

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Gegenüberstellung experimenteller versus
computergestützter Bestimmung von
HIV-Epitopen**

sowie

**Untersuchung der polyfunktionellen CD8⁺
T-Zellantworten gegen Y181C- und
M184V-HIV-Mutanten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Franziska Kraut
aus Bad Friedrichshall

2016

**Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Rika Draenert

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Bernd Sporer

Prof. Dr. med. Josef Eberle

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Julia Roider

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Das humane Immundefizienz-Virus.....	2
2.1.1	Virale Eigenschaften und daraus entstehende Therapiemöglichkeiten	2
2.2	Virale Reaktion auf Immunantwort und Therapie	4
2.3	Das HLA-System	5
2.3.1	HLA-Restriktion und optimales Epitop	6
2.4	Epitope prediction	7
2.4.1	Experimentelle Definition des optimalen Epitops.....	7
2.4.2	Epitope prediction Programme.....	7
2.5	Die CD8 ⁺ T-Zellfunktion bei HIV-Infektion	10
2.5.1	Epitop-Erkennung durch CD8 ⁺ T-Zellen	10
2.5.2	Erkennen DRM-tragender Viruspeptide	11
2.5.3	Die Polyfunktionalität der CD8 ⁺ T-Zellen	11
2.5.4	Prinzipien einer therapeutischen Impfung gegen DRM-tragende Viren.....	12
3	Ziele der Arbeit.....	13
3.1	Gegenüberstellung von Epitope prediction Programmen und experimenteller Epitopkartierung	13
3.2	Untersuchung der CD8 ⁺ T-Zellantwort gegen M184V und Y181C HIV-1 Mutanten.....	13
4	Material und Methoden.....	14
4.1	Material	14
4.1.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	14
4.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	15
4.1.3	Medien.....	16
4.1.4	Antikörper	16
4.1.5	Peptide.....	17
4.1.6	Verwendete Viren	17
4.1.8	Lymphoblastoide B-Zelllinien und ihre HLA-Typen.....	18
4.1.9	Software	18
4.2	Methoden.....	19
4.2.1	Patienten.....	19
4.2.2	Probengewinnung.....	20
4.2.3	Zellisolierung und Bestimmung der Lebendzellzahl.....	20
4.2.4	Einfrieren der Zellen	21

4.2.5	Auftauen der Zellen.....	21
4.2.6	IFN- γ Elispot.....	21
4.2.7	Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie.....	23
4.2.8	Bestimmen der HLA-Restriktion	24
4.2.9	Zelllinien	25
4.2.10	Herstellen von HI-Viruskulturen.....	27
4.2.11	Titerbestimmung	27
4.2.12	Infektion von CD4 ⁺ T-Zellen mit HIV.....	28
4.2.13	Core-Färbung HIV-infizierter CD4 ⁺ T-Zellen.....	29
4.2.14	Untersuchung auf Polyfunktionalität.....	29
5	Ergebnisse	31
5.1	Gegenüberstellung von Epitope prediction Programmen und experimenteller Epitopkartierung	31
5.1.1	Abweichende Resultate von Epitope prediction Programmen und experimenteller Epitopkartierung.....	31
5.1.2	Gezieltere Vorhersageergebnisse bei bekannter HLA-Restriktion und häufig vorkommendem HLA-Typ.....	35
5.1.3	Schlechtere Vorhersage von Epitopen ungewöhnlicher Länge.....	37
5.2	Untersuchung der CD8 ⁺ T-Zellantwort gegen M184V und Y181C HIV-1 Mutanten.....	38
5.2.1	Unterschiedliches Erkennen der DRM M184V, Y181C und Y181C+M184V in Peptiden.....	38
5.2.2	Kultivieren und Austitrieren von HI-Viren.....	39
5.2.3	CD4 ⁺ T-Zellinfektion mit HI-Viren	42
5.2.4	Messung der CD8 ⁺ T-Zellantwort gegen HIV-1 Mutanten.....	43
6	Diskussion.....	48
6.1	Gegenüberstellung von Epitope prediction Programmen und experimenteller Epitopkartierung	48
6.2	Untersuchung der CD8 ⁺ T-Zellantwort gegen M184V und Y181C HIV-1 Mutanten.....	51
7	Quellenverzeichnis.....	55
8	Anhang.....	62
8.1	Abkürzungsverzeichnis	62
8.2	Abbildungsverzeichnis	64
8.3	Tabellenverzeichnis.....	65
9	Publikation	66
10	Danksagung.....	67
11	Lebenslauf.....	68

1 Zusammenfassung

Seit ca. 30 Jahren ist das humane Immundefizienz-Virus als Auslöser einer schwerwiegenden Immunschwäche bekannt und trotz zahlreich existierender Medikamente ist die Inzidenz hoch. Ebenso waren sämtliche Bemühungen um die Entwicklung einer Impfung bisher vergeblich.

Zum weiteren Verständnis der zellulären Immunabwehr gegenüber HIV lag der Fokus dieser Arbeit auf der Funktion und Epitoperkennung von CD8⁺ T-Lymphozyten. Um diesen Vorgang genauer untersuchen zu können, bedarf es neben der Bestimmung der HLA-Restriktion auch der Definition des optimalen Epitops. Dieses kann sowohl experimentell als auch bioinformatisch mittels Epitop-Vorhersage-Programmen (sogenannte „in-silico“ Programme) durchgeführt werden. Letztere finden zunehmend Verwendung, wurden bisher jedoch nicht auf die Zuverlässigkeit ihrer Vorhersagen von HIV-Epitopen untersucht.

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass „in-silico“ Programme die experimentelle Epitopkartierung bisher nicht ersetzen können. Zu viele Faktoren beeinflussen die Validität der Ergebnisse und so können Epitop-Vorhersage-Programme die Laborarbeit zwar unterstützen, auf die experimentelle Epitopkartierung kann dennoch nicht verzichtet werden.

Die zweite Fragestellung dieser Arbeit betraf die CD8⁺ T-Zellerkennung von Zellen, welche mit DRM (engl. für *drug resistance mutations*) -tragenden HI-Viren infiziert sind. Vor allem die Medikamentenresistenzmutationen M184V und Y181C sind für die Unwirksamkeit wichtiger und gerade in Entwicklungsländern unverzichtbarer Medikamente verantwortlich. Bei manchen Patienten konnte nachgewiesen werden, dass polyfunktionelle CD8⁺ T-Zellen DRM-tragende Viruspeptide gezielt erkennen können. Um diese Untersuchung auf virusinfizierte Zellen auszuweiten, wurden CD4⁺ T-Zellen mit mutierten Viren infiziert und die CD8⁺ T-Zellreaktion gemessen. Um die Entwicklung einer angestrebten, therapeutischen Impfung voranzutreiben bedarf es einer weiteren Optimierung der Teilversuche sowie deren Anwendung auf ein repräsentatives Patientenkollektiv. Dabei können die hier gewonnenen Erkenntnisse über Viruskultivierung, Titerbestimmung und Zellinfektion als Hilfestellung dienen.

2 Einleitung

35 Millionen Menschen sind aktuell laut UNAIDS weltweit mit HIV-1 infiziert. 2,3 Millionen Neuinfektionen wurden im Jahr 2012 verzeichnet und rund 1,6 Millionen Menschen starben im selben Jahr an den Folgen der Erkrankung [1]. Vor allem die Länder der Sub-Sahara weisen eine hohe Infektionsrate auf, ebenso verschärft sich die HIV-Problematik in Osteuropa und Asien zusehends.

Entdeckt wurde die Krankheit in den frühen 1980er Jahren, als in den USA eine Gruppe junger homosexueller Männer durch das Auftreten seltener und schwerwiegender Erkrankungen wie Pneumocystis-Pneumonien, Kaposi-Sarkome und ausgeprägter Kandidosen der Schleimhäute auffällig wurde. Erstmals wurde daraufhin der englische Begriff *Acquired Immune Deficiency Syndrome*, kurz AIDS, beschrieben [2]. In den darauffolgenden Jahren entdeckten Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier das Humane Immundefizienz-Virus HIV als Auslöser dieses Syndroms.

Trotz intensiver Bemühungen ist die Inzidenz weiterhin hoch. So ist HIV noch immer ein globales Gesundheitsproblem und stellt eine große soziale und ökonomische Herausforderung dar. Neben der Entwicklung eines Impfstoffes stehen auch die Bereiche Aufklärung, Prävention und Akzeptanz im Mittelpunkt des Interesses.

2.1 Das humane Immundefizienz-Virus

2.1.1 Virale Eigenschaften und daraus entstehende Therapiemöglichkeiten

HIV ist ein behülltes Einzelstrang-RNA-Lentivirus und gehört zur Familie der Retroviren. Sein Genom besteht aus 9-10 kB und beinhaltet zum einen die Strukturproteine *gag* (*group antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*), zum anderen die akzessorisch-regulatorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* und *nef* (vgl. Abb. 1).

Zielzellen des Virus sind das Oberflächenmolekül CD4-tragende Zellen und damit vor allem die CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Helferzellen). Nach Bindung an die Zielzelle und Verschmelzung der Membranen wird das virale Kapsid im Zytoplasma aufgelöst, die RNA in DNA umgeschrieben und in das Genom der Wirtszelle eingebaut [3], wofür die virale Reverse Transkriptase und Integrase benötigt werden. Teilt sich nun die Wirtszelle, wird automatisch auch das virale Genom transkribiert und translatiert, die viralen Bestandteile zusammengesetzt und schließlich neue Viren ausgeschleust [4].

Dieser virale Replikationszyklus bietet Ansatzstellen für therapeutische Interventionen und so wurde in den 1990er Jahren eine effektive Kombinationstherapie zur Unterdrückung der Viruslast möglich, die *highly active antiretroviral therapy* (HAART). Ihr stehen Medikamente verschiedener Wirkstoffklassen zur Verfügung (vgl. Abb. 1).

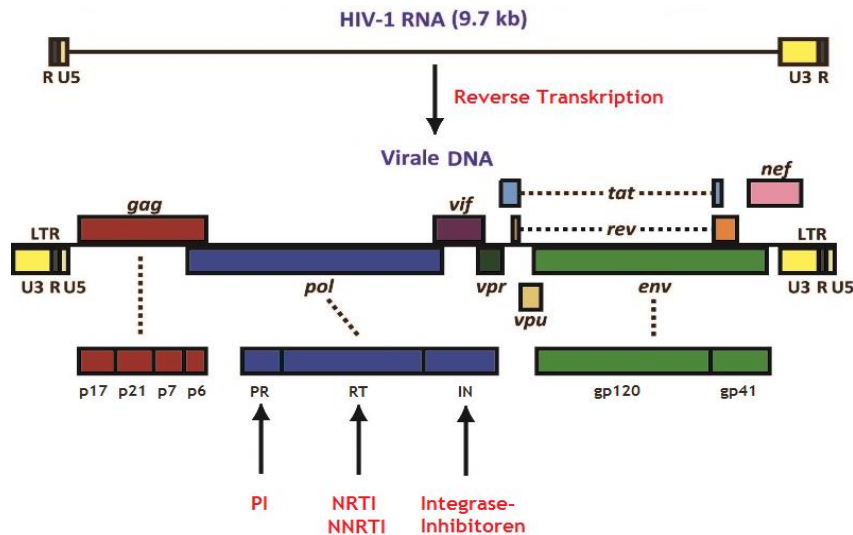


Abbildung 1: Schematische Darstellung des HIV-Genoms (Abb. bearbeitet nach [5]). Der virale Replikationszyklus bietet therapeutische Interventionsmöglichkeiten, wovon hier diejenigen dargestellt sind, die die von pol kodierten Proteine betreffen. PI = Proteaseinhibitoren, NRTI = Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, NNRTI = Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren.

Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)

NRTIs ähneln in ihrer Struktur Nukleosiden und dienen bei der reversen Transkription der viralen RNA zu DNA als falsche Bausteine, welche dann für einen Kettenabbruch sorgen. Aufgrund häufig generierter Medikamentenresistenzmutationen gegen NRTIs ist diese Substanzklasse in der vorgelegten Arbeit von besonderer Bedeutung. Zu den NRTIs gehören die Substanzen Abacavir (ABC), Didanosin (ddi, obsolet), Emtricitabin (FTC), Lamivudin (3TC), Stavudin (d4T, obsolet), Tenofovir (TDF, wobei es sich hier um ein Nukleotidanalogen handelt) und Zidovudin (AZT).

Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)

Auch hier stellt die Reverse Transkriptase das Angriffsziel dar, allerdings binden diese Substanzen direkt an das aktive Zentrum des Enzyms und blockieren damit dessen katalytische Aktivität. Medikamentenresistenzmutationen gegen NNRTIs sind häufig. Die vier vorhandenen Medikamente sind Efavirenz (EFV), Etravirin (ETV), Nevirapin (NVP) und Rilpivirin (RPV).

NNRTIs sind genau wie NRTIs fester Bestandteil in first-line-Regimen, da sie nebenwirkungsarm und zudem kostengünstig sind, was sie vor allem in Entwicklungsländern unentbehrlich macht [6].

Weitere Wirkstoffe mit mehreren Vertretern sind Proteaseinhibitoren (PI), Fusionsinhibitoren, CCR5-Inhibitoren sowie Integrase-Inhibitoren.

Da HI-Viren den Medikamenten durch Mutationen zu entkommen versuchen, werden in der antiretroviralen Therapie mindestens drei Wirkstoffe aus zwei unterschiedlichen Substanzklassen kombiniert. Dadurch wird das Auftreten von Medikamentenresistenzmutationen verhindert bzw. längstmöglich hinausgezögert.

2.2 Virale Reaktion auf Immunantwort und Therapie

Bei HIV handelt es sich um hochvariable Viren. Mit sog. Escape-Mutationen versuchen sie, dem Druck der Immunantwort durch CD8⁺ T-Zellen zu entkommen [7-10]. Neben diesen Flucht-Mutationen generieren die HI-Viren auch Medikamentenresistenzmutationen, womit sie der Kontrolle antiretroviraler Pharmaka entgehen. Zugrunde liegt diesen Mutationen u.a. die hohe Fehleranfälligkeit der Reversen Transkriptase, die das Umschreiben der viralen RNA in DNA katalysiert [11]. Dadurch trägt eine infizierte Person eine enorme Menge sog. Quasispezies in sich, also Viren, die sich durch Punktmutationen voneinander unterscheiden [12, 13]. Dies erfordert häufig eine Umstellung der Therapie, welche unter Umständen teurer und mit stärkeren Nebenwirkungen behaftet ist.

Erwähnenswert sind hier die beiden NRTIs Lamivudin und Emtricitabin, die laut WHO-Richtlinien in weltweit über 90% aller Therapieregime der HAART enthalten sind [6]. Um ihnen zu entgehen wird durch Mutation die Aminosäure Methionin an Position 184 des viralen Genoms durch Valin ersetzt (M184V). Das Virus kann dann zwischen Cytidin und den Cytidin-Analoga unterscheiden und den Einbau der Medikamente verhindern, was letztendlich eine >100-fache Resistenz gegenüber Lamivudin/Emtricitabin bewirkt [14, 15].

Eine vergleichbare Mutation stellt die an Position 181 dar, welche Tyrosin durch Cystein ersetzt (Y181C) und eine Resistenz gegenüber den NNRTIs Nevirapin und Efavirenz, welche häufig in Drittweltländern eingesetzt werden, sowie eine Teilresistenz gegenüber Rilpivirin bewirkt.

Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die zwei beschriebenen Medikamentenresistenzmutationen gelegt. Die M184V-Mutation ist die mit am häufigsten auftretende DRM des HI-Virus und spielt eine Schlüsselrolle beim Versagen der antiretroviralen Therapie. Ihr Auftreten konnte in virusinfizierten Zellen nachgewiesen werden und ihre Kontrolle wäre ein Meilenstein auf dem Weg zum Verhindern eines Therapieversagens, wie Arbeiten unserer Forschungsgruppe nachweisen konnten [16]. Die Y181C-Mutation tritt zwar seltener auf, ist jedoch nicht minder von Bedeutung [17, 18], bedenkt man die herausragende Rolle der beiden Therapeutika Nevirapin und Efavirenz. Da beide Mutationen zum einen benachbart liegen, zum anderen häufig in Kombination auftreten [19, 20], wäre es optimal, das Auftreten beider Mutationen mit demselben Verfahren verhindern zu können. Dies könnte mit der Entwicklung einer therapeutischen Impfung verwirklicht werden (siehe Abschnitt 2.5.4).

2.3 Das HLA-System

Die humane Version des MHC Systems (engl. für *major histocompatibility complex*) ist das sogenannte *human leukocyte antigen system*, kurz HLA, und ist mit über 40 Genen auf Chromosom 6 repräsentiert. Dabei existieren zwei in Funktion und Aufbau unterschiedliche Klassen, HLA I und II. Alle kernhaltigen menschlichen Körperzellen tragen HLA I-Moleküle auf ihrer Oberfläche, während HLA II-Gene nur von Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Thymus-Epithelzellen, sowie B- und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert werden. Die Aufgabe beider HLA-Klassen ist es, prozessierte Bruchstücke von Pathogenen an der Zelloberfläche zu binden und T-Zellen zu präsentieren, um dadurch das adaptive Immunsystem zu aktivieren [21].

Bei einer HIV-Infektion werden $CD4^+$ T-Lymphozyten infiziert und parallel zur Synthese neuer Viren virale Proteine im Proteasom prozessiert, auf HLA I-Moleküle geladen und an der Oberfläche der T-Zelle präsentiert. Dort wird der HLA-Peptid-Komplex von $CD8^+$ T-Zellen über deren T-Zellrezeptor erkannt und die Zelle anschließend zerstört. Dies ist ein Grund für die abnehmende Zahl an $CD4^+$ T-Helferzellen, das Immunsystem wird zunehmend geschwächt und ohne Therapie tritt letztendlich das erworbene Immundefektsyndrom AIDS auf.

2.3.1 HLA-Restriktion und optimales Epitop

Im Falle von HLA I, das zur Präsentation von Viruspartikeln unverzichtbar ist, existieren rund 20 verschiedene Gene, welche die drei Untergruppen HLA-A, B und C bestimmen. Diese Gene werden kodominant vererbt, sodass jede kernhaltige Zelle zwei HLA-A, HLA-B und HLA-C Merkmale trägt. Von diesen drei Klassen gibt es zahlreiche allelische Unterformen, welche durchnummeriert z.B. als HLA-A2 bezeichnet werden. In dieser Arbeit ist vor allem HLA-A*02:01 von Bedeutung. Es restringiert wichtige HIV-Epitope und ist ein häufiges Allel des A2-Supertyps. So tragen 23% der kaukasischen, 25% der afroamerikanischen und 26% der lateinamerikanischen Bevölkerung Allele des HLA-A2 Supertyps [22].

Die an der Oberfläche zu präsentierenden Peptide sind bei HLA I zwischen 7-11 Aminosäuren lang und werden immer von einem bestimmten HLA-Allel präsentiert. Dieses Phänomen wird als HLA-Restriktion bezeichnet. Daraus folgt, dass eine von HIV infizierte Zelle nur eine bestimmte Anzahl an HIV-Epitopen an CD8⁺ T-Zellen präsentieren kann. Ist die infizierte Person für HLA I heterozygot, kann eine größere Anzahl an viralen Peptiden präsentiert und folglich eine breitere Immunantwort ausgelöst werden [21, 23].

Betrachtet man die dreidimensionale Struktur des HLA I-Moleküls, so weist es an seiner Peptid-Bindungsstelle sechs Taschen auf durch die festgelegt wird, welches Epitop gebunden wird. Im Falle von HLA-A*02:01, das bevorzugt 8-10mer lange Epitope präsentiert, spielen die Aminosäuren an Position 2 sowie an der letzten Position vor dem C-Terminus (z.B. Position 9 eines 9mer langen Epitops) eine besondere Rolle (vgl. Abb. 2).

Ebenso müssen die anderen, nicht als Ankerpositionen bezeichneten Stellen des Epitops erwähnt werden, da die chemischen Eigenschaften der dort ansässigen Aminosäuren ebenfalls (wenn auch schwächeren) Einfluss auf die Bindungsstärke des Epitops an das HLA-Molekül [24, 25], aber auch auf die Bindung an den T-Zellrezeptor haben (siehe unten). All dieses Wissen machte man sich beim Generieren der Epitop-Vorhersage-Programme zunutze.

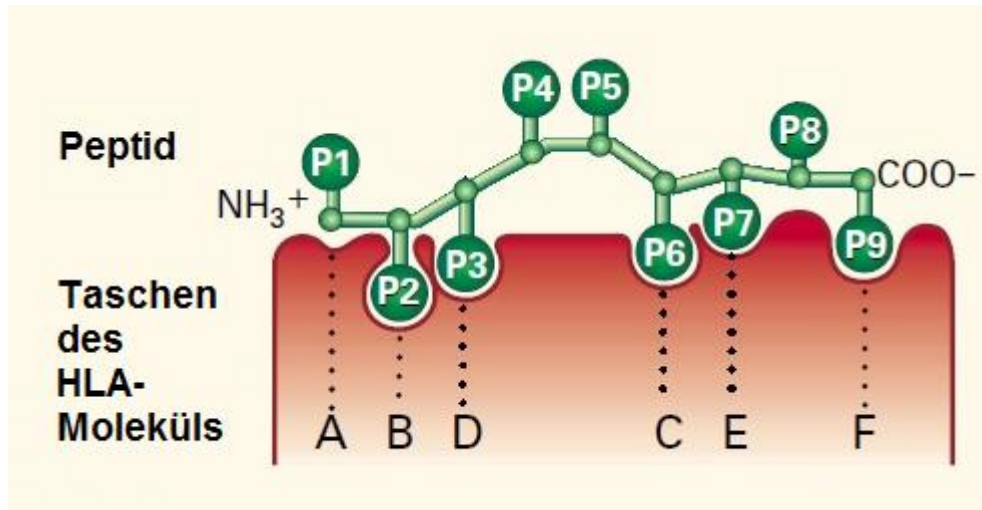


Abbildung 2: **Bindungsstelle von Peptid und HLA-Molekül** (Abb. bearbeitet nach [21]). Dargestellt ist ein 9mer langes Epitop, dessen Aminosäuren in den Bindungstaschen des HLA-Moleküls zu liegen kommen. Besondere Bedeutung kommt hierbei den Bausteinen der Positionen P2 und P9 zu, die das Peptid in den Bindungstaschen B und F verankern.

2.4 Epitope prediction

2.4.1 Experimentelle Definition des optimalen Epitops

Um Länge und Sequenz des optimalen Epitops zu bestimmen, muss eine experimentelle Epitopkartierung durchgeführt werden (siehe Abschnitt 4.2.6). Hierbei wird die T-Zellantwort auf einen bestimmten Ausschnitt des HIV-Genoms gemessen, wobei durch Hinzufügen oder Kürzen um einzelne Aminosäuren unterschiedlich lange Peptide entstehen. Zwar enthalten sie alle die Zielsequenz, durch Änderung der Aminosäuren in der Ankerposition und der gesamten Länge des Epitops werden jedoch nicht alle mit gleich hoher Affinität von den CD8⁺ T-Zellen gebunden, was anhand einer Messung der Zytokinproduktion eruiert werden kann. Durch Auffinden der stärksten T-Zellantwort kann also die Sequenz dieses experimentell definierten, optimalen Epitops ermittelt werden.

2.4.2 Epitope prediction Programme

Da die experimentelle Kartierung des optimalen Epitops ein zeitaufwendiges und teures Verfahren darstellt, wurden bioinformatische Modelle generiert, die diesem Problem Abhilfe verschaffen sollten.

So wurden in den letzten 30 Jahren zahlreiche online Datenbanken entwickelt, die anfangs nur anhand der Ankerpositionen bekannter Epitope vorhersagen sollten, ob in einem

pathogenen Protein mögliche T-Zellepitope enthalten sind und wie deren Primärstruktur aussieht. Mittlerweile wurden diese Datenbanken durch verschiedenste Methoden verfeinert, was es den Programmen ermöglicht, präzisere Angaben auch zur Bindungsaffinität zwischen Epitop und HLA-Molekül zu machen [26, 27].

Im Folgenden werden drei Datenbanken vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen:

SYFPEITHI

Wir wählten SYFPEITHI, da es sich bei der 1995 veröffentlichten Datenbank um das älteste Epitope prediction Programm handelt [28-30].

Die gesammelten Daten basieren auf Veröffentlichungen und sind mit den wissenschaftlichen Datenbanken EMBL und PubMed verlinkt. Durch SYFPEITHI ist es also möglich, nach MHC-Allelen und Motiven, natürlichen Liganden und T-Zellepitopen zu suchen [31]. Die Datenbank enthält nicht nur Proteine humaner Herkunft, sondern auch solche von Affen, Rindern, Hühnern und Mäusen. Dabei werden bei der Analyse von Peptiden nicht nur die Aminosäuren der Ankerpositionen berücksichtigt, sondern auch die Eigenschaften jeder einzelnen enthaltenen Aminosäure fließen mit in die Kalkulation ein. Ein Nachteil besteht darin, dass bei der Recherche zwar gezielt HLA-Merkmale als restringierend ausgewählt werden können, dabei stehen jedoch nicht alle existierenden HLA-Allele zur Verfügung. Demzufolge werden Epitope häufig auftretender HLA-Allele besser vorhergesagt als solche seltenerer HLA-Typen. Die Ergebnisse werden nach Rängen geordnet, wobei eine hohe Bindungsaffinität mit einem hohen Rang assoziiert ist.

CTLPred

Die Idee dieser Datenbank besteht darin, verschiedene Algorithmen miteinander zu verbinden, um dadurch ein genaueres Ergebnis zu erzielen. Sie bedient sich dabei einer quantitativen Matrix sowie den Lernprogrammen ANN (engl. für *Artificial Neural Network*) und SVM (engl. für *Support Vector Machine*). Das Prinzip der quantitativen Matrix bezieht die Eigenschaften jeder Aminosäuren mit in die Berechnung ein und gleicht damit der Funktionsweise des Programms SYFPEITHI. Außerdem ermöglicht dieses Vorgehen, die HLA-Restriktion eines Epitops zu ermitteln [32].

Das künstliche neuronale Netz (ANN) ist ein Computermodell der Informationsverarbeitung, das die vielen Einflussfaktoren der einkommenden Informationen (hier eine spezielle Peptidsequenz) aufnimmt, analysiert und verknüpft

und daraus die MHC Bindungsaffinität ermittelt [33]. Dafür durchläuft das Modell eine Trainingsphase und lernt ständig dazu, um Vorhersagen hoher Spezifität und Sensitivität liefern zu können [34].

Eine Support Vector Machine teilt Informationen bestimmten Klassen zu, die vorher anhand bekannter Trainingsdaten konstruiert wurden [35]. Ziel ist es, die Klassen „T-Zellepitop“ und „kein T-Zellepitop“ mit möglichst großem Abstand voneinander zu trennen, um ein Peptid eindeutig einer der beiden Gruppen zuordnen zu können [32]. Bei der Rangordnung der Ergebnisse ist eine hohe Bindungsaffinität daher mit einer hohen Fraktion assoziiert. Es sind vor allem die Möglichkeiten der Konsensermittlung sowie der kombinierten Suche mit ANN und SVM, welche Ergebnisse mit hoher Sensitivität und Spezifität liefern, wie Bhasin et al. zeigen konnten [36]. Limitiert wird die Suche allerdings dadurch, dass nur Nonamere als Epitope bestimmt werden. Außerdem kann bezüglich der restringierenden HLA-Moleküle keine Vorauswahl getroffen werden, um das Ergebnis zu spezifizieren.

Wir wählten diese Datenbank, da sie ein neueres und weniger bekanntes Programm darstellt und auf unterschiedlichen Lernalgorithmen basiert. Im Februar 2013 veröffentlichten Abidi et al. eine Studie, in der unter anderem mit CTLPred gearbeitet wurde, um mutierte HIV-Peptidsequenzen zu analysieren [37]. Dieses Programm stellt also eine Alternative zu SYFPEITHI bei der Bestimmung HIV-Epitope dar.

IEDB

Eine recht junge Datenbank ist die 2005 gegründete Immune Epitope Database and Analysis Resource. Enthalten ist ein großes Register an Antikörpern und T-Zellepitopen, das von den vielen, bereits zuvor existierenden Datenbanken zusammengetragen wurde. Dabei liefert die Suche nach einem bestimmten Epitop auch Informationen über den ursprünglichen Versuchsablauf, über die Zytokinproduktion bei Zellstimulation sowie mögliche Applikationswege einer potenziellen Impfung. Sowohl intrinsische als auch extrinsische Einflussfaktoren werden hierbei berücksichtigt [38]. Die Datenbank umfasst mehr als 180 000 Einträge über Epitope und rund 200 000 über T-Zellantworten und bezieht sich dabei auf Menschen, nichtmenschliche Primaten, Nagetiere und andere.

Als Analysemethoden für die Voraussage der MHC-I Bindung stehen verschiedene maschinelle Lernprogramme zur Verfügung [39]. Das ANN wurde bereits beschrieben, weitere Modelle sind SMM (engl. für *Stabilized Matrix Method*), SMMPMBEC (engl. für *SMM with a Peptide:MHC Binding Energy Covariance matrix*), Comblib (engl. für *Scoring Matrices derived from Combinatorial Peptide Libraries*) und NetMHCpan.

Weitere Informationen zu den einzelnen Programmen liefert die IEDB-Webseite <http://tools.immuneepitope.org/mhci/help/#Method>.

Bezüglich der Suchkriterien bietet IEDB variable Einstellungsmöglichkeiten. So kann die Analyse auf ein spezielles HLA-Allel bezogen werden. Ebenso können Epitope beliebiger oder festgesetzter Länge ermittelt werden. Dabei werden bei der Darstellung der Ergebnisse die Epitope an unterster Rangstufe angesiedelt, die die höchste Bindungsaffinität zum angegebenen HLA-Molekül aufweisen. Wir wählten IEDB als drittes Epitope prediction Programm, um eine möglichst repräsentative Auswahl an Programmen zu treffen. Das vergleichsweise junge bioinformatische Tool vereint dabei die Inhalte vieler Datenbanken und stellt eine große Menge an Informationen zu Verfügung [40].

2.5 Die CD8⁺ T-Zellfunktion bei HIV-Infektion

2.5.1 Epitop-Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen

Schon früh nach der Entdeckung von HIV wurde die Schlüsselrolle der CD8⁺ T-Zellen (auch zytotoxische T-Lymphozyten, kurz: CTL) erkannt, welche das Wachstum HIV-infizierter Zellen hemmen [41] und zum initialen Rückgang der Viruslast nach HIV-Infektion führen [42]. CD8⁺ T-Zellen treffen im Körper ständig infizierte Zellen, welche pathogene Partikel präsentieren. Dabei ist ihr T-Zellrezeptor (TCR) entscheidend an der Erkennung des HLA-Peptid-Komplexes beteiligt, wobei ein TCR nur ein bestimmtes Antigen erkennen kann. CD8⁺ T-Zellen mit hoher Spezifität für das entsprechende Antigen erkennen HLA-Peptid-Komplexe auch dann, wenn diese nur in kleinen Mengen auf der Oberfläche infizierter Zellen vorhanden sind und können auch bei geringer Antigen-Präsentation ihre Effektorfunktionen ausüben. Dabei gilt auch, dass die CD8⁺ T-Zellen umso mehr Funktionen aufweisen, je besser sie den HLA-Antigen-Komplex erkennen [43].

Präsentiert eine HIV-infizierte Zelle ein wie oben beschrieben prozessiertes HIV-Epitop und erkennt eine virusspezifische CD8⁺ T-Zelle diesen HLA-Peptid-Komplex mit ihrem T-Zellrezeptor, kann sie die Zelle entweder über lösliche Faktoren abtöten [44] oder ihre Apoptose initiieren.

2.5.2 Erkennen DRM-tragender Viruspeptide

Bezüglich medikamentenresistenter Viren wurde festgestellt, dass die CD8⁺ T-Zellen mancher Patienten gezielt DRM-tragende Virusepitope erkennen. Medikamentenresistenzmutationen treten in Abwesenheit einer antiretroviralen Therapie normalerweise nicht auf [45-47]. Der Selektionsdruck, der durch die medikamentöse Therapie ausgeübt wird, induziert demzufolge die Synthese naiver CD8⁺ T-Zellen [48], welche auf das Erkennen mutierter HI-Viren spezialisiert sind und diese sogar besser erkennen als das ehemalige Wildtyp-Virus. Diese Erkenntnis konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ebenfalls bestätigt werden [16].

2.5.3 Die Polyfunktionalität der CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ T-Zellen besitzen Granula, welche Perforin, Granzyme und Proteoglykane beinhalten und zur Bekämpfung der Zielzelle dienen. Bei Aktivierung schütten die CD8⁺ T-Zellen ihre Granula mittels Exozytose aus. Dabei kommen spezielle Glykoproteine auf der Zelloberfläche zu liegen [49]. Ein Beispiel ist CD107a, ein Marker für die Degranulation von lytischen Granula der CD8⁺ T-Zellen [50], welches mittels ICS (engl. für *intracellular cytokine staining*, s.u.) angefärbt werden kann.

Außerdem wurde die Bedeutsamkeit sog. polyfunktioneller CD8⁺ T-Zellen festgestellt, welche mehrere Zellfunktionen gleichzeitig ausüben und mehr als das Zehnfache an Zytokinen produzieren, als es monofunktionelle Zellen tun [51]. Dabei ist es vielmehr die Qualität anstatt der Quantität, die eine effektive T-Zellantwort ausmacht und die Kontrolle der Viruslast beeinflusst [52]. So sezernieren die CD8⁺ T-Zellen neben den zytotoxischen Granula auch verschiedene Zytokine und Chemokine. Interferon- γ (IFN- γ) z.B. wird allgemein als Marker antigenspezifischer T-Zellaktivität herangezogen und zeichnet sich vor allem durch seine antivirale Wirkung aus. Weitere von CD8⁺ T-Zellen gebildete Zytokine sind Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowie Interleukin-2 (IL-2) [53].

Mittels Fluoreszenzfärbung kann die Bildung von CD107a, IFN- γ , TNF- α und IL-2 gleichzeitig gemessen und dargestellt werden, um das volle Ausmaß der HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort zu ermitteln. Diese Analyse belegte bei verschiedenen HIV-Patienten, dass die Menge der polyfunktionellen T-Zellen in inverser Korrelation zur Viruslast steht [51, 54].

2.5.4 Prinzipien einer therapeutischen Impfung gegen DRM-tragende Viren

Bezüglich DRM-tragender Viren wäre eine Vakzine denkbar, die CD8⁺ T-Zellantworten induziert, die speziell Viren mit DRM erkennen. Wenn dann Medikamentenresistenzmutationen auftreten, sorgen die CD8⁺ T-Zellantworten für eine fortdauernde Kontrolle der Virämie. So kann einerseits die medikamentöse Therapie Druck auf die Wildtyp-Viren ausüben, welchem sie durch Bilden von Medikamentenresistenzmutationen zu entgehen versuchen würden. Andererseits würden die durch die Impfung induzierten, DRM-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten Druck auf die DRM-tragenden Viren ausüben und Richtung Wildtyp-Virus drängen. Dies ist die grundsätzliche Idee für den zweiten Teil des hier vorgestellten Projekts.

3 Ziele der Arbeit

3.1 Gegenüberstellung von Epitope prediction Programmen und experimenteller Epitopkartierung

Die Identifizierung relevanter CD8⁺ T-Zellepitope ist nicht nur entscheidend, um die Funktion des Immunsystems zu verstehen, sondern auch ein grundlegender Schritt bei der Entwicklung T-Zell-basierter Impfstoffe.

Da die experimentelle Epitopkartierung jedoch ein kompliziertes, zeitaufwendiges und teures Verfahren darstellt, wurden zahlreiche computergestützte Epitope prediction Programme entwickelt, die mögliche T-Zellepitope in einer Aminosäuresequenz von Interesse ermitteln sollen. Um einen Eindruck über die Vorhersagegenauigkeit dieser Programme zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Arbeit neun HIV-Epitope experimentell bestimmt und mit der Vorhersage von drei Epitop-prediction-Programmen verglichen.

3.2 Untersuchung der CD8⁺ T-Zellantwort gegen M184V und Y181C HIV-1 Mutanten

Die Fähigkeit des extrem variablen HI-Virus, sowohl Immunsystem als auch medikamentöser Therapie durch Mutationen zu entkommen, ist ein entscheidender limitierender Faktor bei der Kontrolle dieser Infektionskrankheit. Im Hinblick auf die Entwicklung einer T-Zell-basierten, therapeutischen Impfung ist es deswegen von großem Interesse, das Erkennen medikamentenresistenter HI-Viren durch CD8⁺ T-Zellen näher zu untersuchen.

Studien konnten zeigen, dass einige Patienten CD8⁺ T-Zellantworten gegen virale Peptide aufweisen, die Medikamentenresistenzmutationen beinhalten [16, 45, 55, 56]. Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der Reaktionen auf die Mutationen M184V und Y181C, einzeln und in Kombination. Da sich die bisherige Kenntnis nur auf Peptide bezog, wurde mit Vollviren gearbeitet und die polyfunktionelle CD8⁺ T-Zellantwort verschiedener, HIV-positiver Individuen untersucht und mittels Durchflusszytometrie gemessen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer, FACSCanto II	Eppendorf AG, Hamburg
EDTA Monovette, KE/ 9ml	Sarstedt, Nümbrecht
Elispot-Reader, ELR04	AID, Strassberg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Freezing Container Mr. Frosty	Nalgene, Wiesbaden
Heizwasserbad, Modell 1083	GFL, Burgwedel
Inkubationsschrank, Heracell®	Heraeus, Hanau
Kova-Objektträger	Hycor Biomedical, Kassel
Mikroskop Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Multiscreen IP – 96 Well Elispotplatte	Millipore, Schwalbach
Nunc Kryo-Röhrchen 1,8 ml	Thermo Scientific, Langenselbold
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilwerkbank, Model Gelaire BSB 4A	Gruppo Flow s.p.a. OPERA, Italy
Sterilwerkbank, Model Labgard 437 Class II, Type A2	NuAire Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA
Serologische Einmalpipette, 5 und 10 ml	TTP, Ibbenbüren
Vortexgerät, Vortex-Genie® 2	IKA® Werke, Staufen
Zellkulturflasche, Filter, 25 und 75 cm ²	TPP, Ibbenbüren
Zellkulturplatte, 6- und 24-Loch	PAA, Cölbe

Zellzählsystem, CASY®1 Model TT	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge, Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Rotanta 460R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Zentrifuge, Sorvall Super T21	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifugenröhrchen	TPP, Ibbenbüren

4.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Biocoll (Ficoll®)	Biochrom; Berlin
Brefeldin A	Sigma Aldrich; Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA; Darmstadt
Dulbecco's PBS (1x)	PAA; Cölbe
FCS (fetal calf serum) Gold	PAA; Cölbe
Fixation Medium – Medium A	Invitrogen; Karlsruhe
Hank's BSS (1x)	PAA; Cölbe
HEPES Buffer Solution (1M)	PAA; Cölbe
Interleukin-2 (IL-2)	Immuno Tools, Friesoythe
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA; Cölbe
Monensin (BD Golgi Stop™)	Becton Dickinson; Heidelberg
PHA (Phytohaemagglutinin)	Sigma Aldrich; Taufkirchen
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA; Cölbe
Permeabilization Medium – Medium B	Invitrogen; Karlsruhe
RPMI1640, ohne L-Glutamin	PAA; Cölbe
Tween-Lösung	Sigma Aldrich; Taufkirchen

4.1.3 Medien

Hanks:

Hank's Grundmedium ohne Glutamin (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)) wurde supplementiert mit 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 5 ml HEPES Puffer.

R10:

RPMI1640 Grundmedium ohne Glutamin wurde supplementiert mit 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml HEPES Puffer und 50 ml FCS (1 Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert).

R20:

RPMI1640 Grundmedium ohne Glutamin wurde supplementiert mit 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml HEPES Puffer, und 100 ml FCS (1 Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert).

R10/IL-2:

RPMI1640 Grundmedium ohne Glutamin wurde supplementiert mit 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml HEPES Puffer und 50 ml FCS (1 Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert) und 1:1000 mit 20 mg/ml IL-2.

4.1.4 Antikörper

Antikörper	Markierung	Spezies	Hersteller
CD3/CD8	-	Mouse	J. Wong, MGH, Boston, USA
CD4	APC	Mouse	BioLegend, San Diego, USA
CD8	Pacific blue	Mouse	BioLegend, San Diego, USA
CD8	PerCP	Mouse	BioLegend, San Diego, USA
CD107a	FITC	Mouse	BD, Heidelberg
hIFN- γ mAb1-D1K	-	Mouse	Mabtech, Hamburg
hIFN- γ mAb7-B6-Biotin	-	Mouse	Mabtech, Hamburg
IFN- γ	APC	Mouse	BioLegend, San Diego, USA
IFN- γ	FITC	Mouse	BD, Heidelberg
IL-2	Pe	Mouse	BD, Heidelberg
KC57	FITC	Mouse	Beckman Coulter, Krefeld
TNF- α	Pe/Cy7	Mouse	BD, Heidelberg

4.1.5 Peptide

Peptid	Sequenz	Position
IV12-M184V	IVIYQYVDDLYV	RT 178-189
VY10-M184V	VIYQYVDDLY	RT 179-188
VV11	VIYQYMDDLYV	RT 179-189
VV11-M184V	VIYQYVDDLYV	RT 179-189
VG12-M184V	VIYQYVDDLYVG	RT 179-190
IV10-M184V	IYQYVDDLYV	RT 180-189
YY8-M184V	YQYVDDLY	RT 181-188
YV9	YQYMDDLYV	RT 181-189
YV9-M184V	YQYVDDLYV	RT 181-189
CV9-Y181C	CQYMDDLYV	RT 181-189
CV9-Y181C, M184V	CQYVDDLYV	RT 181-189
YG10-M184V	YQYVDDLYVG	RT 181-190
QV8-M184V	QYVDDLYV	RT 182-189

Verwendet wurden Peptide der Konsensussequenz des HIV-1 Subtyps B von 2001 [57] bzw. solche mit darin enthaltenen Mutationen. Alle Peptide wiesen eine Reinheit von >70% auf.

4.1.6 Verwendete Viren

Virus	Eigenschaften	Bezugsquelle
EBV	B-95 EBV-produzierende B-Zelllinie	Prof. Wildner, Augenklinik, Klinikum Innenstadt, LMU
NL4-3, WT	HIV-1 Gruppe M Subtyp B, Wildtyp	Dr. Schneidewind, Medizinische Klinik und Poliklinik I, UKB
NL4-3, M184V	HIV-1 Gruppe M Subtyp B, M184V-Mutation	Dr. Schneidewind, Medizinische Klinik und Poliklinik I, UKB
NL4-3, Y181C	HIV-1 Gruppe M Subtyp B, Y181C-Mutation	Dr. Schneidewind, Medizinische Klinik und Poliklinik I, UKB
NL4-3, Y181C + M184V	HIV-1 Gruppe M Subtyp B, Y181C- + M184V-Mutation	Dr. Schneidewind, Medizinische Klinik und Poliklinik I, UKB

4.1.8 Lymphoblastoide B-Zelllinien und ihre HLA-Typen

Zelllinie	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
AC 04	0201	2402	4102	5101	0702	1703
ALR	24	31	14	57	07	08
AN	0201	0202	3501	4901	0401	0701
BL 30	0101	1101	0801	3901	0202	0701
BN	0101	1101	0801	5501	0303	0701
BS	0301	2402	0702	1501	0102	0702
CR0050z	0202	29	07	49	07	-
CR0059t	03	25	42	57	03	-
DJS	0201	0301	35	37	0401	0601
DP	0201	2402	1501	4402	0303	0501
GK	0201	3002	0702	1801	05	0702
GS	02	30	44	57	05	18
JBB	01	03	07	57	05	07
JW	23	68	35	44	04	-
LC	0201	2902	4403	5001	0602	1601
MDC	32	-	57	-	06	-
MP	0201	0301	0702	4901	0701	0702
NB	11	29	08	44	04	-
OMW	0201	0201	4501	4501	1601	1601
PRLS02	23	33	07	-	07	-
PRLS08	33	68	15	53	03	04
RLO	0301	2601	3801	4101	1203	1701
SB	24	30	4001	13	06	07
SS	02	29	14	58	07	08
SWS	01	24	13	57	06	-

4.1.9 Software

CellQuest	BD; Heidelberg
EliSpot Reader Version 5.0	AID, Strassberg
FACSDiva Version 6.0	BD; Heidelberg
FlowJo Version 9.5.2	Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software, La Jolla, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Patienten

Für das Projekt wurden HIV-1 positive Patienten der Infektionsambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München rekrutiert. Alle Teilnehmer wurden vor der Probenentnahme über Inhalt der Forschungsarbeit sowie über Freiwilligkeit, Rücktrittsrecht und mögliche Risiken der Blutentnahme aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Eine entsprechende Genehmigung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität lag vor.

Patient	HLA-Moleküle	optimales Epitop	HLA-Restriktion	Therapie	Mutation
C1	A*01:01; A*01:01 B*44:02; B*37:01 C*05:01; C*06:02	LRPGGKKKY (LY9)	C*06:02	nein	Keine
C1	A*01:01; A*01:01 B*44:02; B*37:01 C*05:01; C*06:02	LVSAGIRKVL (LL10)	C*06:02	nein	Keine
C2	A*02:01; A*32:01 B*08:01; B*18:01 C*07:01; C*07:01	DVKDTKEAL (DL9)	B*08:01	nein	Keine
C3	A*24:02; A*31:01 B*35:01; B*35:08 C*04:01; C*04:01	VPLRPMTY (VY8)	B*35:01	nein	Keine
P1	A*03:01; A*25:01 B*35:01; B*39:01 C*04:01; C*12:03	SRLAFNHMA (SA9)	B*39:01	nein	Keine
P2	A*24:02; A*68:01 B*18:01; B*35:01 C*07:01; C*07:04	RYPLTFGW (RW8)	A*24:02	nein	Keine
P3	A*02:01; A*02:01 B*08:01; B*13:02 C*06:02; C*07:01	YQYMDDLIV (YV9)	A*02:01	nein	M184V
T1	A*02:01; A*02:02 B*35:01; B*49:01 C*04:01; C*07:01	VIYQYMDDLIV (VV11)	A*02:01	ja	M184V
T2	A*02:01; A*25:01 B*44:02; B*44:02 C*05:01; C*07:04	YQYMDDLIV (YV9)	A*02:01	ja	M184V
T3	A*01:01; A*30:04 B*08:01; B*49:01 C*07:01; C*07:01	EKEGKISKI (EI9)	B*49:01	ja	M41L
T4	A*02:01; A*23:01 B*27:05; B*44:03 C*02:02; C*04:01	YQYMDDLIV (YV9)	A*02:01	ja	M184V
T5	A*02:01; A*02:01 B*15:01; B*15:01 C*03:04; C*04:01	VIYQYMDDLIV (VV11)	A*02:01	ja	M184V

Tabelle 1: **Übersicht über die in der Arbeit vorkommenden Patienten.** Aufgelistet sind die jeweiligen HLA-Moleküle, die experimentell bestimmten, optimalen Epitope mit der zugehörigen HLA-Restriktion sowie Angaben über Therapie und Medikamentenresistenzmutationen. C steht für Controller (Viruslast <5.000 Kopien/ml Plasma und >400 CD4⁺ Zellen/μl Blut), P für Progressoren (Viruslast >50.000 Kopien/ml, <400 CD4⁺ Zellen/μl Blut) und T für Therapieresistente, deren Viruslast durch die abfallende Effizienz der Therapie zunehmend anstieg.

4.2.2 Probengewinnung

Durch eine venöse Punktion wurden zwischen drei und sechs EDTA-Röhrchen à 9 ml Patientenblut entnommen. Anschließend wurde durch Real-Time-PCR die Viruslast sowie mittels Durchflußzytometrie (BD Tritest) die CD4⁺ T-Zellzahl ermittelt.

4.2.3 Zellisolierung und Bestimmung der Lebendzellzahl

Bei den benötigten Zellen handelte es sich um *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC), d.h. mononukleäre Zellen des peripheren Blutes. Für die Dichtegradienten-Methode wurde Ficoll®, ein Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, verwendet. Unter das Vollblut gelegt ermöglichte es die Separation der verschiedenen Blutbestandteile, wodurch die mononukleären Zellen nach halbstündigem Zentrifugieren bei 1500 U/min als Schicht zwischen Plasma und Ficoll® zu liegen kamen und anschließend abpipettiert werden konnten (vgl. Abb. 3).

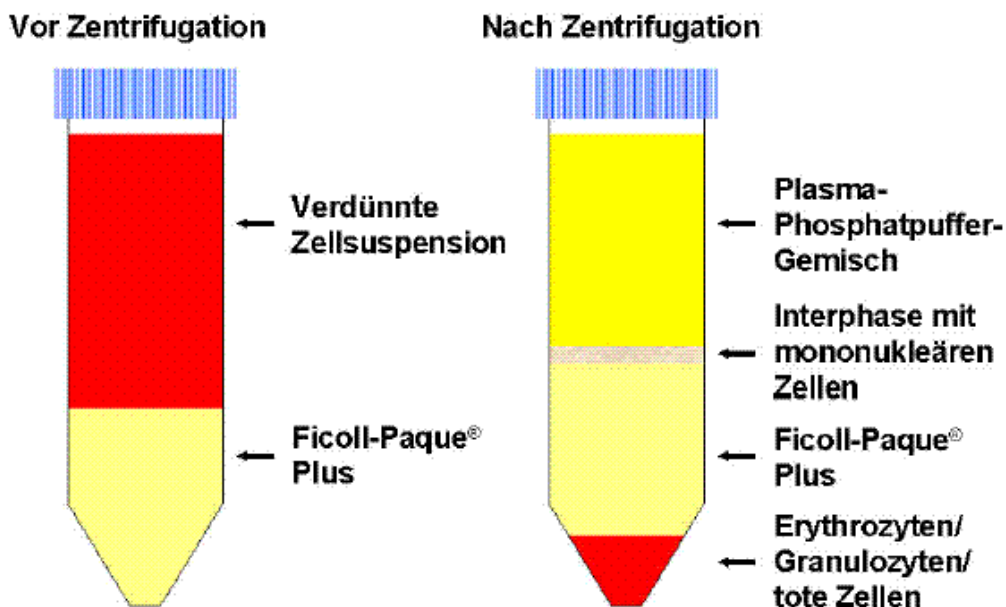


Abbildung 3: **Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll®** [58]. Nach 30 Minuten Zentrifugation bildete sich eine Flüssigkeitssäule aus vier Schichten, die verschiedene Blutkomponenten enthielten.

Die entnommenen Zellen wurden in einem neuen Gefäß mit 40 ml Hanks vermischt und zehn Minuten zentrifugiert. Nach zweimaligem Wiederholen dieses Waschschriffs wurden die Zellen in 10 ml R10 Medium resuspendiert und im elektrischen Zellzählsystem CASY® gezählt. Hierzu wurden 50 µl der Zellgemischs entnommen und in 10 ml CASY®Ton, einer isotonen Salzlösung physiologischen pH-Wertes, suspendiert. Zur Bestimmung der Viabilität wurden 10 µl des Zellgemischs mit 10 µl Trypanblau gemischt und die Zellen in einer KOVA®-Zählkammer gezählt. Der Quotient aus lebenden zu toten Zellen multipliziert mit dem von dem CASY® angegebenen Wert ergab die Zahl der lebenden Zellen.

4.2.4 Einfrieren der Zellen

Die verwendete Einfrierlösung bestand aus reinem FCS gemischt mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). In jeweils 1ml dieser Lösung wurden 10×10^6 der zuvor abzentrifugierten Zellen (1500 U/min, 10 Min., 4°C) resuspendiert und mit Hilfe des Einfrierbehälters Mr. Frosty langsam um 1°C pro Minute bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Proben dann zur Langzeitaufbewahrung in -196°C kalten Flüssigstickstoff überführt.

4.2.5 Auftauen der Zellen

Die aufzutauenden Proben wurden im 37°C warmen Wasserbad geschmolzen, mit 10 ml R10 gemischt und bei 1500 U/min für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem R10 resuspendiert und dieser Waschschriff wiederholt. Am Ende wurden die Zellen in 10 ml R10-Medium resuspendiert und ein Volumen von 50 µl entnommen, um mittels automatischer Bestimmung der Zelldichte die endgültige Zellzahl zu erhalten.

In einer Zellkulturflasche wurden $1,5 \times 10^6$ der Zellen pro ml R10 in einem Standardinkubator bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 100% bebrütet und aufbewahrt.

4.2.6 IFN-γ Elispot

Der Interferon-γ Elispot (engl. für *Enzyme-linked immunospot assay*) ist ein Test zum Nachweis spezifischer zellulärer Aktivität und erfasst die IFN-γ Produktion antigenstimulierter CD8⁺ T-Zellen. Zur Detektion des optimalen Epitops wurden

zunächst 5,5 µl des Primärantikörpers hIFN-γ mAb1-D1K der Konzentration 1 mg/ml in 11 ml PBS gelöst und je 100 µl pro Well in die 96-Well Elispotplatte verteilt.

Ein sechsmaliger Waschschritt mit PBS und 1% FCS entfernte am Tag darauf die nicht haftenden Antikörper. Anschließend wurden in jede Vertiefung 100.000 PBMC pipettiert und die entsprechenden Peptide (vgl. 4.1.5) der Konzentration 14 µg/ml in logarithmischen Verdünnungsschritten (von 200 mg/ml bis 2 ng/ml) zugegeben. Als Negativkontrolle galten Wells mit PBMC ohne Antigen, zur Positivkontrolle wurden PHA und FEC (ein Gemisch aus Grippe-, Epstein-Barr- und Zytomegalie-Virusepitopen) verwendet.

In einem Standardinkubator folgte eine ca. 14 stündige Bebrütung der Platte, bevor diese mit PBS gewaschen wurde, um zelluläre Bestandteile zu entfernen. Daraufhin wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper zugeführt, der ebenfalls gegen IFN-γ gerichtet war und den Komplex aus Primärantikörper und IFN-γ band (vgl. Abb. 4). Dies induzierte eine Farbreaktion, die die Zellaktivierung als bläuliche, sog. „spot forming cell“ (kurz SFC) sichtbar machte.

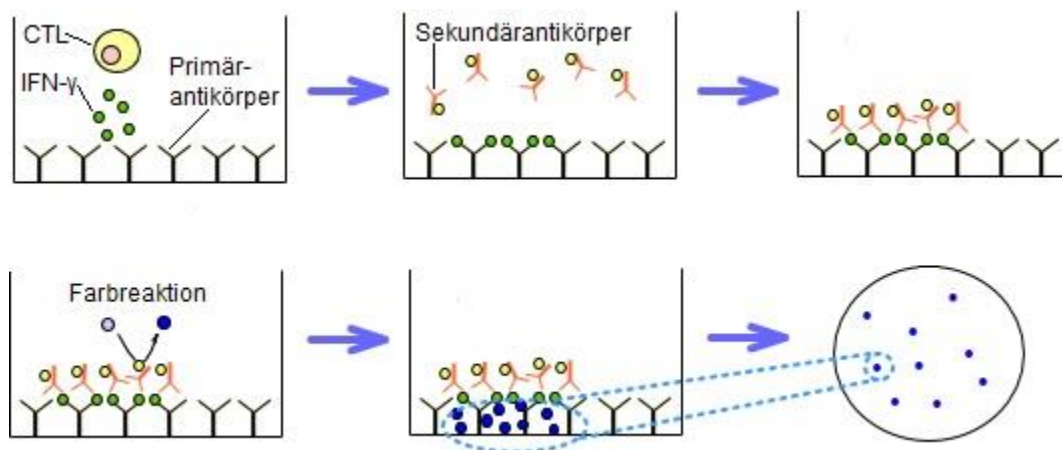


Abbildung 4: Dargestellt ist das **Prinzip des Enzyme-linked immunospot assays**, das zelluläre Aktivität durch das Generieren von SFC sichtbar zu machen vermag (Abb. bearbeitet nach [59]).

Die Elispotplatten wurden anschließend mit 200 µl einer 0,05%-iger Tween-Lösung desinfiziert und nach dem Trocknen mithilfe des AID Lesegerätes ausgewertet. Ein Well wurde nur dann als positiv gewertet, wenn die Anzahl an SFC die der Negativkontrollen mindestens um das Dreifache übertraf. Letztendlich wurde für jede Verdünnungsreihe der Mittelwert der einzelnen Vertiefungen berechnet und als SFC/10⁶ Zellen dargestellt.

Als optimales Epitop wurde das Peptid definiert, welches bei der geringsten Verdünnung die stärkste IFN-γ Immunantwort hervorrief.

4.2.7 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Färbung und Darstellung von Zellen und Zellbestandteilen wie z.B. Oberflächenmolekülen und Zytokinen. Für das Verfahren existiert eine Vielzahl an Antikörpern, die an extra- oder intrazelluläre Zellbestandteile binden und an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Somit kann das jeweilige Merkmal quantitativ und qualitativ dargestellt werden. In der Regel werden von einer Probe 100.000 Ereignisse gemessen, wobei das *fluorescence-activated cell sorting* (kurz FACS) Gerät FACSCalibur vier, das Gerät FACSCanto bis zu acht unterschiedliche Farbstoffe gleichzeitig messen kann.

Der zu messenden Zellsuspension wurden 1 Mio. Zellen entnommen und dreimal in R10-Medium bei 22°C und 1500 U/min für 10 Min. zentrifugiert, um das eventuell in der Kultur enthaltene IL-2 auszuwaschen. Anschließend wurden die Zellen in jeweils 1 ml R10 resuspendiert, auf eine 24-Well Platte gegeben und über Nacht bebrütet. Nach 24 Stunden wurde die Stimulation mittels Peptid oder Virus vorgenommen. Nach einer Stunde wurden 10 µl Brefeldin A (1 mg/ml) untergemischt, welches am Golgi-Apparat interferiert und das Ausschleußen von im endoplasmatischen Retikulum gebildeten Proteinen verhindert. IFN- γ , das von den CD8⁺ T-Zellen als Antwort auf die Stimulation produziert wurde, verblieb somit in der Zelle und konnte anschließend nachgewiesen werden. Nach fünfstündiger Inkubation bei 37°C wurden beide Ansätze bei 4°C für 10 Min. bei 1500U/min in 2 ml PBS+1% FCS zentrifugiert, um Brefeldin A zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, 50 µl PBS zugegeben und im Dunkeln Antikörper zur Färbung extrazellulärer Proteine untergemischt. Nach halbstündiger Inkubation bei 4 °C wurden die Proben in 2 ml PBS gewaschen und 100 µl Fix/Perm Solution A zur Fixierung der Oberflächenantikörper zugegeben. Nach erneutem Waschen in 2 ml PBS kamen 100 µl Fix/Perm Solution B dazu, um die Zellen permeabel für die anschließende Färbung intrazellulärer Zytokine zu machen. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Antikörper gegen intrazelluläre Zellbestandteile untergemischt und wiederum eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 2 ml PBS wurden die gefärbten Zellen in 200 µl PBS resuspendiert, am Durchflusszytometer gemessen und die Ergebnisse mit der Software FlowJo ausgewertet. Dabei konnte man die Lymphozyten selektieren, um daraus wiederum gezielt z.B. CD8⁺ T-Zellen zu betrachten. Das Verfahren der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie kam in mehreren Schritten dieser Arbeit zur Anwendung und wird in den entsprechenden Unterpunkten näher erläutert.

4.2.8 Bestimmen der HLA-Restriktion

Zur Bestimmung der HLA-Restriktion musste die HLA-Typisierung aus Patienten-DNA vorgenommen werden, was das Labor für Immunogenetik der Abteilung für Transfusionsmedizin im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München übernahm. Um daraufhin zu ermitteln, mit welchem seiner HLA-Moleküle der entsprechende Patient ein bestimmtes Epitop präsentiert, wurden allogene B-Zelllinien (BCL) bekannten HLA-Typs mit Peptid beladen und den CD8⁺ T-Zellen des Patienten ausgesetzt. Hierbei wurde im Idealfall jeder HLA-Typ des Patienten von ausschließlich einer BCL, die nur mit einem HLA-Typ des Patienten übereinstimmte, abgedeckt. Lagen die benötigten BCL nicht vor, wurde alternativ durch verschiedene Kombinationen der sechs HLA-Moleküle auf den restringierenden HLA-Typ rückgeschlossen. Abb. 5 verdeutlicht das Vorgehen anhand eines beliebigen Patienten und Epitops.

Die Konzentration des Peptids betrug 1 µg/ml R10 pro 5x10⁵ B-Zellen/ml. Nach einstündiger Inkubation in einem Standardinkubator wurden die B-Zellen dreimal mit R10 gewaschen, wodurch nicht gebundenes Peptid entfernt wurde. Daraufhin wurden die peptidbeladenen BCL im Verhältnis 1:5 mit CD8⁺ T-Zellen des Patienten zusammengegeben und sechs Stunden im Inkubator bebrütet, wobei nach einer Stunde 10 µl Brefeldin A (1mg/ml) dazugegeben wurden. Anschließend fand die wie oben beschriebene Durchführung eines FACS-Ansatzes statt. Als intrazellulärer Antikörper dienten 15 µl IFN-γ-FITC, als extrazellulärer Antikörper 1 µl CD8-PerCP, die Messung erfolgte am Gerät FACSCalibur.

Bei der anschließenden Auswertung (siehe Abb. 5) wurde dasjenige HLA-Allel des Patienten als restringierend bestimmt, das – enthalten in einer der B-Zelllinien – die stärkste IFN-γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen hervorrufen konnte.

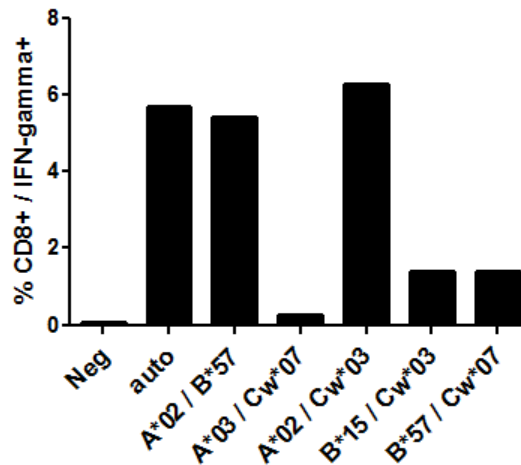


Abbildung 5: Bestimmen der HLA-Restriktion eines beliebigen Patienten mit den HLA-Merkmalen HLA-A*02:01, -A*03:01, -B*15:01, -B*57:03, -C*03:04, -C*07:01 [16]. Die Messung der IFN- γ Produktion nach Stimulation mittels B-Zelllinien der entsprechenden HLA-Moleküle ergibt in diesem Fall HLA-A*02:01 als restringierenden HLA-Typen.

4.2.9 Zelllinien

Herstellen von T-Zelllinien

CD8⁺ T-Zelllinie

Um gezielt Epitop-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu gewinnen, wurden 4 Mio. PBMC des Patienten aufgetaut und mit einem Stimulus vermischt. Dieser bestand aus 4 Mio. B-Zellen einer bereits vorhandenen BCL des restringierenden HLA-Typen. Die B-Zellen wurden mit 50 μ l des gewünschten Peptids beladen und zwei Stunden inkubiert.

Währenddessen wurden 20 Mio. frische PBMC eines HIV-negativen Spenders als Futterzellen isoliert. Stimulierte B-Zellen und PBMC wurden anschließend bei 3000 rad mit Hilfe einer Caesiumquelle bestrahlt und teilungsunfähig gemacht, um die Vermehrung lediglich der gewünschten CD8⁺ T-Zellen zu ermöglichen.

Die B-Zellen wurden nach der Bestrahlung dreimal in je 10 ml R10-Medium bei 1500 U/min 10 Min. gewaschen und in 1 ml R10 resuspendiert. Dann wurden die aufgetauten CD8⁺ T-Zellen, die PBMC-Futterzellen und die peptidstimulierten PBMC zusammen in eine 25 ml-Flask überführt, 10 μ l IL-2 zugegeben und mit R10-Medium auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt. Nach etwa einer Woche konnte die CD8⁺ T-Zelllinie auf Spezifität (s.u.) überprüft werden.

Restimulation einer CD8⁺ T-Zelllinie

Um eine CD8⁺ T-Zelllinie zu verwenden wurde sie aufgetaut und mit einem Stimulus vermischt. Dieser beinhaltete die gleichen Bestandteile wie beim Anlegen der T-Zelllinie. Die mit demselben Peptid beladenen B-Zellen wurden gemeinsam mit frischen PBMC-Futterzellen bestrahlt und mit den aufgetauten CD8⁺ T-Zellen vermischt und inkubiert. Nach zehn Tagen wurde die Spezifität der Zelllinie überprüft.

Spezifitätsüberprüfung einer CD8⁺ T-Zelllinie

Um die Spezifität einer CD8⁺ T-Zelllinie gegenüber dem Peptid zu überprüfen, mit dem sie stimuliert wurde, wurde ebenfalls das durchflusszytometrische Verfahren angewendet. Dafür wurden der Kultur Zellen entnommen und 20 µl des entsprechenden Peptids in einer Konzentration von 200 µg/ml zugegeben. Eine Negativkontrolle blieb ohne Peptidstimulation.

Als extrazelluläre Antikörper dienten bei der weiteren Zellfärbung 5 µl CD4-APC sowie 1 µl CD8-PerCP. Intrazellulär wurde IFN-γ mittels 15 µl des IFN-γ-FITC Antikörpers gefärbt. Die Überprüfung der Spezifität anhand der IFN-γ Produktion der Zellen fand anschließend am FACSCalibur statt. Um die Linie verwenden zu können, wurde eine im Vergleich zur Negativkontrolle mindestens zweifach höhere IFN-γ Produktion gefordert.

CD4⁺ T-Zelllinie

Für die Herstellung einer CD4⁺ T-Zelllinie wurden 5 Mio. PBMC des entsprechenden HLA-Typs 10 Min. bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand entnommen und das Zellpellet in 200 µl Restmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und 1 µl eines bispezifischen anti-CD3/anti-CD8 Antikörpers pro Mio. viabler Zellen untergemischt. Dieser Antikörper sorgte dafür, dass CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen verklumpen und sich nicht weiter teilen konnten. Nach fünfminütiger Inkubation wurden 1 ml/Mio. Zellen R10/IL-2 zugegeben und jeweils 1 ml des Zellgemischs pro Vertiefung in eine 24-Well-Platte gefüllt.

Am nächsten Tag wurde pro Well 500 µl R10/IL2-Medium zugefüttert, nach drei weiteren Tage wurden die Zellen in eine gemeinsame 25 ml Kulturflasche überführt und 5 ml Medium zugegeben. Zur weiteren Teilung wurden die Zellen ein Tag später durch Zugabe von 2 µl/ml Zellgemisch des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA) angeregt. Nach weiteren zwei Tagen waren die Zellen gebrauchsbereit. Vor Verwendung wurde mittels FACS-Messung überprüft, ob ausschließlich CD4⁺ T-Zellen gewachsen sind.

4.2.10 Herstellen von HI-Viruskulturen

Verwendet wurden HIV-1 Viren des Stammes NL4-3 Gruppe M, Subtyp B mit dem primären Co-Rezeptor CXCR4, die aus einer Kollaboration der Universitätsklinik Bonn stammten. Gearbeitet wurde sowohl mit dem Wildtypvirus als auch den Varianten mit den Medikamentenrestistenzmutationen Y181C; M184V; Y181C+M184V.

Zur Kultivierung und Vermehrung der HI-Viren wurden 7 ml einer H9-Zellsuspension mit einem Zellanteil von 0,5 Mio. pro ml mit 700 μ l des jeweiligen Virusstocks infiziert und in 25 ml-Zellkulturflaschen inkubiert. Nach 3 Tagen wurde 10 ml R10 zugegeben, am siebten Tag erfolgte eine Überführung in 75 ml-Zellkulturflaschen. Außerdem wurden 3 Mio. frische H9-Zellen zugegeben und mit R10 auf 50 ml Volumen aufgefüllt. Nach frühestens drei weiteren Tagen wurden die H9-Zellen bei 3040 U/min bei 4°C für 10 Min. abzentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und in einem Volumen von je 1 ml in Nunc-Kryoröhrchen bei -80°C tiefgefroren.

4.2.11 Titerbestimmung

Zur Bestimmung der Menge infektiöser Viren der HIV-Kulturen wurde eine Endpunkttitration durchgeführt. Hierfür wurde nach mindestens 24-stündiger Lagerung bei -80°C ein Kryoröhrchen der Kulturüberstände aufgetaut und eine Verdünnungsreihe angelegt: 900 μ l R10 wurden mit 100 μ l der Viruskultur untermischt. Daraus wurden wiederum 100 μ l in ein neues, ebenfalls 900 μ l R10 enthaltenes Eppendorfgefäß gegeben. Dieser Prozess wurde mehrere Male wiederholt, sodass eine in logarithmischen Stufen titrierte Verdünnungsreihe bis zur Endpunktkonzentration 10^{-6} entstand (vgl. Abb. 6).

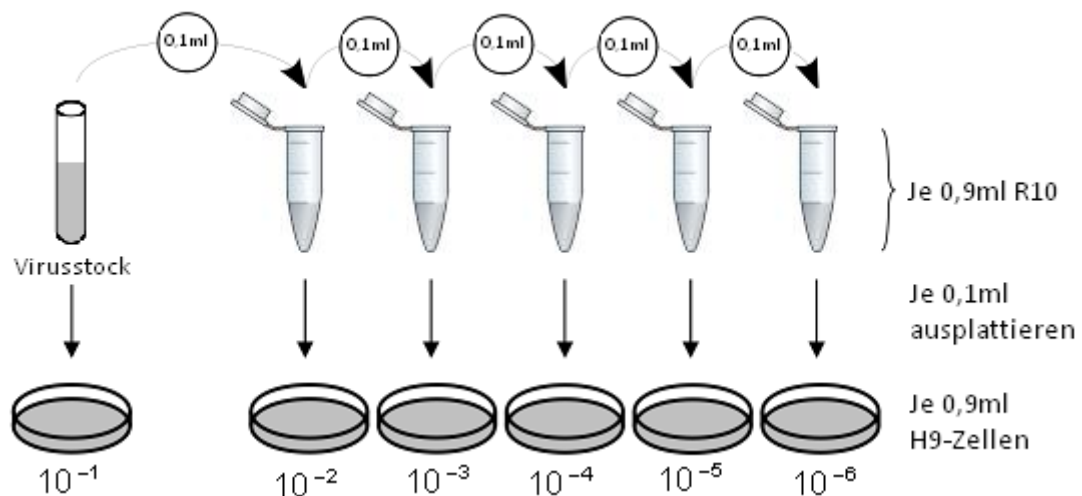


Abbildung 6: Anlegen und Ausplattieren der Verdünnungsreihe eines HIV-Stocks.

Aus den verdünnten Viruslösungen wurden 100 μl aus dem jeweiligen Gefäß entnommen und in je vier untereinander liegende Vertiefungen einer 24-Well Platte gegeben. Die obersten zwei Wells der ersten Reihe wurden als Positivkontrolle mit 100 μl des Virusstocks befüllt, die beiden darunterliegenden dienten als Negativkontrolle.

Anschließend wurde in jedes Well 900 μl einer H9-Zellsuspension (0,1 Mio./ml) zugegeben, sodass die aus den Eppendorfgefäßen entnommene Viruslösungen um eine weitere Zehnerpotenz verdünnt wurden. Abb. 7 zeigt die fertig befüllte 24-Well Platte:

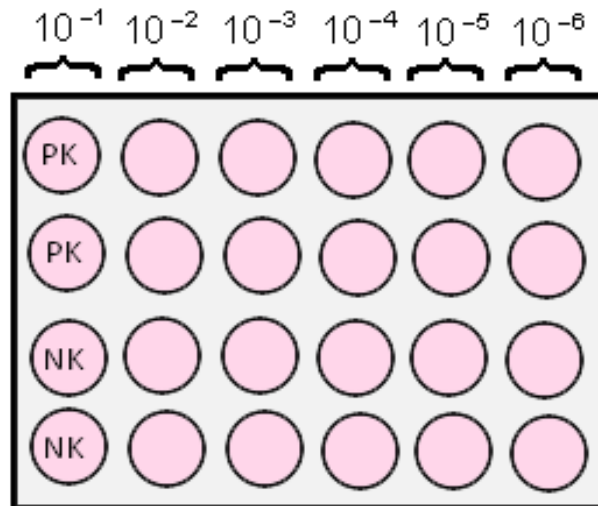


Abbildung 7: Virus-Endpunkttitration auf einer 24-Well Platte.

Die Platten wurden für ca. 20 Tage in einem Standardinkubator bebrütet und zweimal pro Woche mit 350 μl R10-Medium pro Vertiefung zugefüttert. Da H9-Zellen bei Infektion Synzytien bilden, wurden die Lochplatten zweimal wöchentlich unter dem Lichtmikroskop inspiziert und nach Ablauf der 20 Tage die TCID_{50} anhand der Reed-Muench-Methode [60] berechnet. Es handelt sich hierbei um die „Median tissue culture infective dose“, also die Menge an Viruspartikeln, die in 50% der Vertiefungen einer Verdünnungsreihe Synzytien hervorruft. Waren beispielsweise in den Verdünnungen 10^{-2} und 10^{-3} in allen und bei 10^{-4} in zwei Wells Synzytien sichtbar, lag der Titer infektiöser Viren bei $10^4/\text{ml}$.

4.2.12 Infektion von CD4^+ T-Zellen mit HIV

Die Infektion der CD4^+ T-Zellen sollte anhand einer bestimmten MOI (engl. für *Multiplicity of Infection*), also dem Verhältnis infektiöser Viruspartikel zu Zielzellen, erfolgen. In vorangegangenen Projekten unserer Forschungsgruppe stellte sich eine MOI von 0,01 als optimal heraus, sprich eine von 100 CD4^+ T-Zellen wurde initial infiziert. Die Infektion wurde wie folgt vorgenommen:

Viermal 0,5 Mio. viable CD4⁺ T-Zellen wurden in 15 ml Tubes bei 21°C für 5 Min. bei 1660 U/min abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Anschließend wurde in jedes Tube eine der tiefgefrorenen HIV-Kulturen zugegeben:

- NL4-3, WT
- NL4-3, Y181C
- NL4-3, M184V
- NL4-3, Y181C+M184V

Dabei wurden vom Wildtyp und der M184V-Mutation je 0,5 ml und von der Y181C-Mutation sowie von dem beide Mutationen tragenden Virus je 1 ml verwendet.

Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C in einer 24-Lochplatte wurde je 1 ml R10/IL-2 zupipettiert. Nach weiteren drei Tagen Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml R10/IL-2 gefüttert. Um das Ausmaß der Zellinfektion nachzuweisen wurde an Tag 4 nach Infektion eine Core-Färbung (s.u.) durchgeführt.

4.2.13 Core-Färbung HIV-infizierter CD4⁺ T-Zellen

Zur Quantifizierung der Virusaufnahme der CD4⁺ T-Zellen wurde jedem Virus-Zell-Gemisch 500 µl entnommen, zweimal in R10-Medium gewaschen und ein FACS-Ansatz durchgeführt. Nicht infizierte CD4⁺ T-Zellen dienten als Negativkontrolle.

Extrazelluläre Proteine wurden mit 5 µl des Antikörpers CD4-APC und 1 µl CD8-PerCP markiert. Zur Färbung der internalisierten, intrazellulären HI-Viren dienten 5 µl eines Core-Antikörpers gekoppelt an den Farbstoff FITC, der gegen das virale p24 Kapsid-Protein gerichtet ist. Nach Messung der Proben am FACSCalibur wurden die Ergebnisse unter Berücksichtigung der Negativkontrolle mit der Software FlowJo ausgewertet.

4.2.14 Untersuchung auf Polyfunktionalität

Um die CD8⁺ T-Zellantwort auf eine Stimulation mit virusinfizierten Zellen zu untersuchen, wurde ebenfalls eine Färbung für die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Dafür wurden am Vortag Zellen einer restimulierten und auf Spezifität überprüften CD8⁺ T-Zelllinie zweimal in R10-Medium gewaschen. An Tag 5 nach Infektion wurden die CD8⁺ T-Zellen in einem Volumen von je 1 ml R10-Medium auf eine 24-Well-Platte gegeben und sowohl infizierte als auch nicht infizierte CD4⁺ T-Zellen gezählt. Der Ansatz mit nicht infizierten CD4⁺ T-Zellen diente als Negativkontrolle.

Da man Effektor- und Zielzellen in einem bestimmten Verhältnis mischen wollte (*Effector Cell to Target Cell Ratio*, E:T), wurde den Proben jeweils die entsprechende Menge an CD4⁺ T-Zellen entnommen, in R10-Medium bei 22 °C und 1500 U/min für 10 Min. zentrifugiert, in 150 µl Restvolumen resuspendiert und zu den CD8⁺ T-Zellen gegeben. Gleichzeitig wurden 15 µl eines Antikörpers gegen CD107a-FITC zupipettiert. Nach einstündiger Inkubation wurden die Sekretionsinhibitoren Monensin (0,7 µl) und Brefeldin A (10 µl) zugegeben und der Versuch wie oben beschrieben fortgeführt. Das extrazelluläre CD8 wurde mit 5 µl des Antikörpers CD8-PacificBlue gefärbt. Zur Markierung intrazellulärer Zytokine wurden 5 µl IFN- γ -APC, 5 µl TNF- α -Pe/Cy7 und 15 µl IL-2-PE pro Ansatz untermischt. Bei der Auswertung wurden die Lymphozyten ausgewählt, die CD8⁺ T-Zellen daraus selektiert und CD8 jeweils gegen CD107a, IFN- γ , IL-2 und TNF- α aufgetragen (siehe Abb. 8). So konnten gezielt CD8⁺ T-Zellen, die das jeweilige Zytokin bzw. Degranulationsmarker aufwiesen, quantifiziert werden.

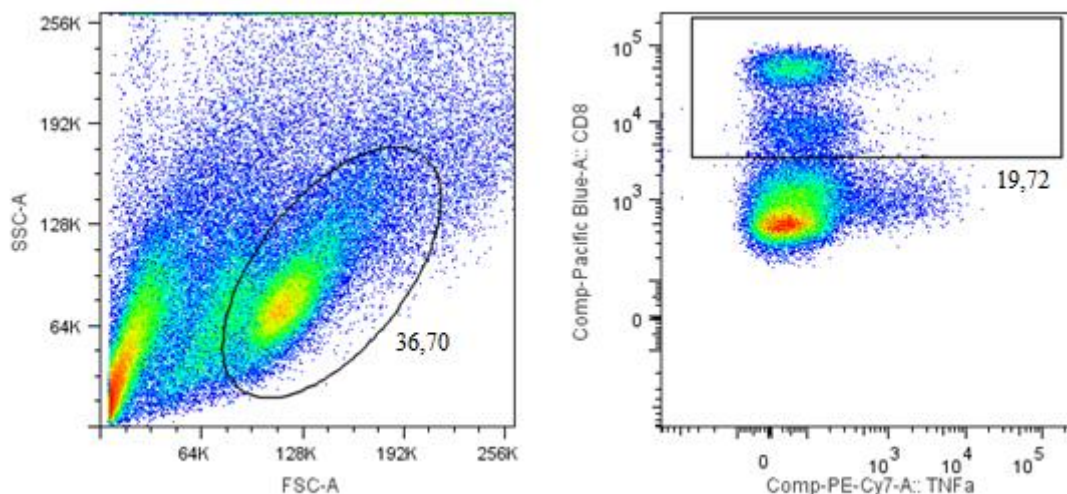


Abbildung 8: Bild A zeigt die **Auswahl der Lymphozyten** im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, in Bild B ist die Selektion der CD8⁺ T-Zellen dargestellt.

Zuerst wurde der Versuch mit einer Negativkontrolle vorgenommen, bei der CD4⁺ T-Zellen, die nicht mit HIV infiziert wurden, als Stimulus dienten. Die gesetzten Grenzen wurden dann auf die anderen Proben übertragen, der Wert der Hintergrundfluoreszenz der Negativkontrolle subtrahiert und so der Anteil der gesuchten Zellen errechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Gegenüberstellung von Epitope prediction Programmen und experimenteller Epitopkartierung

Insgesamt wurden neun in unserem Labor neu kartierte optimale HIV-Epitope von acht Individuen untersucht. Im Vorfeld waren bereits von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe mittels IFN- γ Elispot die optimalen Epitope und die entsprechende HLA-Restriktion ermittelt worden.

5.1.1 Abweichende Resultate von Epitope prediction Programmen und experimenteller Epitopkartierung

Die in Abschnitt 2.4.2 vorgestellten bioinformatischen Programme wurden verwendet, um aus langen Screening-Peptiden die optimalen Epitope der acht Patienten zu ermitteln. Damit sollte analysiert werden, wie zuverlässig die Vorhersagen dieser Programme sind und ob sie die zeitaufwendige und teure Laborarbeit zu ersetzen vermögen.

Da die HLA-Restriktion zu Beginn der experimentellen Epitopkartierung für gewöhnlich nicht bekannt ist, wurden in einem ersten Schritt die jeweiligen Screening-Peptide mit den Programmen SYFPEITHI, CTLPred und IEDB analysiert, ohne die HLA-Restriktion zu berücksichtigen. Die ermittelten Aussagen bezogen sich auf alle HLA-Typen des Patienten. Außerdem wurden nur die vorausgesagten Epitope berücksichtigt, die der Länge des experimentell bestimmten Epitops entsprachen, da nicht alle Programme in der Lage waren, diesbezüglich eine Voreinstellung zu treffen und die Ergebnisse nur so vergleichbar blieben.

Tabelle 2 (siehe Seite 33/34) listet die acht Patienten mit ihren HLA-Molekülen, den experimentell bestimmten, optimalen Epitopen und der zugehörigen HLA-Restriktion auf. Ebenso sind pro Patient die ersten drei Suchergebnisse der bioinformatischen Programme mit den zugehörigen Rängen sowie in Klammern das mit dem Suchergebnis verbundene HLA-Allel aufgeführt. Zur besseren Übersicht wurde die als optimale Epitop experimentell ermittelte Sequenz des Screening-Peptids grau hinterlegt.

Befand sich das optimale Epitop nicht unter den ersten drei angegebenen Ergebnissen, wurde der entsprechende Rang bzw. „optimales Epitop nicht vorhergesagt“ notiert. Konnte von der Software keine Sequenz als Epitop ermittelt werden, wurde dies als „kein Ergebnis“ vermerkt.

Da in-silico Programme einer ständigen Aktualisierung unterliegen, ändern sich die Resultate der Suchanfragen unter Umständen bei späteren Analysen. Stand der hier aufgeführten Ergebnisse ist der 26.11.2013.

Betrachtet man das Programm SYFPEITHI, wurde das optimale Epitop in sieben von neun Fällen richtig vorhergesagt (ungeachtet von HLA-Restriktion und Ranking). CTLPred hatte in drei von neun, IEDB in neun von neun Fällen Erfolg.

Unter den ersten drei aufgelisteten Ergebnissen vorzufinden war das optimale Epitop in 44% (4/9) bei SYFPEITHI, in 22% (2/9) bei CTLPred und in 78% (7/9) bei IEDB.

Interessanterweise sagten die Programme oft dieselbe Aminosäuresequenz als Epitop voraus, verbanden das Suchergebnis jedoch mit unterschiedlicher HLA-Restriktion.

Dies war zum Beispiel bei Patient C1 der Fall, dessen optimales Epitop LVSAGIRKVL HLA-C*06:02 restringiert ist. SYFPEITHI gab jedoch HLA-B*44:02 als restringierendes Molekül an und lieferte kein Ergebnis bezüglich HLA-C*06:02.

Im Falle des Epitops DVKDTKEAL (Patient C2) ermittelte IEDB HLA-B*18:01 und HLA-B*08:01 als restringierende HLA-Moleküle, während SYFPEITHI HLA-A*02:01 mit dem höchsten Ranking angab (Rang 14 versus Rang 0 für HLA-B*18:01 und B*08:01). Auch bei den Patienten P1, P2 und T2 passte das angegebene HLA-Allel nicht zum experimentell bestimmten.

ID	Screening-Peptid	kartiertes Epitop	HLA-Restriktion	HLA-Moleküle	SYFPEITHI	CTLPred	IEDB	
C1	LRPGGKKYKLVKHHV	LRPGGKKY	C*06:02	A*01:01	LRPGGKKY (A*01/B*44:02)(18/15)	KKKYKLVKHH (C*06:02)(0.03/0.879)	LRPGGKKY (C*06:02)(7.4)	
				A*01:01				
				B*44:02	PGGKKYKL (B*37:01)(14)		KKYKLVKHH (B*37:01)(16)	
				B*37:01				
				C*05:01	KKKYKLVKHH (B*44:02)(12)	optimales Epitop nicht vorhergesagt	KKKYKLVKHH (B*44:02)(24)	
C*06:02								
C1	QVDKLVSAIRKLVFL	LVSAGIRKVL	C*06:02	A*01:01	LVSAGIRKVL (B*44:02)(15)	kein Ergebnis	QVDKLVSAIRK (C*05:01)(0.4)	
				A*01:01				
				B*44:02	VSAGIRKLVFL (B*44:02)(13)		VSAGIRKLVFL (A*01:01)(4.7)	
				B*37:01				
				C*05:01	SAGIRKLVFL (B*44:02)(13)		LVSAGIRKVL (C*06:02)(5.1)	
C*06:02								
C2	RIDVKDTKEALEKI	DVKDTKEAL	B*08:01	A*02:01	DTKEALEKI (A*02:01)(18)	DVKDTKEAL (B*08:01)(0.32/1.027)	DVKDTKEAL (B*18:01/B*08:01)(13.5/16)	
				A*32:01				
				B*08:01	DVKDTKEAL (A*02:01)(14)		DTKEALEKI (B*18:01/A*32:01)(16.5/23)	
				B*18:01				
				C*07:01	RIDVKDTKE (A*02:01)(11)		RIDVKDTKE (A*32:01)(26)	
C*07:01								
C3	EEEEVGFPVTPQVPLRPMTY	VPLRPMTY	B*35:01	A*24:02	kein Ergebnis	kein Ergebnis	VPLRPMTY (B*35:08/B*35:01)(0.9/3.3)	
				A*31:01				
				B*35:01			VTPQVPLR (A*31:01)(4.3)	
				B*35:08				
				C*04:01	RIDVKDTKE (A*02:01)(11)		FPVTPQVP (B*35:01)(4.4)	
C*04:01								
P1	EWRFD\$RLAFNHMA\$RELHPE	SRLAFNHMA	B*39:01	A*03:01	RLAFNHMAR (A*03)(21)	RFD\$RLAFN (Cw*04:01)(0.97/0.368)	RLAFNHMAR (A*03:01)(0.45)	
				A*25:01				
				B*35:01	WRFD\$RLAF (B*39:01/A*03)(15/10)	AFNHMA\$REL (Cw*04:01)(0.06/1.217)	WRFD\$RLAF (B*39:01)(0.7)	
				B*39:01				
				C*04:01	NHMA\$RELHP (B*39:01)(14)	WRFD\$RLAF (Cw*04:01)(0.16/1.001)	DSRLAFNHM (A*25:01)(2.95)	
C*12:03								
				optimales Epitop 4. Rang	optimales Epitop 6. Rang	optimales Epitop 7. Rang		

ID	Screening-Peptid	kartiertes Epitop	HLA-Restriktion	HLA-Moleküle	SYFPEITHI	CTLPred	IEDB
P2	PDWQNYTPGPGVRYPLTFGW	RYPLTFGW	A*24:02	A*24:02 A*68:01 B*18:01 B*35:01 C*07:01 C*07:04	GVRYPPLTF (B*18)(13) TPGPGVRY (B*18)(12) GPGVRYPL (B*18)(8)	kein Ergebnis	RYPLTFGW (A*24:02)(0.6) TPGPGVRY (B*35:01)(0.9) YTPGPGVR (A*68:01)(2)
optimales Epitop 7. Rang							
T1	RKQNPDIYQYMDDLIV	VIYQYMDDLIV	A*02:01	A*02:01 A*02:02 B*35:01 B*49:01 C*04:01 C*07:01	kein Ergebnis	kein Ergebnis	KQNPDIYQY (B*49:01)(4.4) VIYQYMDDLIV (C*07:01/A*02:01)(4.9/10.8) QNPDIYQYM (C*07:01)(5.9)
T2	RKQNPDIYQYMDDLIV	YQYMDDLIV	A*02:01	A*02:01 A*25:01 B*44:02 B*44:02 C*05:01 C*07:04	VIYQYMDDL (A*02:01)(21) KQNPDIY (B*44:02)(18) NPDIVYQY (B*44:02)(16)	VIYQYMDDL (A*02:01/C*07:04)(0.5/2.5) YQYMDDL (A*02:01/A*25:01)(5.9/8.3) NPDIVYQY (C*05:01)(9.1)	YQYMDDLIV (A*02:01/C*07:04)(0.5/2.5) VIYQYMDDL (A*02:01/A*25:01)(5.9/8.3) NPDIVYQY (C*05:01)(9.1)
optimales Epitop 4. Rang							
T3	LVEICTEMEKEGKISKI	EKEGKISKI	B*49:01	A*01:01 A*30:04 B*08:01 B*49:01 C*07:01 C*07:01	TEMEKEGKI (B*49:01)(25) CTEMEKEGK (A*01)(14) EKEGKISKI (B*49:01)(14)	kein Ergebnis	TEMEKEGKI (B*49:01)(1.2) CTEMEKEGK (A*01:01)(4.5) VEICTEMEKEK (B*49:01)(4.9) optimales Epitop 7. Rang

Tabelle 2: **Liste der acht analysierten Patienten.** Aufgeführt sind optimales Epitop (grau hinterlegt), HLA-Moleküle und –Restriktion sowie die ersten drei Suchergebnisse der bioinformatischen Programme mit zugehörigem Rang und angegebenem HLA-Allel.

5.1.2 Gezielte Vorhersageergebnisse bei bekannter HLA-Restriktion und häufig vorkommendem HLA-Typ

Um zu untersuchen, ob das Wissen über den das entsprechende Peptid restringierenden HLA-Typ die in-silico Vorhersageergebnisse verbesserte, wurden alle Sequenzen noch einmal analysiert und der experimentell bestimmte, restringierende HLA-Typ mit angegeben. Da das Programm CTLPred mögliche Epitope automatisch für alle HLA-Typen angibt und bei SYFPEITHI nicht alle existierenden HLA-Moleküle gezielt ausgewählt werden können, wurde dieser Versuch nur mit IEDB durchgeführt. Anstatt wie in 5.1.1 alle sechs wurde nur der jeweils zuvor experimentell ermittelte, restringierende HLA-Typ angegeben. Tabelle 3 gibt die Ergebnisse wieder.

ID	kartiertes Epitop	HLA-Restriktion	alle HLA-Typen	HLA-Restriktion bekannt
C1	LVSAGIRKVL	C*06:02	3. Rang	1. Rang
P1	SRLAFNHMA	B*39:01	7. Rang	2. Rang
T1	VYQYMDDLIV	A*02:01	2. Rang	1. Rang
T3	EKEGKISKI	B*49:01	7. Rang	4. Rang

Tabelle 3: **Bekannte HLA-Restriktion führt zu einer verbesserten Rangfolge der Suchergebnisse.** Die beiden letzten Spalten der Tabelle zeigen das Ranking des optimalen Epitops innerhalb der Suchergebnisse zum einen bei der Suche nach allen HLA-Typen des Patienten, zum anderen bei gezielter Suche des jeweils experimentell bestimmten, restringierenden HLA-Typen.

Zwar konnte durch die gezielte Suche mittels experimentell bestimmten, restringierenden HLA-Typen keine größere Anzahl an optimalen Epitopen richtig vorhergesagt werden, die Rangfolge der Suchergebnisse verbesserte sich jedoch deutlich. Vier der neun mit IEDB richtig vorhergesagten Epitope erschienen durch die veränderte Suchbedingung an einer höheren Stelle des Rankings. Das Wissen über die HLA-Restriktion trägt also zu einer gezielteren Vorhersage des optimalen Epitops bei.

Die untersuchten Computerprogramme werden regelmäßig mit experimentell gewonnenen Datensets trainiert und damit aktualisiert. Folglich sind die Inhalte über häufig vorkommende HLA-Typen aufgrund vermehrt vorhandener Informationen zahlreicher und aktueller.

Um der Frage nachzugehen, ob die Häufigkeit des HLA-Typs in der Population die Ergebnisse beeinflusste, wurde anhand der Kalkulationen von Frahm et al. geschätzt, welche HLA-Moleküle in der kaukasischen Bevölkerung bevorzugt auftreten [61]. Anhand des Ergebnisses wurden sechs untersuchte Peptide in eine Gruppe mit häufigen und eine mit seltenen restringierenden HLA-Typen unterteilt. Anschließend wurden die Resultate des Programms IEDB für beide Gruppen verglichen (siehe Tabelle 4).

ID	Screening-Peptid	kartiertes Epitop	HLA-Restriktion	Allelfrequenz bei Kaukasiern	IEDB Vorhersage
C1	QVDKLV SAGIRKVL FL	LVSAGIRKVL	C*06:02	Hoch	QVDKLV SAGI (C*05:01)(0.4) VSAGIRK VLF (A*01:01)(4.7) LVSAGIRKVL (C*06:02)(5.1)
C3	EEEEVGFPVTPQ VPLRPMTY	VPLRPMTY	B*35:01	Hoch	VPLRPMTY (B*35:08/B*35:01)(0.9/3.3) VTPQ VPLR (A*31:01)(4.3) FPVTPQ VP (B*35:01)(4.4)
P2	PDWQNYTPGPGV RYPLTFGW	RYPLTFGW	A*24:02	Hoch	RYPLTFGW (A*24:02)(0.6) TPGPGV RY (B*35:01)(0.9) YTPGPGV R (A*68:01)(2)
T2	RKQNPDI VIYQYMDDL YV	YQYMDDL YV	A*02:01	Hoch	YQYMDDL YV (A*02:01/C*07:04)(0.5/2.5) VIYQ YMDDL (A*02:01/A*25:01)(5.9/8.3) NPDI VIYQY (C*05:01)(9.1)
P1	EWRFD SRLAFNHMA RELHPE	SRLAFNHMA	B*39:01	Niedrig	RLAFNH MAR (C*03:01)(0.45) WRFD SRLAF (B*39:01)(0.7) DSRLAF NHM (A*25:01)(2.95) optimales Epitop 7. Rang
T3	LVEICTEME KEGKISKI	EKEGKISKI	B*49:01	Niedrig	TEMEKE GKI (B*49:01)(1.2) CTEMEKE GK (A*01:01)(4.5) VEICTEME K (B*49:01)(4.9) optimales Epitop 7. Rang

Tabelle 4: **Häufig auftretende HLA- Typen sind mit besseren Vorhersageergebnissen verbunden.** Aufgeführt sind anhand der Kalkulationen von Frahm et al. als häufig bzw. selten eingestufte HLA-Moleküle und die jeweils zugehörigen, von IEDB generierten Vorhersagen des optimalen Epitops.

Es stellte sich also heraus, dass häufig vorkommende HLA-Typen wie HLA-A*02:01, HLA-A*24:02, HLA-B*35:01 und HLA-C*06:02 mit präziseren Angaben korrelierten als die selten vorkommenden Moleküle HLA-B*39:01 und HLA-B*49:01.

Bioinformatische Programme vermögen präzisere Angaben zu Suchanfragen zu liefern, die sich auf häufig vorkommende HLA-Typen beziehen, während aufgrund geringerer Informationslage zu selten vorkommenden Molekülen weniger genaue Aussagen generiert werden können.

5.1.3 Schlechtere Vorhersage von Epitopen ungewöhnlicher Länge

Ein typisches CD8⁺ T-Zellepitop ist in den meisten Fällen neun Aminosäuren lang. Bei der computergestützten Suche der optimalen Epitope fiel auf, dass Epitope, die keine Nonamere waren, schlechter vorausgesagt wurden. So wurden z.B. die Patienten T1 und T2, die beide ihr Epitop mit HLA-A*02:01 restringierten, auf dasselbe Screening-Peptid hin untersucht (RKQNPDIYQYMDDL^YV = HIV pol 327-344). Sowohl SYFPEITHI als auch CTLPred und IEDB ermittelten das Nonamer YQYMDDL^V mit hohen Rangwerten als optimales Epitop. Verglichen mit der experimentellen Kartierung traf dies zwar auf Patient T2 zu, jedoch war das 11mer lange Peptid VIYQYMDDL^YV für Patient T1 das optimale Epitop, was in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe festgestellt wurde (siehe Abschnitt 2.5.2).

Interessant ist hierbei, dass die für die Bindung an den HLA I-Rezeptor wichtig erachtete Ankerposition (Position 2 im Epitop) abweichend von dem Nonamer ist. Ebenso wurde das in der Literatur bereits beschriebene, HLA-A*24:02 restringierte Epitop RW8 (RYPLTFGW) [62, 63] von SYFPEITHI erst an siebter Stelle als Epitop ermittelt und dabei noch einem abweichenden HLA-Allel zugeordnet (HLA-B*18). Das HLA-B*35:01 restringierte Oktamer VY8 (VPLRPMTY) konnte SYFPEITHI überhaupt nicht als Epitop ermitteln. CTLPred hingegen bezieht ausschließlich Nonamere in seine Analysen ein und kann demzufolge die genannten, in der Länge abweichenden Epitope nicht vorhersagen.

Demgegenüber steht das Programm IEDB, mit dem man anhand der Sucheinstellungen sowohl nach Epitopen bestimmter als auch beliebiger Länge suchen kann. Auf beiden Wegen wurden die Peptide RW8 und VY8 als Epitope erkannt, wobei sie bei der gezielten Suche nach Oktameren an höherer Stelle im Ranking erschienen.

Insgesamt betrachtet führen Epitope unüblicher Länge in Epitope prediction Programmen zu schlechteren Ergebnissen als gewöhnliche, neun Aminosäuren lange Peptide.

5.2 Untersuchung der CD8⁺ T-Zellantwort gegen M184V und Y181C HIV-1 Mutanten

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass es CD8⁺ T-Zellantworten gibt, die spezifisch medikamentenresistentes Virus erkennen können [16]. Durch mangelnde Medikamentencompliance generierten die Viren verschiedener Patienten Medikamentenresistenzmutationen, was die Synthese neuer, auf die mutierten Sequenzen spezialisierter CD8⁺ T-Zellen induzierte. Diese Zellen erkannten in Peptiden die mutierten Epitope sogar besser als das ursprüngliche Wildtyp-Epitop [16]. Folgende Ergebnisse wurden bei der Untersuchung, ob auch mit ganzen, die Mutationen tragenden Viren eine solche Reaktion vorhanden ist und gemessen werden kann, erzielt.

5.2.1 Unterschiedliches Erkennen der DRM M184V, Y181C und Y181C+M184V in Peptiden

Da die Y181C-Mutation benachbart zur M184V-Mutation liegt und beide für ein Versagen der medikamentösen Therapie verantwortlich sind (siehe Abschnitt 2.2), wurde in diesem Schritt das Erkennen der Y181C-Mutation näher untersucht. Das spezifische Erkennen der Mutation M184V wurde bereits mehrfach nachgewiesen [16, 45, 55, 56]. Was die Reaktion auf Peptide angeht, welche die Mutation an der Stelle 181 tragen, liegen jedoch keine Daten vor. Auch das Erkennen von Peptiden, welche sowohl die Mutation M184V als auch Y181C enthalten, wurde bisher nicht untersucht. Daher wurde ein IFN- γ Elispot mit Peptiden durchgeführt, die entweder der Wildtyp-Sequenz entsprachen oder die Mutationen M184V, Y181C oder beide trugen.

Verwendet wurden folgende Peptide:

- Wildtyp: YQYMDDLYV (YV9-WT)
- M184V: YQYVDDLYV (YV9-M184V)
- Y181C: CQYMDDLYV (CV9-Y181C)
- Y181C+M184V: CQYVDDLYV (CV9-Y181C, M184V)

Beispielhaft sind in Abb. 9 die Antworten zweier therapieresistenter Patienten T2 und T4 aufgeführt.

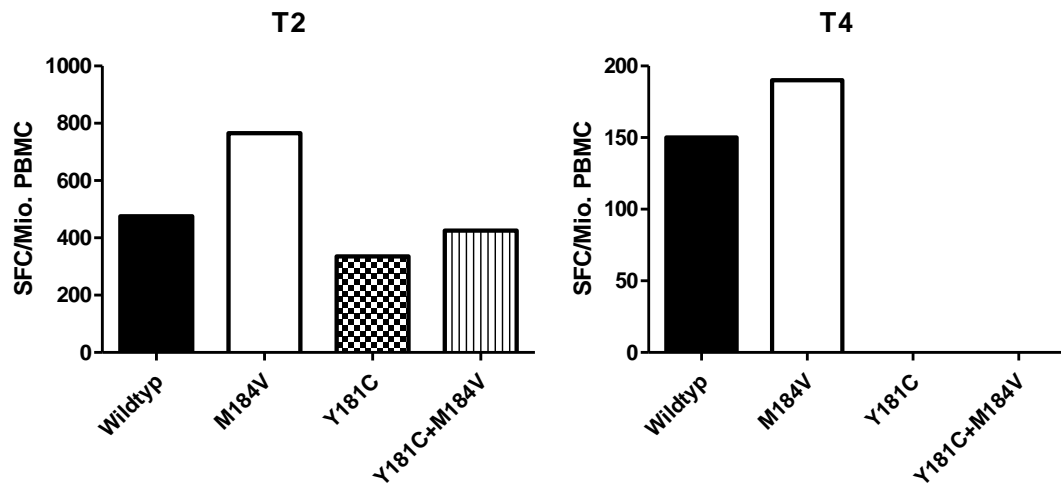


Abbildung 9: IFN- γ Elispot-Ergebnisse für zwei Patienten nach Peptidstimulation. Getestet wurde die Reaktion auf Peptide der Wildtyp-Sequenz sowie solche mit den Mutationen M184V, Y181C und Y181C+M184V.

Beide Patienten sind Träger M184V-mutierter Viren und erkannten folglich das Peptid mit der M184V-Mutation am besten. Das Einführen der Mutation Y181C führte zu unterschiedlichen Ergebnissen: T2 erkannte das Peptid dennoch gut, allerdings schlechter als das Wildtyp- und das M184V-mutierte Peptid; bei T4 kam es durch Einführen der Y181C-Mutation jedoch zu einem kompletten Verlust der Antwort.

Wurde daraufhin mit einem Peptid stimuliert, das sowohl die Mutation Y181C als auch M184V trug, wurde bei T2 eine höhere Antwort beobachtet als es bei dem allein Y181C-mutierten Peptid der Fall war. Bei Patient T4 dagegen konnte auch das Peptid mit der Doppelmutation nicht zu einem Erkennen führen und keine Zellantwort hervorrufen.

Die Mutation Y181C wird folglich nicht in allen Fällen erkannt. Das zusätzliche Einführen der M184V-Mutation hingegen kann die Immunantwort wieder verstärken, was die Idee einer therapeutischen Impfung verstärkt, die gegen beide Medikamentenresistenzmutationen gerichtet ist.

5.2.2 Kultivieren und Austitrieren von HI-Viren

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die CD8⁺ T-Zelllinien auch komplette Viren, die die Mutationen M184V und/oder Y181C enthielten, erkennen können. Hierfür wurden Viren verwendet, in die eine oder mehr DRM hineinkloniert worden waren.

Die ersten Versuchsansätze mit Viruszucht und Titerbestimmung erbrachten nicht das gewünschte Ergebnis. Ziel war es, eine TCID₅₀ zwischen 10⁴ – 10⁷/ml zu erreichen; ein niedrigerer Titer würde ein enormes Volumen an Virussuspension zur Infektion von CD4⁺ T-Zellen vonnöten machen.

Da die erreichte TCID₅₀ nicht hoch genug war, wurden im Folgenden die Versuchsbedingungen modifiziert. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die acht verschiedenen Ansätze.

Als erstes wurde die Zentrifugation verändert. Anstatt die H9-Zellen bei 21°C, 1660 U/min 5 Min. zu zentrifugieren, wurde bei den anderen Ansätzen länger, mit höherer Umdrehungszahl und bei kälteren Temperaturen zentrifugiert (4°C, 3040 U/min, 10 Min.). Dadurch sollte verhindert werden, dass die HI-Viren an den H9-Zellen haften blieben und dann nicht im Überstand vorhanden waren. Diese Veränderung ermöglichte es, höhere Virustiter zu erreichen. Da sie jedoch noch nicht hoch genug waren, wurden die Viren nach der Ernte versuchsweise bei verschiedenen Temperaturen weiterverarbeitet (Ansatz 4). Somit war es möglich, die anschließend ausgewerteten Rücktitrationen dahingehend zu vergleichen, ob die Art des Einfrierens bzw. der Lagerung einen Unterschied machte. Die TCID₅₀ der Viren, die bei -80°C schockgefroren wurden, war dabei mit 10⁴/ml am höchsten. Wurde zur langsamen Abkühlung der Kryoröhrchen der Einfrierbehälter Mr. Frosty verwendet, gelang es nicht, einen höheren Virustiter zu erreichen. Die bei -20°C gelagerten Proben wiesen eine etwas geringere TCID₅₀ auf. Allerdings war der Titer bei Proben, die bei 7°C im Kühlschrank gelagert wurden, wider Erwarten nicht niedriger. Erst die Lagerung bei 37°C zeigte, dass weniger infektiöses Material bei der Virusernte gewonnen werden konnte. Diese Beobachtung ließ den Rückschluss zu, dass das Schock-Einfrieren der Viren bei -80°C keinen negativen Einfluss auf den Titer der Kulturen hatte und weiterhin durchgeführt werden konnte.

Anschließend wurde untersucht, ob eine veränderte Kultivierungsdauer eine Verbesserung erzielte. Ansatz 7 und 8 sprechen gegen diese Idee. Kultur 7 wurde 32 Tage lang bebrütet, Kultur 8 nur 13. Die weiteren Versuchsbedingungen waren identisch und die Virustiter wichen kaum voneinander ab. Was die Bebrütungsdauer der Rücktitrationen anbelangt wurden die Platten jeweils so lange mikroskopiert, bis kein Neuauftreten von Synzytien in den Wells mehr zu beobachten war (durchschnittlich ca. 20 Tage).

Trotz variierender Versuchsbedingungen konnte der angestrebte Virustiter nicht erreicht werden.

Nr.	Virus	Viren geerntet an Tag	zentrifugiert	Tiefgekühlt	TCID ₅₀ berechnet an Tag	TCID ₅₀ /ml
1	WT M184V	16	21°C, 1660 U/min, 5 Min.	-80°C Schock	25	WT = 10 ^{1,75} M184V = 10 ^{1,75}
2	M184V Y181C Y181C+M184V	21	21°C, 1660 U/min, 5 Min.	-80°C Schock	25	M184V = 10 ^{1,5} Y181C = 10 ² Y181C+M184V = 10 ^{1,75}
3	WT	22	21°C, 1660 U/min, 5 Min.	-80°C Schock	14	zu niedrig, nicht bestimmt
4	WT	15	4°C, 3040 U/min, 10 Min.	-80°C Schock -80°C Mr.Frosty -20°C 7°C 37°C	19	-80°C Schock = 10 ⁴ -80°C Mr.Frosty = 10 ^{3,75} -20°C = 10 ^{3,5} 7°C = 10 ^{3,75} 37°C = 10 ^{2,75}
5	M184V Y181C Y181C+M184V	21	4°C, 3040 U/min, 10 Min.	-80°C Schock	14	zu niedrig, nicht bestimmt
6	WT M184V Y181C Y181C+M184V	23	4°C, 3040 U/min, 10 Min.	-80°C Schock	20	WT = 10 ^{3,5} M184V = 10 ^{2,5} Y181C = 10 ^{3,25} Y181C+M184V = 10 ^{2,5}
7	WT M184V Y181C Y181C+M184V	32	4°C, 3040 U/min, 10 Min.	-80°C Schock	18	WT = 10 ^{3,5} M184V = 10 ^{3,5} Y181C = 10 ^{3,5} Y181C+M184V = 10 ^{3,75}
8	WT M184V Y181C Y181C+M184V	13	4°C, 3040 U/min, 10 Min.	-80°C Schock	18	WT = 10 ^{3,25} M184V = 10 ^{3,75} Y181C = 10 ^{3,75} Y181C+M184V = 10 ^{3,25}

Tabelle 5: Zusammenfassung der acht Ansätze von Viruszucht und Titerbestimmung. Zur Versuchsoptimierung wurden die Parameter Zentrifugation, Einfrieren und Dauer der Kultivierung variiert. Die letzte Spalte gibt einen Überblick über die erzielten TCID₅₀ - Werte.

Um nachzuweisen, ob die geernteten Kulturen überhaupt Viren enthielten, wurde ein p24 ELISA mit allen vier HI-Virusstämmen durchgeführt. Für jede der Proben war die Viruskonzentration höher als das Maximum der Standardkurve.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch einen weiteren p24 ELISA der Virologie des Max von Pettenkofer Instituts München.

Damit war das Vorhandensein von Viren bei frustraner TCID₅₀-Bestimmung bewiesen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Viren entweder extrem zytopathisch waren und zur Zerstörung ihrer Zielzellen führten, oder aber sie wurden trotz variierten Versuchsbedingungen bei Kultivierung, Zentrifugation oder Einfrieren so geschädigt, dass sie keine Synzytien mehr bilden konnten und damit bei der TCID₅₀-Bestimmung nicht berücksichtigt wurden.

5.2.3 CD4⁺ T-Zellinfektion mit HI-Viren

Aufgrund der problematischen Virustitration, aber mit dem Wissen, dass viel Virus vorhanden war, beschlossen wir für die Infektion der CD4⁺ T-Zellen ein pragmatisches Vorgehen. Verwendet wurden Viruskulturen folgender Titer (siehe Tabelle 5, Ansatz 7):

- NL4-3 Wildtyp mit TCID₅₀ = 10^{3,5}/ml,
- NL4-3 M184V mit TCID₅₀ = 10^{3,5}/ml,
- NL4-3 Y181C mit TCID₅₀ = 10^{3,5}/ml und
- NL4-3 Y181C+M184V mit TCID₅₀ = 10^{3,75}/ml.

Dabei wurden von den Kulturen des Wildtyps und der M184V-Mutation je 0,5 ml, von den anderen beiden Kulturen jeweils 1 ml Material verwendet, ungeachtet der ursprünglich angestrebten MOI. Um die Zahl an infizierten Zellen nachvollziehen und die Dynamik der Zellinfektion beobachten zu können, wurde jeweils nach dem vierten, fünften, sechsten und siebten Tag nach Infektion eine Core-Färbung durchgeführt (vgl. 4.2.13) und die Raten an infizierten Zellen bestimmt. Abb. 10 zeigt das Ergebnis:

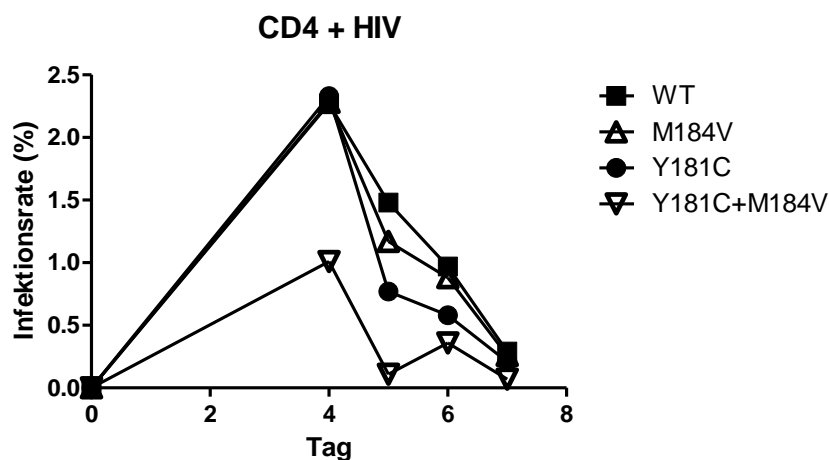


Abbildung 10: Messung der Infektionsrate von CD4⁺ T-Zellen mittels Core-Färbung. Gemessen wurde jeweils an Tag vier, fünf, sechs und sieben.

Aus der Abbildung geht hervor, dass die Infektionsrate an Tag vier am höchsten war und dann an den späteren Tagen abnahm.

Der optimale Zeitpunkt, CD4⁺ T-Zellen nach HIV-Infektion für weitere Versuche zu verwenden, war also am vierten Tag nach Infektion.

In zehn wiederholten Ansätzen wurden CD4⁺ T-Zellen mit allen vier Viren infiziert. Die durchschnittliche Infektionsrate an Tag vier lag dabei bei

- WT: 2,75% (range 0,21 – 13,06%)
- M184V: 2,65% (range 0 – 12%)
- Y181C: 2,85% (range 0 – 13,28%)
- Y181C+M184V: 1,32% (range 0 – 6,45%).

Zwar waren die Durchschnittswerte der verschiedenen Virustypen miteinander vergleichbar, die Spannweite der einzelnen Messungen war jedoch groß. Ebenso konnte mit keinem der Virustypen eine hohe Infektionsrate erzielt werden.

5.2.4 Messung der CD8⁺ T-Zellantwort gegen HIV-1 Mutanten

Das angestrebte Ziel der Arbeit war es, CD4⁺ T-Zellen mit den vier verschiedenen HI-Viren zu infizieren, zu CD8⁺ T-Zellen zu geben und deren zelluläre Reaktion auf diesen Stimulus zu messen. Diese Untersuchung wurde mit CD8⁺ T-Zelllinien von drei Patienten durchgeführt. Es handelte sich dabei um einen Progressor (P3) und zwei Therapieresistente (T2 und T5), wobei P3 und T2 das Peptid YQYVDDLYV (YV9-M184V), T5 das 11mer lange VIYQYVDDLYV (VV11-M184V) als optimales Epitop erkannten.

Bei dem durchgeführten Versuch galt es, das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen, die sog. E:T Ratio (engl. für *Effector Cell to Target Cell Ratio*) zu beachten. Die ersten Versuchsreihen wurden in einem Verhältnis der CD8⁺ zu CD4⁺ T-Zellen von 10:1, 5:1, 2:1 und schließlich 1:1 durchgeführt. Eine deutliche Reaktion der CD8⁺ T-Zellen konnte jedoch nicht detektiert werden. In den folgenden Ansätzen wurde daher das Verhältnis zu Gunsten der infizierten CD4⁺ T-Zellen zu 1:2 verändert.

Die Ergebnisse fielen sehr unterschiedlich aus. Ein Ansatz mit Zellen von Patient P3 wird im Folgenden detailliert dargestellt:

Die verwendeten CD4⁺ T-Zellen zeigten an Tag 4 nach Infektion mit den vier HI-Viren folgende Core-Werte:

- WT: 2,39%
- M184V: 1,8%
- Y181C: 3,22%
- Y181C+M184V: 1,66%

Die CD8⁺ T-Zelllinie zeigte nach Restimulation mit einer peptidbeladenen BCL des Spenders GK eine Spezifität von 39%, was einer sehr guten Spezifität entspricht.

Abb. 11 veranschaulicht das Resultat, wobei die Zytokine IL-2 und TNF- α aufgrund ihrer geringen Reaktion nicht dargestellt sind.

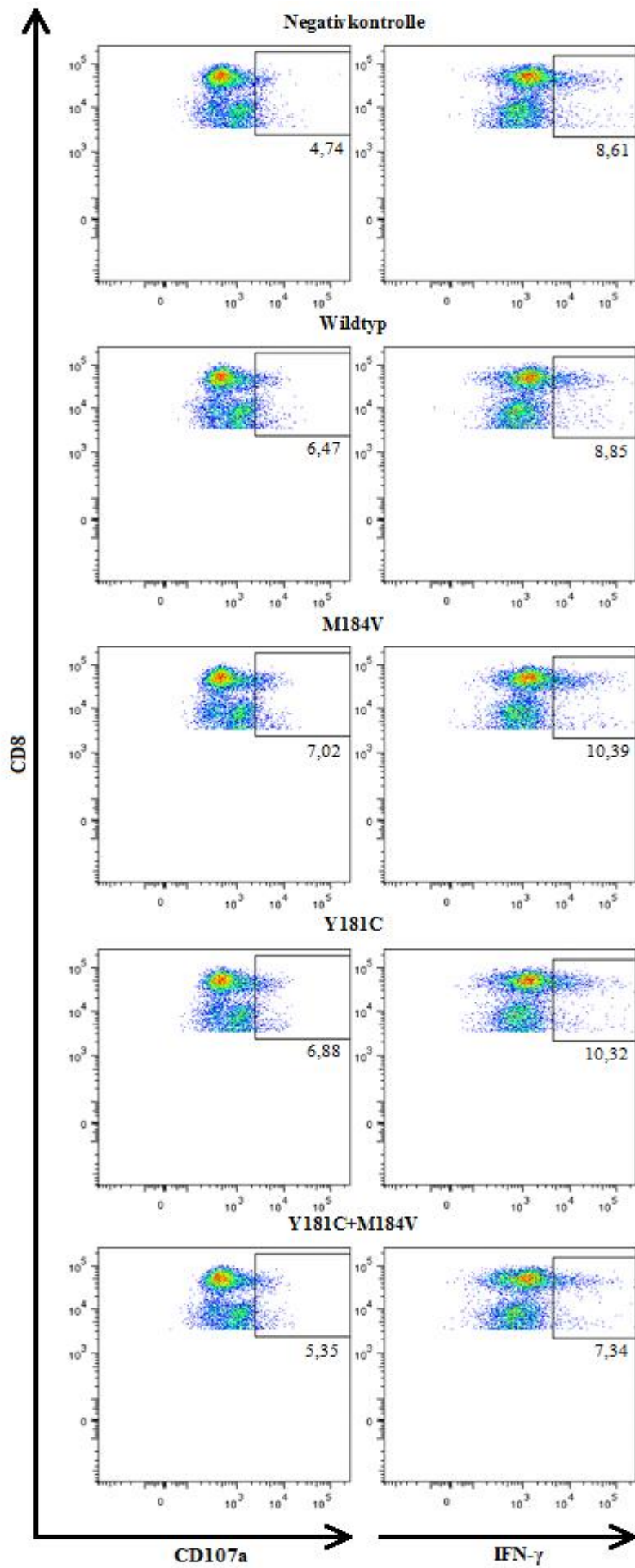


Abbildung 11: **Untersuchung der Effektorfunktionen einer CD8⁺ T-Zelllinie von Patient P3 auf HIV-infizierte CD4⁺ T-Zellen.** Abgebildet sind die ausgewerteten Dot blot-Bilder, die Zahl unter dem Kasten beschreibt die Menge an Zellen in Prozent. Nach Auswahl der CD8⁺ T-Zellen wurde jeweils der Anteil CD107a (linke Spalte) bzw. IFN- γ (rechte Spalte) positiver Zellen selektiert. Dabei wurde die Messung mit einer Negativkontrolle, nach Stimulation mit CD4⁺ T-Zellen plus Wildtyp-Virus, Virus mit M184V-Mutation, Virus mit Y181C-Mutation sowie Virus mit Y181C+M184V-Mutation durchgeführt.

Abb. 12 fasst das Ergebnis für CD107a und IFN- γ noch einmal zusammen.

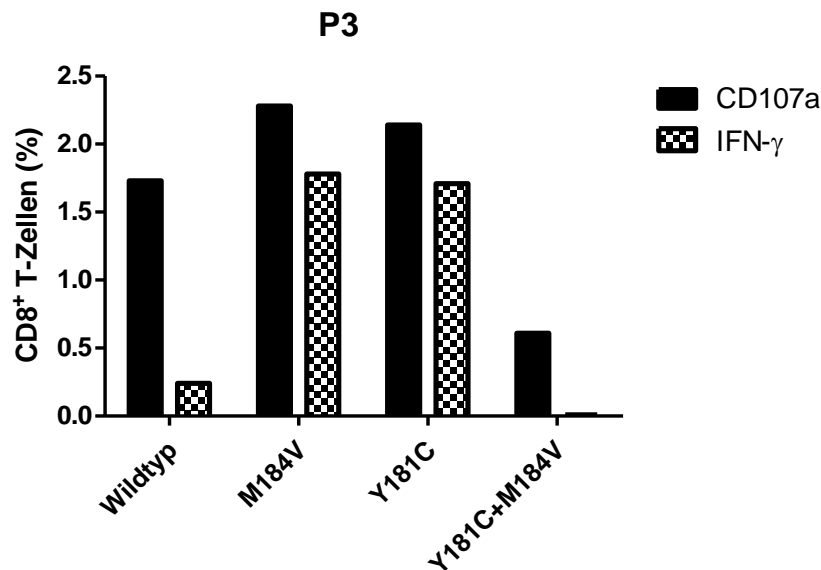


Abbildung 12: **CD8⁺ T-Zellantwort auf Stimulation mit HIV-infizierten CD4⁺ T-Zellen.** Aufgeführt sind die Ergebnisse für die Merkmale CD107a und IFN- γ . Die x-Achse gibt an, mit welchem Virus gearbeitet wurde, auf der y-Achse befindet sich die Prozentangabe der CD8⁺ T-Zellen, die CD107a bzw. IFN- γ produzierten.

Mittels IFN- γ Elispot wurde das mutierte Peptid YV9-M184V als optimales Epitop für Patient P3 ermittelt. Die CD8⁺ T-Zellantwort fällt auf das Virus mit der M184V Mutation stärker aus als auf das Wildtyp-Virus. Wurden die Zellen mit einem Virus infiziert, das nicht M184V sondern Y181C als Medikamentenresistenzmutation trug, fiel die Reaktion der CD8⁺ T-Zellen vergleichbar aus. Trug das Virus beide Mutationen, sank die Zellreaktion deutlich ab.

Ebenso waren CD107a als Degranulationsmarker und IFN- γ als Zytokin unterschiedlich stark vorhanden. Während CD107a sowohl beim Wildtyp-Virus als auch den mutierten Varianten vorhanden war, wurde die IFN- γ Produktion vor allem durch Stimulation mit M184V- bzw. Y181C-mutierten Viren hervorgerufen. Demgegenüber wurden TNF- α und IL-2 bei Stimulation mit HIV-infizierten CD4⁺ T-Zellen nicht höher exprimiert als in

der Negativkontrolle und konnten in diesem Falle das Reaktionsmuster der CD8⁺ T-Zellen nicht repräsentativ darstellen.

Der Versuch zeigt trotz vieler Schwierigkeiten, dass eine CD8⁺ T-Zellantwort gegen mit Virus befallene Zellen sowohl bezüglich der M184V- als auch der Y181C-Mutation besteht und auch beide Mutationen in Kombination von manchen Patienten erkannt werden können.

6 Diskussion

6.1 Gegenüberstellung von Epitope prediction Programmen und experimenteller Epitopkartierung

Da die experimentelle Epitopkartierung ein aufwendiges, zeit- und kostenintensives Verfahren darstellt, wurden zahlreiche bioinformatische Programme entwickelt, die anhand einer vorgegebenen Sequenz optimale Epitope ermitteln und diese mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit vorhersagen sollen. Viele Arbeitsgruppen bedienen sich heutzutage dieser sogenannten „in-silico“ Programme, um Laborversuche ersetzen oder zumindest vereinfachen zu können. In der vorgelegten Arbeit wurden zur Validitätsüberprüfung solcher Prädiktionen die Programme SYFPEITHI, CTLPred und IEDB mit experimentell erzielten Ergebnissen verglichen.

Wurden die Sequenzen ungeachtet des restringierenden HLA-Typen analysiert, konnte das optimale Epitop in 19 der 27 Suchanfragen unabhängig des Rangs richtig ermittelt werden (SYFPEITHI 7/9, CTLPred 3/9, IEDB 9/9). Sollte es sich unter den ersten drei angegebenen Epitopen befinden, sank die Zahl auf 13 von 27 (SYFPEITHI 4/9, CTLPred 2/9, IEDB 7/9).

Interessanterweise gaben die Programme in mehreren Fällen zwar das optimale Epitop richtig an, verbunden allerdings mit unterschiedlichen und nicht passend zum experimentell bestimmten HLA-Typen (vgl. Tabelle 2).

Hier sollte auf das Bestehen von HLA-Supertypen hingewiesen werden, welche bei dieser Beurteilung berücksichtigt werden müssen. Zu HLA-Supertypen werden Allelvarianten zusammengefasst, welche dieselben Ankerpositionen in Epitopen erkennen. Beispielweise zählen zu Molekülen des A2-Supertypes A*02:01, A*02:02, A*02:03, A*68:02 u.v.m. und sie alle binden bevorzugt Peptide mit aliphatischen Aminosäuren an Position 2 und am C-Terminus [64].

In dieser Arbeit wurde das Epitop DVKDTKEAL experimentell als HLA-B*08:01, von SYFPEITHI als HLA-A*02:01 restringiert befundet. Es besteht also eine Diskrepanz über den HLA-Supertypen hinaus (A*02:01 gehört zum Supertyp A02, B*08:01 zu B08). Dies ist möglich, da z.B. HLA-Moleküle der Gruppe B08 Epitope nicht abhängig der typischen Ankerposition 2 und des C-Terminus, sondern anhand Aminosäuren der Positionen 3 und 5 binden [65]. Ein entsprechendes Epitop kann somit mit mehr als nur einem HLA-Allel kompatibel sein [66].

Die weiteren Versuchsergebnisse zeigten, dass die Suche nach von häufiger vorkommenden HLA-Allelen restringierten Epitope erfolgreicher war (siehe Tabelle 4) und auch das Wissen des HLA-Typs die Suche positiv beeinflusste. Grund hierfür sind die die Programme aktualisierenden Datensets, welche von der Auftretenshäufigkeit der verschiedenen HLA-Typen abhängig sind [67]. Da die HLA-Restriktion im Regelfall jedoch bei der Suche mit in-silico Programmen nicht bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, durch das Vorliegen einer seltenen HLA-Ausstattung ein falsch angegebenes Epitop zu übernehmen und das tatsächliche, optimale Epitop aufgrund seines – wenn überhaupt angegeben – niedrigen Ranges zu übersehen. Dies indiziert die Notwendigkeit, weiterhin mehr Daten in die existierenden Programme einzuschließen.

Verschiedene in-silico Programme wurden anhand von Maus-Experimenten evaluiert [68, 69]. Die Studie von Moutaftsi et al. beschrieb dabei eine hohe Genauigkeit von Softwares bei der Prädiktion von CD8⁺ T-Zellepitopen von Vaccinia Viren [68], wobei lediglich zwei MHC-Moleküle in die Analyse einfließen.

Demgegenüber steht die Studie von Bergmann-Leitner et al., in der die Vorhersagen von B- und T-Zellepitopen gegen ein zuvor experimentell bestätigtes Malaria Antigen evaluiert wurden. Auch sie schlussfolgern, dass verfügbare Epitope prediction Programme weiterentwickelt werden müssen und die experimentelle Epitopkartierung bislang nicht ersetzen können [69].

Ein direkter Vergleich von experimentell bestimmten Epitopen im Menschen und bioinformatisch vorhergesagten wurde bislang nicht vorgenommen. Es existiert lediglich eine Studie, die sich näher mit der HLA-Bindung von T-Zellepitopen von Respiratory-Syncytial-Viren (RSV) und Humanen Metapneumoviren beschäftigt [70]. Auch hier hing das Ergebnis stark von der Häufigkeit des restringierenden HLA-Moleküls ab, was den Erkenntnissen der hier durchgeführten Arbeit entspricht.

Im besten Fall konnte in der vorliegenden Arbeit eine Vorhersagegenauigkeit von 78% erreicht werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit anderen, kürzlich veröffentlichten Studien, die ebenfalls mit HIV arbeiteten. Buggert et al. verwendeten dabei den neuen Algorithmus *PopCover*, um HLA II-restringierte HIV-Epitope zu ermitteln. 73% der vorhergesagten Epitope riefen dabei tatsächlich CD4⁺ T-Zellantworten hervor [71]. Ein vergleichbares Ergebnis lieferten Pérez et al.. Mit den Programmen *NetCTL* und *EpiSelect* wurden 184 CD8⁺ HIV T-Zellepitope bestimmt, von denen ein Patient 114

(62%) tatsächlich erkennen konnte [72]. Beide Studien waren allerdings darauf ausgerichtet, aus einem großen Patientenkollektiv immunogene Epitope zu detektieren anstatt, wie in der hier vorgelegten Arbeit, das optimale Epitop eines spezifischen Studienobjektes zu ermitteln.

Alle der hier untersuchten Peptide sind HIV-spezifische CD8⁺ T-Zellepitope. HI-Viren zeichnen sich durch ihre hohe Mutagenität aus, wodurch sie sich der Immunantwort entziehen (siehe 5.2). Oft befinden sich diese sog. Fluchtmutationen in den entsprechenden CD8⁺ T-Zellepitopen. Dies führt zur Ausbildung komplexer HIV-Populationen innerhalb eines infizierten Patienten, man spricht dabei von sog. Quasispezies.

Die in dieser Arbeit analysierten HIV-Sequenzen entsprachen entweder der Konsensussequenz aus dem Jahr 2001 oder stammten von autologen Viren aus Blutproben der jeweiligen Patienten. Aufgrund möglicher Quasispezies kann nicht garantiert werden, dass die untersuchte Sequenz des autologen Virus mit der Konsensussequenz übereinstimmt, was eine valide Epitopvorhersage und die Vergleichbarkeit experimenteller und computergestützter Ergebnisse erschwert.

Studien dagegen, in denen Epitope besser konservierter Pathogene (z.B. Vaccinia-Virus) untersucht wurden, wiesen eine höhere Vorhersagereabilität auf [68]. Die in dieser Arbeit getroffenen Stellungnahmen beziehen sich deshalb nur auf die Vorhersage HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellepitope.

Eine für Forscher große Schwierigkeit stellt die Abundanz an frei verfügbaren, bioinformatischen Epitope prediction Programmen dar. Sie alle beruhen auf unterschiedlichsten Lernalgorithmen und legen ihren Schwerpunkt auf verschiedene Fragestellungen. Die Analysen in dieser Arbeit sollen keinen Vergleich der drei repräsentativ gewählten Programme darstellen. Dennoch konnten in diesem Projekt mit der Software IEDB die besten Ergebnisse erzielt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bioinformatische Programme zum Treffen einer Vorauswahl an zu untersuchenden Peptiden hilfreich sein und die Laborarbeit dadurch erheblich erleichtern können.

Nichtsdestotrotz sprechen die gewonnenen Erkenntnisse für die Wichtigkeit labortechnischer Versuche und zeigen, dass in silico Epitope prediction Programme die experimentelle Epitopkartierung bislang nicht ersetzen können.

6.2 Untersuchung der CD8⁺ T-Zellantwort gegen M184V und Y181C HIV-1 Mutanten

Seit Einführung der antiretroviralen Therapie ist die Mortalität durch eine HIV-Infektion drastisch gesunken. Ein zentrales Problem der medikamentösen Therapie ist die Entwicklung viraler Resistenzmutationen. Klinisch relevant ist hier neben der eine Lamivudin/Emtricitabin-Resistenz erzeugende M184V-Mutation auch die im HIV-Genom benachbart liegende Mutation Y181C, welche eine Resistenz gegen die NNRTIs Efavirenz und Nevirapin bewirkt [14, 15, 17, 19, 20]. Fernziel des geplanten Projekts ist es, eine CD8⁺ T-Zell-basierte, therapeutische Impfung gegen M184V und Y181C zu entwickeln. Hierfür wurde in diesem Abschnitt des Promotionsvorhabens die CD8⁺ T-Zellantwort gegen M184V und Y181C HIV-1 Mutanten untersucht.

Bei der Umsetzung des Vorhabens traten mehrere Schwierigkeiten auf. So konnte trotz zahlreicher Bemühungen, die Versuchsbedingungen beim Kultivieren der Viren zu optimieren, keine für die Durchführung der Versuche zufriedenstellende TCID₅₀ erreicht werden.

Um festzustellen, ob überhaupt HI-Viren in den Kulturen vorhanden waren, wurde daraufhin ein p24 ELISA durchgeführt. Dieser bestätigte das Vorliegen großer Mengen viraler Partikel in den geernteten Kulturen, wobei dies keinen Rückschluss auf die Anzahl lebender Viren zulässt. Somit bleibt offen, ob die Viren der Stocks überhaupt replizierten, ob sie bei der Ernte verloren oder zugrunde gingen oder ob sie nicht in der Lage waren, Wirtszellen zu infizieren. Ebenso wäre das Vorliegen extrem pathogener Viren denkbar, welche die Zielzellen erfolgreich infizierten, diese jedoch schnell zerstörten.

Berücksichtigung sollte hier die im Jahre 2004 veröffentlichte Studie von Marozsan et al. finden [73]. Da die TCID₅₀ Bestimmung nach Reed und Muench wie oben beschrieben ein mühsames und zeitaufwendiges Prozedere darstellt, dessen Berechnung von den verwendeten Zellen und der Auswertungsmethode abhängt, verglichen sie weitere Methoden zur Bestimmung des HIV-Titers. Dabei war die Messung der Reversen Transkriptase-Aktivität allen anderen Messverfahren (p24-Messung, TCID₅₀, virale RNA-Last) überlegen. Die Bestimmung des p24 Proteins sowohl durch ELISA als auch anti-p24 Western Blot stellte dabei zwar ein gutes Messverfahren für die totale Virusmenge dar, jedoch unterscheidet sie nicht zwischen infektiösen, nicht-infektiösen und zerfallenden Viren. So kann freies p24 auch von lysierten Zellen freigesetzt werden

und ebenso wie virale Partikel die p24-Menge erhöhen, ohne dass infektiöses Virus vorliegt.

Die Bestimmung der Reversen Transkriptase-Aktivität könnte in nachfolgenden Arbeit ergänzt werden, um Sicherheit über das Vorhandensein infektiöser HI-Viren zu erhalten.

Trotz niedriger Virustiter wurde eine Infektion von CD4⁺ T-Zellen versucht, ungeachtet der ursprünglich angestrebten MOI. Mehrere Versuche wurden durchgeführt und dabei stets Viren derselben Ernte und somit desselben Titers pro Virus verwendet, um die Ergebnisse miteinander vergleichbar zu machen. Dennoch fiel die Infektionsrate der CD4⁺ T-Zellen unterschiedlich und teilweise niedrig aus.

Bei der anschließenden Untersuchung der Effektorfunktionen der CD8⁺ T-Zellen im Beisein HIV-infizierter CD4⁺ T-Zellen konnte lediglich die Auswertung eines einzigen Ansatzes (Patient P3) Berücksichtigung finden, da aufgrund oben geschilderter Problematik die vorausgesetzten Bedingungen zur Versuchsdurchführung nicht in allen Fällen gegeben waren. Auch bei der Ergebnisbeurteilung von Patient P3 muss das pragmatische Vorgehen berücksichtigt werden.

So waren zum Beispiel die Infektionsraten der CD4⁺ T-Zellen mit den verschiedenen Viren an Tag vier nach Infektion nicht identisch (WT 2,39%, M184V 1,8%, Y181C 3,22%, Y181C+M184V 1,66%). Dennoch wurden die infizierten Zellen jeweils in einer E:T-Ratio von 1:2 zu den CD8⁺ T-Zellen gegeben, wodurch das Verhältnis von infizierten Zellen zu CD8⁺ T-Zellen in den vier Proben leicht verschieden war. Unterschiedlich stark ausgefallene Reaktionen der CD8⁺ T-Zellen könnten also auch darauf zurückzuführen sein, dass mehr oder weniger infizierte Zellen zur Stimulation vorlagen.

Trotz dieser Einschränkung kann das Ergebnis dahingehend interpretiert werden, dass Patient P3 M184V-mutierte, virusinfizierte Zellen besser erkennt als Zellen, die mit dem Wildtyp oder Y181C-mutierten Virus infiziert sind. Trug das infizierende Virus beide Mutationen, wurde es schlechter erkannt und bekämpft. Diese Beobachtung stimmt mit der der Elispot-Ergebnisse überein (siehe Abschnitt 2.5.2) und spricht dafür, dass das Einführen der Y181C-Mutation zu einer Abnahme der spezifischen Immunantwort führt. Erklärt werden kann dies durch die in einem Patienten stattfindende Synthese von CD8⁺ T-Zellen, welche speziell gegen neu auftretende und zum Therapieversagen führende, DRM-tragende Viren gerichtet sind. Patient P3 hat M184V-tragende Viren, jedoch konnte keine Y181C-Mutation nachgewiesen werden, was das Fehlen einer Y181C-gerichteten Immunantwort erklären könnte. Demgegenüber stehen andere Versuche

unserer Arbeitsgruppe (Daten nicht veröffentlicht), welche in drei Fällen therapienaiver Patienten eine starke CD8⁺ T-Zellantwort gegen Peptide mit der Y181C-Mutation nachweisen konnten, wobei Peptide der Wildtypsequenz, der M184V-Mutation und der kombinierten Y181C+M184V-Mutationen keine Immunantwort auslösten. Es handelte sich bei diesen Patienten um Controller, welche bislang keine Therapie erhalten haben.

Ein Erklärungsansatz könnte die 2012 veröffentlichte Studie von Boltz et al. liefern [74]. Dabei wurden Makaken mit SIV infiziert, die die HIV-1 Reverse Transkriptase trugen. Mittels ultrasensitiver, allel-spezifischer PCR wiesen sie die Existenz DRM-tragender Viren vor Beginn einer antiretroviralen Therapie nach, deren Vorkommen bereits mehrfach vermutet wurde [13, 75-80]. Dabei konnte neben der Mutation M184V auch Y181C in geringen Mengen kurz nach der Infektion mit Wildtyp-Viren nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass auch ohne Druck durch die antiretrovirale Therapie Viren vorliegen, die die für ein Therapieversagen verantwortlichen Mutationen tragen, was wiederum das Erkennen dieser Viren durch CD8⁺ T-Zellen erklären könnte. Von welchen Kriterien dieses Auftreten abhängt, ob es zufällig stattfindet, wie stark die Reaktion der CD8⁺ T-Zellen abhängig von der Menge mutierter Viren ist und wie diese Erkenntnis konkret zur Entwicklung einer therapeutischen Impfung beitragen kann, muss in weiteren Untersuchungen erforscht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen jedoch die Vermutung nahe, dass das Erkennen der Mutationen M184V und Y181C möglich ist und somit eine therapeutische Impfung denkbar wäre, welche das Auftreten beider Mutationen verhindern kann.

Betts et al. betonten die herausragende Rolle polyfunktioneller CD8⁺ T-Zellen beim Bekämpfen HIV-infizierter Zellen [81], weshalb IFN- γ als alleiniger Messwert der Zellreaktion nicht ausreichend ist. Vielmehr sollte die Polyfunktionalität der CD8⁺ T-Zellen dargestellt werden, da die HIV-Infektion umso besser kontrolliert wird, je polyfunktioneller diese Zellen sind [53, 82]. Nach Akinsiku et al. ist es besonders IL-2, dessen Expression eine effektive CD8⁺ T-Zellantwort abbildet [83] und daher bei erfolgreicher Virussuppression messbar wird [84, 85].

In dem durchgeführten Versuch mit Zellen von Patient P3 fiel auf, dass die Reaktion nur für CD107a und IFN- γ messbar war; IL-2 dagegen wurde ebenso wie TNF- α bei der Inkubation mit virusinfizierten Zellen nicht stärker exprimiert als es in der Negativkontrolle der Fall war. Das geringe Maß an Polyfunktionalität und dabei

besonders das Fehlen von IL-2 lässt dementsprechend auf eine geringe Effektivität der CD8⁺ T-Zellreaktion rückschließen.

Die Begründung könnte im Zeitpunkt der Blutentnahme liegen. Die Entwicklung neuer CD8⁺ T-Zellantworten nach Auftreten von Medikamentenresistenzmutationen wurde bereits mehrfach beschrieben [86-89]. Roeder et al. untersuchten diese Zellreaktion auf Polyfunktionalität und stellten fest, dass, im Vergleich zur ursprünglichen Reaktion auf das nicht mutierte Virus, die neue Reaktion weniger Effektorfunktionen aufwies [90]. Stammen die CD8⁺ T-Zellen von Patient P3 also von einem Zeitpunkt, an dem bereits DRM vorlagen, könnten auch sie eine neu generierte, schwächere Antwort repräsentieren und daher weniger Effektorfunktionen aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die für die Erfassung der Polyfunktionalität von CD8⁺ T-Zellen bei der Inkubation mit HIV-infizierten CD4⁺ T-Zellen Optimierungsbedarf aller Teilversuche besteht. Anhand der hier durchgeführten Experimente können nur eingeschränkt Aussagen zur Reaktionsweise und -stärke der Zellen gemacht werden. Um dieser Fragestellung weiter auf den Grund zu gehen, wäre erneutes Kultivieren frisch hergestellter HI-Viren nötig mit dem Ziel, geeignet hohe Virustiter zu erreichen, um dann anhand einer in allen Ansätzen identischen MOI CD4⁺ T-Zellen infizieren zu können.

Durch die Optimierung der genannten Punkte könnten die Ergebnisse reevaluiert werden und die dadurch gewonnene Erkenntnis zur Entwicklung einer therapeutischen Impfung beitragen. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse können dabei als wertvolle Hilfestellung dienen.

7 Quellenverzeichnis

1. UNAIDS. *World AIDS Day Report 2012*. 2012; unter: <http://www.unaids.org/en/> (abgerufen am 06.09.2013).
2. Gottlieb, M. and R. Schroff, *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
3. Ferguson, M.R. and D.R. Rojo, *HIV-1 replication cycle*. Clin Lab Med, 2002. **22**(3): p. 611-635.
4. Freed, E.O., *HIV-1 replication*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
5. Suzuki, Y. and Y. Suzuki. *Gene Regulatable Lentiviral Vector System, Viral Gene Therapy*. 2011; unter: <http://www.intechopen.com/books/viral-gene-therapy/gene-regulatable-lentiviral-vector-system> (abgerufen am 01.09.2013).
6. WHO. *Consolidated Guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection*. 2013; unter: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/download/en/> (abgerufen am 08.10.2013).
7. Borrow, P., et al., *Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 205-11.
8. Goulder, P.J., et al., *Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 212-7.
9. Bronke, C., et al., *HIV escape mutations occur preferentially at HLA-binding sites of CD8 T-cell epitopes*. AIDS, 2013. **27**(6): p. 899-905.
10. Draenert, R., et al., *Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 905-15.
11. Temin, H.M., *Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 6900-3.
12. Mansky, L.M. and H.M. Temin, *Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 5087-94.
13. Coffin, J.M., *HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy*. Science, 1995. **267**(5197): p. 483-9.
14. Svicher, V., et al., *Different evolution of genotypic resistance profiles to emtricitabine versus lamivudine in tenofovir-containing regimens*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010. **55**(3): p. 336-44.

15. Bulteel, N., et al., *The emergence of drug resistant HIV variants at virological failure of HAART combinations containing efavirenz, tenofovir and lamivudine or emtricitabine within the UK Collaborative HIV Cohort*. J Infect, 2014. **68**(1): p. 77-84.
16. Vollbrecht, T., et al., *Control of M184V HIV-1 mutants by CD8 T-cell responses*. Med Microbiol Immunol, 2012. **201**(2): p. 201-11.
17. Maserati, R., et al., *Emerging mutations at virological failure of HAART combinations containing tenofovir and lamivudine or emtricitabine*. AIDS, 2010. **24**(7): p. 1013-8.
18. Theys, K., et al., *Predicted residual activity of rilpivirine in HIV-1 infected patients failing therapy including NNRTIs efavirenz or nevirapine*. Clin Microbiol Infect, 2015.
19. Xu, H.T. and M. Oliveira, *Molecular Mechanism of Antagonism between the Y181C and E138K Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase*. J Virol, 2012. **68**(23): p. 12983-12990.
20. Anta, L., et al., *Rilpivirine resistance mutations in HIV patients failing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapies*. AIDS, 2013. **27**(1): p. 81-5.
21. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(10): p. 702-9.
22. Saethang, T., et al., *EpicCapo: epitope prediction using combined information of amino acid pairwise contact potentials and HLA-peptide contact site information*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 313.
23. Doherty, P.C. and R.M. Zinkernagel, *Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex*. Nature, 1975. **256**(5512): p. 50-2.
24. Ruppert, J., et al., *Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules*. Cell, 1993. **74**(5): p. 929-37.
25. Madden, D.R., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley, *The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2*. Cell, 1993. **75**(4): p. 693-708.
26. Rognan, D., et al., *Predicting binding affinities of protein ligands from three-dimensional models: application to peptide binding to class I major histocompatibility proteins*. J Med Chem, 1999. **42**(22): p. 4650-8.
27. Doytchinova, I.A. and D.R. Flower, *Toward the quantitative prediction of T-cell epitopes: coMFA and coMSIA studies of peptides with affinity for the class I MHC molecule HLA-A*0201*. J Med Chem, 2001. **44**(22): p. 3572-81.
28. Rammensee, H.G., T. Friede, and S. Stevanović, *MHC ligands and peptide motifs: first listing*. Immunogenetics, 1995. **41**(4): p. 178-228.
29. Yang, X. and X. Yu, *An introduction to epitope prediction methods and software*. Rev Med Virol, 2009. **19**(2): p. 77-96.

30. Falk, K., et al., *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. Nature, 1991. **351**(6324): p. 290-6.
31. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
32. Bhasin, M. and G.P. Raghava, *Prediction of CTL epitopes using QM, SVM and ANN techniques*. Vaccine, 2004. **22**(23-24): p. 3195-204.
33. Yu, K., et al., *Methods for prediction of peptide binding to MHC molecules: a comparative study*. Mol Med, 2002. **8**(3): p. 137-48.
34. Buus, S., et al., *Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a 'Query by Committee' artificial neural network approach*. Tissue Antigens, 2003. **62**(5): p. 378-84.
35. Schölkopf, B. and A. Smola, *Learning with Kernels: Support Vector Machines, Regularization, Optimization, and Beyond*. 1 ed. 2002, Cambridge: MIT Press.
36. Bhasin, M. and G.P. Raghava. *CTLPred: Prediction of CTL epitopes using QM, SVM and ANN techniques*. 2004; unter: www.imtech.res.in/raghava/ctlpred/index.html (abgerufen am 26.11.2013).
37. Abidi, S.H., et al., *Population-specific evolution of HIV Gag epitopes in genetically diverged patients*. Infect Genet Evol, 2013. **16**: p. 78-86.
38. Peters, B., et al., *The design and implementation of the immune epitope database and analysis resource*. Immunogenetics, 2005. **57**(5): p. 326-36.
39. Peters, B. *The Immune Epitope Database and Analysis Resource*. 2010; unter: www.iedb.org (abgerufen am 26.11.2013).
40. Chen, P., S. Rayner, and K.H. Hu, *Advances of bioinformatics tools applied in virus epitopes prediction*. Virol Sin, 2011. **26**(1): p. 1-7.
41. Walker, C.M., et al., *CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication*. Science, 1986. **234**(4783): p. 1563-6.
42. Koup, R.A., et al., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4650-5.
43. Valitutti, S., et al., *Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1917-21.
44. Levy, J.A., C.E. Mackewicz, and E. Barker, *Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells*. Immunol Today, 1996. **17**(5): p. 217-24.
45. Schmitt, M., et al., *Specific recognition of lamivudine-resistant HIV-1 by cytotoxic T lymphocytes*. AIDS, 2000. **14**(6): p. 653-8.

46. Back, N.K., et al., *Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme*. EMBO J, 1996. **15**(15): p. 4040-9.
47. Wainberg, M.A., et al., *Enhanced fidelity of 3TC-selected mutant HIV-1 reverse transcriptase*. Science, 1996. **271**(5253): p. 1282-5.
48. Douek, D.C., et al., *Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 690-5.
49. Peters, P.J., et al., *Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1099-109.
50. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation*. J Immunol Methods, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.
51. Appay, V., D.C. Douek, and D.A. Price, *CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease*. Nat Med, 2008. **14**(6): p. 623-8.
52. Klooverpris, H.N., et al., *Early antigen presentation of protective HIV-1 KF11Gag and KK10Gag epitopes from incoming viral particles facilitates rapid recognition of infected cells by specific CD8+ T cells*. J Virol, 2013. **87**(5): p. 2628-38.
53. Makedonas, G. and M.R. Betts, *Polyfunctional analysis of human t cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection*. Springer Semin Immunopathol, 2006. **28**(3): p. 209-19.
54. Douek, D.C., M. Roederer, and R.A. Koup, *Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 471-84.
55. Mason, R.D., et al., *Antiretroviral drug resistance mutations sustain or enhance CTL recognition of common HIV-1 Pol epitopes*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 7212-9.
56. Samri, A., et al., *Immunogenicity of mutations induced by nucleoside reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T cells*. J Virol, 2000. **74**(19): p. 9306-12.
57. LosAlamosDatabase. *HIV Sequence Database Compendium*. 2001; unter: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/hiv/compendium/2001/hiv1proteins.pdf> (abgerufen am 03.09.2013).
58. Tripmacher, R. *Untersuchungen zu Wirkungen einer eingeschränkten Energiesynthese auf Funktionen von humanen Immunzellen*. 2005; unter: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/tripmacher-robert-2005-05-13/HTML/> (abgerufen am 09.10.2013).
59. *From information on the medicine of specialized field to general*; unter: <http://kusuri-jouhou.com/immunity/kougen.html> (abgerufen am 10.10.2013).
60. Reed, L.J. and H. Muench, *A simple method of estimating fifty percent endpoints*. Am J Hyg, 1938. **27**(3): p. 493-497.

61. Frahm, N., et al., *Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2187-200.
62. Goulder, P.J., et al., *Identification of a novel HLA-A24-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope within HIV-1 Nef*. AIDS, 1997. **11**(15): p. 1883-4.
63. Ikeda-Moore, Y., et al., *Identification of a novel HLA-A24-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope derived from HIV-1 Gag protein*. AIDS, 1998. **12**(15): p. 2073-4.
64. Sette, A. and J. Sidney, *Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 201-12.
65. Sidney, J., et al., *HLA class I supertypes: a revised and updated classification*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 1.
66. Leslie, A., et al., *Differential selection pressure exerted on HIV by CTL targeting identical epitopes but restricted by distinct HLA alleles from the same HLA supertype*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4699-708.
67. Peters, B., et al., *A community resource benchmarking predictions of peptide binding to MHC-I molecules*. PLoS Comput Biol, 2006. **2**(6): p. e65.
68. Moutaftsi, M., et al., *A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(7): p. 817-9.
69. Bergmann-Leitner, E.S., et al., *Computational and experimental validation of B and T-cell epitopes of the in vivo immune response to a novel malarial antigen*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71610.
70. Rock, M.T., et al., *Identification of potential human respiratory syncytial virus and metapneumovirus T cell epitopes using computational prediction and MHC binding assays*. J Immunol Methods, 2011. **374**(1-2): p. 13-7.
71. Buggert, M., et al., *Characterization of HIV-specific CD4+ T cell responses against peptides selected with broad population and pathogen coverage*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e39874.
72. Perez, C.L., et al., *Broadly immunogenic HLA class I supertype-restricted elite CTL epitopes recognized in a diverse population infected with different HIV-1 subtypes*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 5092-100.
73. Marozsan, A.J., et al., *Relationships between infectious titer, capsid protein levels, and reverse transcriptase activities of diverse human immunodeficiency virus type I isolates*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 11130-41.
74. Boltz, V.F., et al., *Ultrasensitive allele-specific PCR reveals rare preexisting drug-resistant variants and a large replicating virus population in macaques infected with a simian immunodeficiency virus containing human immunodeficiency virus reverse transcriptase*. J Virol, 2012. **86**(23): p. 12525-30.

75. Domingo, E., L. Menendez-Arias, and J.J. Holland, *RNA virus fitness*. Rev Med Virol, 1997. **7**(2): p. 87-96.
76. Halvas, E.K., et al., *Low frequency nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in treatment-experienced patients*. J Infect Dis, 2010. **201**(5): p. 672-80.
77. Johnson, J.A., et al., *Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy*. PLoS Med, 2008. **5**(7): p. e158.
78. Kearney, M., et al., *Frequent polymorphism at drug resistance sites in HIV-1 protease and reverse transcriptase*. AIDS, 2008. **22**(4): p. 497-501.
79. Palmer, S., et al., *Selection and persistence of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant HIV-1 in patients starting and stopping non-nucleoside therapy*. AIDS, 2006. **20**(5): p. 701-10.
80. Paredes, R., et al., *Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure*. J Infect Dis, 2010. **201**(5): p. 662-71.
81. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
82. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, *T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 247-58.
83. Akinkunju, O.T., et al., *Interleukin-2 production by polyfunctional HIV-1-specific CD8 T cells is associated with enhanced viral suppression*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2011. **58**(2): p. 132-40.
84. Zimmerli, S.C., et al., *HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(20): p. 7239-44.
85. Emu, B., et al., *Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 14169-78.
86. Allen, T.M., et al., *De novo generation of escape variant-specific CD8+ T-cell responses following cytotoxic T-lymphocyte escape in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 12952-60.
87. Bailey, J.R., et al., *Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1357-69.
88. O'Connell, K.A., et al., *Viral suppression of multiple escape mutants by de novo CD8(+) T cell responses in a human immunodeficiency virus-1 infected elite suppressor*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 63.

-
89. Feeney, M.E., et al., *HIV-1 viral escape in infancy followed by emergence of a variant-specific CTL response*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7524-30.
 90. Roider, J., et al., *Adaptation of CD8 T cell responses to changing HIV-1 sequences in a cohort of HIV-1 infected individuals not selected for a certain HLA allele*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e80045.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

3TC	Lamivudin
Abb.	Abbildung
ABC	Abacavir
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANN	Artificial Neural Network
AZT	Zidovudin
BCL	B-Zelllinie
Comblib	Scoring Matrices derived from Combinatorial Peptide Libraries
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
bzw.	beziehungsweise
d4T	Stavudin
ddi	Didanosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRM	Drug resistance mutations
EBV	Epstein-Barr-Virus
EFV	Efavirenz
Elispot	Enzyme-linked immunospot assay
engl.	Englisch
ETV	Etravirin
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FTC	Emtricitabin
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Human leukocyte antigen
ICS	Intracellular cytokine staining
IEDB	Immune Epitope Database and Analysis Resource
IMTECH	Institute of Microbial Technology
kBp	Kilo-Basenpaare
MHC	Major histocompatibility complex
MOI	Multiplicity of Infection

NNRTI	Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NVP	Nevirapin
ORFs	Open Reading Frames
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Proteaseinhibitoren
RPV	Rilpivirin
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
SFC	Spot forming cells
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SMM	Stabilized Matrix Method
SMMPMBEC	SMM with a Peptide:MHC Binding Energy Covariance matrix
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SVM	Support Vector Machine
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCR	T-Zell-Rezeptor
TDF	Tenofovir
u.a.	unter anderem
u.v.m.	und vieles mehr
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des HIV-Genoms	3
Abbildung 2:	Bindungsstelle von Peptid und HLA-Molekül	7
Abbildung 3:	Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll®	20
Abbildung 4:	Prinzip des Enzyme-linked immunospot assays.....	22
Abbildung 5:	Bestimmen der HLA-Restriktion eines beliebigen Patienten mit den HLA-Merkmalen HLA-A*02:01, -A*03:01, -B*15:01, -B*57:03, -C*03:04, -C*07:01	25
Abbildung 6:	Anlegen und Ausplattieren der Verdünnungsreihe eines HIV- Stocks	27
Abbildung 7:	Virus-Endpunkt titration auf einer 24-Well Platte	28
Abbildung 8:	Auswahl der Lymphozyten.....	30
Abbildung 9:	IFN- γ Elispot-Ergebnisse für zwei Patienten nach Peptidstimulation..	39
Abbildung 10:	Messung der Infektionsrate von CD4 ⁺ T-Zellen mittels Core- Färbung.....	42
Abbildung 11:	Untersuchung der Effektorfunktionen einer CD8 ⁺ T-Zelllinie von Patient P3 auf HIV-infizierte CD4 ⁺ T-Zellen	46
Abbildung 12:	CD8 ⁺ T-Zellantwort auf Stimulation mit HIV-infizierten CD4 ⁺ T-Zellen	46

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die in der Arbeit vorkommenden Patienten	20
Tabelle 2:	Liste der acht analysierten Patienten	35
Tabelle 3:	Bekannte HLA-Restriktion führt zu einer verbesserten Rangfolge der Suchergebnisse	35
Tabelle 4:	Häufig auftretende HLA- Typen sind mit besseren Vorhersageergebnissen verbunden	36
Tabelle 5:	Zusammenfassung der acht Ansätze von Viruszucht und Titerbestimmung.....	41

9 Publikation

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Roider J., Meissner T., **Kraut F.** et al, *Comparison of experimental fine-mapping to in silico prediction results of HIV-1 epitopes reveals ongoing need for mapping experiments.* Immunology (2014).

10 Danksagung

Das Verfassen dieser Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung und Hilfe bestimmter Personen nicht möglich gewesen, weshalb es mir ein Bedürfnis ist, folgende Dankesworte zu formulieren:

Ich danke dem Leiter der Sektion für Klinische Infektiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik, Herrn Prof. Dr. med. Johannes Bogner, für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung erstellen zu dürfen.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Doktormutter, Frau PD. Dr. med. Rika Draenert, für ihre selbstlose Unterstützung sogar über den Rahmen meiner Doktorarbeit hinaus. Jederzeit war sie mir eine greifbare Hilfe, hielt Antworten auf Fragen aller Art bereit und behielt stets das Ziel der Arbeit vor Augen. Als nie enden wollende Quelle von Wissen und Ideenreichtum lehrte sie mich nicht nur das wissenschaftliche Arbeiten, sondern auch was es heißt, Forscher, praktizierender Arzt und Familienmensch in einem zu sein. Ihre Lebensart ist mir über die gemeinsame Zeit hinweg ein wertvolles Vorbild geworden.

Ein großer Dank geht an meine Betreuerin, Frau Dr. med. Julia Roider. Trotz ihrer klinischen Tätigkeit war sie mir ein Ansprechpartner auf Augenhöhe und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Die Zusammenarbeit mit ihr war sehr bereichernd.

Von Herzen danken möchte ich Frau Renate Stirner, die nicht umsonst als gute Seele des Labors bezeichnet wird. Mit ihrem Wissen über jegliche Methodik und Laborarbeit unterstützte und erleichterte sie mir das experimentelle Arbeiten enorm. Jedoch sind es vor allem ihr Zuspruch, ihr Verständnis und ihr in sich ruhender Charakter, der sie für mich zu einem unentbehrlichen Motivator machte. Ihr Lachen brachte so manchen frustrierenden Tag wieder in Ordnung und sorgte dafür, dass ich immer gerne das Labor betrat. Ohne sie hätte ich mein Ziel nicht erreicht.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Stets begleiteten sie mich mit offenen Ohren und Herzen und die Bedingungslosigkeit ihrer Liebe ermöglicht es mir, auf Stein zu bauen.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Franziska Kraut
 Geburtsdatum/-ort: 28.06.1988 in Bad Friedrichshall
 Wohnort: Heinz-Hilpert-Str.4, 81739 München

Universitätsstudium

Juni 2015 Staatsexamen

Mai 2014 – April 2015 Praktisches Jahr:

1. Tertial: Innere Medizin im Krankenhaus Agatharied, Hausham

2. Tertial: Neurologie im Klinikum Harlaching, München und im Institute of Neurology, London

3. Tertial: Chirurgie im Kantonsspital Luzern

März 2012 Beginn der Promotionsarbeit zum Thema „Gegenüberstellung von experimenteller versus computergestützter Bestimmung von HIV-Epitopen sowie Untersuchung der polyfunktionellen CD8⁺ T-Zellantworten gegen Y181C- und M184V-HIV-Mutanten“ (Betreuung: PD Dr. med. R. Draenert)

Oktober 2008 – September 2015 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Publikation

Roider J., Meissner T., **Kraut F.** et al, *Comparison of experimental fine-mapping to in silico prediction results of HIV-1 epitopes reveals ongoing need for mapping experiments.* Immunology (2014)

Stipendium

Else Kröner-Fresenius-Stiftung Gynaecology and Obstetrics Undergraduate Exchange Program^{LMU}

Praktika

Famulaturen

März 2011	Chirurgie, Klinikum Mariahilf, Hamburg
September 2011	Innere Medizin und Geriatrie, Centre Hospitalier de Bayeux, Frankreich
September 2012	Infektiologie, Klinikum der Universität München
März 2013	Pädiatrie, Diocesan Hospital Litembo, Tansania

Klinisches Praktikum

April – Mai 2013	Gynäkologie, Jimma University, Äthiopien
------------------	--

Schulausbildung

1994 – 1998	Heinrich-Kaim-Schule in Schelklingen
1998 – 2004	Karl-Spohn Realschule in Gerhausen
2004 – 2007	Studienkolleg Obermarchtal in Obermarchtal Abschluss: Abitur

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

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

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

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

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand