

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

Immunregulatorische Mechanismen in der akuten HIV-Infektion

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

Vorgelegt von Katharina Rotheneder (geb. Mücke)
aus Nürnberg

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter	Prof. Dr. med. Rika Draenert
Mitberichterstatter	Prof. Dr. med. Josef Eberle Prof. Dr. Michael Hölscher
Mitbetreuung durch den Mitarbeiter	Dr. med. Hans Christian Stubbe

Dekan	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
-------	---------------------------------

Tag der mündlichen Prüfung	28.10.2021
----------------------------	------------

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1. Pathophysiologie der HIV-Infektion.....	1
1.1.1. Aufbau und Genomstruktur des HI-Virus.....	1
1.1.2. Der Replikationszyklus des HI-Virus.....	2
1.2. Die akute HIV-Infektion	4
1.2.1. Der Verlauf der unbehandelten HIV-Infektion.....	4
1.2.2. Klassifikation der akuten HIV-Infektion	6
1.3. HIV und das Immunsystem.....	7
1.3.1. Die CD8 ⁺ T-Lymphozyten	7
1.3.2. Die CD4 ⁺ T-Lymphozyten	8
1.4. Immunerschöpfung	8
1.4.1. Immunaktivierung	9
1.4.2. Immuncheckpoints	9
1.4.3. Myeloide Suppressorzellen (MDSC).....	11
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Labormaterial	14
2.1. Methoden.....	16
2.1.1. TOP-HIV Studienteilnehmer.....	16
2.1.2. PBMC-Isolierung	17
2.1.3. Automatisierte Zellzählung.....	18
2.1.4. Kryokonservierung.....	18
2.1.5. Auftauen von Zellen.....	18
2.1.6. Bestimmung der Zellviabilität mit Trypanblau	19
2.1.7. Peptide	19
2.1.8. Stimulation der Zellen.....	22
2.1.9. Durchflusszytometrie.....	23
2.2. Statistische Auswertung	26
3. Ergebnisse	27
3.1. PMN-MDSC und M-MDSC Level in der akuten HIV-Infektion	27
3.1. Die Immunaktivierungsmarker CD38 und HLA-DR in der akuten HIV-Infektion	28
3.2. Die Immuncheckpoint-Expression in der akuten HIV-Infektion	31
3.2.1. Die Immuncheckpoint-Expression auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	31
3.2.2. Die Immuncheckpoint-Expression auf HIV-spezifischen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	36

4. Diskussion	40
5. Ausblick.....	47
6. Literaturverzeichnis	48
7. Anhang.....	54
7.1. Danksagung	54
7.2. Veröffentlichungen.....	55
7.3. Eidesstattliche Versicherung	56

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ART	Antiretrovirale Therapie
CD	Cluster of differentiation
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigene 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZIF	Deutsches Zentrum für Infektionsforschung
FCS	Fetal calf serum
FMO	Fluorescence minus one
Gag	Group-antigen
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HIV	Human immunodeficiency virus
IFN- γ	Interferon gamma
LAG-3	Lymphocyte activation gene 3
LTR	Long terminal repeat
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
Nef	Negative regulatory factor
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed death-1
Rev	Regulator of expression of virion proteins
RKI	Robert-Koch-Institut
Rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
Tat	Transactivating regulatory protein
TIM-3	T-cell immunoglobuline mucine 3

1. Einleitung

Das Immunschwächesyndrom AIDS (engl. acquired immune deficiency syndrome) wurde erstmals 1981 in den USA beschrieben, als eine Gruppe junger, homosexueller Männer an opportunistischen Infektionen wie *Pneumocystis jirovecii* Pneumonien erkrankte (1). 1983 entdeckten Barré-Sinoussi und Montagnier das HI-Virus (engl. human immunodeficiency virus) als auslösenden Erreger des AIDS (2). Zunächst wurde HIV Typ 1 beschrieben, dem 99 % aller HIV-Infektionen zu Grunde liegen. Kurz darauf wurde auch das weniger virulente und vor allem in Westafrika lokalisierte Typ 2 HI-Virus entdeckt. Als Hypothese zur Entstehung der humanen HI-Viren Stämme, wurde eine Übertragung des SI-Virus (engl. simian immunodeficiency virus) von afrikanischen Primaten auf Menschen und die danach folgende Entwicklung der HI-Viren im Menschen vorgeschlagen (3).

Mit 2,5 Millionen Neuinfektionen jährlich und einer weltweiten Prävalenz von 37 Millionen Infizierten wird von einer Epidemie der HIV-Infektion gesprochen (4). Allein in Deutschland leben nach Angaben des Robert-Koch-Institutes (RKI) 84.700 HIV-Infizierte, bei einer Neuerkrankungsrate von 3.200 Menschen im Jahr 2015 (5). Aufgrund der höheren Verbreitung beschäftigt sich diese Arbeit und ein Großteil der publizierten Studien mit HIV-1 (im Folgenden: HIV). Im Laufe der letzten Jahre wurde ein bedeutender Fortschritt in der Therapie der HIV-Infektion erreicht. So gelang durch die Zulassung weiterer Medikamentenklassen und Einführung der antiretroviralen Therapie (ART) eine Reduktion der Virusvermehrung und ein Verhindern der Krankheitsprogression. Trotz alledem ist die hohe Mortalität und Morbidität weiterhin ein relevantes Problem. Das Ziel der aktuellen Forschung ist daher neben der Verbesserung der antiretroviralen Therapie, die Entwicklung einer wirkungsvollen Prävention und letztlich die Heilung der HIV-Infektion.

1.1. Pathophysiologie der HIV-Infektion

1.1.1. Aufbau und Genomstruktur des HI-Virus

HIV ist Teil der Familie der Retroviren, innerhalb derer es zur Gattung der Lentiviren gehört. Das einzelsträngige RNA-Genom enthält die Gene *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *nef*, die von zwei LTR-Regionen (engl. long terminal repeat) eingerahmt sind. Die LTR-Regionen ermöglichen den Einbau des Virus-Genoms in die DNA der Wirtszelle (6). Die Gene *gag* (engl. group-antigen) und *env* (engl. envelope) kodieren für Strukturproteine: Das Nukleokapsidprotein p24, das Matrixprotein p17, sowie das in die virale Lipoproteinhülle eingebettete Glykoprotein, das sich aus einer Oberflächendomäne (gp120) und einer Transmembrandomäne (gp41) zusammensetzt (7) (8).

Das Gen *pol* (Polymerase) kodiert für die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Virusprotease, die gemeinsam mit dem RNA-Genom im Inneren des Viren-Partikels lokalisiert sind

(Abbildung 1). Zusätzlich enthält das Genom die sechs Gene *nef*, *vpu*, *vpr*, *vif*, *tat*, *rev*, die für die Virusreplikation essenzielle regulatorische und akzessorische Proteine kodieren (Abbildung 2). Unter anderem verhindert das Protein Nef durch die Reduktion der CD4- und MHC-I-Expression auf HIV infizierten Zellen so deren Elimination durch zytotoxische T-Zellen (9) (10).

Die Gene *nef*, *rev* und *tat* werden in der frühen transkriptionellen Phase der HIV-Infektion exprimiert und sind gemeinsam mit Gag stark immunogen (11). In dieser Arbeit wurden deshalb Peptidfragmente dieser HIV-spezifischen Proteine zur Zellstimulation eingesetzt.

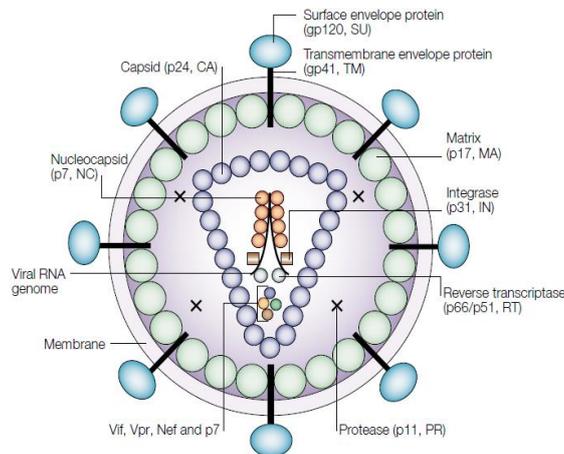


Abbildung 1. Aufbau eines HI-Virus (12): In der Lipoproteinhülle von HIV sind die Glykoproteine bestehend aus einer oberflächlichen (gp120) und transmembranen (gp41) Domäne verankert. Neben dem Matrixprotein p17 befindet sich im Nucleokapsid (p24) das einzelsträngige RNA-Genom mit den Enzymen des Virus.

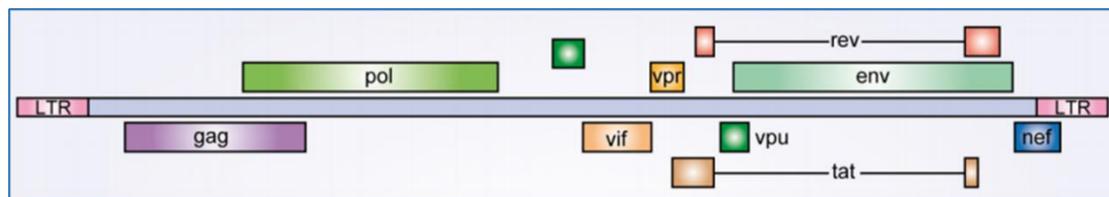


Abbildung 2. HIV Genomstruktur (13): Das Genom des HIV-1-Virus besteht aus 5'LTR-gag-pol-env-LTR 3' und den sechs zusätzlichen Genen *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* und *nef*.

1.1.2. Der Replikationszyklus des HI-Virus

Das Hauptziel des HI-Virus sind aktivierte CD4⁺ T-Zellen. Dabei erlangt das Virus über eine Interaktion mit dem CD4-Rezeptor und den Chemokin-Korezeptoren CCR5 und CXCR4 (Fusin) Eintritt in die Wirtszelle (14) (15) (16). Auch auf der Zelloberfläche von ruhenden CD4⁺ T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen befindet sich der CD4-Rezeptor, so dass auch deren Infektion möglich ist (17). Nach der Fusion des behüllten Virus mit der Zielzellmembran, erlangt das Nucleokapsid Zutritt in das Zellinnere (Abbildung 3). Das darin enthaltene Enzym reverse Transkriptase transkribiert nun die virale RNA in eine komplementäre DNA. Aufgrund der hohen Fehlerrate dieses

Enzyms kommt es zu Mutationen im Virusgenom, die die Bekämpfung des Virus durch das Immunsystem erschweren und letztlich unmöglich machen (18).

In einer ruhenden CD4⁺ T-Zelle wird die entstandene doppelsträngige virale DNA nach dem Transport in den Nukleus vorerst nicht in das Genom der Wirtszelle integriert. Erst bei Aktivierung der Zelle katalysiert die virale Integrase die Integration der viralen DNA in das Wirtszell-Genom (19) (20). *In vitro* kann eine solche T-Zell-Aktivierung durch Zugabe HIV-spezifischer Peptide wie Nef geschehen (Kapitel 2.1.8). Ruhende, latent infizierte Zellen beherbergen das Virus ein Leben lang und bilden persistierende Reservoirs in den HIV-infizierten Zellen (21).

Nach der Integration des viralen Genoms in die Zielzelle erfolgt die Replikation des Virus. Das virale Genom wird transkribiert, das RNA-Transkript in das Zytoplasma exportiert und dort translatiert. Somit werden die viralen Proteine produziert: Tat, Rev, Nef regulieren die weitere Transkription und Replikation, während die Proteine Gag, Pol, Env virale Enzyme und Strukturproteine bilden (13). Schließlich formieren sich neue Viruspartikel, die daraufhin von der Wirtszelle abgeschnúrt werden (engl. budding).

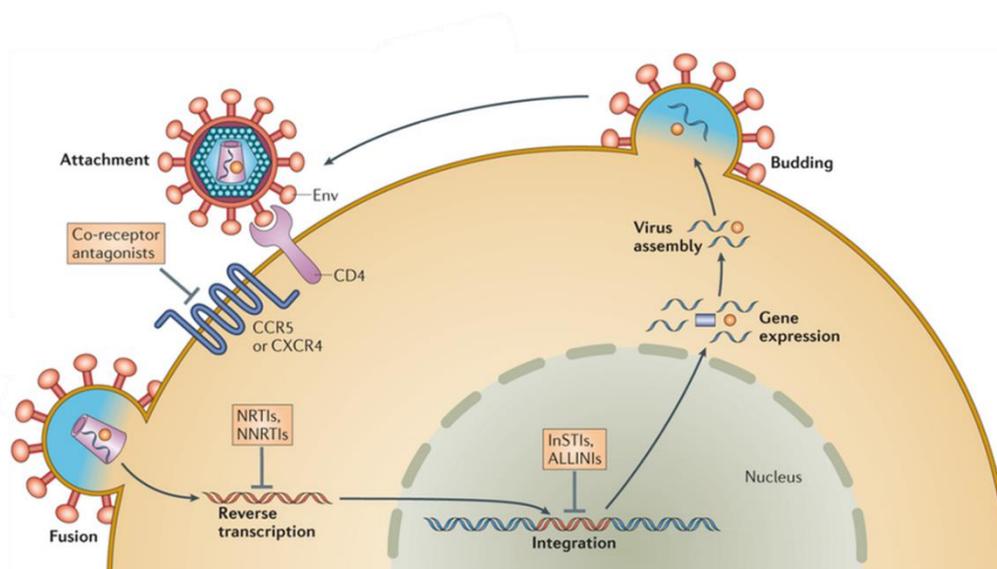


Abbildung 3. Replikationszyklus des HI-Virus (20). Nach der Anlagerung des HI-Virus an den CD4-Rezeptor der Zielzelle und der Membranfusion, schreibt das virale Enzym Reverse Transkriptase die RNA des Virus in eine komplementäre DNA um, damit diese anschließend in das Wirtsgenom integriert werden kann. Nach Aktivierung der Zelle kommt es zur Bildung der mRNA, die für die viralen Proteine kodiert und somit die Bildung neuer Viruspartikel ermöglicht.

1.2. Die akute HIV-Infektion

1.2.1. Der Verlauf der unbehandelten HIV-Infektion

Übertragen wird das HI-Virus vor allem durch Sexualverkehr mit einem infizierten Partner, dem Gebrauch gemeinsamer Utensilien bei intravenösem Drogenkonsum oder perinatal von einer HIV-infizierten Mutter auf das Kind. Nahezu 75 % der HIV-Neuinfektionen in entwickelten Ländern geschahen derzeit zwischen homosexuellen Männern (22).

Die akute HIV-Infektion manifestiert sich klinisch in 90 % der Fälle mit grippalen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, makulopapulöser Hautausschlag, orale Ulzera und Lymphadenopathie. Dabei können die Dauer und Stärke der klinischen Anzeichen individuell stark variieren. Eine vorliegende HIV-Infektion ist nur zuverlässig durch einen spezifischen HIV-Test nachweisbar.

Da die Übertragung des HI-Virus üblicherweise über die rektale oder vaginale Schleimhaut erfolgt, infiltriert das HI-Gründervirus in der frühen, akuten Phase der HIV-Infektion in das dortige Gewebe und befällt die CD4⁺ T-Zellen der Schleimhaut. Dabei kommt es neben einer massiven Virusreplikation zu einem starken Abfall der Anzahl an CD4⁺ T-Zellen, der in erster Linie das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe des Gastrointestinaltraktes (GI-Trakt) betrifft (23) (24) (Abbildung 4). Im Zuge der Immunaktivierung wandern die infizierten und Virusantigen-präsentierenden Zellen in die Lymphknoten und das lymphatische Gewebe ein, wo das Virus auf aktivierte CD4⁺ T-Zellen trifft. Dies ermöglicht dem Virus die Replikation und die disseminierte Ausbreitung im gesamten Organismus. Aktuelle Hypothesen vermuten, dass virale Proteine die Apoptose virusinfizierter Zellen induzieren und dass HIV zusätzlich nicht-infizierte Nachbarzellen (engl. bystander cells) tötet (25). Der Abfall der CD4⁺ T-Zellen beruht demnach nicht primär auf einer direkten Infektion der Zellen, sondern wird maßgeblich durch Apoptose verursacht (26). Ein weiterer Ansatz beruht auf der Elimination HIV-infizierter CD4⁺ T-Zellen durch HIV-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten (Kapitel 1.3.1).

Sobald das Immunsystem aktiviert und die antivirale Immunantwort mit Bildung HIV-spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten initiiert ist, sinkt die Viruslast des Patienten bis auf unter 1 % ab und erreicht einen stabilen Wert, den *viral setpoint*. Dieser ist in seiner Höhe ein maßgebender Prädiktor für den weiteren Verlauf der Infektion (27). Vor allem eine frühe, robuste HIV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort scheint einen großen Einfluss auf die Höhe des *viral setpoints* zu haben (28). So gelingt es HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen die HI-Virämie zu unterdrücken, wenngleich es ihnen nicht möglich ist das Virus zu eliminieren und die CD4⁺ T-Zellzahl auf den Ausgangswert anzuheben. Neben den HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten wurde eine zytotoxische Funktion der HIV-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten und deren Rolle in der Kontrolle der HI-Virämie belegt (29). Zusätzlich kommt es in den ersten Tagen nach

Infektion zu einer massiven Zytokinkaskade, die immunpathologische Einflüsse auf das Immunsystem haben könnte (30).

In der unbehandelten, chronischen Phase der HIV-Infektion kommt es zu einem schleichenden Anstieg der Viruslast und einer langsam zunehmenden Depletion der CD4⁺ T-Zellen, charakteristischerweise über viele Jahre, in denen der Patient asymptomatisch ist. Sinkt letztendlich die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Blut unter 200 Zellen/μl, muss mit dem Auftreten von opportunistischen Infektionen gerechnet werden. Dies ist die Phase des Immunschwächesyndroms AIDS, das virologisch mit einer massiv ansteigenden Viruslast und einem weiteren Abfall der CD4⁺ T-Zellen einher geht und letztlich durch opportunistische Erkrankungen zum Tod des Infizierten führt. In den letzten Jahren konnte durch die Therapie der ART das Voranschreiten der HIV-Infektion verhindert werden, sodass ein infizierter Patient eine nun annähernd gleiche Lebenserwartung wie eine gesunde Person hat (31). Die Eradikation des Virus bleibt jedoch unerreicht.

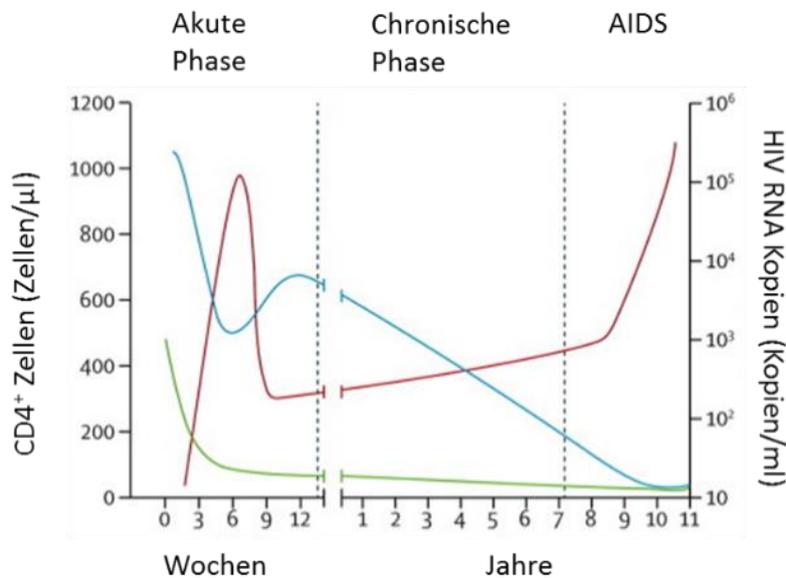


Abbildung 4. Graphische Darstellung der Beziehung zwischen HIV RNA Kopien/Viruslast (rote Kurve) und CD4⁺ Zellzahl im peripheren Blut (blaue Kurve) sowie im Gastrointestinaltrakt (grüne Kurve) der unbehandelten HIV-Infektion (17). In der frühen Phase der HIV-Infektion steigt die Viruslast im Blut des Patienten aufgrund der starken Virusreplikation rasch an, während die CD4⁺-Helferzellen rapide in ihrer Zahl abnehmen. Durch das aktivierte Immunsystem kann die CD4⁺-Zellzahl nach ein paar Wochen um ein Vielfaches erhöht werden, im Laufe der Erkrankung kommt es jedoch zu einer zunehmenden Depletion. Die Viruslast sinkt zudem auf einen stabilen Wert, den *viral setpoint* und steigt im Zuge der chronischen Phase wieder stetig an. Im Endstadium AIDS der Erkrankung erreicht die Viruslast ihren Maximalwert und die Zahl der CD4⁺-Zellen sinkt auf ein Minimum ab.

1.3. HIV und das Immunsystem

Die zelluläre Immunität spielt in der Bekämpfung des HI-Virus eine entscheidende Rolle. Sichtbar wird dies vor allem an der Patientengruppe, den sogenannten *Elite-controller*, deren CD4⁺ Zellzahl physiologisch und deren Virämie trotz fehlender antiretroviraler Therapie nicht detektierbar ist. Die Fähigkeit der *Elite-controller* ihre HIV-1 Infektion kontrollieren zu können ist noch nicht vollständig verstanden. Es zeigte sich jedoch, dass in einigen Fällen starke, robuste HIV-spezifische T-Zellantworten in dieser Patientenkohorte dafür verantwortlich waren (37).

Einige Zellen des Immunsystems, vor allem die Lymphozyten, sind bei einer HIV-Infektion von entscheidender Bedeutung. Die Lymphozyten, die Teil der zellulären Immunität sind, werden im Knochenmark gebildet und differenzieren sich im Zuge der Reifung und Entwicklung in viele verschieden funktionell hochspezialisierte T-Zell-Subpopulationen. Eine besondere Rolle nehmen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten ein.

1.3.1. Die CD8⁺ T-Lymphozyten

Die Hauptfunktion der CD8⁺ T-Zellen ist die Eliminierung virusinfizierter Zellen und damit die Hemmung der viralen Replikation (38). Sie erkennen eine HIV-infizierte Zelle, wenn diese virale Peptide auf ihrer Oberfläche präsentiert. Die Eliminierung geschieht sowohl durch direkte Zytolyse mit zytotoxischen Proteinen (Perforinen), als auch indirekt durch Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen wie etwa Interferon- γ (IFN- γ) (39) (40).

Die HIV-spezifische CD8⁺ T-Zell Immunantwort wurde bereits 1987 beschrieben und spielt eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung des HI-Virus (41). Während der frühen, akuten Phase der HIV-Infektion werden besonders die viralen Proteine Nef, Rev und Tat exprimiert und von infizierten Zellen präsentiert (42). In diesem Stadium der Infektion wurden Tat-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen, deren Auftreten mit einem rapiden Abfall der Plasmavirämie einherging (43). Diese Beobachtung wurde durch den Anstieg der Plasmavirämie nach vorangegangener Depletion der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen in HIV-infizierten Affen bestätigt (44). So konnte in weiteren Studien ein Zusammenhang zwischen dem Absinken der Viruslast und dem Anstieg HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen beschrieben und deren Bedeutung in der Kontrolle der Virämie unterstrichen werden (39) (45).

Dabei soll die initiale CD8⁺ T-Zellantwort auch *escape mutants* erkennen und eliminieren. Das sind HI-Viren, die ihr virales Genom von dem ursprünglichen Gründervirus durch eine andere Aminosäuresequenz ersetzt haben und damit versuchen dem Immunsystem zu entkommen (46) (47). Unter anderem mit Hilfe dieser Strategie können HI-Viren ein virales Reservoir im Körper des Infizierten etablieren. Diese Beobachtungen legen nahe, dass eine effiziente CD8⁺ T-Zellimmunität bereits in der akuten HIV-Infektion von großer Bedeutung ist. Nach anfänglichem Erfolg im

Unterdrücken der viralen Replikation kommt es, trotz Zunahme der Breite der T-Zellantworten, zu einem Verlust der Effektorfunktionen der CD8⁺ T-Zellen in der chronischen Phase der Infektion (48) (49). Dies wurde als Immunerschöpfung beschrieben und begünstigt das Fortschreiten der Erkrankung (Kapitel 1.4).

1.3.2. Die CD4⁺ T-Lymphozyten

Die CD4⁺ T-Zellen werden nach Funktion und Phänotyp in verschiedenen Subgruppen eingeteilt, u.a.: Th1-, Th2-, Th17- T-Helferzellen und folliculäre T-Helferzellen. Die am besten untersuchten Th1- und Th2-T-Helferzellen lassen sich anhand des Expressionsprofils ihrer Zytokine unterscheiden. Dabei sezernieren Th1-Zellen zum Beispiel IFN- γ und Th2-Zellen Interleukine.

Zytotoxische CD4⁺ T-Zellen gehören zur Gruppe der Th1-Zellen und spielen ebenso wie die HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen eine essentielle Rolle in der Elimination und Kontrolle des HI-Virus. Es wurde gezeigt, dass während der akuten HIV-Infektion das Auftreten HIV-spezifischer zytotoxischer CD4⁺ T-Zellantworten mit einem niedrigen *viral setpoint* und einer verzögerten Krankheitsprogression assoziiert war (29) (50). Der Nachweis, dass Gag-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten aktiv zur Kontrolle der Virämie beitragen, unterstreicht dies (51). Ihre zytotoxische Funktion beläuft sich neben der Eliminierung des Virus auf die Kooperation mit den CD8⁺ T-Zellen (37). So ermöglichen die CD4⁺ T-Lymphozyten das Aufrechterhalten der CD8⁺-Immunantworten. Sichtbar wird dies unter anderem an CD4⁺-defizienten Mäusen, in denen keine effektive antivirale T-Zellantwort stattfinden konnte (52).

Das Charakteristikum der HIV-Infektion ist der massive Verlust der CD4⁺ Zellen in ihrer Anzahl und Funktion im Verlauf der Erkrankung. Die daraus resultierende Reduktion der Funktionalität und Co-Signale der CD4⁺ T-Zellen hat einen kritischen Einfluss auf die Effektivität der CD8⁺ T-Zellantworten in der akuten Phase der HIV-Infektion und führt wiederum zu einer verminderten Kontrolle der HI-Virämie (29) (51).

1.4. Immunerschöpfung

Das charakteristische Kennzeichen der chronischen HIV-Infektion ist die progressive Depletion der CD4⁺-Zellen und die Dysfunktion der T-Zellen. Der Verlust der Effektorfunktionen der T-Zellen, sowie die chronische Immunaktivierung führen im Verlauf der HIV-Infektion zu einer Erschöpfung des Immunsystems und gehen mit einer Progression der Erkrankung einher. Dabei schrieb eine in den vergangenen Jahren intensive Forschung inhibitorischen Molekülen, sog. Immuncheckpoints, und der immunsuppressiv wirkenden Zellsorte MDSC (engl. myeloid-derived suppressor cells) eine bedeutende Rolle in der Entstehung der Immunerschöpfung zu (53) (54) (55).

1.4.1. Immunaktivierung

Die chronische Aktivierung des Immunsystems gilt als der beste prognostische Marker für die Krankheitsprogression (56). Eine Ursache hierfür ist der Untergang der CD4⁺ T-Zellen im Mukosa-assoziierten Gewebe des GI-Trakts, der eine permanente mikrobielle Translokation aus dem Darm in das periphere Blut ermöglicht und dies zu einer HIV verursachten chronischen Immunaktivierung führt (57). Durch die persistierende Aktivierung verlieren die für die Kontrolle des Virus essentiellen HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ihre Effektorfunktionen. Die körpereigene Immunabwehr wird ineffektiv, es kommt zu einer zunehmenden Depletion der CD4⁺ T-Zellen und letztlich zur Erschöpfung des Immunsystems im Kampf gegen das Virus.

Immunologische Marker der Immunaktivierung sind das Oberflächenmolekül CD38 und das MHC Klasse II Molekül HLA-DR. Im Rahmen der HIV-Infektion kommt es zu einer vermehrten Expression von CD38 und HLA-DR sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Lymphozyten. HIV-Infizierte weisen hierbei signifikant höhere Levels als gesunde Kontrollpersonen auf (58). Dabei zeigte sich, dass eine starke T-Zellaktivierung mit einer niedrigen CD4⁺ T-Zellzahl und dem Fortschreiten der HIV-Infektion assoziiert ist (59).

1.4.2. Immuncheckpoints

Immuncheckpoints sind inhibitorische Oberflächenrezeptoren auf Immunzellen, die dem Immunsystem, nach vorangegangener Aktivierung helfen, mittels inhibitorischer Signalwege überschießende und somit schädliche Immunantworten zu limitieren (60). Wenn diese unter physiologischen Bedingungen auf den Immunzellen exprimiert werden, verhindern sie die Entstehung von Autoimmunität, unterstützen die periphere Selbsttoleranz und schränken die T-Zellfunktion ein, um Kollateralschäden zu minimieren (61). Die negative Regulation der T-Zellaktivierung ist demnach essenziell für die Homöostase des Immunsystems. Ein gut beschriebenes inhibitorisches Molekül ist PD-1 (engl. programmed cell death protein 1, auch CD279). Als Mitglied der Immunglobulin-Familie und als immunregulatorischer Rezeptor wird es auf aktivierten B- und T-Zellen sowie myeloiden Zellen exprimiert. Die Interaktion des Rezeptors mit seinen zwei Liganden, PD-L1 und PD-L2, führt zu einer Hemmung der T-Zell-Proliferation und Zytokinsekretion (62). Neben PD-1 vermitteln auch CTLA-4 (engl. cytotoxic T-lymphocyte antigene 4), TIM-3 (engl. T-cell immunoglobulin and mucin domaine containing protein 3) und LAG-3 (engl. lymphocyte activation gene 3 protein) eine negative Regulation der T-Zell-Aktivierung. CTLA-4 interagiert für die Hemmung der zellvermittelten Immunantworten mit CD80 und CD86 (61). TIM-3 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Familie und auf HIV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verstärkt exprimiert (63) (64). LAG-3 gehört ebenfalls zur Immunglobulin-Familie, ist strukturell homolog zum CD4-Rezeptor und bindet MHC-II als Liganden. Seine Expression auf

regulatorischen T-Zellen spielt eine Rolle in der Modulation der T-Zell Homöostase und Effektorzellantwort (65).

Eine pathologische Hochregulation dieser inhibitorischen Moleküle wurde erstmals in Tumorpatienten beschrieben. Es wurde vermutet, dass sie an der Inhibition der zellvermittelten Immunität beteiligt sind. Studien zeigten, dass durch Blockade inhibitorischer Signalwege deren hemmender Effekt auf nützliche Immunantworten im Rahmen der Tumorbekämpfung aufgehoben werden konnte. In einigen Tumorarten (unter anderem Melanom, Lungen-, Blasenkrebs) werden diese Immuncheckpoint-Inhibitoren erfolgreich in der Therapie eingesetzt (66) (67).

Nachdem die Beschreibung der Immuncheckpoints in Tumorpatienten rege Hoffnung aufkommen ließ, wurde die vermehrte Expression des inhibitorischen Moleküls PD-1 auf der Oberfläche HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen beschrieben und mit einem Verlust der Effektorfunktionen der T-Zellen und der damit einhergehenden Immunerschöpfung in Verbindung gebracht (53) (54). Die funktionell geschädigten CD8⁺ T-Zellen hatten eine verminderte Fähigkeit Zytokine zu produzieren und zu proliferieren (53) (54). Letztlich ist die Überexpression an PD-1 mit der Akkumulation HIV-spezifischer dysfunktionaler T-Zellen assoziiert und begünstigt die Krankheitsprogression (68). Eine Blockade des PD1-PDL1 Signalweges stellte die Funktionen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wieder her, steigerte die T-Zellfunktion und Zytokinproduktion und unterdrückte die Viruslast (54).

Neben PD-1 nehmen auch die anderen Immuncheckpoints eine wichtige Stellung in der Entstehung der Immunerschöpfung in der HIV-Infektion ein. So beschrieben Tian *et al.* einen signifikanten Anstieg der LAG-3 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Rahmen der chronischen HIV-Infektion (69). Der Beginn einer ART sowie die Blockade von LAG-3 reduzierten deren Level und ließen die HIV-spezifischen T-Zellantworten steigen. Zusätzlich wurde eine Korrelation der LAG-3 Überexpression mit einem Fortschreiten der HIV-Krankheit beschrieben (69).

Nachdem wichtige Erkenntnisse zur Rolle der Immuncheckpoints in der chronischen HIV-Infektion gewonnen wurden, gaben neuere Studien Hinweise darauf, dass bereits eine hohe Expression der Immuncheckpoints während der akuten HIV-Infektion mit einem schnelleren Fortschreiten der Krankheit assoziiert ist (70). Patienten, deren ART während der akuten HIV-Infektion abgebrochen wurde, zeigten bei niedriger anfänglicher Immuncheckpoint-Expression eine längere Zeit bis zum Rezidiv (71). So scheint es, dass die Immunregulationssysteme an der frühen Pathogenese der HIV-Infektion maßgeblich beteiligt sind und dass ihre Beteiligung Auswirkungen auf den langfristigen klinischen Verlauf der Krankheit hat (71).

1.4.3. Myeloide Suppressorzellen (MDSC)

MDSC (engl. myeloid-derived suppressor cells) wurden als eine, aus dem Knochenmark stammende Zellpopulation beschrieben, die suppressive Funktion auf das Immunsystem von Patienten mit Tumoren hat (52). Diese Zellen wurden zunächst als *natural suppressor cells* (NSC) bezeichnet.

MDSC sind eine heterogene Zellpopulation, die aus myeloiden Vorläuferzellen und unreifen myeloiden Zellen besteht. In gesunden Individuen differenzieren sich die unreifen myeloiden Zellen rasch in Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten weiter. Die physiologische Funktion der MDSC ist die Hemmung der Immunantwort durch Inhibition der T-Lymphozyten. So wird das Immunsystem nach vorangegangener Aktivierung in seine Homöostase zurückgebracht und exzessive, autoimmune Prozesse werden vermieden (55). Die immunsuppressive Aktivität der MDSC ist mit einer erhöhten Expression immunsuppressiver Mediatoren wie Arginase 1, NO-Synthase und einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) assoziiert (72). Unterteilt werden die MDSC in zwei Subgruppen, die monozytären MDSC (M-MDSC) und polymorph-nukleären MDSC (PMN-MDSC). Charakterisiert werden diese durch Oberflächenmarker, wobei M-MDSC als CD11b⁺ CD14⁻ CD33⁺ HLA-DR^{low/-} Zellen und PMN-MDSC als CD11b⁺ CD14⁻ CD66⁺ CD15⁺ Zellen definiert sind (72) (73).

Unter speziellen pathologischen Bedingungen, wie Tumorgenese, Entzündungen und Infektionen, expandieren die MDSC in ihrer Anzahl und akkumulieren als unreife myeloide Zellen im Blut des Patienten (74). Diese Zellen weichen vom Standardweg der Differenzierung ab und unterscheiden sich von den reifen, terminal differenzierten myeloiden Zellen bezüglich ihrer Phänotypen und funktionellen Eigenschaften (73). Dabei wurden MDSC in verschiedenen Studien in Patienten mit soliden Tumoren gefunden: z.B. nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Melanom, hepatozelluläres Karzinom und GI-Tumore (75). Vollbrecht *et al.* zeigten erstmals die Vermehrung der PMN-MDSC in chronisch HIV-Infizierten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Bei HIV-Infizierten ohne ART wurde gezeigt, dass eine hohe PMN-MDSC-Frequenz mit einer hohen Viruslast und einer niedrigen CD4⁺-Zellzahl korreliert. Der Beginn einer ART in diesen Patienten führte zu einem Absinken der PMN-MDSC-Frequenzen (76). Ebenso wurde ein erhöhtes Level an M-MDSC in der chronischen, unbehandelten HIV-Infektion nachgewiesen. So zeigte sich *in vitro*, dass M-MDSC die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellproliferation hemmen und deren Expansion die T-Zellfunktion in HIV seropositiven Individuen dämpft (55). Es wird angenommen, dass immunsuppressive Zellen eine wichtige Stellung in der Entstehung der Immunschwäche und der Krankheitsprogression der HIV-Infektion einnehmen.

Im Affenmodell zeigte eine Studie den Anstieg der MDSC Frequenz in der akuten Phase der SIV-Infektion im Vergleich zu den MDSC-Werten vor der Infektion (77). Schließlich wurde auch in menschlichen Probanden eine erhöhte PMN-MDSC Frequenz in Patienten mit einer akuten

HIV-Infektion, verglichen mit gesunden Kontrollen, nachgewiesen (78). Zusätzlich wurde die Interaktion der MDSC mit anderen Immunzellen, vor allem den regulatorische T-Zellen (Tregs) beschrieben. Vollbrecht *et al.* zeigte einen signifikanten Anstieg der Treg-Häufigkeiten nach Ko-Inkubation mit MDSC (76). Allerdings ist der Regelkreis der Inhibition zwischen MDSC und T-Zellantworten in HIV-Patienten bis dato nicht abschließend geklärt.

Die Immunerschöpfung behindert somit die CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen in ihrer Funktion. Sowohl die vermehrte Expression der Immuncheckpoints als auch die erhöhte Präsenz der MDSC sind hierbei mit der Schädigung des Immunsystems und der Entstehung des Immunversagens im Kampf gegen das Virus assoziiert.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Seit der Entdeckung des HI-Virus durch Barré-Sinoussi und Montagnier kam es in den vergangenen Jahren zu einer massiven Kenntnissteigerung bezüglich der Replikation, dem Verlauf und der Therapie der HIV-Infektion. Trotz intensiver Forschung, liegt auch heute noch kein Impfstoff oder gar eine Heilungsmöglichkeit vor. Um die Heilung der HIV-Infektion zu ermöglichen, ist ein profundes Wissen über die Mechanismen, die zur Etablierung einer persistierenden HIV-Infektion beitragen von essenzieller Relevanz. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die immunregulatorischen Mechanismen in der akuten HIV-Infektion zu erforschen und den Einfluss einer früh beginnenden Therapie auf das Immunsystem zu erfassen. Dieses Projekt untersucht, im Rahmen der TOP-HIV-Studie des Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF), akut HIV-1 infizierte Probanden und ermöglicht so die Erforschung und das bessere Verständnis der Beziehung zwischen der Immuncheckpoint-Expression auf (HIV-spezifischen) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und den MDSC-Frequenzen in der akuten Phase der Erkrankung. Hierbei werden folgende Fragen bearbeitet:

1. Haben akut infizierte HIV-Patienten erhöhte PMN-MDSC und M-MDSC-Level im Vergleich zu gesunden und retrospektiven Kontrollen? Wie verändert sich die Kinetik der MDSC nach Beginn einer antiretroviralen Therapie?
2. Sind die inhibitorischen Moleküle auf (HIV-spezifischen) CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten in der akuten Phase der Infektion erhöht? Wie verändert sich die Kinetik der Immuncheckpoints nach Beginn einer antiretroviralen Therapie?
3. Korrelieren MDSC mit der Immuncheckpoint-Expression auf T-Zellen, der T-Zellaktivierung und den HIV-spezifischen T-Zellantworten in der akuten HIV-Infektion?

Immuncheckpoints und MDSC sind regulatorische Komponenten des Immunsystems, deren Charakteristika es in der akuten Phase der HIV-Infektion zu verstehen gilt. Die vorliegende Studie soll ein besseres Verständnis für die immunologischen Ereignisse in der akuten HIV-Infektion liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Labormaterial

Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Sterilwerkbank Safe 2010 Modell 1.2	Heto-Holten
Sterilwerkbank Model Labgard 437	NuAire
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Zellzählsystem, CASY TT	Schärfe-System
Durchflusszytometer, FACS-Calibur	BD
Durchflusszytometer, FACS-Fortessa	BD
Heizwasserbad 1083	GFL
Inkubationsschrank	Heraeus
Mikroskop Dialux 20 EB	Leitz
Serologische Einmalpipette 5 ml / 10 ml	TPP
Zentrifugenröhrchen 15 ml / 50 ml	TPP
FACS-Röhrchen	BD oder becton dickinson
Freezing-Container Mr. Frosty	Nalgene
Nunc-Kryotubes 1,8 ml	Thermo Scientific
Vortexgerät, Vortex-Genie 2	IKA Werke

Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2. Reagenzien und Chemikalien

Produkt	Hersteller
Biocoll (Ficoll)	Biochrom
Brefeldin A	Sigma Aldrich
Fix Perm Medium A	Invitrogen
DMSO	Merck KGaA
Dulbecco`s PBS	Sigma-Aldrich
FCS	PAA
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Hepes buffer solution	PAA
Hanks Grundmedium	Biochrom
RPMI1640 Grundmedium	Biochrom

Medien

Tabelle 3. Medien

Hanks		R10	
<i>Hanks Grundmedium (Biochrom)</i>		<i>RPMI1640 Grundmedium (Biochrom)</i>	
200 mM	L-Glutamin	200 mM	L-Glutamin
5 mg/ml	Penicillin	5 mg/ml	Penicillin
5 mg/ml	Streptomycin	5 mg/ml	Streptomycin
20 mM	HEPES, pH 7.5	20 mM	HEPES, pH 7.5
		50 ml/l	FCS

Antikörper

Tabelle 4. MDSC-Antikörper für das FACS-Gerät Calibur

Target	Fluorochrom	Hersteller	µl/10⁶ Zellen	Färbung
CD11b	FITC	BioLegend	3,0	extrazellulär
CD14	APC	BioLegend	3,0	extrazellulär
CD15	PerCP	BioLegend	3,0	extrazellulär
CD33	PE	BioLegend	1,0	extrazellulär
CD66	PE	BioLegend	3,0	extrazellulär
Iso	PerCP	BioLegend	2,0	extrazellulär
HLA-DR	PerCP	BioLegend	2,0	extrazellulär

Tabelle 5. T-Zell-Antikörper für das FACS-Gerät Fortessa

Target	Fluorochrom	Klasse	Klon	Hersteller	µl/10⁶ Zellen	Färbung
CD3	BV510	Linie	OKT3	BioLegend	1,0	extrazellulär
CD4	PE-Cy7	Linie	OKT4	BioLegend	1,0	extrazellulär
CD8	AF700	Linie	HIT8a	BioLegend	2,0	extrazellulär
CD38	BV421	Aktivierung	HIT2	BioLegend	2,0	extrazellulär
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	Aktivierung	L243	BioLegend	3,0	extrazellulär
Viabilität	ZombieNIR	Viabilität	MR91	BioLegend	0,5	extrazellulär
CD27	BV650	Immuncheckpoint	O323	BioLegend	1,5	extrazellulär
PD-1	PE	Immuncheckpoint	EH12.2.H7	BioLegend	1,5	extrazellulär
TIM-3	BV711	Immuncheckpoint	F38-2E2	BioLegend	2,0	extrazellulär
LAG-3	AF647	Immuncheckpoint	11C3C65	BioLegend	2,0	extrazellulär
CTLA-4	PE/Dazzle	Immuncheckpoint	L3D10	BioLegend	1,5	intrazellulär
Ki67	AF488	Proliferation	Ki67	BioLegend	1,5	intrazellulär
IFN-γ	BUV395	Aktivierung	B27	Becton Dickinson	5,0	intrazellulär

2.1. Methoden

2.1.1. TOP-HIV Studienteilnehmer

Das Projekt „Immunregulatorische Mechanismen in der akuten HIV-Infektion“ wird im Rahmen der TopHIV-Studie (engl. treatment of primary HIV-infection) des DZIF durchgeführt. Diese gehört zur Translationalen Plattform HIV des DZIF. Das Ziel der TopHIV-Studie ist der Aufbau einer HIV-Kohorte akut infizierter HIV-Patienten, welche als Zielgruppe für neue klinische Ansätze zur HIV Remission und Heilung im DZIF gilt. Hierfür wurden in Zusammenarbeit mit den Münchner Zentren Isarpraxis, MVZ Karlsplatz, Prinzmed, ZIMI, TU München und der Klinischen Infektiologie der Medizinischen Klinik IV des LMU Klinikums akut infizierte Patienten rekrutiert. Die Einschlusskriterien für diese prospektive Kohorte sind neben der Volljährigkeit und Einwilligung der Patienten die Diagnose „akute, therapienaive HIV-Infektion im Fiebig Stadium I-V“ (Abbildung 6). Das Blut der Probanden wurde zu drei Studienzeitpunkten Woche 0, 4 und 12 untersucht. Es handelt sich um eine Interventionsstudie, bei der der Beginn einer cART-Therapie (engl. combined ART) unmittelbar nach der Diagnose angesetzt wurde. Chronische HIV-Patienten, deren Infektion in den Fiebig Stadien I-V diagnostiziert und die unmittelbar in den ersten Wochen nach Diagnose mit einer cART behandelt wurden, bilden die retrospektive Kohorte der TopHIV-Studie. Als Kontrolle wurden zusätzlich 20 gesunde, HIV-negative Probanden herangezogen, die mindestens 18 Jahre alt sowie jeweils zur Hälfte männlichen und weiblichen Geschlechts waren. Den Probanden wurde nach Einwilligung zu jeder Studienvisite etwa 50 ml Blut abgenommen.

Tabelle 6. Anzahl der Studienteilnehmer und Proben. Die prospektive Kohorte bilden 16 akut HIV-infizierte Probanden, deren Blut vor Therapiebeginn (Woche 0) und nach Beginn einer ART (Woche 4 und 12) untersucht wurde. Die retrospektive Kohorte bilden 19 chronisch HIV-infizierte Probanden, deren Blut in der Dauertherapiephase unter ART abgenommen wurde. Als Kontrolle wurde das Blut 20 gesunder Probanden untersucht.

Gruppe	Gesamt	Woche 0	Woche 4	Woche 12
Prospektiv	16	16	14	16
Retrospektiv	19	19	0	0
Gesund	20			

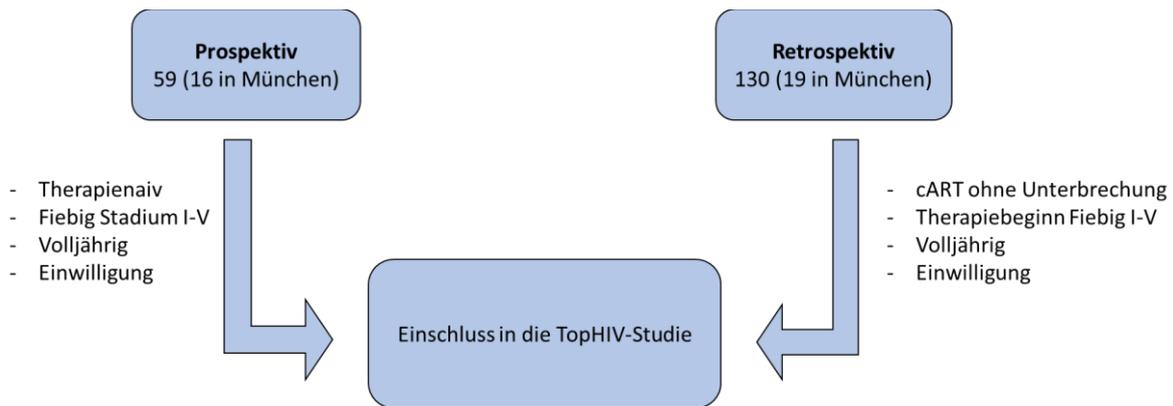


Abbildung 6. Kohorten der TopHIV-Studie und deren Einschlusskriterien. Die TopHIV-Studie des DZIF setzt sich aus einem prospektiven Arm mit 16 HIV-1 akut infizierten, therapienaiven Probanden (Fiebig-Stadium I-V) und 19 rekrutierten, retrospektiven Kontrollen, deren Infektion ohne Unterbrechung und mit Beginn in den Fiebig-Stadien I-V therapiert wurde, zusammen.

2.1.2. PBMC-Isolierung

Lymphozyten und Monozyten werden in ihrer Gesamtheit als periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) bezeichnet. Zur Isolierung der PBMCs wurde Vollblut des Patienten in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt (je zwei 8 ml EDTA-Röhrchen pro Zentrifugenröhrchen) und auf 20 ml mit Hanks Medium aufgefüllt. Anschließend wurde es mit Ficoll unterschichtet und zentrifugiert (30 min, 1500 rpm, RT). Aufgrund der Dichteigenschaft des Ficolls und der Blutzellen pelletieren Granulozyten und Erythrozyten, während das Plasma mit Thrombozyten einen Überstand bildet. In der Phase zwischen Plasma und Ficoll reichern sich die PBMCs an (Abbildung 7). Diese Phase wurde mit einer serologischen Einmalpipette in ein weiteres 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Isolierung folgten drei Waschgänge. Hierfür wurde das Zentrifugenröhrchen mit den darin enthaltenen PBMCs mit Hanks Medium auf 45 ml aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 1500 rpm, RT). Der Überstand wurde jeweils abgenommen und das Zellpellet vor dem nächsten Waschvorgang vorsichtig resuspendiert. Schließlich wurde das Zellpellet in 10 ml (5 ml/EDTA-Röhrchen) R10-Medium aufgenommen.

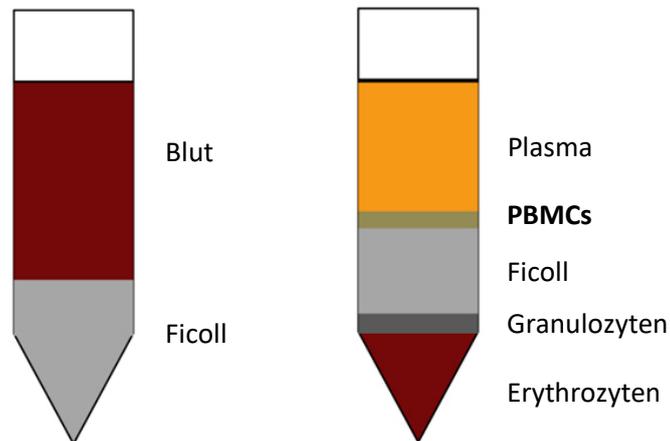


Abbildung 7. PBMC-Isolierung mittels Ficoll vor (links) und nach (rechts) Zentrifugation (79). Das Vollblut des Probanden wurde mit Ficoll unterschichtet und mit Hilfe der Dichtezentrifugation in seine unterschiedlichen Zellpopulationen aufgetrennt. Im Überstand befinden sich nach Zentrifugation die Thrombozyten und das Plasma, das Pellet hingegen wird von den Erythrozyten und Granulozyten gebildet. Die PBMCs, bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, sammeln sich in der Interphase an.

2.1.3. Automatisierte Zellzählung

Die Ermittlung der Anzahl der isolierten PBMCs erfolgte mit Hilfe eines Zellzählgerätes. 50 µl der Zellsuspension wurden mit 10 ml isotonischem Messpuffer (CASY-Ton), gemischt und anschließend gemessen. Das Gerät aspiriert die Suspension in eine Messkapillare und scannt die Zellen zwischen zwei Platinelektroden in einem elektrischen Spannungsfeld. Die entstandenen elektrischen Signale wurden analysiert und die Zelldichte der Zellen in Zellzahl pro ml angegeben. Im weiteren Verlauf des Versuches wurde mit drei Millionen Zellen ein Ansatz für die anschließende Messung am FACS-Gerät (Kapitel 2.1.9.1) erstellt, der Rest der verbleibenden Zellen wurde kryokonserviert (Kapitel 2.1.4).

2.1.4. Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung der PBMCs wurde eine Einfrierlösung (90 % FCS, 10 % DMSO) hergestellt. Währenddessen zentrifugierte die Zellsuspension (10 min, 1500 rpm, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in der Einfrierlösung suspendiert und die gewünschte Menge in die Kryotubes aliquotiert. Diese Schritte erfolgten zügig, da DMSO zytotoxisch wirkt. Die Kryotubes wurden über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80 °C in einem Laborgefrierschrank gelagert, um sie am nächsten Tag in den Stickstofftank zu überführen. Hier wurden die Zellen bei -196 °C langfristig aufbewahrt.

2.1.5. Auftauen von Zellen

Die aufzutauenden Kryotubes wurden im Wasserbad bei 37 °C angetaut. Nun folgte das Überführen der Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt mit 10 ml R10 und anschließender Zentrifugation (10 min, 1500 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml R10 Medium

suspendiert. Schließlich folgte eine Bestimmung der Zellviabilität unter dem Mikroskop (Kapitel 2.1.6) und eine Messung der Zellzahl im Zellzählgerät.

2.1.6. Bestimmung der Zellviabilität mit Trypanblau

Um die Zellviabilität nach dem Auftauen zu bestimmen, wurde 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau gemischt und in die Zählkammer eingefüllt. Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, wohingegen sich tote Zellen dunkelblau anfärben und so unter dem Mikroskop unterscheidbar sind. Nach Auszählen der lebenden und toten Zellen wurde die prozentuale Viabilität nach dem Auftauen mit Formel 1 berechnet.

$$\text{Viabilität} = \frac{n(\text{Lebende Zellen})}{n(\text{Gesamtzellen})} \cdot 100 \% \quad \text{Formel 1}$$

2.1.7. Peptide

Zur Erfassung der HIV-peptidspezifischen T-Zellantworten wurden die HIV-Peptide Gag, Nef, Rev und Tat verwendet. Bezogen wurden die Peptide von National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Potters Bar, England). Es wurde ein Peptidpool mit Gag und ein weiterer Peptidpool mit NEF/REV/Tat verwendet.

2.1.7.1. Gag-Peptide

Tabelle 7. Auflistung der Gag-Peptide

Gag-p17

Peptidname	Sequenz
ARP703.1	MGARASVLSSGGELDK
ARP703.2	GELDKWEKIRLRPGG
ARP703.3	LRPGGKKKYKLVHIV
ARP703.4	LKHIVWASRELERFA
ARP703.5	LERFAVNPGLLETSE
ARP703.6	LETSEGCRQILGQLQ
ARP703.7	LGQLQPSLQTGSEEL
ARP703.8	GSEELRSYNTVATL
ARP703.9	TVATLYCVHQRIDVK
ARP703.10	RIDVKDTKEALEKIE
ARP703.11	LEKIEEEQNKSKKKA
ARP703.12	SKKKAQQAAAAAGTG
ARP703.13	AAGTGNSSQVSQNY

Gag-p24

Peptidname	Sequenz
ARP788.1	PIVQNLQGQMVHQAIISPRTL
ARP788.2	VHQAIISPRTLNAWVKVVEEK
ARP788.3	NAWVKVVEEKAFSPEVIPMF
ARP788.4	AFSPEVIPMFSALSEGATPQ
ARP788.5	SALSEGATPQDLNTMLNTVG
ARP788.6	DLNTMLNTVGGHQAAMQMLK
ARP788.7	GHQAAMQMLKETINEEAAEW
ARP788.8	ETINEEAAEWDRVHPVHAGP
ARP788.9	DRVHPVHAGPIAPGQMREPR
ARP788.10	IAPGQMREPRGSDIAGTTST
ARP788.11	GSDIAGTTSTLQEQIGWMTN
ARP788.12	LQEQIGWMTNPPPIVGEIY
ARP788.13	NPPPIVGEIYKRWIILGLNK
ARP788.14	KRWIILGLNKIVRMYSPTSI
ARP788.15	IVRMYSPTSILDIRQGPKEP
ARP788.16	LDIRQGPKEPFRDYVDRFYK
ARP788.17	FRDYVDRFYKTLRAEQASQD
ARP788.18	TLRAEQASQDVKNWMTETLL
ARP788.19	VKNWMTETLLVQANPDCKT
ARP788.20	VQANPDCKTILKALGPAAT
ARP788.21	ILKALGPAATLEEMMTACQG
ARP788.22	LEEMMTACQGVGGPGHKARV

Gag-p15

Peptidname	Sequenz
ARP704.1	AEAMSQVTNPANIMM
ARP704.2	ANIMMQRGNFRNQRK
ARP704.3	RNQRKTVKCFNCGKE
ARP704.4	NCGKEGHIAKNCRAP
ARP704.5	NCRAPRKKGCWRCGR
ARP704.6	WRCGREGHQMKDCTE
ARP704.7	KDCTERQANFLGKIW
ARP704.8	LGKIWPSYKGRPGNF
ARP704.9	RPGNFLOSRPEPTAPPE
ARP704.10	EPTAPPEESFRFGEE
ARP704.11	RFGEEKTPPQKQEPI
ARP704.12	QKQEPIDKELYPLTS
ARP704.13	YPLTSLRSLFGNDPSSQ

Für die Herstellung des Gag-Pools wurden 20 µl eines jeden der 48 Peptide (5 mg/ml) in 1000 µl Hanks Medium gelöst, die Endkonzentration betrug somit 100 µg/ml. Für die Stimulation wurden jeweils 20 µl des Gag-Pools hinzugegeben, um im Well eine Peptid-Konzentration von 2 µg/ml zu erreichen.

2.1.7.2. Nef-Rev-Tat-Peptide

Tabelle 8. Auflistung der Nef-Peptide

Peptidname	Sequenz
ARP7074.1	GGKWSKSSVVGWPTVRERMR
ARP7074.2	GWPTVRERMRAEPAADGVG
ARP7074.3	RAEPAADGVGAASRDLEKHG
ARP7074.4	AASRDLEKHGAISSNTAAT
ARP7074.5	AITSSNTAATNAACAWLEAQ
ARP7074.6	NAACAWLEAQEEEEVGFPVT
ARP7074.7	EEEEVGFPVTPQVPLRPMTY
ARP7074.8	PQVPLRPMTYKAAVDLSHFL
ARP7074.9	KAAVDLSHFLKEKGGLEGLI
ARP7074.10	KEKGGLEGLIHSQRRQDILD
ARP7074.11	HSQRRQDILDLWIYHTQGYF
ARP7074.12	LWIYHTQGYFPDWQNYTPGP
ARP7074.13	PDWQNYTPGPVRYPLTFGW
ARP7074.14	GVRYPPLTFGWICYKLVPEPD
ARP7074.15	CYKLVPEPDKVEEANKGEN
ARP7074.16	KVEEANKGENTSLLHPVSLH
ARP7074.17	TLLHPVSLHGMDDPEREVL
ARP7074.18	GMDDPEREVLEWRFDRLAF
ARP7074.19	EWRFDRSLAFHHVARELHPE
ARP7074.20	HHVARELHPEYFKNC

Tabelle 9: Auflistung der Rev-Peptide

Peptidname	Sequenz
EVA780.1	AGRSGDSDDED
EVA780.2	LLKAVRLIKF
EVA780.3	LYQSNPPPNP
EVA780.4	EGTRQARRNR
EVA780.5	RRRWRRERQRQ
EVA780.6	IHSISERILS
EVA780.7	TYLGRSAEPV
EVA780.8	PLQLPPLERL
EVA780.9	TLDCNEDCGT
EVA780.10	SGTQGVGSPQ
EVA780.11	ILVESPTVLESQTKE

Tabelle 10. Auflistung der Tat-Peptide

Peptidname	Sequenz
EVA779.1	EPVDPRLEPWKHPGSQPKTA
EVA779.2	KHPGSQPKTACTTCYCKKCC
EVA779.3	CTTCYCKKCCFHCQVCFTTK
EVA779.4	FHCQVCFTTKALGISYGRKK
EVA779.5	ALGISYGRKKRRQRRRPPQG
EVA779.6	RRQRRRPPQGSQTHQVLSK
EVA779.7	SQTHQVLSKQPTSQPRGD
EVA779.8	QPTSQPRGDPTGPKE

2.1.8. Stimulation der Zellen

Die Zellen wurden am Vorabend aus dem Stickstoff aufgetaut, ihre Anzahl mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY ermittelt und 1×10^6 PBMC in 1 ml R10 Medium pro Well in eine 24 Well-Platte aliquotiert (Abbildung 8). Dabei ergaben sich für jeden Patienten je zwei Wells für die Gag und NRT Stimulation, sowie zwei Wells für die FMO (engl. fluorescence minus one) und eines für die ungefärbte Kontrolle. Anschließend ruhten die Zellen 12 h über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator. Es folgte die Zugabe von 20 µl der Peptidpools Gag und Nef/Rev/Tat in das jeweilige Well, um die HIV-peptidspezifische T-Zellantworten anhand der IFN-γ Konzentration zu messen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden 10 µl Brefeldin A, ein Inhibitor des Proteinexports, hinzugegeben und die Zellen weitere 5 h inkubiert. Im Anschluss wurde die T-Zell-Färbung für das FACS-Gerät Fortessa angesetzt (Kapitel 2.1.9.3).

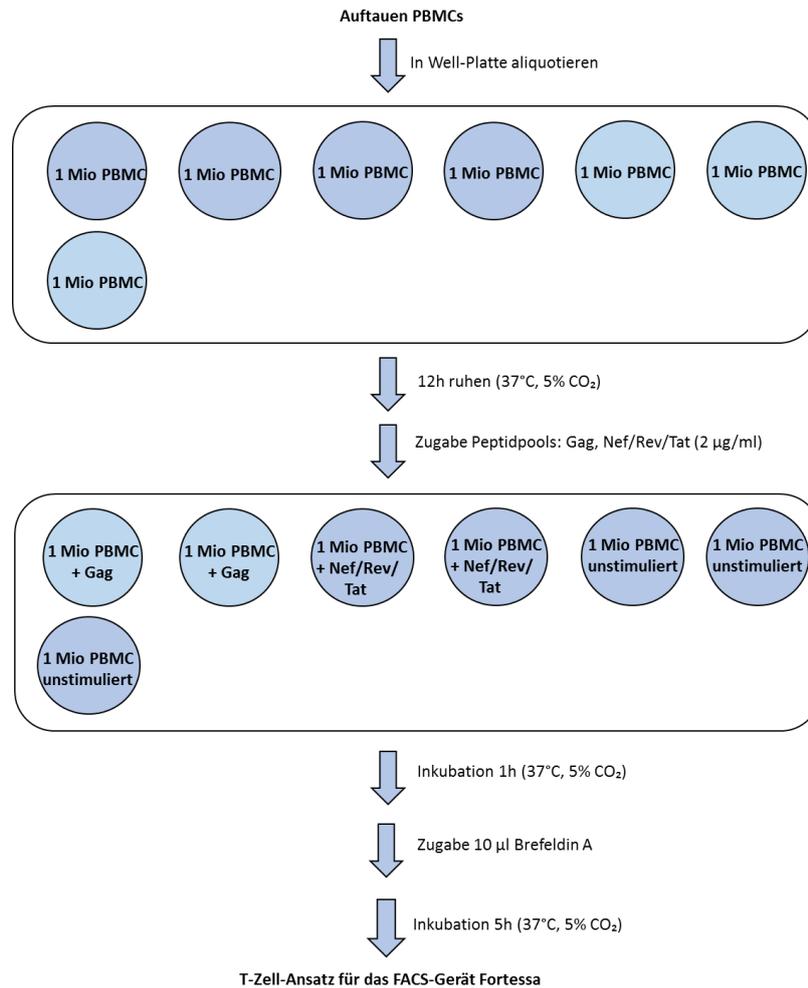


Abbildung 8. Schematische Darstellung des Stimulationsablaufes der Zellen. Nach dem Auftauen der gewünschten PBMCs und der Aliquotierung von 10^6 PBMC pro Well wurde nach einer Ruhezeit von 12 h die Peptidpools Gag und Nef/Rev/Tat (20 µl) hinzugegeben und 1 h inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 10 µl Brefeldin A mit einer weiteren Inkubation von 5h und anschließendem Protokoll für das FACS-Gerät Fortessa.

2.1.9. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS; engl. fluorescence-activated cell sorting) analysiert Eigenschaften von Zellen und charakterisiert Zellpopulationen. Das hier zu Grunde liegende Prinzip ist die Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern an Zellen, deren Lichtsignale nach Bestrahlung mit drei (FACS-Gerät Calibur) bis fünf (FACS-Gerät Fortessa) Lasern emittiert und in Korrelation zur Expression extra- und intrazellulärer Proteine der Zellen gebracht werden. Die gemessene Intensität ist unter optimalen Bedingungen proportional zur gemessenen Antigen-Menge.

2.1.9.1. MDSC-Ansatz für das FACS-Gerät Calibur

Nachdem die Zellzahl der frisch isolierten PBMCs bestimmt wurde, erfolgte nun mit 3×10^6 der Zellen der Ansatz für die Messung der MDSCs am FACS-Gerät Calibur. Für den Ansatz wurden die Zellen in drei FACS-Tubes à 10^6 Zellen aliquotiert und anschließend mit je 2 ml PBS + 1 % FCS gewaschen. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgekippt (10 min, 1500 rpm, RT). Nun folgte die Zugabe

von 50 µl PBS und die Färbung der MDSCs mit den entsprechenden Antikörpern (Tabelle 4), die anschließend inkubierten (30 min, 4 °C). Die Proben wurden erneut in je 2 ml reinem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 100 µl Fix Perm A fixiert, um die Antigen-Antikörper-Bindungen zu stabilisieren. Die Zellen wurde im Dunkeln inkubiert (15 min, RT), 2x gewaschen und schließlich in 200 µl PBS aufgenommen.

2.1.9.2. Analyse am FACS-Gerät Calibur und Auswertung

Die Messung der MDSC-Anzahl erfolgte am FACS-Gerät Calibur mit der Software BD Cell Quest Pro Version 6.0. Die Daten wurden anschließend mit der Software FlowJo Version 7.2.1 ausgewertet. Die Zellpopulationen wurden graphisch in einem Dot-Plot nach Größe (FSC, engl. forward scatter, Vorwärtsstreuung) und Granularität (SSC, engl. side scatter, Seitwärtsstreuung) dargestellt. Für das Erfassen der prozentualen PMN-MDSC-Zahl wurde zunächst ein Gate um die Monozyten gelegt, um anschließend auf ihre Oberflächeneigenschaften CD11b⁺ CD14⁻ und CD15⁺ CD66⁺ zu gaten. Die Zellen mit allen vier Charakteristika waren PMN-MDSC (Abbildung 2, A). Um nun auch die Anzahl der M-MDSC zu ermitteln, wurden sowohl um die Lymphozyten als auch um die Monozyten das Gate *P1* gezogen. Mit Hilfe einer Isokontrolle (Isotyp-AK) wurde die HLA-DR Negativität definiert und das Gate in den letzten Dot-Plot kopiert. Bei den sich hier befindenden HLA-DR⁻, CD33⁺ Zellen handelte es sich um die gesuchten M-MDSC.

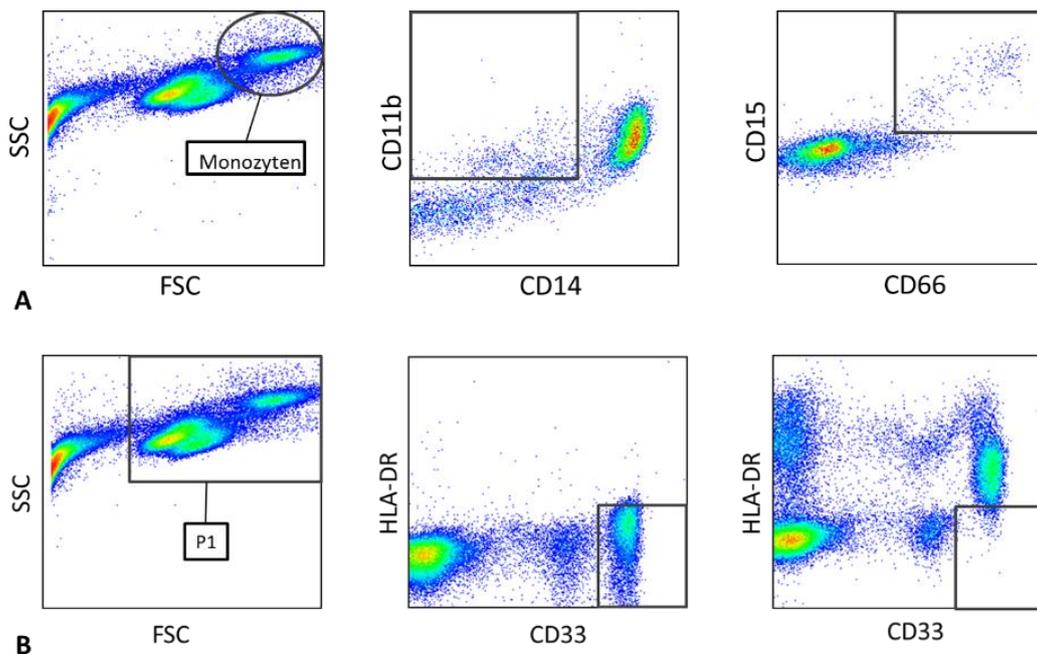


Abbildung 9. Beispielhafte Auswertung der Messung am FACS-Gerät Calibur. Darstellung der einzelnen Schritte der Analyse der PMN-MDSC (A) und M-MDSC (B). (A): Im Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (FSC-SSC) wurde die Monozytenpopulation erfasst und anschließend auf die Oberflächeneigenschaften CD11b⁺, CD14⁻, CD15⁺ und CD66⁺ der PMN-MDSC gegatet. (B): Zur Ermittlung der M-MDSC wurde nach anfänglicher Auswahl der Lymphozyten und Monozyten (*P1*) mit Hilfe einer HLA-DR Isokontrolle auf HLA-DR⁻, CD33⁺ Zellen gegatet.

2.1.9.3. T-Zell-Ansatz für das FACS-Gerät Fortessa

Zur Messung des Expressionsprofils der T-Zellen mit dem FACS-Gerät Fortessa wurden die Zellen nach Stimulation mit den HIV-Peptiden aus der 24 Well-Platte in die FACS-Tubes übergeben. Anschließend folgte ein Waschgang der Zellen mit 2 ml PBS + 1 % FCS, ein Zentrifugationsschritt (5 min, 1500 rpm, RT) und das Abkippen des Überstandes. Nun wurden alle extrazellulär zu färbenden Antikörper des Panels in die FACS-Tubes der Gag und NRT stimulierten Zellen gegeben (Tabelle 5). Als Negativkontrolle für die spätere Auswertung wurde eine FMO verwendet, deren Zellen mit allen Markern – ausgeschlossen die Immuncheckpoints – gefärbt wurden. Nach der Inkubation im Dunkeln (30 min, RT) folgte der nächste Waschvorgang mit 2 ml PBS + 1 % FCS. Für die intrazelluläre Färbung der T-Zellen wurden diese mit Hilfe des FoxP3 *staining buffer sets* fixiert und permeabilisiert. Hierfür wurden zwei Puffer, der Fixation/Permeabilisationspuffer Diluent und Konzentrat im Verhältnis 3:1 und der Permeabilisationspuffer mit Wasser im Verhältnis 1:10 hergestellt. Nach dem vorangegangenen Waschvorgang wurde je 1 ml Fixation/Permeabilisationspuffer hinzugegeben und inkubiert (30 min, RT). Die Permeabilisation der Zellen erfolgte anschließend mit je 2 ml des hergestellten Permeabilisationspuffers. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, RT) und mit den intrazellulären Antikörpern gefärbt (Tabelle 5). Nach 30-minütigem Inkubieren erfolgte erneut eine Zugabe von je 2 ml Permeabilisationspuffer mit anschließender Zentrifugation und einem letzten Waschvorgang mit 2 ml PBS + 1 % FCS. Schließlich wurden die Zellen in jedes Tube 300 µl PBS suspendiert.

2.1.9.4. Analyse am FACS-Gerät Fortessa und Auswertung

Die Messungen erfolgten an dem Durchflusszytometer FACS Fortessa. Dabei wurden pro Tube 500 000 Ereignisse aufgenommen und mit Hilfe der FACS Diva Version 8.0 erfasst. Die Daten wurden mit der Software FlowJo Version 10 ausgewertet. Nach Darstellung der Zellpopulationen nach Zellgröße und Granularität im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (Forward Scatter – Sideward Scatter; FSC-SSC) wurde die Lymphozytenpopulation gated und anschließend die Dubletten ausgeschlossen (Abbildung 10, A, B). Die lebendigen Zellen konnten durch das live/dead-Gate von den Toten abgegrenzt werden (C). Anschließend wurde ein Gate um die CD3⁺ T-Zellen, dann um die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gesetzt und auf diesen die weiteren zu untersuchenden Marker erfasst (D, E): die Immuncheckpoints PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3; die Immunaktivierungsparameter CD38 und HLA-DR, der Zellproliferationsmarker Ki-67, sowie der die HIV-spezifischen Immunantworten charakterisierende IFN-γ Parameter. Als Negativkontrolle für die Auswertung der Immuncheckpoints wurde die FMO verwendet. Dargestellt ist beispielhaft die Auswertungsstrategie der PD-1 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

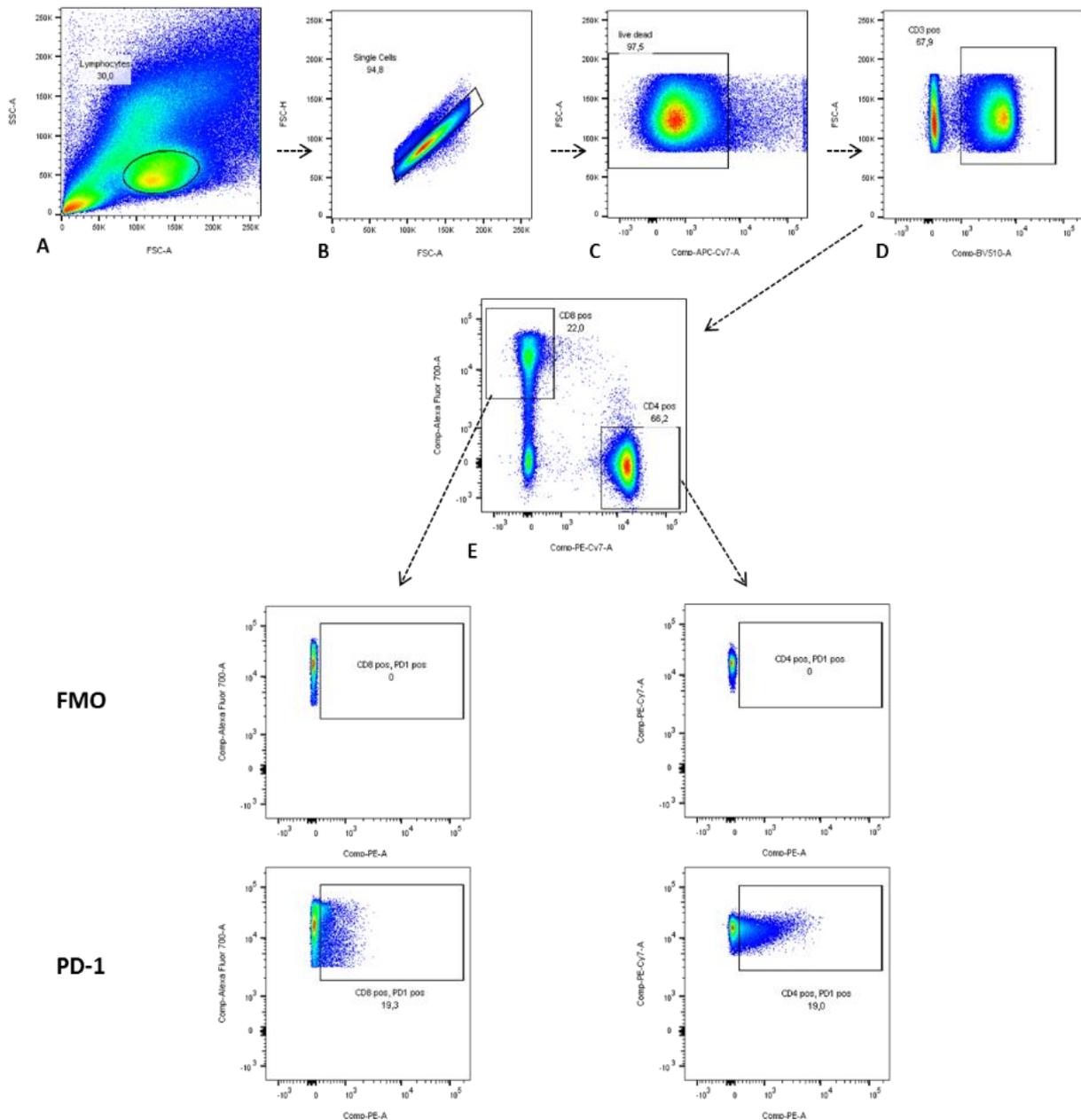


Abbildung 10. Beispielhafte Auswertung der Messung am FACS-Fortessa. Die Abbildung stellt die Auswertungsstrategie der Messung am Beispiel der PD-1 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen dar. Im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC; A) wird ein Gate um die Lymphozytenpopulation gelegt, die Dubletten und toten Zellen ausgeschlossen (B, C) und die CD3⁺ T-Zellen erfasst (D). Jetzt wurde ein Gate um die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gelegt (E) und das in der Negativkontrolle (FMO) gezogene Gate für PD-1 auf die gefärbte Probe kopiert. Diese Auswertung wurde für alle zu erfassenden Parameter vollzogen.

2.2. Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5.0 statistisch erfasst und graphisch dargestellt. Statistische Unterschiede zwischen den Kohorten wurden mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Test, der Vergleich nichtparametrischer Daten innerhalb einer Kohorte wurde mit einem gepaarten Wilcoxon-Rangsummentest ausgewertet. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit dem Spearman Rho-Koeffizienten. Ein P-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die dargestellten Graphen zeigen den Median der Ergebnisse.

3. Ergebnisse

3.1. PMN-MDSC und M-MDSC Level in der akuten HIV-Infektion

Ein erhöhtes Level an PMN-MDSCs und M-MDSCs wurde in der chronischen HIV-Infektion nachgewiesen (55) (76). Bis heute fehlen fundierte Informationen, die erklären in welcher Phase der HIV-Infektion die MDSC expandieren. Neuere Studien wiesen auf eine erhöhte Frequenz der PMN-MDSC bereits in der akuten Phase der HIV-Infektion hin (77) (78).

Um die Relevanz von MDSC in der Pathogenese der primären HIV-Infektion zu identifizieren, untersuchten wir anhand der TopHIV-Studie die Levels der PMN-MDSC und M-MDSC in akut HIV-Infizierten und verglichen diese mit chronisch infizierten und gesunden Kontrollpersonen (Abbildung 11). Es zeigte sich, dass die PMN-MDSC Frequenz in Patienten mit einer therapienaiven akuten HIV-Infektion signifikant höher war als bei gesunden Probanden ($p = 0.008$). Der Vergleich zwischen der prospektiven und retrospektiven Kohorte erreichte keine Signifikanz, es zeigte sich jedoch ein eindeutiger Trend zu höheren PMN-MDSC Levels in der akuten im Vergleich zur therapierten chronischen HIV-Infektion ($p = 0.25$). Bezüglich der M-MDSCs war kein Unterschied in den drei Kohorten messbar.

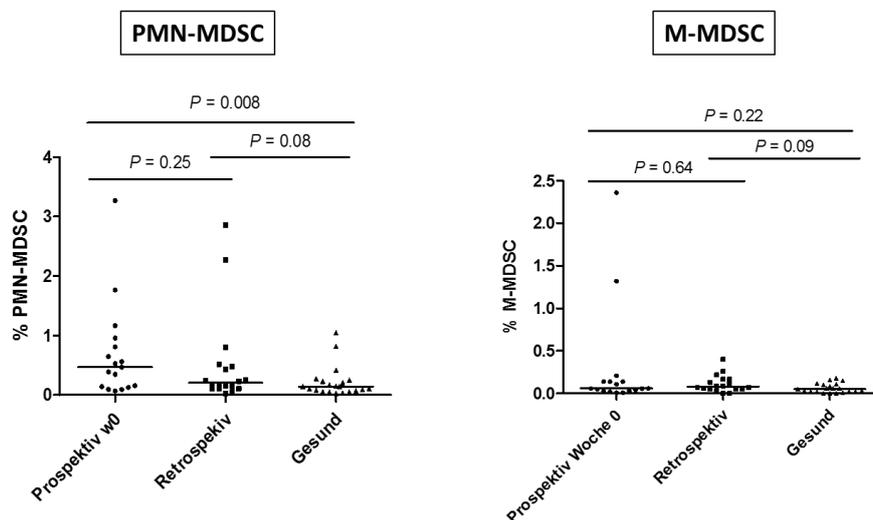


Abbildung 11. PMN-MDSC und M-MDSC Levels der einzelnen Kohorten. Vergleich des PMN-MDSC (links) und M-MDSC (rechts) Levels zwischen akut prospektiven und chronisch retrospektiven HIV-Infizierten, sowie gesunden Probanden.

Nun stellte sich die Frage, welchen Einfluss der Beginn der antiretroviralen Therapie auf die Kinetik der PMN-MDSC Frequenzen hat (Abbildung 12). Bereits 4 Wochen nach der Infektion tendierten die PMN-MDSC unter der Gabe der ART zu niedrigeren Levels als zu Beginn der Infektion. Aus dem Trend entwickelten sich signifikant niedrigere PMN-MDSC-Level aller Patienten 12 Wochen nach der Infektion, die denen gesunder Kontrollen entsprachen ($p = 0.0071$). Bei Betrachtung der M-MDSC setzte sich dieser Trend nicht fort.

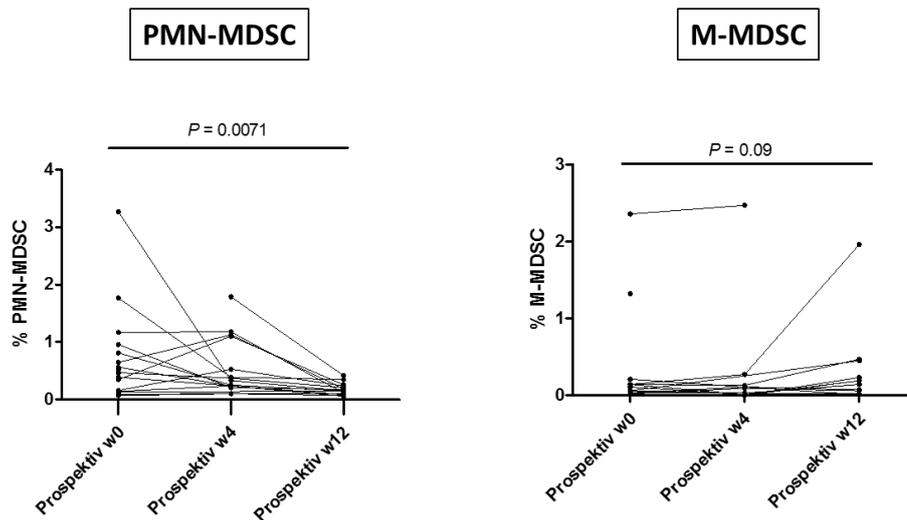


Abbildung 12. Kinetik der PMN-MDSC und M-MDSC Frequenz in der akuten HIV-Infektion unter antiretroviraler Therapie. Vergleich der PMN-MDSC (links) und M-MDSC (rechts) Frequenz in akut HIV-infizierten Probanden vor Beginn der antiretroviralen Therapie (Prospektiv Woche 0) und im Verlauf bis 12 Wochen nach Beginn der Therapie (Prospektiv Woche 12).

Zusammengefasst beschreiben wir eine erhöhte PMN-MDSC Frequenz in akut HIV-infizierten Probanden im Vergleich zur chronisch HIV-infizierten und gesunden Kohorte, die sich in ihrer Zahl durch den Beginn einer antiretroviralen Therapie reduzierte. Für M-MDSC zeigte sich keines der beschriebenen Phänomene.

3.1. Die Immunaktivierungsmarker CD38 und HLA-DR in der akuten HIV-Infektion

Die Immunaktivierung gilt als der beste prognostische Marker für die Krankheitsprogression der HIV-Infektion (56). Deshalb verglichen wir die CD38 und HLA-DR Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in akut HIV-Infizierten mit chronisch HIV-infizierten und gesunden Probanden (Abbildung 13).

Die prospektive Gruppe wies eine signifikant höhere HLA-DR Expression auf CD4⁺ ($p = 0.007$) und CD8⁺ T-Zellen ($p = 0.0008$), sowie eine erhöhte CD38 Expression auf CD8⁺ T-Zellen ($p < 0.0001$) im Vergleich zu gesunden Probanden auf. Es wurden keine signifikanten Unterschiede für die Expression von CD38 auf CD4⁺ T-Zellen beobachtet ($p = 0.56$). Zudem zeigte sich auch in der chronischen HIV-Infektion eine Erhöhung der Immunaktivierungsmarker im Vergleich zur gesunden Kohorte. Signifikanzen ergaben sich für die Expression von CD38 auf CD8⁺ T-Zellen, sowie HLA-DR auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die Höhe dieser Parameter veränderte sich zwischen Woche 0 vor Therapie und 12 Wochen nach Therapiebeginn nicht.

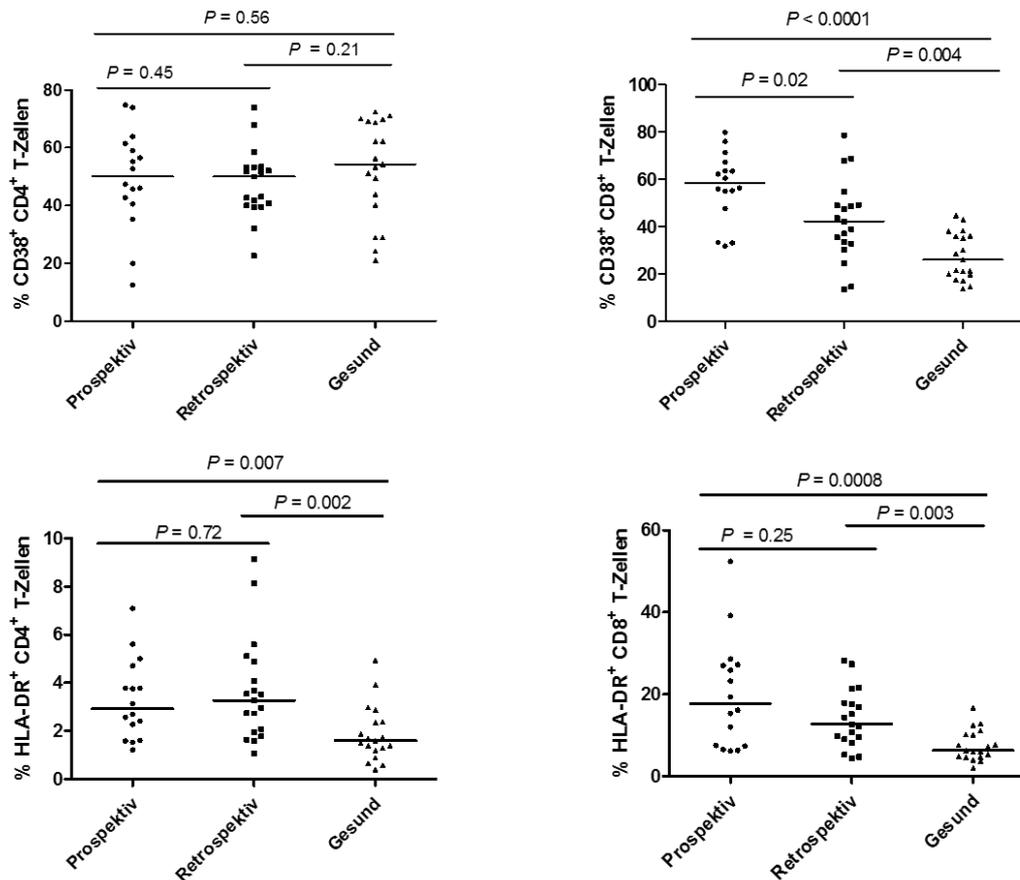


Abbildung 13. CD38 und HLA-DR Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als Zeichen der Immunaktivierung. Vergleich der Expression der Immunaktivierungsmarker CD38 und HLA-DR auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwischen der prospektiven, retrospektiven und gesunden Kohorte.

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Anzahl doppelt positiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für die Immunaktivierungsmarker HLA-DR und CD38 (Abbildung 14). Beim direkten Vergleich der CD38 + HLA-DR Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwischen der prospektiven Kohorte und den gesunden Probanden zeigten sich signifikante Unterschiede (jeweils $p < 0.0001$). Auch chronisch infizierte Patienten wiesen im Vergleich zu gesunden Probanden eine stärkere Zweifachexpression der Immunaktivierungsmarker auf CD4⁺ ($p = 0.0002$) und CD8⁺ T-Zellen ($p < 0.0001$) auf. Die prospektiven Zellen sind bezüglich der CD38 + HLA-DR Expression auf den CD8⁺ T-Zellen gegenüber der retrospektiven Kohorte signifikant erhöht ($p = 0.02$), wenngleich die CD4⁺ T-Zellen hierfür nur einen Trend aufweisen ($p = 0.2$).

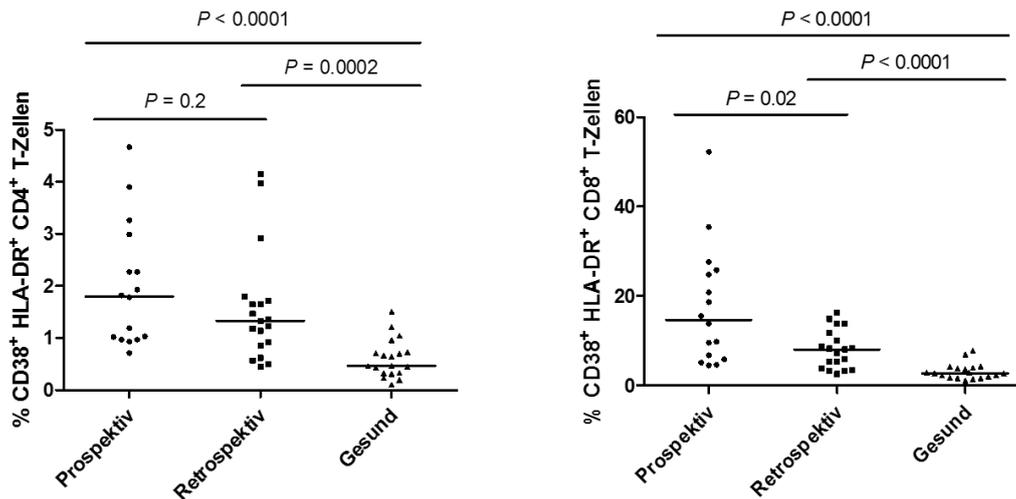


Abbildung 14. Anzahl doppelt positiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für die Immunaktivierungsmarker CD38 und HLA-DR in den unterschiedlichen Patientengruppen. Vergleich der Zweifachexpression der Immunaktivierungsmarker CD38 und HLA-DR auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwischen den Probanden der prospektiven, retrospektiven und gesunden Kohorte.

In der chronischen HIV-Infektion wurde eine Korrelation zwischen der MDSC Expansion und der CD38 Expression auf CD8⁺ T-Zellen beschrieben (55). Um in Erfahrung zu bringen, ob dieser Zusammenhang auch für die akute HIV-Infektion zutrifft, korrelierten wir die PMN-MDSC Frequenz mit der CD38 und HLA-DR Expression sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 15). Wir fanden keine Korrelationen zwischen der Frequenz der CD38⁺ T-Zellen und HLA-DR⁺ T-Zellen und den PMN-MDSC in der akuten HIV-Infektion.

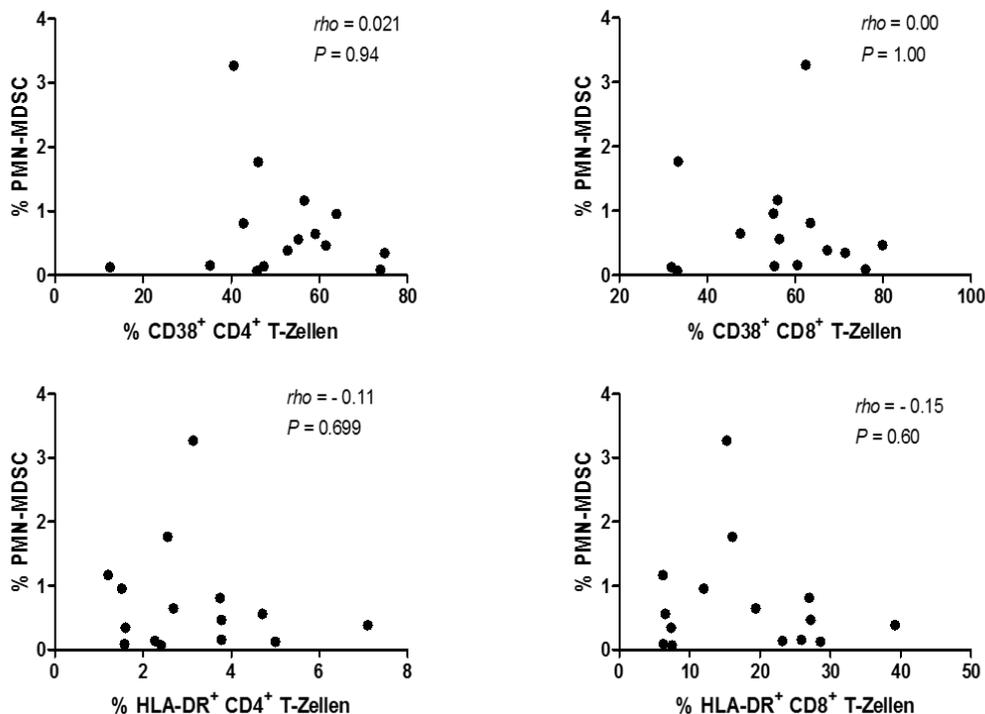


Abbildung 15. Korrelation der PMN-MDSC mit den Immunaktivierungsmarkern CD38 und HLA-DR auf T-Zellen in der akuten HIV-Infektion.

3.2. Die Immuncheckpoint-Expression in der akuten HIV-Infektion

3.2.1. Die Immuncheckpoint-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Eine erhöhte Immuncheckpoint-Expression auf T-Zellen ist Zeichen der Immunerschöpfung in der HIV-Infektion (53). Um das Expressionsprofil der Immuncheckpoints in der akuten HIV-Infektion zu beschreiben, wurde die Expression von PD-1, CTLA-4, TIM-3 und LAG-3 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gemessen und in den unterschiedlichen Kohorten verglichen (Abbildung 16).

Der Vergleich der CTLA-4 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwischen der prospektiven, retrospektiven und gesunden Kohorte ergab eine erhöhte CTLA-4 Expression auf den T-Zellen der chronisch infizierten Probanden im Vergleich zu den akut Infizierten (CTLA-4⁺ CD4⁺ $p = 0.007$, CTLA-4⁺ CD8⁺ $p = 0.009$). Es konnte kein Unterschied zwischen den CTLA-4 Levels der prospektiven und gesunden Gruppe auf CD4⁺ ($p = 0.19$) und CD8⁺ ($p = 0.61$) T-Zellen gefunden werden. PD-1 hingegen ist auf CD4⁺ ($p = 0.002$) und CD8⁺ T-Zellen ($p = 0.003$) in prospektiven Probanden signifikant höher exprimiert als in Gesunden und sinkt auf CD8⁺ T-Zellen in chronisch HIV-Infizierten nach Beginn der ART ab. Im Hinblick auf die TIM-3 Expression auf CD4⁺ T-Zellen zeigt sich kein Unterschied in dessen Level in allen drei Kohorten. Allerdings ist TIM-3 auf CD8⁺ T-Zellen in prospektiven Probanden signifikant höher exprimiert als in retrospektiven ($p = 0.005$), wohingegen kein Unterschied zwischen der prospektiven und gesunden Kohorte besteht. Letztlich zeigte sich sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Zellen keine Erhöhung der LAG-3 Expression in akuten HIV-Patienten im Vergleich zur retrospektiven und gesunden Kohorte.

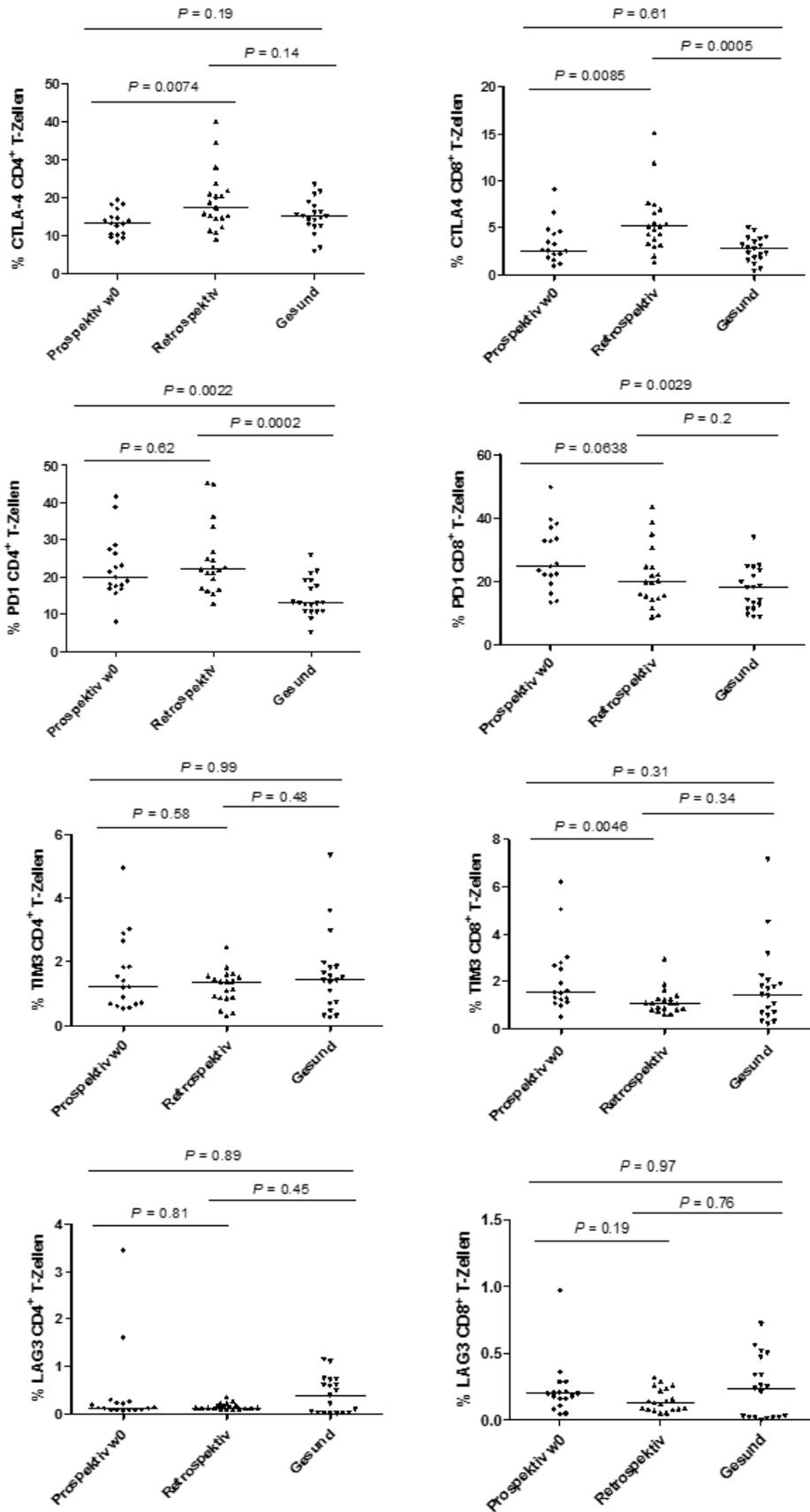


Abbildung 16. Expression der Immuncheckpoints CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen verglichen in prospektiven, retrospektiven und gesunden Probanden.

Um den Einfluss der antiretroviralen Therapie auf die Immuncheckpoint-Frequenz zu untersuchen, wurde die Expression der vier inhibitorischen Moleküle auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zum therapienaiven Zeitpunkt Woche 0 und 12 Wochen nach Therapiebeginn gemessen. Dabei zeigte sich unter ART eine signifikante Reduktion der TIM-3 und LAG-3 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, wohingegen für die Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-1 diese Beobachtung nicht bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Expression der einzelnen inhibitorischen Moleküle untersucht wurde, interessierte uns wie viele CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für diese Immuncheckpoints ein- und mehrfach positiv sind (Abbildung 17). In der therapienaiven akuten HIV-Infektion sind mehr CD4⁺ ($p = 0.053$) und CD8⁺ ($p = 0.003$) T-Zellen einfach positiv für einen Immuncheckpoint als in der gesunden Kohorte. Diese Beobachtung lässt sich auch bezüglich der Zweifachpositivität auf CD4⁺ ($p = 0.06$) und CD8⁺ T-Zellen ($p = 0.009$) finden. Gesunde CD8⁺ T-Zellen sind signifikant weniger dreifach positiv für inhibitorische Moleküle als akut Infizierte ($p = 0.006$), wohingegen für dieses Phänomen für CD4⁺ T-Zellen nur ein Trend bestand ($p = 0.15$). In der akuten Phase der HIV-Infektion exprimierten CD4⁺ ($p = 0.058$) und CD8⁺ ($p = 0.18$) T-Zellen vier Immuncheckpoints häufiger als in der gesunden Kontrollgruppe.

Der Unterschied der Immuncheckpoint-Expressionen zwischen der prospektiven Gruppe zum Zeitpunkt Woche 0 und der retrospektiven Kohorte wird lediglich für die Dreifach-Expression auf CD8⁺ T-Zellen, sowie für die Vierfach-Expression auf beiden T-Zell-Subgruppen signifikant. In diesen drei Fällen haben akut Infizierte im therapienaiven Status eine stärkere Expression als chronisch infizierte Probanden.

Es stellte sich heraus, dass die antiretrovirale Therapie im direkten Vergleich der prospektiven Kohorte zwischen Woche 0 und 12 vor allem auf die Vierfach-Expression der Immuncheckpoints einen reduzierenden Einfluss hat. Dabei ergab sich sowohl für die CD4⁺ ($p = 0.04$) als auch für die CD8⁺ ($p = 0.03$) T-Zellen ein signifikanter Unterschied.

Um die mutmaßliche funktionelle Relevanz von MDSC bei der akuten HIV-Infektion und die immunologischen Mechanismen der MDSC-Expansion in der akuten Phase der Infektion zu identifizieren, untersuchten wir die Korrelationen dieser Zellpopulation mit der Immuncheckpoint-Expression auf T-Zellen. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der für die Immunerschöpfung stehenden inhibitorischen Moleküle bezüglich ihrer Ein- und Mehrfachexpression und der PMN-MDSC Frequenz (Abbildung 18).

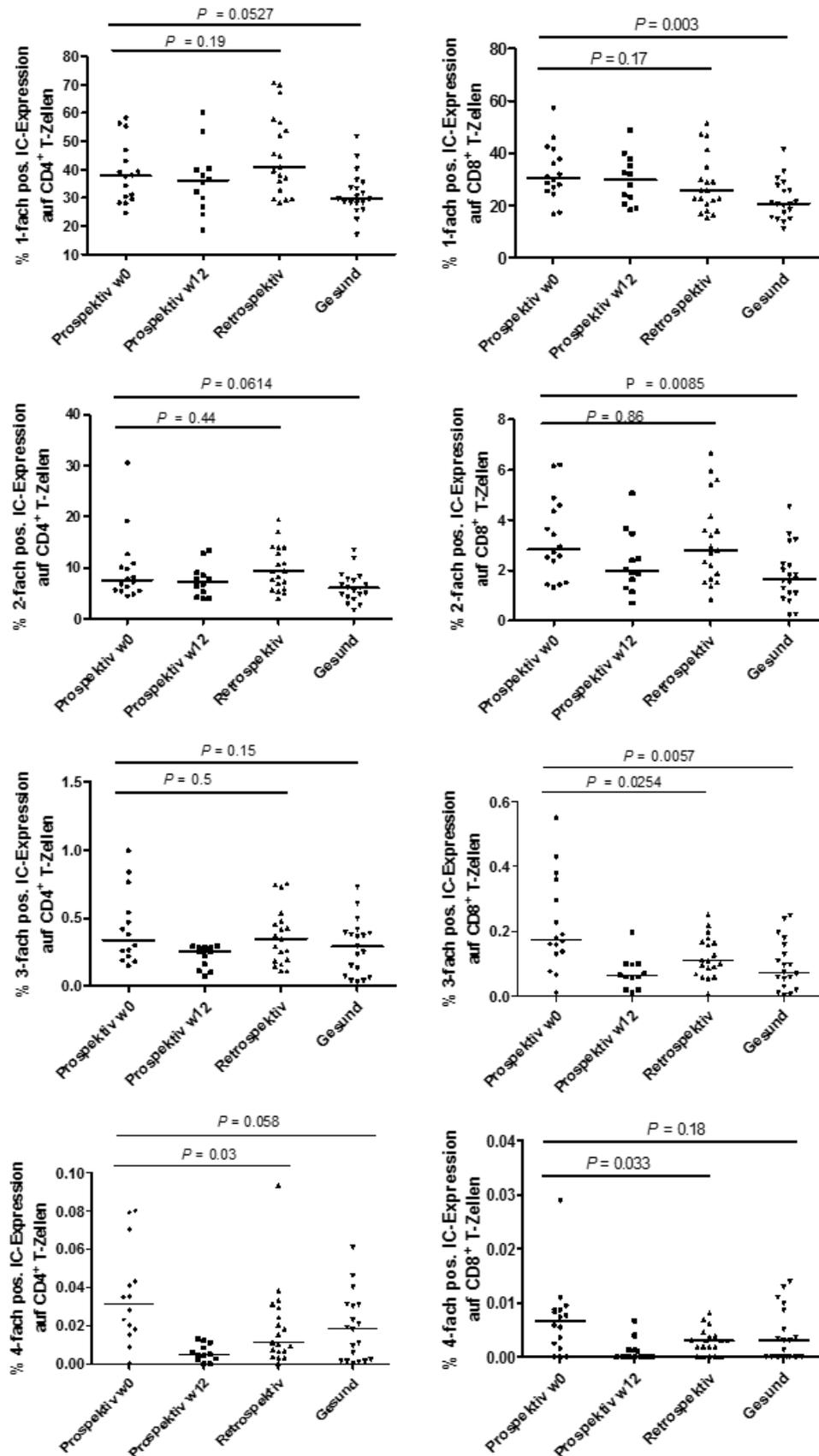


Abbildung 17. Vergleich der Ein- und Mehrfachexpression der Immuncheckpoints auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in prospektiven Woche 0 und 12, retrospektiven und gesunden Probanden.

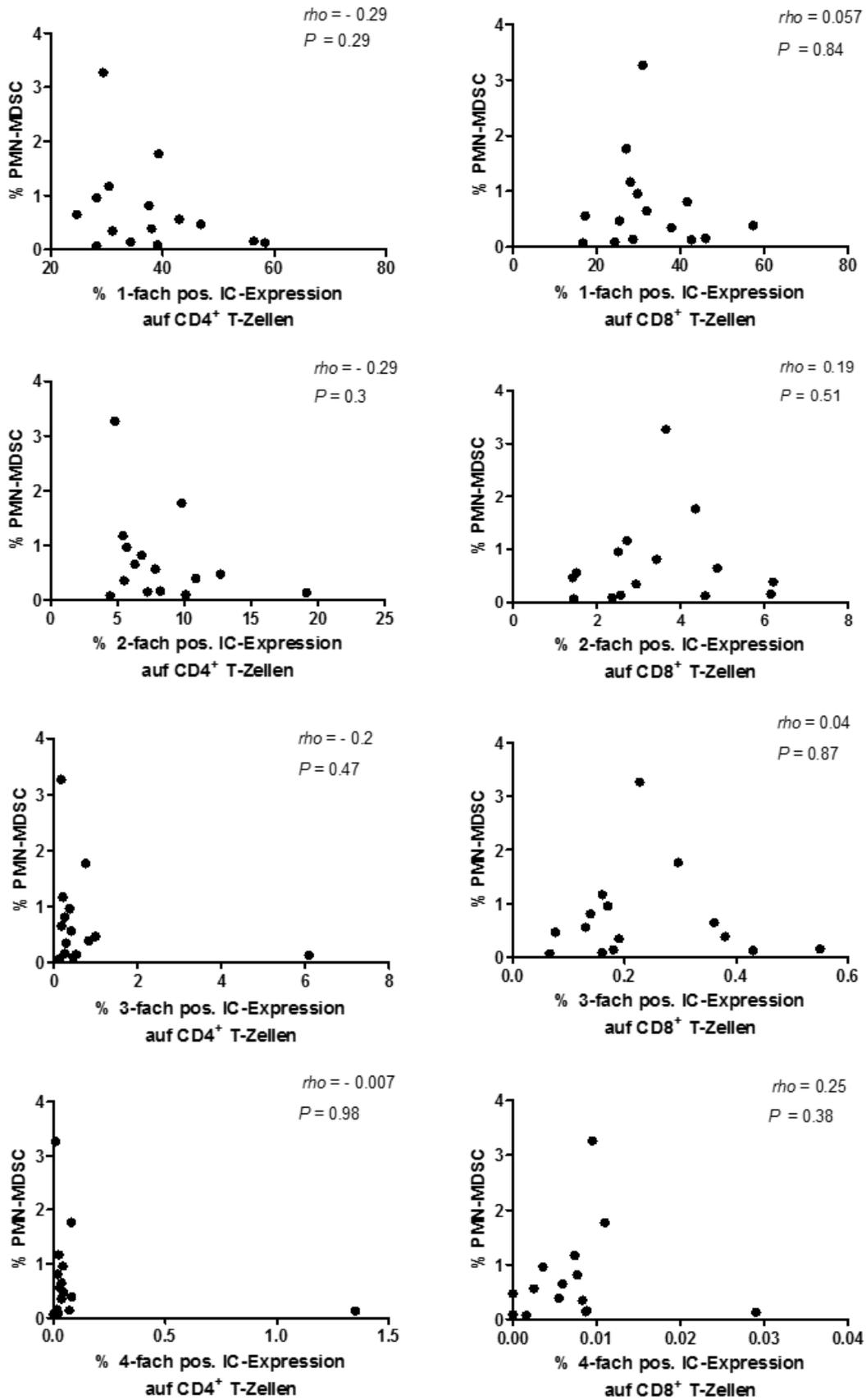


Abbildung 18. Korrelationsanalysen der PMN-MDSC Frequenz und Ein-bis Mehrfachexpression der Immuncheckpoints auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der akuten HIV-Infektion.

3.2.2. Die Immuncheckpoint-Expression auf HIV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

HIV-spezifische Immunantworten spielen in der Bekämpfung des Virus und dessen Replikation eine essenzielle Rolle (50). Deswegen verglichen wir die HIV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten in den verschiedenen Studiengruppen (Abbildung 19). Hierfür wurde nach Stimulation der Zellen mit den zwei HIV-Peptidpools Gag und Nef/Rev/Tat deren IFN- γ Produktion gemessen. In beiden T-Zellsubgruppen zeigte sich sowohl in der prospektiven Kohorte Woche 0 ($p < 0.0001$) als auch in der retrospektiven Kohorte ($p < 0.0001$) eine signifikante Erhöhung der IFN- γ produzierenden T-Zellen im Vergleich zu den gesunden Probanden. Dabei wiesen chronisch Infizierte eine höhere Frequenz HIV-spezifischer T-Zellen als prospektive, akute Probanden auf. Eine Signifikanz wurde nur bezüglich der CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen ($p = 0.049$).

Es wurde gezeigt, dass in der chronischen HIV-Infektion die Immunantworten der CD8⁺ T-Zellen stärker sind als die der CD4⁺ T-Zellen (80). Interessanterweise scheinen sich diese Verhältnisse in der akuten HIV-Infektion umzukehren. So wiesen wir in der akuten HIV-Infektion eine stärkere CD4⁺ als CD8⁺ T-Zellantwort nach.

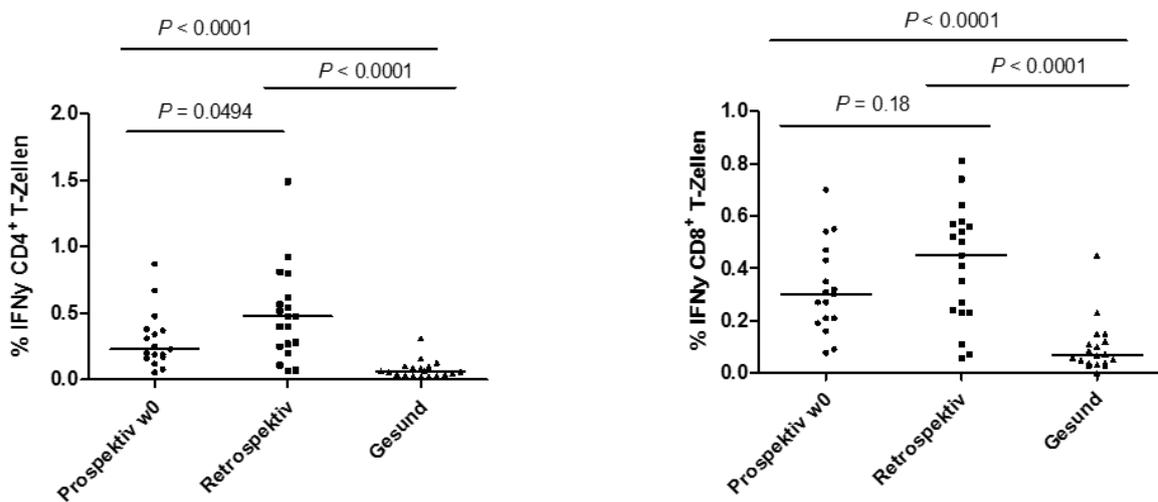


Abbildung 19. HIV-spezifische IFN- γ Immunantworten in der prospektiven, retrospektiven und gesunden Kohorte nach Stimulation mit dem Peptidpool Gag.

Da den MDSC eine immunsuppressive Funktion in der HIV-Infektion nachgewiesen wurde, korrelierten wir die PMN-MDSC Frequenz mit der HIV-spezifischen Immunantwort, um den Einfluss dieser auf die HIV-spezifischen T-Zellen erfassen zu können (Abbildung 20). Hier zeigte sich kein Zusammenhang.

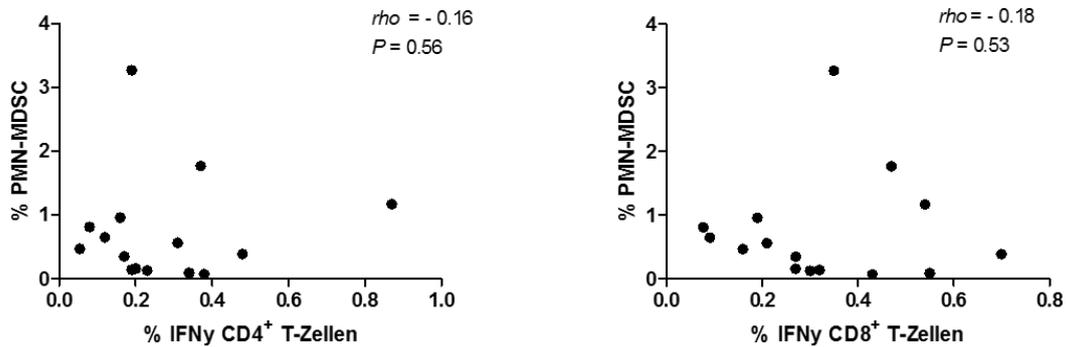


Abbildung 20. Korrelation der PMN-MDSC Frequenz mit den IFN- γ produzierenden HIV-spezifischen T-Zellen.

Neben der Expression der Immuncheckpoints PD-1, CTLA-4, TIM-3 und LAG-3 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersuchten wir die Expression dieser Checkpoints auf den HIV-spezifischen T-Zellen in der akuten HIV-Infektion. Nach Stimulation mit den Peptiden Gag, Nef, Rev und Tat wurde auf den IFN- γ produzierenden Zellen der Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) des jeweiligen inhibitorischen Moleküls gemessen und zwischen der prospektiven und retrospektiven Gruppe verglichen (Abbildung 21). Anschließend wurde der Quotient aus der für den jeweiligen Immuncheckpoint IFN- γ positiven MFI und IFN- γ negativen MFI gebildet und somit der relative Mittelwert der Fluoreszenzintensität, rMFI, berechnet (Abbildung 22). Sowohl auf den CD4⁺ ($p = 0.08$) als auch CD8⁺ ($p = 0.06$) HIV-spezifischen T-Zellen war TIM-3 in den retrospektiven Probanden höher exprimiert als in den therapienaiven prospektiven Probanden. Auch für das inhibitorische Molekül LAG-3 zeigt sich dieses Phänomen (CD4⁺ $p = 0.02$; CD8⁺ $p = 0.01$). PD-1 und CTLA-4 sind dahingegen auf den HIV-spezifischen CD4⁺ (PD-1 $p = 0.0001$; CTLA-4 $p = 0.002$) T-Zellen der prospektiven Kohorte Woche 0 signifikant höher exprimiert als in der retrospektiven Kohorte. Es bestand kein Unterschied der rMFI beider Immuncheckpoints auf den HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Der Vergleich der beiden Peptidstimulanzen Gag und Nef/Rev/Tat zeigten annähernd identische Ergebnisse, wobei die Nef/Rev/Tat-stimulierten T-Zellen niedrigere HIV-spezifische Immunantworten aufwiesen.

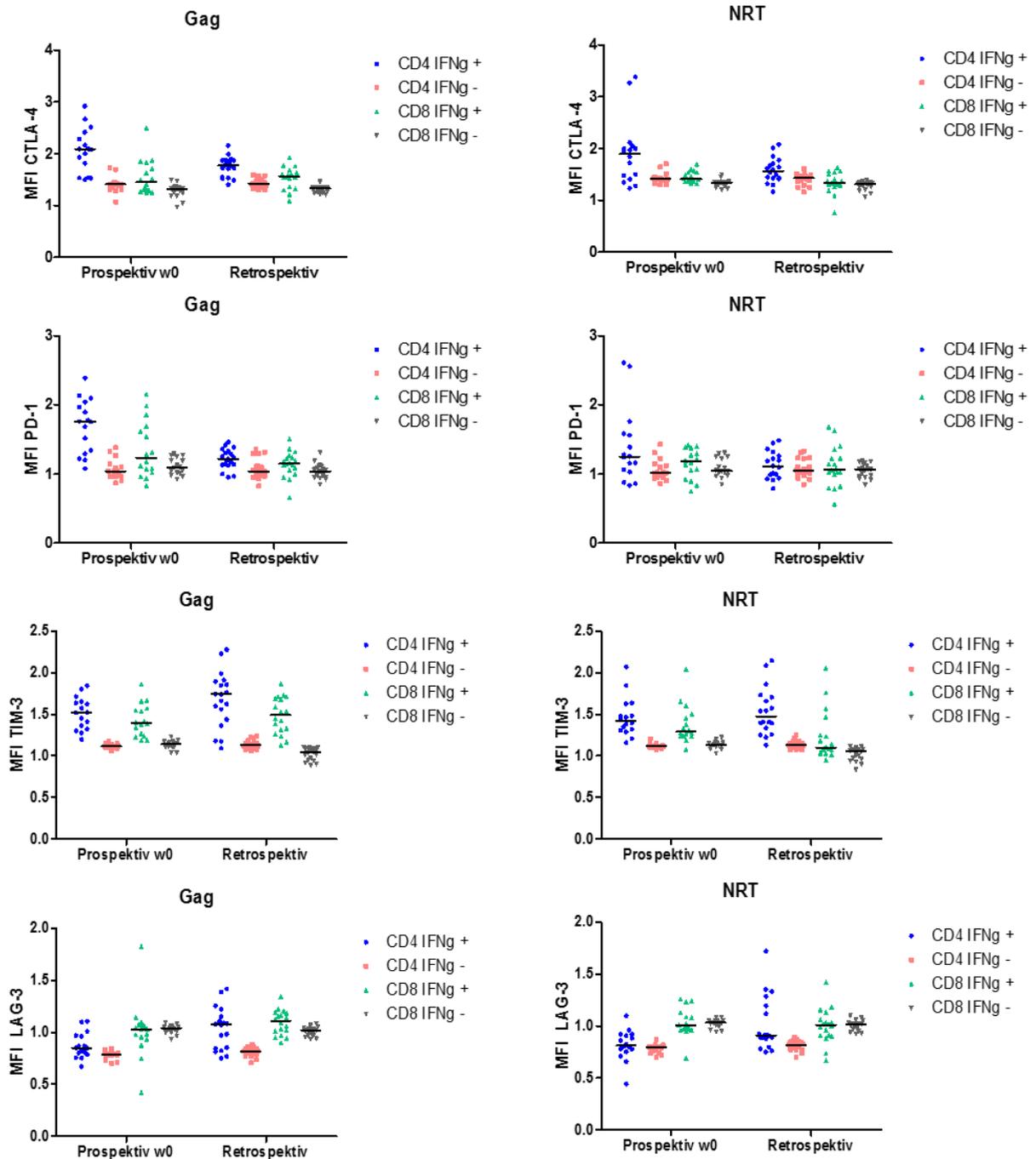


Abbildung 21. Expression der Immuncheckpoints CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 auf Gag (links) und Nef/Rev/Tat (rechts)-stimulierten, IFN- γ produzierenden HIV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Vergleich des Mittelwertes der Fluoreszenzintensität (MFI) zwischen der prospektiven Kohorte Woche 0 und der retrospektiven Kohorte.

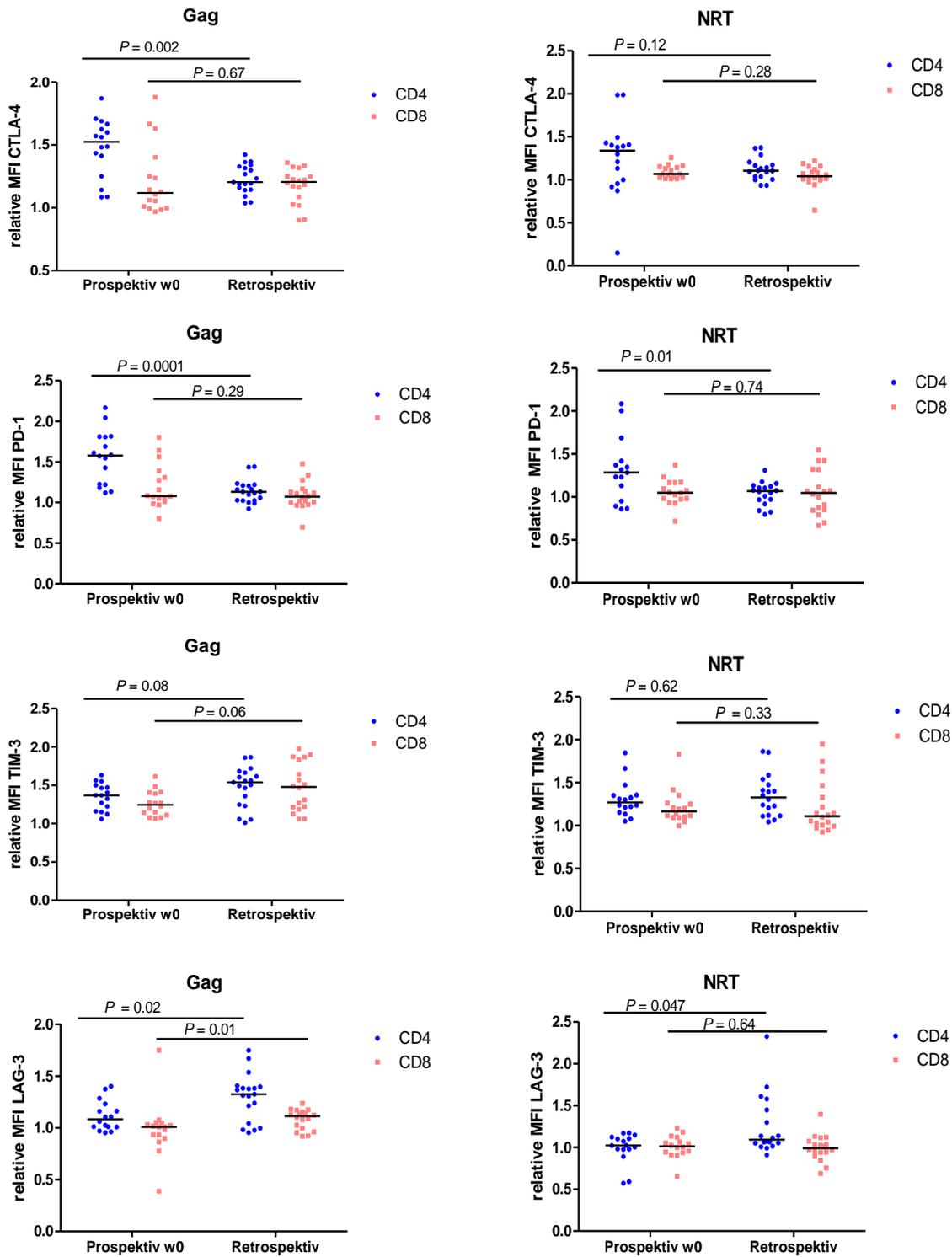


Abbildung 22. Expression der Immuncheckpoints CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 auf Gag (links) und Nef/Rev/Tat (rechts)-stimulierten, IFN- γ produzierenden HIV-spezifischen CD4+ (blau) und CD8+ (rot) T-Zellen. Vergleich des relativen Mittelwertes der Fluoreszenzintensität (rMFI) zwischen der prospektiven Kohorte Woche 0 und der retrospektiven Kohorte.

4. Diskussion

Eines der Hauptmerkmale der chronischen HIV-Infektion ist eine persistierende Immunaktivierung, die zu einer Erschöpfung der zellulären Immunantwort führt. Die damit einhergehende Unfähigkeit der Immunzellen, das HI-Virus zu eliminieren spiegelt sich in der Erschöpfung der T-Zell-vermittelten Immunität wider. Die Folge ist der Verlust der Effektorfunktionen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (48) (49). Frühere Studien zeigten, dass sowohl die Expansion der MDSC als auch die vermehrte Expression von Immuncheckpoints wie PD-1, CTLA-4, TIM-3 und LAG-3 auf T-Zellen mit der Erschöpfung des Immunsystems in der chronischen HIV-Infektion assoziiert waren (53) (54) (55).

In der vorliegenden Studie wurden die immunregulatorischen Mechanismen in der akuten HIV-Infektion und die Auswirkungen einer frühen antiretroviralen Behandlung auf diese Systeme untersucht. Dabei war zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen der Immuncheckpoint-Expression auf (HIV-spezifischen) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und MDSC-Frequenzen in der akuten Phase der HIV-Infektion besteht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Studie diskutiert.

PMN-MDSC und M-MDSC Level in der akuten HIV-Infektion

Den immunsupprimierenden MDSC wird eine bedeutende Rolle in der anhaltenden Immunaktivierung und der damit einhergehenden Schädigung des Immunsystems in der HIV-Infektion zugeschrieben (55). In früheren Studien wurde die Rolle von MDSC in der chronischen HIV-Infektion untersucht. Hier zeigte sich, dass chronisch HIV-infizierte Patienten eine höhere Anzahl an MDSC aufwiesen und diese mit einer Immunerschöpfung assoziiert waren (55) (76).

Im Gegensatz hierzu ist die Rolle der MDSC in der akuten HIV-Infektion noch weitestgehend unerforscht. Neuere Studien zeigen einen Anstieg der PMN-MDSC bereits in der frühen Phase der HIV-Infektion (78) (81). Übereinstimmend mit diesen Daten beobachteten auch wir, dass die PMN-MDSC Frequenz in Patienten mit einer therapienaiven, akuten HIV-Infektion signifikant höher war als die PMN-MDSC Frequenz in gesunden Probanden. So konnten wir nachweisen, dass die Expansion der PMN-MDSC bereits in der akuten Phase der Infektion auftritt. Im Gegensatz dazu wurde in allen Kohorten keine signifikante Expansion der M-MDSC-Untergruppe beobachtet. Dies deckt sich mit den dazu aktuell publizierten Ergebnissen von Tumino *et al* (78).

Die Therapie mit ART ist mit einer Normalisierung vieler, wenngleich nicht aller Immunparameter assoziiert. Um den Effekt der ART auf die MDSC zu ermitteln, verglichen wir zunächst die PMN-MDSC Levels therapienaiver, akut infizierter mit denen therapierter, chronisch infizierter Probanden.

Hier zeigte sich, dass PMN-MDSC während der akuten, noch unbehandelten HIV-Infektion im Vergleich zu den behandelten chronischen Infektionen deutlich erhöht waren. Wenngleich diese Beobachtung

statistisch nicht signifikant war, passt sie zu der Annahme, dass die PMN-MDSC-Frequenzen unter antiretroviraler Therapie niedriger sind (76). Folglich stellt sich die Frage, weshalb die PMN-MDSC-Frequenzen der retrospektiven Patienten trotz Therapie signifikant höher sind als die der gesunden Probanden. Grützner *et al* zeigten, dass PMN-MDSC im Rahmen der chronischen Schädigung des Immunsystems und der damit einhergehenden Immunerschöpfung trotz antiretroviraler Behandlung vermehrt auftreten (82).

Wir interessierten uns im Anschluss für die Auswirkungen einer frühen antiretroviralen Therapie auf die Anzahl der MDSC in der akuten HIV-Infektion, weshalb wir die Kinetik der PMN-MDSC in den ersten Wochen der akuten HIV-Infektion nach Beginn einer ART untersuchten. Es zeigte sich, dass die antiretrovirale Therapie bereits 12 Wochen nach deren Beginn das PMN-MDSC Level bis auf das Niveau gesunder Kontrollen reduziert. Dies stimmt mit den Daten von Agrati *et al* überein, die ebenso eine Abnahme der PMN-MDSC-Häufigkeit nach 12 Wochen ART bei akut-infizierten HIV-Patienten beobachteten (83). Jedoch zeigten sie, dass nach 48 Wochen eine ART keine Normalisierung der PMN-MDSC induzierte. Stattdessen kam es zu einem erneuten Anstieg der PMN-MDSC bis auf das Niveau therapienaiver akut-infizierter Probanden. Um diese Beobachtungen zu evaluieren, bedarf es in der vorliegenden Studie einer Ausweitung der Datenerhebung über die zwölfte Behandlungswoche hinaus. Zudem gilt es in weiteren Studien nach den Ursachen für einen hypothetische, erneute Expansion der PMN-MDSC zu suchen.

In der Zusammenschau unserer Beobachtungen und der Literaturdaten gehen wir davon aus, dass die therapeutische Intervention im Rahmen einer antiretroviralen Therapie einen signifikant reduzierenden Einfluss auf die Kinetik der PMN-MDSC in den ersten 12 Behandlungswochen akut-infizierter Probanden hat. Unklar bleibt, ob die Hemmung der HIV-Replikation durch ART auf direktem Wege zu einer Reduktion der MDSC in den ersten Therapiewochen führt.

Zusammenfassend haben wir festgestellt, dass PMN-MDSC bereits in der akuten HIV-Infektion expandieren. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Zellpopulation eine relevante Rolle bei der Modulation der Immunantwort kurz nach der Infektion mit dem HI-Virus spielen könnte. So sind weitere Studien notwendig, um die Mechanismen aufzuklären, die die Frequenz und die Funktionen der MDSC während der verschiedenen Phasen der HIV-Infektion beeinflussen. Da zudem gezeigt wurde, dass die Expansion der MDSC in der HIV-Infektion mit der chronischen Immunerschöpfung assoziiert ist (55), könnte das Verständnis der Rolle der MDSC und deren regulatorischen Mechanismen in der akuten HIV-Infektion zur Entwicklung neuer Strategien zur Wiederherstellung der funktionellen Eigenschaften von T-Zellen beitragen und sich bei der Eindämmung der schädlichen Auswirkungen einer anhaltenden Aktivierung des Immunsystems als nützlich erweisen.

Die Immunaktivierungsmarker CD38 und HLA-DR in der akuten HIV-Infektion

Da die Immunaktivierung als prognostischer Marker für die Krankheitsprogression der HIV-Infektion gilt und die dauerhafte Aktivierung des Immunsystems mit der Immunerschöpfung im Rahmen der HIV-Infektion assoziiert ist, interessierte uns der Status der Immunaktivierung in der akuten Phase der Infektion (56). Frühere Studien zeigten anhand einer erhöhten Expression des Aktivierungsmarker CD38 eine starke Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen in der akuten HIV-Infektion (78) (84) (85). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wiesen wir eine signifikant höhere HLA-DR Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie eine erhöhte CD38 Expression auf CD8⁺ T-Zellen in akut HIV-infizierten Probanden im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach. Diese Beobachtung deckt sich mit den vorhandenen Literaturdaten und spiegelt eine bereits zu Beginn der HIV-Infektion auftretende und durch den Viruserwerb induzierte Aktivierung der zellulären Immunantwort wider (78).

In der chronischen HIV-Infektion wurde eine Korrelation zwischen der MDSC Expansion und der CD38 Expression auf CD8⁺ T-Zellen beschrieben (55) (76). Um in Erfahrung zu bringen, ob dieser Zusammenhang auch für die akute HIV-Infektion zutrifft, korrelierten wir die PMN-MDSC Frequenz mit der CD38 und HLA-DR Expression sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Zellen. Wir fanden diesbezüglich für die akute HIV-Infektion keine Korrelationen, was im Einklang mit den in der Literatur bereits vorhandenen Ergebnissen der Forschungsgruppe Tumino *et al* steht (78). Deswegen vermuten wir, dass in der akuten HIV-Infektion die PMN-MDSC Expansion nicht durch die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen in die Höhe getrieben wird und die Immunaktivierung somit nicht der Hauptmechanismus in der Regulation der MDSC-Frequenz ist. Umgekehrt könnte aber auch die MDSC-Expansion zur Immunaktivierung führen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde allerdings kein Zusammenhang zwischen der Immunaktivierung und MDSC-Akkumulation in der akuten HIV-Infektion nachgewiesen.

Die Immuncheckpoint-Expression in der akuten HIV-Infektion

Bei einer chronischen HIV-Infektion ist die Erschöpfung des Immunsystems mit der Hochregulation von Oberflächenmolekülen, die als Immuncheckpoints bezeichnet werden, verbunden (53) (54). So zeigte sich, dass die Überexpression von PD-1 mit einem Verlust der Effektorfunktionen der T-Zellen und einer damit einhergehenden progressiven Immunerschöpfung in der chronischen HIV-Infektion assoziiert ist (53) (54). Neuere Studien assoziieren eine hohe Immuncheckpoint-Expression bereits während der akuten HIV-Infektion mit einem schnelleren Fortschreiten der Krankheit (70). Es scheint, dass die Immunregulationssysteme an der frühen Pathogenese der HIV-Infektion maßgeblich beteiligt sind und dass ihre Beteiligung Auswirkungen auf den langfristigen klinischen Verlauf der Krankheit hat (71). Um diese immunologischen Zusammenhänge in der akuten HIV-Infektion zu erforschen,

untersuchten wir in der vorliegenden Studie die Expression der Immuncheckpoints auf (HIV-spezifischen) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und evaluierten deren Verhältnis zu den MDSC-Frequenzen in der akuten Phase der Infektion. Darüber hinaus interessierten uns die Auswirkungen einer frühen antiretroviralen Therapie zu Beginn der akuten HIV-Infektion auf die Expression der Immuncheckpoints.

Die Immuncheckpoint-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Bisher liegen nur wenige Daten zur CTLA-4 Expression in der HIV-Infektion vor. Unter anderem konnte Steiner *et al* ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau des inhibitorischen Rezeptors CTLA-4 auf CD4⁺ T-Zellen in der chronischen HIV-Infektion zeigen, während bei CD8⁺ T-Zellen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisbar waren (86). Im Gegensatz zu diesen Daten beschrieben wir eine signifikant erhöhte Expression von CTLA-4 in beiden T-Zellpopulationen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in chronisch HIV-infizierten Probanden. Interessanterweise exprimierten akut infizierte Patienten und gesunde Spender ein annähernd gleiches Level an CTLA-4. Da CTLA-4 in früheren Studien eine Schlüsselrolle in der Modulation der Immunantwort zugeschrieben wurde, hätten wir eine vermehrte CTLA-4 Expression bereits in der akuten HIV-Infektion im Vergleich zu gesunden Probanden erwartet (87) (88).

Hoffmann *et al* wies in akut HIV-infizierten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine erhöhte Expression von PD-1, TIM-3 und LAG-3 auf CD8⁺ T-Zellen nach (70). Im Einklang mit diesen Beobachtungen bezüglich der Immuncheckpoint-Expression in der frühen, akuten Phase der Infektion zeigten wir eine Hochregulation von PD-1 und TIM-3 auf CD8⁺ T-Zellen, wohingegen wir dieses Phänomen für LAG-3 nicht bestätigen konnten. TIM-3 und PD-1 könnten in der frühen Phasen einer HIV-Infektion entscheidend sein, um die Differenzierung von antigenspezifischen Effektor-T-Zellen zu gewährleisten, während später mit Fortschreiten der Infektion das kontinuierliche Signal dieser Marker zur Erschöpfung der T-Zellen führen kann (70). Da in der zitierten Studie lediglich eine Messung dieser Oberflächenmoleküle auf CD8⁺ T-Zellen erfolgte, analysierte die vorliegende Studie die Expression der genannten drei inhibitorischen Rezeptoren zusätzlich in der CD4⁺ T-Zellpopulation: So beobachteten wir in der akut HIV-infizierten Kohorte eine signifikante Hochregulation von PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten sich in unseren Untersuchungen in der akuten HIV-Infektion keine Unterschiede bezüglich der TIM-3 und LAG-3 Expression auf CD4⁺ T-Zellen. Da TIM-3 und LAG-3 in chronisch infizierten Individuen mit einer Dysfunktion der zellulären Immunantwort assoziiert wurden, hätten wir, ähnlich wie bei CTLA-4, eine Hochregulation dieser bereits in der akuten HIV-Infektion erwartet (64) (70) (69). Umso wichtiger ist es, das Expressionsverhalten der Immuncheckpoints in der akuten HIV-Infektion weiter zu charakterisieren und deren Einfluss auf den Verlauf der HIV-Erkrankung zu evaluieren.

Um den Einfluss der antiretroviralen Therapie auf die Immuncheckpoints zu untersuchen, verglichen wir die Expression der vier inhibitorischen Moleküle auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zum therapienaiven Zeitpunkt Woche 0 und 12 Wochen nach Therapiebeginn. Dabei zeigte sich unter ART eine signifikante Reduktion der TIM-3 und LAG-3 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass der größte Effekt auf einen stark abweichenden Messwert zurückzuführen ist, weshalb sich unsere Analyse diesbezüglich limitiert zeigt. Obwohl für die Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-1 eine Reduktion deren Expression innerhalb der ersten 12 Wochen nach Therapiebeginn nicht beschrieben werden konnte, ist trotz alledem ein Trend erkennbar. Wenngleich folglich die ART einen geringen Einfluss auf die frühe Immuncheckpoint-Expression der T-Zellen zu haben scheint, ist der Einschluss weiterer Studienteilnehmer erforderlich, um die Auswirkungen einer antiretroviralen Therapie auf die Immunregulationssysteme in der akuten HIV-Infektion zu untersuchen. Interessant wäre zudem eine Analyse der Immuncheckpoint-Expression über die zwölfte Woche der frühen antiretroviralen Therapie hinaus, um einen möglichen Effekt erkennbar werden zu lassen.

Bei der Betrachtung des Expressionsverhaltens der Immuncheckpoints in der chronischen HIV-Infektion zeigten sich TIM-3, wie auch LAG-3 in chronisch HIV-Infizierten im Vergleich zu gesunden Probanden nicht hochreguliert. Möglicherweise kann unser Ergebnis als erfolgreiches Ansprechen der antiretroviralen Therapie, mit der chronisch infizierte retrospektiv zugeordnete Probanden therapiert wurden, interpretiert werden. Passend zu unseren Beobachtungen zeigte die Arbeitsgruppe Tian *et al* in unbehandelten chronisch HIV-infizierten Probanden einen signifikanten Anstieg der LAG-3 Expression, die durch die Eindämmung der HIV-Replikation durch eine prolongierte ART verringert wurde (69). Ebenso reduzierte sich das Expressionslevel an TIM-3 in chronisch progressiv HIV-infizierten Probanden nach Beginn einer antiretroviralen Therapie (64).

Unsere Vorstellung, dass die Immuncheckpoints in der akuten HIV-Infektion auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bereits stärker exprimiert sind als in gesunden Probanden und unter dem Beginn einer ART sowie in der chronischen Phase der Infektion in ihrem Level sanken, bestätigte sich nur für PD-1. Die Tatsache, dass der Erwerb des HI-Virus in der prospektiven Kohorte Woche 0 gerade erst stattgefunden hat, erklärt möglicherweise, dass die Immuncheckpoints in unseren evaluierten Daten in der prospektiven Kohorte nicht wesentlich höher als in gesunden Probanden sind. Die kurze Dauer der akuten HIV-Infektion geht noch nicht mit einer starken Erschöpfung des Immunsystems einher. Die Immunerschöpfung nimmt erst mit dem Verlauf der Erkrankung zu, was sich in einem Anstieg der Immuncheckpoint-Expression in chronisch fortschreitenden HIV-infizierten Probanden widerspiegelt (64) (69). Wir beobachteten in der retrospektiven Kohorte eine fehlende Hochregulation der Immuncheckpoint-Expression. Da bereits zu Beginn der Erkrankung eine antiretrovirale Therapie begonnen und somit frühzeitig interveniert wurde, ist dies mit einem reduzierten Level an

Immuncheckpoints in therapierten, chronisch HIV-infizierten Probanden vereinbar. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen bezüglich PD-1, welches unter ART in seinem Expressionslevel sinkt. Somit bleibt unklar, warum CTLA-4 trotz ART in chronischen Probanden stark erhöht exprimiert ist und deutet möglicherweise auf eine Sonderrolle von CTLA-4 im Rahmen der Immunerschöpfung oder eine schlechtere Kontrolle der HIV-Infektion in diesen Probanden hin. Zudem wäre ein hoher CTLA-4-Spiegel bereits vor Beginn der ART denkbar, der trotz Therapie nicht mehr komplett gesenkt werden konnte.

Um die Bedeutung der Mehrfachexpression der Immuncheckpoints auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der akuten HIV-Infektion zu evaluieren, untersuchten wir die Co-Expression dieser Moleküle auf beiden T-Zell-Subgruppen. Es zeigte sich eine höhere Expression aller vier inhibitorischen Moleküle PD-1, CTLA-4, TIM-3 und LAG-3 in HIV infizierten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Dieser Unterschied zeigte jedoch nur einen Trend und war nicht statistisch signifikant. Eine mögliche Begründung für die fehlende Signifikanz dieser Beobachtung sind die sowohl gering detektierbaren Ereignisse der FACS-Analyse als auch die geringe Patientenzahl der Studie. Um weitere Aussagen bezüglich der Mehrfachexpression der Immuncheckpoints auf T-Zellen in der akuten HIV-Infektion treffen zu können, werden weitere Studien mit mehr Studienteilnehmern erforderlich sein, um eine zufriedenstellende statistische Aussagekraft der Analyse zu erreichen.

Wir konnten in der vorliegenden Studie einen Anstieg der PMN-MDSC bereits in der akuten HIV-Infektion nachweisen. Im Gegensatz zur chronischen HIV-Infektion ist die Rolle der MDSC in der akuten HIV-Infektion noch weitestgehend unerforscht. Um die mutmaßliche funktionelle Relevanz von MDSC und die immunologischen Mechanismen der MDSC-Expansion in der akuten Phase der Infektion zu identifizieren, untersuchten wir die Korrelationen dieser Zellpopulation mit der Immuncheckpoint-Expression auf T-Zellen. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der für die Immunerschöpfung stehenden inhibitorischen Moleküle bezüglich ihrer Ein- und Mehrfachexpression und der PMN-MDSC Frequenz, weshalb wir vermuten, dass die regulatorischen Mechanismen der MDSC nicht mit der Expression von Immuncheckpoints in der akuten HIV-Infektion in Zusammenhang stehen. Zudem könnte dies darauf hindeuten, dass der Anstieg der Immuncheckpoint-Expression in der akuten HIV-Infektion nicht hauptsächlich durch die PMN-MDSC getriggert wird. Um die Beziehung zwischen MDSC und Immuncheckpoints weiter zu evaluieren, wäre es interessant zu verstehen, welche Trigger für die Expansion der PMN-MDSC und welche für die vermehrte Expression von Immuncheckpoints in der akuten HIV-Infektion verantwortlich sind.

Die Immuncheckpoint-Expression auf HIV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Bislang bezogen sich die Ergebnisse der Immuncheckpoint-Expression auf die Gesamtheit der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Da HIV-spezifische Immunantworten in der Bekämpfung des Virus eine essentielle Rolle spielen (43), untersuchten wir zuerst die Anzahl HIV-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten in der akuten Phase der HIV-Infektion und anschließend deren Immuncheckpoint-Expressionsprofile.

So zeigten wir in beiden T-Zellsubgruppen eine signifikante Erhöhung der IFN- γ produzierenden T-Zellen sowohl in der akuten als auch der chronisch-infizierten Kohorte im Vergleich zu gesunden Probanden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bereits vorhandenen Forschungsergebnissen (89) (90). Um den Einfluss von MDSC auf die HIV-spezifischen T-Zellen erfassen zu können, korrelierten wir anschließend die PMN-MDSC Frequenz mit der HIV-spezifischen Immunantwort. Da MDSC eine immunsuppressive Funktion in der HIV-Infektion zugeschrieben wird, vermuteten wir einen Zusammenhang zwischen HIV-peptidspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten und der PMN-MDSC Frequenz. Wider Erwarten zeigte sich hier keine Korrelation. Dies kann bedeuten, dass wenige PMN-MDSC reichen, um ihren Effekt auf die Entwicklung HIV-peptidspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten auszuüben oder das letztlich keine Beziehung zwischen beiden Komponenten besteht. Zudem wäre eine sehr schnelle Regeneration der CD8⁺ T-Zellen in der akuten Infektion denkbar, die uns den vermuteten Effekt nicht sehen lässt.

Neben einer in der chronischen HIV-Infektion bereits bekannten erhöhten CTLA-4 Expression auf HIV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (87), beschrieben wir in der vorliegenden Studie auch in akut HIV-infizierten Probanden eine signifikant vermehrte Expression von CTLA-4 auf HIV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Im Vergleich dazu wurde CTLA-4 nicht auf HIV-spezifische CD8⁺ T-Zellen hochreguliert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Kaufmann *et al* gehen wir von einer selektiven Beeinträchtigung der HIV-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Subpopulation aus (87).

Obwohl in der chronischen HIV-Infektion eine vermehrte Expression des inhibitorischen Moleküls PD-1 auf der Oberfläche HIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen gefunden wurde (53) (54), konnte diese Beobachtung in der akuten Phase der Infektion nicht nachgewiesen werden. Stattdessen war in akut infizierten Probanden eine erhöhte PD-1 Expression auf HIV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen messbar. Ähnlich zum CTLA-4 Expressionsprofil könnte dieses Ergebnis Hinweis auf eine selektiv beeinträchtigte CD4⁺ T-Zell-Subpopulation sein. Da PD-1 in der chronischen HIV-Infektion eine entscheidende Rolle in der Akkumulation HIV-spezifischer dysfunktionaler T-Zellen spielt und die Progression der HIV-Erkrankung begünstigt (68), sind in Zukunft weitere Studien bezüglich der Relevanz dieses inhibitorischen Rezeptors in der Pathogenese der akuten HIV-Infektion erforderlich.

Die in der Literatur beschriebene erhöhte Expression von TIM-3 und LAG-3 auf den HIV-spezifischen T-Zellen in der chronischen HIV-Infektion, konnten wir bestätigen (64). Verglichen mit akut-infizierten Probanden war die Expression dieser beiden Immuncheckpoints auf HIV-spezifischen T-Zellen in der chronischen HIV-Infektion stärker ausgeprägt. Es gilt die Expression dieser Immuncheckpoints detaillierter zu beschreiben und diese in Zusammenhang mit der Funktion HIV-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu bringen. Die vorliegende Studie liefert eine erste, systematische Analyse der Immuncheckpoint-Expression auf (HIV-spezifischen) T-Zellen in der akut und chronisch HIV-infizierten Patienten im Vergleich zu HIV-naiven Probanden.

5. Ausblick

Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, um die Beziehung zwischen Immunregulationsmechanismen und der chronischen HIV-Erkrankung zu definieren. In den letzten Jahren steigerten sich auch die immunologischen Erkenntnisse in der akuten HIV-Infektion, die Hinweise darauf geben, dass immunregulatorische Systeme wie Immuncheckpoints und MDSC bereits in die frühe HIV-Pathogenese involviert sind.

Die vorliegende Studie ist die erste systematische Analyse der Expression von Immuncheckpoints auf (HIV-spezifischen) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der akuten HIV-Infektion, der Expansion von MDSC und der Auswirkungen einer frühen antiretroviralen Therapie auf diese Systeme. Möglicherweise hat eine frühe Therapie, die gegen diese Systeme gerichtet ist, Einfluss auf den Krankheitsverlauf und könnte eine neue Heilungsstrategie darstellen. Künftig ist es die Aufgabe der Forschung, weitere Untersuchungen an die Ergebnisse dieser Studie anzuschließen, um die immunologischen Ereignisse in der akuten HIV-Infektion weiter zu definieren.

6. Literaturverzeichnis

1. **Gottlieb, M S.** Pneumocystis Pneumonia—Los Angeles 1981. *American Journal of Public Health.* 2006, Bd. 96, S. 980-983.
2. **Barré-Sinoussi, F, et al.** Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science.* 1983, Bd. 220, S. 868-871.
3. **Sharp, P M und Hahn, B H.** Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011, S. 1-22.
4. **UNAIDS.** Fact-Sheet 2016. <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>. 2016.
5. **RKI.** Schätzung der Zahl der HIV-Neuinfektionen und der Gesamtzahl von Menschen mit HIV in Deutschland. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2016/45/Art_01.html;jsessionid=EABF456460D51C95BCCF1E2593422343.2_cid298?nn=2374210. 2016.
6. **Blackard, J T, et al.** Transmission of human immunodeficiency type 1 viruses with intersubtype recombinant long terminal repeat sequences. *Virology.* 1999, Bd. 254, S. 220-225.
7. **Allan, J S, et al.** Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science.* 1985, Bd. 228, S. 1091-1094.
8. **Chan, D C, et al.** Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 1997, Bd. 89, S. 263-273.
9. **Lama, J, Mangasarian, A und Trono, D.** Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Current Biology.* 9, 1999, S. 622-631.
10. **Collins, K L, et al.** HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 1998, Bd. 391, S. 397-401.
11. **Klotman, M E, et al.** Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proceedings of the national academy of sciences.* 1991, Bd. 88, S. 5011-5015.
12. **Robinson, H L.** New hope for an AIDS vaccine. *Nature reviews.* 2002, Bd. 2, S. 230-242.
13. **Guerrero, S, et al.** HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus. *Viruses.* 2015, Bd. 7, S. 199-218.
14. **Dalglish, A G, et al.** The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 1984, Bd. 312, S. 763-767.
15. **Doranz, B J, et al.** A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell.* 1996, Bd. 85, S. 1149-1158.
16. **Feng, Y, et al.** HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 1996, Bd. 272, S. 872-877.
17. **Maartens, G, Celum, C und Lewin, S R.** HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. *Lancet.* 2014, Bd. 384, S. 258-271.

18. **Hu, W-S und Hughes, S H.** HIV-1 reverse transcription. *Cold spring Harb Perspect Med.* 2012, Bd. 2, a006882.
19. **Zack, J A, et al.** HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 1990, Bd. 61, S. 213-222.
20. **Laskey, S B und Siliciano, R F.** A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nature reviews. Microbiology.* 2014, Bd. 12, S. 772-780.
21. **Chun, T-W, et al.** Quantification of latent tissue reservoirs and total viral load in HIV--1 infection. *Nature.* 1997, Bd. 387, S. 183-188.
22. **Gouws, E und Cuchi, P.** Focusing the HIV response through estimating the major modes of HIV transmission: a multi-country analysis. *Sex Transm Infect.* 2012, Bd. 88, S. 76-85.
23. **Mehandru, S, et al.** Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The journal of experimental medicine.* 2004, Bd. 200, S. 761-770.
24. **Brenchley, J M und Douek, D C.** HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunology.* 2008, Bd. 1, S. 23-30.
25. **Garg, H, Mohl, J und Joshi, A.** HIV-1 Induced Bystander Apoptosis. *Viruses.* 2012, Bd. 4, S. 3020-3043.
26. **Gougeon , M L und Montagnier, L.** Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1999, Bd. 887, S. 199-212.
27. **Fraser, C, et al.** Variation in HIV-1 set-point viral load: Epidemiological analysis and an evolutionary hypothesis. *PNAS.* 2007, Bd. 104, S. 17441-17446.
28. **Streeck, H, et al.** Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells. *The Journal of Virology.* 2009, Bd. 83, S. 7641-7648.
29. **Soghoian, D Z, et al.** HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Science Translational Medicine.* 2012, Bd. 4, S. 1-18.
30. **Stacey, A R, et al.** Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *The Journal of Virology.* 2009, Bd. 83, S. 3719-3733.
31. **Nakagawa, F, et al.** Projected life expectancy of people with HIV according to timing and diagnosis. *AIDS.* 2012, Bd. 26, S. 335-343.
32. **Mogensen, T H, et al.** Innate immune recognition and activation during HIV-infection. *Retrovirology.* 2010, Bd. 7, S. 1-54.
33. **Brenner, B G, et al.** High rates of forward transmission events after acute/early HIV-1 infection. *The journal of infectious diseases.* 2007, Bd. 195, S. 951-959.
34. **Chen, J, et al.** Immunological and virological benefits resulted from short-course treatment during primary HIV infection: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013, Bd. 8, e82461.

35. **Fiebig, E W, et al.** Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV-infection. *AIDS*. 2003, Bd. 17, S. 1871-1879.
36. **McMichael, A J, et al.** The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*. 10, 2010, S. 11-23.
37. **Rosenberg, E S, et al.** Vigorous HIV-1–Specific CD4 T Cell Responses Associated with Control of Viremia. *Science*. 1997, Bd. 278, S. 1447-1450.
38. **Walker, C M, et al.** CD8+ Lymphocytes Can Control HIV Infection in Vitro by Suppressing Virus Replication. *Science*. 1986, Bd. 234, S. 1563-1566.
39. **McMichael, A und Rowland-Jones, S.** Cellular immune responses to HIV. *Nature*. 2001, Bd. 410, S. 980-987.
40. **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. *Journal of Virology*. 1997, Bd. 71 (4), S. 3120-3128.
41. **Walker, B D und Chakrabarti, S, et al.** HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature*. 1987, Bd. 328, S. 345-348.
42. **Cao, J, et al.** Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-secreting CD8+ T cells in primary HIV-1 infection. *The Journal of Virology*. 2003, Bd. 77, S. 6867-6878.
43. **Allen, T M, et al.** Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature*. 2000, Bd. 407, S. 386-390.
44. **Jin, B X, et al.** Dramatic Rise in Plasma Viremia after CD8+ T Cell Depletion Simian Immunodeficiency Virus-infected Macaques. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999, Bd. 189, S. 991-998.
45. **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. *Journal of Virology*. 1994, Bd. 68 (7), S. 4650-4655.
46. **Cao, J, et al.** Evolution of CD8 T Cell Immunity and Viral Escape Following Acute HIV-1 Infection. *The Journal of Immunology*. 2003, Bd. 171, S. 3837-3846.
47. **Price, D A, et al.** Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997, Bd. 94, S. 1890-1895.
48. **Wherry, E J und Ahmed, R.** Memory CD8 T cell differentiation during viral infection. *Journal of virology*. 2004, Bd. 78 (11), S. 5535-5545.
49. **Demers, K R und Makedonas, G, et al.** Temporal dynamics of CD8+ T cell effector responses during primary HIV infection. *PLoS Pathogens*. 2016, Bd. 12 (8), e1005805.
50. **Johnson, S, et al.** Cooperativity of HIV-specific cytolytic CD4T cells and CD8 T cells in control of HIV viremia. *The Journal of Virology*. 2015, Bd. 89, S. 7494-7505.
51. **Schieffer, M, et al.** Induction of Gag-specific CD4 T cell responses during acute HIV Infection is associated with improved viral control. *The Journal of Virology*. 2014, Bd. 88, S. 7357-7366.

52. **Young, M R, Newby, M und Wepsic, H T.** Hematopoiesis and Suppressor Bone Marrow Cells in Mice Bearing Large Metastatic Lewis Lung Carcinoma Tumors. *Cancer Research*. 1987, Bd. 47, S. 100-105.
53. **Trautmann, L, et al.** Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine*. 2006, Bd. 12, S. 1198-1202.
54. **Day, C L, et al.** PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006, Bd. 443, S. 350-354.
55. **Qin, A, et al.** Expansion of monocytic myeloid-derived suppressor cells dampens T cell function in HIV-1 seropositive individuals. *Journal of Virology*. 2013, Bd. 87, S. 1477-1490.
56. **Giorgi, J V, et al.** Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *The journal of infectious diseases*. 1999, Bd. 179 (4), S. 859-870.
57. **Brenchley, J M, et al.** Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*. 2006, Bd. 12, S. 1365-1371.
58. **Ho, H N, et al.** Circulating HIV-specific CD8 cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens. *The Journal of Immunology*. 1993, Bd. 150, S. 3070-3079.
59. **Hunt, P W, et al.** Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *The journal of infectious diseases*. 2008, Bd. 197, S. 126-133.
60. **Chen, L und Flies, D B.** Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013, Bd. 13 (4), S. 227-242.
61. **Greenwald, R J, Freeman, G J und Sharpe, A H.** The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology*. 2005, Bd. 23, S. 515-548.
62. **Freeman, G J, et al.** Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000, Bd. 192, S. 1027-1034.
63. **Kassu, A, et al.** Regulation of Virus-Specific CD4+ T Cell Function by Multiple Costimulatory Receptors during chronic HIV infection. *Journal of Immunology*. 2010, Bd. 185, S. 3007-3018.
64. **Jones, R B, et al.** Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008, Bd. 205, S. 2763-2779.
65. **Workman, C J und Vignali, D A.** Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *The Journal of Immunology*. 2005, Bd. 174, S. 688-695.
66. **Ahmadzadeh, M, et al.** Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009, Bd. 114, S. 1537-1544.
67. **Dong, H, et al.** Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*. 2002, Bd. 8, S. 793-800.

68. **D'Souza, M, et al.** Programmed Death 1 Expression on HIV-specific CD4+ T Cells is driven by Viral Replication and Associated with T Cell Dysfunction. *The Journal of Immunology*. 2007, Bd. 179, S. 1979-1987.
69. **Tian, X, et al.** The upregulation of LAG-3 on T-cells defines a subpopulation with functional exhaustion and correlates with disease progression in HIV-infected subjects. *The Journal of Immunology*. 2015, Bd. 194, S. 3873-3882.
70. **Hoffmann, M, et al.** Exhaustion of activated CD8 T cells predicts disease progression in primary HIV-1 infection. *PLoS Pathogens*. 2016, Bd. 12 (7), e1005661.
71. **Hurst, J, et al.** Immunological biomarkers predict HIV-1 viral rebound after treatment interruption. *Nature Communications*. 2015, Bd. 6, S. 8495.
72. **Greten, T F, Manns, M P und Korangy, F.** Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *International Immunopharmacology*. 2011, Bd. 11, S. 802-807.
73. **Bronte, V, et al.** Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*. 2015, Bd. 7, S.12150.
74. **Ostrand-Rosenberg, S und Sinha, P.** Myeloid-derived suppressor cells : Linking inflammation and cancer. *The journal of immunology*. 2009, Bd. 182, S. 4499-4506.
75. **Dumitru, C A, et al.** Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother*. 2012, Bd. 61, S. 1155-1167.
76. **Vollbrecht, T, et al.** Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells. *AIDS*. 2012, Bd. 26, S. 31-37.
77. **Dross, S E, et al.** Kinetics of myeloid-derived suppressor cell frequency and function during simian immunodeficiency virus infection, combination antiretroviral therapy, and treatment interruption. *The Journal of Immunology*. 2016, Bd. 198, S. 757-766.
78. **Tumino, N, et al.** Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Increased in Early Phases of Primary HIV Infection Depending on TRAIL Plasma Level. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 74, 2017, S. 575-582.
79. **Lin, Z, et al.** In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells. *Nature Protocols*. 2014, Bd. 9 (7), S. 1563-1577.
80. **Walker, B und McMichael, A.** The T-cell response to HIV. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012, Bd. 2 (11), a007054.
81. **Zhang, ZN, et al.** Myeloid-Derived Suppressor Cells Associated With Disease Progression in Primary HIV Infection: PD-L1 Blockade Attenuates Inhibition. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2017, Bd. 76, S. 200-208.
82. **Grützner, EM, et al.** Treatment intensification in HIV-infected patients is associated with reduced frequencies of regulatory T cells. *Frontiers in Immunology*. 2018, Bd. 9, S. 811.
83. **Agrati, C und Tumino, N, et al.** Myeloid derived suppressor cells expansion persists after early ART and may affect CD4 T cell recovery. *Frontiers in Immunology*. 2019, Bd. 10, S. 1886.

84. **Appay, V, et al.** Dynamics of T cell responses in HIV infection. *Journal of Immunology*. 2002, Bd. 168 (7), S. 3660-3666.
85. **Ndhlovu, Z M, et al.** Magnitude and kinetics of CD8+ T cell activation during hyperacute HIV infection impact viral set point. *Immunity*. 2015, Bd. 43 (3), S. 591-604.
86. **Steiner, K, et al.** Enhanced expression of CTLA-4 (CD152) on CD4+ T cells in HIV infection. *Clinical and experimental immunology*. 1999, Bd. 115 (3), S. 451-457.
87. **Kaufmann, D E, et al.** Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nature immunology*. 2007, Bd. 8, S. 1246-1254.
88. **Leng, Q, et al.** CTLA-4 upregulation during HIV infection: Association with anergy and possible target for therapeutic intervention. *AIDS*. 2002, Bd. 16 (4), S. 519-529.
89. **Walker, BD und Plata, F.** Cytotoxic T-lymphocytes against HIV. *AIDS*. 1990, Bd. 4, S. 177-184.
90. **Hoffenbach, A, et al.** Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *Journal of immunology*. 1989, Bd. 142, S. 452-462.
91. **Learn, G H, et al.** Virus population homogenization following acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*. 2002, Bd. 76, S. 11953-11959.
92. **Grossman, Z, et al.** Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nature medicine*. 2006, Bd. 12, S. 289-295.
93. **Février, M, Dorgham, K und Rebollo, A.** CD4+ T Cell Depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: Role of Apoptosis. *Viruses*. 2011, Bd. 3, S. 586-612.
94. **Fromentin, R, et al.** CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLOS Pathogens*. 2016, Bd. 12, S. 1-19.
95. **von Herrath, M G, et al.** CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T-lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *Journal of Virology*. 1995, Bd. 70, S. 1072-1079.

7. Anhang

7.1. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Sektion für Klinische Infektiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV durchgeführt. Für die Möglichkeit der Durchführung dieser Studie möchte ich mich bei dem Leiter der Abteilung, Herrn Professor Bogner herzlich bedanken.

Ausdrücklich danken möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Rika Draenert für die Bereitstellung des Themas und die zielgerichtete Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit. In Ihrer zuverlässigen und kompetenten Unterstützung ist Sie mir ein Vorbild.

Auch meinem Betreuer Hans Christian Stubbe gilt mein Dank für seine ausgezeichnete fachliche Unterstützung während meines Projekts und beim Verfassen dieser Arbeit. Ich schätzte ihn als nahbaren und geduldigen Ansprechpartner, der mir einen Einblick in den medizinischen Forschungsbetrieb ermöglichte.

Bei Renate Stirner bedanke ich mich für ihre uneingeschränkte Hilfe bei praktischen und theoretischen Fragen. Sie arbeitete mich geduldig in die methodischen Arbeitsweisen der Immunologie ein und ich empfand ihr herzliches Wesen auch im Privaten als große Bereicherung.

Außerdem möchte ich mich bei allen Patienten bedanken, die ihr Blut für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt haben. Hierbei ist die freundliche Zusammenarbeit zur Rekrutierung akut HIV-infizierter Probanden mit den Münchner Zentren Isarpraxis, MVZ Karlsplatz, Prinzmed, ZIMI und der TU München besonders hervorzuheben.

Zuletzt gilt mein Dank meinem Ehemann Matthias, meiner Familie und meiner besten Freundin Carina, die mir zu jeder Zeit geduldig zur Seite gestanden und mich unermüdlich unterstützt haben.

7.2. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der Arbeit wurden bei der Gemeinsamen Jahrestagung von DGI und DZIF 2017 und beim Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT) 2018 als Poster präsentiert. Beim KIT 2018 erhielt die Arbeit den Posterpreis. Im Folgenden wurde das Abstract des vorgestellten Posters abgedruckt.

Ein Manuskript zu den Ergebnissen ist in Arbeit.

Immune regulatory mechanisms in acute HIV-1 infection within the TopHIV cohort

Katharina Mücke[#], Hans Christian Stubbe[#], Alexandra Jablonka, Melanie Stecher, Renate Stirner, Raffaele Conca, Ulrich Kastenbauer, Ramona Pauli, Nils Postel, Christoph Spinner, Eva Wolf, Georg Behrens, Jörg Janne Vehreschild, Johannes Bogner, Rika Draenert

[#] contributed equally

Objectives: Chronic HIV-1 infection causes functional T cell exhaustion. Recent data indicate that myeloid-derived suppressor cells (MDSC), as well as immune checkpoints on T cells are involved in the inhibition of T cell function. Levels of MDSC during primary HIV-1 infection and their impact on T cell exhaustion and clinical outcome have not been studied yet. In this study, we aim to characterize the dynamics of MDSC and their relation to immune checkpoint expression on HIV-specific T cells in acutely infected individuals. Additionally, we are investigating the impact of combined antiretroviral therapy (cART) on these systems. This project is a subproject of the Translational Platform HIV (TP-HIV) of the German Center for Infection Research (DZIF).

Methods: We measure MDSC frequencies (both subgroups PMN-MDSC and M-MDSC) in PBMC and expression of immune checkpoints PD-1, CTLA-4, LAG-3 and TIM-3 on T cells using two multicolour flow-cytometry panels for surface and intracellular staining. To identify HIV-specific T cells, we stimulate PBMC with the HIV-peptides Gag, Nef, Rev and Tat. We compare acutely infected HIV-patients with chronically infected individuals and healthy controls. Patient samples are being obtained from the Treatment of primary HIV (TopHIV) cohort.

Results: Our data shows that the frequency of PMN-MDSC was markedly elevated and statistically significantly higher during primary HIV-1 infection compared to treated chronic infection ($p=0.036$) and healthy controls ($p=0.007$). 12 weeks after starting cART, PMN-MDSC levels had decreased significantly ($p=0.009$). In line with published data, we observed higher expression of PD-1, CTLA-4, LAG-3 and TIM-3 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells during HIV-infection compared to healthy controls.

Conclusion: PMN-MDSC frequencies are significantly elevated during primary HIV-infection. cART reduces them to the level of healthy controls after 12 weeks of treatment. Currently, we are correlating these results with immune checkpoint expression on T cells and HIV-1 specific T cell responses.

7.3. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Rotheneder, Katharina

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

Immunregulatorische Mechanismen in der akuten HIV-Infektion

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.

München, 28.10.2021

Ort, Datum

Katharina Rotheneder