

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

**Definition von HIV1- spezifischen CD8+ T- Zellepitopen,
welche die Position von
Medikamentenresistenzmutationen enthalten**

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

Vorgelegt
von Tim Laurin Meissner
aus Hannover

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. Rika Draenert

Mitberichterstatler: Prof. Dr. Thomas Brocker
PD Dr. Christof Geldmacher

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Julia Roider

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

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 01. 2017

Inhalt

Inhalt	I
1 Einleitung	1
1.1 Das Humane Immundefizienzvirus	1
1.1.1 Pathophysiologie	1
1.1.1.1 Struktur des HI- Virus	1
1.1.1.2 Replikationszyklus	3
1.1.2 Epidemiologie	4
1.1.3 Klinik der unbehandelten HIV-Infektion	5
1.1.4 Therapie der HIV-Infektion	7
1.1.4.1 Wirkstoffklassen	7
1.1.4.2 Kombinationstherapie	8
1.1.4.3 ART Resistenzmutationen	9
1.1.5 Immunantworten auf das HI- Virus	10
1.1.5.1 Arten der Immunantwort	10
1.1.5.2 Therapeutische Impfung	12
1.2 Fragestellung der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Labormaterial	13
2.1.1 Plastikwaren und Verbrauchsartikel	13
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits	14
2.1.3 Antikörper	15
2.1.4 Geräte	16
2.2 Peptide	17
2.2.1 Überlappende 15-20mer Peptide	17
2.2.2 Peptide für die Truncationen	18
2.3 Patienten	19
2.4 Software	21
2.5 Zellen	22

2.5.1	Nährmedien	22
2.5.2	PBMC- Isolation	23
2.5.3	Automatisierte Zellzählung	23
2.5.4	Manuelle Zellzählung und Bestimmung der Vitalität mit Trypanblau	24
2.5.5	Kryokonservierung	24
2.5.6	Auftauen von Zellen	24
2.5.7	Herstellen von Futterzellen (= feeder cells)	24
2.5.8	CD8+ T- Zell- Linien	25
2.5.9	Lymphoblastoide B- Zell- Linien	26
2.6	Elispot	27
2.6.1	Methodik	27
2.6.2	Pol- Elislots	28
2.6.3	Titrations- Elislots	28
2.7	Durchflusszytometrie	28
2.7.1	Methodik	28
2.7.2	Überprüfung von CD8+ T-Zell-Linien auf Spezifität und Polyfunktionalität	29
2.7.3	Bestimmung der HLA- Restriktion	30
2.8	DNA- Gewinnung und HLA- Typisierung	31
3	Ergebnisse	32
3.1	CD8+ T- Zellantworten im Bereich von HIV- Pol	32
3.2	Epitop- Kartierung von drei CD8+ T- Zellantworten	34
3.2.1	HLA- Typisierung der Patienten	34
3.2.2	Epitop- Vorhersagen durch das Programm SYFPEITHI	35
3.3	Experimentelle Epitopbestimmung	36
3.3.1	Anlegen von CD8+ T- Zell- Linien	36
3.3.2	IEELRQHLL (IL9) als optimales Epitop für P18	38
3.3.3	EKEGKISKI (EI9) als optimales Epitop für T61	40
3.3.4	KKKSVTVLDVG (KG11) als optimales Epitop für T77	42
4	Diskussion	44
5	Zusammenfassung	47
6	Anhang	49
6.1	Tabellenverzeichnis	49

6.2	Abbildungsverzeichnis.....	49
6.3	Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit.....	50
6.4	Abkürzungsverzeichnis.....	50
7	Literaturverzeichnis	53
8	Danksagung	59
9	Lebenslauf.....	60
10	Eidesstattliche Erklärung	62

1 Einleitung

Zu Beginn der 80-er Jahre des letzten Jahrhunderts zeigte sich bei zuvor gesunden homosexuellen Männern eine Anhäufung von seltenen Erkrankungen wie dem Kaposi-Sarkom und Pneumocystis- pneumoniae Pneumonien, in dessen Zusammenhang zum ersten Mal das Immunschwächesyndrom (engl. acquired immunodeficiency syndrom, AIDS) beschrieben wurde [1, 2]. 1983 konnte ein bis dahin unbekanntes Virus isoliert werden und bereits ein Jahr später ein Zusammenhang zwischen diesem, seit 1986 als Humanes Immundefizienzvirus (HIV) bezeichneten Erreger und AIDS hergestellt werden [3, 4].

Mit heute über 37 Millionen Infizierten weltweit [5] hat sich das HI- Virus seither zu einer weltweiten Epidemie mit erheblichen sozialen und wirtschaftlichen Herausforderungen entwickelt. Der Verlauf der Erkrankung ist unbehandelt in der Regel letal.

Bis heute wurde das Virus in umfangreicher Weise erforscht, sodass mittlerweile wirksame Medikamente zur Verfügung stehen. Es gelang jedoch bisher nicht eine kurative Therapie oder einen Impfstoff zu entwickeln.

1.1 Das Humane Immundefizienzvirus

1.1.1 Pathophysiologie

1.1.1.1 Struktur des HI- Virus

Das HI- Virus ist ein behülltes RNA- Retrovirus aus der Gruppe der Lentiviren. Es kann nur über Körperflüssigkeiten von Mensch zu Mensch übertragen werden. Bekannt sind mindestens 2 verwandte Arten, HIV 1 und HIV 2, wobei HIV 1 deutlich virulenter und weltweit für den mit Abstand Großteil der Infektionen verantwortlich ist [6]. Es ging vermutlich bereits in den 1920er Jahren aus dem Simianen Immundefizienz- Virus (SIV) des Affen hervor. Anhand der Sequenz wird HIV in die 3 Hauptgruppen M (main), O (out) und N (non-M, non-O) eingeteilt, welche untereinander nur entfernte Verwandtschaft besitzen [7].

Strukturell besteht das Virus, wie in Abb. 1 gezeigt, aus 9 Genen, welche von langen terminalen Wiederholungen (engl. long terminal repeats, LTR) eingerahmt werden. Diese sind für die Integration des Provirus in die DNA (engl. deoxyribonucleic acid) der Wirtszelle von Bedeutung. Die 3 Strukturgene sind Gag (engl. group antigen), Pol (engl. polymerase) und Env (engl. envelope). Das Pol-Gen trägt die Information für die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) und somit für die Enzyme der Virusreplikation und –integration sowie der Reifung des Virus. Das Gag- Gen codiert Strukturproteine für das Kernstück des Virus und das Env- Gen die Glykoproteine der Virushülle. Darüber hinaus bestehen 6 kürzere akessorische Gene (Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev und Nef), welche an Regulation, Replikation und effizienter Virusreproduktion beteiligt sind [8].

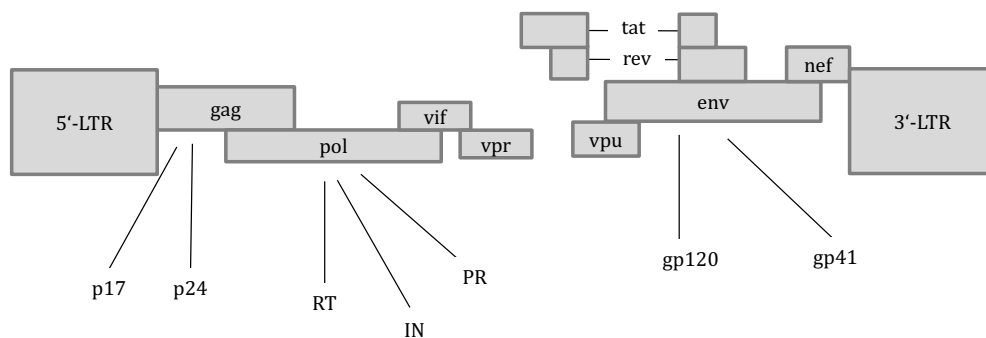


Abbildung 1: Gene des HI- Virus [9]

Dargestellt ist das Pol-Gen mit seinen Produkten (RT, IN, PR), das Env- Gen mit seinen Produkten (GP120 und GP41) sowie das Gag- Gen mit seinen Produkten (p17, p24 und p7). Darüber hinaus sind die 6 akessorischen Gene (Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev und Nef) dargestellt. Die 9 Gene werden von LTRs eingerahmt.

Ein Virion des HI- Virus besteht, wie Abb. 2, zeigt aus 2 Kopien des RNA- Genoms und diversen Kopien der für die ersten Stufen der Infektion und Replikation benötigten Enzyme Integrase und Reverse Transkriptase. Diese sind vom Gag- codierten p24- Nukleosid umhüllt, welches wiederum von p17- Matrixproteinen umschlossen wird. An der Außenseite befinden sich die Env- codierten Glykoproteine gp41 und gp120 [10].

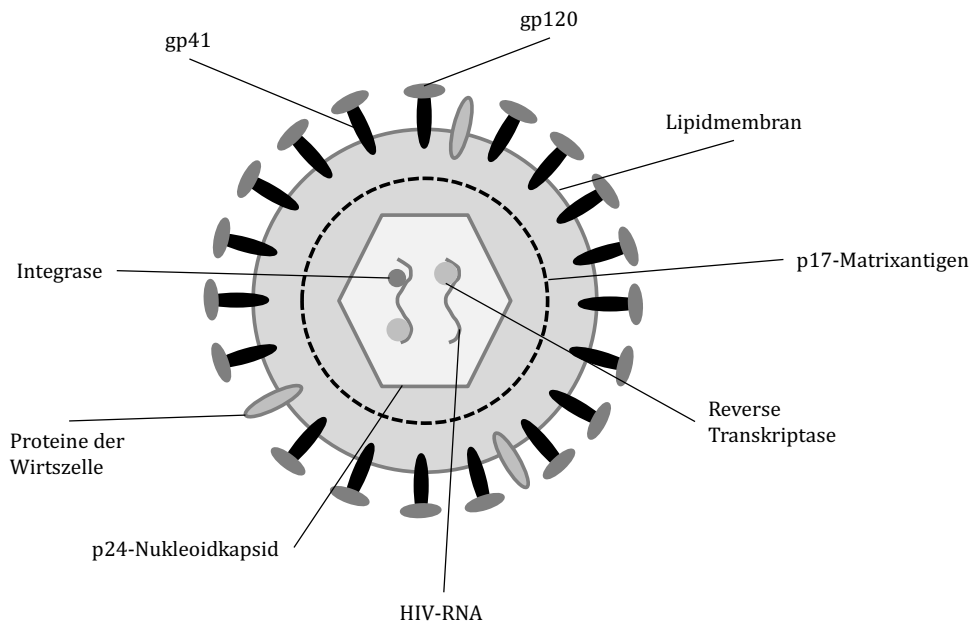


Abbildung 2: HI- Virion

Im Inneren des Virions befindet sich die virale RNA sowie die Proteine RT und IN. Diese sind umschlossen durch das p24- Nukleosidkapsid, p17- Matrixproteine und nach außen durch eine Lipidmembran. In diese sind die Glykoproteine der Außenseite eingebettet sind.

1.1.1.2 Replikationszyklus

Die Fähigkeit des Virus, in bestimmte Zelltypen einzudringen, bezeichnet man als Tropismus. Zielzellen sind u.a. CD4+ T-Zellen [11], aber auch Makrophagen und dendritische Zellen. Zum Eindringen in die Zielzelle benötigt das Virus zudem einen Ko- Rezeptor, wobei CCR5- von CXCR4- tropischen Viren unterschieden werden [12, 13]. Bei Infektion einer Zelle bindet das Glykoprotein 120 (GP120) an CD4- Rezeptor und den jeweiligen Ko- Rezeptor, woraufhin das Glykoprotein 41 (GP41) freigesetzt wird und die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran bewirkt. Auf diese Weise gelangt virale RNA in das Zytosol der Zelle und wird mittels der RT zunächst in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Aufgrund des Fehlens einer Korrekturlese- und Exonukleasefunktion arbeitet die RT mit einer sehr hohen Fehlerquote [14]. Dies erklärt die insbesondere unter Selektionsdruck schnell auftretenden Mutationen im viralen Genom. Die cDNA wird in der Folge durch das Protein Integrase in die zelleigene DNA integriert. Die Zelle ist nun infiziert, wobei die integrierte cDNA- Kopie als Provirus bezeichnet wird. In aktivierten CD4+ Zellen leitet die Transkription des Provirus die weitere Virusreplikation ein. Jedoch verfügt das HI- Virus über die Fähigkeit, ein latentes Reservoir in

nicht aktiven Zellen zu etablieren, das Provirus bleibt in diesem Fall inaktiv, kann jedoch jederzeit aktiviert werden [15]. Bei Aktivierung der Zelle erfolgt die Produktion der viralen Proteine, wobei die Promotoren im Bereich der LTRs lokalisiert sind. Zur Überführung in ihre funktionelle Form benötigen die viralen Proteine teils zelleigene Enzyme teils die virale Protease. Dieser Vorgang erfolgt durch limitierte Proteolyse und wird als Reifung bezeichnet. Die Neubildung infektiöser Viruspartikel ist ohne die Protease nicht möglich. Von Bedeutung für die erfolgreiche Replikation sind zudem regulatorische Produkte von Tat und Rev, weshalb diese vermehrt zu Beginn der Replikation produziert werden. Proteine der Strukturgene werden vermehrt im Anschluss produziert und zusammen mit RNA- Transkripten, welche das neue Virusgenom darstellen, zu neuen Virionen verpackt. Die infektiösen Partikel werden freigesetzt und befallen fortan weitere Zellen [16].

Sowohl die Fusion von Virus und Wirtszelle als auch RT, IN und Protease können als pharmakologischer Angriffspunkt für die antiretrovirale Therapie (ART) verwendet werden. Die entsprechenden Wirkstoffklassen sind unter 1.1.4.1 aufgeführt.

1.1.2 Epidemiologie

Das HI- Virus hat sich bezogen auf die Anzahl der Betroffenen und volkswirtschaftlichen Auswirkungen zu einer großen und weltweiten Epidemie entwickelt. Die weltweite Prävalenz betrug bei Jahresende 2014 ca. 37 Millionen Menschen, bei einer Inzidenz von 2 Millionen Menschen und einer Mortalität von 1,2 Millionen Menschen. Mit 66% der Infizierten lag der Fokus auf dem afrikanischen Kontinent, insbesondere den Regionen südlich der Sahara. Die meisten Infektionen erfolgten durch heterosexuellen Geschlechtsverkehr [5].

Nach Zahlen des Robert Koch Institutes wird die Prävalenz in der Bundesrepublik Deutschland für das Jahresende 2013 mit ca. 80.000 angegeben, von denen 65.000 Männer sind. Im Jahr 2013 ereigneten sich hierbei 550 HIV- bedingte Todesfälle und 3.200 Neuinfektionen [17]. Den Hauptübertragungsweg (75%) stellte dabei der homosexuelle Geschlechtsverkehr dar. Weitere Übertragungswege waren zudem die Transmission von Mutter auf Kind während Schwangerschaft und Geburt sowie der intravenöse Drogenkonsum. Sonstige Infektionswege, wie etwa die Übertragung durch infizierte Blutprodukte oder die Infektion über offene Wunden, sind nur in Einzelfällen beschrieben und stellen Raritäten dar [18].

1.1.3 Klinik der unbehandelten HIV-Infektion

Die akute HIV-Infektion ist in 40- 90% der Fälle symptomatisch und durch unspezifische, grippeähnliche Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit und Lymphadenopathie gekennzeichnet. Die Viruslast (VL) ist in dieser Phase extrem hoch, die Betroffenen damit hochinfektiös. Auch ein unterschiedlich starker Abfall der CD4+ T-Zellen ist zu beobachten [19]. Die akute Phase dauert im Allgemeinen 3-4 Monate, wobei ohne einen akuten Verdachtsmoment die Diagnosestellung häufig verpasst wird [20]. Im Anschluss stellt sich meist eine zeitlich begrenzte immunologische Kontrolle der Infektion ein. Diese ist unter anderem vermittelt durch HIV-spezifische CD8+ T- Zellantworten [21], welche virusinfizierte Zellen abtöten und die Virusreplikation teilweise supprimieren. Damit kommt es zu einem Absinken der Viruslast im peripheren Blut und zu einer Stabilisierung der CD4+ T- Zellzahl. Die VL zu diesem Zeitpunkt wird als „viraler setpoint“ bezeichnet und besitzt große prädiktive Aussagekraft bezüglich des Fortschreitens der Erkrankung [22]. Durch die Produktion von Antikörpern kommt es zudem zur Serokonversion.

Es folgt die klinische Latenzphase, in welcher die Patienten weitgehend asymptomatisch sind. Wie Abb.3 zeigt, findet jedoch eine stetige Virusreplikation und Abnahme der CD4+ T- Zellzahl statt [23], wobei sich die VL im Allgemeinen auf dem Niveau des viralen setpoints bewegt. Diese Phase ist in ihrer Dauer sehr variabel und kann von 6 Monaten bis zu 20 Jahren oder länger andauern, beträgt jedoch im Durchschnitt etwa 10 Jahre [24]. Der Abfall der CD4+ T- Zellzahl scheint dabei auf der direkten Abtötung durch das Virus, dem vermehrten Auslösen der Apoptose und der Abtötung durch CD8+ T- Zellen zu beruhen [25].

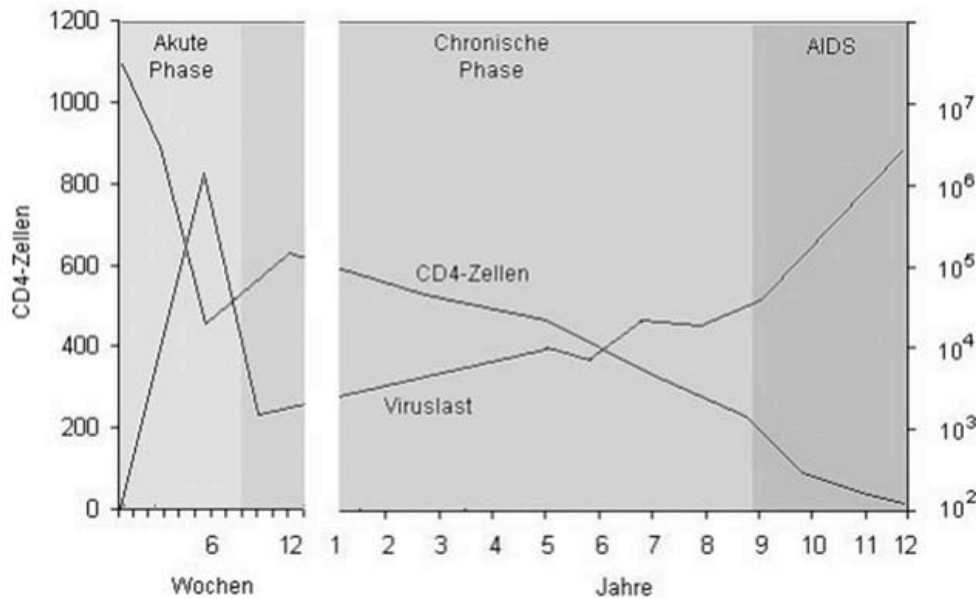


Abbildung 3: CD4+ Zellzahl und Viruslast im Verlauf der Infektion [26]

Auf der linken y- Achse ist die CD4+ Zellzahl /µl des peripheren Blutes und auf der rechten y- Achse die Viruslast dargestellt (Kopien/ ml Plasma). Beide sind im Bezug zur Dauer der Infektion auf der x- Achse dargestellt.

Unterschreitet die CD4+ Zellzahl im Stadium der Progression einen kritischen Wert, kommt es zu Infektionen mit verschiedenen opportunistischen Krankheitserregern, welche für Immunkompetente in vielen Fällen keine Gefahr darstellen [27, 28]. Die Patienten präsentieren sich hierbei zunächst häufig mit oraler Candidose oder Tuberkulose. Oft kommen unter anderem Pneumonien durch *Pneumocystis carinii*, zerebrale Toxoplasmose und Cryptokokkose sowie Reaktivierungen verschiedener Viren, wie etwa von Humanem Herpes Virus (HHV) und Varizella Zoster Virus (VZV) hinzu. Infektionen mit dem Zytomegalievirus (CMV) und dem Mycobakterium avium- Komplex treten in der Regel erst später im Verlauf auf. Zudem lassen sich diverse Malignome beobachten, bei denen besonders Non- Hodgkin- Lymphome und das Kaposi- Sarkom hervorzuheben sind. Nach CDC- Klassifikation (engl. center for disease control) ist das Vollbild AIDS ab dem Auftreten AIDS- definierender Erkrankungen (opportunistischer Infektionen), sowie einem Abfall der CD4+ Zellzahl auf Werte unter 200/ µl Blut bzw. unter 14% der Leukozyten erreicht [29].

1.1.4 Therapie der HIV-Infektion

1.1.4.1 Wirkstoffklassen

Aktuell steht für die ART eine Vielzahl an Substanzen aus 6 Substanzklassen zur Verfügung [30, 31]. Deren pharmakologischer Angriffspunkt findet sich an jeweils unterschiedlichen Stellen des Replikationszyklus des HI- Virus.

Die RT ist zunächst als Angriffspunkt zu benennen. Sie kann durch die Substanzklasse der Nukleosidischen- Reverse- Transkriptase- Inhibitoren (NRTI) gehemmt werden. Aufgrund einer Modifikation am 3'- Ende der Desoxyribose fungieren diese als fehlerhafte Nukleoside bei der Transkription von RNA zu DNA, woraufhin das Transkriptionsprodukt unbrauchbar wird. Zu dieser Klasse gehören die Substanzen Abacavir (ABC), Didansoin (ddI), Emtricitabin (FTC), Lamivudin (3TC), Stavudin (d4T), Tenofovir (TDF) und Zidovudin (AZT). Hinzu kommt die Substanzklasse der Nicht- Nukleosidischen- Reverse- Transkriptase- Inhibitoren (NNRTI). Diese lagern sich im Gegensatz zu den NRTIs am aktiven Zentrum des Enzyms an und hemmen dessen Aktivität auf nicht- kompetitive Weise. Zugelassene Substanzen sind Efavirenz (EFV), Etravirin (ETV), Nevirapin (NVP) sowie als neuere Substanz Rilpivirin (RPV) [32]. Medikamente beider Substanzklassen können ihre Wirksamkeit durch das Auftreten von Medikamentenresistenzmutationen (engl. drug resistance mutation, DRM) verlieren. Diese Arbeit befasst sich mit CD8+ T-Zellantworten auf die Mutationen K103N (vermittelt eine komplette Resistenz gegen EFV und NVP), T215Y/F (vermittelt eine Resistenz gegen TDF, ABC, ddI, d4T und AZT) und M41L (vermittelt eine Resistenz gegen AZT) (vgl. 1.1.4.3). Die Mutationen führen zu Therapieversagen, woraufhin das Therapieschema ggf. mit einem Wechsel auf andere Substanzklassen geändert werden muss. Gelingt es, CD8+ T-Zellantworten gegen diese DRM durch eine therapeutische Impfung zu etablieren, besteht die Hoffnung, dass sich diese klinisch nicht manifestieren können und die Therapie mit den genannten Substanzen beibehalten werden kann.

Als weitere Substanzklasse stehen die Inhibitoren der Integrase (INI) mit den Substanzen Raltegravir (RAL), Elvitegravir (EVG), und Dolutegravir (DTG) [33] zur Verfügung. Auch die Protease kann durch Medikamente der Klasse der Proteaseinhibitoren (PI) mit den Substanzen Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV), Fosamprenavir (FPV), Lopinavir (LPV), Saquinavir (SQV) und Tipranavir (TPV) als Angriffspunkt dienen. Zudem sind noch die Wirkstoffe Enfuvirtide (T-20) als Entry- Inhibitor und Mavaviroc (MVC) als Ko-Rezeptorantagonist von Bedeutung. T-20 bindet GP41 und verhindert somit die Fusion von Virus und Zelle, während MVC den CCR5- Ko-Rezeptor der Zelle blockiert, so dass kein Virus

an diesen binden kann. Diese Substanz ist somit nur bei CCR5- tropen Viruspopulationen wirksam.

1.1.4.2 Kombinationstherapie

Da sich gegen Einzelsubstanzen rasch Resistenzen ausbilden [34, 35], wird für die ART grundsätzlich eine Kombination von 3 verschiedenen Substanzen aus 2 verschiedenen Wirkstoffklassen verwendet [30]. Meist sind dies zwei NRTIs und ein NNRTI, ein PI oder INI. Diese Kombination wird als „hochaktive antiretrovirale Therapie“ (HAART) bezeichnet und ist regelmäßig und lebenslang anzuwenden. Pausen der Therapie sind nur in begründeten Einzelfällen zu vertreten. Ziel stellt die Absenkung der Viruslast im peripheren Blut bis unter die Nachweisgrenze dar (<50 Kopien/ ml Plasma). Der Zeitpunkt des Therapiebeginns wird anhand verschiedener Faktoren, wie der Anzahl CD4+ T- Helferzellen, Viruslast und Klinik, festgelegt und muss im Einzelfall individuell abgestimmt werden [31]. Durch die rechtzeitige Anwendung der HAART kann eine Progression der Erkrankung und die Entwicklung des Vollbildes AIDS zuverlässig verhindert werden. Zudem geht die Therapie einher mit einer kontinuierlichen Zunahme der CD4+ T- Zellen und die Betroffenen haben eine weitgehend normale Lebenserwartung. Das Maximalziel, die Heilung der Infektion, wird jedoch nicht erreicht [36, 37].

Die Anwendung der einzelnen Wirkstoffe ist zudem durch verschiedene Faktoren begrenzt. Dies ist zum Beispiel das Wechselwirkungs- und Nebenwirkungsprofil. Zu letzterem zählen das Lipodystrophiesyndrom [38] und kardiovaskuläre Ereignisse [39]. Je nach Substanz werden auch weitere unerwünschte Wirkungen wie Hepatotoxizität, Nephrotoxizität, Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel, Allergien, Hautveränderungen, hämatologische Veränderungen, Laktatazidosen sowie neurologische und psychiatrische Veränderungen beobachtet. Die kontinuierliche Weiterentwicklung der Medikamente hat jedoch dazu geführt, dass zunehmend nebenwirkungsfreie bis -arme Substanzen zur Verfügung stehen.

Zum Zweiten treten insbesondere bei schlechter Patienten- Compliance resistenzrelevante Mutationen im viralen Genom auf. Dies führt zu Therapieversagen mit einer steigenden VL. DRM sind ausführlich unter 1.1.4.3 dargestellt.

Diese Umstände können eine Umstellung auf ein anderes, unter Umständen teureres und mit ungünstigerem Nebenwirkungsprofil versehenes Therapieregime, erfordern. Die Preise der einzelnen Medikamente, auch aus derselben Substanzklasse, variieren erheblich. Im Allgemeinen sind die Substanzklassen der NRTIs und NNRTIs jedoch meist preisgünstiger,

während PIs und andere moderne Wirkstoffe bis zu doppelt so hohe Kosten verursachen können. Das aktuell günstigste Therapieregime verfügt jedoch mit der Substanz EVG über einen INI [40]. Aufgrund der Kostenstruktur unterliegen auch die in den Leitlinien empfohlenen Kombinationen starken Preisschwankungen. Die direkten Krankheitskosten für Patienten, die eine HAART erhalten, werden in der Bundesrepublik Deutschland mit durchschnittlich 22.563€ pro Patient pro Jahr angegeben, wobei erweiterte Therapieregime für Patienten mit multiresistenten Viren mit erheblich höheren Kosten assoziiert sind [41].

Die Verfügbarkeit von insbesondere teuren Substanzen ist in den durch die Epidemie besonders betroffenen Entwicklungsländern stark eingeschränkt. NRTI- und NNRTI- basierte Therapieregime stellen hier teilweise die einzige Therapieoption dar. Erweiterte Therapieregime, welche nur noch im geringeren Ausmaß auf diese Substanzklassen zurückgreifen, stehen aus Kosten- und Logistikgründen nicht oder nur limitiert zur Verfügung [42, 43].

1.1.4.3 ART Resistenzmutationen

Resistente Virusvarianten stellen heute ein Hauptproblem der ART dar [44, 45]. Ziel ist die Absenkung der Viruslast auf 20- 50 Kopien pro ml Plasma [31]. Eine HAART, welche ohne Pausen eingenommen wird, kann das Virus so gut kontrollieren, dass DRM nicht auftreten [46]. Insbesondere Patientenincompliance, aber auch Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten und Erkrankungen, wie etwa gastrointestinale Infekte, führen aufgrund eines zu niedrigen Plasmaspiegels der Medikamente zur Resistenzentwicklung des Virus. Bei wiederholt nachweisbarer Viruslast lässt sich ab etwa 100- 300 Kopien/ ml Plasma ein gehäuftes Auftreten von DRM im viralen Genom beobachten [47]. Dies ist durch den hohen Turnover des Virus bedingt, der bei unbehandelten Individuen etwa 10 Milliarden Viruspartikel pro Tag beträgt. Durch die hohe Fehlerquote der RT entstehen hierbei zahlreiche Virusvarianten, die sogenannten „Quasispezies“ [48].

Durch die Anwendung einer HAART wird auf das Virus ein Selektionsdruck ausgeübt, welcher dazu führt, dass resistenzrelevante Mutationen selektiert werden. Hat ein Virus eine solche DRM akquiriert, besteht ein Selektionsvorteil gegenüber dem Wildtyp, woraufhin ein vermindertes oder nicht mehr vorhandenes Ansprechen der antiretroviralen Medikation zu beobachten ist [49]. Dies macht eine Umstellung des Therapieregimes mit ggf. Anwendung anderer Substanzklassen erforderlich.

In dieser Doktorarbeit wurden CD8+ T- Zellantworten auf 3 relativ häufige DRM näher untersucht, wobei in Vorarbeiten bereits gezeigt werden konnte, dass auf Bereiche mit DRM spezifische CD8+ T-Zellantworten bestehen. Alle lagen im Bereich der RT und ihr Auftreten vermindert das Therapieansprechen von Medikamenten der Substanzklassen der NRTIs und NNRTIs [50]. Die ausgewählten DRM waren:

- ❖ Die K103N- Mutation ist eine Punktmutation im aktiven Zentrum der RT. Es wird die Aminosäure (AS) Lysin gegen Asparagin ausgetauscht. Die Mutation verursacht eine komplette Resistenz gegen die häufig verwendeten Substanzen EFV und NVP aus der Substanzklasse der NNRTIs.
- ❖ Die M41L- Mutation ist eine Punktmutation, bei welcher die AS Methionin gegen Leucin ausgetauscht wird. Es konnte in vitro eine hohe Resistenz gegen den Wirkstoff AZT und eine geringe Resistenz gegen die Wirkstoffe d4T, ddI sowie ABC nachgewiesen werden. Bei allen genannten Substanzen handelt es sich um NRTIs.
- ❖ Die T215F/Y- Mutation ist eine Punktmutation, bei welcher die AS Threonin durch Phenylalanin bzw. Tyrosin ersetzt wird. Die Wirkung dieser Mutation betrifft ebenfalls die Gruppe der NRTIs. Es ist ein vermindertes Ansprechen auf die Wirkstoffe TDF, ABC, ddI, d4T und AZT beschrieben.

1.1.5 Immunantworten auf das HI- Virus

1.1.5.1 Arten der Immunantwort

Anders als andere Viren kann das HI- Virus weder aus dem Körper eliminiert noch dauerhaft kontrolliert werden. Es kann jedoch durch die Immunantwort des Körpers für eine interindividuell unterschiedliche Zeit unter Kontrolle gehalten werden. Prinzipiell lässt sich eine humorale und eine zelluläre Immunität unterscheiden. Bereits länger bekannt ist, dass die immunologische Kontrolle der Infektion vorrangig durch CD8+ T- Zellen gewährleistet wird [21, 51]. Die für diese Arbeit relevante zelluläre Immunität wird im Folgenden genauer erläutert.

Im Rahmen der Immunantwort erkennen HIV- spezifische CD8+ T- Zellen virusinfizierte CD4+ Zellen und töten sie ab. Die CD8+ T- Zelle erkennt mittels ihres T- Zellrezeptors (engl. T- Cell- Receptor, TCR) das Fremdeiweiß (Virusbestandteil), welches ihr an den HLA Klasse 1- Rezeptor (Humanes Leukozyten Antigen) gebunden präsentiert wird. HLA- Moleküle der Klasse 1 werden auf der Oberfläche von allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert. Die HLA- Komplexe untergliedern sich in A, B und C, wobei jedes Individuum pro HLA- Typ 2 Allele

aufweist [52, 53]. Die hochpolymorphen HLA- Allele lassen sich wiederum HLA- Supertypen zuordnen, wobei die einem Supertyp- zugehörigen Allele Gemeinsamkeiten bezüglich der Fähigkeit zur spezifischen Peptidbindung aufweisen [54, 55].

Sobald CD8+ T- Zellen nicht- körpereigenes Material auf einer Zelle erkennen, wird eine Immunreaktion induziert. Dies beruht zum einem auf der Aktivierung des FAS- Liganden, der in betreffenden Zellen die Apoptose auslösen kann. Die Zelle wird somit für den Organismus unschädlich gemacht. Dies wird als der cytotoxische Effekt bezeichnet. Darüber hinaus wird noch ein weiterer, nicht- cytotoxischer Effekt beobachtet [56, 57]. Es handelt sich um eine Suppressoraktivität auf die Replikation des HI- Virus, welche auf der Wirkung von Effektorfunktionen in Form von ausgeschütteten Chemokinen beruht. Als Marker dienen die Effektorfunktionen zur experimentellen Bestimmung der Aktivität der CD8+ T- Zellen. Neben der Ermittlung der INF γ - Produktion wird auch die Produktion anderer Chemokine wie TNF α und IL-2 bestimmt. Die Expression von CD107a auf der Zelloberfläche zeigt eine Degranulation an und wird ebenfalls als Marker verwendet [58]. Verfügt die Zelle über eine Vielzahl von Effektorfunktionen, wird dies als Polyfunktionalität bezeichnet und korreliert mit der Effektivität der Immunantwort [59].

Der Form der zellulären Immunantwort kommt eine wichtige Bedeutung besonders in der Frühphase der Infektion zu, entsprechende Antworten konnten jedoch auch in fortgeschrittenen Phasen der Erkrankung gezeigt werden [60] .

Durch die interindividuelle genetische Heterogenität der HLA- Allele konnten zwischen den Patienten bezüglich des Krankheitsverlaufes Unterschiede beobachtet werden. Inzwischen kann man den Allelen HLA-B*27 und HLA-B*57 eine gute Prognose mit guter Kontrolle des Virus zuschreiben. Die Allele HLA-B*35 und HLA-C*w07 sind hingegen mit einer raschen Krankheitsprogression assoziiert [61, 62].

Die immunologische Kontrolle des HI- Virus durch CD8+ T- Zellen wird im Laufe der Infektion zunehmend ineffektiv [63]. Die Gründe konnten bisher nicht abschließend geklärt werden, scheinen aber vielschichtig zu sein. Unter anderem beruht dies auf dem Auftreten sogenannter „Escape Mutationen“ im viralen Genom. Diese führen dazu, dass die Zellen ihr Epitop nicht mehr erkennen, und sie werden durch CD8+ Immunantworten selektiert [64, 65]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass CD8+ T- Zellen im Laufe der Infektion einzelne Effektorfunktionen einbüßen und die Immunantwort somit an Effektivität verliert [66].

1.1.5.2 Therapeutische Impfung

Es ist trotz intensiver Forschung bisher nicht gelungen, einen wirksamen Impfstoff gegen das HI- Virus zu entwickeln. Durch die passive Gabe von Antikörpern konnte im Tiermodell eine Infektionen verhindert werden [67]. Neuere Daten zeigen, dass durch den Einsatz von „broadly neutralizing antibodies“ auch beim Menschen eine deutliche Reduktion der Virämie möglich ist. Diese scheinen auch von Bedeutung für die Prävention einer Infektion zu sein [68].

Durch eine CD8+ T- Zell- basierte Impfung kann die Infektion an sich nicht verhindert werden, da nur bereits infizierte Zellen erkannt werden. Eine sterilisierende Impfung ist ohne Ausbildung neutralisierender Antikörper nicht möglich [69]. Bei einer CD8+ T- Zellbasierten Impfung gegen DRM handelt es sich um eine therapeutische Impfung, welche synergistisch zur HAART eingesetzt werden würde. Hierbei würden bereits HIV- infizierte Patienten in der Latenzphase der Infektion eine Impfung gegen die entsprechenden DRM erhalten. Sobald sie therapiepflichtig würden und sich das Virus dem Selektionsdruck ausgesetzt sähe, wären bereits Immunantworten gegen die entsprechenden DRM vorhanden [70]. Hierdurch entfielen der Selektionsvorteil und die resistente Virusvariante könnte sich nicht gegenüber dem Wildtyp durchsetzen, welcher weiter auf die gängige ART ansprüche. Dadurch, dass die Resistenz nicht klinisch manifest würde, ließe sich die Anwendbarkeit der etablierten Therapieregime verlängern. Höhere Kosten und unerwünschte Wirkungen könnten vermieden werden.

1.2 Fragestellung der Arbeit

War die Diagnose einer HIV- Infektion zunächst infaust, so steht mittlerweile eine wirksame ART zur Verfügung, mit der bei rechtzeitigem Therapiebeginn das Vollbild AIDS verhindert werden kann und die VL unter die Nachweisgrenze sinkt. Jedoch ist die ART in ihrer Anwendung durch hohe Kosten und Nebenwirkungen eingeschränkt. Ein weiteres Problem sind die rasch entstehenden, eine Medikamentenresistenz erzeugenden Mutationen des HI- Virus. Diese können besonders in Entwicklungsländern gravierende Auswirkungen haben, da antivirale Substanzen hier nur in begrenztem Umfang zur Verfügung stehen.

In der Frühphase wird die natürliche Infektion durch HIV- spezifische CD8+ T- Zellen kontrolliert [71]. Bei einzelnen Betroffenen ist die immunologische Kontrolle so effektiv, dass auch langfristig auf eine ART verzichtet werden kann [72, 73]. Es ist zudem bekannt, dass bei HIV- positiven Patienten gegen DRM gerichtete CD8+ Immunantworten bestehen und neben

der antiretroviralen Therapie an der Kontrolle des Virus mitwirken [74]. Anhand der M184V-Mutation ließ sich darüber hinaus zeigen, dass das Vorhandensein einer solchen Immunantwort bei Therapieversagen mit einer Reduktion der VL einhergeht und somit prognoseverbessernd ist [75]. Die Induktion CD8+ T- Zellantworten mittels therapeutischer Impfung ist somit ein interessanter Ansatz. Diese sollen verhindern, dass es unter Therapie nach Entwicklung von DRM zu einem Anstieg der Viruslast kommt und somit ein verlängertes Ansprechen der ART gewährleisten.

Häufig verwendete Substanzklassen der ART, insbesondere der first- line- Therapieregime, sind Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs) und Nicht- Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs). Ein genaues Verständnis der immunologischen Vorgänge ist für die Entwicklung eines Impfstoffes unabdingbar. Als Fragestellung dieser Arbeit sollte als Vorarbeit für einen solchen geklärt werden, inwiefern CD8+ T- Zellantworten gegen DRM bestehen. Aufgrund der Resistenzvermittlung gegen NRTIs und NNRTIs sowie ihrem relativ häufigen Auftreten konzentrierten wir uns auf die Mutationen K103N (vermittelt eine komplette Resistenz gegen EFV und NVP), T215Y/F (vermittelt eine Resistenz gegen TDF, ABC, ddI, d4T und AZT) und M41L (vermittelt eine Resistenz gegen AZT). Es war dabei wünschenswert, eine möglichst große Zahl von Epitopen mit den resistenzrelevanten Mutationen zu definieren. Hierbei wurde jeweils das exakte Epitop kartiert. Um den Nutzen für eine möglichst breite Bevölkerungsschicht zu erhalten, waren insbesondere jene Epitope interessant, deren HLA- Restriktion mit einem breiten Vorkommen HLA- Allele in der Bevölkerung korrelierte. Aus diesem Grund wurde diese für die ermittelten Epitope bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Labormaterial

2.1.1 Plastikwaren und Verbrauchsartikel

Produkt	Bezugsquelle
10 ml serologische Einmalpipette	TPP, Ibbenbühren
15 ml Zentrifugenröhrchen	TPP, Ibbenbühren
24- Loch Zellkulturplatte	PAA, Cölbe
25 cm ² Zellkulturflasche	TPP, Ibbenbühren

50 ml Zentrifugenröhrchen	TPP, Ibbenbühren
5 ml serologische Einmalpipette	TPP, Ibbenbühren
75 cm ² Zellkulturflasche	TPP, Ibbenbühren
96- Loch Zellkulturplatte (Rundbogen)	PAA, Cölbe
C-Chip, Neubauerzählkammer	Digital Bio, Seoul, Südkorea
Combitips plus, 10 ml	Eppendorf, Hamburg
FACS- Röhrchen	BD, Heidelberg
Freezing Container Mr. Frosty	Nalgene, Wiesbaden
Kova- Objektträger	Hycor Biomedical, Kassel
Multiscreen IP – 96 well Elispotplatte	Milipore, Schwalbach
Nunc Kryo-Röhrchen 1,8 ml, Außengewinde	Thermo Scientific, Langenselbold
Nunc Kryo-Röhrchen 1,8 ml, Innengewinde	Thermo Scientific, Langenselbold
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 1: Plastikwaren und Verbrauchsartikel

Es sind die verwendeten Plastikwaren und Verbrauchsartikel sowie deren Bezugsquelle aufgelistet.

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Produkt	Bezugsquelle
AP Conjugate Substrate Kit	BioRad, München
Biocoll (Ficoll®)	Biochrom, Berlin
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe
FCS (fetal calf serum) Gold	PAA, Cölbe
Fixation Medium – (Medium A)	Invitrogen, Karlsruhe
G418 Sulfate	Calbiochem, Darmstadt
Hank's BSS	PAA, Cölbe
HEPES Buffer Solution (1M)	PAA, Cölbe
Hygromycin B Lösung	Roth, Karlsruhe
Interleukin 2 (IL- 2)	ImmunoTools, Friesoythe
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA, Cölbe
Penicillin / Streptomycin	PAA, Cölbe
Permeabilization Medium – (Medium B)	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Puregene DNA Isolation Kit	Qiagen, Hilden
QiaEx II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

RPMI1640, ohne L-Glutamin	PAA, Cölbe
Streptavidin-ALP	Mabtech, Hamburg

Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Kits

Es sind die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits sowie deren Bezugsquelle aufgelistet.

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration	Menge/ 1 Mio. Zellen	Herkunft	Klon
CD4- APC	BioLegend, San Diego, USA	317416	50 µg/ml	5µl	Maus	OKT4
CD8- PerCp	BioLegend, San Diego, USA	301030	200 µg/ml	1µl	Maus	RPA-T8
CD8- Pacific- Blue	BioLegend, San Diego, USA	301033	200 µg/ml	5µl	Maus	RPA-T8
IFNγ- FITC	BD, Heidelberg	340449	12,5 µg/ml	20µl	Maus	25723.11
IFNγ- APC	BD, Heidelberg	554702	200 µg/ml	5µl	Maus	B27
TNFα- PE- Cy7	BD, Heidelberg	557647	6 µg/ml	5µl	Maus	MAB11
CD107a- FITC	BD, Heidelberg	555800	25 µg/ml	15µl	Maus	H4A3
IL-2 PE	BD, Heidelberg	340450	1,6 µg/ml	15µl	Maus	5344.111

Tabelle 3: Antikörper für die Durchflusszytometrie

In Spalte 1 ist der Name angegeben. Dieser setzte sich aus der Zielstruktur des Antikörpers (z.B. CD4) sowie dem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. APC) zusammen. In Spalte 2 ist der jeweilige Hersteller angegeben, in Spalte 3 die jeweilige Bestellnummer beim Hersteller sowie in Spalte 4 die jeweilige Konzentration, in welcher der Antikörper vom Hersteller geliefert wurde. Spalte 5 gibt an, welche Menge des Antikörpers in Versuchen pro 1 Million Zellen

verwendet wurde. Spalte 6 beschreibt den Ursprung des Antikörpers. Es wurden ausschließlich murine Antikörper verwendet. Weiter ist in Spalte 7 der jeweilige Klon angegeben.

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration
hIFN γ , mAb1-D1K	Mabtech, Hamburg	3420-3-1000	1 mg/ml
hIFN γ , mAb7-B6-1-Biotin	Mabtech, Hamburg	3420-6-1000	1 mg/ml

Tabelle 4: Antikörper für Elispot

In Spalte 1 ist der Name des Antikörpers angegeben. Dieser setzte sich aus der Zielstruktur (jeweils hIFN γ), der Herkunft des Antikörpers (jeweils murin) und dem verwendeten Klon (z.B. 1-D1K) zusammen. Es folgen der Hersteller in Spalte 2 und die Bestellnummer bei diesem in Spalte 3. Spalte 4 gibt die Konzentration an, in welcher der Antikörper vom Hersteller geliefert wurde

2.1.4 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer	FACSCanto	BD, Heidelberg
Elispot- Lesegerät	ELR04	AID, Strassberg
Feinwaage	BP 61	Sartorius, Göttingen
Heizwasserbad	Modell 1083	GFL, Burgwedel
Inkubationsschrank	Heracell [®]	Heraeus, Hanau
Laborwaage	1419 MP 8-1	Sartorius, Göttingen
Mikroskop	Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Mikroskop	Leica DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Photometer	DU 530	Beckman Coulter, Krefeld
Sterilwerkbank	Model Labgard 437 Class II, Type A2	NuAire Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA
Sterilwerkbank	Safe 2010 Model 1.2	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
UV-Tisch	TFP-35L	Vilber Lourmat, Eberhardzell
UV- Transilluminator	GelDoc 2000	BioRad, München
Vortexgerät	Vortex-Genie [®] 2	IKA [®] Werke GmbH & Co KG, Staufen
Zellzählssystem	CASY [®] 1 Model TT	Schärfe System, Reutlingen

Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Sorvall Super T21	Thermo, Schwerte

Tabelle 5: Geräte

Es sind die verwendeten Geräte aufgelistet. In Spalte 1 wird das Gerät, in Spalte 2 das Modell und in Spalte 3 der jeweilige Hersteller angegeben.

2.2 Peptide

2.2.1 Überlappende 15-20mer Peptide

Zum Screenen auf spezifische CD8+ T-Zellantworten wurden sich jeweils um 10 Aminosäuren überlappende 15-20mer Peptide verwendet. Diesen lag die clade B Konsensussequenz des HIV1- Genoms zu Grunde [76].

Sämtliche Peptide wiesen eine Reinheit von >70% auf und wurden von der Firma EZ Biolab in Carmel, Indiana, USA geliefert. Die entsprechenden Peptide sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Peptidname	Sequenz
RT 201-219	KIEELRQHLLRWGF ^T TPDK
RT 201-219 T215Y	KIEELRQHLLRWGF ^Y TPDK
RT 201-219 T215F	KIEELRQHLLRWGF ^F TPDK
RT 210-227	LRWGF ^T TPDKKHQKEPPF
RT 210-227 T215Y	LRWGF ^Y TPDKKHQKEPPF
RT 210-227 T215F	LRWGF ^F TPDKKHQKEPPF
RT 28-43	EKIKALVEICTEMEK
RT 28-43 M41L	EKIKALVEICTELEK
RT 34-50	LVEICTEMEKEGKISKI
RT 34-50 M41L	LVEICTELEKEGKISKI
RT 87-104	FWEVQLGIPHPAGLKKKK
RT 87-104 K103N	FWEVQLGIPHPAGLKKNK
RT 95-111	PHPAGLKKKKS ^V TVLDV
RT 95-111 K103N	PHPAGLKKNK ^S TVLDV
RT 102-118	KKKS ^V TVLDVGDAYF ^S V
RT 102-118 K103N	KNKS ^V TVLDVGDAYF ^S V

Tabelle 6: Überlappende 15-20mer Peptide

Es sind die verwendeten überlappenden 15-20mer Peptide aufgelistet. Spalte 1 gibt den Namen des Peptids an. RT bezeichnet, dass es sich um einen Abschnitt der Reversen Transkriptase handelt. Die folgende Nummern (z.B. 201-219) geben die Positionen im Genom der RT an, welche beinhaltet werden. Beinhaltet das Peptid eine von der Konsensussequenz abweichende Mutation, ist dies im Anschluss vermerkt (z.B. T215Y). Spalte 2 gibt die jeweilige AS- Sequenz des Peptids an.

2.2.2 Peptide für die Truncationen

Zur exakten Definition des optimalen Epitopes innerhalb eines langen Peptides wurden abgeschnittene (= truncated) Peptide in unterschiedlicher Länge verwendet [77]. Diese wurden im Elispot-Assay in ihrem Erkennen durch spezifische CD8+ T- Zellen untereinander verglichen. Um vor Beginn der in- vitro Versuche einen Anhaltspunkt für das zu erwartende optimale Epitop zu gewinnen und damit die Anzahl der zu synthetisierenden Peptide zu verringern, wurde auf das „in-silico“ Epitop- Vorhersageprogramm SYFPEITHI [78] zurückgegriffen. Die Auswahl der truncated Peptide erfolgte anhand der Vorhersagen des Programms. Die Peptide waren 1 oder 2 Aminosäuren kürzer bzw. länger als das vermutete optimale Epitop und wurden logarithmisch verdünnt (200 mg/ml bis 2 ng/ml). Das Peptid, welches bei geringster Verdünnung noch die größte IFN γ - Antwort im Elispot hervorrief, wurde als optimales Epitop betrachtet. War diese Antwort bei 2 Peptiden identisch, so wurde das kürzere als optimales Epitop gewertet [77].

Die Peptide für die Truncationen wiesen eine Reinheit von >70% auf und wurden von der Firma EZ Biolab in Carmel, Indiana, USA geliefert. Die entsprechenden Peptide sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Peptidname	Sequenz
RT 207-219	QHLLRWGF'TTPDK
RT 209-219	LLRWGF'TTPDK
RT 204-217	ELRQHLLRWGF'TTP
RT 206-217	RQHLLRWGF'TTP
RT 201-214	KIEELRQHLLRWGF
RT 202-210	IEELRQHLL
RT 201-209	KIEELRQHL
RT 102-112	KKKSVTVLDVG
RT 103-112	KKSVTVLDVG
RT 104-112	KSVTVLDVG

RT 102-111	KKKSVTVLDV
RT 102-110	KKKSVTVLD
RT 101-112	KKKKSVTVLDVG
RT 102-113	KKKSVTVLDVGD
RT 102-112 K103N	KNKSVTVLDVG
RT 102-112	KKKSVTVLDVG
RT 103-112	KKSVTVLDVG
RT 37-48 M41L	ICTELEKEGKIS
RT 38-47 M41L	CTELEKEGKI
RT 35-48 M41L	VEICTELEKEGKIS
RT 37-50 M41L	ICTELEKEGKISKI
RT 38-50 M41L	CTELEKEGKISKI
RT 40-50 M41L	ELEKEGKISKI
RT 42-50	EKEGKISKI
RT 41-50 M41L	LEKEGKISKI

Tabelle 7: Peptide für die Truncationen

Es sind die für die Truncationen verwendeten Peptide aufgelistet. Spalte 1 gibt den jeweiligen Namen an. RT bezeichnet, dass es sich um einen Abschnitt der Reversen Transkriptase handelt. Die folgenden Nummern (z.B. 207-219) beschreiben die beinhalteten Positionen im Genom der RT. Beinhaltet der Abschnitt eine von der Konsensussequenz abweichende Mutation, ist die im Anschluss vermerkt (z.B. K103N). Spalte 2 gibt die jeweilige AS-Sequenz des Peptids an. Zur besseren Verständlichkeit des Prinzips der Titrations-Elisots (vgl. 2.6.3) ist diese eingerückt dargestellt.

2.3 Patienten

Bei allen Probanden handelte es sich um HIV-positive Patienten der Infektionsambulanz des Klinikums der Universität München. Sie wurden von ärztlicher Seite über das Vorgehen, Rücktrittsrecht und Risiken der Blutabnahme aufgeklärt. Die Zustimmung hierzu wurde schriftlich mittels einer Patienteneinverständniserklärung dokumentiert. Sämtliche Patienten erhielten zur Anonymisierung eine eigene ID. Die Studie wurde von der Ethikkommission der LMU München genehmigt. Tabelle 8 gibt eine Übersicht der untersuchten Patienten.

Pat.- ID	Viruslast	CD4- Zahl	Jahr der Diagnose	Relevante Mutationen des Virus
T4	<50	231	1992	
T5	192.425	228	2000	K103N
T7	<50	392	2002	K103R
T10	>500.000	162	1987	K103N, T215F
T11	7.804	355	2007	K103N
T13	295	147	1988	K103N
T14	1.015	177	1995	
T15	<50	86	1993	M41L, K103N, T215Y
T17	9.751	142	1988	M41L, T215F
T19	83	615	1996	M41L, T215Y
T20	6.176	174	1987	M41L, T215Y
T22	17.917	283	1990	
T25	33.050	163	1999	
T27	<50	362	1991	
T30	<50	345	1996	T215F
T31	<50	734	1987	T215Y
T36	<50	513	1996	
T37	<50	576	1985	K103N, T215N
T38	<50	824	1998	
T40	<50	170	2008	
T47	<50	767	1993	
T42	<50	331	1994	
T49	<50	167	1996	
T50	301	179	2002	K103N, T215A
T53	<50	868	1996	M41L, K103N, T215Y
T54	<50	533	1988	K103N
T55	50	516	1994	K103N
T56	<50	533	1999	K103N
T57	<50	381	1995	K103N
T60	<50	294	1985	K103N, T215Y
T61	228	639	1999	M41L, T215C
T63	<50	919	1995	
T64	12.853	345	1999	

T65	<50	628	1997	
T67	65	349	1988	K103N
T68	50	316	1996	K103N
T69	50	253	1990	
T70	50	464	1995	K103N
T72	50	1.173	1995	
T73	420.321	33	1990	M41L, T215Y
T74	50	618	1984	M41L, T215Y
T75	19.341	79	2000	K103N
T76	50	419	2005	K103N
T77	50	448	1990	K103N T215I
T78	50	573	1988	M41L, T215F
T79	50	490	1996	M41L, T215Y
P7	109.254	537	1999	
P9	92.000	115	2008	
P18	50	437	2008	

Tabelle 8: Patienten

Es sind die Patienten, deren Blut für diese Doktorarbeit untersucht wurde aufgelistet. Spalte 1 gibt die individuelle Patienten- ID an, welcher jeder Patient zur Anonymisierung erhielt. Spalte 2 gibt die Viruslast (Viruskopien/ml Plasma des peripheren Blutes) und Spalte 3 die Anzahl der CD4+ Zellen/ μ l des peripheren Blutes des Patienten an. Spalte 4 gibt das Jahr der HIV- Diagnose an. Hat das Virus im jeweiligen Patienten eine der in dieser Doktorarbeit behandelten Mutationen akquiriert, ist dies in Spalte 6 vermerkt.

2.4 Software

Name	Bezugsquelle
Cell- Quest	BD, Heidelberg
FlowJo 7.1.3	Tree Star Inc., Ashland, USA
Microsoft Office 2008	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Excel 2008	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint 2008	Microsoft, Redmond, USA

Tabelle 9: Software

Es ist die verwendete Software mit jeweiliger Bezugsquelle aufgelistet.

Zusätzlich wurden 2 internetbasierte Dienste verwendet. Dies war zum einen die Los- Alamos-Datenbank, in der sämtliche bisher publizierte CD8+ T- Zellepitope des HIV- Genoms aufgelistet sind (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html>) [79]. Zum anderen handelte es sich um SYFPEITHI. Dies ist ein Programm zur Vorhersage von Epitopen von CD8+ T-Zellen (<http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.html>) [78].

2.5 Zellen

2.5.1 Nährmedien

Um Zellen in Suspension zu bringen, wurden verschiedene Nährmedien verwendet. Diese sind im Folgenden aufgeführt.

R10:

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

R20:

RPMI1640 Grundmedium (ohne Glutamin) supplementiert mit 5 ml L-Glutamin [200 mM], 5 ml Penicillin [10.000 U/ml] / Streptomycin [10 mg/ml], 5 ml HEPES Puffer [1 M] und 100 ml FCS (hitzeinaktiviert, 1 h, 56 °C).

R10/IL-2:

RPMI1640 Grundmedium (ohne Glutamin) supplementiert mit 5 ml L-Glutamin [200 mM], 5 ml Penicillin [10.000 U/ml] / Streptomycin [10 mg/ml], 5 ml HEPES Puffer [1 M], 50 ml FCS (hitzeinaktiviert, 1 h, 56 °C) und 1:1000 mit 20 mg/ml Interleukin-2 (IL-2).

Hanks:

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

2.5.2 PBMC- Isolation

Zur Gewinnung der PBMC (engl. peripher blood mononuclear cells) wurden den betreffenden Patienten zunächst ca. 6- 10 EDTA- Röhrchen (50- 90ml) Blut entnommen. Zur Separation wurde anschließend in einem Zentrifugenröhrchen die Ficoll- Lösung mit dem gewonnenen Vollblut überschichtet. Es folgte eine 30minütige Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen pro Minute (U/min), Raumtemperatur und ausgeschalteter Bremse.

Die spezifischen Eigenschaften des Ficolls führen dazu, dass sich, gemäß ihrer Dichte, verschiedene Zelltypen in unterschiedlichen Schichten ansammeln. So befanden sich die relativ dichten Erythrozyten und Granulozyten unter der Ficoll- Phase. Die wenig dichten Thrombozyten konzentrierten sich hingegen im Überschuss. Die zu isolierenden PBMC, bestehend aus vor allem Lympho- und Monozyten, waren in der Interphase als PBMC- Ring zwischen verdünntem Blutplasma und Ficoll- Schicht zu finden.

Dieser PBMC- Ring wurde im Anschluss in ein weiteres Zentrifugengefäß übertragen. Da hierbei stets auch ein Teil des thrombozytenhaltigen Überschusses mit übertragen wurde, folgten 3 Waschschrte, wobei die Zellsuspension in den ersten beiden Schritten mit Hanks Medium und im letzten mit R10 versetzt und auf 45 ml gebracht wurde. Die jeweils anschließende Zentrifugation erfolgte bei 1500 U/min, Raumtemperatur und für 10 Minuten. Bei jedem Waschschrte wurden die Thrombozyten mit dem Überschuss verworfen.

Die auf diese Weise gewonnenen PBMC wurden nun in einem geeigneten Volumen R10 aufgenommen und entweder eingefroren oder unmittelbar für die Experimente verwendet [80].

2.5.3 Automatisierte Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Dichtemessung mit Hilfe des automatisierten Zählsystems Schärfe System GmbH Casy® 1 TT durchgeführt. Hierzu wurden 50µl der Zellsuspension in 10ml Casy®ton gegeben. Es handelte sich hierbei um eine isotope Lösung, welche die Zellaggregation verhindert und die Erhaltung der ursprünglichen Zellgröße gewährleistet.

In der Folge wurden die Zellen in Suspension durch eine Kapillare definierter Größe angesaugt und zwischen 2 Platinelektroden mit niedriger Spannung gezählt. Von den betreffenden Zellen wurde hierbei, entsprechend ihrer Größe, ein bestimmtes Volumen der isotonen Lösung

verdrängt, wodurch sich der elektrische Widerstand verminderte und elektrische Signale produziert wurden. Hieraus ließ sich das jeweilige Zellvolumen berechnen.

2.5.4 Manuelle Zellzählung und Bestimmung der Vitalität mit Trypanblau

Bei Trypanblau handelt es sich um einen anionischen Dioxidfarbstoff, welcher von lebenden Zellen nicht aufgenommen werden kann. Diese Eigenschaft wurde verwendet, um die Vitalität einer bestimmten Zellpopulation zu bestimmen. Diese wurde hierfür im Verhältnis 1:10 mit 10µl Trypanblau versetzt und sorgfältig resuspendiert.

Die entstandene Suspension wurde nun auf eine Neubauer- Zählkammer gegeben, woraufhin 2 Großquadrate mikroskopisch ausgezählt wurden. Die Gesamtzellzahl wurde durch die Anzahl der vitalen Zellen, multipliziert mit dem Umrechnungsfaktor 10.000 bestimmt. Die Zellvitalität ergab sich aus dem Verhältnis der vitalen Zellen zur Gesamtzellzahl multipliziert mit 100.

2.5.5 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurde eine bestimmte Menge PBMC zunächst 30 Minuten bei ca. 4° C gekühlt. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation (1500 U/min, 4° C, 10 Minuten). Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Zellsediment mit einer vorgekühlten Lösung, bestehend aus 9 Teilen FCS und 1 Teil Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und in Kryo-Gefäßen zu je 1,8ml eingefroren. Diese Gefäße wurden zunächst über Nacht in einem „Mr. Frosty“ Einfrierbehälter stufenweise auf -80°C gebracht und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.5.6 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der gefrorenen Gefäße erfolgte im Wasserbad (37°C). Im Anschluss wurde die noch kalte Suspension in 10ml vorgekühltes R10 überführt. Zur Entfernung des toxischen DMSO folgten 3 Waschschrte (1500 U/min, 4° C, 10 Minuten). Schließlich wurden die Zellen in einem angemessenen Volumen R10 aufgenommen und eine Bestimmung der Zellvitalität durchgeführt.

2.5.7 Herstellen von Futterzellen (= feeder cells)

Für Herstellung und Restimulation CD8+ positiver T- Zell- Linien wurden sog. „feeder cells“ von HIV- negativen Spendern benötigt. Durch bekannte und unbekannte Wachstumsfaktoren

sowie durch Zell- Zell- Kontakte sollten diese ein optimales Milieu für das Wachstum der Zelllinie schaffen.

Die Futterzellen wurden zunächst durch PBMC- Isolation aus dem Blut der Spender gewonnen. Anschließend wurde ihre Teilungsfähigkeit durch eine Bestrahlung (30Gy, 30 Minuten) zerstört. Nach etwa 7 Tagen waren die bestrahlten Futterzellen abgestorben und es verblieben lediglich die proliferierenden Zelllinien in Kultur.

2.5.8 CD8+ T- Zell- Linien

HIV- spezifischen CD8+ T- Zell- Linien wurden mit Hilfe peptidbeladener, antigenpräsentierender Zellen (engl. antigen presenting cells, APC) angelegt. Je nach Verfügbarkeit wurden hierfür meist PBMC, aber auch, sofern vorhanden, entsprechende lymphoblastoide B- Zelllinien (engl. B- lymphoid cell line, BCL) oder autologe CD8+ T- Zellen verwendet. Sofern die gewünschte HLA- Restriktion nicht bekannt war, musste die BCL über dieselbe HLA- Zusammensetzung wie die zu stimulierenden Zellen verfügen. War diese bekannt, reichte das Vorhandensein dieses spezifischen HLA- Merkmals aus. 50µl des gewünschten Peptids (Konzentration 200µg/ml) wurden zu ca. 1 Million APC in 1ml R10 hinzugegeben, woraufhin diese bei 37° C in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank für 1 Stunde inkubiert wurden. Es folgte eine Bestrahlung (30 Gy, 30min), um die Teilungsfähigkeit zu zerstören sowie ein 3maliger Waschvorgang in R10 (1500 U/min, Raumtemperatur), um nicht- zellgebundenes Peptid zu entfernen.

Ca. 4 Mio. zu stimulierende Zellen (PBMC oder CD8+ T- Zellen aus zu restimulierenden CTL) wurden nun mit ca. 2 Mio. bestrahlten APC und ca. 20 Mio. ebenfalls bestrahlten feeder cells in ein Volumen von 20ml R10 gebracht. Diese Suspension wurde in eine 25 cm³- Zellkulturflasche überführt, mit 10µl IL-2 versetzt und in einen Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) gebracht. Die Zelllinie wurde 2 mal wöchentlich mit R10/IL- 2 Medium gefüttert. Nach etwa einer Woche war vom Absterben der APC und Futterzellen auszugehen. Bis dahin erfüllten sie den Zweck, die Antigen- spezifischen CD8+ T-Zellen durch Antigenpräsentation zur Teilung anzuregen.

Die Überprüfung der Zelllinienspezifität erfolgte nach 7- 10 Tagen mittels intrazellulärer Fluoreszenzfärbung durch den Nachweis der Produktion von IFN γ nach Stimulation durch das jeweilige spezifische Peptid (siehe 2.7.2) [81].

2.5.9 Lymphoblastoide B- Zell- Linien

Zur Herstellung immortalisierter lymphoblastoide B- Zell- Linien (BCL) wurden ca. 1 Million frische oder aufgetaute PBMC eines HLA- typisierten Spenders benötigt. Diese wurden in der Folge in ein Volumen von 1ml R20 gebracht und mit Epstein- Barr- Virus (EBV) infiziert. Anschließend wurden sie mit 0,4 µg/ml Cyclosporin A (CSA) für 4- 6 Wochen in einem Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO₂). Die B- Zellen wurden hierbei selektiv durch das EBV infiziert, wobei das Zytostatikum CSA einen suppressiven Effekt auf die T- Zellen bewirkte. Diese Kombination führte zur Immortalisation und Proliferation der B- Zellen. Auf diese Weise konnte die gewünschte BCL angelegt werden. Sie wurde bis zur Verwendung in 20ml R20 in einem Brutschrank (37°C, 5% CO₂) aufbewahrt. Die BCL wurde 2 mal wöchentlich durch den Austausch von 10ml Medium gefüttert [82]. Tabelle 10 führt sämtliche für Versuche verwendete BCL auf.

Name	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
SS	02	29	14	58	07	08
RLO	03:01	26:01	38:01	41:01	12:03	17:01
OMW	02:01	02:01	45:01	45:01	16:01	16:01
JBB	01	03	07	57	06	07
MP	02:01	03:01	07:02	49:01	07:01	07:02
ND=NB	11	29	08	44	04	04
BN	01:01	11:01	08:01	55:01	03:03	07:01
PR LS 02	23	33	07	07	07	07
GS	02	30	44	57	05	18
SWS	01	24	13	57	06	06

Tabelle 10: Lymphoblastoide B- Zelllinien (BCL)

Es sind die verwendeten BCL aufgelistet. Spalte 1 gibt den Namen der jeweiligen BCL an. Dieser war lediglich eine laborinterne Kennung. Spalte 2 gibt die beiden HLA-A Allele der BCL an. Die ersten beiden Ziffern bezeichnen den Haupttyp und die beiden folgenden den Subtyp. Sind nur 2 Ziffern angegeben, so war der Subtyp unbekannt. Nach diesem Prinzip werden in den Spalten 3 und 4 die beiden jeweiligen Allele für HLA-B bzw. HLA- C angegeben.

2.6 Elispot

2.6.1 Methodik

Mittels Elispot lässt sich in-vitro die IFN γ -Produktion stimulierter T-Zellen nachweisen. Diese stellen sich als kleine blaue Punkte in der Vertiefung einer speziell beschichteten 96-well-Platte dar.

Die Beschichtung besteht aus einer Immobilon-P-Nitrozellulosemembran, die mit einem Antikörper gegen IFN γ (Anti-Human mAb 1-DK1/ 1mg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Die nicht der Membran anhaftenden Antikörper wurden am Folgetag durch einen Waschschriff mit PBS und 1% FCS entfernt, wobei das FCS unspezifische Bindungsstellen abdecken und auf diese Weise falsch positive Ergebnisse minimieren sollte.

In jede Vertiefung wurden in der Folge 20.000- 100.000 PBMC oder Zellen aus CD8+ CTL pipettiert und 10 μ l Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Daneben wurden noch mindestens je 3 Negativ- Kontrollen ohne Peptid und Positiv- Kontrollen mit Phytohaemagglutinin (PHA) durchgeführt.

Es folgte eine 14- 16stündige Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO $_2$). In dieser Zeit sollte eine Antigenerkennung durch die CD8+ positiven Zellen und dadurch die Produktion von IFN γ erfolgen, welches durch den am Boden der Platte anhaftenden Antikörper gebunden werden sollte.

Es wurden nun die zellulären Bestandteile durch einen Waschschriff mit PBS entfernt und ein weiterer, ebenfalls gegen IFN γ gerichteter, biotinylierter Antikörper (Anti-Human IFN- γ mAb 7 B6-1-Biotin/ 1mg/ml) hinzugegeben. Dieser verfügte über ein anderes Epitop als der erste Antikörper, um die Komplexe aus erstem Antikörper und IFN γ zu binden.

An den biotinylierten Antikörper wurde nun 1 ml Streptavidin (0,050 - 0,075 μ g/ml) gebunden. Nach Zugabe des Enzymsubstrats konnten die blauen Punkte durch Zugabe von BCIP / NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ Nitro blue tetrazolium chloride) als Färbelösung sichtbar gemacht werden. Jeder Punkt repräsentierte hierbei eine IFN γ -produzierende Zelle.

Die getrockneten Platten wurden später im Elispot- Lesegerät ELR04 ausgewertet. Die IFN γ -Produktion wurde in SFC (engl. spot- forming cells) pro 1 Million Zellen angegeben. Wells, die mehr als die 3fache Menge farbiger Punkte wie die Negativ- Kontrollen aufwiesen, wurden als

positiv gewertet. Der Wert 2000 SFC/ Mio stellte den Maximalwert dar, da eine größere Anzahl von farbigen Punkten im well nicht mehr voneinander abgegrenzt werden konnte.

2.6.2 Pol- Elispots

Mit Hilfe des Elispots konnten CD8+ T- Zellantworten auf überlappende Peptide (vgl. 2.2.1) aus dem pol- Gen nachgewiesen werden [60]. Diese beinhalteten die ausgewählten DRM. Die einzelnen Peptide wurden in der Konzentration 200 µg/ml verwendet. Wenn spezifische CD8+ T-Zellantworten auf diese 15 – 20mer langen Screening-Peptide nachweisbar waren, wurden im nächsten Schritt kürzere truncated Peptide zur Bestimmung des optimalen Epitops verwendet (vgl. 2.6.3).

2.6.3 Titrations- Elispots

Titration- Elispots wurden zur Ermittlung des optimalen Epitops durchgeführt. Hierbei wurden die entsprechend kürzeren truncated Peptide (vgl. 2.2.2) in einer logarithmischen Verdünnung von 200 µg/ml bis 2 ng/ml in die wells gegeben. Weiter wurden zwischen 20.000 und 100.000 PBMC oder Zellen aus CD8+ T- Zell- Linien des betreffenden Probanden hinzugefügt. Es wurde verglichen, welche Peptide bei geringer Konzentration noch eine vergleichsweise hohe IFN γ - Produktion bewirken konnten.

Dabei wurden zunächst die kürzeren Truncationspeptide mit den längeren überlappenden Peptiden verglichen. Eine IFN γ - Produktion nach Stimulation mit diesen Peptiden war bereits bekannt. Als optimales Epitop wurde im Folgenden jenes Peptid definiert, welches bei geringer Konzentration noch die stärkste IFN γ - Produktion hervorrufen konnte. War diese bei 2 Peptiden identisch, so wurde das kürzere als optimales Epitop gewertet [80].

2.7 Durchflusszytometrie

2.7.1 Methodik

Mittels Durchflusszytometrie ließen sich 4 (FACSCalibur) bzw. 8 (FACSCanto) unterschiedliche intra- oder extrazelluläre aufgebrauchte Fluoreszenzfarbstoffe messen und somit unterschiedliche Eigenschaften einer Zelle darstellen.

Hierbei wurde zunächst eine extrazelluläre Färbung der Zellen durchgeführt. 1 Mio. Zellen wurden mit 2ml PBS + 1% FCS gewaschen, bei 1500U/min für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend für 30 Minuten in einem Volumen von 100µl mit den entsprechenden Antikörpern bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Zellen in der Folge zweimal mit 2ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100µl der Fixierlösung FixPerm A bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung enthielt Paraformaldehyd. Dadurch wurde bewirkt, dass die Antigen- gebundenen Antikörper stabilisiert und die Zelle in ihrer Form erhalten wurde. Dies stellte einen wichtigen Schritt für die nun folgende intrazelluläre Färbung dar.

Für diese wurden die Zellen wiederum mit 2ml PBS gewaschen und anschließend mit 100µl der Lösung FixPerm B versetzt. Diese Lösung erzeugte kleine Perforationen in der Zellmembran, durch welche die intrazellulären Antikörper an ihr Ziel gelangen konnten. Es folgte eine 15minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Ohne weiteren Waschschrift wurden im Anschluss die Antikörper in ihrer jeweiligen Konzentration hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Es folgten noch 2 erneute Waschschriffe mit PBS, woraufhin die Probe mit 200µl PBS versetzt und gut resuspendiert wurde. Sie konnte anschließend an einem FACSCalibur bzw. FACSCanto gemessen werden. Zur Auswertung wurde jeweils die Software FlowJo verwendet [83].

2.7.2 Überprüfung von CD8+ T-Zell-Linien auf Spezifität und Polyfunktionalität

Hierfür wurden zunächst ca. 3 Millionen Zellen einer bestimmten CD8+ T- Zell- Linie am Vortag 3 Mal in R10 gewaschen um das IL- 2 zu entfernen. Die Spezifitätsüberprüfung erfolgte über eine Stimulation mit dem betreffenden Peptid. In 1ml Medium R10 wurden die Zellen mit 20µl (Konzentration 200µg/ml) Peptid versetzt. Nach 60 Minuten Inkubationszeit in einem Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden 10µl Brefeldin A (Konzentration 1 mg/ml) hinzugegeben. Dies inhibierte den Golgi- Apparat und sorgte somit dafür, dass das später nachzuweisende IFN γ in den Zellen verblieb. Es folgte eine 5- 6stündige Inkubationszeit im Brutschrank.

Im Anschluss erfolgte die extra- und intrazelluläre Fluoreszenzfärbung mittels der Antikörper CD8- PerCP und IFN γ - FITC. Mit deren Hilfe konnte zunächst die Population der CD8+ Zellen eingegrenzt werden. Weiter wurde ermittelt, welche dieser Zellen auf die Stimulation mit dem entsprechenden Peptid mit einer Produktion von INF γ reagierten. Diese Zellen waren als für das entsprechende Peptid spezifisch zu betrachten. Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der CD8+ Zellen gab die Spezifität der Linie an.

Zusätzlich hierzu konnte die betreffende Linie noch auf mehrere CD8+ T- Zell Effektorfunktionen hin überprüft werden [59]. Hierbei wurden zusätzlich zu IFN γ - APC die intrazellulären Antikörper TNF α - PE- Cy7 und IL-2- PE sowie der extrazelluläre Antikörper CD107a- FITC verwendet. Da bei dieser Methode mehr als 4 Zelleigenschaften untersucht wurden, wurde das FACSCanto benötigt.

2.7.3 Bestimmung der HLA- Restriktion

Anhand von HLA- Molekülen der Klasse 1 werden passende Peptidfragmente, wie beispielsweise intrazellulär produzierte Virusbestandteile, CD8+ Effektorzellen präsentiert. Für das genaue Verständnis der immunologischen Reaktion zwischen T-Zellrezeptor und dem HLA/ Epitop- Komplex ist es unabdingbar, für jedes Epitop das entsprechende präsentierende HLA-Molekül zu definieren. Um zu ermitteln über welchen HLA- Typ das jeweilige Peptidfragment des HIV- Genoms präsentiert wird, wurden mittels Durchflusszytometrie HLA- Restriktionsassays durchgeführt [84].

Hierbei wurden, entsprechend den HLA- Allelen des Patienten, BCL mit identischen Merkmalen eingesetzt. Die Kombination der gewählten BCL umfasste sämtliche 6 HLA- Allele des Patienten. Dabei musste es sich eindeutig darstellen lassen, über welches HLA- Allel die Antigenpräsentation erfolgte. Im Optimalfall wurden lediglich 6 unterschiedliche BCL verwendet, wobei jede ein einziges, mit dem Patienten identisches HLA- Allel aufwies. War dies nicht möglich, so wurde eine Kombination der BCL gewählt, die eine eindeutige Zuordnung des antigenpräsentierenden HLA- Allels ermöglichte.

Zu ca. 500.000 B- Zellen, suspendiert in 1ml R10, wurden in der Folge 20 μ l entsprechendes Peptid (Konzentration 200 μ l/mg) hinzugegeben, woraufhin eine 60minütige Inkubation (37°C, 5% CO₂) erfolgte.

Um nicht gebundenes Peptid zu entfernen, wurden die Zellen im Anschluss dreimal in R10 gewaschen (1500 U/min, 10 Minuten, Raumtemperatur). Im Verhältnis 1:5 wurden daraufhin Zellen aus einer für das Peptid spezifischen CD8+ T- Zell- Linie hinzugegeben, woraufhin sie erneut für 6-7 Stunden inkubiert wurden (37°C, 5% CO₂). Nach 1 Stunde wurden 10 μ l Brefeldin A (Konzentration 1mg/ml) hinzugefügt.

Es folgte extra- und intrazelluläre Fluoreszenzfärbung mittels der Antikörper CD8- PerCP und IFN γ - FITC. In der Folge wurde der Anteil der IFN γ - produzierenden Zellen an der Gesamtzahl

der CD8+ T- Zellen ermittelt. Aufgrund der vorher festgelegten Zusammenstellung der einzelnen BCL ließ sich auf diese Weise die HLA- Restriktion des Epitops bestimmen.

2.8 DNA- Gewinnung und HLA- Typisierung

DNA wurde mit Hilfe des Qiagen Gentra- DNA- Extraktionskits nach Angaben des Herstellers gewonnen [85]. Dazu wurden Zellen nach PBMC- Präparation aus Vollblut des Spenders in ein geeignetes Volumen R10 gebracht. Um Verunreinigungen zu entfernen, wurden diese 3 mal in R10 gewaschen (1500 U/min, 10min, Raumtemperatur). Es folgte die Zugabe einer geeigneten Menge von RBC- Lysis- Solution. Diese lysierte die Erythrozyten, ließ die Leukozyten jedoch intakt. Nach 5 Minuten erfolgte ein Zentrifugationsschritt (2000 U/min, 2min, Raumtemperatur) mit anschließender Abnahme des Überstandes. Übrig blieben die Leukozyten als weißes Pellet. Sie wurden resuspendiert und mit 3ml Cell Lysis Solution versetzt, wodurch sie lysiert wurden. Danach wurde 1 ml Precipitation Solution hinzugegeben. Dies war ein Puffer, der die Löslichkeit von Protein herabsetzte. Protein setzte sich nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2000 U/min, 5min, Raumtemperatur) am Boden ab und der DNA- haltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Daraufhin wurde die DNA in 100%igen Isopropanol (3ml) zum Ausfällen gebracht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2000 U/min, 3 min, Raumtemperatur) und Abnahme des Überstandes wurden 3ml 70%iger Ethanol dazugegeben, woraufhin erneut zentrifugiert (2000 U/min, 1 min, Raumtemperatur) und der Überstand abgenommen wurde. Nach dem Trocknen wurden 250µl DNA- hydratation solution hinzugefügt, um die DNA in Lösung zu bringen. Die anschließende Bestimmung der HLA- Typen erfolgte mittels PCR Amplifikation und DNA- Sequenzierung im Labor für Immunogenetik der Abteilung für Transfusionsmedizin im Klinikum Großhadern der Universität München.

3 Ergebnisse

3.1 CD8+ T- Zellantworten im Bereich von HIV- Pol

Bei HIV- infizierten Patienten sind Pol- spezifische CD8+ T- Zellantworten häufig und in großer Anzahl in der Literatur beschrieben [60, 86]. Anhand der überlappenden Peptide wurden PBMC von 49 HIV- positiven Patienten im IFN γ - Elispot auf das Vorhandensein spezifischer CD8+ T- Zellantworten auf die Regionen RT 28–227 gescreent. Da uns vor allem CD8+ T- Zellantworten auf DRM interessierten, verwendeten wir überlappende Peptide, die häufige DRM in ihrer Sequenz enthielten, wobei wir uns gemäß der Fragstellung dieser Arbeit auf die Mutationen K103N, M41L und T215Y/F konzentrierten. Darüber hinaus wurde der jeweilige Wildtyp getestet. Wie in Tabelle 11 verzeichnet, wiesen 22 Patienten CD8+ T-Zellantworten auf die überlappenden Screening- Peptide auf. Häufig waren Antworten auf Peptide, die die Mutation K103N enthielten. Antworten auf den Wildtyp waren meist schwächer und oft gar nicht nachzuweisen. In Einzelfällen war jedoch auch die Reaktion auf den Wildtyp die stärkere. Deutlich seltener ließen sich Antworten gegen Peptide mit der M41L- und der T215Y/F- Mutation beobachten. Im Fall der M41L- Mutation wurde stets das Peptid mit der Mutation stärker erkannt als der Wildtyp. Bei den Peptiden im Bereich der T215Y/F- Mutation wurde in 2 Fällen das Peptid mit der Mutation und in 3 Fällen der Wildtyp stärker erkannt.

Patienten- ID	Relevante Mutationen	Getestetes Peptid	SFC/ Mio
T04		RT 102-118	75
		RT 102-118 K103N	110
T05	K103N	RT 102-118	80
		RT 102-118 K103N	140
T07	K103R	RT 87-104 K103N	60
		RT 95-111 K103N	60
		RT 102-118	2190
		RT 102-118 K103N	270
T15	M41L, K103N, T215Y	RT 87-104 K103N	50
T19	M41L, T215Y	RT 95-111 K103N	70
		RT 102-118 K103N	50
T25		RT 102-118	140
		RT 102-118 K103N	190

T31	T215Y	RT 102-118	580
		RT 102-118 K103N	390
T36		RT 102-118 K103N	53
T49		RT 87-104	60
		RT 95-111	55
		RT 201 -219	210
		RT 201-219 T215Y	250
		RT 201-219 T215F	290
T50	K103N, T215A	RT 201-219	180
		RT 201-219 T215Y	220
		RT 201-219 T215F	240
		RT 87-104 K103N	60
T57	K103N	RT 102-118 K103N	50
T61	M41L, T215C	RT 34-50	140
		RT 34-50 M41L	200
T63		RT 102-118	495
		RT 102-118 K103N	390
T65		RT 201-219	2980
T67	K103N	RT 201-219	60
		RT 201-219 T215Y	50
		RT 201-219 T215F	50
T72		RT 87-104 K103N	80
		RT 95-111 K103N	110
		RT 102-118 K103N	130
T73	M41L, T215Y	RT 34-50	75
		RT 34-50 M41L	88
T74	M41L, T215Y	RT 95-111 K103N	60
T76	K103N	RT 28-43 M41L	80
		RT 34-50 M41L	60
T77	K103N, T215I	RT 87-104 K103N	90
		RT 95-111	90
		RT 95-111 K103N	50
		RT 102-118	110
P9		RT 95-111 K103N	50
		RT 102-118 K103N	60
P18		RT 201-219	3210

RT 201-219 T215Y	2970
RT 201-219 T215F	2890
RT 210-227 T215Y	150
RT 210-227 T215F	120

Tabelle 11: CD8+ T- Zellantworten auf überlappende Peptide des Pol- Gens

Es sind alle positiven Ergebnisse des Screenings auf Pol- spezifische CD8+ T- Zellantworten der Patienten angegeben. Spalte 1 führt die jeweilige Patienten- ID auf. Hatte das Virus des Patienten eine in dieser Arbeit behandelte und im peripheren Blut nachweisbare Mutation akquiriert, ist dies in Spalte 2 vermerkt. In Spalte 3 ist das jeweilige überlappende 15-20mer Peptid angegeben, welches zum Screening verwendet wurde (vgl. 2.2.1). Die Stärke der CD8+ T- Zellantwort auf dieses Peptid ist in Spalte 4 in SFC/ Mio angegeben. Die für die Identifikation des optimalen Epitops ausgewählten Patienten sind fett markiert.

Aus diesem Patientenkollektiv wurden für die Identifikation des optimalen Epitops und Bestimmung der entsprechenden HLA- Restriktion 7 Patienten ausgewählt. Dies waren zum einen T05, T25, T31, T63 und T77, mit CD8+ T- Zellantworten gegen Abschnitte des Pol- Gens, welche die K103N- Mutation enthielten. Hinzu kamen P18 und T61, bei welchen CD8+ T- Zellantworten gegen überlappende Peptide mit der T215F/Y- Mutation bzw. der M41L- Mutation vorhanden waren.

3.2 Epitop- Kartierung von drei CD8+ T- Zellantworten

3.2.1 HLA- Typisierung der Patienten

Für die 7 ausgewählten Patienten wurde eine hochauflösende HLA- Typisierung durchgeführt. Diese wurde benötigt, um die HLA- Restriktion der zu ermittelnden optimalen Epitope zu bestimmen. Tabelle 12 gibt die einzelnen HLA- Allele der betreffenden Patienten wieder.

Pat. - ID	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
T05	01:01	03:01	08:01	35:01	04:01	07:01
T25	30:02	33:03	15:03	35:01	02:10	04:01
T31	03:01	32:01	35:01	35:08	04:01	15:02
T61	01:01	30:04	08:01	49:01	07:01	07:01
T63	01:01	03:01	35:01	39:01	04:01	07:02
T77	02:01	24:02	15:01	44:02	03:03	05:01
P18	29:02	80:01	41:02	45:01	06:02	17:03

Tabelle 12: HLA- Typisierung der Patienten

Es sind die einzelnen HLA- Allele der für die weiteren Versuche ausgewählten Patienten dargestellt. In der 1. Spalte ist die jeweilige Patienten- ID angegeben. Spalte 2 beschreibt die beiden Allele für HLA- A. Die ersten beiden Ziffern bezeichnen den Haupt- und die beiden folgenden den Subtyp. Nach diesem Prinzip sind die beiden Allele für HLA- B bzw. HLA- C in den Spalten 3 und 4 dargestellt.

3.2.2 Epitop- Vorhersagen durch das Programm SYFPEITHI

Es wurde zunächst anhand der Los- Alamos- Datenbank (<http://www.hiv.lanl.gov>) abgeglichen, ob in den betreffenden Bereichen von Pol bereits optimale CD8+ T- Zell- Epitope in der Literatur beschrieben waren. Für einen im Peptid RT 102 -118 bzw. RT 102-118 K103N enthaltenen Bereich war bereits das HLA-B*35:01 restringierte Nonamer TVLDVGDAY (TY9) als CD8+ T- Zell- Epitop beschrieben [87]. Bei den ausgewählten Patienten, welche dieses HLA- Allel aufwiesen und im Screening eine Reaktion auf das überlappende Peptid RT 102-118 oder RT 102-118 K103N zeigten, bestand die Möglichkeit, dass es sich bei ihrem Epitop um das beschriebene TY9- Epitop handelt. Dieses beinhaltet nicht die Position der K103N -Mutation. Betroffen waren die Patienten T05, T25, T31 und T63. Um dies zu überprüfen, wurde in der Folge je ein Titrations- Elispot durchgeführt, bei welchem das Screening- Peptid RT 102-118 mit dem truncated Peptid RT 102-112 verglichen wurde. Dieses enthielt die TY9- Epitop nicht mehr vollständig. Zur besseren Verständlichkeit sind die AS- Sequenzen beider Peptide in Abb. 4 aufgeführt. Bei keinem der Patienten konnte eine Reaktion auf das kürzere Peptid nachgewiesen werden. Es war somit davon auszugehen, dass CD8+ T- Zellen dieser Patienten das bereits bekannte TY9- Epitop erkannten, woraufhin auf weitere Versuche zur Bestimmung des optimalen Epitops verzichtet werden konnte.



Abbildung 4: Peptide der Überprüfungs- Elispots für T05, T25, T31 und T63

Oben dargestellt ist die Sequenz des langen Screening- Peptids RT 102-118. Das bekannte HLA-B*35:01 restringierte Epitop TVLDVGDAY (TY9) ist rot hervorgehoben. Darunter befindet sich die Sequenz des truncated Peptids RT 102-112. Das Epitop TY9 ist nicht mehr vollständig enthalten.

Für die verbliebenen 3 Patienten, nämlich P18, T61 und T77, wurde mittels des Programms SYFPEITHI eine Epitop- Vorhersage durchgeführt. Hierbei wurde für die Vorhersage jenes überlappende Peptid gewählt, das im Screening die stärkste CD8+ T- Zellreaktion hervorrief. Sofern möglich, wurden die spezifischen HLA- Typen des Patienten berücksichtigt. Dies war

jedoch nicht in allen Fällen möglich, da das Programm die Vorhersagen nur für bestimmte HLA- Typen durchführen konnte. Das vorhergesagte Epitop mit der jeweils höchsten Wahrscheinlichkeit ist in Tabelle 13 verzeichnet. Je höher der ermittelte Score lag, desto höher war die Wahrscheinlichkeit, dass es sich auch tatsächlich um das optimale Epitop handelte.

Patienten- ID	Vorhergesagtes Epitop	Sequenz	HLA- Restriktion	Score
P18	RT 209-217	LLRWGF T TP	B*45	15
T61	RT 39-47 M41L	TELEKEGKI	B*49:01	25
T77	RT 107-115	TVLDVGDAY	B*15:01	20
	RT 107-116	TVLDVGDAYF	B*15:01	20

Tabelle 13: Epitopvorhersagen von SYFPEITHI

Es sind die mittels SYFPEITHI vorhergesagten optimalen Epitope aufgeführt. In Spalte 1 ist die jeweilige Patienten-ID angegeben. Spalte 2 beschreibt das Epitop. Hierbei bezeichnet RT, dass es sich um einen Ausschnitt aus der Reversen Transkriptase handelte. Die folgenden Nummern (z.B. 209-217) beschreiben die beinhalteten Positionen im Genom der RT. Enthielt die Sequenz eine Mutation (z.B. M41L), so ist dies im Anschluss verzeichnet. In Spalte 3 folgt die entsprechende Sequenz des Epitops sowie in Spalte 4 die vorhergesagte HLA-Restriktion. In Spalte 5 ist der Score angegeben, welchen das Programm für das betreffende Epitop ermittelte. Für T77 wurden 2 Epitope mit gleicher Wertung vorhergesagt.

3.3 Experimentelle Epitopbestimmung

3.3.1 Anlegen von CD8+ T- Zell- Linien

Voraussetzung für die Bestimmung der Epitoplänge und der HLA- Restriktion waren CD8+ T- Zellen, die möglichst spezifisch für dieses eine Epitop sind. Aus diesem Grund wurden CD8+ T- Zell- Linien angelegt. Für P18 konnte eine spezifische CD8+ T- Zell- Linie angelegt werden. Wie in Abb. 5 gezeigt, waren 19,88% der Zellen dieser Linie spezifisch für das Peptid RT 201-219. Dies wurde anhand der IFN γ - Produktion nach Stimulation mit diesem Peptid bestimmt. Es konnte weiter eine Polyfunktionalität dieser CD8+ T- Zellantwort anhand der Marker CD107a und TNF α aufgezeigt werden. Lediglich bei der Produktion des Markers IL-2 zeigte sich nach Peptidstimulation keine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Negativ- Kontrolle.

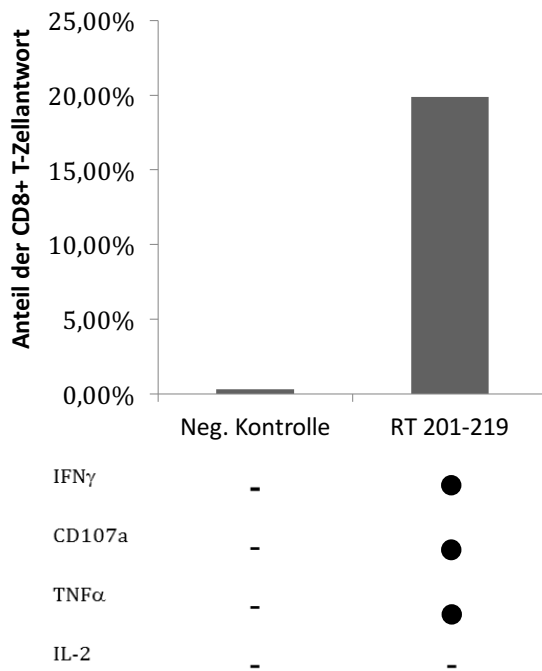


Abbildung 5: Spezifische CD8+ T- Zell- Linie für P18

Auf der y- Achse ist der prozentuale Anteil der Effektorfunktion- produzierenden CD8+ T- Zellen angegeben. Auf der x- Achse ist beschrieben, ob es sich um das Ergebnis nach Stimulation durch das Peptid RT 201-219 oder um das Ergebnis der Negativ- Kontrolle ohne Peptid handelt. Darunter sind die einzelnen Effektorfunktionen angegeben. Ein Strich beschreibt, dass der Nachweis der Effektorfunktion nicht möglich war. Durch einen ausgemalten Kreis wird angegeben, dass der Nachweis möglich war.

Für T61 konnten 2 verschiedene, spezifische CD8+ T- Zell- Linien angelegt werden. Wie Abb. 6a zeigt, waren bei ersterer 3,9% der CD 8+ T- Zellen spezifisch für das Peptid RT 42-50. Abb. 6b zeigt, dass die weitere CD8+ T- Zell- Linie eine Spezifität von 2,64% für das Peptid RT 41-40 M41L aufwies. Die Spezifität wurde in beiden Fällen anhand der Produktion von IFN γ nach Stimulation mit dem jeweiligen Peptid bestimmt.

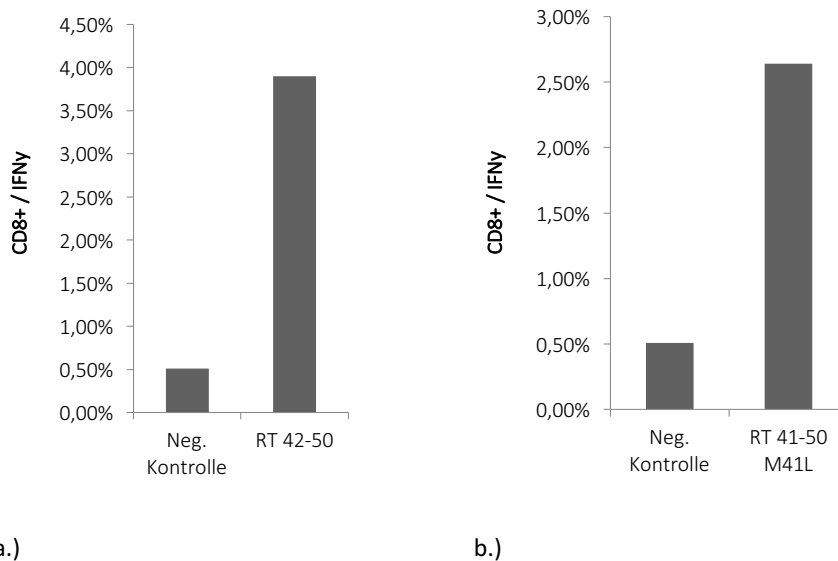


Abbildung 6: Spezifische CD8+ T- Zell- Linien für T61

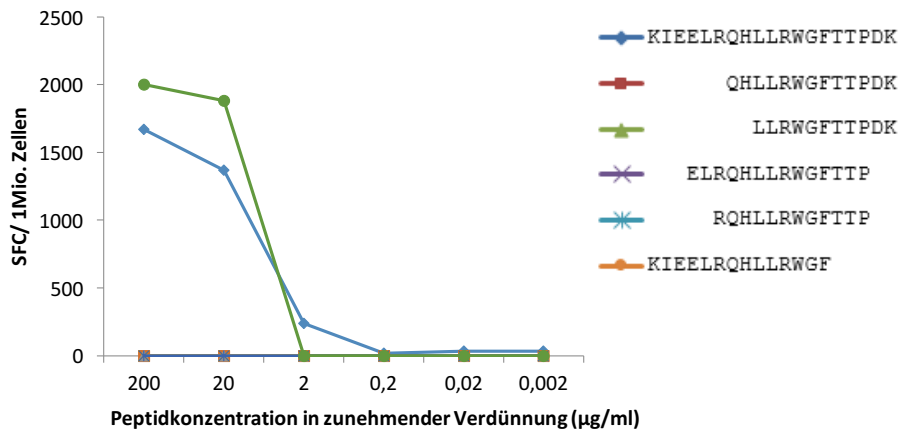
In Abb. 6a ist die für das Peptid RT 42-50 spezifische CD8+ T- Zell- Linie und in Abb. 6b die für das Peptid RT 41-50 M41L spezifische CD8+ T-Zell-Linie dargestellt. Auf der y- Achse ist jeweils der prozentuale Anteil der IFN γ -produzierenden CD8+ T- Zellen angegeben. Auf der x- Achse ist beschrieben, ob es sich um das Ergebnis nach Stimulation durch das jeweilige Peptid oder um das Ergebnis der jeweiligen Negativ- Kontrolle ohne Peptid handelt.

Für T77 ließ sich trotz wiederholter Versuche keine spezifische CD8+ T- Zell- Linie anlegen. Versuche zur Überprüfung der HLA- Restriktion des Epitops dieses Patienten ließen sich in der Folge nicht durchführen.

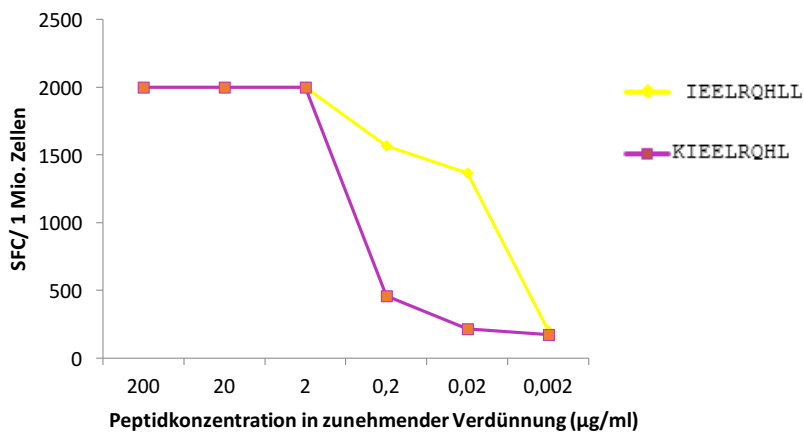
3.3.2 IEELRQHLL (IL9) als optimales Epitop für P18

Zur Ermittlung des optimalen Epitops für P18 wurden Titrations- Elispots durchgeführt. Hierbei wurden die verschiedenen truncated Peptide mit dem überlappenden Peptid RT 201-219 verglichen. Dieses Peptid rief die stärkste CD8+ T- Zellantwort im Screening hervor. Wie in Abb.7 ersichtlich, konnte gezeigt werden, dass das Peptid RT 202-210 mit der Sequenz IEELRQHLL (IL9) das optimale Epitop in diesem Bereich darstellte. Es beinhaltet jedoch nicht die Position der T215Y/F- Mutation. In Abb. 8 ist gezeigt, dass die Allele A*29, B*45:01, B*41, C*17 und C*06 im HLA- Restriktionsassay sämtlich negative Ergebnisse aufwiesen. Daher war dieses Epitop am ehesten HLA-A*80:01restringiert. Die experimentelle Bestätigung hierfür steht jedoch aus, da eine BCL mit einem HLA-A*80:01- Merkmal aufgrund des seltenen

Vorkommens dieses Allels in der kaukasischen Bevölkerung nicht vorhanden war. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Titrations- Elispots sowie der HLA- Restriktion aufgeführt. Sowohl die Elispots als auch die Versuche zur Ermittlung der HLA- Restriktion wurden mit Zellen aus der für das Peptid RT 201-219 spezifischen CD8+ T- Zell- Linie durchgeführt.



a.)



b.)

Abbildung 7: Titrationselispot für RT 201 – 219

Auf der x-Achse ist jeweils die Peptidkonzentration in zunehmender Verdünnung, auf der y-Achse die Stärke der CD8+ T- Zellantwort in SFC/ 1 Million Zellen angegeben. In Abb. 7a ist in dunkelblau das lange Screening- Peptid KK19 sowie die anderen längeren Peptide dargestellt. Abb. 7b zeigt das optimale Epitop IL9 in Gelb und zusätzlich KL9 in Pink.

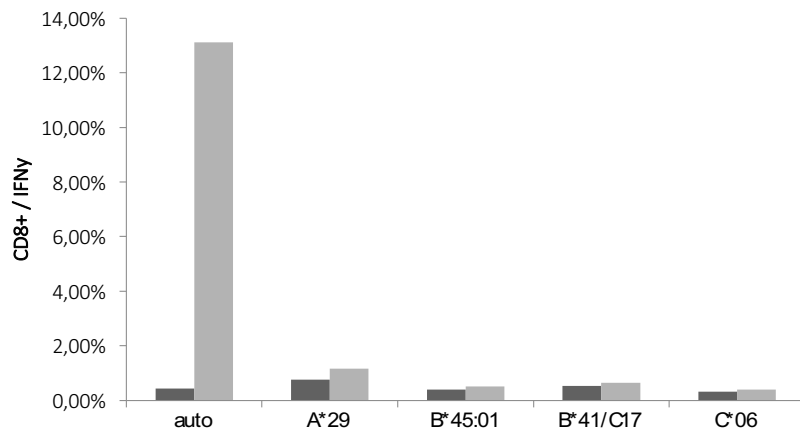
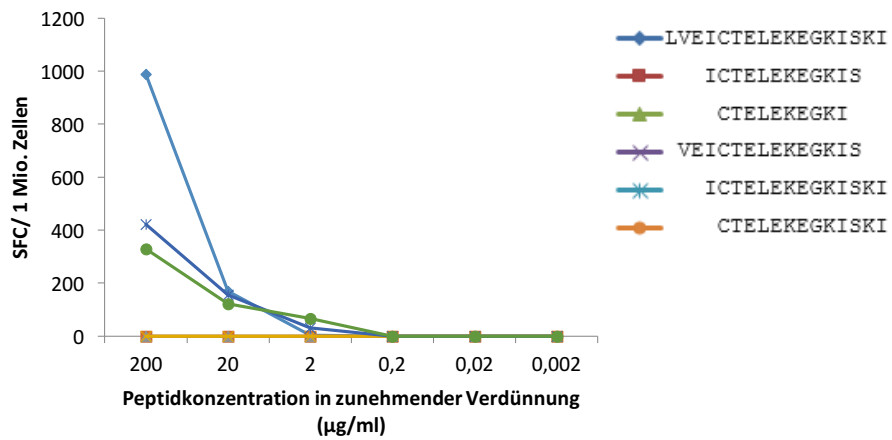


Abbildung 8: HLA- Restriktionsassay für das Epitop IEELRQHLL (IL9)

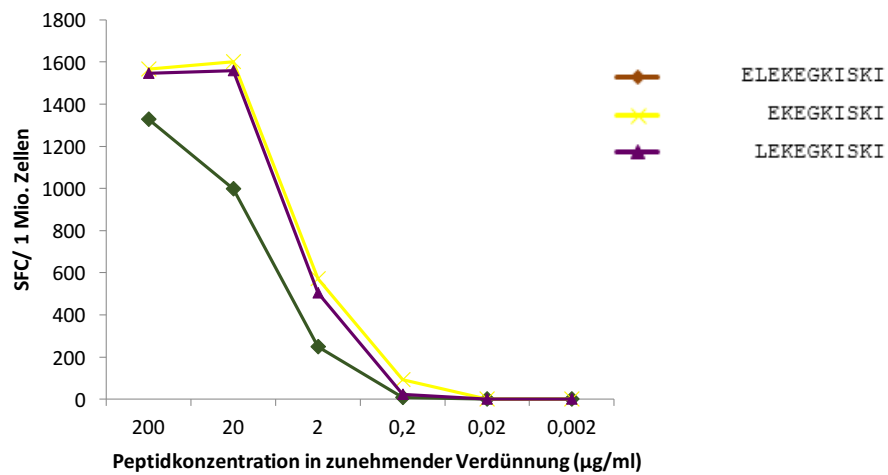
Auf der x- Achse sind die relevanten HLA- Merkmale der verwendeten BCL aufgeführt. Auf der y- Achse der prozentuale Anteil der IFN γ - produzierenden CD8+ T- Zellen. Der hellgraue Balken stellt das Ergebnis nach Peptidstimulation durch RT 201-219 dar, der dunkelgraue Balken die Negativ- Kontrolle ohne Peptid. Eine signifikant höhere Anzahl IFN γ - produzierender Zellen nach Peptidstimulation lässt sich nur bei der Verwendung autologer T- Zellen beobachten (siehe Text).

3.3.3 EKEGKISKI (E19) als optimales Epitop für T61

Zur Ermittlung des optimalen Epitops für T61 wurden truncated Peptide in Titrations- Elispots mit dem überlappenden Peptid RT 34-50 M41L verglichen. Dieses Peptid rief die stärkste CD8+ T- Zellantwort im Screening hervor. Wie Abb. 9 zeigt, konnte als optimales Epitop das Peptid RT 42-50 mit der Sequenz EKEGKISKI (E19) ermittelt werden. Das Peptid RT 41-50 mit der Sequenz LEKEGKISKI (LI10) wurde annähernd gleich stark erkannt. Da in diesem Fall das kürzere Epitop als optimales Epitop gewertet wurde, war dies E19. Dessen Sequenz enthielt leider nicht die Position der M41L- Mutation. Des Weiteren zeigt Abb. 10 die Restriktion dieses Epitops durch das Allel HLA-B*49:01. Die Elispots wurden mit PBMC des Patienten sowie mit Zellen aus der für das Peptid RT 42-50 spezifischen CD8+ T- Zell- Linie durchgeführt. Die HLA- Restriktion wurde ausschließlich an Hand von Zellen aus der für das Peptid RT 42-50 spezifischen CD8+ T- Zell- Linie ermittelt.



a.)



b.)

Abbildung 9: Titrationselispot für RT 37-50 M41L

Auf der x-Achse sind die Peptidkonzentration in zunehmender Verdünnung, auf der y-Achse die Stärke der CD8+ T- Zellantwort in spot-forming cells (SFC) / 1 Million Zellen angegeben. In Abb. 9a ist in dunkelblau das lange Screening- Peptid LI17 sowie die anderen längeren Peptide dargestellt. Abb. 9b zeigt das optimale Epitop E19 in Gelb und zusätzlich LI10 in Pink und E111 in Braun.

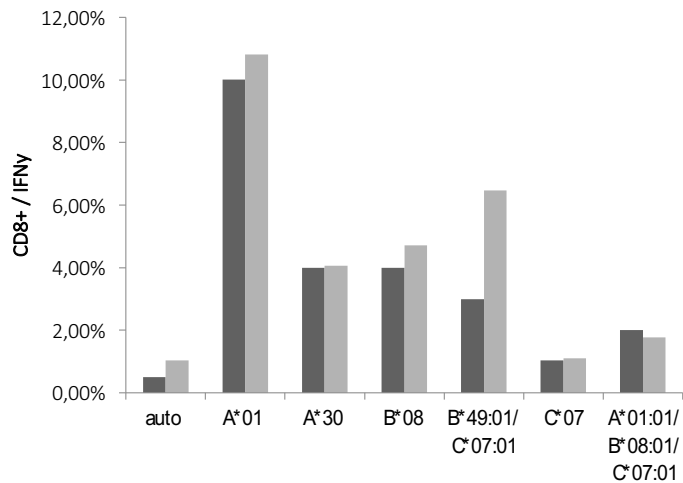


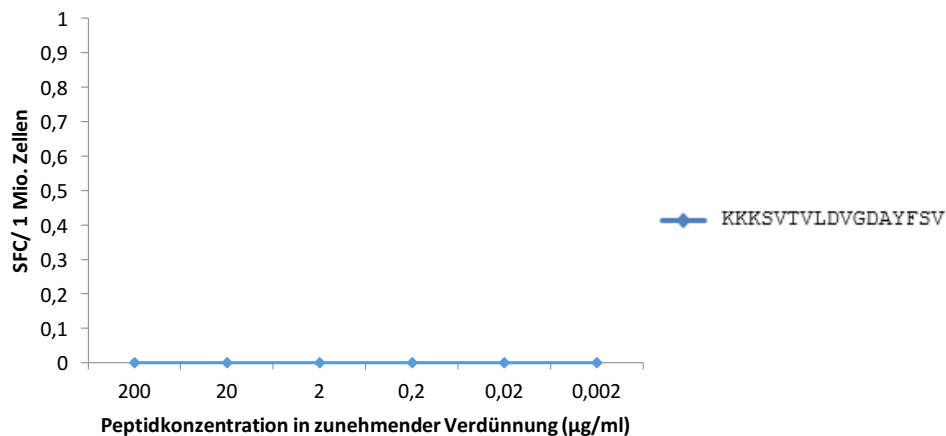
Abbildung 10: HLA- Restriktionsassay für das Epitop EKEGKISKI (E19)

Auf der x- Achse sind die relevanten HLA- Merkmale der verwendeten BCL aufgeführt. Auf der y- Achse der prozentuale Anteil der IFN γ - produzierenden CD8+ T- Zellen. Der hellgraue Balken stellt das Ergebnis nach Peptidstimulation durch RT 42-50 dar, der dunkelgraue Balken die Negativ- Kontrolle ohne Peptid. Eine signifikant höhere Anzahl IFN γ - produzierender Zellen nach Peptidstimulation ließ sich nur bei der Verwendung der BCL mit den HLA- Merkmalen B*49:01 und C*07:01 beobachten sowie bei der Verwendung von autologen T- Zellen. C*07:01 trat noch bei einer weiteren BCL mit negativem Ergebnis auf und ist somit auszuschließen. Bei der BCL mit dem HLA- Allel A*01 erreichte die Negativkontrolle ähnlich hohe Werte wie nach Peptidstimulation. Hier lag am ehesten eine unspezifische Stimulation durch die allogenen Immunzellen vor. Das Ergebnis ist als negativ zu werten. Zudem zeigte sich bei der Verwendung von B- Zellen generell eine stärkere Reaktion als bei der Verwendung von autologen T- Zellen.

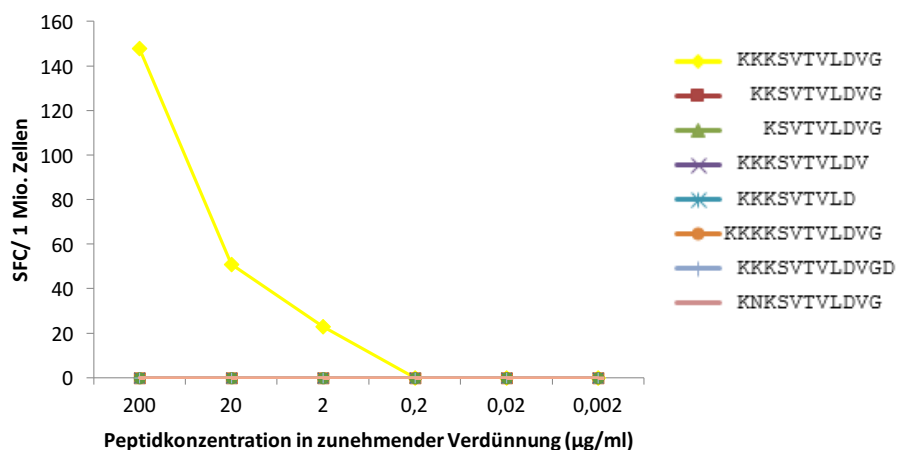
3.3.4 KKKSVTVLDVG (KG11) als optimales Epitop für T77

Zur Ermittlung des optimalen Epitops für T77 wurden in Titrations- Elispots verschiedene truncated Peptide mit dem überlappenden Peptid RT 102-118 verglichen. Dieses Peptid rief die stärkste CD8+ T- Zellantwort im Screening hervor. Wie Abb.11 zeigt, konnte das Peptid RT 102-112 mit der Sequenz KKKSVTVLDVG (KG11) als optimales Epitop bestimmt werden. Dieses Epitop beinhaltet zwar die Position RT 103 der K103N- Mutation, jedoch konnte die CD8+ T- Zellantwort lediglich gegen den Wildtyp gezeigt werden. Sobald das Peptid die Mutation enthielt, konnte keine CD8+ T- Zellreaktion nachgewiesen werden. Eine Bestimmung der HLA- Restriktion des Epitops war nicht durchzuführen, da sich für den Patienten trotz wiederholter Versuche keine Peptid- spezifische CD8+ T- Zell- Linie anlegen ließ. Laut SYFPEITHI war dieses Epitop HLA-B*44:02 restringiert, ein Allel, das der Patient auch aufwies. Die Ergebnisse der

Titration- Elispots sind im Folgenden aufgeführt. Sämtliche Elispots wurden mit PBMC des Patienten durchgeführt.



a.)



b.)

Abbildung 11: Titrations- Elispot für RT 102-118

Auf der x-Achse sind die Peptidkonzentrationen in zunehmender Verdünnung, auf der y-Achse die Stärke der CD8+ T- Zellantwort in spot-forming cells (SFC) / 1 Million Zellen angegeben. In Abb. 11a ist in dunkelblau das lange Screening- Peptid KV17 dargestellt. Abb. 2b zeigt in Gelb das optimale Epitop KG11 und zusätzlich die weiteren getesteten Peptide. CD8+ T- Zellantworten ließen sich nur für KG11 nachweisen. Wie ersichtlich, führt die Einführung der K103N- Mutation in dieses Peptid (rosa) zu einem Verlust des Erkennens des Epitops im Elispot- Assay. Gemäß unseren Vorgaben wiesen auch die je eine AS längeren oder kürzeren Peptide als KG11

keine positive Reaktion auf. Hierzu anzumerken ist, dass die Elispot-Platten stets relativ viel Hintergrund in Form von SFC in den Negativ-Kontrollen aufwiesen.

4 Diskussion

Durch die Einführung der HAART konnte die Mortalität durch das HI- Virus entscheidend gesenkt werden. Ein Ansatz, die primären Therapiestrategien trotz Auftreten von DRM beibehalten zu können, ist die antiretrovirale Therapie durch eine therapeutische Impfung zu ergänzen. Dabei würde der Wildtyp des Virus durch die gängige ART kontrolliert, während durch die Impfung induzierte, spezifische CD8+ T- Zellen die Replikation der mutierten Variante inhibieren. Als Grundlage dazu mussten Epitope entsprechender CD8+ T- Zellen kartiert werden. Dabei konzentrierten wir uns auf die DRM K103N (vermittelt eine komplette Resistenz gegen Efavirenz und Nevirapin), T215Y/F (vermittelt eine Resistenz gegen Tenofovir, Abacavir, Didansoin, Stavudin und Zidovudin) und M41L (vermittelt eine Resistenz gegen Zidovudin). Wir konnten die CD8+ T- Zellepitope IEELRQHLL (IL9), EKEGKISKI (EI9) und KKKSVTVLDVG (KG11) ermitteln.

Die Mutationen lagen alle im Bereich der RT und wurden aufgrund ihres relativ häufigen Auftretens sowie wegen ihrer Resistenzvermittlung gegen bedeutende Wirkstoffe der Klassen der NRTI und NNRTI ausgewählt. Zudem ist bekannt, dass sich die dominante Immunantwort CD8+ T- Zellen bei Patientin mit antiretroviraler Therapie von Gag zu Pol verschiebt [88], weshalb bei unserem Patientenkollektiv von Immunantworten in relativ hoher Frequenz auszugehen war.

Aus einem Kollektiv 49 HIV- positiver Patienten konnten wir bei 22 Patienten CD8+ T- Zellantworten auf Regionen mit den ausgewählten DRM nachweisen. CD8+ T- Zellantworten gegen das HI- Virus, die sich sowohl gegen den Wildtyp als auch gegen Abschnitte mit DRM richten [89], sind als weit verbreitet und auch in fortgeschrittenen Krankheitsphasen beschrieben [60, 75, 86]. Da wir Antworten sowohl gegen Wildtyp als auch DRM nachweisen konnten, steht dies im Einklang mit unseren Ergebnissen. Anhand der M184V- Mutation wurde beschrieben, dass das Vorhandensein spezifischer gegen DRM gerichteter Antworten mit einem verbesserten klinischen Outcome in Form einer niedrigeren Viruslast assoziiert ist [75]. Diese stellt den entscheidenden prognostischen Marker für die Progression der Erkrankung dar [90].

Von den in dieser Arbeit ermittelten Epitopen waren IL9 [80, 84, 91] und EI9 [87, 92] bereits mehrfach zuvor in der Literatur beschrieben worden, während KG11 laut der Los- Alamos-Datenbank bisher nicht als optimales Epitop definiert war.

Weiter wurde die HLA- Restriktion der Epitope ermittelt, wobei sich die experimentelle Bestimmung lediglich für EI9 durchführen ließ. Dieses Epitop war HLA-B*49:01 restringiert. Vorherige Publikationen beschrieben eine Restriktion durch HLA-B*51:01, womit die Assoziation zu einem weiteren HLA- Allel gezeigt wurde. Das Allel HLA-B*51:01 ist in der Literatur als zum HLA- Supertyp B7 zugehörig beschrieben [54]. Da HLA-B*49:01 als zu dem Supertyp B*44 [93] zugehörig beschrieben ist, konnte auch die Assoziation zu einem weiteren Supertyp aufgezeigt werden.

Die beiden weiteren HLA- Restriktionen ließen sich experimentell nicht durchführen. Dies war im Fall von KG11 nicht möglich, da keine CD8+ T- Zell- Linie aus Zellen des Patienten T77 mit ausreichender Spezifität angelegt werden konnte. Ein möglicher Grund für das Misslingen einer CD8+ T- Zell- Linie könnte dadurch gegeben sein, dass der Patient unter Therapie eine nicht nachweisbare Viruslast aufwies und deswegen nur eine geringe Zahl spezifischer Zellen im peripheren Blut aufwies. Es ist beschrieben, dass entsprechende Zellen in geringerer Quantität auftreten, sobald das Antigen entfernt wurde [60]. Zudem ist beschrieben, dass im Verlauf der Infektion eine Exhaustion der CD8+ T- Zellen stattfindet [94]. Es besteht die Möglichkeit, dass dies zu einer fehlenden Proliferation der Zellen in vitro und damit zum Misslingen der Zelllinie geführt hat. KG11 war laut SYFPEITHI am ehesten durch HLA-B*44:02 restringiert. Dies konnte experimentell weder bestätigt noch widerlegt werden.

Im Falle von IL9 konnten durch die zur Verfügung stehenden B- Zelllinien nicht alle Allele des Patienten P18 abgedeckt werden. Bisherige Publikation beschrieben für IL9 die Assoziation zu den HLA- Allelen HLA-B*40:01 und HLA-B*60/61. Da der Patient P18 beide Allele nicht aufwies, war von einer Restriktion durch mindestens ein weiteres Allel auszugehen. Im Restriktions- Assay konnten alle HLA- Allele des Patienten P18 bis auf HLA-A*80:01 ausgeschlossen werden, wodurch IL9 durch dieses Allel restringiert zu sein schien. Hierzu ist jedoch noch eine Bestätigung mit einer BCL nötig, welche dieses in der kaukasischen Bevölkerung seltene Allel aufweist. Da für die HLA- Allele A*29:02, B*41:02, C*06:01 und C*17:03 lediglich der Haupt- jedoch nicht der Subtyp überprüft wurde, kann auch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Präsentation über eines dieser Allele erfolgte. Laut SYFPEITHI war das Epitop am ehesten durch HLA-B*41:01 restringiert. Dies wich von unserem Ergebnis ab und der Patient wies darüber hinaus nicht das HLA- Allel B*41:01, sondern B*41:02 auf.

Weiter wurde evaluiert, inwiefern die ermittelten Epitope von Bedeutung für die Entwicklung eines Impfstoffes sein konnten. Bei IL9 und E19 lag die Mutation leider gerade außerhalb des Epitops, womit beide Epitope von geringer Relevanz zu sein scheinen. Wenn auch frühere Publikationen IL9 bescheinigen, an einer Kontrolle des Wildtyps beteiligt zu sein [95], während für E19 lediglich ein geringer Effekt beschrieben ist [96]. Jedoch wurde im Titrationselispot die Sequenz LEKEGKISKI (L110) mit ähnlicher hoher Stärke wie E19 erkannt. Gemäß unseren Vorgaben wurde E19 als optimales Epitop gewertet, da jedoch das um eine AS längere L110 die M41L- Mutation beinhaltet, erscheint es denkbar, dass CD8+ T- Zellen, welche E19 als optimales Epitop aufwiesen an der Kontrolle von Virusvarianten mit dieser DRM beteiligt sein können. Im Fall von KG11 erkannten CD8+ T- Zellen ihr Epitop lediglich mit der Sequenz des Wildtyps. Das modifizierte Epitop mit Beinhaltung der K103N- Mutation wurde in der Folge gar nicht mehr erkannt. Es ist davon auszugehen, dass die K103N- Mutation in diesem Fall sowohl eine DRM als auch eine Escape- Mutation für die CD8+ T- Zellantwort darstellte, womit KG11 folglich für die Fragestellung dieser Arbeit ebenfalls von geringer Relevanz zu sein scheint. Es ist vielfach beschrieben, dass potente CD8+ T- Zellantworten zu Escape- Mutationen in Genom des HI- Virus führen [64, 97] und ihr Auftreten als ein Anzeichen für einen Selektionsdruck durch eine effektive Immunantwort zu werten ist [98]. Zudem ist beschrieben, dass das Auftreten von DRM in Epitopen Auswirkungen auf die Erkennung des Epitops haben kann [89]. Dies schien auch hier der Fall zu sein.

Anhand des Epitops IL9 wurde darüber hinaus untersucht, ob die Immunantwort über eine Polyfunktionalität in Form von diversen Effektorfunktionen der betreffenden CD8+ T- Zellen verfügte. Es ist beschrieben, dass eine Polyfunktionalität ein entscheidendes Kriterium für die Effektivität der Immunantwort ist [59]. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen neben INF γ auch TNF α als weiteres Chemokin produzierten und zudem der Oberflächenmarker CD107a exprimiert wurde. Aufgrund dieser Vielfalt von Effektorfunktionen waren die Zellen als polyfunktional zu bezeichnen. Auch ist bekannt, dass die Immunantworten im Laufe der Infektion verschiedene Effektorfunktionen einbüßen und somit ineffektiver werden [66]. Dies schien hier noch nicht der Fall zu sein. Zudem ist beschrieben, dass CD8+ T- Zellen zuerst die Fähigkeit verlieren IL-2 zu produzieren [99, 100]. Da diese Effektorfunktion als einzige untersuchte Eigenschaft nicht nachgewiesen werden konnte, steht das Ergebnis damit im Einklang. Jedoch ist anzumerken, dass CD8+ T- Zell- Linien über längere Zeiträume mit IL-2 inkubiert wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zellen dadurch wieder Effektorfunktionen erworben haben, über die sie in vivo nicht verfügten [101, 102].

In der Zusammenschau konnte gezeigt werden, dass CD8+ T- Zellantworten gegen die 3 untersuchten DRM bestehen und es konnten 3 optimale Epitope ermittelt werden. Bezüglich

der Fragestellung dieser Arbeit musste jedoch leider festgestellt werden, dass diese für die Entwicklung eines Impfstoffes keine Relevanz zu haben scheinen. Da wir jedoch das Programm SYFPEITHI zur Vorhersage der Epitope verwendeten, konnte anhand der experimentell bestimmten Epitope die Genauigkeit des Vorhersageprogramms überprüft werden. Dabei wurde keines der ermittelten Epitope mit der höchsten Wertung vorhergesagt. Dies wies auf die weitere Notwendigkeit einer experimentellen Epitopermittlung für weitere Studien hin. Diese Beobachtung ließ sich bei einer größeren Zahl von Epitopen bestätigen [103], wobei die Ergebnisse dieser Arbeit in die Publikation einfließen.

In der Zusammenschau konnten trotz breiter Suche keine für die Entwicklung eines Impfstoffes bedeutsamen Epitope entdeckt werden, was es zunächst als schwierig erscheinen lässt, die HAART durch eine therapeutische Impfung zu ergänzen. Es ist jedoch noch weitere Grundlagenforschung mit experimenteller Kartierung weiterer Epitope im Bereich von DRM notwendig, um diese Beobachtung zu bestätigen.

5 Zusammenfassung

Medikamentenresistenzmutationen (DRM) im Genom des HI- Virus stellen für die Anwendung der antiretroviralen Therapie (ART) eines der Hauptprobleme dar. Diese bedingen ein vermindertes Ansprechen der „first- line- Schemata“, welche häufig auf den Substanzklassen der Nukleosidischen Reverse- Transkriptase Inhibitoren (NRTI) und der Nicht- Nukleosidischen Reverse- Transkriptase Inhibitoren (NNRTI) basieren. Grundsätzliche Idee der vorliegenden Arbeit war es, eine verlängerte Wirksamkeit der first- line- Medikamente zu gewährleisten, indem spezifische, gegen DRM gerichtete CD8+ T- Zellantworten, mittels „therapeutischer Impfung“ induziert werden. Als Vorarbeiten hierfür konnten in dieser Arbeit drei CD8+ T- Zellepitope in der Reversen Transkriptase (RT) definiert werden, speziell im Bereich der Mutationen K103N (vermittelt eine komplette Resistenz gegen Efavirenz und Nevirapin), T215Y/F (vermittelt eine Resistenz gegen Tenofovir, Abacavir, Didansoin, Stavudin und Zidovudin) und M41L (vermittelt eine Resistenz gegen Zidovudin). Dies waren IEELRQHLL (IL9), EKEGKISKI (EI9) und KKKSVTVLVDVG (KG11). Bei den Epitopen IL9 und EI9 lag die DRM leider gerade außerhalb des als optimal definierten Epitops. Für das Epitop KG11 ergab sich, dass die K103N nicht nur DRM, sondern auch Fluchtmutation für die CD8+ T-Zellantwort darstellte. Mit dieser Mutation entgeht das Virus also sowohl dem Medikament als auch der CD8+ T- Zellantwort. Damit waren alle drei neu definierten Epitope hinsichtlich der

therapeutischen Impfung gegen DRM nicht hilfreich. Jedoch konnte anhand dieser Epitope die Vorhersage-Genauigkeit von Epitop prediction-Programmen getestet werden.

Diese Ergebnisse sind bereits publiziert (Roeder, Meissner et al.: Immunology 2014, p193-201).

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Plastikwaren und Verbrauchsartikel
Tabelle 2	Chemikalien, Reagenzien und Kits
Tabelle 3	Antikörper für die Durchflusszytometrie
Tabelle 4	Antikörper für Elispot
Tabelle 5	Geräte
Tabelle 6	Überlappende 15-20mer Peptide
Tabelle 7	Peptide für die Truncationen
Tabelle 8	Patienten
Tabelle 9	Software
Tabelle 10	Lymphoblastoide B- Zelllinien (BCL)
Tabelle 11	CD8+ T- Zellantworten auf überlappende Peptide des Pol- Gens
Tabelle 12	HLA- Typisierung der Patienten
Tabelle 13	Epitopvorhersagen von SYFPEITHI

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Gene des HI- Virus
Abb. 2	HI- Virion
Abb. 3	CD4+ Zellzahl und Viruslast im Verlauf der Infektion
Abb. 4	Peptide der Überprüfungs- Elispots für T05, T25, T31 und T63
Abb. 5	Spezifische CD8+ T- Zell- Linie für P18
Abb. 6	Spezifische CD8+ T- Zell- Linien für T61
Abb. 7	Titrationseispot für RT 201 – 219
Abb. 8	HLA- Restriktionsassay für das Epitop IEELRQHLL (IL9)
Abb. 9	Titrationseispot für RT 37-50 M41L
Abb. 10	HLA- Restriktionsassay für das Epitop EKEGKISKI (EI9)
Abb. 11	Titrationseispot für RT 102-118

6.3 Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Roider J, Meissner T, Kraut F, Vollbrecht T, Stirner R, Bogner JR, Draenert R., Comparison of experimental fine-mapping to *in silico* prediction results of HIV-1 epitopes reveals ongoing need for mapping experiments. *Immunology*. 2014 Oct; 143(2): 193–201.

6.4 Abkürzungsverzeichnis

3TC	Lamivudin (Epivir®)
ABC	Abacavir (Ziagen®)
AIDS	erworbenes Immunschwäche Syndrom (engl. acquired immuno- deficiency syndrome)
APC	antigenpräsentierende Zellen (engl. antigene presenting cells)
ART	antiretrovirale Therapie
AS	Aminosäure
ATV	Atazanavir (Reyataz®)
AZT	Zidovudin (Retrovir®)
BCL	Lymphoblastoide B-Zelllinie (engl. B- lymphoblastoid cell line)
CCL	CC- Motiv- Ligand
CCR5	CC- Motiv- Chemokinrezeptor 5 (engl. C-C motif chemokine receptor 5)
CD	engl. cluster of differentiation
CDC	engl. Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary deoxyribonucleic acid)
CMV	Zytomegalievirus
CSA	Cyclosporin A
CXCR4	Chemokinrezeptor 4
d4T	Stavudin (Zerit®)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
ddl	Didanosin (Videx®)
DAIG	Deutsche AIDS- Gesellschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRV	Darunavir (Prezista®)
DVD	Delavirin (Rescriptor®)
DTG	Dolutegravir (Tivicay®)

DRM	Medikamentenresistenzmutation (engl. drug resistance mutation)
EBV	Ebbstein- Barr Virus
EFV	Efavirenz (Sustiva®)
Elispot	engl. enzyme linked immunospot assay
ETV	Etravirin (Intelence®)
EVG	Elvitegravir (Viteka®)
FACS	Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calb serum)
FPV	Fosamprenavir (Telzir®)
FTC	Emtricitabin (Emtriva®)
GP 120	Glykoprotein 120
GP 41	Glykoprotein 41
GY	Gray
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IDV	Indinavir (Crixivan®)
IFN γ	Interferon-gamma
IL-2	Interleukin 2
IN	Integrase
INI	Integraseinhibitor
LPV	Lopinavir (Kaletra®)
LTR	engl. long terminal repeats
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
MVC	Maraviroc (Celsentri®)
NFV	Nelfinavir (Viracept®)
NNRTI	Nicht- nukleosidische Reverse- Transkriptase- Inhibitoren
NRTI	Nukleosidische bzw. Nukleotidische- Reverse- Transkriptase- Inhibitoren
NVP	Nevirapin (Viramune®)
PBMC	mononukleäre Zellen aus periphärem Blut (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate- buffered saline)

PHA	Phytohaemagglutinin
PI	Proteaseinhibitor
PR	Protease
RAL	Raltegravir (Isentress®)
RPV	Rilpivirin (Edurant®)
RT	Reverse Transkriptase
RTV	Ritonavir (Norvir®)
SIV	simianes Immundefizienz-Virus
SFC	engl. spot- forming cells
SQV	Saquinavir (Invirase®)
T-20	Enfuvirtide (Fuzeon®)
TCR	T-Zellrezeptor (engl. T- cell receptor)
TDF	Tenofovir (Viread®)
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPV	Aptivus (Tipranavir®)
U/Min	Umdrehungen pro Minute
VL	Viruslast
VZV	Varizella Zoster Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. world health organisation)
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

1. Siegal, F.P., et al., *Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1439-44.
2. Masur, H., et al., *An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1431-8.
3. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
4. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 497-500.
5. UNAIDS, *Fact Sheet - 2014 Global Statistics*. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, Genf, Schweiz, 2014.
6. Reeves, J.D. and R.W. Doms, *Human immunodeficiency virus type 2*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 6): p. 1253-65.
7. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1552): p. 2487-94.
8. Subbramanian, R.A. and E.A. Cohen, *Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 6831-5.
9. Greene, W.C., *Regulation of HIV-1 gene expression*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 453-75.
10. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 1-32.
11. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-7.
12. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. Nature, 1996.
13. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
14. Preston, B.D., B.J. Poiesz, and L.A. Loeb, *Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase*. Science, 1988. **242**(4882): p. 1168-71.
15. Siliciano, R.F. and W.C. Greene, *HIV latency*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a007096.
16. Freed, E.O., *HIV-1 replication*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
17. RKI, *HIV/AIDS in Deutschland – Eckdaten der Schätzung*. Robert Koch Institut, Berlin, 2013.
18. RKI, *Epidemiologisches Bulletin*. Robert Koch Institut, Berlin, 2014.
19. Clark, S.J., et al., *High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection*. N Engl J Med, 1991. **324**(14): p. 954-60.

20. Kahn, J.O. and B.D. Walker, *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection*. N Engl J Med, 1998. **339**(1): p. 33-9.
21. 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.
22. O'Brien, T.R., et al., *Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study*. JAMA, 1996. **276**(2): p. 105-10.
23. Ho, D.D., et al., *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. Nature, 1995. **373**(6510): p. 123-6.
24. Todd, J., et al., *Time from HIV seroconversion to death: a collaborative analysis of eight studies in six low and middle-income countries before highly active antiretroviral therapy*. AIDS, 2007. **21 Suppl 6**: p. S55-63.
25. Fevrier, M., K. Dorgham, and A. Rebollo, *CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis*. Viruses, 2011. **3**(5): p. 586-612.
26. Hoffmann, C. and J.K. Rockstroh, *HIV Buch 2012, Hamburg: Medizin Fokus Verlag*. 2012.
27. Schwartlander, B., et al., *Changes in the spectrum of AIDS-defining conditions and decrease in CD4+ lymphocyte counts at AIDS manifestation in Germany from 1986 to 1991*. AIDS, 1992. **6**(4): p. 413-20.
28. Stein, D.S., et al., *Predicting clinical progression or death in subjects with early-stage human immunodeficiency virus (HIV) infection: a comparative analysis of quantification of HIV RNA, soluble tumor necrosis factor type II receptors, neopterin, and beta2-microglobulin*. Multicenter AIDS Cohort Study. J Infect Dis, 1997. **176**(5): p. 1161-7.
29. Hoffman, C. and J.K. Rockstroh, *HIV- Buch 2014/15, Hamburg: Medizin Fokus Verlag*. 2014.
30. Arts, E.J. and D.J. Hazuda, *HIV-1 antiretroviral drug therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a007161.
31. DAIG, *Deutsch- Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie*. 2014.
32. Ripamonti, D., E. Bombana, and M. Rizzi, *Rilpivirine: drug profile of a second-generation non-nucleoside reverse transcriptase HIV-inhibitor*. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2014. **12**(1): p. 13-29.
33. Dow, D.E. and J.A. Bartlett, *Dolutegravir, the Second-Generation of Integrase Strand Transfer Inhibitors (INSTIs) for the Treatment of HIV*. Infect Dis Ther, 2014.
34. Staszewski, S., et al., *Virological and immunological analysis of a triple combination pilot study with loviride, lamivudine and zidovudine in HIV-1-infected patients*. AIDS, 1996. **10**(5): p. F1-7.
35. D'Aquila, R.T., et al., *Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators*. Ann Intern Med, 1996. **124**(12): p. 1019-30.
36. Finzi, D., et al., *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 512-7.

37. Chun, T.W., et al., *Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13193-7.
38. Carr, A., et al., *A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors*. AIDS, 1998. **12**(7): p. F51-8.
39. Holmberg, S.D., et al., *Protease inhibitors and cardiovascular outcomes in patients with HIV-1*. Lancet, 2002. **360**(9347): p. 1747-8.
40. Juday, T., et al., *Cost-effectiveness of the once-daily efavirenz/emtricitabine/tenofovir tablet compared with the once-daily elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir tablet as first-line antiretroviral therapy in HIV-infected adults in the US*. Clinicoecon Outcomes Res, 2013. **5**: p. 437-45.
41. Kuhlmann, A., et al., *[Cost of Illness of HIV Patients under Antiretroviral Therapy in Germany - Results of the 48-Week Interim Analysis of the Prospective Multicentre Observational Study 'CORSAR']*. Gesundheitswesen, 2015. **77**(6): p. e133-42.
42. Schneider, H., et al., *Health systems and access to antiretroviral drugs for HIV in Southern Africa: service delivery and human resources challenges*. Reprod Health Matters, 2006. **14**(27): p. 12-23.
43. UNAIDS, *Progress Report*. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, Genf, Schweiz, 2009.
44. DeGruttola, V., et al., *The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan*. Antivir Ther, 2000. **5**(1): p. 41-8.
45. Ledergerber, B., et al., *AIDS-related opportunistic illnesses occurring after initiation of potent antiretroviral therapy: the Swiss HIV Cohort Study*. JAMA, 1999. **282**(23): p. 2220-6.
46. Menendez-Arias, L., *Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(8): p. 381-8.
47. Garcia-Gasco, P., et al., *Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(3): p. 699-704.
48. Perelson, A.S., et al., *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1582-6.
49. Drake, J.W., *Rates of spontaneous mutation among RNA viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4171-5.
50. Tang, M.W. and R.W. Shafer, *HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications*. Drugs, 2012. **72**(9): p. e1-25.
51. Borrow, P., et al., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 6103-10.
52. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(10): p. 702-9.
53. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(11): p. 782-6.
54. Sidney, J., et al., *HLA class I supertypes: a revised and updated classification*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 1.
55. Sidney, J., et al., *Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs*. Immunol Today, 1996. **17**(6): p. 261-6.

56. 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.
57. Yang, O.O., et al., *Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 3120-8.
58. 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.
59. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
60. Draenert, R., et al., *Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2004. **78**(2): p. 630-41.
61. Migueles, S.A., et al., *HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2709-14.
62. O'Brien, S.J. and G.W. Nelson, *Human genes that limit AIDS*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 565-74.
63. Shin, H. and E.J. Wherry, *CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(4): p. 408-15.
64. Price, D.A., et al., *Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1890-5.
65. 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.
66. Freeman, G.J., et al., *Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade*. Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(10): p. 2223-2227.
67. Parren, P.W., et al., *Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro*. J Virol, 2001. **75**(17): p. 8340-7.
68. Caskey, M., et al., *Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117*. Nature, 2015. **522**(7557): p. 487-91.
69. Walker, B.D. and D.R. Burton, *Toward an AIDS vaccine*. Science, 2008. **320**(5877): p. 760-4.
70. Stratov, I., et al., *Induction of T-cell immunity to antiretroviral drug-resistant human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7728-37.
71. Freel, S.A., K.O. Saunders, and G.D. Tomaras, *CD8(+)T-cell-mediated control of HIV-1 and SIV infection*. Immunol Res, 2011. **49**(1-3): p. 135-46.
72. 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.
73. Miura, T., et al., *HLA-B57/B*5801 human immunodeficiency virus type 1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic T-lymphocyte [corrected] recognition*. J Virol, 2009. **83**(6): p. 2743-55.

74. Karlsson, A.C., et al., *Dual pressure from antiretroviral therapy and cell-mediated immune response on the human immunodeficiency virus type 1 protease gene*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 6743-52.
75. Vollbrecht, T., et al., *Control of M184V HIV-1 mutants by CD8 T-cell responses*. Med Microbiol Immunol, 2012. **201**(2): p. 201-11.
76. LosAlamosDataBase, *HIV Sequence Database Compendium*, <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2001/HIV1proteins.pdf>. 2001.
77. Draenert, R., et al., *Impact of inraepitope epitope location on CD8 T cell recognition: implications for design of overlapping peptide panels*. AIDS, 2004. **18**(6): p. 871-6.
78. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
79. Llano, A., N. Frahm, and C. Brander, *How to Optimally Define Optimal Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes in HIV- Infection?*, in *HIV Molecular Immunology 2009*. 2009.
80. Altfeld, M.A., et al., *Identification of dominant optimal HLA-B60- and HLA-B61-restricted cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitopes: rapid characterization of CTL responses by enzyme-linked immunospot assay*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8541-9.
81. Walker, B.D., et al., *Long-term culture and fine specificity of human cytotoxic T-lymphocyte clones reactive with human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9514-8.
82. Walker, B.D., et al., *HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals*. Nature, 1987. **328**(6128): p. 345-8.
83. Draenert, R., et al., *Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses*. J Immunol Methods, 2003. **275**(1-2): p. 19-29.
84. Draenert, R., et al., *Constraints on HIV-1 evolution and immunodominance revealed in monozygotic adult twins infected with the same virus*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 529-39.
85. Qiagen, *Gentra® Puregene® Handbook*. Qiagen, Venlo, Niederlande, 2007.
86. Addo, M.M., et al., *Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load*. J Virol, 2003. **77**(3): p. 2081-92.
87. Reche, P.A., et al., *Elicitation from virus-naive individuals of cytotoxic T lymphocytes directed against conserved HIV-1 epitopes*. Med Immunol, 2006. **5**: p. 1.
88. Karlsson, A.C., et al., *Antiretroviral drug therapy alters the profile of human immunodeficiency virus type 1-specific T-cell responses and shifts the immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response from Gag to Pol*. J Virol, 2007. **81**(20): p. 11543-8.
89. 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.
90. Deeks, S.G., et al., *Duration and predictors of CD4 T-cell gains in patients who continue combination therapy despite detectable plasma viremia*. AIDS, 2002. **16**(2): p. 201-7.
91. Day, C.L., et al., *Relative dominance of epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons with shared HLA alleles*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6279-91.

92. Haas, G., et al., *Cytotoxic T-cell responses to HIV-1 reverse transcriptase, integrase and protease*. AIDS, 1998. **12**(12): p. 1427-36.
93. Hillen, N., et al., *Essential differences in ligand presentation and T cell epitope recognition among HLA molecules of the HLA-B44 supertype*. Eur J Immunol, 2008. **38**(11): p. 2993-3003.
94. Day, C.L., et al., *Proliferative capacity of epitope-specific CD8 T-cell responses is inversely related to viral load in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2007. **81**(1): p. 434-8.
95. Montefiori, D.C., et al., *Viremia control despite escape from a rapid and potent autologous neutralizing antibody response after therapy cessation in an HIV-1-infected individual*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3906-14.
96. Geels, M.J., et al., *Identification of sequential viral escape mutants associated with altered T-cell responses in a human immunodeficiency virus type 1-infected individual*. J Virol, 2003. **77**(23): p. 12430-40.
97. Brumme, Z.L., et al., *Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1*. PLoS Pathog, 2007. **3**(7): p. e94.
98. Schweighardt, B., et al., *Immune escape mutations detected within HIV-1 epitopes associated with viral control during treatment interruption*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010. **53**(1): p. 36-46.
99. Nomura, L.E., et al., *IL-2 production correlates with effector cell differentiation in HIV-specific CD8+ T cells*. AIDS Res Ther, 2006. **3**: p. 18.
100. 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.
101. Joshi, N.S. and S.M. Kaech, *Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1309-15.
102. Demers, K.R., M.A. Reuter, and M.R. Betts, *CD8(+) T-cell effector function and transcriptional regulation during HIV pathogenesis*. Immunol Rev, 2013. **254**(1): p. 190-206.
103. Roeder, J., et al., *Comparison of experimental fine-mapping to in silico prediction results of HIV-1 epitopes reveals ongoing need for mapping experiments*. Immunology, 2014. **143**(2): p. 193-201.

8 Danksagung

Meinen Dank möchte ich all denen aussprechen, die mir geholfen haben, diese Arbeit zu vollenden.

An erster Stelle danke ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Draenert für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die ständige Unterstützung und die stets große Zuverlässigkeit. Ich bedanke mich bei Frau Dr. med. Roider für die kompetente und engagierte Betreuung.

Besonderer Dank gilt auch Frau Renate Stirner für die immer freundliche Hilfe und Unterstützung im Labor sowie den Mitarbeitern der Infektionsambulanz.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Christopher Völk, Ove Deutschmann, Jonas Weiss, Claudia Steggers sowie meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die mich auf meinem Weg tatkräftig unterstützt haben.

Abschließender Dank gilt allen Spendern, welche ihr Blut für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 13.01.1988
Geburtsort: Hannover
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. med. Petra Meissner und Dr. med. Michael Meissner
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1994 - 1998 Theodor- Heuss- Grundschule, Empelde
1998 - 2000 Orientierungsstufe Ludwig Windthorst Schule, Hannover
2000 - 2007 Gymnasium St. Ursula Schule, Hannover
2004 - 2005 Davidson Highschool, Sydney, Australien
Juni 2007 Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

Juni 2007 - März 2008 Krankentransportdienst Klinikum Nordstadt, Hannover

Hochschulbildung

September - Dezember 2007 Pflegepraktikum, Klinikum Nordstadt, Hannover
März - September 2008 Studium der Zahnmedizin an der Johannes- Gutenberg-
Universität, Mainz
September 2008 - Juni 2015 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians- Universität München und der Technischen
Universität München
August 2010 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Februar – August 2013 Auslandssemester an der Università degli Studi di
Torino, Italien
April 2014 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juni 2015 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit April 2016 Studium der Zahnmedizin an der Medizinischen
Hochschule Hannover

Famulaturen

August – September 2009	Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Diakoniekrankenhaus Henriettenstiftung, Hannover
April – Mai 2011	Klinik für Anästhesie, Deutsches Herzzentrum, München
Juli – August 2012	Hausärztliche Famulatur in Hannover
August – September 2012	Zentrale Notaufnahme, Klinikum Schwabing, München
September – Oktober 2013	Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Kaiser Franz- Josef- Spital, Wien, Österreich

Praktisches Jahr

Mai – September 2014	Tertial Urologie, Klinikum Rechts der Isar, München
September – Dezember 2014	Tertial Innere Medizin, Policlinico Umberto 1, Rom, Italien
Dezember 2014 – April 2015	Tertial Chirurgie, Klinikum Schwabing, München

Beruflicher Werdegang

Dezember 2015 – Juni 2016	Assistenzarzt der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Handchirurgie, Klinikum Nordstadt, Hannover
seit Juli 2016	Assistenzarzt der Klinik für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie, Diakovere Henriettenstiftung, Hannover

10 Eidesstattliche Erklärung

Meissner, Tim Laurin

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

**Definition von HIV1- spezifischen CD8+ T- Zellepitopen, welche die Position von
Medikamentenresistenzmutationen enthalten**

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

Tim Laurin Meissner