

Aus dem

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin - Schlossmannhaus
Klinik für Kinderonkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Borkhardt

Funktionelle und phänotypische Charakterisierung
von CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen
bei vertikal HIV-infizierten Kindern

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der
Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniel Delbeck

2007

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

gez:

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. Nürnberg
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. T. Niehues

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Hengel

Meiner Familie gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. EINLEITUNG.....	9
1.1 Das Human Immunodeficiency Virus	
1.1.1 Molekularbiologie des HIV	9
1.1.2 Das HIV-Genom	9
1.2 Verlauf der HIV-Infektion bei Kindern und Unterschiede zu Erwachsenen	10
1.2.1 Transmission	10
1.2.2 Natürlicher Verlauf	10
1.2.3 Virusdynamik	11
1.2.4 Klinik	11
1.2.5 Diagnose und Klassifikation	12
1.3 Auseinandersetzung des T-Zellsystems im Kindesalter mit der HIV-Infektion	12
1.3.1 T-Zell Effektorfunktion und antivirale T-Zellimmunität	12
1.3.2 T-Zell Aktivierung und CD28 Kostimulation	13
1.3.3 HIV-spezifische CD8 Zellen	14
1.3.4 Die Rolle von Interleukin 2 und Interferon γ	14
1.4 Vergleichbarkeit zu anderen chronischen Viruserkrankungen wie Hepatitis	15
1.5 Fragestellungen dieser Dissertation	16
2. PATIENTEN UND METHODEN.....	18
2.1 Nachweis HIV-spezifischer T-Zellen mittels MHC-Tetrameren	18
2.1.1 Patientenübersicht	18
2.1.2 Detektion HLA A02 positiver Patienten	20
2.1.3 Färbung mit MHC-Tetrameren und Oberflächenmarkern	20
2.1.3.1 Prinzip der MHC – Klasse I – Tetramere	20

2.1.3.2	Färbeprozedur mit Tetrameren und monoklonalen Antikörpern für die anschließende Durchflusszytometrie	21
2.1.4	Messung per Durchflusszytometrie	22
2.1.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	22
2.1.4.2	Durchflußzytometrische Analyse	23
2.2	Intrazelluläre Zytokinmessung nach Stimulation	23
2.2.1	Patientenübersicht	23
2.2.2	Erstellen des RPMI-Medium-Gemisches	26
2.2.3	Zellisolierung peripherer mononukleärer Zellen aus Vollblut	26
2.2.4	Stimulation mit Ionophor / PMA	26
2.2.5	Färbung der Oberflächenmarker mit monoklonalen Antikörpern	27
2.2.6	Permeabilisation	28
2.2.7	Intrazelluläres Färben der Zytokine	28
2.2.8	Messung per Durchflusszytometrie	29
2.3	Statistische Auswertung	29
3.	ERGEBNISSE.....	30
3.1	Tetrameruntersuchungen	30
3.1.1	Tetramerpositive HIV-spezifische CD8 T-Lymphozyten bei HIV-infizierten Kindern	30
3.1.1.1	HIV-GAG spezifische CD8 Zellen	30
3.1.1.2	HIV-POL spezifische CD8 Zellen	30
3.1.2	Anteil terminal ausdifferenzierter tetramerpositiver HIV-spezifischer CD8 Zellen	31
3.1.3	Korrelation zwischen tetramerpositiven HIV-spezifischen CD8 T-Lymphozyten und Alter, klinischem Stadium, CD4 Zahl, Viruslast und Therapie	33
3.1.3.1	Alter	33
3.1.3.2	klinisches Stadium	34
3.1.3.3	CD4 Zahl / immunologisches Stadium	35
3.1.3.4	Viruslast	36
3.1.3.5	Therapie	36

3.1.4	Tetramerpositive HIV-spezifische CD8 T-Lymphozyten bei Erwachsenen	37
3.1.5	Doppeltnegative (CD4 ⁻ CD8 ⁻) HIV-spezifische T-Lymphozyten	38
3.2	Intrazelluläre Zytokinmessungen	38
3.2.1	Terminal differenzierte CD8 Zellen bei HIV-infizierten Kindern, bei Hepatitis-infizierten Kindern und bei gesunden Kindern	38
3.2.2	Intrazellulärer Zytokinnachweis bei terminal differenzierten CD8 Zellen bei HIV-infizierten Kindern und Kontrollgruppen (Hepatitis, Gesunde)	39
3.2.2.1	Ohne Stimulation	39
3.2.2.2	Stimulation mit Ionophor / PMA: Interleukin 2	40
3.2.2.3	Stimulation mit Ionophor / PMA: Interferon γ	40
3.2.3	Intrazelluläre Zytokine nach Stimulation	43
3.2.3.1	Intrazelluläre Zytokine und Alter	43
3.2.3.2	Intrazelluläre Zytokine und klinisches Stadium bei Diagnose	44
3.2.3.3	Intrazelluläre Zytokine und aktuelles Ausmaß des Immundefektes	44
3.2.3.4	Intrazelluläre Zytokine und aktuelle Viruslast	45
3.2.3.5	Intrazelluläre Zytokine und Therapie	46
4.	DISKUSSION.....	47
4.1	Ziele	47
4.1.1	Ziele allgemein	47
4.1.2	Ziele und Möglichkeiten der Tetrameruntersuchungen	48
4.1.3	Ziele und Möglichkeiten der Stimulationsuntersuchungen	50
4.2	Interpretation der erhobenen Daten	51
4.2.1	Interpretation der in den Tetrameruntersuchungen erhobenen Daten	51
4.2.2	Interpretation der in den Stimulationsuntersuchungen erhobenen Daten	54
4.3	Aussicht und klinische Bedeutung	56

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	58
Literaturverzeichnis.....	59
Anhang – CDC-Klassifikation.....	74
Curriculum vitae.....	75
Danksagung.....	76

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrom
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DMSO	Dimethyl Sulphoxide
DNA	“deoxyribonucleic acid”
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
gag	„group antigen“
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	Human Immundeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IL-7	Interleukin 7
IL-15	Interleukin 15
LDA	„limiting dilution assay“
LNMC	„lymphnode mononuclear cells“
log	Dekadischer Logarithmus
MHC	Major Histokompatibilitäts Komplex
PBMC	„peripheral blood mononuclear cells“
PCR	„polymerase chain reaction“
PMA	Phorbol-12-Mistrate-13-Acetate
pol	„polymerase“
RPM	Rotationen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt von G.E. Moore et al. am Roswell Park Memorial Institute)
TZR	T-Zellrezeptor

1. EINLEITUNG

1.1 Das Human Immunodeficiency Virus

1.1.1 *Molekularbiologie des HIV*

HIV ist ein Retrovirus innerhalb der Familie der Lentiviren. Die HIV-Viruspartikel sind im Durchmesser ca. 100nm groß und von einer Lipoproteinhülle umgeben, in welche neben Glykoproteinkomplexen auch verschiedene Proteine der Wirtszelle inkorporiert werden. Dazu gehören auch die HLA Klasse I- und II-Moleküle, wie auch Adhäsionsproteine zum Anheften an andere Zielzellen. Das „core antigen“ enthält zwei Kopien der HIV-RNA, die als Protein-Nukleinsäurekomplex vorliegen.

1.1.2 *Das HIV-Genom*

Klassisches Aufbauschema des retroviralen Genoms ist 5'LTR-gag-pol-env-LTR 3'. Dabei sind die LTR („long-terminal repeat“) Regionen diejenigen Teile, die bei der Integration beidseitig mit der zellulären DNA verbunden werden. Die drei Gene gag („group antigen“), pol („polymerase“) und env („envelope“) sind die für die Replikation entscheidenden Gene. Daneben sind bei HIV-1 noch sechs weitere sogenannte akzessorische Gene zu finden, die eher regulatorische Funktionen übernehmen.

1.2 Verlauf der HIV-Infektion bei Kindern und Unterschiede zu Erwachsenen

1.2.1 *Transmission*

Während man im Erwachsenenalter vom *horizontalen* Übertragungsweg per Transfusion, Geschlechtsverkehr oder Drogenmissbrauch spricht, wird der überwiegende Anteil der Kinder (>95%) *vertikal* durch perinatale Übertragung des Virus von der Mutter auf das Kind infiziert. Horizontale Infektionen spielen als Transmissionsweg in den westlichen Ländern aufgrund verbesserter Screeninguntersuchungen keine Rolle mehr.

Viruslast und Erkrankungsstadium der Mutter in der Schwangerschaft spielen bei der vertikalen Infektion für die Transmissionswahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle (Weiser, 1994; Dickover, 1996; Sperling, 1996). Da die Viruslast unmittelbar mit der Menge der übertragenen Viren korreliert, stellt diese den wichtigeren Risikofaktor dar (Mofenson, 1999; Garcia, 1999). Je nach Zeitpunkt der Übertragung spricht man von einer Übertragung in utero, peri- oder intrapartal und postpartal (Mofenson, 1997a; Rouzioux, 1995).

Ohne Behandlung liegt die Transmissionsrate des HI-Virus von der Mutter auf das Kind in Europa bei 15-20% (Grosch-Wörner, 1993; The European Collaborative Study, 1994). Durch Erkenntnisse über die Charakteristika der vertikalen Transmission konnte eine Transmissionsprophylaxe durch verschiedene Maßnahmen entwickelt werden, die die Transmissionsrate auf <2% senken kann (Kind, 1998; Mandelbrot, 1998; Feiterna-Sperling, 1999; Grosch-Wörner, 2000).

1.2.2 *Natürlicher Verlauf*

Bei der vertikalen HIV-Infektion wird ein bimodaler Verlauf beobachtet (The European Collaborative Study, 1994; Blanche, 1997): Bei etwa 75-90% der infizierten Kinder zeigt sich ein Verlauf der Infektion mit mittlerer Progressionsdauer von > 5 Jahren bis zum Auftreten AIDS definierender Symptomatik, bei einem kleineren Teil der Kinder (10-25%) muss eine schnellere

Progression mit AIDS definierender Symptomatik oder tödlichem Verlauf noch innerhalb des ersten Lebensjahres festgestellt werden. Als Ursachen für diesen bimodalen Verlauf werden die unterschiedlichen Infektionszeitpunkte angenommen. Darüberhinaus haben Faktoren wie Viruslast (Rich, 2000), Zelltropismus (Mas, 1999) und vorbestehende Resistenzen von HIV gegenüber antiretroviralen Medikamenten (The Italian Register for HIV infection in children, 1999) Einfluss auf die Progression der Erkrankung. Inzwischen ist vor allem die Effizienz der antiretroviralen Therapie entscheidend für die Krankheitsprogression.

1.2.3 *Virusdynamik*

Die Virusdynamik bei HIV-infizierten Kindern unterscheidet sich wesentlich von der innerhalb weniger Monate nach akuter Infektion schnellen Abnahme der Viruslast des unbehandelten Erwachsenen (Graziosi, 1993; Henrard, 1995): Nach niedriger Viruslast bei Geburt (< 10000 Kopien/ml), kommt es innerhalb der ersten 1-2 Lebensmonate bei unbehandelten Kindern zu einer extremen Zunahme der Virusreplikation (>100000 Kopien/ml), die danach nur sehr zögerlich abnimmt: $0,6\log_{10}$ /Jahr in 12-24 Monaten, danach $0,3\log_{10}$ /Jahr bis zum 4.-5. Lebensjahr (McIntosh, 1996; Shearer, 1997). Die Gründe hierfür dürften wohl vor allem in der Unfähigkeit des unreifen Immunsystems im Kindesalter, eine HIV spezifische Immunantwort zu entwickeln, liegen.

1.2.4 *Klinik*

Die im Erwachsenenalter typische Manifestation einer akuten HIV-Infektion mit Fieber, Halsschmerzen, Lymphadenopathie und mononukleoseähnlichem Krankheitsbild fehlt beim HIV-infizierten Kind. Typisch sind vielmehr spezielle klinische Manifestationen, insbesondere Infektionen (Principi, 1991), die entsprechend in die CDC-Klassifikation der HIV-Infektion im Kindesalter eingehen (Centers of Disease Control and Prevention, 1994). Allerdings werden diese meist nur noch bei Säuglingen oder Kindern festgestellt, die keinen Zugang zu Medikamenten haben. Unter effektiver antiretroviraler Therapie sind

opportunistische Infektionen eine Seltenheit geworden. Wachstum und somatische Entwicklung sind bei unbehandelten HIV-infizierten Kindern häufig retardiert (The European Collaborative Study Group, 1994) und beinhalten Störungen der endokrinen Systeme, des Gastrointestinaltrakts und des Energiehaushaltes sowie der Zytokinproduktion.

1.2.5 *Diagnose und Klassifikation*

Da passiv auf das Kind übertragene mütterliche HIV-Antikörper bis zu 18 Monate nach Geburt nachgewiesen werden können, sollte der direkte Nachweis einer HIV-Infektion nach Geburt mittels PCR erfolgen. Hiermit können innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt 38% infizierte Kinder detektiert werden. Nach einem Monat sind 96% der infizierten Kinder positiv (Dunn, 1995). Allerdings entgehen die in Europa weniger prävalenten HIV-1 Subtypen A, C-H und O in der konventionellen PCR Reaktion dem Nachweis. Um bei einem exponierten Kind die HIV-Infektion endgültig auszuschließen, muss das Verschwinden der mütterlichen IgG Antikörper (Seroreversion) dokumentiert werden.

Die Stadieneinteilung der HIV-Infektion im Kindesalter erfolgt nach virologischer Diagnose aufgrund klinischer und immunologischer Befunde mit einer altersabhängigen Bewertung der CD4 Zahl.

1.3 **Auseinandersetzung des T-Zellsystems im Kindesalter mit der HIV-Infektion**

1.3.1 *T-Zell Effektorfunktion und antivirale T-Zellimmunität*

T-Zellen stehen im Zentrum der HIV Immunpathologie. Die Rolle der T-Zellen ist dabei ambivalent. Einerseits sind sie Zielzellen des HI-Virus und zentraler Angriffspunkt der Infektion, andererseits sind sie unverzichtbar für die antivirale Immunität. Während HIV im Erwachsenenalter eine ausgereiftes Immunsystem infiziert, sind Kenntnisse über die T-Zellontogenese und die spezielle,

altersabhängige T-Zellphysiologie die Voraussetzung für das Verständnis der HIV induzierten Veränderungen im Kindesalter.

So weisen verschiedene *in vitro* Untersuchungen auf eine Unreife der Effektorfunktion neonataler T-Zellen hin: im Vergleich zu T-Zellen Erwachsener proliferieren neonatale T-Zellen nach Bindung des TZR unzureichend (Gerli, 1989; Miscia, 1999), Zytokinproduktion und Zytotoxizität nach Aktivierung sind reduziert (Chalemers, 1998; Lubens, 1982) und Helferzellfunktionen sind eingeschränkt (Clerici, 1993). So besteht im Neugeborenenalter bei immunologisch gesunden Kindern die Neigung zu schweren und fatalen Infektionen. Anders als der Erwachsene können Kinder wohl daher auch die Viruslast nicht initial senken und HIV infizierte Zellen nicht gleichermaßen wie Erwachsene effektiv eliminieren. Zwar sind funktionell aktive HIV-spezifische CD8 Zellen sowohl bei exponierten, nicht infizierten als auch bei infizierten Kindern nachgewiesen worden (Cheynier, 1992; Rowland-Jones, 1993), sie scheinen aber weniger Aktivität als im Erwachsenenalter zu besitzen (Luzuriaga, 1997; Wasik, 1999). So ist bei Kindern von einer verminderten antiviralen Immunität gegenüber HIV auszugehen.

1.3.2 *T-Zell Aktivierung und CD28 Kostimulation*

Die Aktivierung von T-Zellen ist Voraussetzung für eine effektive T-Zellfunktion. Dazu sind zwei Signale erforderlich: das erste Signal dient der Antigenerkennung durch den TZR. Dieses Signal führt zur Anergie der T-Zelle, falls nicht ein zweites Signal von der antigenpräsentierenden Zelle (APZ) an die T-Zelle gegeben wird, welches als Kostimulation bezeichnet wird. Das wichtigste kostimulatorische Molekül auf T-Zellen ist das Glykoprotein CD28. CD28 ist wesentlich an der Ausbildung der sogenannten Immunsynapse beteiligt, die für die Interaktion zwischen APZ und der T-Zelle notwendig ist (Viola, 1999). Stimulation durch CD28 induziert das intrazelluläre anti-apoptotische Protein Bcl-xL. Die CD28 Expression stellt daher eine wichtige Grundlage für das Überleben von T-Zellen dar (Boise, 1995). Ein Verlust der CD28 Expression insbesondere auf CD8 Zellen ist bei HIV infizierten Erwachsenen und Säuglingen beobachtet worden (Lewis, 1994; Jennings, 1994).

1.3.3 *HIV-spezifische CD8 Zellen*

HIV-spezifischen CD8 Zellen wird in der immunologischen Abwehr der HIV-Infektion eine Schlüsselrolle zugeordnet, wenngleich sie jedoch nicht in der Lage sind die Virusinfektion vollständig zu kontrollieren und eine Krankheitsprogression letztendlich zu verhindern. Es wird von einer inversen Korrelation zwischen Anzahl der HIV-spezifischen CTL und Viruslast berichtet (Betts, 1999; Borrow 1994; Buseyne, 2002a; Edwards 2002; Koup, 1994; Ogg, 1998). Dennoch gibt es verschiedene Indizien dafür, dass diese Zellen alleine nicht in der Lage sind das Virus zu eliminieren (reviewed von Lieberman, 2001). Das Verständnis der Rolle und der Immunpathogenese von HIV-spezifischen CD8 Zellen ist essentiell für eine immunologische Intervention bei HIV.

1.3.4 *Die Rolle von Interleukin 2 und Interferon γ*

Interleukin 2 hat bei der HIV-Infektion mehrere, für den Krankheitsverlauf günstige, immunmodulatorische Funktionen. Daher wurde in mehreren Studien HIV-positiven Patienten neben HAART noch zusätzlich IL-2 verabreicht. Bei diesen Patienten zeigten sich signifikante Veränderungen wie ein Anstieg der CD4 Zahl und eine Abnahme der Viruslast (De Paoli, 2001; Emery, 2000), eine Abnahme der Apoptose der CD4 Zellen (Caggiari, 2000; Pandolfi, 2000), sowie ein Anstieg von Interleukin 7 und eine Besserung der klinischen Symptome (Marchetti, 2002). Interferon γ wird positiv mit der CD4 Zahl, negativ mit der Viruslast, sowie mit einer verminderten Krankheitsprogression assoziiert (Bailer, 1999). Dies wird auf die Eigenschaft von IFN γ , MHC II -Moleküle und somit die Antigenpräsentation hochzuregulieren, zurückgeführt (Sarol, 2002; Steimle, 1994). Darüberhinaus besitzt es Eigenschaften wie die Aktivierung von Makrophagen (Dayton, 1985), die vermehrte Herstellung antiviraler Proteine (Guidotti, 1996), die Vermehrung der HLA Klasse I und II -Moleküle an der Zelloberfläche, wie auch eine Vergrößerung des Repertoires der durch die HLA-Klasse I präsentierten Peptide (Schreiber, 2003).

So erfüllen die beiden Zytokine Interleukin 2 und Interferon γ im Zusammenspiel der zellulär vermittelten Immunantwort überaus wichtige Funktionen und haben bei der HIV-Infektion wichtige Bedeutung für die Prognose.

1.4 Vergleichbarkeit zu anderen chronischen Viruserkrankungen wie Hepatitis

Die Hepatitis B Infektion wird bei Infektion im Erwachsenenalter nur in einem geringen Teil zu einer chronischen Erkrankung. Im Falle einer erfolgreichen Eradikation des Virus bei einer selbstlimitierten Hepatitis spielen multispezifische zytotoxische T-Lymphozyten, die gegen zahlreiche HBV-Proteine gerichtet sind und Zytokine wie Interferon γ und Tumornekrosefaktor α produzieren, eine große Rolle (Chisari, 1995; Guidotti, 1996). Andererseits sind CD4 und CD8 Antworten kaum oder gar nicht nachweisbar, wenn es dem Immunsystem des Patienten nicht gelingt, das Virus spontan zu eliminieren. Kinder, die transplazentar infiziert werden, verfügen über kein ausgereiftes Immunsystem und so fehlen Möglichkeiten, das Virus effektiv zu bekämpfen, was in über 90% der Fälle eine chronische Hepatitis-Infektion zur Folge hat (Chisari, 1995). Die chronische Hepatitis- und die HIV-Infektion haben mit anderen chronischen Viruserkrankungen gemein, dass sich das Immunsystem des infizierten Patienten ein Leben lang mit der chronischen Virusinfektion auseinandersetzen muss. Und obwohl der Körper immer mit den gleichen Mitteln, wie beispielsweise Virus-spezifischen CD8 Zellen, gegen die Infektion ankämpft, gibt es je nach Art der Virusinfektion Unterschiede in der zellulären Immunantwort. So zeigen die Virus-spezifischen CD8 Zellen zum Beispiel verschieden vorherrschende Differenzierungsstadien auf und sind auch funktionell hinsichtlich ihrer Zytotoxizität (Perforin, Granzyme A, zytotoxische Granula und Lysosomen) unterschiedlich potent (Appay, 2002). In dieser Arbeit wird ein Vergleich zwischen speziellen Immunantwortmustern HIV-infizierter Kinder und Kinder mit chronischer Hepatitis B angestellt.

1.5 Fragestellung dieser Dissertation

Möglicherweise sind die funktionellen Eigenschaften von CD8 T-Zellen (Zytokinproduktion) und die antigenspezifische T-Zell-Immunität bei HIV-infizierten Kindern unter HAART entscheidend für den Verlauf der HIV-Infektion. CD8 Zellen werden entsprechend ihrer Expression der Oberflächenmarker CD27 und CD28 in naive, intermediäre und terminal differenzierte CD8 Zellen unterteilt. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits gezeigt, dass die Population der CD8⁺CD28⁻ T-Zellen bei Kindern auch unter Therapie auf Dauer expandiert ist. In dieser Arbeit wird die Antigenpezifität und die Zytokinproduktion dieser expandierten Zellen untersucht und es werden folgende Fragen bearbeitet:

I. Zur Antigenpezifität terminal differenzierter CD8 Zellen

1. Wie viele tetramerpositive HIV-gag- und HIV-pol-spezifische CD8 T-Lymphozyten lassen sich bei HIV-infizierten Kindern detektieren?
2. Wie viele der tetramerpositiven HIV-gag- und HIV-pol-spezifischen CD8 Zellen sind terminal ausdifferenziert?
3. Gibt es eine Korrelation zwischen tetramerpositiven HIV-spezifischen CD8 T-Lymphozyten und
 - a. Alter
 - b. klinischem Stadium
 - c. CD4 Zahl
 - d. Viruslast
 - e. Therapie ?
4. Gibt es Unterschiede zwischen Kindern und Erwachsenen in der Ausdifferenzierung tetramerpositiver HIV-spezifischer CD8 Zellen ?
5. Lassen sich doppeltnegative (CD4⁻CD8⁻) tetramerpositive HIV-spezifische Lymphozyten nachweisen?

II. Zur Zytokinproduktion terminal differenzierter CD8 Zellen

1. Wie ist der prozentuale Anteil terminal differenzierter CD8 Zellen bezogen auf die gesamte CD8 Population bei HIV-infizierten Kindern im Vergleich mit einer anderen chronischen Virusinfektion (Hepatitis) und mit gesunden Kontrollen?
2. Welche Zytokine werden nach Stimulation durch terminal ausdifferenzierte CD8 Zellen bei HIV-infizierten Kindern im Vergleich zu den Kontrollen produziert?
3. Gibt es eine Korrelation zwischen zytokinproduzierenden terminal ausdifferenzierten bzw. naiv/intermediären CD8 Zellen und
 - a. Alter
 - b. klinischem Stadium
 - c. Immunstatus (CD4 Zahl)
 - d. Viruslast
 - e. Therapie ?

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Nachweis HIV-spezifischer T-Zellen mittels MHC-Tetrameren

2.1.1 *Patientenübersicht*

Die Detektion HIV-spezifischer CD8 T-Zellen mittels so genannter MHC-Tetramere ist nur bei Blutproben von Patienten mit dem Genotyp HLA A02 möglich. Deshalb wurden zunächst Natriumheparinblutproben von Patienten der HIV-Ambulanz der Universitätskinderklinik Düsseldorf, sowie Proben von HIV-Patienten der Pädiatrischen Pneumologie und Neonatologie der Medizinischen Hochschule Hannover und der Immundefekt-Ambulanz im Dr. von Haunersches Kinderspital des Klinikums Innenstadt der Ludwig Maximilians Universität München im Kinderimmunlabor der Universitätskinderklinik Düsseldorf auf ihren HLA-Typ untersucht. Dies geschah mittels einer entsprechenden Färbung mit für HLA A02 spezifischen monoklonalen Antikörpern und anschließender durchflusszytometrischen Messung (siehe 2.1.2).

Insgesamt wurden 69 pädiatrische HIV-Patienten auf HLA A02 untersucht. Von 13 (9,7 ± 3,8 Jahre) der insgesamt 21 HLA A02 typisierten Patienten, davon sieben aus Düsseldorf, vier aus Hannover und zwei aus München, wurde dann, zwischen Oktober 2002 und Mai 2004, wiederum Natriumheparinblut für die eigentliche MHC-Tetrameruntersuchung entnommen (siehe Tabelle). Alle Blutproben wurden innerhalb eines Zeitraums von maximal 14 Stunden nach Blutentnahme im Labor weiterverarbeitet.

Alle 13 mit MHC-Tetrameren untersuchten Patienten sind vertikal HIV-infiziert. Nach immunologischen Kategorien der CDC Klassifikation befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme 8 Patienten im Stadium 1, 3 im Stadium 2 und 2 Patienten im Stadium 3.

Tabelle 1 - Übersicht der Proben für Tetrameruntersuchungen

	Anzahl auf HLA A02 untersuchter HIV-positiver Kinder	davon HLA A02 positiv	davon mit MHC- Tetrameren untersucht
Universitätskinderklinik Düsseldorf	52	12	7
Kinderklinik Medizinische Hochschule Hannover	9	4	4
Kinderspital LMU München	8	5	2
Gesamt	69	21	13

Tabelle 2 - Übersicht der HIV-Patienten für Tetrameruntersuchungen

Patient	Geschlecht	Alter	CDC	Therapie
01K	W	4,3	A1	AZT, 3TC, NFV
02K	W	6,7	A1	EFV, LPV/r
05K	M	18,3	B2	AZT, 3TC, EFV
22K	M	7,1	A2	ddl, d4T
24K	M	4,7	A1	Keine
25K	W	7,8	B2	ddl, d4T, NFV
33K	M	8,7	A2	AZT, 3TC, NFV
35K	W	7,6	C1	d4T, 3TC, EFV
36K	M	15,3	B2	AZT, ddC, NFV
37K	M	15,5	C2	ABC, d4T, NVP
38K	W	8,4	A3	ddl, d4T, EFV,
39K	M	5,6	B2	AZT, 3TC, LPV/r
40K	M	16,1	A3	ddl, d4T, LPV/r

Zusätzlich wurden noch Blutproben von sechs erwachsenen HLA A02 positiven horizontal infizierten HIV-Patienten aus der HIV-Ambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf mit Tetrameren untersucht.

2.1.2 *Detektion HLA A02 positiver Patienten*

Für die Untersuchung zur Feststellung, ob die Patienten HLA A02 positiv sind, wurde jeweils 100 µl Vollblut in zwei FACS-Röhrchen, von dem in einem 20µl HLA A02 spezifischer monoklonaler Antikörper (anti-human HLA-A2 Klon BB7.2, FITC, Becton Dickinson, San Jose, USA) vorgelegt wurde und das andere als mitgeführte Negativkontrolle diente, pipettiert. Nach Durchmischen mit dem Vortexgerät (VFZ IKA-Labortechnik, Staufen i.Br., Deutschland) und 10 Minuten Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur wurde jedem Röhrchen 2ml Lysing-Solution (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson, San Jose, USA) hinzugegeben und der Inhalt der Röhrchen nochmals durchmischt. 10 minütiger Inkubation in Dunkelheit und Raumtemperatur folgte dann eine Zentrifugation bei 350g (1270 U/min) mit Bremse für 7 Minuten. Das erhaltene Zellpellet wurde anschließend noch zweimal mit jeweils 3ml PBS (PBS-Puffer pH 7,3, SERAG Wiessner, Naila, Deutschland) bei gleichen Einstellungen der Zentrifuge gewaschen, bevor sich dann die durchflußzytometrische Messung anschloss, wozu das erhaltene Zellpellet mit 200µl PBS resuspendiert wurde (Prinzip der Durchflußzytomtrie siehe 2.1.4).

2.1.3 *Färbung mit MHC-Tetrameren und Oberflächenmarkern*

2.1.3.1 *Prinzip der MHC – Klasse I - Tetramere*

In der Regel erkennen T-Zellen Peptide von Erregern, Tumoren oder eigenen Abbauprodukten, wenn diese an Major Histokompatibilitäts Komplex – Molekülen (MHC-Moleküle) auf der Oberfläche von Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) oder von „target cells“ gebunden sind, wobei die Erkennung sowohl für das Antigen als auch für das MHC-Allel spezifisch ist. So ist es möglich, antigenspezifische Zellen durch das Binden an löslichen mit Fluoreszenzfarbstoff versehenen Peptid – MHC – Komplexen zu identifizieren. Dabei haben Komplexe in Form der Tetramere (vier MHC-Moleküle) bessere Bindungseigenschaften am T-Zellrezeptor (TZR) als Monomere oder Dimere gezeigt.

Die hier verwendeten MHC-Tetramere sind mit den Peptiden HIV gag₇₇₋₈₅ bzw. HIV pol₄₇₆₋₄₈₄, sowie dem Fluoreszenzmarker Phycoerythrin (PE) versehen.

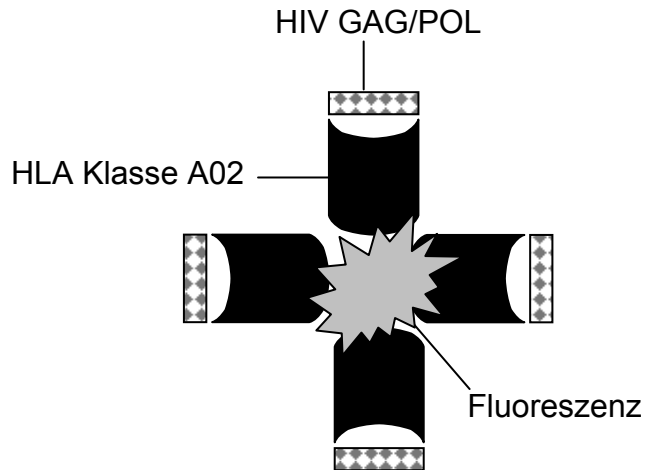


Abbildung 1 - Schema MHC-Tetramer

2.1.3.2 Färbeprozedur mit Tetrameren und monoklonalen Antikörpern für die anschließende Durchflusszytometrie

Die Färbungen erfolgten mit den oben beschriebenen iTAGgTM MHC-Tetrameren (HIV gag – Peptide SLYNTVATL; HIV pol – Peptide ILKEPVHGV) von Beckman Coulter Inc. (Fullerton, Kalifornien, USA), sowie monoklonalen Antikörpern von Becton Dickinson (BD; Biosciences San Jose, Kalifornien, USA) und Immunotech (Imm; Marseille, Frankreich) in folgenden Kombinationen:

- MHC-Tetramer gag PE (5µl) / anti CD8 PerCP BD (10µl) / anti CD28 FITC BD (10µl)
- MHC-Tetramer gag PE (5µl) / anti CD8 PerCP BD (10µl) / anti CD27 FITC Imm (20µl) / anti CD28 FITC BD (10µl)
- MHC-Tetramer pol PE (5µl) / anti CD8 PerCP BD (10µl) / anti CD28 FITC BD (10µl)
- MHC-Tetramer pol PE (5µl) / anti CD8 PerCP BD (10µl) / anti CD27 FITC Imm (20µl) / anti CD28 FITC BD (10µl)
- MHC-Tetramer gag PE (5µl) / anti CD3 PerCP BD (10µl) / anti CD4 FITC BD (10µl) / anti CD8 FITC BD (10µl)

- MHC-Tetramer pol PE (5µl) / anti CD3 PerCP BD (10µl) / anti CD4 FITC BD (10µl) / anti CD8 FITC BD (10µl)

Als Negativkontrolle wurde eine zusätzliche Färbung mit Maus-IgG (20µl IgG₁ FITC / IgG_{2a} PE - Simultest™ γ_1/γ_{2a} und 10 µl Mouse γ_1 PerCP; beides BD Biosciences San Jose, Kalifornien, USA) mitgeführt.

Zu den in FACS-Röhrchen befindlichen Antikörper- und Tetramerkombinationen wurden jeweils 100µl Vollblut pipettiert und nach Vermischen für 10 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde in jedes Röhrchen 100µl OptiLyse® von Immunotech (Marseille, Frankreich) pipettiert, wobei direkt nach Hinzugabe bei jedem Röhrchen ein unmittelbares Durchmischen mittels des Vortexgerätes (VFZ IKA-Labortechnik, Staufen i.Br., Deutschland) erfolgte. Nach erneuter Inkubation in Dunkelheit und bei Raumtemperatur wurde mit Hilfe der Multipipette jeweils 1ml Aqua dest. zu jeder Färbung hinzugefügt. Im Anschluss an eine dritte Inkubationszeit von wiederum 10 Minuten in Dunkelheit und bei Raumtemperatur wurden allen Röhrchen 2ml PBS hinzugefügt, um die gefärbten Zellen dann mittels einer Zentrifugation von 7 Minuten in Raumtemperatur bei 350g (1270RPM) zu waschen. Dieses Waschprocedere wurde dann mit jeweils 3ml PBS dreimal wiederholt. Zur anschließenden FACS-Analyse wurde das Zellpellet mit 100µl PBS schließlich resuspendiert.

2.1.4 *Messung per Durchflusszytometrie*

2.1.4.1 *Prinzip der Durchflusszytometrie*

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf einer optischen Abtastung von Zellen nach verschiedenen Parametern. In einem Zellanalysator (FACS: Fluorescence activated cell sorter) werden gleichzeitig Fluoreszenz- und Streulichtsignale einzelner Zellen, die durch hydrodynamische Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet einzeln untersucht werden, objektiv quantifiziert und qualifiziert. Am Analysepunkt kreuzt ein Laserstrahl den Flüssigkeitsstrahl und von jeder einzelnen Zelle wird die erzeugte Lichtstreuung

wie auch das fluoreszierende Licht detektiert, elektronisch verstärkt und in ein digitales Signal umgewandelt. Von einem Computer werden dabei alle Signale zu jeder Zelle (Event) in der zeitlichen Reihenfolge gespeichert.

Bei der Messung der Lichtstreuung wird die Richtung, in die das auf die Zelle treffende Licht abgelenkt wird, gemessen. Der größte Anteil wird dabei in die Vorwärtsrichtung entlang des einfallenden Lichtstrahls gestreut. Dieses Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße, während die Streuung zur Seite, das Rechtwinkelstreulicht (side scatter, SSC) ein Maß für die Zellgranularität darstellt. Trifft der Laserstrahl einen mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper, der auf der Oberfläche der Zellen oder intrazellulär gebunden wurde, regt er die Fluorochrome zur Emission von Licht an. Dadurch werden je nach verwendetem Fluorochrom verschiedene Farbemissionen erzeugt, die dem Event zugeordnet in ihrer Qualität und Intensität gespeichert werden.

Um unspezifische Fluoreszenz der Zellen auszuschließen, wird eine Negativ-Kontrolle durchgeführt.

2.1.4.2 Durchflußzytometrische Analyse

Die Fluoreszenzanalyse wurde nach der oben beschriebenen Färbeprozedur mit einem 3-Farben FACScan Durchflußzytometer von Becton Dickinson (San Jose, USA) mit einem 15 mW Argon Laser durchgeführt. Es wurden jeweils zwischen 200000 und 250000 Events aufgenommen. Die digitalen Daten wurden mit der Software Cell Quest von Becton Dickinson verarbeitet, gespeichert und statistisch und graphisch ausgewertet.

2.2 Intrazelluläre Zytokinmessung nach Stimulation

2.2.1 Patientenübersicht

Zur intrazellulären Zytokinmessung nach Stimulation wurden natriumheparinisierte Blutproben von etwa 20ml bei drei Patientengruppen entnommen. Bei der ersten Gruppe von 26 Kindern ($10,6 \pm 3,9$ Jahre) handelt es sich um HIV-infizierte

Patienten, die in der HIV Ambulanz der Universitätskinderklinik Düsseldorf betreut werden. Nach Einteilung in die immunologischen Kategorien der CDC-Klassifikation befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme 16 Patienten im Stadium 1, 7 im Stadium 2 und 3 Patienten im Stadium 3.

Tabelle 3 - Übersicht der HIV-Patienten für Stimulationsuntersuchungen

Patient	Geschlecht	Alter	CDC	Therapie
02K	w	6,7	A1	EFV, LPV, RTV
03K	w	14,4	A2	EFV, LPV, RTV
04K	w	9,0	A3	EFV, LPV, RTV
05K	m	18,3	B2	AZT, EFV, 3TC
06K	w	16,3	A2	keine
07K	w	4,8	A1	AZT, NFV, 3TC
08K	w	5,6	A1	ABC, AZT, NFV
09K	w	16,4	C3	AZT, RTV, 3TC
10K	w	7,1	N1	keine
11K	m	11,3	C3	AZT, NFV, 3TC
12K	m	8,9	C3	AZT, NFV, 3TC
13K	m	14,4	A1	ABC, NFV, 3TC
14K	w	11,3	C3	d4T, RTV, 3TC
15K	w	11,7	B2	ddl, d4T, NFV
16K	m	8,6	A2	ddl, EFV, 3TC
17K	m	9,9	B2	ddl, d4T, NFV
18K	w	12,9	B3	ddl, EFV, LPV, RTV
19K	w	11,7	A2	keine
21K	m	7,7	A2	ddl, NFV, 3TC
25K	w	7,8	B2	ddl, d4T, NFV
28K	m	11,3	A2	ddl, d4T, NFV
30K	w	13,8	A1	AZT, NFV, 3TC
31K	w	14,3	B2	ddl, d4T, NFV
32K	m	2,3	B2	AZT, NFV, 3TC
33K	m	8,7	A2	AZT, NFV, 3TC
34K	w	8,8	B1	ddl, d4T, NFV

Die 10 Kinder ($13,0 \pm 4,8$ Jahre) der zweiten Gruppe, sind Patienten mit einer chronischen Hepatitis-Infektion (neunmal Hepatitis B, einmal Hepatitis C), die entweder im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des HELIOS Klinikum Wuppertal (n=6) oder in der Universitätskinderklinik Düsseldorf (n=4) versorgt werden. Alle 10 Kinder zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung sonographisch

eine Leber ohne pathologischen Befund. Die Leberenzyme GOT und GPT lagen im Mittel bei 36 (± 10) bzw. 39 (± 22) U/l.

Tabelle 4 - Übersicht der Hepatitis-Patienten für Stimulationsuntersuchungen

ID	Geschlecht	Alter	HBV -DNA quant.
01HK	m	14,3 y	> 10 000 000 Kopien/ml
02HK	m	16,8 y	> 100 000 000 Kopien/ml
03HK	w	14,8 y	75600 Kopien/ml
04HK	w	6,1 y	> 100 000 000 Kopien/ml
05HK	m	20,2 y	> 1 000 000 Kopien/ml
06HK	m	17,1 y	> 1 000 000 000 Kopien/ml
07HK	m	6,9 y	> 100 000 000 Kopien/ml
08HK	w	8,5 y	> 100 000 000 Kopien/ml
09HK	m	9,7 y	>100 000 000 Kopien/ml
10HK*	m	15,3 y	-

* Hepatitis C

Als Kontrollgruppe dienten 10 Kinder ohne chronische Infektion ($8,9 \pm 6,3$ Jahre), von denen sich sieben zu elektiven Eingriffen in der chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Düsseldorf befanden.

Tabelle 5 - Übersicht der gesunden Patienten für Stimulationsuntersuchungen

ID	Geschlecht	Alter
01CK	m	3,0
02CK	m	10,6
03CK	m	2,1
04CK	w	5,6
05CK	m	8,6
06CK	m	4,5
07CK	m	2,8
08CK	m	15,2
09CK	m	17,9
10CK	m	18,1

2.2.2 *Erstellen des RPMI-Mediumgemisches*

Zur Verdünnung der Zellkonzentrationen und für einzelne Waschvorgänge wurde ein Mediumgemisch erstellt. Dazu wurde zu 500ml RPMI-Medium der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland) 50ml fötales Kälberserum (FCS – Fetal Bovine Serum – tested for mycoplasma, Biochrom AG, Berlin, Deutschland), das zuvor für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert wurde, sowie 5ml Antibiotika (Penicillin 5000 I.U./ml - Streptomycin 5000 ng/ml, ICN Biomedicals, Ohio, USA) und 5ml Glutamin (L-Glutamine 200MM, GIBCO / Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) gegeben.

2.2.3 *Zellisolierung peripherer mononukleärer Zellen aus Vollblut*

Etwa 20ml heparinisertes Vollblut wurde unter sterilen Bedingungen vorsichtig über 25ml Ficoll (Ficoll-Paque Plus (endotoxin tested), Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden) geschichtet. Nach Zentrifugation bei 1000g (2150RPM) bei 20°C ohne Bremse für 15 Minuten, wurde dann die deutlich abgesetzte weiße Leukozyten-Interphase mit einer Pipette abgenommen (20ml) und in ein 50ml Falcon Röhrchen (Becton Dickinson) überpipettiert. Das Falcon wurde dann mit 30ml PBS aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 300g (1176RPM) bei 20°C mit Bremse für 10 Minuten. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 20ml des RPMI-Medium-Gemisches ein weiteres Mal bei 300g (1176RPM) mit Bremse für 10 Minuten zentrifugiert. Mit Hilfe des Mölab-Zellzählers (Mölab Haematologie system Modell 8700A, Mölab, Karlsruhe, Deutschland) wurde das Zellpellet auf zwei Millionen Zellen pro Milliliter verdünnt.

2.2.4 *Stimulation mit Ionophor / PMA*

Als Kulturmedium wurden 500ml RPMI-Medium der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland), 5ml Glutamin (L-Glutamine 200MM, GIBCO / Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA), 5ml Antibiotikum (Penicillin 5000 I.U./ml - Streptomycin 5000 ng/ml, ICN Biomedicals, Ohio, USA), 12,5ml Hepes-Buffer und 20% hitzeinaktiviertes FCS zugesetzt. Diesem Ansatz wurde GolgiStop™ (Monensin,

Becton Dickinson Biosciences San Jose, CA, USA) für eine 2µmolare Endkonzentration hinzugefügt. Für die Ansätze in Kontrollmedium wurden jeweils 500µl des Mediumgemisches steril in FACS-Röhrchen pipettiert.

Für die Ansätze zur Stimulation wurden Ionophor (Calbiochem – EMD Biosciences, San Diego, Kalifornien, USA) in Dimethyl-Sulphoxide (DMSO – Sigma, München, Deutschland) für eine 1µmolare Endkonzentration und Phorbol-12-Mistrate-13-Acetate (PMA – Sigma) in DMSO für eine 1,5fache µmolare Endkonzentration zugesetzt. Auch von diesem Gemisch wurden je 500µl steril in FACS-Röhrchen pipettiert.

In jeweils fünf der Röhrchen mit Medium, als auch in fünf der Röhrchen mit Ionophor / PMA wurden dann 500µl der Zellsuspension gegeben.

Die Inkubation erfolgte für fünf Stunden bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre (Inkubator von Heraeus, Kendro-Laboratory Products, Hanau, Deutschland).

2.2.5 *Färbung der Oberflächenmarker mit monoklonalen Antikörpern*

Die FACS-Röhrchen wurden nach Inkubation bei 500g (1520RPM) mit Bremse für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde vorsichtig mit einer Vakuumpumpe der Überstand abgesaugt und ein weiterer Waschvorgang mit 3ml PBS schloss sich bei gleichen Einstellungen der Zentrifuge an. Darauf folgte die Färbung der Oberflächenmarker mit monoklonalen Antikörpern von Becton Dickinson (BD) und Immunotech (Imm) für jeweils vier Röhrchen der Zellen, die in Medium inkubiert wurden, als auch für jeweils vier Röhrchen der Zellen, die mit Ionophor / PMA stimuliert wurden, in folgenden Kombinationen:

- anti CD8 PerCP BD (20µl) / anti CD28 FITC BD (20µl)
- anti CD8 PerCP BD (20µl) / anti CD27 FITC Imm (20µl) / anti CD28 FITC BD (20µl)

Als Negativkontrolle wurde zwei zusätzliche Färbungen von sowohl in Medium als auch in Ionophor / PMA inkubierten Zellen mit jeweils Maus-IgG (20µl IgG₁ FITC /

IgG_{2a} PE - Simultest™ / γ_{2a} und 10 μ l Mouse γ 1 PerCP; beides BD Biosciences San Jose, Kalifornien, USA) mitgeführt.

Nach 10minütiger Inkubation bei 4°C in Dunkelheit, wurden die Zellen wieder wie oben beschriebenen gewaschen.

2.2.6 *Permeabilisation*

Zur Vorbereitung der intrazellulären Zytokinfärbung wurden anschließend mittels jeweils 250 μ l Cytfix / Cytoperm von Becton Dickinson (BD Biosciences, San Diego, Kalifornien, USA) die Zellen permeabilisiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei 4°C in Dunkelheit wurden die Proben bei gleicher Temperatur bei 500g (1520 RPM) fünf Minuten zentrifugiert. Weitere zweimal schloss sich ein Waschvorgang an, diesmal jedoch mit je 3ml einer 1:9 Verdünnung (Aqua dest.) von Perm/Wash™ Buffer (0,09% Sodum Azide - BD Biosciences, San Diego, Kalifornien, USA)

2.2.7 *Intrazelluläres Färben der Zytokine*

Zur Färbung der Zytokine wurden die Zellen nach dem letzten Waschvorgang mit jeweils 20 μ l der Perm-Wash-Buffer-Mix-Verdünnung resuspendiert. Dann erfolgten die intrazellulären Färbungen mit Antikörpern der Firma BD Pharmingen™ wie folgt mit entweder 20 μ l PE anti IL2 (PE-conjugated rat anti-human il-2 monoclonal antibody), oder 20 μ l PE Interferon γ (PE labelled mouse anti-human IFN γ), so dass sich schließlich folgende Färbekombinationen ergaben:

Mit Medium inkubierte Zellen bzw. mit Ionophor / PMA inkubierte Zellen

- anti IL2 PE (20 μ l) / anti CD8 PerCP BD (20 μ l) / anti CD28 FITC BD (20 μ l)
- anti IL2 PE (20 μ l) / anti CD8 PerCP BD (20 μ l) / anti CD27 FITC Imm (20 μ l) / anti CD28 FITC BD (20 μ l)
- anti IFN γ PE (20 μ l) / anti CD8 PerCP BD (20 μ l) / anti CD28 FITC BD (20 μ l)

- anti IFN γ PE (20 μ l) / anti CD8 PerCP BD (20 μ l) / anti CD27 FITC Imm (20 μ l) / anti CD28 FITC BD (20 μ l)

Nach 15 Minuten bei 4°C in Dunkelheit wurden die Zellen ein weiteres Mal wie oben beschrieben mit 3ml des Perm-Wash-Buffer-Mixes gewaschen.

2.2.8 *Messung per Durchflusszytometrie*

Zur Messung per Durchflusszytometrie wurden die Zellen je mit 300 μ l PBS resuspendiert. Es wurden mit einem 3-Farben FACScan Durchflußzytometer von Becton Dickinson mit einem 15 mW Argon Laser jeweils zwischen 200 000 und 250 000 Events aufgenommen.

Die digitalen Daten wurden auch hier mit der Software Cell Quest von Becton Dickinson (San Jose, Kalifornien, USA) verarbeitet, gespeichert und statistisch und graphisch ausgewertet.

2.3 **Statistische Auswertung**

Die Expression der Oberflächenantigene (CD8, CD27, CD28) bzw. die Produktion von Zytokinen (Il-2, IFN γ) wurde als Prozentzahl, in Teilen auch als absolute Zahl, berechnet - bezogen auf die gesamte CD8 T-Zellpopulation oder auf die entsprechenden Subpopulationen hinsichtlich ihrer Zelldifferenzierung (naiv / intermediär vs. terminal). Die Werte für die jeweils angegebenen Gruppen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem Students t Test mit Microsoft Excel Software berechnet. P-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Tetrameruntersuchungen

3.1.1. Tetramerpositive HIV-spezifische CD8 T-Lymphozyten

Von insgesamt 69 untersuchten Kindern waren 21 Kinder HLA A02 positiv. Bei 13 Patienten war eine Untersuchung mit den MHC-Tetrameren möglich (*Tabelle 6*).

3.1.1.1 HIV-GAG spezifische CD8 Zellen

Bei 8 von 13 untersuchten Kindern lassen sich HIV-spezifische CD8 Zellen nachweisen. Der Anteil HIV-GAG-spezifischer Zellen an der CD8 Gesamtpopulation variiert zwischen 0,3 und 6,3% und liegt im Mittel bei 1,8% $\pm 1,95$. Dies entspricht in absoluten Zellzahlen einer Spanne von 3 bis 114 Zellen pro μl , im Mittel 27 ± 37 .

3.1.1.2 HIV-POL spezifische CD8 Zellen

Bei 4 von 13 untersuchten Kindern lassen sich HIV-POL-spezifische CD8 Zellen nachweisen. Der Anteil HIV-POL-spezifischer Zellen an der CD8 Gesamtpopulation liegt jeweils bei 0,2%, 0,2%, 0,4% und 1,1 %, was absoluten Zellzahlen von 1, 2, 6 und 20 pro μl entspricht.

3.1.2 *Anteil terminal ausdifferenzierter tetramerpositiver HIV-spezifischer CD8 Zellen*

Es finden sich fast keine HIV-GAG-spezifischen CD8 Zellen, die sowohl CD27 als auch für CD28 negativ sind. Die HIV-GAG spezifischen CD8 Zellen zeigen damit nicht den Phänotyp einer terminal ausdifferenzierten CD8 Zellpopulation. Die HIV-spezifischen Zellen sind jedoch bei der einfachen Färbung mehrheitlich für CD28 negativ (81,6% \pm 17,7 der HIV-GAG-positiven CD8 Zellen). Dies lässt darauf schließen, dass ein Großteil dieser Zellen CD27 positiv CD28 negativ ist, also dem intermediären CD8 Zelldifferenzierungstyp angehört. Es sind keine HIV-POL-spezifischen CD8 Zellen nachweisbar, die sowohl für CD27 als auch für CD28 negativ sind.

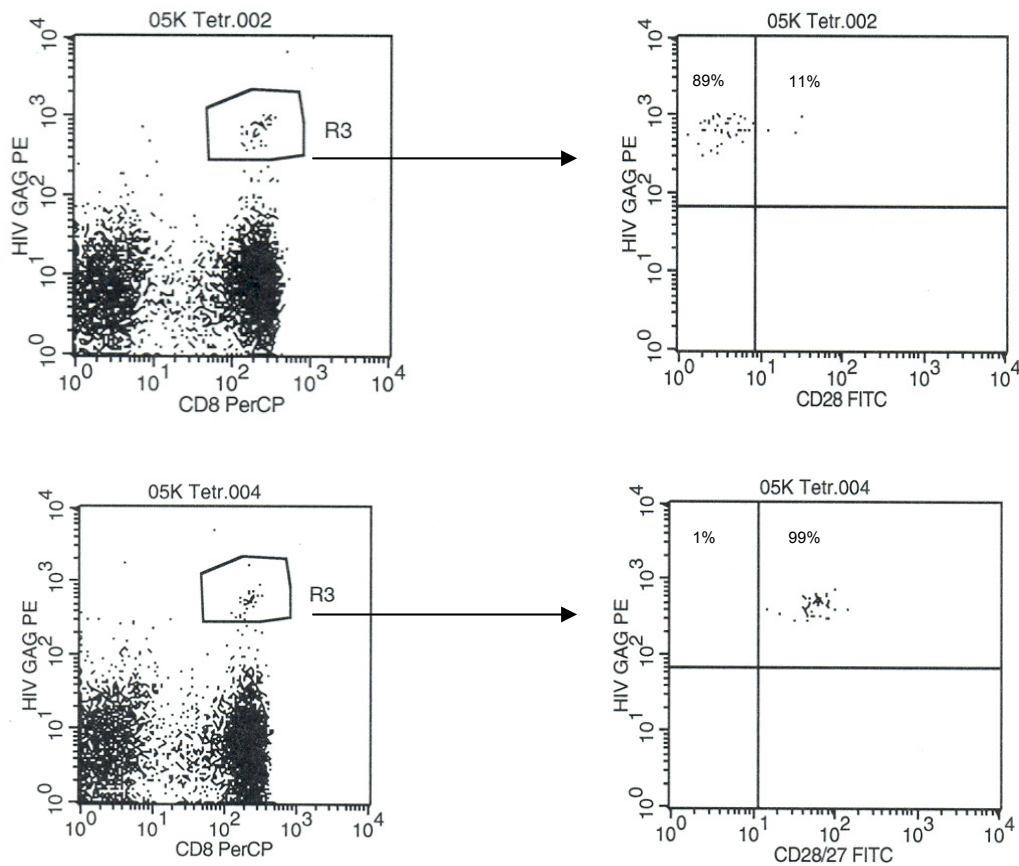


Abbildung 2 - Patient 05K - FACS-Analyse von mononukleären Zellen, Gating auf Lymphozyten (nicht abgebildet), einer Tetrameruntersuchung mit Bestimmung der Oberflächeneigenschaften für CD27 und CD28 der HIV(gag)-spezifischen CD8 Zellen durch Gating auf die tetramerpositive CD8 Population (R3)

Oben: Färbung mit CD28 FITC – 89,4% der HIV(gag)-spezifischen CD8 Zellen sind für CD28 negativ (oberer linker Quadrant), während 10,6% der HIV(gag)-spezifischen CD8 Zellen für CD28 positiv sind (oberer rechter Quadrant)

Unten: Färbung mit CD27 FITC und CD28 FITC – 1,1% der HIV(gag)-spezifischen CD8 Zellen sind für CD27 und CD28 negativ (oberer linker Quadrant), während 98,9 % der HIV(gag)-spezifischen CD8 Zellen für CD27 und / oder CD28 positiv sind (oberer rechter Quadrant)

3.1.3 Korrelation zwischen tetramerpositiven HIV-spezifischen CD8 T-Lymphozyten und Alter, klinischem Stadium, CD4 Zahl, Viruslast und Therapie

3.1.3.1 Alter

In *Tabelle 6* sind die Ergebnisse zur Untersuchung HIV-spezifischer CD8 Zellen dargestellt. Die Ergebnisse sind dabei nach Alter der Patienten sortiert. Bei unseren Untersuchungen war ein Nachweis HIV-spezifischer T-Zellen mittels der Tetramermethode eher bei älteren Kindern und Jugendlichen festzustellen. So waren bei 5 von 6 Kindern älter als 8 Jahre HIV-spezifische CD8 Zellen nachweisbar, dagegen gelang dies nicht bei 4 von 7 Kindern unter 8 Jahren.

Tabelle 6 - CD8 Zellzahlen und HIVgag und pol spezifische T-Zellen bei den untersuchten HLA A02 positiven HIV-Patienten, sortiert nach Alter

ID	Alter / y	CD8 / μ l	CD8 ⁺ GAG ⁺		CD8 ⁺ GAG ⁺ CD27/CD28 ⁺		CD8 ⁺ POL ⁺		CD8 ⁺ POL ⁺ CD27/CD28 ⁺	
			%	/ μ l	%	/ μ l	%	/ μ l	%	/ μ l
01K	4,3	1140	kein Nachweis		-	-	kein Nachweis		-	-
24K	4,7	2280	kein Nachweis		-	-	kein Nachweis		-	-
39K	5,6	1098	0,3	3	0,0	0	kein Nachweis		-	-
02K	6,7	1920	kein Nachweis		-	-	kein Nachweis		-	-
22K	7,1	630	kein Nachweis		-	-	kein Nachweis		-	-
35K	7,6	1605	2,6	41	0,5	0	kein Nachweis		-	-
25K	7,8	1653	0,8	14	1,0	0	kein Nachweis		-	-
38K	8,4	1953	kein Nachweis		-	-	kein Nachweis		-	-
33K	8,7	969	1,2	11	0,8	0	0,2	1	5,9	0
36K	15,3	1440	0,3	4	10,3	0	0,4	6	9,6	1
37K	15,5	1843	6,2	114	3,2	4	1,1	20	6,2	1
40K	16,1	1024	1,8	18	5,4	1	0,2	2	7,1	0
05K	18,3	1260	1,0	13	1,0	0	kein Nachweis		-	-

3.1.3.2 *klinisches Stadium*

Zur vereinfachten Darstellung wurden Gruppen gemäß der CDC-Klassifikation von 1994 gebildet (siehe Anhang). Dabei ließen sich tetramerpositive HIV-spezifische CD8 T-Lymphozyten eher bei Kindern mit fortgeschrittenem klinischem Stadium nachweisen. So fanden sich bei den insgesamt sieben Kindern im Stadium A zweimal HIV-spezifische CD8 Zellen. Bei den sechs Kindern in Stadium B und C gelang dies in allen sechs Fällen.

Tabelle 7 - Übersicht nach Aufteilung in Gruppen: geordnet nach klinischem Stadium zum Zeitpunkt der Untersuchung

Gruppen nach klinischem Stadium (aktuell erreichte Einstufung nach CDC von 1994)	Gesamt (n=13)	Nachweis von tetramerpositiven HIV-spezifischen CD8 T-Zellen	KEIN Nachweis von tetramerpositiven HIV-spezifischen CD8 T-Zellen
A	7	2	5
B	4	4	0
C	2	2	0

3.1.3.3 CD4 Zahl / immunologisches Stadium

Zwischen CD4 Zahl und tetramerpositiven HIV-spezifischen T-Lymphozyten besteht bei den von uns untersuchten Patienten kein eindeutiger Zusammenhang. Nach Aufteilung in Gruppen anhand der aktuellen CD4 Zahl mit Hilfe der CDC-Klassifikation gelang bei 4 von 8 Kindern im Stadium 1 (CD4 Zahl $\geq 25\%$), bei 3 von 3 im Stadium 2 (CD4 Zahl 15-24%) und bei einem von 2 im Stadium 3 (CD4 Zahl $< 15\%$) ein Nachweis tetramerpositiver HIV-spezifischer CD8 Zellen.

Tabelle 8 - Übersicht aller untersuchten HLA A02 positiven HIV-Patienten, sortiert nach CD4 Zahl, und Aufschlüsselung in Anteile von detektierten HIV-spezifischen CD8 Zellen

ID	CD4 / μl	CD8 ⁺ GAG ⁺		CD8 ⁺ POL ⁺	
		%	/ μl	%	/ μl
38K	155	kein Nachweis		Kein Nachweis	
05K	280	1.0	13	Kein Nachweis	
33K	340	1.2	11	0.2	1
40K	433	1.8	18	0.2	2
37K	476	6.2	114	1.1	20
25K	700	0.8	13	Kein Nachweis	
39K	867	0.3	3	Kein Nachweis	
22K	945	kein Nachweis		Kein Nachweis	
24K	1120	kein Nachweis		Kein Nachweis	
01K	1200	kein Nachweis		Kein Nachweis	
36K	1520	0.3	4	0.4	6
02K	1680	kein Nachweis		Kein Nachweis	
35K	2408	2.6	41	Kein Nachweis	

3.1.3.4 Viruslast

Eine Korrelation zwischen der Nachweisbarkeit bzw. der Anzahl tetramerpositiver HIV-spezifischer CD8 T-Lymphozyten und Viruslast ist nicht festzustellen. Es finden sich sowohl HIV-spezifische CD8 Zellen bei relativ hoher Viruslast, als auch bei Kindern mit der Viruslast unter der Nachweisgrenze von 50 Kopien/ml.

Tabelle 9 - Übersicht aller untersuchten HLA A02 positiven HIV-Patienten, sortiert nach Viruslast (Kopien/ml Plasma), und Aufschlüsselung in Anteile von detektierten HIV-spezifischen CD8 Zellen

ID	HIV-Viruslast	<u>CD8⁺ GAG⁺</u>		<u>CD8⁺ POL⁺</u>	
	Kopien / ml	%	/ µl	%	/ µl
01K	<50	kein Nachweis		Kein Nachweis	
39K	<50	0.3	3	Kein Nachweis	
35K	<50	2.6	41	Kein Nachweis	
38K	<50	kein Nachweis		Kein Nachweis	
02K	92	kein Nachweis		Kein Nachweis	
33K	129	1.2	11	0.2	1
40K	210	1.8	18	0.2	2
24K	270	kein Nachweis		Kein Nachweis	
36K	500	0.3	4	0.4	6
25K	1385	0.8	13	Kein Nachweis	
05K	2030	1.0	13	Kein Nachweis	
37K	2310	6.2	114	1.1	20
22K	7696	kein Nachweis		Kein Nachweis	

3.1.3.5 Therapie

Lediglich eines der untersuchten Kinder wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht mit einer antiviralen Therapie behandelt. Bei diesem Kind waren keine tetramerpositiven HIV-spezifischen CD8 T-Lymphozyten nachzuweisen. Bei den 12 Kindern und Jugendlichen mit antiviraler Kombinationstherapie war in acht Fällen ein Nachweis der mit Tetrameren detektierten HIV-spezifischen Zellen möglich.

3.1.4 Tetramerpositive HIV-spezifische CD8 T-Lymphozyten bei Erwachsenen

Bei den insgesamt 6 mit Tetrameren untersuchten erwachsenen HIV-Patienten ließen sich in fünf Fällen GAG-tetramerpositive HIV-spezifische CD8 T-Lymphozyten nachweisen. Diese lagen im Mittel bei 1,3% ($\pm 1,6$) der CD8 Zellen. Im Unterschied zu Kindern zeigten zwei der erwachsenen Patienten klare Populationen terminal ausdifferenzierter CD8 Zellen (13,9% bzw. 40,1% der tetramerpositiven HIV-spezifischen CD8 Zellen).

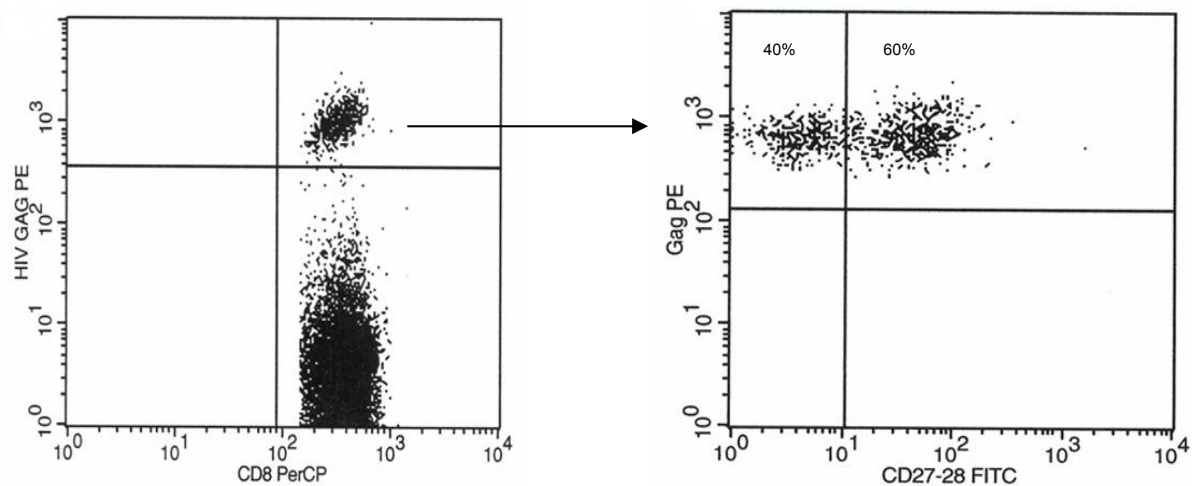


Abbildung 3 - Beispiel der FACS-Analyse im Lymphozytenfenster einer Tetrameruntersuchung mit Bestimmung der Oberflächeneigenschaften für CD27 und CD28 der HIV(gag)-spezifischen CD8 Zellen durch Gating auf die tetramerpositive CD8 Population (Pfeil) bei einem erwachsenen Patienten

Rechts: Färbung mit CD27 FITC und CD28 FITC – 40,1% der HIV(gag)-spezifischen CD8 Zellen sind für CD27 und CD28 negativ (linker oberer Quadrant) und 59,9% der HIV(gag)-spezifischen CD8 Zellen sind CD27 und/oder CD28 positiv (rechter oberer Quadrant)

3.1.5 *Doppelnegative (CD4⁻ CD8⁻) HIV-spezifische T-Lymphozyten*

Es konnten weder bei den 13 pädiatrischen Patienten, noch bei den sechs erwachsenen HIV-Patienten eine Population oder einzelne Zellen CD4 und CD8 doppelnegativer HIV-spezifischer Lymphozyten nachgewiesen werden.

3.2 **Intrazelluläre Zytokinmessungen**

3.2.1 *Terminal differenzierte CD8 Zellen bei HIV-infizierten Kindern, bei Hepatitis-infizierten Kindern und bei gesunden Kindern*

Die Differenzierung von CD8 Zellen wurde zwischen altersgematchten Kohorten von HIV-infizierten Kindern (n=26), Hepatitis-infizierten Kindern (n=10) und gesunden Kindern (n=10) verglichen. Bei den Untersuchungen an den isolierten peripheren mononukleären Zellen der HIV-positiven Kinder sind im Mittel 24,3% (\pm 14,3) der CD8 Zellen terminal differenziert. Bei der Gruppe der Hepatitis infizierten Kinder sind dies lediglich 13,8% (\pm 7,5), bei den gesunden Probanden 15,9% (\pm 10,1). Somit zeigt sich im Differenzierungsprofil der CD8 Zellen ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen der Gruppe der HIV-infizierten und der Hepatitis-infizierten Kinder. Zwischen der Gruppe der HIV-infizierten Kinder und der gesunden Probanden zeigt sich diesbezüglich kein als signifikant zu bezeichnender Unterschied ($p = 0,06$).

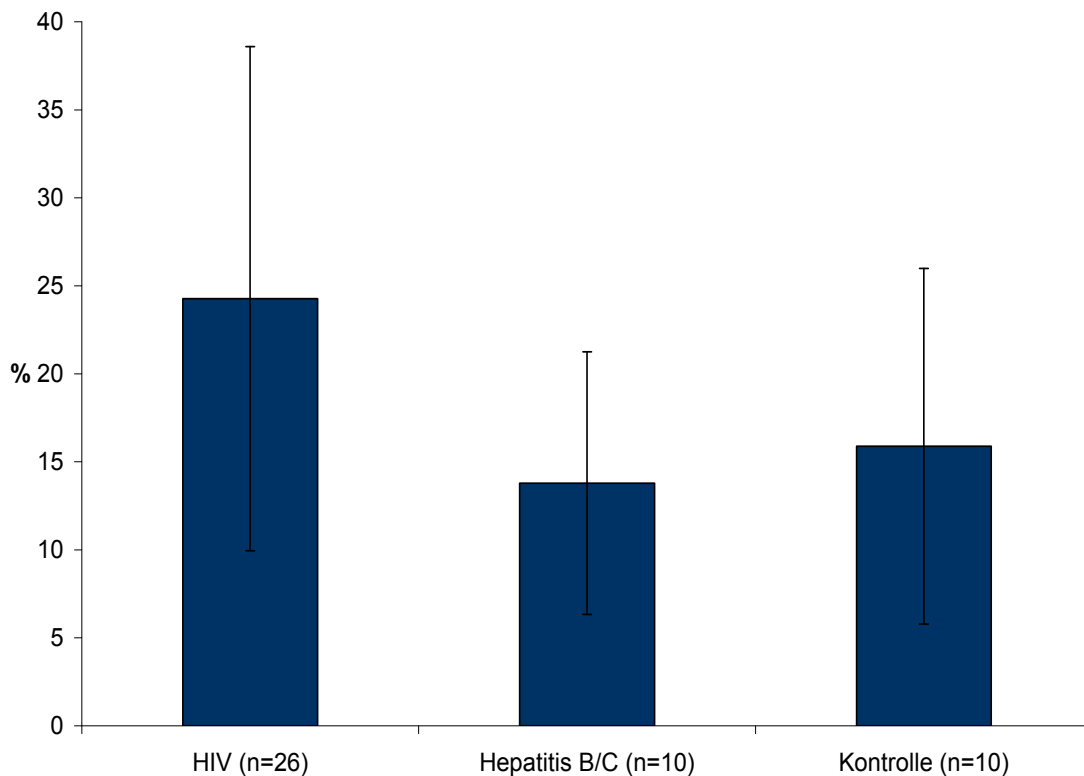


Abbildung 4 - Prozentualer Anteil terminal differenzierter Zellen an der Gesamt-CD8 Lymphozytenpopulation bei HIV, chronischer Virusinfektion und gesunden Kontrollen

3.2.2 *Intrazellulärer Zytokinnachweis bei terminal differenzierten CD8 Zellen bei HIV-infizierten Kindern und Kontrollgruppen (Hepatitis, Gesunde)*

3.2.2.1 *Ohne Stimulation*

In den unstimulierten Zellsuspensionen wurden keine oder prozentual kleine Populationen ($\leq 1,34\%$) Zytokin oder Chemokin produzierender CD8 Zellen gefunden. Die Interleukin 2 Produktion in der terminal differenzierten CD8⁺ CD27⁻ CD28⁻ Population liegt bei HIV-infizierten Kindern und den Hepatitis-infizierten Kindern $\leq 0,02\%$. Ein signifikanter Unterschied zu den gesunden Kindern ($0,07\% \pm 0,12$) liegt nicht vor. Hinsichtlich der IFN γ -Produktion bestehen bei der terminal differenzierten CD8 Population der HIV-infizierten Kinder ($0,38\% \pm 0,36$)

signifikante Unterschiede sowohl zu den Hepatitis-infizierten Kindern (0,03% \pm 0,03; $p < 0,001$), als auch zu den Gesunden (0,14% \pm 0,22; $p = 0,03$). Die naiv / intermediäre CD8 Population zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion (IL-2: HIV 0,54% \pm 0,42 / Hepatitis 0,61% \pm 0,32 / Gesunde 1,34% \pm 1,22 ; IFN γ : HIV 0,63% \pm 0,49 / Hepatitis 1,07% \pm 1,05 / Gesunde 1,32% \pm 1,08).

3.2.2.2 *Stimulation mit Ionophor / PMA: Interleukin 2*

Bei den HIV-positiven Kindern produzieren 11,3% (\pm 4,0) aller naiv / intermediär, und 2,6% (\pm 3,9) aller terminal differenzierten CD8 Zellen Interleukin 2. Ähnlich produzieren in der Kontrollgruppe der Kinder mit der chronischen Virusinfektion Hepatitis 14,3% (\pm 6,9) der naiv-intermediären, und 2,8% (\pm 1,6) der terminal differenzierten CD8 Zellen IL-2. Bei den gesunden Kindern sind dies 10,4% (\pm 3,9) der naiv-intermediären CD8 Zellen und 3,8% (\pm 3,4) der terminal differenzierten CD8 Zellen.

CD8 Zellen, die nach Stimulation Interleukin 2 produzieren, gehören also vornehmlich dem naiven oder intermediären Zellstadium an und sind nur zu einem geringen Anteil terminal ausdifferenziert. Dabei lassen sich zwischen der Gruppe der HIV-infizierten Kinder und den beiden Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede im Ausdifferenzierungsprofil Interleukin 2 produzierender CD8 Zellen feststellen. Weder im Bezug auf alle CD8 Zellen, noch bei Betrachtung der einzelnen Differenzierungsgruppen (naive/intermediäre vs. terminale CD8 Zellen).

3.2.2.3 *Stimulation mit Ionophor / PMA: Interferon γ*

Während der Anteil der IL-2 produzierenden CD8 Zellen bei allen Untersuchungsgruppen selbst nach Stimulation mit Ionophor / PMA weniger als 20% der CD8 Zellen ausmacht, finden sich bei den HIV-infizierten Kindern über 50% der CD8 Zellen, die IFN γ produzieren. So wird bei den HIV-positiven Kindern in durchschnittlich 50,3% (\pm 19,7) der naiven bzw. intermediären CD8 Zellen und 85,0% (\pm 20,7) der terminal differenzierten CD8 Zellen die Produktion von

Interferon γ nachgewiesen. Bei der Gruppe der Hepatitis infizierten Kinder finden sich 26,4% ($\pm 14,9$) aller naiven bzw. intermediären CD8 Zellen gegenüber 64,1% ($\pm 21,8$) terminal ausdifferenzierten Zellen mit dieser Eigenschaft. Im Blut der gesunden Kinder produzieren 26,0% ($\pm 6,7$) aller naiv / intermediär, und 60,1% ($\pm 22,8$) aller terminal differenzierten CD8 Zellen IFN γ . Interferon γ wird nach Stimulation also sowohl von CD8 Zellen im naiven-intermediären Zellstadium, als auch im terminal ausdifferenzierten Stadium produziert. Dabei ist der Anteil der naiven, wie auch der terminal ausdifferenzierten Zellen bei den Kindern mit HIV im Vergleich zu Hepatitis-Patienten oder gesunden Probanden signifikant erhöht – sowohl im Bezug auf alle CD8 Zellen, wie auch bezogen auf jeweils nur alle naiv / intermediär bzw. terminal differenzierten CD8 Zellen.

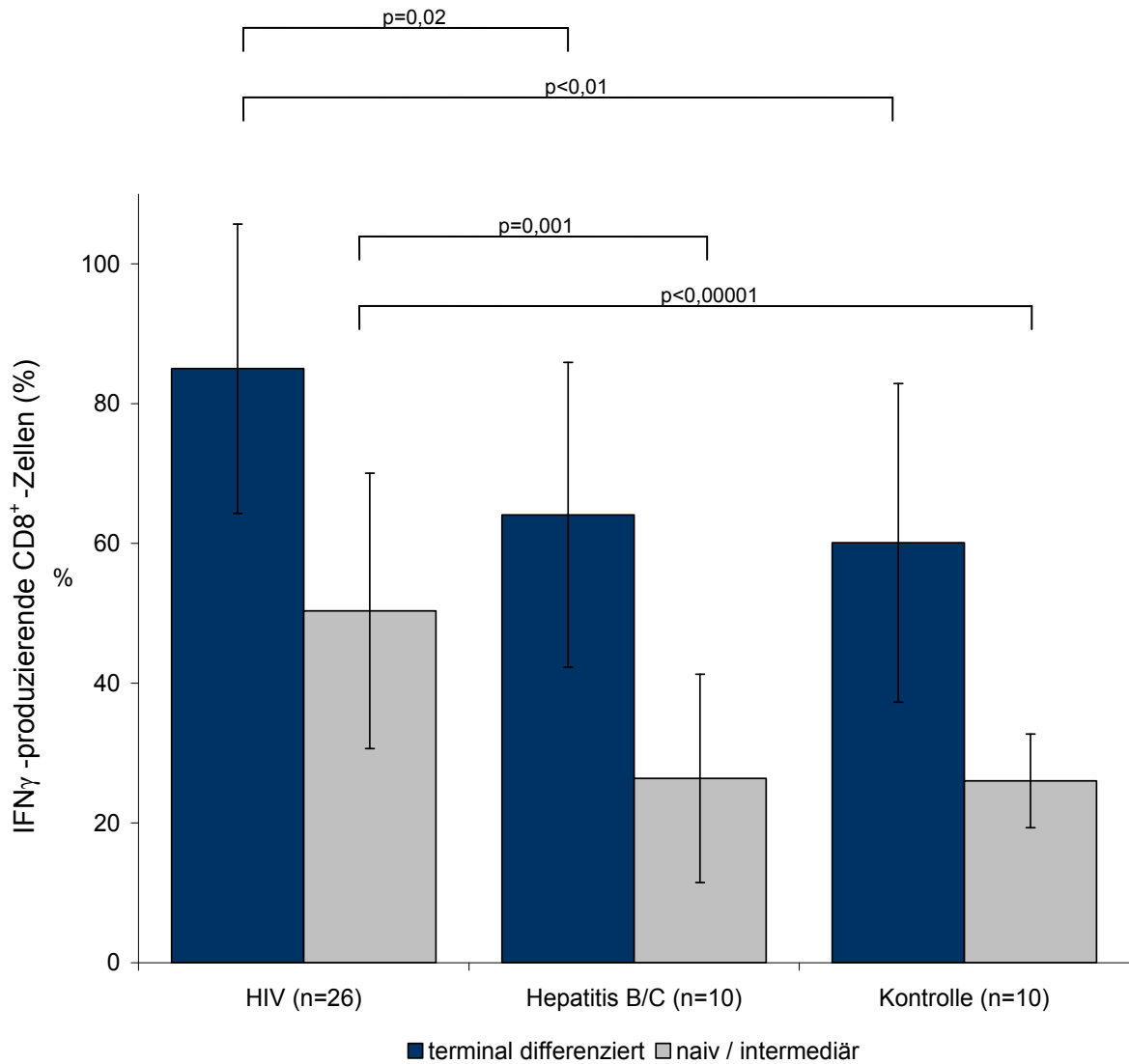


Abbildung 5 - Anteil Interferon γ produzierender Zellen innerhalb der naiven/intermediären bzw. terminal differenzierten CD8 Zellen in den drei Untersuchungsgruppen – Beispiel: 50,3% ($\pm 19,7$) aller naiv / intermediär ausdifferenzierten CD8 Zellen bei den HIV-infizierten Kindern produzieren $\text{IFN}\gamma$

3.2.3 Intrazelluläre Zytokine nach Stimulation

Die Daten zur Zytokinproduktion nach Stimulation mit Ionophor / PMA zeigen zum Teil deutliche interindividuelle Unterschiede. Im Folgenden wird untersucht ob zwischen der Anzahl der zytokinproduzierenden CD8 Subpopulation und Alter, klinischem Stadium, immunologischem Stadium (CD4 Zahl), Viruslast und Therapie Korrelationen bestehen. Aufgrund der niedrigen Patientenzahl wurde hierbei in der Regel keine statistische Analyse durchgeführt.

3.2.3.1 Intrazelluläre Zytokine und Alter

Die Daten für terminal differenzierte CD8 Zellen sind in Tabelle 10 dargestellt. Nach Aufteilung der Patientengruppen nach Alter (jünger oder älter als 10,5 Jahre - Altersdurchschnitt der untersuchten HIV-Patienten), fallen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Zellpopulationen und ihrer Zytokinproduktion auf. Bei den naiv-intermediären CD8 Zellen fällt lediglich als markanter Unterschied auf, dass in der Gruppe der älteren Kinder und Jugendlicher (>10,5 Jahre) in allen Untersuchungsgruppen der Anteil Interleukin 2 produzierender Zellen größer ist (HIV: 12,6 % \pm 3,9; Hep.: 16,1% \pm 7,2; Gesunde: 13,3% \pm 1,2) als bei den jüngeren Kindern (HIV: 10,0% \pm 3,7; Hep.: 11,6% \pm 6,2; Gesunde: 8,4% \pm 3,8).

Tabelle 10 - Anteil Interleukin 2 bzw. Interferon γ produzierender Zellen innerhalb der terminal differenzierten CD8 Zellen in den drei Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Alter

	Interleukin 2			Interferon γ		
	HIV+	Hepatitis	Gesunde	HIV+	Hepatitis	Gesunde
$\leq 10,5$ y	1,5 % (n=13)	3,3% (n=4)	5,2% (n=6)	83,1% (n=13)	72,6% (n=4)	65,4% (n=6)
$> 10,5$ y	3,8% (n=13)	2,4% (n=6)	1,6% (n=4)	86,9% (n=13)	58,5 (n=6)	52,1% (n=4)

3.2.3.2 *Intrazelluläre Zytokine und klinisches Stadium bei Diagnose*

Bei Diagnose der HIV-Infektion wird eine Einteilung in klinische Stadien vorgenommen (siehe 1.2.5). In Abhängigkeit von den Kategorien der CDC-Klassifikation (siehe Anhang) gibt es bei den naiv / intermediären bzw. den terminal differenzierten CD8 Zellen zwischen den drei HIV-Patientengruppen (Stadium A vs. B vs. C) keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Anzahl IL-2-produzierender Zellen. Es zeigt sich lediglich ein leichter Trend zu einem höheren Anteil zytokinproduzierender Zellen in den früheren Stadien, wie aus Tabelle 11 für die terminal differenzierten Zellen ersichtlich ist.

Tabelle 11 - Anteil Interleukin 2 bzw. Interferon γ produzierender Zellen innerhalb der terminal differenzierten CD8 Zellen in Abhängigkeit vom klinischen Stadium*

	Interleukin 2	Interferon γ
Stadium N / A (n=14)	3,0 %	89,5 %
Stadium B (n= 8)	2,2 %	84,3 %
Stadium C (n=4)	1,3%	72,7 %

*Stadieneinteilung gemäß Klinik bei Diagnose

3.2.3.3 *Intrazelluläre Zytokine und aktuelles Ausmaß des Immundefektes*

Angelehnt an die immunologischen Kategorien der CDC-Klassifikation wurde anhand der aktuellen (Zeitpunkt der Untersuchung) CD4 Zahlen eine Einteilung des Immundefektes vorgenommen. Es gibt bei Betrachtung der naiv / intermediären bzw. der terminal differenzierten CD8 Zellen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich ihrer IL-2-Produktion. Es fällt auf, dass mit zunehmendem Immundefekt der Anteil der IFN γ -produzierenden Zellen zunimmt. So produzieren bei den Patienten im Stadium 3 nahezu 100% der terminal differenzierten CD8 Zellen IFN γ .

Tabelle 12 - Anteil Interleukin 2 bzw. Interferon γ produzierender Zellen innerhalb der terminal differenzierten CD8 Zellen in Abhängigkeit vom immunologischen Stadium (CD4 Zahl)*

	Interleukin 2	Interferon γ
Stadium 1 (n=16)	3,0 %	81,1 %
Stadium 2 (n= 7)	1,9 %	86,5 %
Stadium 3 (n=3)	2,1 %	99,6 %

*Stadieneinteilung nach aktueller CD4 Zahl

3.2.3.4 Intrazelluläre Zytokine und aktuelle Viruslast

Nach Einteilung der HIV-Patienten anhand der Viruslast in zwei Gruppen (größer oder kleiner 500 Kopien/ml Plasma) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die IL-2 produzierenden terminal differenzierten bzw. naiv / intermediären CD8 Zellen zwischen den beiden HIV-Patientengruppen. Bezogen auf die IFN γ -produzierenden CD8 Zellen zeigt sich bei der Gruppe der Patienten mit einer Viruslast > 500 Kopien/ml Plasma ein signifikant ($p < 0,01$) größerer Anteil der naiv / intermediären CD8 Zellen in der Lage, dieses Zytokin zu produzieren (59,7% zu 40,2%). Bei den terminal differenzierten CD8 Zellen zeigen sich keine Unterschiede, wie in Tabelle 13 ersichtlich.

Tabelle 13 - Anteil Interleukin 2 bzw. Interferon γ produzierender Zellen innerhalb der terminal differenzierten CD8 Zellen in Abhängigkeit von der Viruslast

	Interleukin 2	Interferon γ
\leq 500 Kopien / ml (n=12)	2,5 %	86,1 %
> 500 Kopien / ml (n=14)	2,8 %	84,1 %

3.2.3.5 Intrazelluläre Zytokine und Therapie

Nur drei der insgesamt 26 pädiatrischen HIV-Patienten wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht therapiert. Dabei kann festgestellt werden, dass ein deutlich größerer Teil der terminal differenzierten CD8 Zellen bei den Patienten ohne Therapie IFN γ produziert, wenn auch bei Betrachtung der Einzelwerte dies nur für zwei der drei Patienten gilt und diese auch nicht zu den höchsten gemessenen Werten in der Gesamtkohorte zählen.

Tabelle 14 - Anteil Interleukin 2 bzw. Interferon γ produzierender Zellen innerhalb der terminal differenzierten CD8 Zellen in Abhängigkeit von antiviraler Therapie

	Interleukin 2	Interferon γ
ohne Therapie (n=3)	1,7 %	94,6 %
mit Therapie (n=23)	3,3 %	83,6 %

4. DISKUSSION

4.1 Ziele

4.1.1 Ziele allgemein

Da dem Immunsystem des Kindes zum Zeitpunkt der perinatalen Infektion noch die Abwehrmechanismen eines erwachsenen ausgereiften Immunsystems fehlen und es erst in den Anfängen seiner immunologischen Prägung steht, darf in diesem Patientenkollektiv eine andere HIV-Pathogenese als bei der horizontalen HIV-Infektion erwachsener Patienten vorausgesetzt werden. So zeigen sich auch im klinischen Verlauf der Infektion Unterschiede: die Inkubationszeit bei Kindern ist kürzer als bei Erwachsenen und das erwachsene Immunsystem verfügt im Gegensatz zu dem des Kindes über Eigenschaften die Viruslast initial selbstständig zu senken. Unter anderen gehören hierzu HIV-spezifische CD8 Zellen, die virusspezifisch Zellen zerstören können. Erwachsene zeigen eine Virusdynamik mit schneller Abnahme der Viruslast (Henrard, 1995), bei perinatal infizierten Kindern hingegen ist dies frühestens nach 1 – 3 Lebensjahren Jahren der Fall (Mofenson, 1997b), obgleich schon in den ersten Lebensmonaten bereits teilweise HIV-spezifische CD8 Zellen zu finden sind, die aber – zumindest in den ersten sechs Lebensmonaten - in keinem Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf zu stehen scheinen (Buseyne, 1998; Lohmann, 2005).

In einem Modell zur T-Zelldifferenzierung werden die antigenspezifischen CD8 Zellen in drei, verschiedenen Entwicklungsstadien entsprechenden, Subpopulationen anhand ihrer CD27 und CD28 Expression aufgeteilt (Appay, 2002). Bei dem Weg durch die verschiedenen Entwicklungsstufen werden CCR7, CD28 und CD27 herunter reguliert, während zytotoxische Faktoren hoch reguliert werden. Interessanterweise wurden bei unterschiedlichen Virusinfektionen (HIV, EBV, HCV, CMV) unterschiedlich vorherrschende Zellpopulationen verschiedener Entwicklungsstufen gefunden, was der zuvor geltenden Vorstellung von Effektor- und Gedächtniszellen mit klaren phänotypischen Erscheinungen widerspricht und

nahe legt, dass jede Virusinfektion eine spezifische Immunantwort mit unterschiedlichen Gedächtniszellpopulationen hervorruft (Appay, 2002). In der Arbeit von Appay et al. wurden HBV induzierte Veränderungen nicht untersucht. Mit unseren Untersuchungen versuchen wir die unterschiedlichen Entwicklungsstufen (naive und intermediäre vs. terminal ausdifferenzierte CD8 T-Zellen) bei HIV-Infektion vertikal infizierter Kinder quantitativ und funktionell näher zu beschreiben.

4.1.2 Ziele und Möglichkeiten der Tetramermethode

Mit den MHC-Tetrameren wird untersucht, ob sich bei vertikal HIV-infizierten Kindern HIV-spezifische CD8 Zellen nachweisen lassen und ob HIV-spezifische CD8 T-Zellen naiv bzw. intermediär oder terminal ausdifferenziert sind. Des Weiteren wird nach eventuell bestehenden Korrelationen zu Alter, Viruslast, CD4 Zahl, klinischem Stadium oder Therapie gesucht.

So können mit den Tetrameren direkt im Vollblut - ohne Zellisolation, Anlegen von Zellkulturen oder sonstigen Manipulationen - selbst zahlenmäßig kleine Populationen gefärbt und im Durchflusszytometer gezählt und beschrieben werden. Der Nachteil der geringen Anzahl tetramerpositiver Zellen wurde durch eine Aufnahme von möglichst vielen Events (i.d.R. > 200000) ausgeglichen.

Im Mäusemodell einer chronischen Virusinfektion (lymphozytischen Choriomeningitis) fallen die Werte mit Peptid-MHC-Tetrameren gemessener antigenspezifischer T-Zellen höher aus als bei anderen Methoden (Elispot, intrazelluläres Staining, LDA – limiting dilution assay). Es wird angenommen, dass durch die Tetramere auch ein substantieller Anteil funktionell inaktiver spezifischer Zellen, die nicht zytolytisch funktionieren und kein IFN γ produzieren, gemessen wird (Gallimore, 1998; Zajac, 1998). Für die HIV-Infektion konnte in einem Methodenvergleich zwischen den oben genannten Methoden und der Tetramermethode belegt werden, dass funktionell inaktive CTLs quantitativ keine signifikante Rolle in der chronischen HIV-Infektion bei Kindern und Erwachsenen spielen, da eine starke positive Korrelation zwischen den gemessenen Zellzahlen der verschiedenen Methoden gefunden wurde (Goulder, 2000). Neuere Studien scheinen jedoch zu bestätigen, dass tatsächlich nicht alle Tetramer-bindenden

CD8 Zellen in der Lage sind Zytokine oder Chemokine zu produzieren, weder bei Erwachsenen (Goepfert, 2000; Kostense 2001, Sun 2003), noch bei Kindern (Buseyne, 2002b, Scott-Algara, 2005). Bei Progression der chronischen HIV-Infektion zum erworbenen Immundefizienzsyndrom (AIDS) zeigen sich mehr *Tetramer-positive* Zellen als *HIV-Peptidspezifische IFN γ produzierende* Zellen, die besser mit der Abnahme der CD4 Zellzahlen korrelieren. Dies ist möglicherweise auf einen zunehmenden Verlust der Funktion HIV-spezifischer CD8 Zellen zurückzuführen (Kostense, 2002).

Ein Nachteil der MHC-Tetramere ist, dass sie nur bestimmte Peptide nutzen, in unserem Fall die HIV-Peptide gag (SLYNTVATL) und pol (ILKEPVHGV), und somit ein komplexes Arrangement von Epitopen, wie es möglicherweise Ziel des Angriffs durch T-Zellen sein könnte, nicht erfasst wird. Verstärkt wird dieses Problem durch einen möglicherweise bestehenden Selektionsdruck auf die benutzten Epitope. So entziehen sich HIV-1 Varianten der CTL-Erkennung (positive Selektion von „CTL-Escape-Varianten“) in der frühen Infektionsphase wie dies für das Epitop NEF untersucht wurde (Price, 1997), was ein möglicher Grund für die Persistenz des HI-Virus nach Serokonversion sein könnte.

Darüber hinaus werden mit dieser Untersuchungsmethode lediglich HIV-spezifische CD8 Zellen *im Blut* erfasst, nicht aber CD8 Zellen, die sich an anderen Stellen des Körpers befinden. Im Vergleich zwischen Lymphknoten und peripherem Blut scheinen die Frequenz der HIV-spezifischen CD8 Zellen, jeweils bezogen auf die LNMC bzw. PBMC, ähnlich zu sein (Altfeld, 2002; Oxenius, 2001). Aber auch in nicht-lymphatischem Gewebe sind möglicherweise HIV-spezifische CD8 Zellen anzutreffen. So wurde im Mausmodell gezeigt, dass virusspezifische CD8 Zellen, sich neben Geweben des lymphatischen Systems (Lymphknoten, Thymus) auch in so genannter ‚Diaspora‘ wie zum Beispiel Leber, Niere und Knochenmark befinden (gezeigt anhand vesikulärem Stomatitis-Virus, Masopust, 2001 und Influenza A-Virus, Marshall 2001). Diese werden jedoch auch bei anderen Untersuchungsmethoden von Proben peripheren Blutes nicht erfasst.

Zusammenfassend stellt das Verfahren HIV-spezifische T-Zellen mittels MHC-Tetrameren zu detektieren im Vergleich zu anderen Tests eine einfache und zugleich äußerst sensible Methode dar, die mit den Ergebnissen anderer Tests zur

Detektion HIV-spezifischer Zellen korreliert, jedoch nicht alle möglichen Epitope und Peptidkombinationen erfasst und alleine keine unmittelbare Aussage über die Funktion der detektierten Zellen erlaubt.

4.1.3 *Ziele und Möglichkeiten der Stimulationsuntersuchungen*

Durch den Funktionstest des intrazellulären Stainings nach Stimulation mit Ionophor / PMA sollen die einzelnen Entwicklungsstufen der CD8 Zellen funktionell entsprechend ihrer Produktion von Interleukin 2 und Interferon γ beschrieben werden. Dabei soll die Kohorte HIV-positiver Kinder mit einer Gruppe Hepatitis-infizierter Kinder als Beispiel einer anderen chronischen Virusinfektion, wie auch mit gesunden Kindern verglichen werden.

Da bei Erwachsenen gezeigt wurde, dass bei verschiedenen Virusinfektionen (HIV, EBV, HCV, CMV) verschiedene Differenzierungsstadien der CTLs vorzufinden sind (Appay, 2002), sollten Unterschiede spezifischer kindlicher Immunantwortmuster bei vertikaler HIV-Infektion vs. Hepatitisinfektion herausgearbeitet werden.

In unseren Untersuchungen wurden die peripheren mononukleären Zellen mit Ionophor und PMA in vitro stimuliert. Ohne in vitro Aktivierung ist die Zytokinproduktion schwer zu beurteilen, da sich in der Regel nur bei weniger als 1% der Zellen intrazelluläre Zytokine nachweisen lassen. Eine Stimulation mit spezifischen Antigenen im Rahmen einer Auswahl spezieller Epitope oder gar die Nutzung eines „whole-protein-spanning peptide pools“ würde eher einer physiologischen Aktivierung entsprechen als eine unspezifische ‚pharmakologische‘ Stimulation mit den von uns gewählten Reagenzien, jedoch ist durch die identische Behandlung der Zellen aller drei verschiedenen Kohorten (HIV, Hepatitis und Gesunde) eine Vergleichbarkeit hinsichtlich der Zytokinprofile möglich. Darüberhinaus wurde in Studien durch Vergleich mit anderen Tests (ELISA, etc.) gezeigt, dass die Stimulation mit Ionophor und PMA sehr wohl das physiologische Potential der zellulären Zytokinproduktion repräsentiert (Prussin, 1997).

4.2 Interpretation der erhobenen Daten

4.2.1 *Interpretation der in den Tetrameruntersuchungen erhobenen Daten*

Unsere Ergebnisse decken sich mit anderen Studien HIV-infizierter Kinder, in denen HIV-spezifische CD8 Zellen beschrieben wurden. Dort wurden mit Tetrameren im Mittel 0,87% (0,1-3,9%) für das gag-Peptid und 0,59% (0,1-5,5%) für das pol-Peptid positive Zellen gefunden (bezogen auf alle CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten) (Scott-Algara, 2001). Bei unseren Untersuchungen waren im Mittel 1,77% (0,3-6,2%) der CD8⁺ T-Lymphozyten gag-Peptid positiv und 0,48% (0,2-1,1%) pol-Peptid positiv. Allerdings wurden in genannter Arbeit bei 26 von 28 Kindern (93%) HIV-spezifische Zellpopulationen gefunden, in unseren Untersuchungen war dies nur bei 8 von 13 Kindern (62%) möglich. Es handelt sich hier möglicherweise um einen altersspezifischen Befund, da in oben genannter Studie vier von den 28 Kindern (14%) unter 8 Jahren alt sind, bei unseren Untersuchungen dagegen sieben von 13 (54%) unter 8 Jahren sind (bei denen nur bei zwei Tetramer-positive Zellen gefunden werden konnten). Der Aspekt, dass der Nachweis HIV-spezifischer Zellen eher bei älteren Kindern gelingt, ist auch in einer anderen Studie beschrieben (Scott, 2001). Eine positive Korrelation zwischen INF γ produzierenden HIV-spezifischen CD8 Zellen und dem Alter wurde erst kürzlich gezeigt (Buseyne, 2005). In einer anderen Tetramer-Studie bei HIV-infizierten Kindern wird kein Zusammenhang zwischen Alter und HIV-spezifischen CD8 Zellen festgestellt (McCloskey, 2001). Dort waren im Mittel 0,4% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen gag-positiv und 0,1% CD8 Zellen pol-positiv bei insgesamt 19 untersuchten Kindern (Altersmedian: 9 Jahre), wobei nur bei zwei Patienten kein Nachweis tetramerpositiver CD8 Zellen möglich war. Dies liegt möglicherweise an einer anderen Inkubationstemperatur von 37°C bei der Studie von McCloskey vs. 21°C bei unseren Untersuchungen entsprechend den Herstellerangaben der von uns verwendeten Tetramere (Whelan, 1999). In den meisten anderen Tetramer-Studien sind keine Angaben zur verwendeten Inkubationstemperatur zu finden. Nur in einzelnen Studien wird eine Temperatur von 4°C verwendet (Gea-Banacloche, 2000; Goulder, 2000; Sun, 2002), in anderen auch 37°C (Kostense, 2001; McCloskey, 2001).

Zur Korrelation von Viruslast und HIV-spezifischen T-Zellen gibt es widersprüchliche Daten. Von einer inversen Korrelation beider (z.B. viele zytotoxische T-Lymphozyten = niedriger Viruslast) bei Erwachsenen (jedoch nicht mit Tetrameren detektiert) wurde wiederholt berichtet (Borrow, 1994; Cao, 1995; Edwards, 2001; Greenough, 1997; Koup, 1994; Musey, 1997; Rinaldo, 1995). Auch bei Kindern wurde dieser Zusammenhang gezeigt (Buseyne, 2002a), im speziellen auch für $\text{INF}\gamma$ produzierende HIV-spezifische CD8 Zellen bei Kindern unter HAART (Buseyne, 2005). In Tetramer-Studien zeigt Ogg ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen Viruslast und mit Tetrameren detektierten HIV-spezifischen CTLs bei Erwachsenen (Ogg, 1998), wie auch in longitudinalen Untersuchungen bei Kindern (Ogg, 1999). Interessanterweise konnte dies für HIV-infizierte Kinder bis zum ersten Lebensjahr bei Messung von HIV-spezifischen T-Zellen im Elispot nicht gezeigt werden (Lohmann, 2005). Für Erwachsene finden sich einzelne Studien, die zeigen, dass eine hohe Viruslast durchaus mit einer großen Anzahl HIV-spezifischer CD8 Zellen einhergehen kann (Migueles, 2001). Auch wir konnten durch unsere Tetrameruntersuchungen keinen Zusammenhang zwischen Viruslast und der Anzahl der tetramerpositiven CD8 T-Zellen nachweisen. Andere Studien kommen in der Verwendung mit Tetrameren zu ähnlichen Ergebnissen und konnten keinerlei Zusammenhang zwischen der ermittelten Anzahl HIV-spezifischer CTLs und Viruslast oder CD4-CD8-Ratio zeigen, weder bei Kindern (Scott-Algara, 2001; Buseyne, 2002b), noch bei Erwachsenen (Gea-Banacloche, 2000). Diese insgesamt widersprüchliche Studienlage wird auf eine unterschiedlich spielende Rolle von HIV-spezifischen CD8-Antworten im Verlauf der HIV-Infektion zurückgeführt (Jiao, 2006). Wird speziell auf $\text{INF}\gamma$ -produzierende CD8 Zellen untersucht, so wird von einer negativen Korrelation zwischen $\text{INF}\gamma$ -produzierenden Tetramer-positiven CD8 Zellen und Viruslast berichtet (Scott-Algara, 2005).

Bei einer Studie mit HIV-infizierten Erwachsenen von Kostense (2001) wird weiter zwischen Patienten mit niedriger und hoher CD4 Zahl differenziert (Unterscheidung bei $400 / \mu\text{l}$ Blut). Nur bei der Gruppe mit hoher CD4 Zahl findet sich hier eine inverse Korrelation zwischen Viruslast und Anzahl HIV-spezifischer CTLs. Dies wird im Zusammenhang mit der die Funktion betreffenden möglichen Abhängigkeit der CTLs von den CD4 Zellen gesehen, deren Hilfe für die Funktion der CTL als notwendig erachtet wird (Zajac, 1998). Wir finden bei den Kindern mit

einer CD4 Zahl über 400/ μ l Blut keinen Zusammenhang zwischen Viruslast und Anzahl HIV-spezifischer CTLs, allerdings ist unser Kollektiv zahlenmäßig klein.

Studien von Appay et al. (2000) zeigen, dass die mit der Tetramermethode detektierten HIV-spezifischen CD8 T-Zellen hinsichtlich der antigenspezifischen Produktion von Zytokinen funktionell aktiv sind. Es wurden nur kleine Subpopulationen gefunden, die zwar IFN γ und MIP-1beta, jedoch nicht TNF-alpha exprimierten. TNF-alpha ist für eine effektive HIV-spezifische Zytotoxizität zusammen mit IFN γ notwendig (Lichterfeld, 2004). Weiter wurde in der Studie von Appay (2000) festgestellt, dass HIV-spezifische CD8 Zellen signifikant weniger Perforin als CMV-spezifische CD8 Zellen produzieren. Dies unterstützt die These, dass es verschiedene funktionelle Stadien der spezifischen CTLs gibt und diese sich im Profil je nach vorherrschender Infektion unterscheiden. Appay beschreibt weiter, dass die Persistenz des Oberflächenmarkers CD27 bei HIV-spezifischen Zellen mit niedrigeren Perforinspiegeln und eingeschränkter zytolytischer Funktion einhergeht (Appay, 2000), so dass erst den terminalen ausdifferenzierten CD27 negativen Zellen eine effektive Zytotoxizität beigemessen werden kann.

Die von uns detektierten HIV-spezifischen CD8 Zellen bei Kindern sind entweder für CD27 und / oder 28 positiv und damit, wie oben beschrieben, nicht dem terminalen Zellstadium zuzuordnen. Es wäre denkbar, dass der Grund für die bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen eingeschränkte immunologische Abwehr der HIV-Infektion in der nicht vorhandenen Ausdifferenzierung zu suchen ist. Dem entsprechend konnten wir in vorläufigen Untersuchungen einen Unterschied zu Erwachsenen feststellen, bei denen sehr wohl signifikante Populationen HIV-spezifischer CD8 Zellen im terminalen Stadium zu finden waren. Dieser Phänotyp bei Erwachsenen wurde kürzlich auch in einer Studie mittels LDA gezeigt: Populationen von CD27⁻ CD28⁻ HIV-spezifischen CD8 Zellen (u.a. Gag-spezifisch) sind hier deutlich vorhanden (Weekes, 2006). In einer anderen Studie wird ebenfalls gezeigt, dass bei Erwachsenen eine höhere Anzahl HIV-spezifischer CD8⁺ CD27⁻ Zellen mit einer verzögerten Krankheitsprogression einhergeht (van Baarle, 2002).

Bei der Progression zum Krankheitsstadium AIDS scheinen jedoch auch die terminal ausdifferenzierten HIV-spezifischen CTLs ihre Funktion zu verlieren, da gezeigt wurde, dass der Anteil der IFN γ produzierenden Zellen der HIV spezifischen Zellen insgesamt während der Progression zu AIDS abnimmt (Kostense, 2002). Dieser Fall wurde durch unsere Studien nicht untersucht, da sich zum Zeitpunkt der Untersuchung keiner der Patienten im Krankheitsstadium AIDS befand.

4.2.2 *Interpretation der in den Stimulationsuntersuchungen erhobenen Daten*

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits gezeigt, dass die CD8⁺ CD28⁻ Zellen bei HIV-infizierten Kindern gegenüber gesunden Probanden expandiert sind (Niehues, 1998), selbst nach Senken der Viruslast durch HAART (Niehues, 2000). In dieser Arbeit zeigen wir darüber hinaus, dass dies auch für die nach Appay (2002) terminal differenzierten, also CD27 und CD28 negativen, CD8 Zellen gilt und dass diese Expansion nicht bei einer anderen chronischen Virusinfektion (hier Hepatitis B) vorzufinden ist, also möglicherweise HIV-spezifisch ist. Scheinbar fordert das HI-Virus in der immunologischen Auseinandersetzung andere Abwehrmechanismen heraus, als dies bei anderen Viruserkrankungen der Fall ist. Die Gründe hierfür sind sicherlich in den unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der verschiedenen CD8 Subpopulationen zu suchen. So werden Zellen mit fehlender Expression von CD28 mit Dysfunktion, Anergie, einem verminderten, normalerweise durch Interleukin 2 vermittelten, Eintritt in den Zellzyklus und geringerer Zellzyklusaktivität (Wells, 1997), wie auch mit einer erhöhten Apoptosebereitschaft (Boise, 1995; Lewis, 1994; Noel, 1996) assoziiert - insbesondere durch die ausbleibende Hochregulation des anti-apoptischen Proteins Bcl-xL (Dahl, 2000; Okkenhaug, 2001). Ähnliches wie für CD28 gilt für CD27, da CD27 Überlebensfunktionen der aktivierten T-Zellen stimuliert (Hendriks, 2003) und so für eine Ansammlung von Effektor-T-Zellen am Ort der immunologischen Auseinandersetzung mit der Infektion sorgen kann. Durch ihre Eigenschaft vermehrt Perforin zu exprimieren wird den terminal differenzierten Zellen ein größeres zytotoxisches Potential zuerkannt (Appay, 2002), was auch

durch eine inverse Korrelation zwischen der Expression von CD27 und Perforin bestätigt wird (Tomiyama, 2004).

Bisher gibt es kaum Studien mit einem Vergleich der CD8-Zell-Produktion von Zytokinen bei verschiedenen chronischen Virusinfektionen. Wir zeigen, dass bei HIV die terminal differenzierten CD8 Zellen nach Stimulation im Vergleich zu Hepatitis und gesunden Kontrollen vermehrt Interferon γ produzieren - im Gegensatz zu Interleukin 2, für dessen Produktion kein signifikanter Unterschied zwischen den HIV-Patienten im Vergleich zu Gesunden oder Kindern mit chronischer Virusinfektion zu finden ist. Dies ist möglicherweise ein HIV-spezifischer Befund, da bei einer anderen chronischen Virusinfektion (Hepatitis B) keine signifikant vermehrte Produktion von $\text{IFN}\gamma$ festgestellt werden konnte. So scheinen nicht nur wie bei Appay (2002) beschrieben und oben gezeigt, verschiedene Subpopulation der CD8 Zellen bei unterschiedlichen chronischen Virusinfektionen vorzuherrschen, sondern es scheint innerhalb dieser auch bei den verschiedenen Infektionen ein unterschiedliches Funktionsprofil vorhanden zu sein.

Warum sind nun bei der HIV-Infektion die terminalen CD8 Zellen nach Stimulation eher bereit Interferon γ zu produzieren, als dies bei Hepatitis-infizierten oder gesunden Kindern der Fall ist? Interferon γ begünstigt die Aktivierung von Makrophagen (Dayton, 1985), die vermehrte Herstellung antiviraler Proteine (Guidotti, 1996), die Vermehrung der HLA Klasse I und II -Moleküle an der Zelloberfläche, wie auch eine Vergrößerung des Repertoires der durch die HLA-Klasse I präsentierten Peptide (Schreiber, 2003). Die vermehrte Expansion von HLA wiederum führt zur Aktivierung und Expansion der CD8 Zellen, zum Beispiel durch Interleukin 7 und 15. Für Interleukin 7 sind deutlich erhöhte Spiegel bei HIV-Patienten nachgewiesen (Correa, 2003; Llano, 2001). Interleukin 15 hingegen wird im Vergleich zu Gesunden vermindert nachgewiesen (Ahmad, 2003 und 2005). Beide stellen wichtige Expansionsfaktoren für CD8 Zellen dar (Brugnera, 2000; Diab, 2005; Fry, 2001; Kennedy, 2000; Yu, 2003). Da aktivierte CD8 Zellen, wie gezeigt, bei HIV-infizierten vermehrt $\text{IFN}\gamma$ produzieren, wird die Expansion der terminal differenzierten CD8 Zellpopulation weiter verstärkt (Abbildung 6).

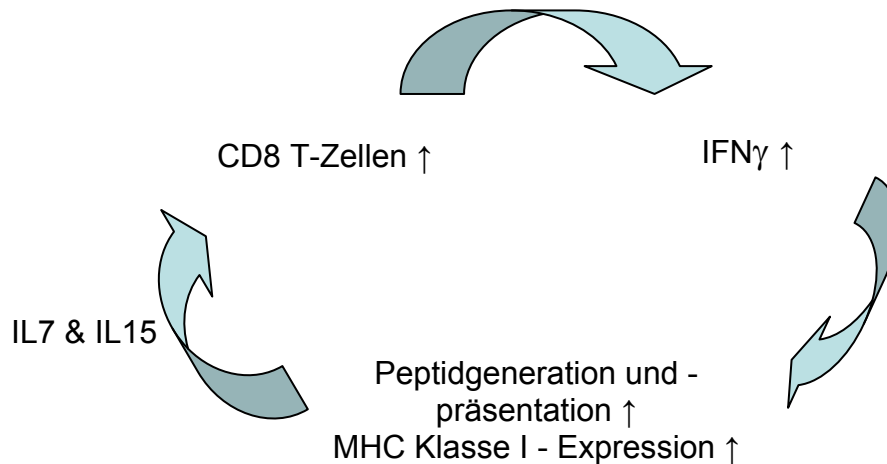


Abbildung 6 - Erklärungsmodell zur CD8 T-Zell-Expansion mit vermehrter Interferon γ – Produktion bei HIV (siehe Text)

4.3 Aussicht und klinische Bedeutung

Um das Versagen der CTLs während des natürlichen Verlaufs der HIV-Infektion zu verstehen, müssen die funktionellen Eigenschaften der Tetramer positiven Zellen besser verstanden werden. Scheinbar handelt es sich vor allem nicht um ein quantitatives, sondern eher qualitatives Problem in der zellulären Immunität gegenüber HIV. Die Funktion der terminal differenzierten CD8 Zellen und ihre Interaktion zwischen Virus und zellulärer Abwehr scheinen hochkomplex. Mit verbesserten Kenntnissen des Zusammenhangs zwischen HIV-spezifischen CD8 Zellen und Krankheitsprogression kann die Detektion tetramerpositiver CD8 Zellen eventuell auch zu Therapiemonitoring- oder Prognosezwecken eingesetzt werden. Bei Vakzinierungsstudien kann diese Methode dann zur Überwachung eines Impferfolges verwendet werden. Detaillierte Kenntnisse zu HIV-spezifischen CD8 Zellen sind von zentraler Bedeutung um den Therapieansatz des autologen Transfers HIV-spezifischer Zellen weiterzuentwickeln. Beim autologen Transfer werden entweder direkt HIV-spezifische CTLs gewonnen oder CD8 Zellen, die in vitro mit HIV-Antigen vorstimuliert werden. Diese werden ex-vivo als HIV-spezifische T-Zellklone expandiert und mit Interleukin 2 stimuliert. Anschließend werden die so ex vivo modifizierten Zellen dem Patienten wieder zurück infundiert.

In bisherigen Pilotstudien wurden verschiedene Variationen und Weiterentwicklungen (z.B. durch Gen-Modifikationen) des Verfahrens angewendet (Brodie, 1999; Deeks, 2002; Dropulic, 2006; Koenig, 1995; Lieberman, 1997; McKinney, 1999; Mitsuyasu, 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern weitere Ansätze zum Verständnis der Expansion von terminal differenzierten CD8 Zellen bei HIV-infizierten Kindern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung der Expansion von CD8⁺CD28⁻ T-Zellen für die antivirale Immunität bei HIV-infizierten Kindern ist unklar. CD8 Zellen lassen sich in naive (CD28⁺CD27⁺), intermediäre (CD28⁻CD27⁺) und terminal ausdifferenzierte Phänotypen (CD28⁻CD27⁻) unterteilen. In dieser Studie wird der Differenzierungsgrad von HIV-spezifischen (gag/pol) CD8 Zellen untersucht (MHC-Tetramermethode). Die Zytokinproduktion (Interleukin 2 und Interferon γ) von CD8 Subpopulationen bei HIV-infizierten Kindern, Kindern mit chronischen Virusinfektionen (Hepatitis B) und gesunden Kindern wird mittels FACS-Analyse nach Stimulation mit Ionophor/PMA intrazellulär ermittelt.

HIV-spezifische CD8 Zellen werden bei 8 von 13 Kindern nachgewiesen und haben einen naiven oder intermediären Differenzierungsgrad. Der Anteil Interferon γ produzierender CD8 Zellen ist bei HIV-infizierten Kindern (n=26) signifikant größer als der von Interferon γ produzierenden CD8 Zellen bei Kindern mit Hepatitis (n=10) oder gesunden Kindern (n=10). Interferon γ wird sowohl von naiven-intermediären als auch von terminal ausdifferenzierten Zellen produziert, dagegen wird Interleukin 2 nicht von terminal ausdifferenzierten CD8 Zellen produziert.

Die terminal ausdifferenzierte, expandierte CD8⁺CD28⁻ Zellpopulation enthält bei Kindern keine HIV-gag/pol-spezifischen T-Zellen, so dass sie für die antivirale Zytotoxizität bei Kindern möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielen. Die Interferon- γ -Produktion von stimulierten CD8 Zellen ist spezifisch für die HIV-Infektion und hat möglicherweise eine immunregulatorische Funktion. Diese Studie liefert weitere Aspekte zum Verständnis der Expansion und Funktion von terminal ausdifferenzierten CD8 Zellen bei HIV-infizierten Kindern.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmad R, Sindhu ST, Toma E, Morisset R, Ahmad A. Studies on the production of IL-15 in HIV-infected/AIDS patients. *J Clin Immunol*. 2003 Mar;23(2):81-90.
- Ahmad A, Ahmad R, Iannello A, Toma E, Morisset R, Sindhu ST. IL-15 and HIV infection: lessons for immunotherapy and vaccination. *Curr HIV Res*. 2005 Jul;3(3):261-70.
- Altfeld M, van Lunzen J, Frahm N, Yu XG, Schneider C, Eldridge RL, Feeney ME, Meyer-Olson D, Stellbrink HJ, Walker BD. Expansion of pre-existing, lymph node-localized CD8+ T cells during supervised treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(6):837-43.
- Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med*. 2000 Jul 3;192(1):63-75.
- Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*. 2002 Apr;8(4):379-85.
- Bailer RT, Holloway A, Sun J, Margolick JB, Martin M, Kostman J, Montaner LJ. IL-13 and IFN-gamma secretion by activated T cells in HIV-1 infection associated with viral suppression and a lack of disease progression. *J Immunol*. 1999 Jun 15;162(12):7534-42.
- Betts MR, Krowka JF, Kepler TB, Davidian M, Christopherson C, Kwok S, Louie L, Eron J, Sheppard H, Frelinger JA. Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte activity is inversely correlated with HIV type 1 viral load in HIV type 1-infected long-term survivors. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 Sep 1;15(13):1219-28.

- Blanche S, Newell ML, Mayaux MJ, Dunn DT, Teglas JP, Rouzioux C, Peckham CS. Morbidity and mortality in European children vertically infected by HIV-1. The French Pediatric HIV Infection Study Group and European Collaborative Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*. 1997 Apr 15;14(5):442-50.
- Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. 1995 Jul;3(1):87-98.
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1994 Sep;68(9):6103-10.
- Brodie SJ, Lewinsohn DA, Patterson BK, Jiyamapa D, Krieger J, Corey L, Greenberg PD, Riddell SR. In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nat Med*. 1999 Jan;5(1):34-41.
- Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Ginter TI, Yamashita Y, Sharrow SO, Singer A. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity*. 2000 Jul;13(1):59-71.
- Buseyne F, Burgard M, Teglas JP, Bui E, Rouzioux C, Mayaux MJ, Blanche S, Riviere Y. Early HIV-specific cytotoxic T lymphocytes and disease progression in children born to HIV-infected mothers. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998 Nov 1;14(16):1435-44.
- Buseyne F, Le Chenadec J, Corre B, Porrot F, Burgard M, Rouzioux C, Blanche S, Mayaux MJ, Riviere Y. Inverse correlation between memory Gag-specific cytotoxic T lymphocytes and viral replication in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis*. 2002a Dec 1;186(11):1589-96
- Buseyne F, Scott-Algara D, Porrot F, Corre B, Bellal N, Burgard M, Rouzioux C, Blanche S, Riviere Y. Frequencies of ex vivo-activated human immunodeficiency virus type 1-specific gamma-interferon-producing CD8+ T cells in infected children correlate positively with plasma viral load. *J Virol*. 2002b Dec;76(24):12414-22.

- Buseyne F, Scott-Algara D, Bellal N, Burgard M, Rouzioux C, Blanche S, Riviere Y. The frequency of HIV-specific interferon- gamma -producing CD8 T cells is associated with both age and level of antigenic stimulation in HIV-1-infected children. *J Infect Dis.* 2005 Nov 15;192(10):1781-6.
- Caggiari L, Zanussi S, Bortolin MT, D'andrea M, Nasti G, Simonelli C, Tirelli U, De Paoli P. Effects of therapy with highly active anti-retroviral therapy (HAART) and IL-2 on CD4+ and CD8+ lymphocyte apoptosis in HIV+ patients. *Clin Exp Immunol.* 2000 Apr;120(1):101-6.
- Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1995 Jan 26;332(4):201-8.
- Chalmers IM, Janossy G, Contreras M, Navarrete C. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood.* 1998 Jul 1;92(1):11-8.
- Cheynier R, Langlade-Demoyen P, Marescot MR, Blanche S, Blondin G, Wain-Hobson S, Griscelli C, Vilmer E, Plata F. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur J Immunol.* 1992 Sep;22(9):2211-7.
- Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:29-60. Review.
- Clerici M, DePalma L, Roilides E, Baker R, Shearer GM. Analysis of T helper and antigen-presenting cell functions in cord blood and peripheral blood leukocytes from healthy children of different ages. *J Clin Invest.* 1993 Jun;91(6):2829-36.
- Correa R, Resino S, Munoz-Fernandez MA. Increased interleukin-7 plasma levels are associated with recovery of CD4+ T cells in HIV-infected children. *J Clin Immunol.* 2003 Sep;23(5):401-6.
- Dahl AM, Klein C, Andres PG, London CA, Lodge MP, Mulligan RC, Abbas AK. Expression of bcl-X(L) restores cell survival, but not proliferation off effector differentiation, in CD28-deficient T lymphocytes. *J Exp Med.* 2000 Jun 19;191(12):2031-8.

- Dayton ET, Matsumoto-Kobayashi M, Perussia B, Trinchieri G. Role of immune interferon in the monocytic differentiation of human promyelocytic cell lines induced by leukocyte conditioned medium. *Blood*. 1985 Sep;66(3):583-94.
- De Paoli P, Bortolin MT, Zanussi S, Monzoni A, Pratesi C, Giacca M. Changes in thymic function in HIV-positive patients treated with highly active antiretroviral therapy and interleukin-2. *Clin Exp Immunol*. 2001 Sep;125(3):440-6.
- Deeks SG, Wagner B, Anton PA, Mitsuyasu RT, Scadden DT, Huang C, Macken C, Richman DD, Christopherson C, June CH, Lazar R, Broad DF, Jalali S, Hege KM. A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Mol Ther*. 2002 Jun;5(6):788-97.
- Diab A, Cohen AD, Alpdogan O, Perales MA. IL-15: targeting CD8+ T cells for immunotherapy. *Cytotherapy*. 2005;7(1):23-35. Review.
- Dickover RE, Garratty EM, Herman SA, Sim MS, Plaeger S, Boyer PJ, Keller M, Deveikis A, Stiehm ER, Bryson YJ. Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission. Effect of maternal zidovudine treatment on viral load. *JAMA*. 1996 Feb 28;275(8):599-605.
- Dropulic B, June CH. Gene-based immunotherapy for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Gene Ther*. 2006 Jun;17(6):577-88.
- Dunn DT, Brandt CD, Krivine A, Cassol SA, Roques P, Borkowsky W, De Rossi A, Denamur E, Ehrnst A, Loveday C. The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. *AIDS*. 1995 Sep;9(9):F7-11. Review.
- Edwards BH, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan MJ, Goepfert PA. Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J Virol*. 2002 Mar;76(5):2298-305.

- Emery S, Capra WB, Cooper DA, Mitsuyasu RT, Kovacs JA, Vig P, Smolskis M, Saravolatz LD, Lane HC, Fyfe GA, Curtin PT. Pooled analysis of 3 randomized, controlled trials of interleukin-2 therapy in adult human immunodeficiency virus type 1 disease. *J Infect Dis.* 2000 Aug;182(2):428-34.
- Feiterna-Sperling C, Maier RF, Grosch-Worner I. Short courses of zidovudine and perinatal transmission of HIV. *N Engl J Med.* 1999 Apr 1;340(13):1041-2
- Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol.* 2001 Oct;22(10):564-71. Review.
- Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, Hengartner H, Zinkernagel R. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med.* 1998 May 4;187(9):1383-93.
- Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK, Kornegay J, Jackson B, Moye J, Hanson C, Zorrilla C, Lew JF. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med.* 1999 Aug 5;341(6):394-402.
- Gea-Banacloche JC, Migueles SA, Martino L, Shupert WL, McNeil AC, Sabbaghian MS, Ehler L, Prussin C, Stevens R, Lambert L, Altman J, Hallahan CW, de Quiros JC, Connors M. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J Immunol.* 2000 Jul 15;165(2):1082-92.
- Gerli R, Bertotto A, Crupi S, Arcangeli C, Marinelli I, Spinozzi F, Cernetti C, Angelella P, Rambotti P. Activation of cord T lymphocytes. I. Evidence for a defective T cell mitogenesis induced through the CD2 molecule. *J Immunol.* 1989 Apr 15;142(8):2583-9.
- Goepfert PA, Bansal A, Edwards BH, Ritter GD Jr, Tellez I, McPherson SA, Sabbaj S, Mulligan MJ. A significant number of human immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma interferon. *J Virol.* 2000 Nov;74(21):10249-55.

- Goulder PJ, Tang Y, Brander C, Betts MR, Altfeld M, Annamalai K, Trocha A, He S, Rosenberg ES, Ogg G, O'Callaghan CA, Kalams SA, McKinney RE Jr, Mayer K, Koup RA, Pelton SI, Burchett SK, McIntosh K, Walker BD. Functionally inert HIV-specific cytotoxic T lymphocytes do not play a major role in chronically infected adults and children. *J Exp Med*. 2000 Dec 18;192(12):1819-32.
- Graziosi C, Pantaleo G, Butini L, Demarest JF, Saag MS, Shaw GM, Fauci AS. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA and RNA synthesis during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 15;90(14):6405-9.
- Greenough TC, Brettler DB, Somasundaran M, Panicali DL, Sullivan JL. Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo. *J Infect Dis*. 1997 Jul;176(1):118-25.
- Grosch-Wörner I, Belohradsky BH, Debatin KM, Enenkel-Stoodt S, Hoger P, Landwehr-Dobberstein C, Wahn V, Wintergerst U. Intermediate results of a multicenter study in long-term management of HIV exposed and infected children *Monatsschr Kinderheilkd*. 1993 Mar;141(3):227-36.
- Grosch-Wörner I, Schafer A, Obladen M, Maier RF, Seel K, Feiterna-Sperling C, Weigel R. An effective and safe protocol involving zidovudine and caesarean section to reduce vertical transmission of HIV-1 infection. *AIDS*. 2000 Dec 22;14(18):2903-11.
- Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol*. 1996 Aug;8(4):478-83. Review.
- Hendriks J, Xiao Y, Borst J. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med*. 2003 Nov 3;198(9):1369-80.
- Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, Blattner WA, Wiesner D, Eyster ME, Goedert JJ. Natural history of HIV-1 cell-free viremia. *JAMA*. 1995 Aug 16;274(7):554-8.

-
- Jennings C, Rich K, Siegel JN, Landay A. A phenotypic study of CD8+ lymphocyte subsets in infants using three-color flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994 Apr;71(1):8-13.
- Jiao Y, Xie J, Li T, Han Y, Qiu Z, Zuo L, Wang A. Correlation between gag-specific CD8 T-cell responses, viral load, and CD4 count in HIV-1 infection is dependent on disease status. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006 Jul;42(3):263-8.
- Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S, Peschon JJ. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med.* 2000 Mar 6;191(5):771-80.
- Kind C, Rudin C, Siegrist CA, Wyler CA, Biedermann K, Lauper U, Irion O, Schupbach J, Nadal D. Prevention of vertical HIV transmission: additive protective effect of elective Cesarean section and zidovudine prophylaxis. Swiss Neonatal HIV Study Group. *AIDS.* 1998 Jan 22;12(2):205-10.
- Koenig S, Conley AJ, Brewah YA, Jones GM, Leath S, Boots LJ, Davey V, Pantaleo G, Demarest JF, Carter C, et al. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat Med.* 1995 Apr;1(4):330-6.
- Kostense S, Ogg GS, Manting EH, Gillespie G, Joling J, Vandenberghe K, Veenhof EZ, van Baarle D, Jurriaans S, Klein MR, Miedema F. High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *Eur J Immunol.* 2001 Mar;31(3):677-86.
- Kostense S, Vandenberghe K, Joling J, Van Baarle D, Nanlohy N, Manting E, Miedema F. Persistent numbers of tetramer+ CD8(+) T cells, but loss of interferon-gamma+ HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood.* 2002 Apr 1;99(7):2505-11.
- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994 Jul;68(7):4650-5.

- Llano A, Barretina J, Gutierrez A, Blanco J, Cabrera C, Clotet B, Este JA. Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J Virol*. 2001 Nov;75(21):10319-25.
- Lewis DE, Tang DS, Adu-Oppong A, Schober W, Rodgers JR. Anergy and apoptosis in CD8+ T cells from HIV-infected persons. *J Immunol*. 1994 Jul 1;153(1):412-20.
- Lichterfeld M, Yu XG, Waring MT, Mui SK, Johnston MN, Cohen D, Addo MM, Zaunders J, Alter G, Pae E, Strick D, Allen TM, Rosenberg ES, Walker BD, Altfeld M. HIV-1-specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8(+) T cells producing both interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):487-94.
- Lieberman J, Skolnik PR, Parkerson GR 3rd, Fabry JA, Landry B, Bethel J, Kagan J. Safety of autologous, ex vivo-expanded human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte infusion in HIV-infected patients. *Blood*. 1997 Sep 15;90(6):2196-206.
- Lieberman J, Shankar P, Manjunath N, Andersson J. Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1667-77.
- Lohman BL, Slyker JA, Richardson BA, Farquhar C, Mabuka JM, Crudder C, Dong T, Obimbo E, Mbori-Ngacha D, Overbaugh J, Rowland-Jones S, John-Stewart G. Longitudinal assessment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon responses during the first year of life in HIV-1-infected infants. *J Virol*. 2005 Jul;79(13):8121-30.
- Lubens RG, Gard SE, Soderberg-Warner M, Stiehm ER. Lectin-dependent T-lymphocyte and natural killer cytotoxic deficiencies in human newborns. *Cell Immunol*. 1982 Nov 15;74(1):40-53.
- Luzuriaga K, Bryson Y, Krogstad P, Robinson J, Stechenberg B, Lamson M, Cort S, Sullivan JL. Combination treatment with zidovudine, didanosine, and nevirapine in infants with human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1997 May 8;336(19):1343-9.

- Mandelbrot L, Le Chenadec J, Berrebi A, Bongain A, Benifla JL, Delfraissy JF, Blanche S, Mayaux MJ. Perinatal HIV-1 transmission: interaction between zidovudine prophylaxis and mode of delivery in the French Perinatal Cohort. *JAMA*. 1998 Jul 1;280(1):55-60.
- Marchetti G, Meroni L, Varchetta S, Terzieva V, Bandera A, Manganaro D, Molteni C, Trabattoni D, Fossati S, Clerici M, Galli M, Moroni M, Franzetti F, Gori A. Low-dose prolonged intermittent interleukin-2 adjuvant therapy: results of a randomized trial among human immunodeficiency virus-positive patients with advanced immune impairment. *J Infect Dis*. 2002 Sep 1;186(5):606-16.
- Marshall DR, Turner SJ, Belz GT, Wingo S, Andreansky S, Sangster MY, Riberdy JM, Liu T, Tan M, Doherty PC. Measuring the diaspora for virus-specific CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 22;98(11):6313-8.
- Mas A, Espanol T, Heredia A, Pedraza MA, Hernandez M, Caragol I, Fernando M, Bertran JM, Alcami J, Soriano V. CCR5 genotype and HIV-1 infection in perinatally-exposed infants. *J Infect*. 1999 Jan;38(1):9-11.
- Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001 Mar 23;291(5512):2413-7.
- McCloskey TW, Haridas V, Pahwa R, Pahwa S. Human immunodeficiency virus gag and pol-specific CD8 T cells in perinatal HIV infection. *Cytometry*. 2001 Oct 15;46(5):265-70.
- McIntosh K, Shevitz A, Zaknun D, Kornegay J, Chatis P, Karthas N, Burchett SK. Age- and time-related changes in extracellular viral load in children vertically infected by human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J*. 1996 Dec;15(12):1087-91.
- McKinney DM, Lewinsohn DA, Riddell SR, Greenberg PD, Mosier DE. The antiviral activity of HIV-specific CD8+ CTL clones is limited by elimination due to encounter with HIV-infected targets. *J Immunol*. 1999 Jul 15;163(2):861-7.
- Migueles SA, Connors M. Frequency and function of HIV-specific CD8(+) T cells. *Immunol Lett*. 2001 Nov 1;79(1-2):141-50.

- Miscia S, Di Baldassarre A, Sabatino G, Bonvini E, Rana RA, Vitale M, Di Valerio V, Manzoli FA. Inefficient phospholipase C activation and reduced Lck expression characterize the signaling defect of umbilical cord T lymphocytes. *J Immunol.* 1999 Sep 1;163(5):2416-24.
- Mitsuyasu RT, Anton PA, Deeks SG, Scadden DT, Connick E, Downs MT, Bakker A, Roberts MR, June CH, Jalali S, Lin AA, Pennathur-Das R, Hege KM. Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood.* 2000 Aug 1;96(3):785-93.
- Mofenson LM. Interaction between timing of perinatal human immunodeficiency virus infection and the design of preventive and therapeutic interventions. *Acta Paediatr Suppl.* 1997a Jun;421:1-9. Review.
- Mofenson LM, Korelitz J, Meyer WA 3rd, Bethel J, Rich K, Pahwa S, Moya J Jr, Nugent R, Read J. The relationship between serum human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA level, CD4 lymphocyte percent, and long-term mortality risk in HIV-1-infected children. National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. *J Infect Dis.* 1997b May;175(5):1029-38.
- Mofenson LM, Lambert JS, Stiehm ER, Bethel J, Meyer WA 3rd, Whitehouse J, Moya J Jr, Reichelderfer P, Harris DR, Fowler MG, Mathieson BJ, Nemo GJ. Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 185 Team. *N Engl J Med.* 1999 Aug 5;341(6):385-93.
- Musey L, Hughes J, Schacker T, Shea T, Corey L, McElrath MJ. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1997 Oct 30;337(18):1267-74.
- Niehues T, Ndagijimana J, Horneff G, Wahn V. CD28 expression in pediatric human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Res.* 1998 Aug;44(2):265-8

- Niehues T, Horneff G, Knipp S, Adams O, Wahn V. Treatment-resistant expansion of CD8+CD28-cells in pediatric HIV infection. *Pediatr Res*. 2000 Mar;47(3):418-21.
- Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol*. 1996 Jul 15;157(2):636-42.
- Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*. 1998 Mar 27;279(5359):2103-6.
- Ogg GS, Kostense S, Klein MR, Jurriaans S, Hamann D, McMichael AJ, Miedema F. Longitudinal phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *J Virol*. 1999 Nov;73(11):9153-60.
- Okkenhaug K, Wu L, Garza KM, La Rose J, Khoo W, Odermatt B, Mak TW, Ohashi PS, Rottapel R. A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):325-32.
- Oxenius A, Yerly S, Ramirez E, Phillips RE, Price DA, Perrin L. Distribution of functional HIV-specific CD8 T lymphocytes between blood and secondary lymphoid organs after 8-18 months of antiretroviral therapy in acutely infected patients. *AIDS*. 2001 Sep 7;15(13):1653-6.
- Pandolfi F, Pierdominici M, Marziali M, Livia Bernardi M, Antonelli G, Galati V, D'Offizi G, Aiuti F. Low-dose IL-2 reduces lymphocyte apoptosis and increases naive CD4 cells in HIV-1 patients treated with HAART. *Clin Immunol*. 2000 Mar;94(3):153-9.
- Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, Bangham CR, Phillips RE. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 4;94(5):1890-5.
- Principi N, Marchisio P, Tornaghi R, Massironi E, Onorato J, Picco P, Libretti C. Occurrence of infections in children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J*. 1991 Mar;10(3):190-3.

- Prussin C. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J Clin Immunol.* 1997 May;17(3):195-204. Review.
- Rich KC, Fowler MG, Mofenson LM, Abboud R, Pitt J, Diaz C, Hanson IC, Cooper E, Mendez H. Maternal and infant factors predicting disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected infants. Women and Infants Transmission Study Group. *Pediatrics.* 2000 Jan;105(1):e8.
- Rinaldo C, Huang XL, Fan ZF, Ding M, Beltz L, Logar A, Panicali D, Mazzara G, Liebmann J, Cottrill M, et al. High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol.* 1995 Sep;69(9):5838-42.
- Rouzioux C, Costagliola D, Burgard M, Blanche S, Mayaux MJ, Griscelli C, Valleron AJ. Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group *Am J Epidemiol.* 1995 Dec 15;142(12):1330-7.
- Rowland-Jones SL, Nixon DF, Aldhous MC, Gotch F, Ariyoshi K, Hallam N, Kroll JS, Froebel K, McMichael A. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet.* 1993 Apr 3;341(8849):860-1.
- Sarol LC, Imai K, Asamitsu K, Tetsuka T, Barzaga NG, Okamoto T. Inhibitory effects of IFN-gamma on HIV-1 replication in latently infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar 8;291(4):890-6.
- Schreiber, G.H. 2003. Interferon γ . *The Cytokine Handbook*, 4th Edition, Elsevier Science Ltd. London: 568-601.
- Scott ZA, Chadwick EG, Gibson LL, Catalina MD, McManus MM, Yogev R, Palumbo P, Sullivan J, Britto P, Gay H, Luzuriaga K and PACTG 345 Investigators. Infrequent detection of HIV-1-specific, but not Cytomegalovirus-specific, CD8+ T cell responses in young HIV-1-infected infants. *J Immunol* 2001 Oct;167:7134-40
- Scott-Algara D, Buseyne F, Blanche S, Rouzioux C, Jouanne C, Romagne F, Riviere Y. Frequency and phenotyping of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD8+

T cells in HIV-infected children, using major histocompatibility complex class I peptide tetramers. *J Infect Dis.* 2001 Jun 1;183(11):1565-73.

Scott-Algara D, Buseyne F, Porrot F, Corre B, Bellal N, Rouzioux C, Blanche S, Riviere Y. Not all tetramer binding CD8+ T cells can produce cytokines and chemokines involved in the effector functions of virus-specific CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infected children. *J Clin Immunol.* 2005 Jan;25(1):57-67.

Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, Lew JF, Mofenson L, Almy S, Rich K, Handelsman E, Diaz C, Pagano M, Smeriglio V, Kalish LA. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med.* 1997 May 8;336(19):1337-42.

Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, Todd JA, Herman SA, McSherry GD, O'Sullivan MJ, Van Dyke RB, Jimenez E, Rouzioux C, Flynn PM, Sullivan JL. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med.* 1996 Nov 28;335(22):1621-9.

Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science.* 1994 Jul 1;265(5168):106-9.

Sun Y, Iglesias E, Samri A, Kamkamidze G, Decoville T, Carcelain G, Autran B. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J Immunol Methods.* 2003 Jan 15;272(1-2):23-34.

The European Collaborative Study. Natural history of vertically acquired human immunodeficiency virus-1 infection. *Pediatrics.* 1994 Dec;94(6 Pt 1):815-9

The Italian register for HIV Infection in Children. Rapid disease progression in HIV-1 perinatally infected children born to mothers receiving zidovudine monotherapy during pregnancy. *AIDS.* 1999 May 28;13(8):927-33.

Tomiyaama H, Takata H, Matsuda T, Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD8+ T Cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative

expression of CD27 and cytotoxic effector function. *Eur J Immunol.* 2004; 34:99-1010

van Baarle D, Kostense S, Hovenkamp E, Ogg G, Nanlohy N, Callan MF, Dukers NH, McMichael AJ, van Oers MH, Miedema F. Lack of Epstein-Barr virus- and HIV-specific CD27- CD8+ T cells is associated with progression to viral disease in HIV-infection. *AIDS.* 2002 Oct 18;16(15):2001-11.

Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science.* 1999 Jan 29;283(5402):680-2.

Wasik TJ, Bratosiewicz J, Wierzbicki A, Whiteman VE, Rutstein RR, Starr SE, Douglas SD, Kaufman D, Sison AV, Polansky M, Lischner HW, Kozbor D. Protective role of beta-chemokines associated with HIV-specific Th responses against perinatal HIV transmission. *J Immunol.* 1999 Apr 1;162(7):4355-64.

Weekes MP, Wills MR, Sissons JG, Carmichael AJ. Large HIV-specific CD8 cytotoxic T-lymphocyte (CTL) clones reduce their overall size but maintain high frequencies of memory CTL following highly active antiretroviral therapy. *Immunology.* 2006 May;118(1):25-38.

Weiser B, Nachman S, Tropper P, Viscosi KH, Grimson R, Baxter G, Fang G, Reyelt C, Hutcheon N, Burger H. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 during pregnancy: relationship of viral titer to mother-to-child transmission and stability of viral load. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Aug 16;91(17):8037-41.

Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest.* 1997 Dec 15;100(12):3173-83.

Whelan JA, Dunbar PR, Price DA, Purbhoo MA, Lechner F, Ogg GS, Griffiths G, Phillips RE, Cerundolo V, Sewell AK. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J Immunol.* 1999 Oct 15;163(8):4342-8.

Yu Q, Erman B, Bhandoola A, Sharrow SO, Singer A. In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells J Exp Med. 2003 Feb 17;197(4):475-87.

Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. J Exp Med. 1998 Dec 21;188(12):2205-13.

ANHANG: CDC-KLASSIFIKATION

Tabelle 14 – Einteilung in immunologische Stadien gemäß überarbeiteter CDC Klassifikation für die HIV Infektion im Kindesalter von 1994 basierend auf den altersentsprechenden CD4 Zellzahlen oder CD4 Prozentzahlen (MMWR 1994; 43 (No. RR-12): 1-10)

CDC-Stadium	< 12 Monate		1-5 Jahre		6-12 Jahre	
	Zellzahl/ μ l	(%)	Zellzahl/ μ l	(%)	Zellzahl/ μ l	(%)
Stadium 1 Keine Immunsuppression	≥ 1500	($\geq 25\%$)	≥ 1000	($\geq 25\%$)	≥ 500	($\geq 25\%$)
Stadium 2 Mäßige Immunsuppression	750-1499	(15%-24%)	500-999	(15%-24%)	200-499	(15%-24%)
Stadium 3 Schwere Immunsuppression	<750	(<15%)	<500	(<15%)	<200	(>15%)

CURRICULUM VITAE

Name	Daniel Delbeck
Geburtsdatum	12. August 1977
Geburtsort	Essen
Familienstand	ledig

Schulbildung

1984 – 1997	Grundschule und bilinguales Gymnasium in Essen
1997 – 1998	Zivildienst: Franz-Sales-Haus in Essen Einrichtungen für Menschen mit geistigen und seelischen Behinderungen

Studium

Oktober 1998 – November 2005	Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
August 2000	Physikum
August 2001	1. Staatsexamen
August 2004	2. Staatsexamen
September 2004 – August 2005	Praktisches Jahr
November 2005	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

1. Terial, Chirurgie	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2. Terial, Innere Medizin	Sunderland Royal Hospital, Großbritannien
3. Terial, Radiologie	TUFTS New England Medical Center, Boston, U.S.A.

Berufliche Tätigkeit

seit Oktober 2006	wissenschaftlicher Assistent, Klinik für Kinderonkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
-------------------	---

Abstracts und Vorträge

„Funktionelle und phänotypische Charakterisierung von CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen bei vertikal HIV-infizierten Kindern.“

21. API-Jahrestagung 2004 in Anif, Österreich

„Funktionelle und phänotypische Charakterisierung von CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen bei HIV-infizierten Kindern und Erwachsenen.“

PAAD-Jahrestagung 2003 in Augsburg

DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Tim Niehues für die Überlassung des Themas, die profunde wissenschaftliche, sowie die persönliche Betreuung und Förderung von Beginn bis zum Abschluss der Arbeit. Mit seiner stets freundlichen Art und seiner Begeisterungsfähigkeit war er mir ein exzellenter Betreuer meiner Dissertation.

Den Herren Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt und seinem Vorgänger Prof. Dr. med. Ulrich Göbel danke ich für die Möglichkeit an der Klinik für Kinderonkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie promovieren zu dürfen und für die Bereitstellung der dazu notwendigen Ressourcen.

Mein großer Dank gilt auch Frau Dr. med. Jennifer Neubert, deren wissenschaftliche Arbeit sowohl die Grundlage für das gewählte Thema bildete als auch Inspiration für dessen Weiterentwicklung gab.

Selbstverständlich danke ich herzlich dem Team des Kinder-Immunlabors im Schlossmannhaus um Herrn Dr. rer. nat. Oliver Feyen für die Einweisung in die experimentelle Methodik und Diagnostik, sowie für viele freundliche Hilfestellungen in Organisation und Durchführung der Untersuchungen. Spezieller Dank gebührt dabei Frau Annette Seibt, Frau Nico Vente und Herrn Sven Bellert.

Schließlich möchte ich auch unseren Kooperationspartnern danken: Herrn Dr. med. Ulrich Baumann in Hannover und Herrn Dr. med. Uwe Wintergerst in München, sowie Herrn Dr. med. Martin Jetzek-Zader in der hiesigen Anästhesie und Herrn Dr. med. Mark Oette in der HIV-Erwachsenen-Ambulanz für die gute Zusammenarbeit in der Probengewinnung.

Meinen Freunden danke ich für Ihren Zuspruch und Ihre Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern Dres. med. Monika und Georg Delbeck, die mich all die Jahre hindurch in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und mir so vieles ermöglichten. Ihnen und meinem Bruder Dr. med. Norman Delbeck, der mir stets ein guter Ratgeber ist, ist diese Arbeit gewidmet.