

**Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik I für Innere Medizin  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek**

**Die Doppel-PI-Therapie bei immunovirologischer  
Diskordanz in der HIV-Therapie – eine longitudinale  
Studie**

**Inaugural- Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln**

**vorgelegt von  
Anika Prinzleve geb. Hofmann  
aus Wuppertal**

**Promoviert am 14. Dezember 2011**



**Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik I für Innere Medizin  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek**

**Die Doppel-PI-Therapie bei immunovirologischer  
Diskordanz in der HIV-Therapie – eine longitudinale  
Studie**

**Inaugural- Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln**

**vorgelegt von  
Anika Prinzleve geb. Hofmann  
aus Wuppertal**

**Promoviert am 14. Dezember 2011**



Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. med. P. Hartmann

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. Nat. Dr. h.c. H. Pfister

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Dr. med. C. Lehmann

Privatdozentin Dr. med. P. Hartmann

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt .

Berlin, den 10.05.2011

(Anika Prinzleve)

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. med. C. Lehmann von mir selbständig durchgeführt worden.

### **Danksagung**

Ich danke in erster Linie Frau Privatdozentin Dr. med. P. Hartmann und Herrn Universitätsprofessor Dr. med. G. Fätkenheuer, die mir beide die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens vermittelten und stets zur kritischen und konstruktiven Diskussion während der Erstellung der Dissertation bereit waren. Weiterhin danke ich insbesondere Frau Dr. med. C. Lehmann für die freundliche Überlassung des Themas, die ausführlichen praktischen Anleitungen und langjährige fachliche und moralische Unterstützung.

Michaela Markett und Dorothea Passon danke ich für die wertvollen Ermunterungen bei den Experimenten im Labor.

Bei den untersuchten Patienten bedanke ich mich für ihre bereitwillige Teilnahme an der Studie, womit sie einen Beitrag zur Erkenntnisgewinnung geleistet haben.

Nicht zuletzt gilt meinen Eltern Dank, da mein Werdegang, sowie diese Arbeit ohne ihre uneingeschränkte Unterstützung nicht möglich gewesen wäre.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>13</b>
1.1. DAS IMMUNSYSTEM .....	13
1.2. DIE INFEKTION MIT DEM HUMANEN IMMUNDEFIZIENZ VIRUS (HIV).....	15
1.2.1. <i>Virologie, Aufbau des Virus, Subtypen Übertragungsweg</i> .....	15
1.2.2. <i>Pathophysiologie</i> .....	16
1.2.3. <i>Natürlicher Krankheitsverlauf</i> .....	18
1.2.4. <i>Epidemiologie</i> .....	20
1.3. HIV-THERAPIE .....	21
1.3.1. <i>Heutiger Stand</i> .....	21
1.3.2. <i>Verlauf der HIV-Infektion unter antiretroviraler Therapie</i> .....	22
1.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT, FRAGESTELLUNGEN .....	24
<b>2. Patienten, Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1. PATIENTEN .....	25
2.2. MEDIKATION .....	26
2.3. BEOBACHTUNGSZEIT DER STUDIE .....	26
2.4. PROBENGEWINNUNG - ISOLIERUNG UND KRYOKONSERVIERUNG VON PBMC .....	27
2.5. EXTRAZELLULÄRE FÄRBUNG DER ZELLEN .....	28
2.5.1. <i>Aufbereitung der tiefgefrorenen PBMC</i> .....	28
2.5.2. <i>Extrazelluläre Färbung der Zellen</i> .....	29
2.6. ANALYSE MITTELS FLOW-ACTIVATED CELL SORTER (FACSCAN).....	30
2.6.1. <i>Prinzip</i> .....	30
2.6.2. <i>Messung</i> .....	31
2.7. STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	32
2.8. MATERIAL .....	33
2.8.1. <i>Chemikalien</i> .....	33
2.8.2. <i>Lösungen</i> .....	33
2.8.3. <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	33
2.8.4. <i>Antikörper</i> .....	34
2.8.5. <i>Geräte</i> .....	34
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1. BASISCHARAKTERISTIKA DER PATIENTEN BEI STUDIENEINSCHLUSS.....	35
3.2. KONTROLLGRUPPEN .....	37
3.3. KLINISCHER VERLAUF DER PATIENTEN DER STUDIE .....	37
3.4. VERLAUF DER HIV-SPEZIFISCHEN SURROGATPARAMETER.....	38
3.4.1. <i>Verlauf der Viruslast über 12 Monate</i> .....	38
3.4.2. <i>Verlauf der CD4+ T-Lymphozyten über 12 Monate</i> .....	40
3.4.3. <i>Verlauf der CD8+ T-Lymphozyten über 12 Monate</i> .....	42
3.5. VERLAUF DER AKTIVITÄTSPARAMETER ÜBER 12 MONATE .....	43
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>46</b>
4.1. CD4+ UND CD8+ T-LYMPHOZYTENZAHLE UND VIRUSLAST .....	46
4.2. AKTIVITÄTSPARAMETER AUF T-HELPER- UND SUPPRESSORZELLEN .....	48
4.4. BEANTWORTUNG DER FRAGEN .....	49
4.4.1. <i>Frage 1</i> .....	49
4.4.2. <i>Frage 2</i> .....	49
4.4.3. <i>Frage 3</i> .....	49
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>50</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>51</b>
<b>7. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen</b> .....	<b>56</b>
<b>8. Lebenslauf</b> .....	<b>57</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AP	alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
ART	antiretrovirale Therapie
AZT	Zidovudine
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CTL	Cytotoxische T- Lymphozyten
DNA	Desoxyribonucleid Acid = Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluoreszenz- Aktivierter- Cellsorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GALT	gut associated lymphoid tissue (Darmassoziiertes Immunsystem)
$\gamma$ -GT	Gamma Glutamyl Transferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
gp	Glycoprotein
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HAART	High active antiretroviral Therapy
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human leucocyte antigen
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IL-2	Interleukin 2
INR	immunologische non-Responder
IQR	interquartile range (=Interquartilsabstand)
IVD	immunovirologische Diskordanz
K	Kontrolle
Mg	Milligramm
MHC	Majorhistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter

NNRTI	Nicht Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTI	Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren
PBL	peripheral blood lymphocytes
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PE	R- Phycoerythrin
PerCP	Peridin- Chlorophyll- a- Protein
PI	Protease Inhibitoren
RNA	Ribonucleic Acid= Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute (= Umdrehungen pro Minute)
RT	reverse Transkriptase
SSC	Side Scatter
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF	Tumor Nekrose Faktor

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Eine der Hauptaufgaben des humanen Immunsystems ist die Abwehr von Infektionserregern. Das Immunsystem verfügt über verschiedene Systemkomponenten, die sich durch unspezifische, angeborene und spezifische, erworbene Mechanismen unterscheiden.

Zu den unspezifischen Abwehrkomponenten zählen mechanische Barrieren wie die Haut und das Flimmerepithel des Respirationstrakts und chemische Barrieren, wie die Magensäure, oder Enzyme, zum Beispiel in der Tränenflüssigkeit. Außerdem gehören zur angeborenen Immunität das Komplementsystem und die sogenannten professionellen Phagozyten, neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen die in der Lage sind, Fremdmaterial/Mikroorganismen direkt durch den Prozess der Phagozytose aufzunehmen und dieses in einer „Verdauungsvakulole“, dem Phagosom zu degradieren.

Die Hauptmerkmale der spezifischen Immunität sind Antigenspezifität, die Ausbildung eines Gedächtnisses, die Fähigkeit zur Selbstregulation und der Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“. Diese anspruchsvollen Prozesse werden durch ein komplexes Zusammenspiel von zellulären und humoralen Komponenten (Antikörper) des spezifischen Immunsystems gewährleistet. Das Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunität erfolgt über zur Antigenpräsentation befähigte professionelle Phagozyten = APCs (Antigen-präsentierende-Zellen). Die aufgenommenen Mikroorganismen werden im Phagolysosom des Makrophagen verdaut. Die hieraus resultierenden Eiweißbruchstücke (Antigene) werden aufbereitet und über die so genannten *Major Histocompatibility Complex* Moleküle (MHC-Komplex) an der Oberfläche des Makrophagen präsentiert <sup>21</sup>.

Die Antigenpräsentation ist ein zentraler Vorgang innerhalb des komplexen Zusammenspiels der Immunantwort. Sie ermöglicht das Erkennen von „fremd“ und „eigen“, aber auch von gutartig und bösartig. Sie ist daher entscheidend für die Bekämpfung von Mikroorganismen und die Elimination von Tumorzellen. Die Antigenpräsentation kann über zwei unterschiedliche MHC-Moleküle erfolgen.

MHC-Klasse I Moleküle werden von nahezu von jeder Zelle exprimiert. Sie präsentieren aus dem Zytosol stammende Peptide an der Zelloberfläche und geben so Auskunft über den „Zustand“ der Zelle. Wenn eine Zelle beispielsweise von einem Virus infiziert ist, werden die im Zytosol vorhandenen Virusproteine an der Zelloberfläche über MHC-I präsentiert. Die Zelle gibt sich so als infiziert zu erkennen. Diese Information wird von den CD8+ T-Lymphozyten (CD=*Cluster of Differentiation*) abgegriffen, die spezifisch an MHC-I binden. Die CD8+ T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) oder „Killerzellen“ bezeichnet, da sie in der Lage sind eine infizierte oder defekte Zelle direkt abzutöten.

Die aktivierten spezifischen CD8+ T-Lymphozyten binden an virusinfizierte Zellen, die das spezifische Antigen mit MHC I präsentieren. Darauf werden die in den CTLs vorhandenen lytischen Granula ausgeschüttet. Sie enthalten Enzyme, die die Membran der Zielzelle schädigen und den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen. Das Genom der Zelle wird „zerschnitten“, der Zellinhalt in kleine Vesikel abgeschnürt und von Makrophagen beseitigt<sup>31, 49</sup>.

Im Gegensatz zu den zytosolischen Peptiden, die über MHC-I präsentiert werden, präsentieren MHC-Klasse II Moleküle ausschließlich Proteinfragmente, die aus dem Phago lysosom stammen, d.h. vorher aktiv durch Phagozytose aufgenommen werden müssen. Dementsprechend vermitteln MHC-II Moleküle Informationen über extrazelluläre Vorgänge. MHC-II wird primär durch APCs wie Makrophagen, oder dendritische Zellen exprimiert und spezifisch von CD4+ T-Lymphozyten erkannt. CD4+ T-Zellen (T-Helferzellen, Th-Zellen) aktivieren die zellvermittelte Immunantwort, indem sie Zytokine freisetzen, mit Hilfe derer sie wie ein Konzertmeister den Einsatz für weitere Zellen des Immunsystems vorgeben. Hierbei unterscheidet man die antagonistisch wirkenden Th-1 und Th-2 Zellen auf der Basis ihres differentiellen Zytokinprofils. Ihre Differenzierung findet während der klonalen Expansion der aktivierten Helferzellen stattfindet<sup>36</sup>.

Außerdem wurden CD25+ regulatorische T-Helferzellen identifiziert<sup>44</sup>.

Th-1 Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumor Nekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-2 (IL-2).

Dadurch werden die Antigen präsentierenden Zellen aktiviert und die T-Zellen selbst zur Proliferation angeregt<sup>42, 53</sup>.

Th-2 Zellen sind die Quelle anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13, die den Effekten der Th-1 Zellen regulatorisch entgegen wirken. Sie leisten einen entscheidenden Beitrag zur antikörpervermittelten Immunität, indem sie Interleukin 4, 5 und 10 ausschütten und damit B-Lymphozyten zur Antikörperbildung anregen<sup>28</sup>.

Die regulatorischen T-Helferzellen unterdrücken die Aktivierung und Vermehrung potentiell krankheitserregender selbstreaktiver T-Zellen und verhindern somit Autoimmunerkrankungen. Dies erfolgt durch die Ausschüttung der Zytokine IL 10 und TGF  $\beta$  (Transforming growth factor)<sup>44</sup>.

Neben der Differenzierung zu TH1 oder TH2-Zellen entwickelt sich ein kleiner Teil der CD4+ T-Lymphozyten zu Gedächtniszellen, die im Falle einer Sekundärinfektion für eine schnelle und spezifische Immunantwort sorgen<sup>40</sup>.

APCs sind die Brücke zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. Die im Rahmen der Antigenpräsentation aktivierten Th Zellen binden durch ihren CD40 Liganden an den CD40 Rezeptor der B-Lymphozyten. Dieser Prozess ist der erste Schritt in der Induktion der Antikörperbildung und somit der erste Schritt zu einer anhaltenden Immunität. Antikörper werden nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen von B-Lymphozyten gebildet und befinden sich im Blutplasma, auf Schleimhäuten, in der Muttermilch und auf der Oberfläche der B-Lymphozyten. Mit ihrer Hilfe können Antigene erkannt, gebunden, kenntlich gemacht und neutralisiert werden<sup>41, 51</sup>.

## ***1.2. Die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV)***

Es gibt angeborene und erworbene Defekte des Immunsystems, die die Integrität des Organismus bedrohen. Zu den erworbenen zählt unter Anderem die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV).

### **1.2.1. Virologie, Aufbau des Virus, Subtypen Übertragungsweg**

Das etwa 100 Nanometer durchmessende HIV-1 ist ein zur Familie der Lentiviren gehörendes Retrovirus. Seine Lipoproteinhülle enthält env-

Glycoproteinkomplexe p160, bestehend aus einem externen (gp120) und einem Transmembrananteil (gp41). Weiterhin enthält die Virushülle Membranproteine der Wirtszelle, die beim Ausknospen der Viruspartikel aus der virusproduzierenden Zelle „mitgenommen“ werden (z.B. HLA Klasse I- und II- und Adhäsionsmoleküle). Das zylinderförmige Kapsid-Antigen enthält zwei Kopien der HIV-RNA und die zur Virusvermehrung benötigten Enzyme reverse Transkriptase (RT), Integrase und Protease.

Das virale Genom besteht im Wesentlichen aus den Genen gag, pol und env, die für die Glykoproteine (env), das Nukleokapsid (gag) und die RT, sowie andere Enzyme (pol) codieren. Hinzu kommen sechs akzessorische Gene (vif, vpr, vpr, tat, rev und nef), die die Produkte der viralen Reproduktion verschiedentlich regulieren (s. Abb 1).

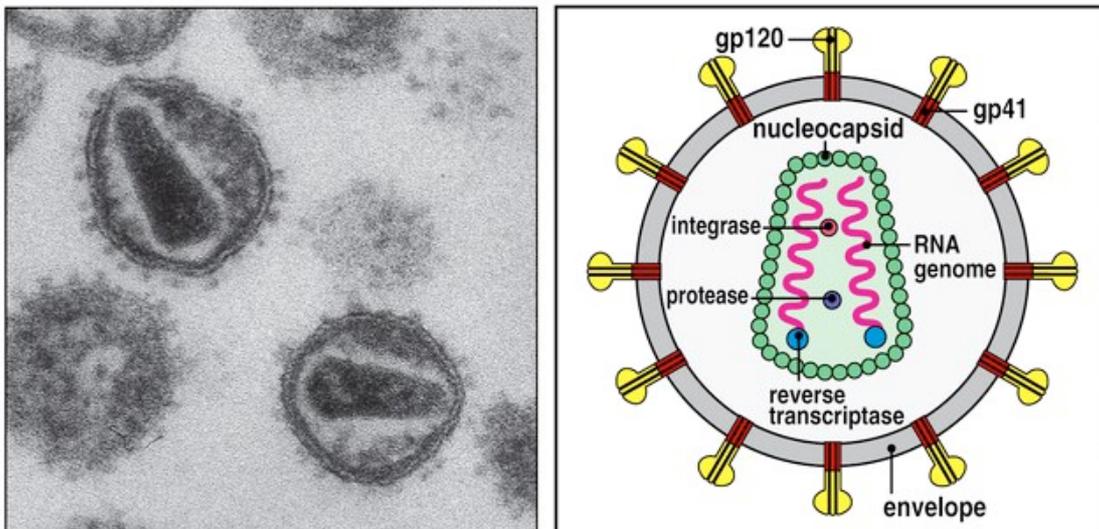


Figure 11-21 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abb. 1 Virusschema (aus Janeway, C. A.: Immunobiology, *The immune System in health and disease*. Garland Science Publishing, New York, 2005)

Es existieren verschiedene genetische Subtypen des Virus, die mit A-K benannt werden und regional unterschiedlich verteilt sind.

HIV wird mittels infizierter Körperflüssigkeiten wie Blut, Samenflüssigkeit, Vaginalsekret und Muttermilch übertragen.

### 1.2.2. Pathophysiologie

HIV bindet mit Hilfe des gp140-Oberflächenmoleküls an CD4-Rezeptoren von aktivierten T-Helferzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen. Für die Fusion von Zelle und Virion muss außerdem noch das virale gp41 an den

zellulären Ko-Rezeptor CCR5 oder CXCR4 binden, danach entleert sich der Viruskern ins Zytoplasma.

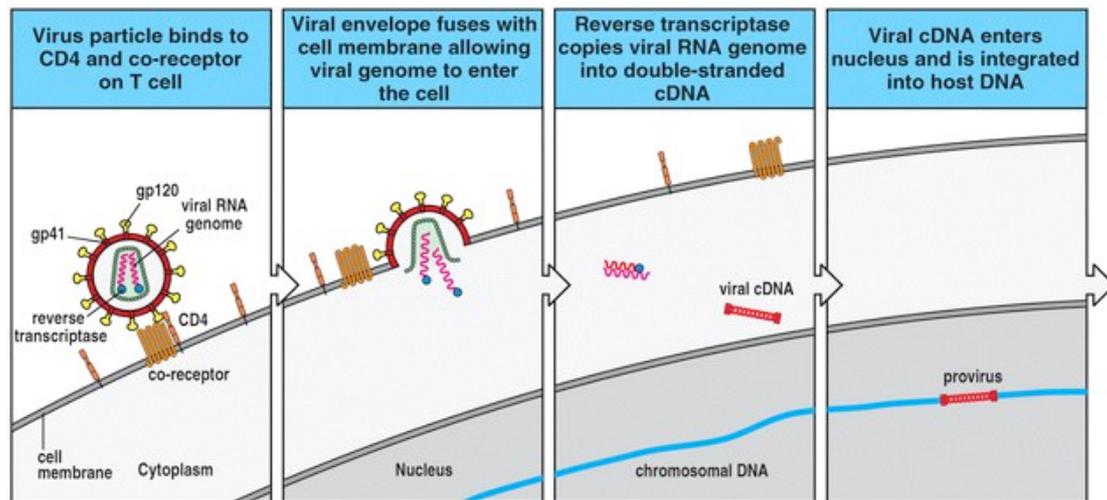


Figure 11-23 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abb. 2 Eintritt von HIV in die Zelle (aus Janeway, C. A.: Immunobiology, *The immune System in health and disease*. Garland Science Publishing, New York, 2005)

Als nächster Schritt folgt die Umwandlung der viralen RNA in provirale DNA mittels reverser Transkriptase. Sobald die Zelle durch Antigenkontakt aktiviert wird, kann die provirale DNA in den Zellkern geschleust, durch das virale Enzym Integrase in das Wirtsgenom integriert und mit der zelleigenen Maschinerie des Wirts repliziert werden<sup>18, 61</sup>.

Die Produkte der Gene gag und pol bilden den Viruskern und die des env-Gens die Glykoproteine der Virushülle. Diese müssen durch die Protease von größeren Molekülen abgespalten werden, damit infektiöse Viruspartikel aus der Zelle ausknospen können.

Da die Fehlerrate der reversen Transkriptase mit etwa 10 Fehlern pro Genom und Replikationszyklus hoch ist, entstehen mit der Zeit einerseits replikationsinkompetente Viren und andererseits genetische HIV-Varianten mit einer z.T. höheren Virulenz als das Primärvirus, die für das Immunsystem eine Herausforderung bis zur Überforderung darstellen. Durch die Infektion mit HIV gehen die CD4+ T-Lymphozyten (Helferzellen) zu Grunde, was konsekutiv zu einer Immunschwäche bei den Patienten führt. Der Abfall der Helferzellen ist Folge unterschiedlicher direkter und indirekter Effekte, die von HIV hervorgerufen werden.

Die intrazelluläre Virusreplikation führt zu einem direkten zytopathischen Effekt, indem die infizierten Helferzellen durch HIV-spezifische zytotoxische Lymphozyten zerstört werden<sup>35</sup>. Der auf der Oberfläche infizierter Zellen im Rahmen der Virusreplikation exprimierte gp120-gp41-Komplex kann außerdem mit dem CD4-Rezeptor und den Korezeptoren anderer nicht infizierter Zellen interagieren und damit die Apoptose dieser nicht infizierten CD4+ Zellen auslösen<sup>22, 47 19, 50</sup>.

Einen weitaus größeren Beitrag zur Depletion der Helferzellen stellt jedoch die chronische Immunaktivierung dar. Es wird angenommen, dass die chronische HIV-Infektion – wie auch opportunistische Infektionen - zu einer generalisierten Aktivierung des Immunsystems führt, was bei erhöhtem Zellumsatz in einer vermehrten Apoptose mit Verminderung der CD4+ Zellzahl endet<sup>1, 29</sup>.

Insbesondere der Verbrauch naiver und ruhender Gedächtniszellen durch Aktivierung hat zur Folge, dass auf bereits bekannte Erreger nicht schnell reagiert werden kann und es gleichzeitig an Nachschub für den CD4+-Zellpool fehlt<sup>13, 33</sup>.

Die Immunaktivierung wird unter Anderem mit den Oberflächenmolekülen CD38 und HLA-DR nachgewiesen. CD38 wurde zuerst 1980 als 45kDalton schweres Oberflächenglykoprotein identifiziert und fungiert als Ektoenzym, Adhäsionsrezeptor und Signalmolekül. Es wird von natürlichen Killerzellen, T- und B-Lymphozyten, sowie in geringerem Ausmaß von Thrombozyten und Erythrozyten exprimiert<sup>45</sup>. Die vermehrte Expression von CD38 auf CD8+ T-Zellen korreliert mit der Höhe der Viruslast im Serum und gilt als ein Parameter für Krankheitsprogression bei HIV-infizierten Patienten<sup>32</sup>.

Das humane Leukozytenantigen, HLA-DR ist ein für MHC II synonymes Molekül und präsentiert somit von extrazellulär aufgenommene Antigene. Seine Expression auf CD4-Lymphozyten korreliert mit der Viruslast, der CD4+-Zellzahl, sowie dem Vorkommen von Koinfektionen<sup>16</sup>.

### **1.2.3. Natürlicher Krankheitsverlauf**

Der Krankheitsverlauf der HIV-Infektion spiegelt die Balance zwischen Virulenz des Virus und individueller Dynamik der Immunantwort wider. 1993

wurde von den Centers for Disease Control (CDC) eine Stadieneinteilung für den Verlauf der HIV-Infektion vorgeschlagen, die auf der CD4+-Zellzahl (1-3; 1: >500 Zellen/ $\mu$ l, 2: 200-499 Zellen/ $\mu$ l, 3: <200 Zellen/ $\mu$ l) und dem klinischen Bild (A-C; A: keine Symptome, B: Symptome, kein AIDS, C: AIDS) basiert.

Wenige Tage bis Wochen, nachdem das HI-Virus in den Organismus eingedrungen ist, entwickelt sich die akute HIV-Infektion, an die sich eine asymptomatische Phase anschließt, die mehrere Jahre dauern kann, bis die symptomatische Phase mit opportunistischen Infektionen und HIV-assoziierten Tumoren eintritt, die schließlich das Vollbild der Erkrankung „AIDS“ ausmacht.

Im Stadium der akuten HIV-Infektion können unspezifische grippeähnliche Symptome auftreten. Die Viruslast (in Kopien/ml Plasma) steigt steil an, während die Helferzellen insbesondere im lymphatischen Gewebe des Gastrointestinaltrakts (GALT) eine starke - und im GALT nachhaltige - Reduktion erfahren <sup>25</sup>. Dies ist die Phase der frühen Antikörper- und Zellvermittelten Immunantwort auf das Virus, welche der auf andere Viruserkrankungen ähnelt. Es kommt nach circa drei Wochen zu einer Expansion zytotoxischer HIV-spezifischer CD8+ T-Lymphozyten, die zu einer Reduktion der Viruslast im Blut führen. Sechs bis neun Wochen nach Infektion lassen sich Antikörper gegen die viralen Hüllproteine und gegen die RT nachweisen. Die Zahl der Helferzellen stabilisiert sich im peripheren Blut wieder und die Erkrankung tritt in die asymptomatische Phase ein.

Hier scheint die Infektion mit niedriger Viruslast im Plasma und stabilen, oder nur sehr langsam abfallenden Helferzellen zu ruhen – tatsächlich ist eine ständige Virusreplikation im lymphatischen Gewebe im Gang. Dadurch entstehen verschiedene Schäden am Immunsystem:

- Der Zellertrag des Thymus, welcher für die T-Zell-Homöostase zuständig ist, ist geringer – der Abfall der Helferzellen kann nicht adäquat kompensiert werden, da weniger naive T-Zellen als „Nachschub“ zur Verfügung stehen.
- Die Lymphknotenarchitektur wird gestört, es kommt zur Fibrosierung.
- Die chronische Entzündung führt zur ständigen Aktivierung der Helferzellen, konsekutiver Apoptose und Verbrauch naiver und ruhender Gedächtniszellen <sup>15</sup>.

- Die Reduktion von CD4+ T-Zellen im GALT bedingt eine geschwächte immunologische Barriere der gastrointestinalen Schleimhaut, die wiederum eine vermehrte bakterielle Translokation zur Folge hat. Dadurch kommt es zusätzlich zu einer erhöhten Immunaktivierung<sup>10</sup>

Im Verlauf der asymptomatischen Phase fällt die Helferzellzahl, bis die Erkrankung sich durch noch nicht AIDS-definierende Symptome bemerkbar macht. Dazu zählen beispielsweise der Herpes Zoster, der sich häufig über mehrere Dermatome gleichzeitig erstreckt, die orale Haarleukoplakie, orale Hefepilzinfektionen und die periphere Neuropathie (klinisches Stadium nach CDC: B).

Unterschreitet die Helferzellzahl die Grenze von 200/ $\mu$ l, drohen AIDS-definierende Erkrankungen (CDC: C), wie Mykobakteriosen, Pneumocystis-Pneumonien, Kaposi-Sarkome und die zerebrale Toxoplasmose.

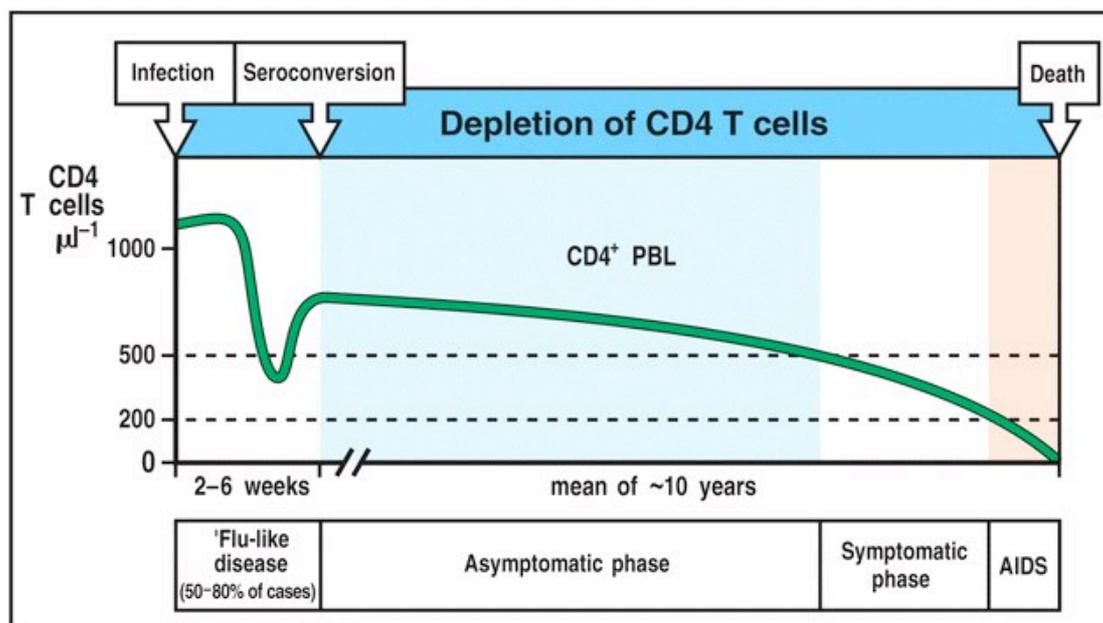


Figure 11-20 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abb. 3 Verlauf der CD4+-T-Zellen während der HIV-Infektion (aus Janeway, C. A.: Immunobiology, *The immune System in health and disease*. Garland Science Publishing, New York, 2005)

Die Überlebenszeit nach der ersten AIDS-definierenden Erkrankung beträgt bei antiretroviral unbehandelten Patienten 6-19 Monate<sup>62</sup>.

#### 1.2.4. Epidemiologie

Ende 2008 waren weltweit 33,4 Millionen Erwachsene mit HIV infiziert. Dies entspricht 0,8% der 15- bis 49jährigen, wobei es hohe regionale Unterschiede

gibt (0,3% in West- und Zentraleuropa, 5,2% in Afrika südlich der Sahara) <sup>57</sup>,  
58.

Seit Beginn der Epidemie Anfang der achtziger Jahre haben sich in Deutschland bis Ende 2009 etwa 86.500 Menschen mit HIV infiziert, davon sind nach Schätzungen des Robert Koch Instituts circa 36500 an AIDS erkrankt und 28000 HIV-Infizierte verstorben.

Ende 2009 lebten in Deutschland etwa 67000 Menschen mit HIV/AIDS (RKI 2010).

### **1.3. HIV-Therapie**

#### **1.3.1. Heutiger Stand**

Der Krankheitsverlauf und die Prognose der HIV-Infektion ist durch die Entwicklung der HIV-Therapie, deren Ziel es ist, die Virusreplikation zu verhindern, entscheidend beeinflusst worden. Heute gibt es fünf Medikamentenklassen.

In der Klasse der **nukleosidalen Inhibitoren der reversen Transkriptase (NRTI)** wurde 1987 der erste Wirkstoff in der HIV-Therapie, Zidovudin (AZT), zugelassen. NRTIs fungieren als alternative Substrate für die RT, ihr Einbau in die DNA führt zum Kettenabbruch.

Die **nicht-nukleosidalen Hemmstoffe der RT (NNRTI)** binden nahe einer Substratbindungsstelle der RT und blockieren diese. Die DNA-Polymerisation wird deutlich verlangsamt.

Als ein weiteres Schlüsselenzym im Replikationszyklus des HI-Virus ist die HIV-Protease eine interessante Zielstruktur für die sogenannten **Proteaseinhibitoren (PI)**, deren Einführung 1996 die HIV-Therapie revolutionierte. Die HIV-Protease spaltet das gag-pol-Polyprotein. Unterbleibt dieser Prozess durch Einsatz der PIs, können keine infektiösen Viruspartikel gebildet werden.

Enfuvirtide gehört zur Klasse der Fusionshemmer unter den **Entryinhibitoren**. Es bindet an gp41, damit wird die Fusion von Virion und Zelle gehemmt. Auch Maraviroc gehört zur Klasse der Entryinhibitoren und wurde im September 2007 zugelassen. Es fungiert als CCR5-Antagonist und

hindert den Viruspartikel daran, an den Korezeptor CCR5 der Helferzelle zu binden.

Der **Integrasehemmer** Raltegravir ist seit Dezember 2007 zugelassen und verhindert, dass die virale DNA im Zellkern durch das Enzym Integrase mit der Wirts-DNA verbunden wird.

Die Frage, wann mit einer medikamentösen Therapie begonnen werden sollte, wird mehr denn je diskutiert. Dies begründet sich darin, dass eine lange unkontrollierte Virusreplikation zu organischen Schäden führen kann, eine lange antiretrovirale Therapie andererseits erhebliche Nebenwirkungen wie Knochenmarkstoxizität oder Stoffwechsellstörungen im Rahmen eines metabolischen Syndroms begünstigt.

Definitiv ist eine Therapie bei symptomatischen Patienten mit Helferzellen  $<350/\mu\text{l}$  indiziert, sowie bei Schwangeren, HIV-assoziiertes Nephropathie und bei bestehender Hepatitis B Coinfektion mit Behandlungsindikation <sup>14</sup>. Zusätzlich müssen verschiedene Parameter beachtet werden – unter anderem die Progression des CD4-Verlustes, die Höhe der Viruslast und das Patientenalter.

Beginnt man eine HIV-Therapie, so werden Kombinationen von drei bis vier Medikamenten aus zwei oder drei Wirkstoffklassen eingesetzt, meistens zwei NRTI+PI oder zwei NRTI+NNRTI (so genannte hochaktive antiretrovirale Therapie, HAART).

Eine hohe Tablettenanzahl und Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden, periphere Neuropathie und Fettverteilungsstörungen limitieren oft die Bereitschaft der Patienten, die Medikamente nach Anweisung einzunehmen. Dies birgt die Gefahr der wiederanstiegenden Viruslast und der viralen Resistenzentwicklungen bei zu niedrigen Wirkstoffspiegeln im Blut.

### **1.3.2. Verlauf der HIV-Infektion unter antiretroviraler Therapie**

Als Folge einer HAART sind vier verschiedene Szenarien denkbar (s. Abbildung 4a-d).

Abbildung 4a beschreibt den gewünschten Therapieerfolg – die Viruslast sinkt unter die Nachweisgrenze, daraufhin erholen sich die Helferzellzahlen <sup>2</sup>.

Außerdem kann es vorkommen, dass die Therapie nicht, oder nur kurzzeitig wirkt, die Viruslast steigt wieder an und die Helferzellzahl erholt sich nicht

(Abb 4b). Gründe für diesen Verlauf können einerseits mangelnde Therapieadhärenz des Patienten, aber auch ein Versagen der HAART bei resistentem Virus sein<sup>37</sup>.

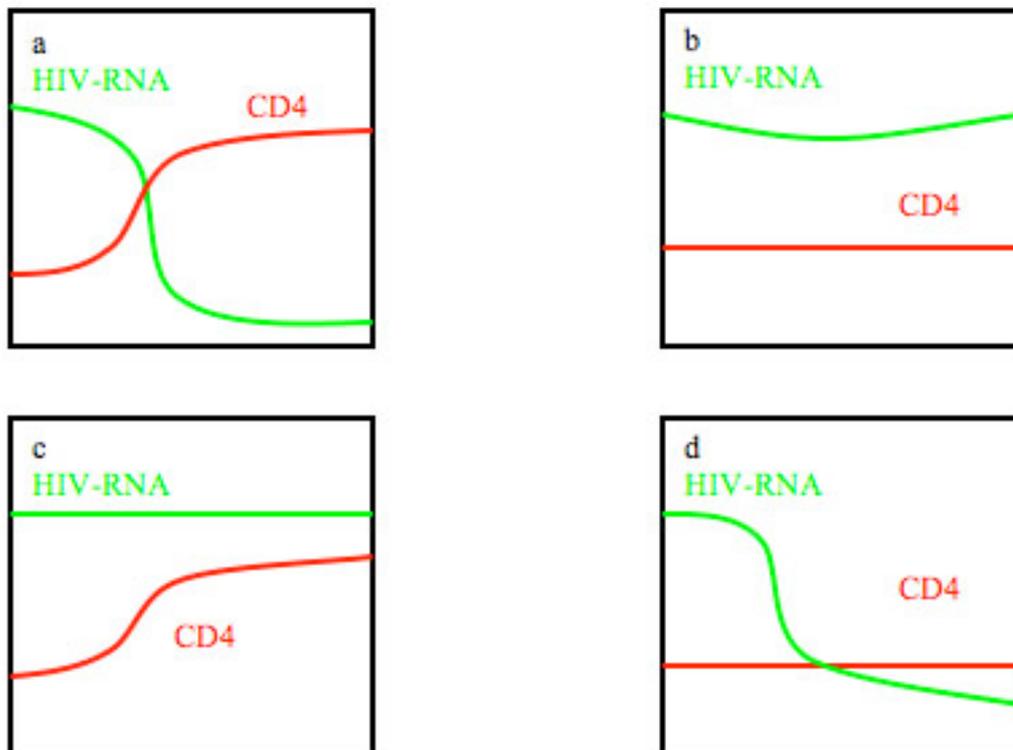


Abb. 4 a-d: Mögliche Effekte einer HAART

Die dritte Möglichkeit (Abb. 4c) besteht in einem virologischen Therapieversagen, trotzdem erholen sich die Helferzellen (immunovirologische Diskordanz). Dies ist nach Schechter bei 10,5 – 23,8% der therapierten Patienten zu beobachten (je nach Definition des virologischen und immunologischen Erfolgs)<sup>46</sup>. Möglicherweise werden hier Virusstämme selektiert, die sich zwar replizieren, aber eine verringerte virale Fitness aufweisen<sup>46</sup>. Der T-Zellumsatz scheint in diesem Fall reduziert zu sein und die Expression der Aktivitätsmarker CD38 und HLA-DR ist geringer als bei therapienaiven Patienten und ähnlich wie bei Patienten mit virologischem Therapieerfolg<sup>12</sup>. Analog zu den oben genannten Ergebnissen von Liu et. al. ist dies ein prognostisch günstiger Faktor und mit einem milderem Krankheitsverlauf assoziiert.

Ein ebenfalls als immunovirologische Diskordanz bezeichneter Zustand wird in der Abbildung 4d beschrieben. Die HIV-RNA sinkt nachhaltig, dennoch

bleibt der Anstieg der CD4-Zellzahl aus. Dieses Phänomen tritt bei 10,5 – 17,3% der behandelten Patienten, die auch als immunologische Non-Responder (INR) bezeichnet werden, auf <sup>46</sup> und ist mit folgenden Risikofaktoren assoziiert: höheres Alter <sup>30, 54, 55, 60</sup>, Hepatitis C-Virus Koinfektion <sup>24</sup>, Vortherapien mit NRTI <sup>23</sup>, niedrige CD4+ T-Lymphozytenzahlen und hohe HIV-RNA vor Beginn der Therapie <sup>23</sup>. Als Mechanismen werden diskutiert:

- Die abnehmende Thymusgröße im Alter und die damit verringerte Fähigkeit, das T-Zell-Gleichgewicht aufrechtzuerhalten <sup>54</sup>
- Residuelle Virusreplikation im lymphatischen Gewebe <sup>20</sup>
- Knochenmarkstoxizität von NRTI <sup>56</sup>
- Immunotoxizität von NRTI (Zidovudine, Zalcitabin) <sup>6</sup>
- Vermehrte T-Zell-Aktivierung als Folge der HIV-Infektion <sup>7</sup>.

#### **1.4. Zielsetzung der Arbeit, Fragestellungen**

Die immunovirologische Diskordanz im Sinne einer ausbleibenden immunologischen Erholung trotz HAART stellt für die betroffenen Patienten ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen und Malignome dar und führt zu einer höheren Mortalität <sup>17</sup>.

Untersuchungen ergaben, dass Patienten unter einer PI-haltigen HAART-Kombination neben der Virussuppression im Plasma auch eine erhebliche Reduktion der HIV-RNA im lymphatischen Gewebe aufweisen, während die persistierende HIV-Replikation im lymphatischen Gewebe als möglicher Grund für den ausbleibenden Helferzellanstieg gilt <sup>34, 43</sup>.

Außerdem konnte in In-vitro-Analysen gezeigt werden, dass PIs möglicherweise unabhängig von ihrem antiviralen Effekt die Apoptose von Lymphozyten inhibieren <sup>11, 48</sup>, im Gegensatz zur Zidovudine, welches möglicherweise die Apoptose begünstigt <sup>6</sup>.

Weiterhin hat eine Studie gezeigt, dass NNRTIs eine geringere Effektivität hinsichtlich des CD4-Zell-Anstiegs aufweisen als PIs <sup>39</sup>.

Vor diesem Hintergrund wird in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass Patienten mit einer immunovirologischen Diskordanz besser ohne den Einsatz von NRTIs, oder NNRTIs nur mit PIs behandelt werden können.

Ein solches Vorgehen ist nur denkbar, wenn sich durch den Verzicht auf NRTIs/NNRTIs die antivirale Potenz des Kombinationsregimes nicht verschlechtert. Die Wirksamkeit NRTI-freier Kombinationsregime wurde bereits gezeigt<sup>52</sup>. Bei der Verwendung von Proteasehemmern sollte dabei immer ein mit Ritonavir „geboostertes“ Regime zum Einsatz kommen, da sich hierdurch höhere Plasmaspiegel und eine größere Therapiesicherheit erzielen lassen. Die Kombination der beiden Proteasehemmer Saquinavir und Atazanavir mit einem Ritonavir- „Booster“ wurde gewählt, da gezeigt wurde, dass Atazanavir die intrazelluläre und Plasmakonzentration von Saquinavir in einem einmal täglich eingenommenen, mit Ritonavir geboosteten Regime erhöht<sup>8,9</sup>.

Basierend auf diesen Daten und Überlegungen sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Ist eine Doppel-PI-Therapie vergleichbar wirksam und verträglich wie die konventionelle Kombinationstherapie?
- Bietet eine Doppel-PI-Therapie Patienten mit immunovirologischer Diskordanz einen Vorteil? Steigen die CD4+ T-Lymphozyten an?
- Verändert sich unter der Doppel-PI-Therapie der Aktivierungsstatus der T-Lymphozyten?

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1. Patienten**

Im Rahmen einer nicht randomisierten Phase IV-Studie wurden 16 Patienten untersucht.

Einschlusskriterien:

- Eine Viruslast unter der Nachweisgrenze von 50 RNA-Kopien pro ml Plasma (gemessen mit Quantiplex Chiron b-DNA) für mindestens 6 Monate vor Einschluss

- Eine CD4+ T-Lymphozytenzahl von weniger als 300 pro µl Plasma für mindestens 6 Monate vor Einschluss
- Vorbehandlung mit NRTI
- Einverständnis nach Aufklärung

Ausschlusskriterien:

- Vorhandensein einer opportunistischen Infektion
- Koinfektion mit Hepatitis B und/oder C
- Nachweisbare HIV-RNA während der Therapie
- ART-Naivität
- Rückzug der Einverständnis

Zusätzlich wurden 2 Gruppen von HIV-infizierten Patienten als Kontrollen untersucht. Elf Patienten wurden zum Zeitpunkt der einmaligen Blutentnahme mit konventioneller HAART behandelt und zeigten gutes immunologisches und virologisches Therapieansprechen. Die zweite Gruppe mit weiteren zehn Patienten war zum Zeitpunkt der Blutentnahme therapienaiv.

## **2.2. Medikation**

Alle 16 Patienten erhielten nach Studieneinschluss folgende Medikation mit Proteaseinhibitoren: 1x täglich 300mg Atazanavir zusammen mit 1x100mg Ritonavir und 2x täglich 1000mg Saquinavir.

## **2.3. Beobachtungszeit der Studie**

Nach Einschluss der Patienten in die Studie wurden in einem Zeitraum von 12 Monaten sequentiell folgende Untersuchungen durchgeführt. Für funktionelle Analysen an den Lymphozyten wurde den Patienten kurz vor Beginn der Doppel-PI-Therapie und nach einer Therapiedauer von sechs und zwölf Monaten Blut abgenommen und nach Zellseparation die PBMC (peripheral blood mononuclear cells) eingefroren (Vorgang siehe unter 2.4).

Zusätzlich wurde zu diesen Zeitpunkten die HIV-Viruslast im Plasma gemessen (mit Chiron Quantiplex bDNA), die CD4+- und CD8+-Lymphozytenzahl absolut sowie auch relativ erhoben.

Zum Monitoring der Verträglichkeit wurden die Patienten klinisch insbesondere hinsichtlich gastrointestinaler Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen beobachtet, sowie weitere Laborparameter bezüglich der häufigsten Nebenwirkung von Proteaseinhibitoren – Hepatotoxizität – bestimmt (Bilirubin, Transaminasen, Gamma-GT, alkalische Phosphatase).

## **2.4. Probengewinnung - Isolierung und Kryokonservierung von PBMC**

Den Patienten wurde Blut aus einer peripheren Vene in Ammonium-Heparin-Röhrchen abgenommen.

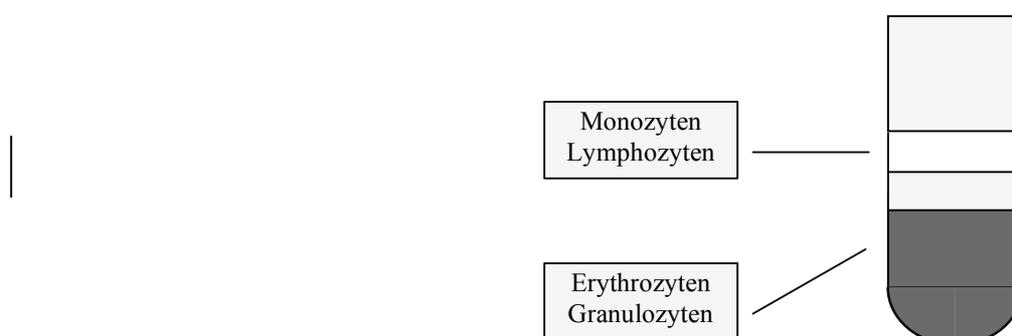
Dieses wurde bei Raumtemperatur auf zwei 50ml Falcon-Röhrchen verteilt und mit Hank's Salt Solution ohne Calcium und Magnesium versetzt.

Zwei weitere 50ml Falcon-Röhrchen wurden mit je 15ml Ficoll-Paque PLUS befüllt und mit dem Blut-Hank's-Gemisch vorsichtig überschichtet.

Diese zwei Röhrchen wurden dann bei 1700rpm und Raumtemperatur 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert.

Über einen Dichtegradienten bilden sich folgende Zellfraktionen:

Zellfraktionen nach Ficoll-Paque-Trennung (Schema)



Die sich im Zentrifugat als weißlich-grünlicher Ring darstellende Fraktion der peripheren mononukleären Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten = PBMCs) wurde in ein weiteres 50ml Röhrchen überführt, mit Hank's-Lösung

auf 50ml aufgefüllt und 5 Minuten bei 1400 rpm und Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellet in 1ml Hank's-Lösung resuspendiert, in 12ml Hank's-Lösung aufgenommen und in ein 15ml Spitzbodenröhrchen transferiert.

Um die Menge der lebenden Zellen in der Lösung zu ermitteln, wurden 20µl der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblaulösung versetzt um in einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1mm) gezählt zu werden.

Da tote Zellen ihre Membranintegrität verloren haben, färben diese sich mit Trypanblau an, lebendige Zellen bleiben aufgrund ihrer intakten Membran ungefärbt.

Indessen wurde die Zellsuspension im 15ml Spitzbodenröhrchen erneut 5 Minuten bei 1400rpm und Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert.

Nach Zählkammerauszählung wurde das Zellpellet in so viel Einfriermedium resuspendiert, dass anschließend ca. 5-10 Millionen PBMC in 1ml eingefroren werden konnten. Die zunächst bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Proben wurden nach 24h in einen Stickstofftank mit  $-180^{\circ}\text{C}$  transferiert.

## ***2.5. Extrazelluläre Färbung der Zellen***

### **2.5.1. Aufbereitung der tiefgefrorenen PBMC**

Ein aus dem Stickstofftank entnommenes Probenröhrchen wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut und die darin befindliche Zellsuspension in einer Sterilbank in ein mit 9ml RPMI-Medium befülltes 15ml Spitzbodenröhrchen (Endvolumen 10ml) überführt. Nach Zentrifugation (5 min./1400rpm/RT /Bremse) wurde der Überstand abgekippt. Zur Reinigung der Zellen vom Einfriermedium wurde das Zellpellet in 10ml RPMI resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstandes wurde das Zellpellet wiederum in 10ml RPMI plus 10% FKS resuspendiert und zur Erholung der Zellen 20 Minuten in einen Brutschrank mit  $\text{CO}_2+5\%\text{N}_2$ -Atmosphäre bei  $37^{\circ}\text{C}$  gestellt. Um die gesamte Zellzahl zu bestimmen wurden 20µl der Zellsuspension 1/1 v/v mit Trypanblau vermischt und auf die Neubauer-Zählkammer aufgebracht. Anschließend wurden die Zellen mit

PBS-FKS-Azid-Lösung (PBS + 2% FKS + 0,0 auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  /ml eingestellt.5% Na-Azid).

### 2.5.2. Extrazelluläre Färbung der Zellen

In 7 Löcher einer 96-Loch-Spitzbodenplatte wurden jeweils 100µl der Zellsuspension zentrifugiert (2 Min./1200rpm/RT/Bremse). Nach Verwerfen des Überstandes durch Abklatschen erfolgte die Wiederauflösung der Zellpellets in je 100µl PBS-FKS-Azid-Lösung mit Hilfe einer Mehrkanalpipette und eine Inkubation von 15 Minuten im Dunkeln auf Eis.

Anschließend konnten die fluoreszenzmarkierten Antikörper nach folgendem Schema den jeweiligen Wells hinzugefügt werden:

1. Nativkontrolle	kein Antikörper
2. Kalibrierung des FACScan	CD3-Fluorescein Isothiocyanat (-FITC),5µl (Grün-Fluoreszenz)
3. Kalibrierung des FACScan	CD3-Phycoerythrin (-PE), 5µl (Orange-Fluoreszenz)
4. Kalibrierung des FACScan	CD3-Peridin-Chorophyll-a Protein(-PerCP), 5µl, (Rot-Fluoreszenz)
5. Kalibrierung des FACScan	CD3-Allophycocyanin (-APC), 2,5µl (Rot-Fluoreszenz)
6. aktivierte CD4+ T-Zellen	CD4-FITC, 5µl CD38-PE, 5µl Anti-HLA-DR-PerCP, 5µl
7. aktivierte CD8+ T-Zellen	CD8-FITC, 5µl CD38-PE, 5µl Anti-HLA-DR-PerCP, 5µl

Nach der Antikörperzugabe wurden die Ansätze 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert, dann zweimal gewaschen (Zentrifugation 5Min./1200rpm/RT/ mit Bremse) Verwerfen des Überstands, Resuspendierung in je 100µl PBS-FKS-Azid-Lösung) und schließlich jeweils in ein Endvolumen von 200µl in ein PP-FACS-Röhrchen transferiert.

## **2.6. Analyse mittels Flow-activated cell sorter (FACScan)**

### **2.6.1. Prinzip**

Die Messung am FACScan (Fluoreszenz-aktivierter Cell-Sorter) beruht auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie (Raffael 1987). Dieses optische Messverfahren ermöglicht die qualitative und quantitative Analyse von Einzelzellen nach den physikalischen Prinzipien von Streulicht und Fluoreszenz in einer heterogenen Zellprobe.

Über eine Stahlkapillare wird die Zellsuspension mit Hilfe eines Überdrucks aus dem kleinen FACS-Röhrchen in eine aus Quarzglas bestehende Messküvette eingesaugt. Von einem laminaren Hüllstrom umgeben passieren die Zellen hintereinandergereiht den Analysepunkt. Im Analysepunkt wird eine bestimmte, vorher definierte Zellzahl (hier zum Beispiel 10.000) analysiert. Dort kreuzen die im Hüllstrom befindlichen zu analysierenden Zellen einen Laserstrahl, der in Abhängigkeit von der Zellgröße vorwärts (Forward Light Scatter, FSC) und der Zellgranularität in 90°-Richtung (Side Scatter, SSC) gestreut wird. Diese Streuungen werden gemessen, aufgezeichnet und erscheinen dann in der Aufzeichnungssoftware als Dotplot, welches eine korrelierte Darstellung von Vorwärtsstreulicht (Größe) und Rechtwinkelstreulicht (Granularität) der Probe darstellt, wobei jeder Punkt eine Zelle repräsentiert. Neben der morphologischen Differenzierung durch Größe und Granularität lassen sich durch fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper Oberflächenmerkmale, intrazelluläre Stoffwechselprodukte, oder DNA auf Einzelzellebene charakterisieren. Die Färbung der Zellpopulation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wird zusätzlich mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors erfasst. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit dem gewünschten fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert, während des Messvorgangs dann die Fluoreszenz per Laser angeregt und durch den Fluoreszenzdetektor aufgezeichnet.

### 2.6.2. Messung

Die zu analysierende Population – hier die Lymphozyten – wird mit den Parametern Größe gegen Granularität eingegrenzt, so dass in einer weiteren Analyse nur diejenigen Zellen berücksichtigt werden, deren Eigenschaften in diesem Bereich liegen. Dies bezeichnet man als „Gating“ (englischsprachiger Ausdruck für das Setzen eines Eingrenzungsfensters).

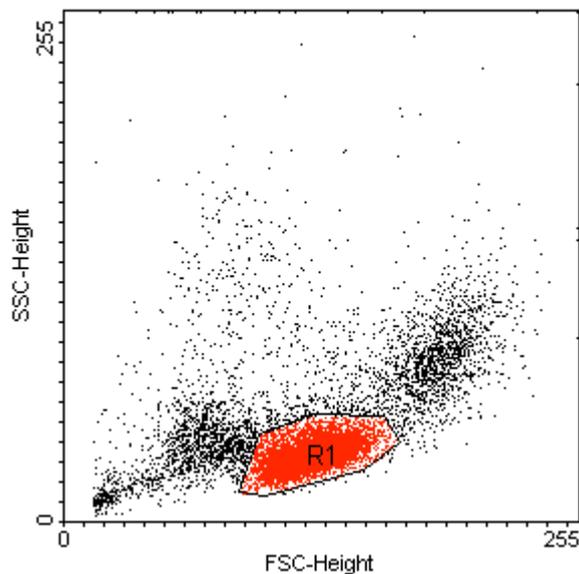


Abb. 5 Dotplot-Darstellung aller peripheren Leukozyten mit Gating der Lymphozyten

Hier wurden in 3 verschiedenen Ansätzen simultan jeweils drei gemessene Fluoreszenzsignale, jedes von einem unterschiedlichen konjugierten Antikörper stammend, analysiert und zweidimensional vom Computerprogramm Cellquest® als Dotplot dargestellt:

- CD4-FITC, -PerCP als Oberflächenmerkmal von T-Helfer-Lymphozyten
- CD8-FITC als Oberflächenmerkmal von cytotoxischen T-Lymphozyten
- CD38-PE markiert aktivierte Lymphozyten
- Anti-HLA-DR-PerCP als Oberflächenmerkmal aktivierter T-Zellen

Zur Beschreibung des Vorgangs der Auswertung mit dem Computerprogramm Cellquest® stelle ich exemplarisch die quantitative Analyse der CD38-positiven CD4-T-Lymphozyten dar:

Zunächst wurden die im oben genannten „Lymphozytengate“ befindlichen Zellen hinsichtlich der Färbung mit den FITC- und PE- konjugierten Antikörpern für die Oberflächenantigene CD38 und CD4 dargestellt.

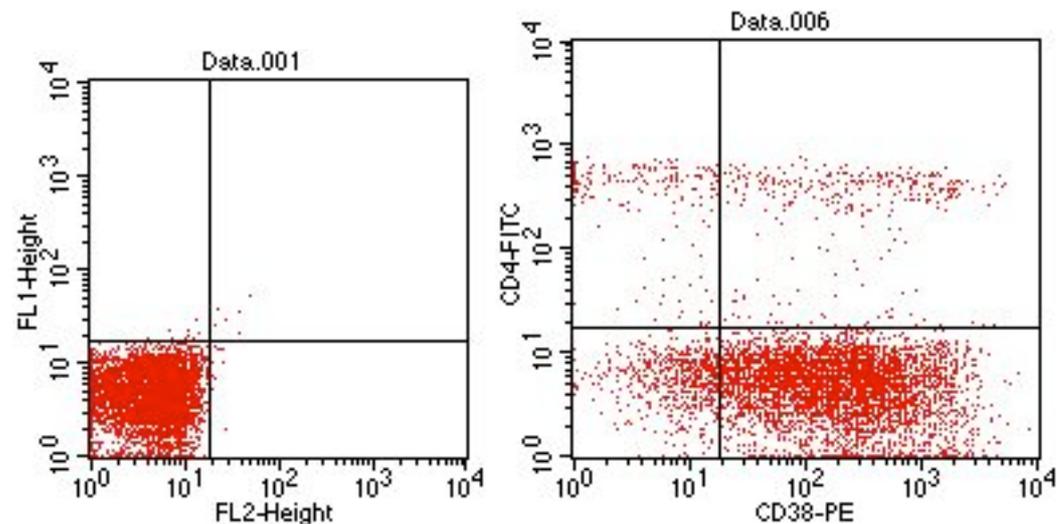


Abb. 6 CD4+CD38+: aktivierte T-Helferzellen im rechten oberen Quadranten

Mit Hilfe des Quadrantenkreuzes können die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Bereichen des Dotplots erfasst werden. Alle CD38-positiven Zellen befinden sich im rechten oberen und unteren Quadranten. Analog finden sich alle CD4-positiven Zellen im oberen linken und rechten Quadranten. Alle Zellen, die gleichzeitig CD38 und CD4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, werden hier im rechten oberen Quadranten dargestellt. Dieser Anteil wird zur späteren statistischen Analyse prozentual erfasst.

Ab welcher Fluoreszenzintensität die Zellpopulation als positiv für den untersuchten Farbstoff gilt, wird mit Hilfe der Darstellung der Nativkontrolle festgelegt. Diese zeigt das Ausmaß der Autofluoreszenz nicht fluoreszenzmarkierter Zellen und erlaubt die Differenzierung in der eigentlichen Messung.

## **2.7. Statistische Auswertung**

Die Daten wurden mit SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, Version 12.0) mit dem Wilcoxon Rank-Test für zwei verbundene Stichproben auf Signifikanzen hin geprüft. Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn  $p \leq 0.05$  war.

Korrelationen wurden ebenso mit SPSS mit der bivariaten Korrelation nach Spearman überprüft. Auch hier indiziert ein  $p \leq 0.05$  eine signifikante Korrelation.

## **2.8. Material**

### **2.8.1. Chemikalien**

Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Ficoll-Paque PLUS	Amersham Biosciences, Schweden
Natrium-Azid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Trypanblau	Biochrom, Berlin

### **2.8.2. Lösungen**

Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Hank's Salt Solution ohne Ca, Mg, Phenolrot	Biochrom, Berlin
PBS ohne Ca, ohne Mg	Biochrom, Berlin
RPMI	5,5 g/l NaCl 25mM Hepes 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> 5 mg/l Phenolrot 0,532 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L Glutamin Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

### **2.8.3. Verbrauchsmaterialien**

Pipetten 10ml, 5ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen (PP-Röhrchen, 1,3ml)	Greiner, Frickenhausen
96-well Spitzbodenplatten	Sarstedt, Newton N.C., USA
96-well Spitzbodenplattendeckel	Sarstedt, Newton N.C., USA
15ml Röhrchen	TPP, Schweiz
Mikroschraubröhre 2ml PP	Sarstedt, Newton N.C., USA
Transferpipette 3,5ml	Sarstedt, Newton N.C., USA
S-Monovette 9ml AH	Sarstedt, Newton N.C., USA

Rundbodenröhrchen 5ml	Becton Dickinson, San Diego, USA
Falcon Röhre 50ml	Becton Dickinson, San Diego, USA

#### **2.8.4. Antikörper**

Anti-CD3 FITC	Becton Dickinson, San Diego, USA
Anti-CD3 PE	Becton Dickinson, San Diego, USA
Anti-CD3 PerCP	Becton Dickinson, San Diego, USA
Anti-CD4 FITC	Becton Dickinson, San Diego, USA
Anti-CD8 FITC	Becton Dickinson, San Diego, USA
Anti-CD38 PE	Becton Dickinson, San Diego, USA
Anti-HLA-DR PerCP	Becton Dickinson, San Diego, USA

#### **2.8.5. Geräte**

Megafuge 1.0R	Heraeus, Düsseldorf
Megafuge 3.0R	Heraeus, Düsseldorf
Mehrkanalpipette	Costar, Bodenheim
Brutschrank	Heraeus, Düsseldorf
FACS Calibur	Becton Dickinson, San Diego, USA
Computerprogramm CellQuest®	Becton Dickinson, San Diego, USA

### **3. Ergebnisse**

Es wurden 16 HIV-positive Patienten (12 männliche, vier weibliche, medianes Alter zum Einschlusszeitpunkt 46 Jahre, Minimum 29, Maximum 62 Jahre) in die longitudinale Studie eingeschlossen. Ein Patient brach die Studie nach zwei Monaten wegen ansteigender Viruslast als Folge von unregelmäßiger Tabletteneinnahme ab. Zwei weitere Patienten mussten nach elf beziehungsweise zwölf Monaten ebenfalls wegen ansteigender Viruslast auf eine andere Therapie umgestellt werden.

Die Ergebnisse beziehen sich für Monat null und sechs auf die 15 verbliebenen und für Monat zwölf auf 13 Patienten.

### **3.1. Basischarakteristika der Patienten bei Studieneinschluss**

Tabelle 1 zeigt die klinischen Merkmale der Studienpatienten vor Beginn der Doppel-PI-Studie.

Demnach wurden alle Patienten mit Zidovudin und Lamivudin vortherapiert, elf davon unmittelbar vor Start der Doppel-PI-Therapie, sowie zwölf von 15 Patienten ebenfalls mit Lopinavir und Ritonavir. Ein Patient war PI-naiv. Fünf Patienten wurden zuvor mit NNRTIs behandelt.

Das mediane Alter der Patienten betrug 46 Jahren und seit der HIV Erst-Diagnose waren im Median sechs Jahre vergangen.

Der Median des CD4-Nadirs war 20/ $\mu$ l und der Median der im Verlauf der HIV-Infektion erfassten höchsten Viruslast war 159396 Kopien/ml.

Patient	Alter	Geschlecht	CDC-Stadium	Zeit seit HIV-Diagnose	Vorbehandlung NRTI	Vorbehandlung NNRTI	Vorbehandlung PI	CD4-Nadir / $\mu$ l	Höchste Viruslast (cop./ml)	Vorherige OI (s.u.)
1	50	M	C3	6	AZT, 3TC, d4T, ABC		Nelfinavir, RTV	10	219403	2, 3, 4, a, d, e
2	57	M	C3	9	AZT, 3TC, ddi, ABC, d4T	NVP, EFV	LPV, APV, RTV, SQV	0	629000	3, 5, 6
3	45	M	C3	2	AZT, 3TC		LPV/r	10	500000	3, 7, d
4	48	W	C3	2	AZT, 3TC		LPV/r	60	84052	2, 3
5	45	M	C3	11	AZT, 3TC		LPV/r	40	9020	5
6	47	W	B3	1	AZT, 3TC TDF	EFV	LPV/r	100	410283	
7	38	M	C3	2	AZT, 3TC		LPV/r	20	182	1, c, d
8	45	M	C3	4	AZT, 3TC		LPV/r	50	500000	4, d
9	50	M	A3	11	AZT, 3TC		LPV/r	150	23355	
10	38	W	C3	7	AZT, 3TC TDF	EFV	LPV/r	20	3133	4, d
11	40	M	C3	1	AZT, 3TC		LPV/r	10	190000	1, 2, 8
12	41	M	B3	1	AZT, 3TC		LPV/r	10	159396	D
13	47	W	A3	8	AZT, 3TC	EFV	-	130	15675	
14	62	M	B3	8	AZT, 3TC, ddi, TDF		LPV/r	40	384266	C, d
15	46	M	C3	19	AZT, 3TC, d4T, ddc, ddi	EFV, NVP	IDV	9	35500	A, b, c, d

Opportunistische Infektionen (OI): 1 = Pneumocystis Pneumonie (AIDS-definierend)

- 2 = Kaposi Sarkom
- 3 = Candidiasis ösophageal
- 4 = Toxoplasmose-Infektion
- 5 = Tuberkulose
- 6 = malignes Lymphom
- 7 = Wasting-Syndrom
- 8 = chronische HSV-Ulcera

HIV-assoziierte Erkrankungen:

- a = periphere Neuropathie
- b = idiopathische thrombozytop. Purpura
- c = Herpes zoster multisegmental
- d = Candidiasis oropharyngeal
- e = chronische Diarrhoen

Tabelle 1: Basischarakteristika der Studienpatienten

### **3.2. Kontrollgruppen**

Die erhobenen Parameter der Studienpatienten wurden mit den Parametern von zwei Kontrollgruppen, K1 und K2 verglichen.

K1 gehörten 11 Patienten an, die unter HAART ein gutes Therapieansprechen zeigten: Der Median der Surrogatparameter in dieser Gruppe war wie folgt: HI-Viruslast <50 Kopien/ml, die CD4-Zellzahl 420/ $\mu$ l (19%), CD4/CD8-Quotient im Median 0,33 und ihr CD4-Nadir mediane 134/ $\mu$ l. Die Patienten hatten ihre antiretrovirale Therapie im Median seit 18 Monaten erhalten, ihr medianes Alter war 39 Jahre.

Die 10 Patienten in der zweiten Kontrollgruppe waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Median 33 Jahre alt und therapienaiv mit dementsprechend hoher Viruslast (Median 40200 Kopien/ml), bei dennoch gutem Immunstatus (CD4 Median 370/ $\mu$ l, 23,5%, CD4/CD8-Quotient Median 0,35). CD4-Nadir Median 298/ $\mu$ l.

### **3.3. Klinischer Verlauf der Patienten der Studie**

Während der Studie traten bei keinem Patienten opportunistische Infektionen auf.

Neun der 15 Patienten verspürten während der Protease-Inhibitor-Therapie keine Nebenwirkungen, drei von ihnen fühlten sich subjektiv besser. Drei Patienten gaben am Anfang gastrointestinale Beschwerden wie Diarrhoe, Meteorismus und Übelkeit an, welche sich innerhalb von circa 14 Tagen selbst limitierten.

In den klinisch chemischen Parametern ließ sich bei allen Patienten während der PI-Therapie eine Erhöhung des Gesamtbilirubins auf Werte zwischen 2 bis 5 mg/dl (Referenzbereich <1,1mg/dl) nachweisen.

Die Transaminasen GOT, GPT,  $\gamma$ -GT und AP als weitere Parameter einer Lebertoxizität lagen dagegen bei allen außer bei einem Patienten, der zwischenzeitlich unter einer Hepatitis-B-Infektion litt, im Normbereich.

Diese Hepatitis-B-Infektion fiel durch eine massive Erhöhung der Transaminasen auf Werte von 2000-3000 U/l auf, limitierte sich selbst und konnte erst nachträglich gesichert werden, denn es handelte sich um eine Hepatitis-B-Virus Escape-Mutante, welche mit den üblichen Nachweisverfahren der Virologie nicht nachweisbar gewesen war.

### 3.4. Verlauf der HIV-spezifischen Surrogatparameter

Der Verlauf der HIV-spezifischen Surrogatparameter ist in den Tabellen 2 und 3 wiedergegeben. Tabelle 2 zeigt den Verlauf vom Beginn der Studie (M0) verglichen mit Monat 6, Tabelle 3 den Unterschied zwischen M0 und Ende des Beobachtungszeitraum (M12).

	<b>Median M0</b>	<b>Median M6</b>	<b>p(M0-M6)</b>
<b><u>CD4 absolut/<math>\mu</math>l</u></b>	<b>170 (90-280)</b>	<b>230 (100-460)</b>	0,011
<b><u>CD4 %</u></b>	<b>10 (5-23)</b>	<b>14 (5-24)</b>	0,067
<b><u>CD8 absolut/<math>\mu</math>l</u></b>	<b>930 (300-2070)</b>	<b>1060 (330-2040)</b>	0,82
<b><u>CD8 %</u></b>	<b>58 (33-80)</b>	<b>55 (31-75)</b>	0,049
<b><u>Quotient CD4/CD8</u></b>	<b>0,2 (0,1-0,6)</b>	<b>0,3 (0,1-0,6)</b>	0,132
<b><u>Viruslast (Kopien/ml)</u></b>	<b>50 (50-51)</b>	<b>50 (50-1156)</b>	0,043

Tabelle 2: HIV-spezifische Surrogatparameter M0 – M6

	<b>Median M0</b>	<b>Median M12</b>	<b>p(M0-M12)</b>
<b><u>CD4 absolut/<math>\mu</math>l</u></b>	<b>170 (90-280)</b>	<b>260 (140-480)</b>	0,002
<b><u>CD4 %</u></b>	<b>10 (5-23)</b>	<b>17 (7-23)</b>	0,045
<b><u>CD8 absolut/<math>\mu</math>l</u></b>	<b>930 (300-2070)</b>	<b>860 (300-1560)</b>	1
<b><u>CD8 %</u></b>	<b>58 (33-80)</b>	<b>51 (28-61)</b>	0,004
<b><u>Quotient CD4/CD8</u></b>	<b>0,2 (0,1-0,6)</b>	<b>0,3 (0,1-0,6)</b>	0,038
<b><u>Viruslast (Kopien/ml)</u></b>	<b>50 (50-51)</b>	<b>50 (50-527)</b>	0,109

Tabelle 3: HIV-spezifische Surrogatparameter M0 – M12

#### 3.4.1. Verlauf der Viruslast über 12 Monate

Alle bis auf einen Patienten starteten am Einschussdatum mit einer Viruslast unter der Nachweisgrenze von 50 Kopien/ml Plasma. Bei diesem einen Patienten handelte es sich um eine transiente, einmalig gemessene Viruslasterhöhung, auch *Blip* genannt, auf 51 Kopien/ml Plasma. Die mediane Dauer der unterdrückten Viruslast vor Studienbeginn betrug 13,5 Monate.

Die Viruslast konnte bei acht Patienten über sechs Monate vollständig unterdrückt werden, bei zwei Patienten zeigten sich *Blips* von 182 und 1403 Kopien/ml Plasma. Fünf Patienten entwickelten eine steigende Viruslast, wobei dies in zwei Fällen zu

einer Therapieumstellung führte. Bei diesen zwei Patienten war eine fehlende Therapieadhärenz als Ursache des Therapieversagens zu eruieren.

In diesen und den drei anderen Fällen mit ansteigender Viruslast unter Therapie konnten durch Resistenzanalysen Resistenzentwicklungen gegen Proteaseinhibitoren ausgeschlossen werden. Auch Messungen der Medikamentenspiegel im Plasma zeigten in allen Fällen ausreichende Konzentrationen aller drei Medikamente im therapeutischen Bereich.

Nach medianen zwölf Monaten (elf-18 Monate) wurde bei den verbliebenen 13 Patienten weiterhin eine im Median unterdrückte Viruslast nachgewiesen. Bei drei Patienten waren Kopien der viralen RNA im Plasma vorhanden (83, 230, 527 Kopien/ml). Statistisch waren diese Änderungen jeweils nicht signifikant ( $p > 0.05$  im Wilcoxon Rank-Test für zwei verbundene Stichproben).

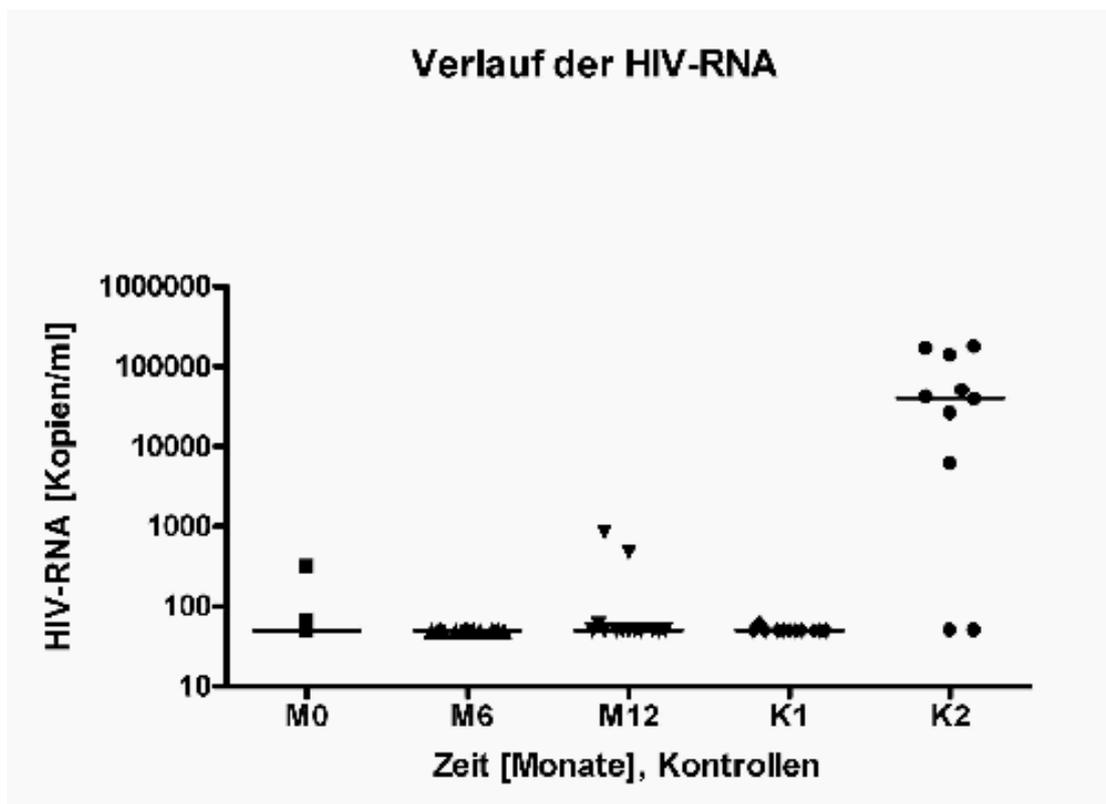


Abb. 7: Verlauf der HIV-RNA im Serum der Studienpatienten über 12 Monate, einmalige Bestimmung der HIV-RNA bei den Kontrollen

### 3.4.2. Verlauf der CD4+ T-Lymphozyten über 12 Monate

Die Zahl der CD4+ T-Lymphozyten betrug zu Anfang des Behandlungszeitraums im Median 170 Zellen/ $\mu$ l Plasma (130-220/ $\mu$ l Interquartilsabstand (IQR)). Als relativer Anteil an den Gesamtlymphozyten ergab sich ein Median von 10% (7-16% IQR).

Nach sechs Monaten zeigte sich ein signifikanter Anstieg der absoluten Zellzahl auf im Median 230 Zellen/ $\mu$ l (170-290/ $\mu$ l IQR): Wilcoxon Rank-Test für zwei verbundene Stichproben ( $p=0.011$ ) (Alle folgenden Signifikanzen wurden ebenfalls mit dem Wilcoxon Rank-Test für zwei verbundene Stichproben ermittelt). Der Median des prozentualen Anteils der CD4-Zellen an den Gesamtlymphozyten stieg innerhalb von sechs Monaten auf 14% (10-17%), ( $p>0.05$ ).

Der Quotient von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten betrug zu Beginn im Median 0,2 und stieg nach sechs Monaten nicht signifikant auf 0,3, nach 12 Monaten zeigte sich im Vergleich zu Monat 0 jedoch ein signifikanter Anstieg auf mediane 0,3 ( $p=0.038$ ) (s. Tabelle).

Am letzten Beobachtungszeitpunkt fand sich eine im Vergleich zum Beobachtungsbeginn statistisch signifikant erhöhte Zahl der CD4+ T-Lymphozyten, sowohl absolut (mediane 260/ $\mu$ l (195-415/ $\mu$ l IQR),  $p=0.002$ ), als auch prozentual (mediane 17% (13,5-18,5% IQR),  $p=0.045$ ).

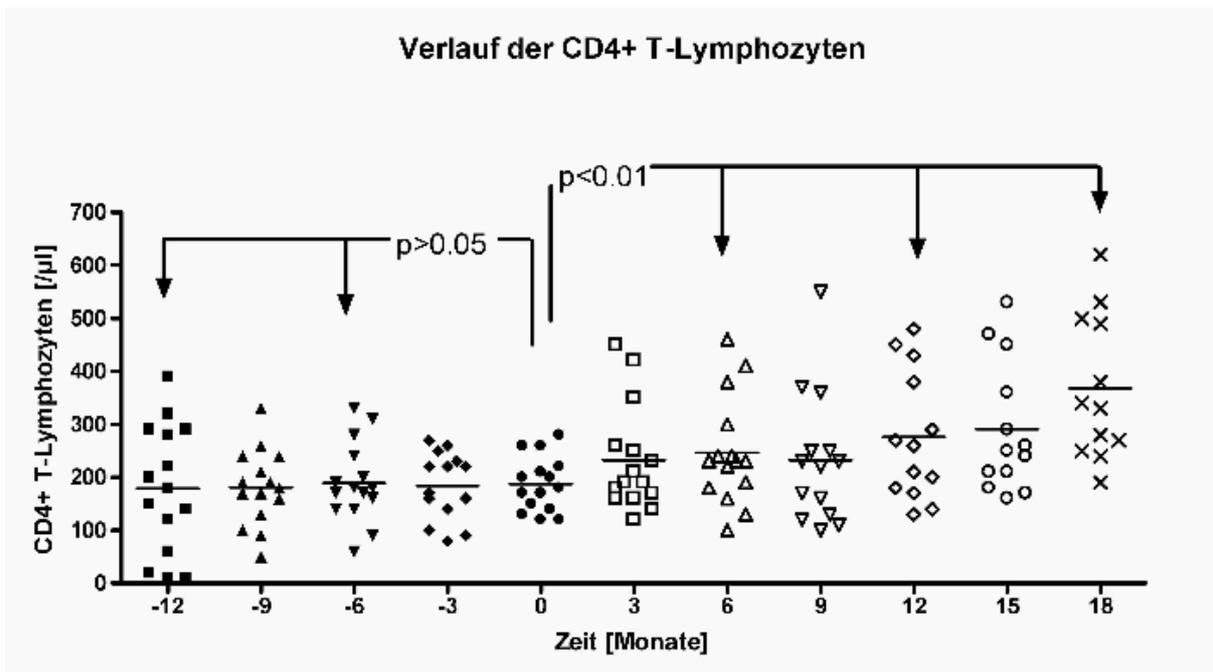


Abb. 8: Verlauf der CD4+ T-Lymphozyten [ $\mu\text{l}$ ] von 1 Jahr vor Studienbeginn bis Monat 12 mit 6 Monaten Nachbeobachtung

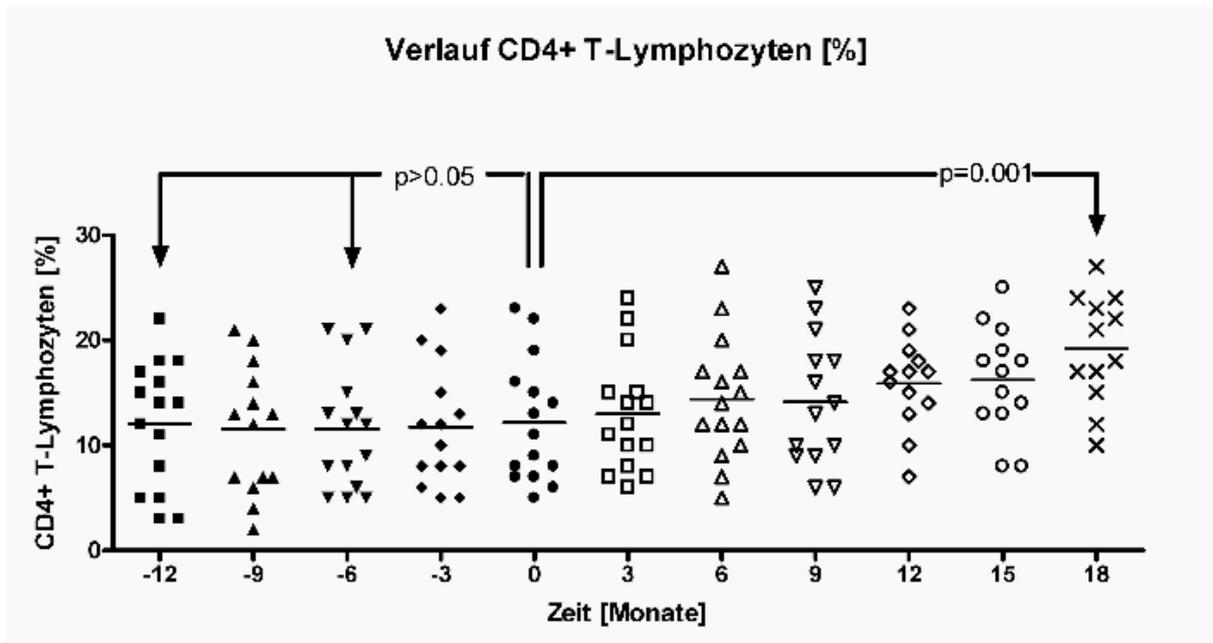


Abb. 9: Verlauf der CD4+ T-Lymphozyten [%] von 1 Jahr vor Studienbeginn bis Monat 12 mit 6 Monaten Nachbeobachtung

Der prozentuale Anteil der CD4+ T-Lymphozyten (K1: Median 18% (10,25-21,75% IQR); K2: Median 23,5% (10,25-32,5% IQR)) an den Gesamtlymphozyten und die Ratio CD4+/CD8+ (K1: Median 0,3 (0,2-0,5 IQR); K2: Median 0,4 (0,2-0,8 IQR)) waren nur bei K1 im Vergleich mit dem Zeitpunkt M0 der Studienpatienten signifikant höher ( $p < 0.05$ ). Ansonsten gab es diesbezüglich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

### 3.4.3. Verlauf der CD8+ T-Lymphozyten über 12 Monate

Im Verlauf der zwölfmonatigen Beobachtungszeit stiegen die CD8+ T-Lymphozyten zunächst innerhalb der ersten sechs Monate nicht signifikant von medianen 930/ $\mu$ l (720-1290/ $\mu$ l IQR) auf 1060/ $\mu$ l (580-1340/ $\mu$ l IQR) ( $p > 0.05$ ). Weitere sechs Monate später war ein ebenso statistisch nicht signifikanter Abfall auf 860/ $\mu$ l (695-1230/ $\mu$ l) ( $p > 0.05$ ) zu verzeichnen.

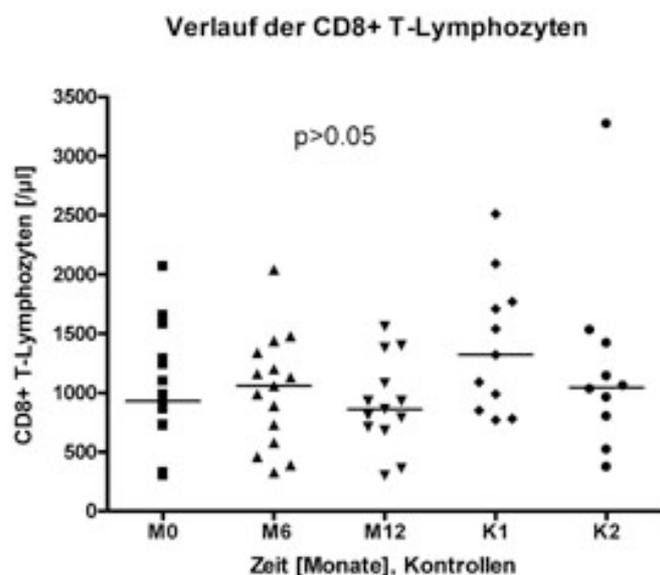


Abb. 11: Verlauf der CD8+ T-Lymphozyten [ $\mu$ l]

Der prozentuale Anteil der CD8+ T-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten ist sowohl nach sechs, als auch nach 12 Monaten statistisch signifikant von 58% (42-68% IQR) auf 55% (41-60% IQR) ( $p < 0.05$ ) auf 51% (39-54% IQR) ( $p = 0.004$ ) gesunken.

Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollgruppen (CD8 absolut: K1: Median 1205/ $\mu$ l (798-1755/ $\mu$ l IQR); K2: 1045/ $\mu$ l (730-1448/ $\mu$ l IQR); CD8 prozentual: K1: Median 54% (47-66% IQR); K2: 59% (34-65% IQR)).

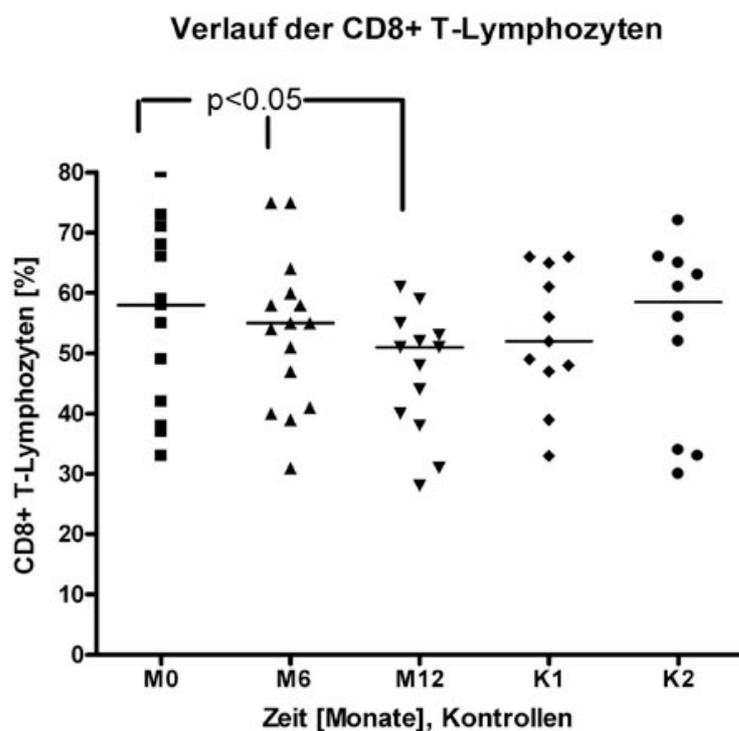


Abb. 12: Verlauf der CD8+ T-Lymphozyten [%]

### **3.5. Verlauf der Aktivitätsparameter über 12 Monate**

#### Aktivierung der CD4+ T-Lymphozyten

In der Studiengruppe änderte sich der Aktivitätsparameter CD38 auf den CD4+ T-Lymphozyten nicht. Nach zwölf Monaten war ein signifikanter Rückgang der HLA-DR-positiven T-Helferzellen von medianen 2,97% auf 1,28% zu beobachten ( $p=0.001$ )

Im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 waren die CD38-positiven Helferzellen in der Studiengruppe zu den ersten beiden Messpunkten nicht signifikant unterschiedlich, nach zwölf Monaten dagegen signifikant niedriger (Median 7,09% bei den Studienpatienten (SP), 13,08% bei K1,  $p<0.05$ ).

HLA-DR-positive CD4+ T-Lymphozyten waren in der Studiengruppe nach zwölf Monaten im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen signifikant niedriger (Studienpatienten: 1,28%; K1: 2,43%; K2: 3,04%).

Die beiden Kontrollgruppen unterschieden sich bezüglich der Aktivitätsparameter auf CD4+ T-Lymphozyten nicht signifikant.

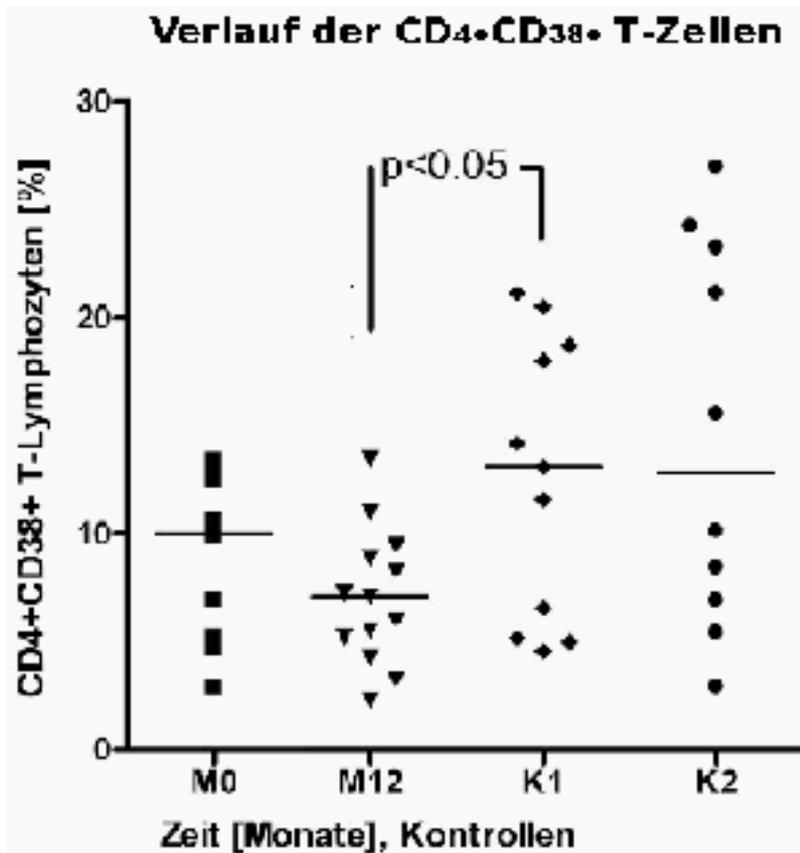


Abb. 10: Verlauf der CD4CD38+ T-Lymphozyten [%]

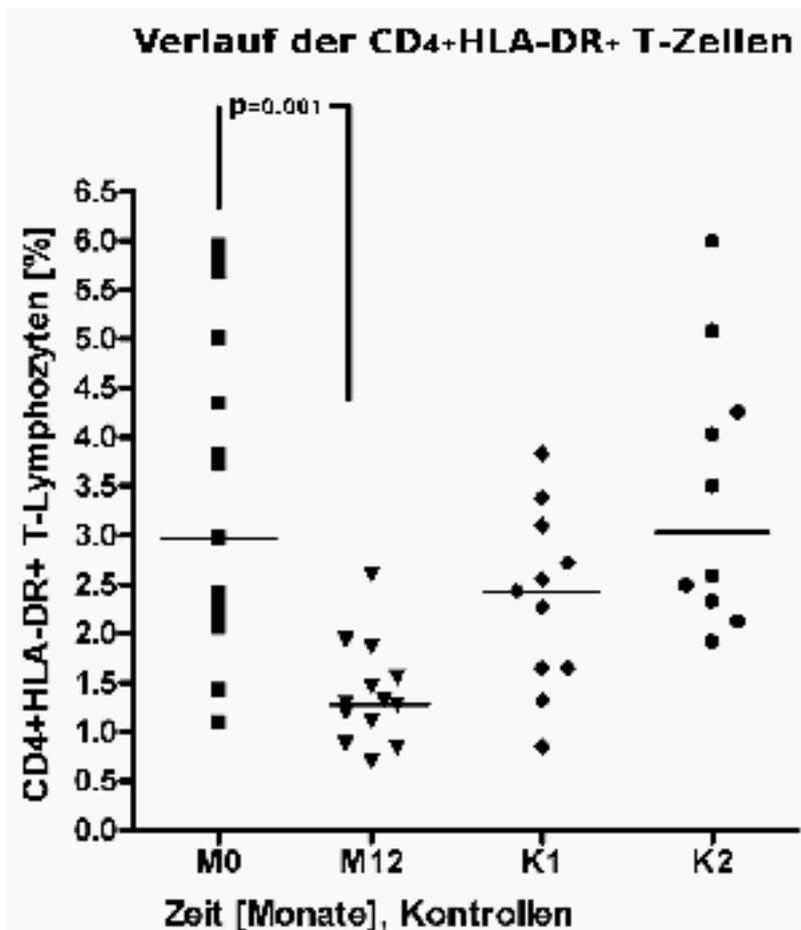


Abb. 11: Verlauf der CD4+HLA-DR+ T-Lymphozyten [%]

#### Aktivierung der CD8+ T-Lymphozyten

Die Aktivitätsparameter änderten sich im Laufe der Studie auf den CD8+ T-Lymphozyten der Studiengruppe nicht signifikant (HLA-DR Median (IQR): M0 14,5% (7,8-19,7%), M12 7,3% (4,7-11,5%); CD38 Median (IQR): M0 37,4% (27,2-47,8%), M12 34,6% (14,4-51,1%))( $p > 0.05$ ).

Die Werte beider Aktivitätsparameter waren bei den Patientin mit detektierbarem HIV im Serum (K2) signifikant höher als bei den Studienpatienten zu Anfang und Ende der Beobachtungszeit und bei den Patienten mit gutem Ansprechen auf HAART (K1) (K2: CD8+HLA-DR+: 34,2% (16,1-39,3%); CD8+CD38+: 54,3% (35,1-64,6%); K1: CD8+HLA-DR+: 7,9% (7,04-12,9%); CD8+CD38+: 29,4 (24,7-36,7))( $p < 0.05$ ).

## **4. Diskussion**

Unter HAART kommt es normalerweise bei HIV-Patienten zu einer deutlichen Reduktion der HIV-Viruslast im Serum, sowie zu einer Rekonstitution der CD4+ Lymphozytenzahl. Bei 10-17% der Patienten jedoch bleibt ein immunologisches Therapieansprechen trotz Suppression der HIV-RNA unter die Nachweisgrenze aus. Dies führt zu einem persistierend erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen und Malignome. In früheren Studien konnten Risikofaktoren für fehlendes immunologisches Ansprechen identifiziert werden. Hierzu zählen höheres Alter, Hepatitis C-Virus Koinfektion, Vortherapien mit NRTI, niedrige CD4+ T-Lymphozytenzahlen und hohe HIV-RNA vor Beginn der Therapie. Basierend auf der Analyse der Risikofaktoren wurden verschiedene Hypothesen hinsichtlich der Ursachen für die ausbleibende T-Zell Rekonstitution aufgestellt werden, wie unter anderem die vermehrte T-Zell-Aktivierung als Folge der HIV-Infektion und Co-Infektionen, abnehmende Thymusgröße im Alter, residuelle Virusreplikation im lymphatischen Gewebe, Knochenmarkstoxizität von NRTI und Immunotoxizität von NRTI (Zidovudine, Zalcitabin).

Die Doppel-PI-Studie untersuchte prospektiv longitudinal die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer geboosteten antiretroviralen Therapie, die nur aus der Gruppe der Proteaseinhibitoren zusammengesetzt ist. Da, wie bereits in der Einführung ausgeführt, die generalisierte Aktivierung des Immunsystems in der Pathogenese der HIV-Infektion eine entscheidende Rolle spielt und als eine mögliche Ursache der immunovirologischen Diskordanz diskutiert wird, wurde zudem in Laboruntersuchungen der Effekt dieser Therapiekombination auf die Aktivierung der CD4+ und CD8+ Lymphozyten evaluiert. Es wurden 16 HIV-positive Patienten, die die Kriterien der immunovirologischen Diskordanz erfüllten, eingeschlossen, ihre antiretrovirale Therapie auf Atazanavir, Saquinavir und Ritonavir umgestellt und der klinische, immunologische, virologische und laborchemische Verlauf über 12 Monate erfasst.

### ***4.1. CD4+ und CD8+ T-Lymphozytenzahl und Viruslast***

Über 12 Monate konnten eine signifikante Erholung der CD4+ T-Zellen und eine effektive Suppression der Viruslast beobachtet werden. Parallel zum CD4-Zell-

Anstieg kam es wie erwartet zu einem Abfall des Anteils der CD8+-T-Zellen und entsprechend zu einem Anstieg des Quotienten aus CD4+- und CD8+ T-Zellen.

Im Verlauf der letzten zwölf Monate vor Studienbeginn konnte kein Anstieg der Helferzellen festgestellt werden, so dass folglich der CD4+-Anstieg dem neuen Therapieregime zuzuschreiben ist.

Soweit bekannt, ist dies die erste Studie, die den Benefit eines ART-Wechsels zu einem nukleosidfreien Doppel-PI Therapieregime zeigt. Allerdings kann mit dieser kleinen Studie nicht geklärt werden, ob der positive Effekt dem Absetzen der Nukleosidanaloga zuzuschreiben ist, oder es sich um eine direkte Wirkung der PIs handelt.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass ein Anstieg der CD4+ Zellen mit einem PI-Regime assoziiert sein könnte – Winston et al. beschreiben einen signifikanten CD4+-Anstieg, 48 Wochen nachdem die Patienten von einer Kombinationstherapie mit NRTIs auf die PI-Kombination Atazanavir, Saquinavir und Ritonavir umgestellt wurden <sup>59</sup>. Pharmakologische Studien zeigen, dass Atazanavir geboostet mit Ritonavir die Konzentration von Saquinavir im Plasma und intrazellulär erhöht <sup>9</sup>, was ebenfalls die Rekonstitution der Helferzellzahl begünstigen könnte. Außerdem gibt es Hinweise, dass PIs einen direkten anti-apoptischen Effekt auf Lymphozyten haben <sup>48</sup>. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine HIV-Therapie basierend auf PIs sehr gut die Virusreplikation im lymphatischen Gewebe unterdrückt, welche für die schlechte Erholung des Immunsystems verantwortlich sein könnte <sup>43</sup>.

Ein weiterer Aspekt, der für das Ausbleiben der immunologischen Erholung trotz effektiver Virussuppression mitverantwortlich sein könnte, ist die Knochenmarkstoxizität von Zidovudine, welches jeder der Studienpatienten zuvor erhalten hatte <sup>38</sup>. Allerdings zeigten sich bei den untersuchten Patienten keinerlei hämatologische Abnormalitäten vor Studieneinschluss, so dass das Ausbleiben der immunologischen Rekonstitution nicht allein Zidovudine zugeschrieben werden kann. Es bleibt zu bemerken, dass keiner der Studienpatienten Tenofovir und Didanosin eingenommen hatte, zwei weitere NRTIs, die ebenfalls mit einem schwachen immunologischen Ansprechen assoziiert sind <sup>3</sup>.

Zusammenfassend betrachtet war eine signifikante Erholung der CD4+ T-Zellen bei Patienten mit zuvor schlechtem immunologischem Therapieansprechen trotz guter

Virussuppression nach Therapiewechsel auf eine nukleosidfreie geboostete Doppel-PI-Therapie mit Atazanavir, Saquinavir und Ritonavir zu beobachten.

Die Relevanz dieser Beobachtung sollte allerdings durch größere randomisierte, kontrollierte Studien weiter untersucht werden.

#### **4.2. Aktivitätsparameter auf T-Helfer- und Suppressorzellen**

Weiterhin beinhaltete die Studie die longitudinale Erfassung der Expression zweier Aktivitätsparameter (HLA-DR und CD38) auf CD4+ und CD8+ T-Zellen der Studienpatienten, die mit zwei verschiedenen Gruppen HIV-infizierter Patienten verglichen wurden: Die erste Gruppe umfasste Patienten mit gutem virologischen und immunologischen Ansprechen auf ihre HIV-Therapie. Die zweite Gruppe bestand aus nicht behandelten HIV-Patienten mit nachweisbarer HIV-RNA und hohen CD4+ T-Zellen. Während bei den Studienpatienten die CD4+ Zellen innerhalb von 48 Wochen signifikant anstiegen, zeigte sich in dieser Zeit keine Änderung in der Expression des Aktivitätsparameter CD38, jedoch konnten wir einen hoch signifikanten Abfall in der HLA-DR Expression auf den CD4+ Zellen beobachten ( $p=0.001$ ). Die Expression der beiden Aktivitätsparameter auf CD8+ T-Zellen war im Vergleich zum Beginn der Studie nach 48 Wochen nahezu unverändert. Allerdings wurden sie auf den CD8+ T-Zellen der Kontrollgruppe mit nachweisbarer HIV-RNA signifikant höher exprimiert, sowohl im Vergleich zum Studienkollektiv (Baseline und 48 Wochen), als auch verglichen mit der Kontrollgruppe der Patienten mit gutem Therapieansprechen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Benito et al., die besagen, dass die Höhe der CD38-Expression auf CD8+ T-Zellen mit der Höhe der HIV-RNA im Blut korreliert <sup>4</sup>.

Die Aktivierung des Immunsystems ist einer der Hauptmechanismen der HIV-Pathogenese <sup>26</sup> und könnte auch erklären, warum ein Teil der Patienten immunologisch nicht auf die antiretrovirale Therapie bei erfolgreicher Virussuppression reagiert <sup>5, 27</sup>. Da zumindest HLA-DR auf CD4+ T-Zellen während des Anstiegs der CD4+ T-Zellen deutlich rückläufig ist, unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass die Immunaktivierung ein Grund für eine schlechte immunologische Erholung trotz HAART sein könnte. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Assoziation von T-Zell Aktivierung und CD4+

Zellzahl auf Unterschiede in der HIV-Replikation unterhalb der Nachweisgrenze oder in dieser Arbeit nicht untersuchten Gewebekompartimenten zurückzuführen ist. Zu anderen möglichen Faktoren für ein schlechtes Therapieansprechen gehören toxische Medikamentenwirkungen, veränderte Thymusfunktion, Knochenmarks-, oder genetische Dispositionen des Wirts und residuelle Virusreplikation.

#### **4.4. Beantwortung der Fragen**

##### **4.4.1. Frage 1**

Ist eine Doppel-PI-Therapie vergleichbar wirksam und verträglich wie die konventionelle Kombinationstherapie?

- Die Viruslast wurde im Studienzeitraum bei allen Patienten wirksam unterdrückt. Studienabbrüche wegen ansteigender Viruslast, oder transienter Erhöhungen der Viruslast ließen sich durch fehlende Therapieadhärenz oder Interaktionen mit anderen Medikamenten oder Erkrankungen erklären.
- Die Verträglichkeit ist zufrieden stellend – unerwünschte Nebenwirkungen führten nicht zum Abbruch der Medikation oder Komplikationen.

##### **4.4.2. Frage 2**

Bietet die Doppel-PI-Therapie Patienten mit immunovirologischer Diskordanz einen Vorteil? Steigen die CD4+ T-Lymphozyten an?

- Es ließ sich ein signifikanter Anstieg der CD4+ T-Lymphozyten im Beobachtungszeitraum im Gegensatz zum vorhergehenden Zeitraum beobachten. Dieser Effekt ist als Vorteil zu bewerten, denn damit geht eine verbesserte Immunabwehr einher. Tatsächlich erlitt keiner der Studienpatienten im Untersuchungszeitraum eine opportunistische Infektion.

##### **4.4.3. Frage 3**

Verändern sich unter Doppel-PI-Therapie molekulare Merkmale der T-Lymphozyten bezüglich Aktivierung?

- Es konnte eine signifikante Änderung von HLA-DR auf den CD4+ Zellen festgestellt werden. Allerdings trat dieser Effekt nicht in Bezug auf CD38 ein. Die Aktivitätsparameter auf der Oberfläche der CD8+ T-Lymphozyten änderten sich

nicht. Insbesondere in Anbetracht der geringen Fallzahl kann durch diese Studie nicht abschließend bestätigt werden, dass die Doppel-PI-Therapie Einfluss auf die T-Zell Aktivierung nimmt.

## **5. Zusammenfassung**

Die HIV-Infektion konnte durch die Entwicklung der antiretroviralen Kombinationstherapie für eine Vielzahl der betroffenen Patienten unter Kontrolle gebracht werden. Allerdings können 10-17% der Behandelten nicht profitieren, da sich ihr Immunstatus trotz erfolgreicher Suppression der Virusreplikation nicht erholt (IVD).

Eine Hyperaktivierung des Immunsystems wird als mögliche Ursache für die IVD diskutiert und als prognostisch ungünstig eingeschätzt. Weitere mögliche Kontributoren zur IVD sind unter Anderem residuelle Virusreplikation im lymphatischen Gewebe, Knochenmarkstoxizität von NRTI und Immunotoxizität von NRTI (Zidovudine, Zalcitabin).

Einige Gruppen konnten zeigen, dass Proteaseinhibitoren auch die Virusreplikation im lymphatischen Gewebe reduzieren und kombiniert ebenso wirksam sein können wie eine konventionelle Kombinationstherapie und die Erholung der T-Helferzellen begünstigen.

Daher wurde in dieser Studie untersucht, ob der Ausschluss von NRTIs und eine alleinige PI-Kombinationstherapie immunologischen Therapieversagern einen Vorteil bietet.

Es zeigte sich insgesamt eine gute Verträglichkeit der Doppel-PI-Therapie, auch wurde die Viruslast nachhaltig unterdrückt. Im Gegensatz zum Zeitraum vor Beginn der Studie wurde ein signifikanter Anstieg der Helferzellen beobachtet.

Die flowzytometrischen Untersuchungen in Bezug auf die Aktivierung der T-Lymphozyten zeigten eine hochsignifikante Reduktion der Expression von HLA-DR auf den CD4+ Zellen der Studiengruppe nach 48 Wochen, während sich kein Unterschied für die Expression von CD38 ergab. Für die CD8+ Zellen zeigte sich keine Veränderung in der Expression beider Parameter.

Diese Arbeit zeigt, dass Patienten mit fehlendem immunologischem Ansprechen bei wirksamer Virussuppression von einer Doppel-PI-Therapie profitieren könnten. Ob

die Doppel-PI Therapie zukünftig eine generelle Empfehlung für diese Patienten sein sollte, muss in weiteren großen, randomisierten Studien überprüft werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ameisen JC (1995) From cell activation to cell depletion. The programmed cell death hypothesis of AIDS pathogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* 374: 139-163
2. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J (1997) Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science (New York, NY)* 277: 112-116
3. Barreiro P, Soriano V (2006) Suboptimal CD4 gains in HIV-infected patients receiving didanosine plus tenofovir. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 57: 806-809
4. Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V (2004) CD38 expression on CD8 T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS research and human retroviruses* 20: 227-233
5. Benito JM, Lopez M, Lozano S, Ballesteros C, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V (2005) Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4+ T cells under successful highly active antiretroviral therapy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 38: 373-381
6. Benveniste O, Estaquier J, Lelievre JD, Vilde JL, Ameisen JC, Leport C (2001) Possible mechanism of toxicity of zidovudine by induction of apoptosis of CD4+ and CD8+ T-cells in vivo. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 896-897
7. Benveniste O, Flahault A, Rollot F, Elbim C, Estaquier J, Pedron B, Duval X, Dereuddre-Bosquet N, Clayette P, Sterkers G, Simon A, Ameisen JC, Leport C (2005) Mechanisms involved in the low-level regeneration of CD4+ cells in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy who have prolonged undetectable plasma viral loads. *The Journal of infectious diseases* 191: 1670-1679
8. Boffito M (2004) Interaction between SQV, RTV and ATV. 11th CROI, San Francisco 2004
9. Boffito M, Kurowski M, Kruse G, Hill A, Benzie AA, Nelson MR, Moyle GJ, Gazzard BG, Pozniak AL (2004) Atazanavir enhances saquinavir hard-gel concentrations in a ritonavir-boosted once-daily regimen. *AIDS (London, England)* 18: 1291-1297
10. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine* 12: 1365-1371

11. Chavan S, Kodoth S, Pahwa R, Pahwa S (2001) The HIV protease inhibitor Indinavir inhibits cell-cycle progression in vitro in lymphocytes of HIV-infected and uninfected individuals. *Blood* 98: 383-389
12. Deeks SG, Hoh R, Grant RM, Wrinn T, Barbour JD, Narvaez A, Cesar D, Abe K, Hanley MB, Hellmann NS, Petropoulos CJ, McCune JM, Hellerstein MK (2002) CD4+ T cell kinetics and activation in human immunodeficiency virus-infected patients who remain viremic despite long-term treatment with protease inhibitor-based therapy. *The Journal of infectious diseases* 185: 315-323
13. Derdeyn CA, Silvestri G (2005) Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Current opinion in immunology* 17: 366-373
14. DHSS (Dec 1st 2009) Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services: 1-161
15. Douek DC (2003) Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS reviews* 5: 172-177
16. Eggena MP, Barugahare B, Okello M, Mutyala S, Jones N, Ma Y, Kityo C, Mugenyi P, Cao H (2005) T cell activation in HIV-seropositive Ugandans: differential associations with viral load, CD4+ T cell depletion, and coinfection. *The Journal of infectious diseases* 191: 694-701
17. Engsig FN, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Roge B, Jensen J, Nielsen LN, Obel N (2010) Long-term mortality in HIV patients virally suppressed for more than three years with incomplete CD4 recovery: a cohort study. *BMC infectious diseases* 10: 318
18. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligo B, Butto S HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 46: 5-14
19. Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Este JA, Zamzami N, Susin SA, Xie Z, Brothers G, Reed JC, Penninger JM, Kroemer G (2000) Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *The Journal of experimental medicine* 192: 1081-1092
20. Garcia F, Vidal C, Plana M, Cruceta A, Gallart MT, Pumarola T, Miro JM, Gatell JM (2000) Residual low-level viral replication could explain discrepancies between viral load and CD4+ cell response in human immunodeficiency virus-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 30: 392-394
21. Germain RN (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287-299
22. Gougeon ML (2003) Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nature reviews* 3: 392-404
23. Grabar S, Le Moing V, Goujard C, Leport C, Kazatchkine MD, Costagliola D, Weiss L (2000) Clinical outcome of patients with HIV-1 infection according to immunologic and virologic response after 6 months of highly active antiretroviral therapy. *Annals of internal medicine* 133: 401-410
24. Greub G, Ledergerber B, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H, Burgisser P, Erb P, Boggian K, Piffaretti JC, Hirschel B, Janin P, Francioli P, Flepp M,

- Telenti A (2000) Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 356: 1800-1805
25. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S (2003) Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology* 77: 11708-11717
  26. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedema F (2003) Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS (London, England)* 17: 1881-1888
  27. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Bredt B, Hagos E, Lampiris H, Deeks SG (2003) T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases* 187: 1534-1543
  28. Janeway CA (2005) *Immunobiology: The immune System in health and disease*. Garland Science Publishing, New York
  29. Lane HC (2010) Pathogenesis of HIV infection: total CD4+ T-cell pool, immune activation, and inflammation. *Top HIV Med* 18: 2-6
  30. Lederman MM, McKinnis R, Kelleher D, Cutrell A, Mellors J, Neisler M, Cooney E, Haas DW, Haubrich R, Stanford J, Horton J, Landay A, Spreen W (2000) Cellular restoration in HIV infected persons treated with abacavir and a protease inhibitor: age inversely predicts naive CD4 cell count increase. *AIDS (London, England)* 14: 2635-2642
  31. Lieberman J (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews* 3: 361-370
  32. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV (1997) Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 16: 83-92
  33. Lore K, Smed-Sorensen A, Vasudevan J, Mascola JR, Koup RA (2005) Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 201: 2023-2033
  34. Martinez E, Arnedo M, Giner V, Gil C, Caballero M, Alos L, Garcia F, Holtzer C, Mallolas J, Miro JM, Pumarola T, Gatell JM (2001) Lymphoid tissue viral burden and duration of viral suppression in plasma. *AIDS (London, England)* 15: 1477-1482
  35. McMichael AJ, Rowland-Jones SL (2001) Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410: 980-987
  36. Murphy KM, Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nature reviews* 2: 933-944

37. Nunez M, Asencio R, Valencia ME, Leal M, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V (2003) Rate, causes, and clinical implications of presenting with low CD4+ cell counts in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS research and human retroviruses* 19: 363-368
38. Nusbaum NJ, Abraham T (1995) AZT modulation of trimetrexate myelotoxicity: evidence from an HL60 model. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* 90: 403-412
39. Plana M, Martinez C, Garcia F, Maleno MJ, Barcelo JJ, Garcia A, Lejeune M, Vidal C, Cruceta A, Miro JM, Pumarola T, Gallart T, Gatell JM (2002) Immunologic reconstitution after 1 year of highly active antiretroviral therapy, with or without protease inhibitors. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 29: 429-434
40. Rogers PR, Dubey C, Swain SL (2000) Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 164: 2338-2346
41. Roitt I (1991) *Essential Immunology*. Blackwell Science inc
42. Romagnani S (2000) T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85: 9-18; quiz 18, 21
43. Ruiz L, van Lunzen J, Arno A, Stellbrink HJ, Schneider C, Rull M, Castella E, Ojanguren I, Richman DD, Clotet B, Tenner-Racz K, Racz P (1999) Protease inhibitor-containing regimens compared with nucleoside analogues alone in the suppression of persistent HIV-1 replication in lymphoid tissue. *AIDS (London, England)* 13: F1-8
44. Sakaguchi S (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101: 455-458
45. Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U (2000) Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *AIDS (London, England)* 14: 1079-1089
46. Schechter M, Tuboi SH (2006) Discordant immunological and virological responses to antiretroviral therapy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58: 506-510
47. Shearer GM (1998) HIV-induced immunopathogenesis. *Immunity* 9: 587-593
48. Sloand EM, Kumar PN, Kim S, Chaudhuri A, Weichold FF, Young NS (1999) Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor modulates activation of peripheral blood CD4(+) T cells and decreases their susceptibility to apoptosis in vitro and in vivo. *Blood* 94: 1021-1027
49. Smyth MJ, Kelly JM, Sutton VR, Davis JE, Browne KA, Sayers TJ, Trapani JA (2001) Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *Journal of leukocyte biology* 70: 18-29
50. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA (1986) Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322: 470-474
51. Sompayrac LM (2008) *How the immune system works*. Wiley-VCH 3
52. Staszewski S, Babacan E, Stephan C, Haberl A, Carlebach A, Gute P, Klauke S, Hermschulte Y, Stuermer M, Dauer B (2006) The LOPSAQ study: 48 week analysis of a boosted double protease inhibitor regimen containing

- lopinavir/ritonavir plus saquinavir without additional antiretroviral therapy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58: 1024-1030
53. Stout RD, Bottomly K (1989) Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J Immunol* 142: 760-765
  54. Teixeira L, Valdez H, McCune JM, Koup RA, Badley AD, Hellerstein MK, Napolitano LA, Douek DC, Mbisa G, Deeks S, Harris JM, Barbour JD, Gross BH, Francis IR, Halvorsen R, Asaad R, Lederman MM (2001) Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS (London, England)* 15: 1749-1756
  55. Viard JP, Mocroft A, Chiesi A, Kirk O, Roge B, Panos G, Vetter N, Bruun JN, Johnson M, Lundgren JD (2001) Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. *The Journal of infectious diseases* 183: 1290-1294
  56. Viora M, Di Genova G, Rivabene R, Malorni W, Fattorossi A (1997) Interference with cell cycle progression and induction of apoptosis by dideoxynucleoside analogs. *International journal of immunopharmacology* 19: 311-321
  57. WHO U (2006) AIDS epidemic update: special report on HIV/AIDS: December 2006.
  58. WHO U (2009) AIDS epidemic update: special report on HIV/AIDS: December 2009.
  59. Winston A, Mallon PW, Satchell C, MacRae K, Williams KM, Schutz M, Law M, Cooper DA, Emery S (2007) The safety, efficacy, and pharmacokinetic profile of a switch in antiretroviral therapy to saquinavir, ritonavir, and atazanavir alone for 48 weeks and a switch in the saquinavir formulation. *Clin Infect Dis* 44: 1475-1483
  60. Yamashita TE, Phair JP, Munoz A, Margolick JB, Detels R, O'Brien SJ, Mellors JW, Wolinsky SM, Jacobson LP (2001) Immunologic and virologic response to highly active antiretroviral therapy in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS (London, England)* 15: 735-746
  61. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS (1990) HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61: 213-222
  62. Zwahlen ME, Matthias (2006) Progression and mortality of untreated HIV-positive individuals living in resource-limited settings: Update of literature review and evidence synthesis. Report on UNAIDS Obligation HQ/05/422204

## 7. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

- Veröffentlichung** Clara Lehmann, Norma Jung, **Anika Hofmann**, Oliver A. Cornely, Gerd Fätkenheuer, Christoph Wyen, Pia Hartmann; “Nucleoside-Free Boosted Double PI Regimen: Significant CD4+ T-Cell Recovery in Patients with Poor Immunologic Response Despite Virologic Suppression” in Current HIV Research 2008
- Tagungsbeitrag** C. F. J. Lehmann, **A. Hofmann**, O. Cornely, N. Jung, P. Hartmann, N. Schmeisser, C. Wyen, G. Fätkenheuer; “Double boosted regimen of atazanavir plus saquinavir and Ritonavir in patients with poor recovery of CD4+ T-cells despite complete viral suppression”, ICAAC06-A-2769-ASM

## **8. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.