Exp Immunol 137(3): 570-7.
- Rodriguez, B., H. Valdez, et al. (2003). "Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression." AIDS 17(13): 1983-5.
- Rodriguez, C., J. K. Thomas, et al. (1996). "HIV disease in children is associated with a selective decrease in CD23+ and CD62L+ B cells." Clin Immunol Immunopathol 81(2): 191-9.
- Rosenblatt, H. M., L. Y. Song, et al. (2005). "Tetanus immunity after diphtheria, tetanus toxoids, and acellular pertussis vaccination in children with clinically stable HIV infection." J Allergy Clin Immunol 116(3): 698-703.

- Roy, M. P., C. H. Kim, et al. (2002). "Cytokine control of memory B cell homing machinery." J Immunol 169(4): 1676-82.
- Samuelsson, A., A. Sonnerborg, et al. (1997). "Progressive B cell apoptosis and expression of Fas ligand during human immunodeficiency virus type 1 infection." AIDS Res Hum Retroviruses 13(12): 1031-8.
- Shearer, W. T., K. A. Easley, et al. (2000). "Prospective 5-year study of peripheral blood CD4, CD8, and CD19/CD20 lymphocytes and serum Igs in children born to HIV-1 women. The P(2)C(2) HIV Study Group." J Allergy Clin Immunol 106(3): 559-66.
- Shirai, A., M. Cosentino, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation." J Clin Invest 89(2): 561-6.
- Stashenko, P., L. M. Nadler, et al. (1980). "Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen." J Immunol 125(4): 1678-85.
- Tedder, T. F., A. W. Boyd, et al. (1985). "The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation." J Immunol 135(2): 973-9.
- Tesselaar, K., L. A. Gravestien, et al. (1997). "Characterization of murine CD70, the ligand of the TNF receptor family member CD27." J Immunol 159(10): 4959-65.
- Titanji, K., F. Chiodi, et al. (2005). "Primary HIV-1 infection sets the stage for important B lymphocyte dysfunctions." AIDS 19(17): 1947-55.
- UNAIDS - Joint United Nations Programme on HIV and AIDS (2006). "2006 Report on the global AIDS epidemic."
- Viau, M. and M. Zouali (2005). "B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity." Clin Immunol 114(1): 17-26.
- Wang, Y. H., Z. Zhang, et al. (2003). "V(D)J recombinatorial repertoire diversification during intracloal pro-B to B-cell differentiation." Blood 101(3): 1030-7.
- Wang, Z., H. W. Horowitz, et al. (1999). "Polyspecific self-reactive antibodies in individuals infected with human immunodeficiency virus facilitate T cell deletion and inhibit costimulatory accessory cell function." J Infect Dis 180(4): 1072-9.
- Widney, D., G. Gundapp, et al. (1999). "Aberrant expression of CD27 and soluble CD27 (sCD27) in HIV infection and in AIDS-associated lymphoma." Clin Immunol 93(2): 114-23.

Xiao, Y., J. Hendriks, et al. (2004). "CD27 is acquired by primed B cells at the centroblast stage and promotes germinal center formation." J Immunol 172(12): 7432-41.

Zamarchi, R., A. Barelli, et al. (2002). "B cell activation in peripheral blood and lymph nodes during HIV infection." AIDS 16(9): 1217-26.

ANHANG

Klinische Kategorien der CDC-Klassifikation (CDC 1994)

KATEGORIE N: OHNE SYMPTOME

- Asymptomatische HIV-Infektion
- ≤ 1 Symptome der Kategorie A

KATEGORIE A: LEICHTE SYMPTOME

≥ 2 der folgenden Symptome, aber ohne Symptome / Erkrankungen der Kategorie B und C

- Lymphadenopathie (≥ 0.5 cm ≥ 2 Lokalisationen)
- Hepatomegalie
- Splenomegalie
- Dermatitis
- Parotitis
- rezidivierende oder persistierende Infektionen der oberen Atemwege, Sinusitis, Otitis media

KATEGORIE B: MITTELSCHWERE SYMPTOME

Krankheitssymptome oder Erkrankungen, die nicht in die Kategorie A und C fallen, dennoch aber der HIV-Infektion ursächlich zuzuordnen sind oder auf eine Störung der zellulären Immunabwehr hinweisen. Hierzu zählen:

- Anämie (< 8 gm/dL), Neutropenie ($< 1,000/\text{mm}^3$), Thrombozytopenie
- ($< 100,000/\text{mm}^3$) > 30 Tage persistierend
- Bakterielle Meningitis, Pneumonie, oder Sepsis
- oropharyngeale Candidiasis > 2 Monate persistierend ab dem 6. Lebensmonat
- Kardiomyopathie
- Cytomegalievirus (CMV) – Infektion vor dem 1. Lebensmonat
- rezidivierende oder chronische Diarrhöe
- Hepatitis
- rezidivierende Herpes simplex virus (HSV) Stomatitis (> 2 Mal / Jahr)
- HSV Bronchitis, Pneumonitis, oder Ösophagitis vor dem 1. Lebensmonat
- Herpes zoster bei Befall mehrerer Dermatome oder nach Rezidiven in einem Dermatome
- Leiomyosarkom
- Lymphoide interstitielle Pneumonie (LIP) or pulmonary lymphoid hyperplasia complex
- Nephropathie
- Nokardiose

-
- Persistierendes Fieber (>1 Monat)
 - Toxoplasmose vor dem 1. Lebensmonat
 - Disseminierte Varizellen-Infektion

KATEGORIE C: SCHWERE SYMPTOME - AIDS

- Multiple oder rekurrende schwere bakterielle Infektionen: Septikämie, Pneumonie, Meningitis, Osteomyelitis, Arthritis, Abszess innerer Organe, Empyem
- Candidose von Bronchien, Trachea oder Lungen
- Candidose, ösophageal
- CMV-Infektionen (außer Leber, Milz, Lymphknoten)
- CMV-Retinitis (mit Visusverlust)
- Enzephalopathie, HIV-bedingt
- Herpes simplex-Infektionen: chronische Ulzera (> 1 Monat bestehend; oder Bronchitis, Pneumonie, Ösophagitis)
- Histoplasmose, disseminiert oder extrapulmonal
- Isosporiasis, chronisch, intestinal, > 1 Monat bestehend
- Kaposi-Sarkom
- Kokzidioidomykose, disseminiert oder extrapulmonal
- Kryptokokkose, extrapulmonal
- Kryptosporidiose, chronisch, intestinal, > 1 Monat bestehend
- Lymphom, Burkitt
- Lymphom, immunoblastisches
- Lymphom, primär zerebral
- Mycobacterium avium complex or M. kansasii, disseminiert oder extrapulmonal
- Mycobacterium, andere oder nicht identifizierte Spezies disseminiert oder extrapulmonal
- Pneumocystis-Pneumonie
- Pneumonien, bakteriell rezidivierend (> 2 innerhalb eines Jahres)
- Progressive multifokale Leukenzephalopathie
- Salmonellen-Septikämie, rezidivierend
- Tuberkulose
- Toxoplasmose, zerebral
- Wasting-Syndrom

Antiretrovirale Medikamente

Typ	Handelsname	Wirkstoff	Abk
NRTI	Retrovir®	Zidovudin	AZT / ZDV
	Epivir®	Lamivudin	3TC
	Hivid®	Zalcitabin	ddC
	Ziagen®	Abacavir	ABC
	Videx®	Didanosin	Ddl
	Zerit®	Stavudin	d4T
	Viread®	Tenofovir DF	TDF
	Emtriva™	Emtricitabin	FTC
	Combivir®	Zidovudin + Lamivudin	
	Trizivir®	Zidovudin + Lamivudin + Abacavir	
NNRTI	Viramune®	Nevirapin	NVP
	Sustiva®/Stocrin®	Efavirenz	EFV
PI	Invirase® Fortovase®	Saquinavir	SQV
	Norvir®	Ritonavir	RTV
	Crixian®	Indinavir	IDV
	Viracept®	Nelfinavir	NFV
	Agenerase®	Amprenavir	APV
	Kaletra®	Lopinavir +Ritonavir	LVP
	Reyataz™	Atazanavir	ATZ
Fusionsinhibitor	Fuzeon®	Enfuvirtide	ENF
Immuntherapie	Proleukin®	Interleukin-2	IL2

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Die HIV-Infektion führt beim Kind neben der T-Zelldepletion, auch zu weiteren immunologischen Schäden. CD27 ist ein Oberflächenmolekül, welches auf B-Zellen, die Ausreifung zur Memory-B-Zelle kennzeichnet und zusammen mit CD70 auf T-Zellen die Aktivität der B-Zellausreifung reguliert. IgD ist ein Oberflächenmolekül, welches B-Zellen mit zunehmender Differenzierung zu Memory-B-Zellen verlieren. Die vorliegende Arbeit vergleicht durch Bestimmung des Phänotyps die Differenzierung der B-Zellen zwischen HIV infizierten Kindern und immungesunden Kontrollen.

Hypothese: Eine erfolgreiche HAART führt bei HIV-infizierten Kindern zur vollständigen Rekonstitution der Gesamt B-Zell- und Memory-B-Zellzahlen (CD27+IgD-).

Methode: Naive, intermediäre und Memory-B-Zellen werden anhand von CD27 und IgD von 48 HIV infizierten Kindern aus dem peripheren Blut mittels FACS-Analyse gemessen. Die Ergebnisse werden mit Werten von 62 altersangepassten Kontrollpersonen verglichen. Immunglobulinspiegel werden erfasst, mit Normwerten verglichen und mit Memory B-Zellen in Korrelation gesetzt.

Resultate: Trotz erfolgreicher HAART mit normaler CD4-Zellzahl und weitgehend supprimierter Viruslast werden im peripheren Blut HIV infizierter Kinder sowohl eine niedrigere Gesamt B-Zellzahl, als auch prozentual und absolut niedrigere Memory-B-Zellen (ANTEIL Kontrolle $11\pm 10\%$ vs. HIV $5\pm 7\%$ $p < 0,001$; ANZAHL Kontrolle 40 ± 28 Zellen/ μl vs. HIV 20 ± 31 Zellen/ μl $p = 0,008$) gemessen. Es finden sich erhöhte Immunglobulinspiegel bei allen Altersgruppen in der mit HIV infizierten Population. Memory-B-Zellzahlen sind höher bei Kindern mit niedrigerer Viruslast (HIV < 500 Eq/ml 23 ± 40 Zellen/ μl ; HIV > 500 Eq/ml 12 ± 9 Zellen/ μl ; $p = 0,011$). Die Anzahl an Memory-B-Zellen korreliert schwach mit der CD4-Zellzahl, jedoch nicht mit den Immunglobulinspiegel IgG, IgA und IgM. Einzelne longitudinale Untersuchungen lassen keine Rückschlüsse auf einen direkten zeitlichen Zusammenhang zwischen Veränderung der Viruslast und Anzahl an Memory-B-Zellzahlen zu.

Schlussfolgerung: Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine veränderte B-Zelldifferenzierung bei HIV infizierten Kindern im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese ist durch eine HAART teilweise reversibel. Die erhöhten Immunglobulinspiegel deuten auf eine pathologische Hyperaktivierung des humoralen Immunsystems hin. Damit liegt bei einem kleinen Teil der Kinder trotz HAART ein zum Teil ausgeprägter humoraler Immundefekt vor, so dass eine Substitution mit intravenösen Immunglobulinen für einzelne Kinder sinnvoll sein könnte.

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein tiefster Dank den Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater Professor Dr. Tim Niehues danke ich für die Bereitstellung des Themas. Seiner konstant sehr guten Betreuung, zeitintensiven Korrekturen und wohlwollenden fachlichen Unterstützung bei der Möglichkeit selbständig wissenschaftlich zu denken, fühle ich mich sehr verbunden. Professor Dr. Arndt Borkhardt und Professor Dr. Ulrich Göbel danke ich für die Durchführung der Dissertationsarbeit in ihrer Klinik. Dr. rer. nat. Oliver Feyen und Sven Bellert danke ich für den unendlichen Beistand im Labor. Ihre Expertise ermöglichte das Gelingen dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Kinderimmunlabors, als auch Dr. med. Murat Bas und Dr. med. Martin Jetzek-Zader für die Bereitstellung der Proben.

Dank gilt vor allem den Patienten, die als zu Untersuchende, Hauptfokus dieser Arbeit sind. Ich hoffe, dass die gewonnenen Erkenntnisse letztendlich jenen zu Gute kommen werden.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern Manikuntala und Dr. med. vet. Mantu Kumar Ghosh, die dieses Studium überhaupt ermöglichten und durch ihre Unterstützung diese Arbeit mittragen. Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

B-Zelldifferenzierung bei Kindern und Jugendlichen – HIV-Infizierte im Vergleich mit Immungesunden

unter der Leitung von Professor Dr. med. Tim Niehues

aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und –Klinische Immunologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Düsseldorf, 01.03.2008

Sujal Ghosh

Curriculum Vitae

Persönliches

Name: Sujal Ghosh

Geboren: 2. Oktober 1982 in Vechta, Deutschland

Familienstand: ledig

Hochschulausbildung

Seit Jan 2008: Beginn der ärztlichen Weiterbildung: Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und –Klinische Immunologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Okt 2001 - Dez 2007:

Studium der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Dez 2007
- 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Sep 2003

Praktisches Jahr

- Apr 07 – Jul 07: Pädiatrie, Universitätsklinikum Düsseldorf
- Dez 06 - Apr 07: Innere Medizin, Kantonsspital Winterthur, Schweiz
- Aug 06 - Dez 06: Chirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Famulatur / Klinische Praktika

- Mär 06: Radiologie, Mount Sinai Hospital, Toronto, Kanada
- Sep 05: Hämatologische Ambulanz, Universitätsklinikum Düsseldorf
- Sep 04: Kardiologie / Pulmonologie, Apollo Gleneagles, Kalkutta, Indien
- Mär 04: Anästhesie, St.-Vincenz-Hospital, Coesfeld
- Aug 02: Chirurgie, Christian Medical College & Hospital, Vellore, Indien

Schulausbildung

- 1992 - 2001: kath. Bischöfliches St.-Pius-Gymnasium, Coesfeld
- 1988 - 1992: Maria-Frieden-Grundschule, Coesfeld