

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl Virologie  
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Dölken

Einfluss der N-Glykosylierung von HIV-Env auf die Krankheitsprogression der  
HIV-Infektion



Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Dimos Georgakopoulos  
aus Nürnberg  
Würzburg, Mai 2020

Referent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Carsten Scheller

Korreferent: apl. Prof. Dr. med. Hartwig Klinker

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2020

Der Promovend ist Arzt

*Για τους γονείς μου, Μαμά και Χάραλντ*

*Για την Βάια*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Humanes Immundefizienz Virus (HIV).....	1
1.2. Epidemiologie .....	2
1.2.1. Subsahara-Afrika .....	3
1.2.2. Lateinamerika und Karibik.....	3
1.2.3. Asien .....	4
1.2.4. Vereinigte Staaten von Amerika.....	4
1.2.5. Europa.....	5
1.3. Morphologie und Genom von HIV .....	5
1.3.1. Replikation von HIV .....	6
1.4.1. Primärinfektion und Virusausbreitung.....	8
1.4.2. Chronische Infektion.....	9
1.4.3. Escape .....	9
1.5. Die Rolle der lymphatischen Organe bei der HIV-Pathogenese .....	10
1.5.1. Bedeutende Rezeptoren bei der HIV-Pathogenese .....	12
1.5.2. Die Zielzellen von HIV .....	13
1.5.3. Reaktion des Immunsystems auf die HIV-Infektion .....	15
1.5.4. Humorale Antwort.....	15
1.5.5. Zelluläre Antwort .....	16
1.6. Diagnose der HIV-Infektion.....	17
1.7. Langzeitstabile.....	19
1.7.1. Viruslast bei Langzeitstabilen.....	20
1.7.2. Langzeitstabile und CD4-Zellen .....	21
1.7.3. Immunantwort bei Langzeitstabilen .....	22
1.7.4. Histokompatibilitätsantigen bei Langzeitstabilen .....	23

1.7.5.	Bedeutung der CD8-Zellen bei Langzeitstabilen .....	24
1.7.6.	CD8-T-Zell Rezeptor bei Langzeitstabilen.....	25
1.7.7.	TCR-Klonotypen von CD8.....	26
1.7.8.	Natürliche Killerzellen und deren Rolle in der HIV-Infektion .....	27
1.7.9.	Neutralisierende Antikörper bei Langzeitstabilen .....	27
1.8.	Allgemeines zur Therapie der HIV-Infektion .....	29
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>30</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>31</b>
3.1.	Patientendaten .....	31
3.1.1	HLA Typisierung.....	31
3.1.2	Titertest/Neutralisationstest.....	32
3.1.3	p24-Färbung.....	33
3.2	Env-Sequenzen .....	33
3.3	Protein Alignment .....	34
3.4	Analyse der N-linked Glykosylierung .....	36
3.5	Statistische Untersuchungen .....	36
3.5.1.	D'Agostino & Pearson Test .....	36
3.5.2.	Standard t-Test .....	37
3.5.3.	Mann-Whitney Test .....	38
3.5.4.	Einfaktorielle Varianzanalyse .....	39
3.5.5.	Balkendiagramm/Substraktions-Balkendiagramm.....	40
3.6.	Glycan Shield mapping.....	41
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1.	Zeitlicher Verlauf der laborchemischen Ergebnisse des Fallbeispiels ....	41

4.1.1.	HLA-Typisierung .....	48
4.1.2.	Ergebnis des Neutralisationstests/p24-Färbung.....	49
4.2.	Vergleich der Glykosylierungsdichte von V1V2 bei ECs und Progressoren .....	49
4.3.	Vergleich der Glykosylierungsdichte von V3 bei ECs und Progressoren .....	50
4.4.	Vergleich der Glykosylierungsdichte von CD4 bei ECs und Progressoren .....	51
4.5.	Vergleich der Glykosylierungsdichte von CD4bs bei ECs und Progressoren .....	52
4.6.	Vergleich der Glykosylierungsdichte des gesamten ENVs bei ECs und Progressoren .....	53
4.7.	Vergleich der drei auffälligen MPER Sequenzen miteinander .....	54
4.8.	Vergleich der Glykosylierungsdichten zwischen ECs und Progressoren entlang der Aminosäurepositionen .....	56
4.9.	Glycan Shield Mapping – Vergleich der Progressoren und ECs.....	59
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>Fazit/Ausblick</b> .....	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
7.1.	Einleitung.....	66
7.2.	Material und Methoden .....	66
7.3.	Ergebnisse und Diskussion .....	67
<b>8.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>68</b>
8.1.	Literaturverzeichnis .....	68
8.2.	Abbildungsverzeichnis/Bildrechte .....	76

# 1. Einleitung

## 1.1. Humanes Immundefizienz Virus (HIV)

Das humane Immundefizienz-Virus gehört zur Gattung der Retroviren. Es wird

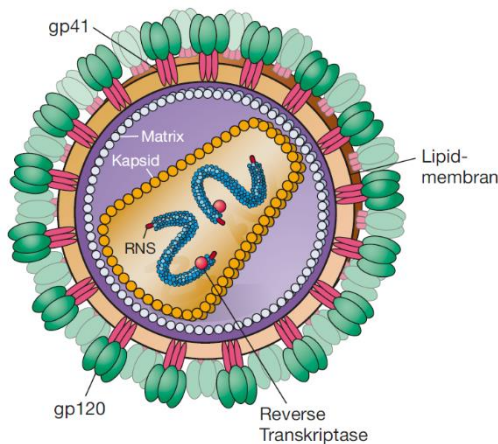


Abbildung 1.1: Struktur von HIV-1 (© mit schriftlicher Genehmigung des ABW Wissenschaftsverlags)

der Subgruppe der Lentiviren zugeordnet, die der Gruppe der Retroviren untergeordnet ist. Aufgrund unterschiedlicher Charakterisierung entstanden die Subfamilien der Oncoviridae, Spumaviridae und Lentiviridae (Fanales-Belasio et al. 2010). Der Begriff „Retrovirus“ umfasst alle Viren, die die Möglichkeit haben ihr Genom in eine DNA-Kopie umzuwandeln. Hinsichtlich dessen hat man Retroviren in sieben große

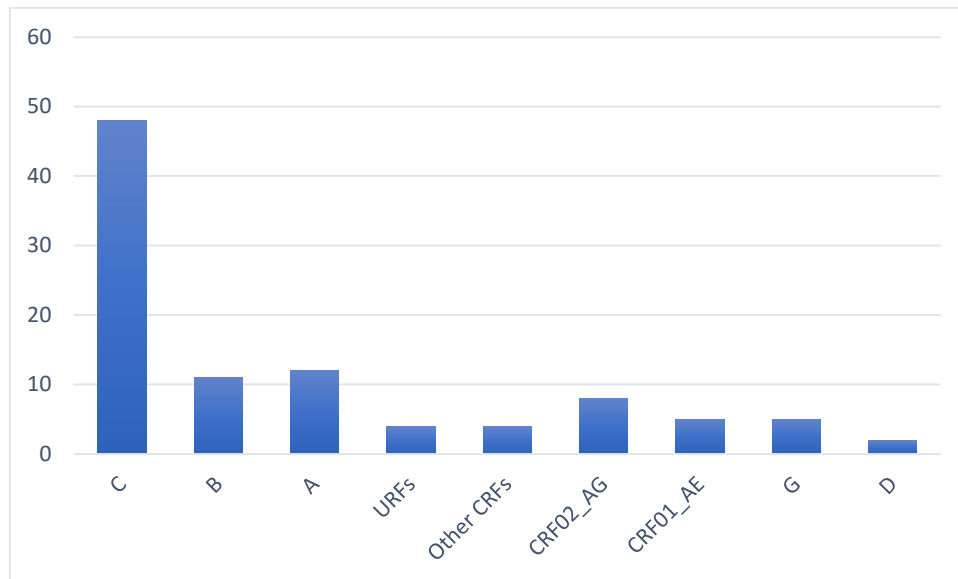
Subfamilien unterteilt. Für den Menschen sind hiervon zwei Gruppen pathogen: Deltaretroviren (HTL-1) und Lentiviren (HIV) (Virologisches Institut Klinische Chemie und Molekulare Virologie Universitätsklinikum Erlangen 2012). Der Genomaufbau der Lentiviren ist sehr komplex. Das humane Immundefizienz-Virus wird in zwei Typen unterteilt HIV-1 und HIV-2, beide sind Erreger des erworbenen Immundefizienz Syndroms (AIDS). Niemand hätte Anfang der 80er Jahre geglaubt, dass diese Krankheit eines der globalsten Probleme unserer Erde sein würde. Die beiden Typen von HI-Viren haben sich unterschiedlich durch die Evolution entwickelt. HIV-1, der Gruppe M und N, entstammt aus einem Lentivirus (Maes et al. 2019). HIV-2 wurde erstmalig 1986 isoliert und war primär als Zoonose beschrieben, das von einem Rußmangaben auf den Menschen übertragen wurde (Gao et al. 1999a). Die Unterschiede zwischen den beiden HIV-Typen werden folgend aufgelistet. Das HIV-1 untergliedert sich in vier Gruppen: M, N, O, P. Aus diesen Gruppen tritt insbesondere die Gruppe M heraus. Diese wird wiederum in die Subtypen A-F eingeteilt. Das überwiegende Vorkommen des Subtyps C ist West-/Zentralafrika, hingegen kommt der Subtyp B weltweit vor. HIV-2 weist einen leicht veränderten Genomaufbau auf im

Vergleich zu HIV-1. Dieser Typ tritt überwiegend in Westafrika auf und hat nicht die gleiche Infektiosität wie HIV-1 (Nyamweya et al. 2013; 227:240, 222:240).

## 1.2. Epidemiologie

Als 1983 HIV in Paris identifiziert wurde, hätte man nicht geglaubt, dass das Virus ein bis heute globales Problem bleiben würde. Bis zur Entdeckung in den USA im Jahr 1981, bestand zuvor sicherlich eine jahrzehntelange Verbreitung in den afrikanischen Ländern (Worobey et al. 2008; 2:12). Zuerst wurde das akute Immundefizienz-Syndrom bei homosexuellen Männern festgestellt. Phylogenetische Studien zeigten, dass das Virus bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts in afrikanischen Ländern nachzuweisen war. Verschiedene Studien bestätigen eine zoonotische Transmission zu den Menschen (Heeney et al. 2006, 313:462; Gao et al. 1999b, 397:436). Hierunter verzeichnen verschiedene Ansätze Gemeinsamkeiten zwischen SIV und HIV, die geographische Korrelation zwischen dem Reservoir dieser Tiere und dem Auftreten der Krankheit beim Menschen als auch simpel gesagt eine „plausible Transmissionsroute“ (Thomas C. Quinn 2016). Im Vergleich zu 1981 hat sich heute die Krankheit weltweit ausgebreitet. Inzwischen wird AIDS in jeder Population, in jedem Land und in jeder Kultur beschrieben. Zum Ende des Jahres 2015 wiesen 36,7 Millionen Menschen auf der Erde eine Infektion mit HIV auf oder litten an AIDS. Im selben Jahr gab es 2,1 Millionen Neuinfizierte und 1,1 Millionen Menschen starben an den Folgen dieser Erkrankung. Aufgrund der antiretroviralen Therapie scheint sich die Prävalenz von HIV über die Jahre stabilisiert zu haben. Die Inzidenz im Jahr 2015 weist eine Reduktion von 38 % im Vergleich zu 2001 auf, hier gab es 3,6 Millionen AIDS-Todesfälle. Geschätzt drei Viertel der weltweiten HIV-infizierten Menschen leben in Subsahara-Afrika. Im Jahr 2013 lag die Prävalenz in Nord- und Mittelfrika bei < 0,1 Prozent im Vergleich zu 4,7 Prozent in Schwarzafrika. HIV/AIDS war 2013 eine der zehn häufigsten Todesursachen auf der Welt (Thomas C. Quinn 2016).





**Abbildung 1.2: Infektionen der einzelnen HIV-1 Subtypen in Korrelation zur Gesamtzahl der HIV-1 Infizierten zwischen 2004 und 2007 (Angaben in Prozent)**

### 1.2.1. Subsahara-Afrika

Wie oben schon beschrieben leben drei Viertel der weltweiten HIV-Infizierten oder an AIDS-Leidenden in diesem Gebiet. Über das letzte Jahr verzeichnet sich hier eine Stabilisierung oder gar Reduktion der Epidemie. Zudem zeigen Daten hier einen zunehmenden Zugang von HIV-infizierten Menschen in dieser Region zu medikamentöser Therapie mit gleichzeitigem Rückgang der AIDS-Todesfälle um 39% in einem Zeitraum zwischen 2005 und 2013. In dieser Region spielt die heterosexuelle Transmission eine wichtige Rolle. Statistiken zeigen, dass Mädchen im Alter zwischen 15 und 19 Jahren eine fünfmal höhere Prävalenz aufweisen als Jungen des gleichen Alters. Zur Prostitution gezwungene Frauen repräsentieren in diesen Gebieten eine Hochrisikogruppe. In einer systematischen Studie zeigten letztere eine Prävalenz von 11,8 % im Vergleich zur übrigen Frauenpopulation (Baral et al. 2012, 12:538).

### 1.2.2. Lateinamerika und Karibik

Nach Subsahara-Afrika weist die Karibik die global zweithöchste HIV-Prävalenz auf. Über 50% der HIV-Infizierten leben auf Haiti. Von den geschätzten zwei Millionen Infizierten in Lateinamerika leben ungefähr drei Viertel in Brasilien, Kolumbien, Mexiko und Venezuela. Im Vergleich zu Subsahara-Afrika erfolgt die

Übertragung in diesem Gebiet überwiegend über den homosexuellen Kontakt zwischen Männern.

### 1.2.3. Asien

Die Prävalenz in Asien ist gering, jedoch weist sie hier mit 0,6 % einen erhöhten Stellenwert auf, da die Hälfte der Weltpopulation in dieser Region lebt. Ungefähr die Hälfte der 5,1 Millionen Infizierten in Asien leben in Indien (The Global HIV/AIDS pandemic, 2006 2006, 55:841; UNAIDS 2014). Der sexuelle Übertragungsweg ist mit 85% die Hauptursache für die Ausbreitung der Krankheit in Indien. Eine soziale Abneigung gegenüber Verhütungsmitteln, wie z.B. Kondomen, und Gesetze, die die Homosexualität verbieten, sind ursächlich für die Ausbreitung. In China beträgt die Prävalenz nur 0,05 %. In fünf Provinzen (Guangdong, Guangpxi, Xinjiang, Yunnan und Henan) sind Fälle beschrieben, bei denen sich die Menschen an einer Plasmaspende infizierten. Eine hohe Rate an Neuinfizierten wird via Drogenkonsum (49%) und Geschlechtsverkehr (50%) verzeichnet.

### 1.2.4. Vereinigte Staaten von Amerika

Zum Ende des Jahres 2014 wiesen ca. 1,2 Millionen Menschen in den USA eine HIV-Infektion auf (CDC 2014). Mitte der 90er Jahre konnte durch antivirale Medikamente der Progress der HIV-Infektion zur Entwicklung eines akuten Immundefizienz-Syndroms dramatisch gebremst werden. Von 2009 bis 2014 sank die Zahl der neuinfizierten Personen von 10,2 auf 8,4 pro 100.000 Einwohner. Bestimmte ethnische Minderheiten in den USA weisen paradox eine ungewöhnlich hohe Rate an HIV-Infektionen auf. Im Jahr 2014 lag die Rate an neuinfizierten Personen bei Schwarzafrikanern, Latinos und Individuen anderer Volksgruppen höher als der Durchschnitt (CDC 2014). Ebenso zeigen Daten in den USA, dass ungefähr 80% der neuinfizierten Personen im Jahr 2014 Männer waren. Davon sind 70% als homosexuell verzeichnet. Diese Korrelation weist in Vergleich zu den letzten Jahren einen kontinuierlichen Anstieg auf (Centers for Disease Control and Prevention 2012, 61:962). Dagegen liegt der Prozentsatz neuinfizierter heterosexueller Personen bei 24.

### 1.2.5. Europa

In Europa zählte die WHO European Region zum Ende des Jahres 2015 ca. 1,7 Millionen HIV-Infizierte (HIV/AIDS surveillance in Europe 2013 2014). 2015 wurden in Europa 190.000 Neuinfizierte verzeichnet. Dies ist ein Anstieg von 57 % im Vergleich zu 2010. Zurückzuführen ist das auf eine dramatische Erhöhung der Neuinfektionen in Osteuropa. Die höchsten Prävalenzen wurden in Russland, der Ukraine und Estland festgestellt. In dieser Region (Osteuropa) werden nur ca. 21% der HIV-infizierten mit antiviraler Therapie behandelt. Die Todesrate in diesen Ländern ist im Vergleich zu 2010 um 22% gestiegen. Der Übertragungsweg in Europa unterscheidet sich von Region zu Region. In West- und Mitteleuropa ist der sexuelle Kontakt zwischen homosexuellen Männern die Hauptursache der Ausbreitung, dagegen sind in Osteuropa der heterosexuelle Kontakt und der intravenöse Drogenabusus überwiegend ursächlich.

### 1.3. Morphologie und Genom von HIV

Im Elektronenmikroskop weist das humane Immundefizienz-Virus die Form eines Ikosaeders auf. Es zeigen sich zahlreiche Fortsätze an der Außenseite, die aus den hauptsächlichen Hüllproteinen des Virus bestehen, das gp120 und gp41. Die HIV-Hülle liegt als trimeres Heterodimer vor (Ward und Wilson 2015). Die Hüllproteine des Virus haben spezifische Eigenschaften. Das gp120 kooperiert mit den zellulären Rezeptoren für HIV und das gp41 vollbringt nach Konformationsänderung und Expression der Korezeptoren schließlich die Verschmelzung der Membranen zwischen HI-Virus und Zielzelle (Garg und Blumenthal 2008, 1:17). Im Inneren des Virus gibt es Gene, die die Strukturproteine kodieren. Hierzu zählen das gag, das Proteine für den Kern des Virus verschlüsselt. Mithilfe des pol-Gens werden Proteine gebildet wie die Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase. Schließlich verschlüsselt das Env-Gen die Glykoproteine der Virusmembran. Außer diesen drei wichtigen Genen beinhaltet HIV-1 weitere Gene wie Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr und Vpu. Diese verschlüsseln Proteine, die die Destabilisierung der Wirtszelle und somit die virale Genexpression dort verstärken. In diesen Genen liegt ebenfalls der große Unterschied zwischen dem Genom von HIV-1 und HIV-2. Im Genom von HIV-2 befindet sich statt dem Vpu-Gen ein Vpx-Gen (Nyamweya et al. 2013; 231:240).

Im Vergleich zu HIV-1 kann HIV-2, dank des *vpx* Proteins, einen Inhibitionsfaktor der Makrophagen, den sogenannten SAMHD1, effizient abbauen/inaktivieren, so dass eine Infektion myeloischer Zellen möglich gemacht werden kann (Hrecka et al. 2011). Zu Beginn produzieren die Gene unreife Viruspartikel, die zu reifen, infektiösen Virionen heranwachsen durch Trennung der Gag- und Gag-Pol Vorläuferproteine. Dieser Schritt wird durch die virale Protease unterstützt. Im Inneren eines reifen Virions befindet sich das p17-Matrixprotein, das mit dem gp41 und dem Kapsid reagiert. Letztlich besteht das sich im Kern befindende Kapsid aus dem p24-Core Antigen, das diploide virale RNA-Genom, die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, sowie einer bestimmten tRNA, die als Primer dient (Lingappa et al. 2014, 2:46, 9:46).

#### 1.3.1. Replikation von HIV

Eine der bedeutenden Haupteigenschaften des Virus ist die Umwandlung von RNA in DNA durch das Enzym Reverse Transkriptase. Sowohl HIV-1 und HIV-2 nutzen das CD4-Molekül auf der Zelloberfläche zur Bindung und Übermittlung des Zellinhaltes. Hierbei dient ein CD4-Molekül als „primärer Rezeptor“. Dieses Molekül befindet sich hauptsächlich auf T-Helferzellen, dendritischen Zellen, MHC-Klasse II- restringierten T-Effektorzellen und selten B-Zellen. Es kommt zur Konformationsänderung im gp120, so dass dieses einen sekundären Rezeptor zum Vorschein bringt (Garg und Blumenthal 2008). Hierbei handelt es sich um die beiden Korezeptoren CCR5 und CXCR4, die zur Familie der G-Protein-assoziierten Zellrezeptoren mit 7 Transmembranen-Domänen gehören. Dieser Schritt spielt eine wichtige Rolle für die Fusion in die Zelle und den weiteren morphologischen Veränderungen, denen das Virus unterzogen wird (Pancera et al. 2010; 1166:1171). Durch die Konformationsänderung des gp120 kommt es zur Bindung der Zellmembran der Wirtszelle mit der Plasmazellmembran durch das gp41. Das gp41 besitzt zwei helikale Bereiche, die zu einem 6-Helix Bündel fungieren und die beiden Zellmembranen zueinander führen (Garg und Blumenthal 2008). Nach der Vereinigung werden die Kapsidhüllproteine freigesetzt. Der Präintegrationskomplex, bestehend aus RNS, Enzymen und akzessorischen Proteinen des Virus, passiert die Zellmembran in Richtung Virus. Auf dem Weg wird die RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in eine

doppelsträngige, provirale DNS umgewandelt. In dieser Phase könnte ein Faktor namens TRIM5-a, ein Hemmfaktor, die Replikation des Virus in der Wirtszelle unterbinden (Ganser-Pornillos und Pornillos 2019). Ein Proteinkomplex namens APOBEC kann im Allgemeinen die Infektion durch das Virus beim Eindringen in den Zellkern stoppen. Jedoch fördert das *vif*-Protein von HIV den proteasomalen Abbau des Proteinkomplexes, sodass dieser machtlos bleibt. Im Zellkern kommt die Integrase zum Einsatz, die aus dem HIV-*pol* Gen kodiert wird. Vor der Bindung viraler DNA mit Wirts-DNA erfolgt die Bildung eines „Präintegrationskomplexes“. Dieser wird zum Zellkern transportiert, sodass die Fusion der beiden DNA-Stränge durch Integrase vollzogen werden kann (Craigie 2012, 1-2:14). Das Besondere an der Integration ist zum einen die Aufnahme als Bestandteil des Wirtsgenoms, was zur langfristigen Persistenz führt, und zum anderen die Integration meistens im Bereich „aktiver“ Gene, sodass das Virus eine Latenz bis hin zur manifesten Genexpression aufweisen kann. Im Wirtsgenom befindet sich das HIV Gen meistens im Latenzstadium. Mit dem Einschluss des HIV-Genoms in das Wirtsgenom ist die Infektion vollendet. Um die Entstehung neuer Virionen zu ermöglichen, wird die DNS transkribiert in HIV-RNS. Für diesen Schritt ist das Protein *tat* wichtig (Humanes Immunschwächevirus (HIV) 2004; 85:95). Der Nucleus des Virus besteht aus HIV-Proteinen, Enzymen und viraler RNS und empfängt seine Außenhülle erst beim Austreten aus der Wirtszelle. Dieser Prozess wird als „Aussprossen“ oder „budding“ bezeichnet. Während dieser Phase spaltet die virale Protease das *gag-pol* Vorläufermolekül, sodass ein reifes Virus entstehen und neue Zellen befallen kann (Sundquist und Kräusslich 2012; 1:24).

#### 1.4. HIV-Pathophysiologie

Hauptangriffspunkt der HIV-Infektion sind die T-Helferzellen, eine Gruppe der T-Lymphozyten. Diese Subgruppe besitzt als Charakteristikum ein CD4-Molekül auf der Oberfläche und wird durch dies im Phänotyp definiert. Wie oben beschrieben, ist CD4 der „primäre Rezeptor“ für HIV (Freeman et al. 2010, 2:19). Man hat mehrere Immundefekte durch HIV in der Vergangenheit erkannt. Hierzu zählen die direkte Zerstörung der Zelle durch HIV, indirekte Zerstörung mittels

Immun-Clearance, Apoptose nach fehlerhafter Aktivierung der Zelle durch das Immunsystem oder letztlich Ermüdung des Immunsystems nach wiederholter Aktivierung mit Funktionsstörungen der Zelle. Durch die fortschreitende und zunehmende Zerstörung der CD4-Zellen und die Reduktion unter einer quantitativ kritischen Grenze, kommt es zur Entstehung opportunistischer Krankheiten beim Patienten.

#### 1.4.1. Primärinfektion und Virusausbreitung

Schon bei Eintritt des Virus durch die Mukosa kann es durch Langerhans-Zellen zur Durchquerung dieser Schicht kommen. Verletzungen der Schleimhaut oder ulzeröse Genitalerkrankungen erleichtern die Penetranz des Virus. Nach dem Eindringen sucht das Virus CD4-Zellen, die sich sowohl im aktivierten als auch inaktiven Zustand befinden. Hierbei spielt es eine wichtige Rolle, dass aktivierte CD4-Zellen eine weitaus höhere Virusvermehrung vollbringen als erstmalig inaktiv infizierte Zellen. Ruhende CD4-Zellen bilden in diesem Zusammenhang ein großes Virusreservoir (Chun et al. 1997). Ist die Infektion vollbracht, führt das Virus seine Replikation und Vermehrung in lymphoiden Zellen der Mukosa/Submukosa und auch im lymphoretikulären Gewebe des Darms durch. Die Zeit, in der die Virusvermehrung vonstattengeht, ohne Nachweis einer Infektion, wird als Eklipse bezeichnet. In dieser Zeit erfolgt auch der Versuch der Elimination des Virus durch den menschlichen Organismus, hierbei wird dieses in die lymphatischen Organe (Lymphknoten) transportiert, bei denen sich zahlreiche CD4-Zellen befinden. Es kommt zum rapiden Fortschreiten der Viruslast mit nachweisbarer Virämie im Plasma und letztlich zum akuten HIV-Syndrom, das sich beim Patienten z.B. mit grippeähnlichen Symptomen ausdrückt. In welcher Schnelligkeit der Progress der HIV-Infektion voranschreitet, entscheidet nicht die primäre Viruslast, sondern der Stand der Viruslast nach einem Jahr (setpoint). Dieser Faktor spielt eine wichtige Rolle für die Prognose der HIV-Infektion. Hierbei entwickeln Infizierte mit einem hohen setpoint viel schneller AIDS als Infizierte mit einem niedrigeren setpoint (Huang et al. 2012, 2:12).

#### 1.4.2. Chronische Infektion

Trotz verstärkter Immunantwort kann sich das Virus im menschlichen Körper weiter entfalten und scheint nie aus dem Körper eliminiert werden zu können. Beim nicht behandelten Patienten kommt es zur chronischen Infektion über eine Zeitspanne von ca. 10 Jahren. Bei anderen Viren kommt es mittels medikamentöser Therapie oder Immunantwort letztlich zur Elimination und Entstehung spezifischer Antikörper zur Vorbeugung neuer Infektionen. HIV dagegen zeigt sich, trotz antiretroviraler Therapie und fehlender Viruslast im Plasma, weiterhin replikationsfähig. In dieser Phase, die auch als Latenzphase genannt wird, ist der Patient asymptomatisch, jedoch befasst sich sein Immunsystem tagtäglich mit der Viruspersistenz bis es schließlich erschöpft ist. Mit den Jahren kommt es zum Verlust der CD4-Zellzahl. Die immunologischen Veränderungen führen zu Manifestationen wie einer reduzierten Reaktion vom verzögerten Typ, reduzierten spezifischen Antikörperantworten, reduzierter Interferon- und Lymphokinbildung, reduzierter Proliferation von T- und B-Lymphozyten und unter anderem der reduzierten Funktion von natürlichen Killerzellen (Moir et al. 2001; Moir et al. 2004). Durch die langfristige Zerstörung der CD4-Zellen kommt es zur Entstehung opportunistischer Krankheiten und letztlich zur AIDS assoziierten Erkrankung.

#### 1.4.3. Escape

Es ist bewiesen, dass HIV sein Genom in das Genom der Wirtszelle implementieren kann. In diesem Zustand kann das Virus über Jahre „latent“ persistieren. In dieser Phase gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine medikamentöse Therapie, die diesen Zustand angreifen kann. Hierbei ist es möglich, dass das Virus im Verlauf erneut in einen replikationsfähigen Zustand kommen kann. Dies ist die Hauptursache, weshalb HIV heutzutage nicht aus dem Körper eliminiert werden kann. In diesem Zusammenhang besteht auch die Voraussetzung zur chronischen Infektion. Trotz starker humoraler und zellulärer Immunantwort schafft es das Virus, im Körper durch verschiedene Mechanismen zu überleben. Als erster Punkt wird die Entstehung neuer „Quasispezies“ genannt, die im Grunde genommen auf neuen Virusvarianten basiert. Gerade HIV besitzt eine sehr hohe Replikationsrate, die in Kombination mit einer

erhöhten Fehlerrate der Reversen Transkriptase zu einer hohen Variabilität führt. Diese neuen Partikel können von neutralisierenden Antikörpern oder zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) nicht erkannt werden. Der zweite Mechanismus besteht in der Fähigkeit der Hüllproteine ihre potenziellen Angriffspunkte zu maskieren. Dies verringert die Wirkung der neutralisierenden Antikörper. Durch gezielte Strategie kann HIV sich den neutralisierenden Antikörpern widersetzen. Es versucht, eine Hypervariabilität der ersten Sequenz des Envelope-Proteins zu entwickeln.

Ein weiterer Mechanismus ist, dass HIV mithilfe der Proteine *nef*, *tat* und *vpu*, Rezeptoren von der Zelloberfläche entfernt, durch die diese von zytotoxischen T-Zellen erkannt und im Anschluss zerstört werden. Somit erkennen T-Helferzellen infizierte Zellen schlechter und bleiben somit verschont. In einem weiteren Prozess kommt es zur Liquidierung der CD4-Zellen, die eine wichtige Rolle in der antiviralen Immunantwort spielen, so dass weniger T-Helferzellen oder CTLs aktiviert werden. Als letzter Schritt gilt der „Rückzug“ von HIV in Zellen des zentralen Nervensystems, in die Immunzellen oder antiretrovirale Medikamente schwer Zugang haben (Bailey et al. 2004, 471-473:476). Bezüglich der Entstehung neuer Virusmutanten, kommt es zu einer Erschöpfung der CD8-Zellen in der prolongierten Immunaktivierung. Diese Phase ist verbunden mit der Entwicklung inhibitorischer Rezeptoren auch Virusepitope genannt (Porichis und Kaufmann 2012). Durch die anhaltende Virämie kommt es auch zur Erschöpfung der B-Zellen und somit zu einer Lähmung der humoralen Immunantwort auf HIV.

#### 1.5. Die Rolle der lymphatischen Organe bei der HIV-Pathogenese

„Immunis“ bedeutet im Lateinischen „frei von“. Unser Immunsystem untergliedert sich in seiner Abwehr in die spezifische und in die unspezifische Abwehr. Als ersten anatomischen Anlaufpunkt für die HIV-Infektion spielt das lymphatische Gewebe eine wichtige Rolle. Unabhängig von der Eintrittspforte besitzt unser Körper lymphatisches Gewebe zur Erstregulierung dieser Bedrohungen. Im Nahrungstrakt kann durch den Waldeyer-Rachenring oder im Darm durch die Tela submucosa eine Vielzahl von Erregern eliminiert werden. Weiter distal befindet sich durch den Appendix vermiformis, der zusammen mit den Peyer'schen Plaques und den zahlreichen Lymphfollikeln, das darmassoziierte



lymphatische Gewebe (GALT) bilden, einen weiteren Eliminationsfaktor. In anderen Körperbereichen wie dem Respirations- und Urogenitaltrakt bilden die verschiedenen Lymphgewebe das mucosassoziierte lymphatische System (Bobat 2020, 134:322). Gerade für die HIV-Infektion sind Lymphknoten ein essenzieller Faktor. Schon im Frühstadium der Infektion bilden Infizierte Lymphknotenschwellungen. Lymphknoten sind kleine rundliche Formationen, die sich im ganzen Körper befinden und die Lymphe der jeweiligen Organe ins Blutsystem drainieren. Anatomisch gesehen, befinden sich die B-Zellen im Cortex des Lymphknotens und die T-Lymphozyten im Paracortex. Hingegen weist ein anderes wichtiges Organ der Körperabwehr, die Milz, die Aufteilung der B- und T-Zellen fast parallel. Dort befinden sich die Zellen in der periarteriolen Scheide mit zentral gelegenen T-Zellen und peripher angeordneten B-Zellen auf. Schließlich besitzt der menschliche Körper durch das Knochenmark und den Thymus zwei weitere wichtige lymphatische Organe. Ersteres ist der Produktionsort aller blutbildenden Zellen, somit der Zellen der Immunabwehr, und zweiteres spielt für die Filtration und Ausprägung neuer T-Zellen eine entscheidende Rolle (Hof und Dörries 2017). Zu Beginn der HIV-Infektion erkennt man eine Zunahme der Replikationsrate von den Lymphzellen in Richtung drainierendem Lymphgewebe. Es kommt zur erhöhten Plasmavirämie. Beim GALT kommt es zu einer Progression der Replikation mit anschließender Verteilung des Virus in das periphere Lymphgewebe. Dies führt zur Hyperplasie der Lymphknoten mit vorheriger zellulärer Aktivierung. Viren binden mit verschiedenen Rezeptoren an den dendritischen Zellen. Neben CCR5 und CXCR4, gibt es auf der Oberfläche dieser Zellen C-Typ Lektinrezeptoren. Hierbei zeigt sich, dass im Übergang einer akuten in eine chronische HIV-Infektion das gebundene Virus in den dendritischen Zellen durch Produktion von neuem Virusmaterial, ständig eine Aktivierung der CD4-Zellen hervorruft mit konsekutiver neuer Virusreplikation (Manches et al. 2014, 2:12). In der Frühphase der Infektion bleibt die Struktur des lymphatischen Gewebes trotz Hyperplasie erhalten. Durch die Bindung neuer Viren an die Zellen des lymphatischen Gewebes kommt es ständig zu neuer Immunantwort mit Ausscheidung proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$

oder IL-6 (Norris et al. 2006; 1:12). Dies führt zur Produktion neuer Viren (Replikation) mit der Folge einer reduzierten Immunantwort auf das Virus. Somit treibt die Immunaktivierung die Replikation voran. Das Voranschreiten der Infektion führt letztlich zu Brüchen der lymphatischen Struktur. Es kommt zur lymphoiden Fibrosierung mit Reduktion der CD4-Zellen. Zudem kommt es zur Minderproduktion neuer Zytokine durch die B-Zellen wie IL-7 und Lymphotoxin- $\alpha$ , die maßgeblich zur Stabilisierung des lymphatischen Systems beitragen. Letztlich kommt es zur vollkommenen Zerstörung des lymphatischen Systems mit rasantem Abfall der dendritischen Zellen. Hierin liegt die Erklärung für die Entstehung der Immundefizienz des Virus und schließlich für die Schwierigkeit, im Verlauf gegen opportunistische Erreger eine zielgerichtete Immunantwort zu bilden (Furler et al. 2019).

#### 1.5.1. Bedeutende Rezeptoren bei der HIV-Pathogenese

Meist befällt das HIV nach seinem Eintritt in den menschlichen Organismus Langerhans'sche Zellen, dendritische Zellen oder Makrophagen. Wie vorherbeschrieben interagiert die Oberfläche des Virus mit der Zelle. Hierbei spielen zwei wichtige Rezeptoren, der CD4 und der CCR5, eine wichtige Rolle (Wilens et al. 2012). CCR5 gilt neben CXCR4 als wichtiger Korezeptor zur Aktivierung verschiedener Zytokine. Viren, die hauptsächlich CCR5 an ihrer Oberfläche produzieren, werden R5-Viren und diejenigen, die vorwiegend CXCR4 exprimieren werden als X4-Viren genannt. Durch dualen Tropismus entstehen jedoch Viren, die beide Korezeptoren besitzen, diese werden als R5X4-Viren bezeichnet (Loftin et al. 2011, 2:9). Für Menschen, die eine homozygote Deletion über 32 Basenpaare in dem für CCR5 kodierendem Gen besitzen, wurde bewiesen, dass die Wahrscheinlichkeit einer sexuellen Übertragung der HIV Infektion sehr gering ist (Martinson et al. 1997).

Es gibt Chemokinliganden, die die Wechselwirkung der Korezeptoren mit der Zielzelle beenden und somit einen Eintritt des HIV in die Zelle verhindern. Für CCR5 sind die Liganden RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ . Für CCR4 ist das SDF-1 der natürliche Ligand. Meistens ist das Virus zu Beginn der Infektion ein R5-Virus, das sich im Verlauf durch verschiedene Mutationen zu einem X4-Virus umwandelt. Diese Umwandlung ist parallel zu einer raschen Progredienz der

Infektion (Weinberger und Perelson 2011). So wie es zu einer Veränderung der Dominanz der Korezeptoren kommen kann, besitzen auch die Hüllglykoproteine einen Tropismus, der auf der dritten variablen Region (V3-Schleife) beruht. Bei der Wechselwirkung von gp120 mit CD4 kommt es zur Konformationsänderung, die Affinität von CCR5 steigt. Hingegen wird die Wechselwirkung von CXCR4 mit gp120 weniger davon berührt. Hierbei zeigt sich, dass eine Wechselwirkung von CD4 mit gp120 eine stärkere Konformationsänderung herbeiführt als die von gp120 mit CXCR4 (geringere Affinität bei X4-Vieren) (Lin et al. 2003). Ein weiterer wichtiger Korezeptor wird zumeist als „akzessorischer Korezeptor“ bezeichnet und spielt keine Rolle in der Interaktion des Virus mit der Zelle. Integrin  $\alpha 4\beta 7$  dient als Hilfe zur Virusausbreitung über Schleimhautoberflächen. Es wurde erkannt, dass dieser Rezeptor ein Darmrezeptor für periphere T-Zellen ist und an ein Tripeptid der V2-Schleife des Virus bindet. Somit kommt es zur Aktivierung von Leukocyte Function-associated Antigen 1 (LFA-1) und zu einer Vereinfachung der Übertragung des Virus von Zelle zu Zelle. Die CD4-Zellen, die außerordentlich viel  $\alpha 4\beta 7$  enthalten und produzieren, sind anfälliger für das Virus und befinden sich hauptsächlich im Gastrointestinal- und Genitaltrakt (Arthos et al. 2018, 128:135).

#### 1.5.2. Die Zielzellen von HIV

Primäre Zielzellen des HIV sind hauptsächlich CD4-T-Zellen oder Zellen, die den CD4 Rezeptor an ihrer Oberfläche aufweisen können (z.B. dendritische Zellen) (Bour et al. 1995, 65:93). Die T-Zellen erfahren ihre Reifung im Thymus und ihre Wirkung wird als „zelluläre Immunität“ zusammengefasst. Diese Lymphozyten besitzen auf ihrer Oberfläche das CD3-Molekül als Charakteristikum. Es übernimmt als Hauptaufgabe die antigenspezifische T-Zellaktivierung. Die reifen CD3-Leukozyten werden in zwei Subgruppen unterteilt. Die erste sind die CD4-T-Lymphozyten und die zweite Gruppe die CD8-T-Lymphozyten. Erstere besitzen eher eine supportive Rolle, letztere haben eine zytolytische Funktion. Diese beiden Populationen binden an bestimmte Bereiche des MHC Klasse I bzw. II. Antigene, die mit CD4-Molekülen in Verbindung kommen, müssen einen Bezug zu MHC Klasse II haben und Antigene, die von CD8-Molekülen erkannt werden, eine Verbindung zu Klasse I (Burt und Verda 2004, 745:761). Bei der

fortgeschrittenen HIV-Infektion führt der quantitative und qualitative Verlust der CD4-Zellen zu multiplen Störungen des Immunsystems. Es kommt zu verschiedenen Defekten in Bereichen, in den CD4-Zellen stark vertreten sind. Im GALT-System kommt es zur Zerstörung des follikulär dendritischen Netzwerks; die Schädigung der Gedächtniszellen ist ebenfalls ein Hauptbestandteil der HIV-Pathogenese. Die Hüllglykoproteine gp120 und gp160 weisen eine hohe Affinität zu CD4-Zellen auf und führen zu immunologischer Dysregulation und Verlust derer Immunkompetenz (Bour et al. 1995, 64:95).

Für die CD8-Zellen, besteht wie vorbeschrieben die Eigenschaft des Abtötens der infizierten Zelle nur, wenn auf der Oberfläche Proteine des MHC Klasse I erzeugt werden (Cresswell et al. 2005; 151:157). Besteht eine hohe Virämie des HIV, ist zu Beginn auch eine CD8-T-Lymphozytose zu erkennen. Dies widerspiegelt die hohe Immunaktivierung. Das Auftreten der CD8-T-Lymphozyten während der Primärinfektion korreliert zu Beginn mit einer Reduktion der Viruslast. Es kommt zu einer primären Kontrolle der Infektion, die im Verlauf durch Escape-Mutationen „außer Kontrolle“ gerät. Wie später beschrieben wird, spielen CD8-Zellen eine wichtige Funktion bei Elite Controller (EC).

Mit dem Progress der Infektion kommt es auch zur Erschöpfung der B-Zellen, zunehmender Apoptose und erhöhter Produktion von unspezifischen Immunglobulinen. Durch die erhöhte Onkogenese während der HIV Infektion können sich im Verlauf EBV assoziierte B-Zelllymphome bilden (Bibas und Antinori 2009).

Wie bei fast jeder Infektion kommt es auch bei HIV zu einer Aktivierung von Makrophagen und Monozyten. So wurde eine hohe Menge von Lipopolysaccharid bei HIV-infizierten festgestellt. Ebenso bilden Monozyten durch die Expression von CCR5, CXCR4 und CCR3 eine Angriffsfläche für die Infektion mit HIV, sind jedoch auch wegen ihrer monozytären Struktur ein schlecht replizierbares Medium für das Virus selbst. Insgesamt tragen diese Zellen viel zum Überleben von HIV bei und bilden auch eine Herausforderung für antiretrovirale Medikamente.

Dendritische Zellen spielen schon zu Beginn der Infektion eine wichtige Rolle. HIV kann sich über bestimmte Rezeptoren (C-Typ Lektin) an diese Zellen binden und wiederum wird dieses den CD4-Zellen präsentiert. Somit kommt es zur Infektion der CD4-Zellen. Natürliche Killerzellen und dendritische Zellen zählen zum angeborenen Immunsystem. Durch deren Aktivierung werden weitere Zellen angetrieben und Zytokine wie IFN- $\alpha$  oder explizit B- und T-Zellen dazu angeregt IL-2, IL-15 und IL-18 zu produzieren (Turville et al. 2003). In bestimmten genetischen Zusammenhängen tragen natürliche Killerzellen zur temporären Kontrolle der HIV-Infektion bei (s. unten). Sowohl dendritische als auch natürliche Killerzellen agieren miteinander, sodass bei der HIV-Infektion diese Interaktionen stark beeinträchtigt sind.

#### 1.5.3. Reaktion des Immunsystems auf die HIV-Infektion

Die Antwort des Immunsystems auf die Erkennung fremder Antigene basiert auf zwei Säulen: Die humorale und die zelluläre Antwort. Die erste basiert auf plasmalöslichen Stoffe und die zweite auf Immunzellen. Beide Säulen segmentieren sich jeweils in einen angeborenen und erworbenen Teil. Ebenso interagieren die zwei Systeme miteinander hinsichtlich der Antigenpräsentation und der Produktion unspezifischer Abwehrmechanismen. Die antigenspezifische Abwehrreaktion unterstützt das angeborene System mit Hilfe des Aufbaus von Gedächtniszellen als auch durch die Stimulation zu gezielteren Abwehrmechanismen. Gerade bei HIV richtet sich die humorale und zelluläre Immunantwort in Zusammenarbeit mit der erworbenen und angeborenen Immunität gegen verschiedene Proteine und Bestandteile des Virus (Parkin und Cohen 2001).

#### 1.5.4. Humorale Antwort

Erste Antikörper können bei der Primärinfektion nach ca. drei Wochen festgestellt werden. Innerhalb der ersten drei Wochen sind schon CD8-zytotoxische T-Zellen nachweisbar, die zu Beginn die Replikation des Virus abschwächen. Hieran erkennt man die Akutphase der Infektion, bei dem das Anschwellen der Lymphknoten des Patienten als Zeichen einer erhöhten Antwort der T-Zellen zu sehen ist, mit daraus folgender Reduktion der Viruslast (Chadburn et al. 2013,

361:370). Zu den Antikörpern, die zuerst produziert werden, gehören in erster Linie Antikörper gegen *gag* wie *p24* und *p55*. Im Westernblot sind die am häufigsten aufgetretenen Zielstrukturen *p17*, *p24* und Antikörper gegen *pol*. Erst später bilden sich Antikörper gegen das *env*-Protein (Gallerano et al. 2015, 234:241; Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections 1989).

Mit dem Abklingen der Viruslast entstehen ab ca. der 12. Woche neutralisierende Antikörper. Im Prinzip handelt es sich um spezifische Antikörper, die das Virus angreifen, sodass es nicht mehr infizieren kann (Immuno-Inaktivierung). Diese Antikörper bleiben zumeist viele Jahre bestehen. Bei HIV werden diese explizit aus dem Antigen gp41 und gp120 exprimiert. Diese haben eine protektive und als auch schädliche Funktion (Gallerano et al. 2015, 224-227:241). Das Virus kann sich jedoch gegen diese Antikörper schützen, indem es durch Glykosylierung (N-glykosylierte Reste) die Angriffsstellen dieser Antikörper an den Zellen blockiert. In vitro Studien konnten diese Epitope näher lokalisieren und erkannten fünf Hauptangriffsstellen für breitneutralisierende Antikörper, wie die CD4 Bindungsstelle, V3 Region, V1/V2 Region, membrannahe Region von gp41 und gp120/gp41 Interaktionsfläche (Wibmer et al. 2015, 3:16).

#### 1.5.5. Zelluläre Antwort

Bei dieser Art der Immunantwort spielen T-Zellen eine wichtige Rolle. Im Vergleich zur humoralen Antwort, in der Antikörper zumeist durch B-Zellen produziert wurden und das Antigen bekämpft haben, greifen hier die T-Zellen dieses selbst an (Parkin und Cohen 2001; 1781:1789). Bei der HIV-Infektion ragen die CD4-T-Helferzellen und die CD8-zytotoxischen T-Zellen hervor.

CD4-T-Zellen wirken als Unterstützerpotential, indem sie HIV-spezifischen B-Zellen und CD8-Zellen zur Hilfe kommen. Ebenso können sie selbst von HIV infiziert werden, aber auch selbst HIV-infizierte Zellen abtöten. Ein Überleben gelingt diesen Zellen, indem sie sich auf das HIV-Antigen klonal modifizieren und ausbreiten. Ein Zusammenhang zwischen HIV-Viruslast und Anzahl der CD4-T-Zellen besteht nicht (Shah 2006).

Schon im Thymus zeichnet sich die Gliederung der T-Zellen ab. Eine dieser Populationen sind die CD8-Zellen. Letztere besteht aus zwei Ketten mit einer

Länge jeweils von 214 Aminosäuren. Eigenschaften der zytotoxischen CD8-T-Zellen bestehen darin nach Kontakt mit HIV, Perforine und weitere Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-2, MIP-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  zu produzieren. CD8-T-Zellen binden via HIV-spezifischen Antigen-Rezeptorkomplex an die Zielzelle und leiten deren Auflösung ein (Sande und Volberding 2012, 52:580). Nach aktueller Forschung (s. unten) weisen diese Zellen eine hohe Effektivität auf, durch erhöhte Immunantwort die HIV-Viruslast einzudämmen und ggf. die Infektion kontrollieren zu können. Weitere zelluläre Immunantworten konnten erkannt werden, wie die nicht zytolytische Eigenschaft von CD8-T-Zellen die Virusreplikation zu hemmen und über Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC) NK-Zellen zu aktivieren (Migueles und Connors 2002).

#### 1.6. Diagnose der HIV-Infektion

Die frühe Diagnosestellung einer HIV-Infektion sowie die Entwicklung verbesserter Algorithmen konnte zu einer signifikanten Früherkennung der Krankheit führen und zu einer frühzeitigen Vorbeugung der Ausbreitung von HIV. Aktuell laufen Studien zum einmaligen Screening von Patienten im Alter zwischen 13 und 75 Jahren, die einem niedrigen Risiko ausgesetzt sind. Im Allgemeinen besteht weiterhin, für Patienten mit hohem Risiko für eine HIV-Infektion die Empfehlung zur HIV-Testung. Zu dieser Gruppe gehören Männer, die gleichgeschlechtlichen Geschlechtsverkehr betreiben, deren Partner an HIV infiziert sind oder die einen unklaren Serostatus haben (Centers for Disease Control and Prevention 2011; DiNenno 2017). Ebenso Personen mit intravenösem Drogenabusus, Personen, die für Geld oder Drogen Geschlechtsverkehr anbieten und Sex-Partner von HIV-Infizierten. In dieser Gruppe besteht die dringende Empfehlung zu wiederholten HIV Tests (Centers for Disease Control and Prevention 2011). Obwohl Früherkennungsmaßnahmen und sensitive Tests weit verbreitet sind, konnte 2015 herausgefunden werden, dass nur 54% der HIV infizierten über ihre Infektion Bescheid wussten (Consolidated guidelines on HIV testing services 2015).

Aktuell wird zur Feststellung einer HIV-Infektion ein Immun Assay der vierten Generation sowie ein HIV1/2 Immun Assay als Bestätigungstest verwendet. Der Vorteil dieses Tests liegt in der Detektion von HIV-1 und 2 als auch des p24

Antigens und kann, im Vergleich zu den Tests der dritten Generation, Patienten in der Frühphase einer Infektion (Fenster-Periode) selektieren. Diese Tests weisen eine nahezu 100%ige Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von chronisch Infizierten auf und können bis zu 80% der Patienten mit akuter Infektion detektieren. Letzteres hat mit der Bestimmung der HIV-RNA eine höhere Sensitivität. Ist ein Test der vierten Generation negativ, ist der Patient nicht infiziert. Kommt es zu einem positiven Ergebnis, folgt der Bestätigungstest, der über die Infektion mit HIV-1, -2 oder beiden Viren Aufschluss gibt. Zusätzlich werden die Kopien der HIV-RNA gemessen, falls der Immun Assay positiv ist, jedoch der Bestätigungstest negativ oder kein klares Ergebnis entsteht. (Branson et al. 2014).

Eine alternative Methode besteht in den Tests der dritten Generation. Hierbei wird ein Immun Assay (ELISA) durchgeführt, der nur Antikörper detektiert. Im Anschluss erfolgt der Bestätigungstest via Westernblot. Dieser Test weist eine hohe Spezifität und Sensitivität bei chronisch Infizierten auf, jedoch kann er keine Diagnose einer akuten Infektion liefern. Ebenso besteht durch diesen Test eine hohe Rate an falsch-positiven HIV-2 Infektionen, „fast 60% der HIV-2 Infektionen werden als HIV-1 falsch klassifiziert“ (HIV-2 Infection Surveillance --- United States, 1987--2009 2011). Falsch negative Ergebnisse sind, aufgrund des diagnostischen Fensters, mit hoher Wahrscheinlichkeit bei den Tests der dritten Generation zu erwarten. (Peters et al. 2016). Außerdem detektieren die meisten Antikörpertests in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika nur HIV der Gruppe M (Schable et al. 1994). Wie oben beschrieben dient bei der dritten Generation von Tests der Westernblot als Bestätigung. Als Nachteil erweist sich dieser bei HIV-1 Westernblots, da er die Subgruppe O nicht detektiert (Loussert-Ajaka et al. 1994). Für HIV-2 benötigt man einen speziellen Westernblot, speziell ausgerichtet auf dieses Virus. Die Gründe für ein unklares/unbestimmtes Ergebnis, das bedeutet, dass der Test weder positiv noch negativ ist, ist meistens eine erst kürzliche Infektion (< 2 Wochen). In diesen Fällen sollte der Spiegel der HIV-RNA im Plasma kontrolliert werden. Bei einem niedrigen Spiegel (< 1000 Kopien/ml) muss von einem falsch-positivem Ergebnis ausgegangen werden, sodass der Test wiederholt werden sollte.



Verschiedene Faktoren können diese Tests beeinflussen, die in keiner Relation zu HIV stehen. So kann durch Kreuzreaktionen von Alloantikörper während der Schwangerschaft, Autoantikörpern oder nach einer „Influenza-Impfung“ ein positives Ergebnis zustande kommen (Erickson et al. 2006).

Die Diagnose der HIV-Infektion gestaltet sich, insbesondere in Entwicklungsländern aufgrund der limitierten Ressourcen schwierig. Hierzu dienen Schnelltests oder Selbsttests, die ein Ergebnis innerhalb von 20 Minuten liefern. Es kann eine Speichelprobe oder eine Blutprobe aus dem Finger zur Testung dienen. Natürlich zeigen diese Tests keine vergleichbare Sensitivität und Spezifität, bilden aber eine unkomplizierte und kostengünstige Grundlage. (Cock et al. 2006).

### 1.7. Langzeitstabile

Eine seltene Gruppe von Patienten sind mit HIV infiziert, weisen jedoch, in Abwesenheit von antiretroviraler Therapie, über einen Zeitraum von mehr als sieben Jahren eine stabile Anzahl von CD4-Zellen ( $> 500/\mu\text{l}$ ) auf (Saez-Cirion et al. 2014). Diese spezielle Gruppe wird als langzeitstabil bezeichnet und unterteilt sich in zwei Subgruppen. In der einen weisen die Patienten einen niedrigen Plasma HIV-RNA Spiegel ( $< 5000$  Kopien/ml) auf. Hierzu zählen die „wahren Langzeitstabilen“ (long term non progressors, LNTPs). Der zweiten gehören Patienten an, die eine noch niedrigere Anzahl an HIV-RNA Kopien aufweist ( $< 50$  Kopien/ml). Diese Patienten werden als „Elite“ oder „Natural Controller“ bezeichnet (Kumar 2013).

Patienten, die als langzeitstabil eingestuft werden, haben keinen permanenten Status. Nach Jahren eines stabilen Infektionsverlaufs, können sie letztlich AIDS entwickeln. Diese Patienten, die weniger als zehn Prozent der HIV-Infizierten ausmachen, bilden seit langem eine Basis für die Forschung sowohl genetischer, viraler Faktoren als auch deren des Wirtes, zur Erlangung neuer Erkenntnisse über die Krankheitsprogression.

Es konnte festgestellt werden, dass viele LNTPs mit einem HIV-Stamm infiziert sind, der eine nef/LTR Deletion aufweist (Zaunders und van Bockel 2013). Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass das Protein Nef einen Funktionsverlust aufweist (Mwimanzi et al. 2013). Resistente HIV-1 Stämme

weisen meistens eine geringe Vermehrung auf, sodass man zur Annahme kommt, dass HIV-1 mit geringer „Replikationsfitness“ eine geringere Viruslast bei den Betroffenen erzeugen könnte.

Eine weitere Gruppe bilden die sogenannten Post-treatment Controller (PTC). Diese Patienten begannen eine antiretrovirale Therapie zu Beginn der nachgewiesenen HIV-Infektion, die im Verlauf abgebrochen/gestoppt wurde. Ein Teil von diesen Patienten entwickelten sich zu Progressoren, ein anderer Teil konnte ohne Therapie die Viruslast kontrollieren. Vergleicht man ECs mit PTCs besteht kein genetischer Zusammenhang zwischen beiden Parteien, das HIV-1 der PTC weist eine „normale Fitness“ auf und in der Häufigkeit treten PTC häufiger auf als EC.

<b>Elite Controller (EC)</b>	<b>Post-treatment Controller (PTC)</b>
<b>Spontane Kontrolle der VL</b>	<b>durch Therapie induzierte VL-Kontrolle</b>
<b>Häufigkeit 0,5%</b>	<b>Häufigkeit nach cART in PHI: 10-20%</b> <b>Häufigkeit nach cART in CHI: ca. 1 %</b>
<b>HLA: B27, B57, Δ32-CCR5</b>	<b>Kein genetischer Zusammenhang</b>
<b>Virus: geringere Fitness</b>	<b>Viren mit normaler Fitness</b>

Abbildung 1.7: Vergleich Elite Controller vs. Post-treatment Controller

### 1.7.1. Viruslast bei Langzeitstabilen

In dieser Abschrift wird die geringe Viruslast bei Langzeitstabilen näher interpretiert. Wahre Langzeitstabile unterscheiden sich von ECs dadurch, dass bei Letzteren fast überhaupt keine Viruslast detektiert werden kann. Es wird geglaubt, dass die HIV-RNA-Replikation hauptsächlich im lymphatischen Gewebe stattfindet (Zaunders und van Bockel 2013). Ein anderer Faktor ist, dass ECs weniger HIV-DNA beinhalten im Vergleich zu anderen Patienten. Hierbei konnte in mehreren Studien eine sehr geringe Menge an HIV-DNA aus PBMC von wahren Langzeitstabilen und ECs gewonnen werden (Julg et al. 2010). Viele Studien sehen bei der primären HIV-Infektion, in ihrem Anfangsstadium, als möglichen Beginn eine starke Immunabwehr mit Auswirkung im Verlauf auf die Viruslast. Hierbei gilt für jedes Individuum, dass der höchste Punkt der Viruslast,

die Schwankungen im weiteren Verlauf und letztlich der sogenannte „Set Point“ für jeden unterschiedlich sind, sodass ECs ihren Ursprung in dieser Phase haben könnten. Diese Phase der primären Infektion markiert eine erhöhte Immunaktivierung im Körper mit Anstieg der CD4- und CD8-Zellen. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass sich auch HIV DNA in den CD4-Gedächtniszellen einliedert, die IL-7 produzieren, anstatt in den HIV CD4-Zellen während der akuten Infektion (Zaunders et al. 2006; Zaunders et al. 2005). Hiermit zeigt sich, dass die HIV-CD4-Zellen der akuten Infektion, die nach der akuten Phase reduziert sind, das Reservoir für den Verbleib der proviralen HIV-DNA in deren Genom bilden können. Vielmehr ist die direkte Infektion von CD4-Gedächtniszellen, die IL7 exprimieren und im lymphatischen Gewebe angehäuft sind, plausibel (Hirbod und Broliden 2007). Insgesamt kann angenommen werden, dass eine geringe Konzentration an HIV-DNA in CD4-Zellen zu Beginn der Infektion, zu einer langsameren Progression der Erkrankung führt (Ganesan et al. 2010). Das bedeutet, dass ECs während der primären HIV-Infektion eine geringe chronische HIV-Replikation entwickeln und eine geringe Anzahl an CD4-Gedächtniszellen besitzen, die mit HIV-1 infiziert sind.

#### 1.7.2. Langzeitstabile und CD4-Zellen

Es konnte nachgewiesen werden, dass viele wahre Langzeitstabile und ECs sowohl eine niedrigere Viruslast während der primären Infektion aufweisen als auch im Verlauf einen niedrigeren „setpoint“. Viele Studien erwiesen, dass eine Mutation am CCR5 Korezeptor, die sogenannte CCR5  $\Delta$ 32 Mutation, einen verzögerten Progress bis hin zu AIDS aufweist (Ioannidis et al. 2001). Hierbei besteht die Überzeugung, dass eine kleine Expression von CCR5 an der Zelloberfläche, weniger Virus in die Zelle eindringen lässt. Zudem zeigt sich, dass eine hohe Prävalenz an ECs diese Mutation aufweist (Pereyra et al. 2010).

Eine weitere Überlegung ist die CD4-Aktivierung bei Langzeitstabilen. Hierbei erkennt man im Vergleich zu Progressoren, dass diese Gruppe eine niedrigere Aktivierung aufweist und damit einhergehend eine höhere Anzahl an ruhenden CD4-Zellen. Impfstudien konnten bestätigen, dass aktivierte HIV spezifische CD4-Zellen mit einem höheren Risiko für eine HIV-Infektion einhergehen und es zu einem höheren Reboundeffekt der Viruslast kommt (Benlahrech et al. 2009).

In anderen Studien wurde nachgewiesen, dass bestimmte HIV spezifische CD4-Zellen mit Hilfe von Granzyme A zytolytische Eigenschaften entwickeln können (Zheng et al. 2009). Diese Zellen sind in der Lage infizierte Makrophagen zu zerstören und bewirken eine geringere Aktivierung der CD4-Zellen.

Andererseits konnten Resistenzfaktoren wie SAMDH1, eine Hydrolase, die die Replikation von HIV-1 in verschiedenen Zellen hemmt, oder TRIM5a keinen sicheren Aufschluss über einen Zusammenhang mit ECs oder LNTPs zeigen. Insgesamt kann nicht von einer Resistenz der CD4-Zellen gegen HIV-1 gesprochen werden. Vielmehr besteht eine erschwerte Infektiosität dieser Zellen im Ruhestadium als bei erhöhter Aktivierung (Zaunders und van Bockel 2013). Wahre Langzeitstabile und ECs weisen, trotz Infektion, eine Regulierung ihrer T-Zellen auf, dass eine gesunde und robuste Immunantwort aufrechterhalten werden kann, die jedoch mit einer erhöhten Immunaktivierung auf Dauer einhergeht.

### 1.7.3. Immunantwort bei Langzeitstabilen

Während der primären HIV-Infektion besteht eine erhöhte Aktivierung und Proliferation der CD4-Zellen, die zu einem Wachstum von CD38<sup>high</sup>, CCR5<sup>+</sup>, Ki67<sup>+</sup> und CD127<sup>low</sup> führt, ideale Zielzellen für HIV-1. Insgesamt führt die Infektion zu einer Ausschüttung von Antikörpern gegen das Envelope Protein. Hierbei handelt es sich in der Frühphase nicht um neutralisierende Antikörper, diese entstehen erst Monate nach der Primärinfektion. In dieser Hinsicht weisen ECs eine erhöhte Anzahl an IgG2 Antikörper gegen gp41 auf, die eine neutralisierende Wirkung aufzeigen und mit einem langsameren Progress der Infektion einhergehen (Ngo-Giang-Huong et al. 2001).

Generell bei Langzeitstabilen (LNTPs und ECs) wird geglaubt, dass eine verminderte Immunantwort und somit eine geringere Anzahl an Zielzellen eine große Rolle spielen (Zaunders und van Bockel 2013). Ganesan et al. konnte herausfinden, dass eine geringe Aktivierung von CD4-Zellen zu einer kleineren Menge an HIV DNA in den Zielzellen führt, zu einer geringeren Viruslast im Plasma und zu einem besseren Langzeitergebnis hinsichtlich des Krankheitsverlaufs (Ganesan et al. 2010).

Weitere Studien verbinden die reduzierte IL-2 Produktion mit einer erhöhten Infektion der CD4-Zellen mit HIV, was zu einer geringeren Proliferation in Immunantworten zu Antigenen und eben auch HIV-Antigen führt. Leider konnte gezeigt werden, dass die Gabe von IL-2 subkutan bei Patienten mit HIV zu keiner klinischen Besserung geführt hat (Abrams et al. 2009). In vitro Studien konnten zeigen, dass CD4-Zellen von PBMC Zellen aus ECs eine starke Zunahme aufwiesen in Verbindung mit HIV-Antigen. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass ECs HIV spezifische CD4-Gedächtniszellen besitzen mit einer starken Avidität ihres T-Zell Rezeptors (Vingert et al. 2010). Bei einem langzeitstabilen Patienten konnte Zaunders et al. herausfinden, dass bestimmte CD4-Zellen, genannt V $\beta$ 17+ CD4-Zellen, eine lytische Funktion auf B-Zellen ausüben können, die ein stammverwandtes Peptid zum Gag-Protein aufweisen. Solche zytotoxischen Zellen spielen bei ECs eine signifikante Rolle. Dieses Gag-Peptid konnte viel einfacher von den CD4-Zellen erkannt werden und somit eine erhöhte Immunantwort mittels CD8 vermitteln.

Sowohl CD4-Zellen mit zytotoxischem Phänotyp als auch HIV-spezifische CD4-Zellen mit einem hohen Gehalt an Granzyme A+ korrelieren, während der primären HIV-Infektion, mit einem langsameren Progress der Infektion. Somit muss es CD4-Zellen geben mit einem zytotoxischen Phänotyp, die die Virusreplikation bei diesen Individuen kontrollieren (Soghoian et al. 2012). Eine weitere Studie beschreibt, dass bei Langzeitstabilen die CD4-Zellen gegen Gag-Peptide eine Immunantwort geben, bei Progressoren jedoch eine Immunantwort gegen Peptide des Env-Proteins. Nach Sallusto et al besteht bei Langzeitstabilen eine geringere CCR5 Expression gegenüber CD4-Zellen, sodass eine geringere Infektionsrate dieser Zellen und deren späteren Verminderung entsteht (Sallusto et al. 2004).

#### 1.7.4. Histokompatibilitätsantigen bei Langzeitstabilen

Eine multizentrische Studie, die Daten für Langzeitstabile aus vielen verschiedenen Ländern erforscht, zeigt eine immunogenetische Korrelation zwischen den einzelnen Ethnien. Für Europäer liegt die odds-ratio innerhalb der HLA Allele: HLA-B\*5701/B\*5201 und HLA B\*2705 (Pereyra et al. 2010). Migueles et al konnten 2010 herausfinden, dass ungefähr die Hälfte der ECs HLA B57

positiv sind. Andere Studien assoziieren diese Individuen aber auch mit HLA B27 und B58 (Bailey et al. 2006). Eine Heterozygotie bei HLA der Klasse I, insbesondere HLA B27 und B57, wirkt sich mit einer gewissen Protektion und Resistenz gegenüber dem Fortschreiten zur Krankheit AIDS (Chatterjee 2010) aus. In diesen Fällen weisen CD8-T-Zellen eine höhere Potenz und Proliferation auf, sodass vermehrt zytolytische Proteine (Perforin und Granzyme B) als auch proinflammatorische Zytokine (Interleukin-2 und Interferon  $\gamma$ ) ausgestoßen werden (Betts et al. 2006).

Diese Patienten weisen eine starke Immunantwort gegen das HIV Gag-Protein auf. Hierbei wird den Allelen nachgesagt, dass sie zu einer raschen Anzahl der CD8-T-Zellen führen, die sehr effektiv unterschiedliche Ziele von HIV-1 angreifen. Das Gag-Protein besitzt zwei helikale Strukturen, die C-terminale und N-terminale Domäne. Verschiedene Mutationen an den verschiedenen Epitopen können zur Abschwächung des Virus führen und es für das Immunsystem zu einem einfacheren Ziel machen (Goulder und Watkins 2004). In Zusammenhang mit dem Subtyp HLA B\*2705 wurden die Mutationen L268M und R264K beschrieben, beide schützen den Wirt vor der Escape-Eigenschaft des Virus in verschiedenster Weise (Lichterfeld et al. 2007; Schneidewind et al. 2007). In Zusammenhang mit diesen Allelen, geht ein Escape-Phänomen für den Virus mit einer stark reduzierten Virusresistenz einher.

#### 1.7.5. Bedeutung der CD8-Zellen bei Langzeitstabilen

Die Effektivität der CD8-Zellen gegenüber HIV wurde schon angedeutet, insbesondere deren Rolle bei der zytotoxischen Aktivität gegenüber den Zielzellen. Die Funktion der Zellzerstörung bei HIV-1 ist sehr wichtig, da das Virus sich in den Zielzellen integriert und überleben kann. Die Lyse von HIV CD4-Zellen durch zytotoxische CD8-Zellen ist unverzichtbar, führt sie doch zur Reduktion der Virusreplikation und proviralen HIV-DNA. Diese Theorie führte, durch viele Studien, zu der Annahme, dass die Toxizität von CD8 gegenüber HIV CD4-Zellen der einzig effektive Immunmechanismus ist, der zur Kontrolle der HIV Infektion führt (McMichael et al. 2010). In vitro Studien wie Walker et al. oder Yang et al. konnten bei Langzeitstabilen zeigen, dass weniger die Zytotoxizität von CD8 entscheidend ist, sondern es vielmehr etwas anderes geben muss, das

eine Unterdrückung der HIV-Replikation bewirkt. Der Gedanke der zytotoxischen Wirkung von CD8 konnte sich schließlich durchsetzen, sodass es doch eine Toxizität geben muss. Migueles et al. konnte bei HLA B57 positiven LNTPs feststellen, dass deren Gag-spezifischen CD8-Zellen bei Kontakt mit Antigen zur Vermehrung und Erhöhung der Konzentration von Perforin führen (Migueles et al. 2002). Dies festigt wiederum die Theorie der Zytotoxizität.

Bei Langzeitstabilen, die HLA B27 positiv waren, konnten bei deren CD8-Zellen außer der Zytotoxizität auch weitere Funktionen erkannt werden. Hierzu zählen die Produktion von „TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN $\gamma$ , MIP1b, und Hochregulierung von CD107a“ (Almeida et al. 2009). Eine große afrikanische Studie konnte zeigen, dass CD8-Zellen, die sich gegen das Env-Protein wenden, mit einer höheren Viruslast einhergehen. (Kiepiela et al. 2007). Dies kann durch Escape-Mutationen am Gag-Protein bestätigt werden, die zu einer Einschränkung der viralen Resistenz (Fitness) führen. Zudem wird nahegelegt, dass sich Epitope des Gag-Proteins nach dem viralen Eintritt in die Zielzelle sehr früh an der Oberfläche präsentieren, sodass CD8-Zellen aufmerksam gemacht werden, bevor sich HIV-1 in das Genom integriert (Sacha et al. 2007).

Insgesamt korreliert die Zytotoxizität der CD8-Zellen mit der niedrigen Virusreplikation von HIV-1. Hierzu ist wichtig, dass CD8-Zellen als Ziel das Gag-Protein haben müssen.

#### 1.7.6. CD8-T-Zell Rezeptor bei Langzeitstabilen

Schon manche sprechen von einer Immunodominanz gegenüber HIV-1 Antigen. Hierbei wird auf den T-Zell Rezeptor verwiesen, dessen Avidität zur Regulierung der Infektion eine wesentliche Rolle spielt. Lichterfeld et al konnte zeigen, dass bei der frühen HIV-Infektion T-Zellen mit einer hohen Avidität rekrutiert werden und eine Virämie gebremst werden konnte (Lichterfeld et al. 2007). Demzufolge kann eine geringe Menge an Antigen hochsensitive CD8-T Zellen zur Expansion führen. Bei LNTPs, die HLA B27 positiv waren, wiesen diese in deren PBMC die niedrigste Konzentration an HIV-DNA und Viruslast auf. CD8-T-Zellen mit hoher Avidität korrelieren auch in vitro mit geringer HIV-Replikationsrate und haben eine protektive Wirkung. Experimente mit diesen Zellen wiesen einen erhöhten PD-1 und CD57-Marker auf, als Zeichen einer erhöhten Apoptose (Vigano et al.

2012). Schlussfolgernd führen CD8-Zellen mit hoher Avidität nicht automatisch zum Status eines Langzeitstabilen, sondern negative Marker beeinflussen das Überleben und die Weiterentwicklung dieser Zellen (Zaunders und van Bockel 2013; Youngblood et al. 2012). Eine Kontrolle der HIV-Infektion durch CD8 kann somit nur temporär entstehen. Die chronische Infektion führt zur Überarbeitung/Abschwächung der CD8-Zellen und schließlich zu deren Reduktion in Anzahl und Funktionalität.

#### 1.7.7. TCR-Klonotypen von CD8

Die Immunantwort von CD8-Zellen schon bei geringster Menge eines Antigens, zeigt sich ergebnisreich in der Virusreplikation. Jedoch weisen CD8-Zellen von ECs Unterschiede zu Progressoren auf (Lécuroux et al. 2013). Hierbei spielt das mit der Virusreplikation verbundene Epitop KK10 eine wichtige Rolle. Klonotypen des T-Zell-Rezeptors von CD8 verursachen bei HLA B27/57 Patienten, anhand dieses Epitops eine immense Immunantwort. Es kommt zur Up-Regulierung des Inhibitors CD57. Studien, wie van Bockel et al. sahen die Persistenz der immunodominanten CD8-Klonotypen durch dieses Epitop im Rahmen der Ausscheidung von IL-7R und Bcl-2 (van Bockel et al. 2011). Diese Klonotypen führen insgesamt zu einer erweiterten Erkennung von Epitopvarianten mit schnellerem Entfachen einer zytolytischen Wirkung und unterscheiden Langzeitstabile von Progressoren, die gemeinsam die gleichen HLA Allele der Klasse I aufwiesen (Chen et al. 2012). Es wurde vermutet, dass durch die Diversität des MHC eine weite Breite an Epitopvarianten durch Kreuzreaktionen des T-Zell Rezeptors erkannt werden konnten. Hierzu dienen Beweise durch CD8-Zellen speziell für das KK10 Epitop. Zuvor muss gesagt sein, dass der T-Zell-Rezeptor speziell für dieses Epitop bei HLA B27 positiven Patienten die Fähigkeit besitzt, sowohl an das Tetramer des Wildtyps als auch an den Mutant L268M zu binden. Dies dient der Immunodominanz gegenüber auch Epitopvarianten (van Bockel et al. 2011). Hiermit haben Langzeitstabile, die HLA B27 positiv sind, gegenüber Progressoren, einen wesentlichen Vorteil, die HIV-1 Replikation zu unterdrücken, deren (Progressor) KK10 spezifischer T-Zell-Rezeptor nur an den Wildtyp des viralen Stranges binden kann. Chen et al. konnte diesen Vergleich mit der Produktion von Perforin bei LNTPs beweisen.



#### 1.7.8. Natürliche Killerzellen und deren Rolle in der HIV-Infektion

Die angeborene Immunität ist ein wesentlicher Faktor, bevor die adaptive Immunantwort entstehen kann. Bei der ersten Unterdrückung der Infektion zählen natürliche Killerzellen zu einem wesentlichen Bestandteil. Das HI-Virus weist jedoch durch das Nef-Protein eine spezielle Funktion zur Unterdrückung der HLA Klasse I Moleküle auf. Cohen et al. konnte zeigen, dass das Nef-Protein selektiv HLA-A und -B unterdrücken kann, weniger effektiv -C und -E (Cohen et al. 1999). Manche Langzeitstabile, infiziert mit einem Nef-deletierten HI-Virus, konnten eine Reduktion der viralen Fitness (Virusresistenz) aufweisen.

Genetische Polymorphismen zeigen, dass Moleküle der HLA Klasse I mit Rezeptoren (KIR) binden können, die an der Oberfläche der natürlichen Killerzellen exprimiert werden. Ein natürlicher Ligand für diesen Rezeptor, speziell KIR3DS1 und KIR3DL1, ist das Bw4 Allel, das der Gruppe der HLA B27 und B57 untergeordnet ist. Diese Kombination weist eine insgesamt langsamere Progression zu AIDS auf (Cockerham und Hatano 2015).

Hierzu dient das Beispiel von Langzeitstabilen, die größtenteils HLA B27 oder B57 aufwiesen. Deren HLA Molekülen gehört die Gruppe der Bw4-Motive an, sodass davon auszugehen ist, dass natürliche Killerzellen durch verschiedene Methoden, wie Präsentation der CD8-T-Zellen oder zytolytische Funktion, zu einer Kontrolle des Virus beitragen (Flores-Villanueva et al. 2001).

#### 1.7.9. Neutralisierende Antikörper bei Langzeitstabilen

Diese Art von Antikörper binden am Envelope-Protein und inhibieren das Eindringen des Virus in die Zelle, sie werden als breitneutralisierende Antikörper bezeichnet. Ihre Erforschung gilt seit langer Zeit der Erschaffung eines Impfstoffes gegen das Virus. Bei ECs ist deren Konzentration meistens gleich derer mit einer Progression der Infektion (Lambotte et al. 2009). Der erste breitneutralisierende Antikörper war Mab b12, der aus dem Knochenmark eines asymptomatischen HIV-Infizierten gewonnen werden konnte (Euler und Schuitemaker 2012). Im Verlauf konnten weitere breitneutralisierende Antikörper entdeckt werden, keines davon mit der Effizienz das Virus für immer auszuschalten. Vulnerable Regionen des Virus an denen diese Antikörper binden können sind gp120 mit V1V2, V3, CD4 binding site (CD4bs) und gp41 mit MPER

(membrane proximal external region). Im Hinblick auf eine Besserung der Effizienz konzentrierte sich die Forschung ebenfalls auf kreuzreaktive neutralisierende Antikörper. Diese Antikörper entstehen erst zwei bis vier Jahre nach der Infektion (Kwong und Mascola 2012). Vergleiche dieser Art von Antikörpern mit wahren Langzeitstabilen, ECs und Progressoren zeigten keinen Vorteil im Hinblick auf das Fortschreiten der Erkrankung. Euler und Schuitemaker kommen zu dem Schluss, dass die Präsenz dieser Antikörper zu Beginn der Erkrankung zu einem komplett anderen Ausgang kommt, ehe sich das Virus etablieren kann (Euler und Schuitemaker 2012).

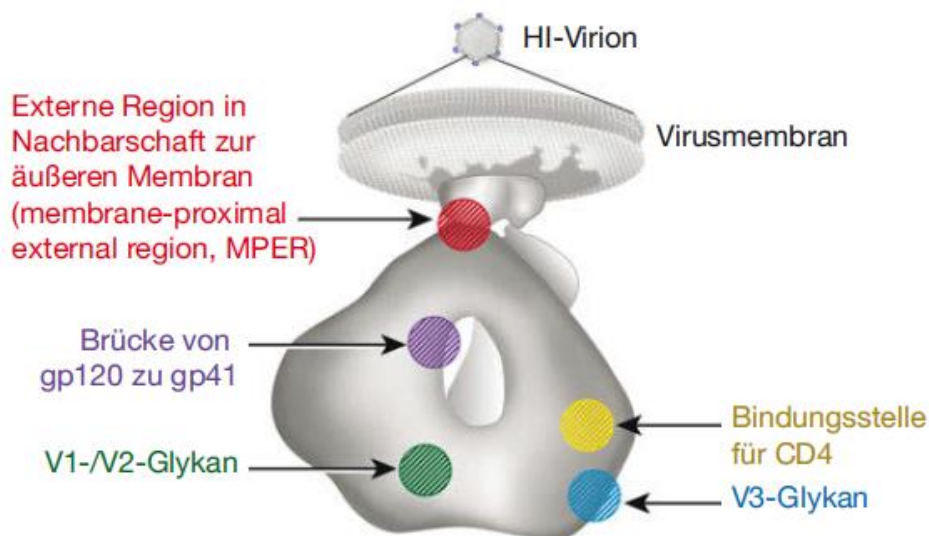


Abbildung 1.7.9: Env-Protein mit Bindungsstellen für neutralisierende Antikörper (© mit schriftlicher Genehmigung des ABW Wissenschaftsverlags)

Autologe neutralisierende Antikörper finden sich in höherer Konzentration in wahren Langzeitstabilen als bei ECs. Es ist davon auszugehen, dass eine geringe Viruslast, die bei Langzeitstabilen bestehen könnte, die Produktion autologer neutralisierender Antikörper von B-Zellen begünstigt (van Gulck et al. 2012).

IgA neutralisierende Antikörper konnten in der cervikalen Mucosa von HIV-negativen Frauen festgestellt werden als auch generell bei ECs und assoziieren eine langsamen Progress der Erkrankung (Hirbod und Broliden 2007). Im Allgemeinen spielen neutralisierende Antikörper zur Erlangung des Status Langzeitstabilen, keine bedeutende Rolle (Zaunders und van Bockel 2013). Die

Kontrolle der Virämie und des Fortschreitens der Erkrankung werden bei diesen Individuen eher durch andere Mechanismen hervorgerufen (s. oben).

### 1.8. Allgemeines zur Therapie der HIV-Infektion

Durch die Erforschung der antiretroviralen Therapie kam es zur dramatischen Reduktion der Mortalität und Morbidität der HIV-Infizierten. 1987 kam mit Azidothymidin, einen nukleosidischen Reverse-Transkriptase Inhibitor, das erste Medikament auf die Welt. Durch Resistenzentwicklung des Virus war das Medikament im Verlauf jedoch nicht mehr effizient als Monotherapie (Arion und Parniak 1999).

Heutzutage gibt es sechs verschiedene Gruppen von Medikamenten mit jeweils differenzierter antiretroviraler Wirkung. Für die meisten Individuen besteht die Therapie in einer Kombination von zwei nukleosidischen Medikamenten und einem dritten Medikament einer anderen Klassifikation. Zu den wichtigsten Medikamentengruppen zählen Entry-Inhibitoren, nukleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitoren (NRTIs), nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs), Integrase-Inhibitoren (INIs) und Protease-Inhibitoren (PIs). Zu den neuesten Medikamenten zählt Ibalizumab, ein monoklonaler Antikörper der Gruppe der Entry-Inhibitoren, der bei Multiresistenz eingesetzt wird, wenn das vorherige Therapieregime keine Wirkung gezeigt hat (Emu et al. 2018).

Bis auf nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren sind alle Medikamentengruppen gleichermaßen gegen HIV-1 und -2 wirksam (HIV-2 ist resistent gegenüber NNRTIs). Für alle therapienaiven Patienten werden Integrase-Inhibitoren als bevorzugtes drittes Medikament neben nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren empfohlen. Nach amerikanischen Leitlinien werden aktuell Integrase-Inhibitoren als Basis zur Erstlinien- und Kombinationstherapie stark bevorzugt (Saag et al. 2018).

Mittlerweile sollte eine antiretrovirale Therapie, unabhängig der CD4-Zellzahl, begonnen werden, insbesondere in den ersten sechs Monaten der Infektion. In diesem Zeitraum konnte bewiesen werden, dass es zu einer Verbesserung der CD4-Zellzahl, einer signifikanten Reduktion der Viruslast und geringerer HIV Übertragung (Cohen et al. 2011) kommen kann. Ebenso gelingt durch rechtzeitigen Beginn mit der Therapie die Reduktion des viralen Reservoirs als

auch die funktionelle Verbesserung von Zellen des Immunsystems (Jain et al. 2013).

Die verbesserten Daten aus neuen Studien, neue Therapiestrategien und somit immer weiter entwickelter antiretroviraler Therapie mit frühzeitigem Beginn beim HIV-Infizierten, haben es mittlerweile schon geschafft eine Metamorphose herbeizuführen, von einer tödlichen in eine chronische Krankheit.

## **2. Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war den Einfluss der N-Glykosylierungen von Bindungsstellen des gp41- und gp120-Proteins von HIV-1 bei Progressoren und ECs zu untersuchen und zu vergleichen und hiernach prädiktive Aussagen über die Entstehung von ECs zu stellen.

Grundlage der Forschung war es, den Zusammenhang zwischen PNLG (predicted N-linked glycosylation) und ECs zu untersuchen. Dafür sollten Datenbanksequenzen von Progressoren und ECs, die beide mit HIV-1 infiziert sind, statistisch bearbeitet werden. Mit dem N-Glycosite Tool der Los Alamos Datenbank wurde die Glykosylierungsdichte aller Sequenzen untersucht und verglichen zwischen Patienten mit normaler Progression und ECs. Dabei wurde insbesondere der Schwerpunkt auf die Analyse der für die Neutralisation relevanten Domänen V1V2, V3, CD4bs und MPER gelegt. Zudem wurden Glykosylierungslücken oder fehlende Glykosylierungen mit dem Glycan Shield mapping Tool der Los Alamos Datenbank für Progressoren und ECs bestimmt und statistisch verglichen.

Einleitend zu dieser Analyse sollte in dieser Arbeit auch ein Fallbeispiel mit klinischen Daten einer Patientin aus Würzburg erstellt werden, die mit HIV-1 infiziert ist. Ihr Immunsystem ist in der Lage, die Viruslast seit Beginn der Infektion selbst zu kontrollieren. Sie ist damit als Elite Controller (EC) zu klassifizieren. Hierzu wurden Daten aus HIV-Westernblot, HIV-RTPCR und CD4-Zellzahl als auch CD4/CD8-Quotient der Patientin benutzt. Zur Verfestigung/Bestätigung des EC-Status wurde noch eine HLA-Typisierung durchgeführt als auch ein Neutralisationstest zur Prüfung, ob die Patientin diese produziert. Für diese Untersuchungen bedurfte es, laut Kommission, keiner Ethik-Nummer zur Durchführung der Experimente.

### **3. Material und Methoden**

#### 3.1. Patientendaten

Die Daten der HIV-Westernblots, High Line Immunoassays, HIV-1 RTPCRs, Lymphozytendifferentialanalysen und HIV-Suchteste für die Analyse des Fallbeispiels wurden mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Virologie und Immunologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, sowie der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt. Insgesamt handelt es sich um 22 Westernblots, 15 HIV Suchtests, einen High Line Immunoassay und 35 HIV-1 RTPCRs (Plasma). Die Daten sind jeweils mit einem Untersuchungsdatum verzeichnet. Die Westernblots und HIV Suchtests stammen aus einem Zeitraum vom 25.10.1993 bis 29.11.2019, die HIV-1 RTPCRs vom 5.11.1993 bis 29.11.2019. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen wurden in einem Kurvendiagramm schematisch abgebildet. Als x-Achse wurde der zeitliche Verlauf und als y-Achse die Ergebnisse der Daten genutzt. Hierbei wurden die Ergebnisse, ob Positivität oder Negativität zur besseren Veranschaulichung als Zahlen angegeben (0 = negativ, 1 = grenzwertig, 2 = positiv). Hinzufügend wurde noch die absolute CD4-Zellzahl und der CD4/CD8-Quotient der Patientin vom 17.06.1998 bis 29.11.2019 graphisch dargestellt.

##### 3.1.1 HLA Typisierung

Am 29.11.2019 wurde die Patientin in der Ambulanz für Infektiologie des Universitätsklinikums Würzburg zur Blutentnahme einbestellt. Hierbei wurde nach schriftlicher Einwilligung der Patientin eine Blutprobe zur HLA-Typisierung ins Institut für Transfusionsmedizin und Hämotherapie verschickt. Es sollte explizit nach HLA B57:01, B52:01 und B27:05 gesucht werden, die häufigsten HLA Typen eines Langzeitstabilen HIV-Infizierten. Das Verfahren erfolgte mittels der SSP Methode. Hierbei werden in der PCR Allel-spezifische Primer angesetzt. Somit werden Merkmale der HLA Klasse I und II in der DNA gesucht. Durch die komplementäre Form der Primer auf die Zielsequenz entstehen Amplifikate.

### 3.1.2 Titertest/Neutralisationstest

Für die Durchführung eines Neutralisationstests bedarf es, aufgrund der Infektiosität des Materials, des Arbeitens in einem BSL3-Labor. Vor dem eigentlichen Testverfahren wurde ein Titertest vollzogen zur Erstellung der Testreihen. Primär benötigt man eine Lochplatte, in der 12 Vertiefungen angelegt werden. Die erste und letzte Vertiefung dient jeweils zur Positiv- und Negativkontrolle. Von der 2. bis 12. Vertiefung wurden jeweils 50 µl Zellkulturmedium zugefügt, bestehend aus RPMI und 10%-igem fetalem Kälberserum (FCS).

Vor der Hinzugabe des Serums in jede Vertiefung muss das Serum inaktiviert werden. Hierzu wurde ein Heizblock verwendet, sodass das Serum bei 56°C für 30 Minuten inkubiert wurde. Anschließend wird 100 µl Serum in die erste Vertiefung verabreicht und von dieser 50 µl entnommen und in die nächste Vertiefung verabreicht. Somit resuspendiert man dem erstem Well 50 µl und verteilt es in das nächste Well und fort folgend. Es entsteht somit eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:1024 (Vertiefung eins bis elf). Es ist zu beachten, dass in der zwölften Vertiefung kein Serum verabreicht wird, da diese zur Negativkontrolle dient. Letztlich wurden 50 µl HIV der Patientin aus dem Fallbeispiel in jede Vertiefung pipettiert und mit 100 µl A3.01 Zellen aufgefüllt, sodass ein Gesamtvolumen von 200 µl entsteht.

Das benötigte Volumen von A3.01 wurde vorher aus der Zellzählung mittels Neubauerkammer bestimmt. Hierzu wurde diese Formel benutzt:

$$\frac{3 \times 10^6}{x \times 10^6}$$

x = gezählte Zelldichte in Millionen

Die gezählten Zellen wurden zentrifugiert (1200 rpm, 3 Min) und in 1,5 ml R10 aufgenommen.

Nach der Gabe von A3.01 in jede Vertiefung lässt man die Lochplatte bei 37°C für drei Tage inkubieren.

### 3.1.3 p24-Färbung

Primär wurden im BSL3-Labor zwölf Rundboden-Röhrchen mit den Zahlen eins bis zwölf beschriftet. In diesen wurde jeweils 1 ml 4% Formalinlösung hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die Gabe der zu färbenden Zellen (Fallbeispiel) aus den jeweiligen Vertiefungen. Es wurde mehrmals resuspendiert und darauf geachtet, dass der obere Rand der Röhrchen keine Berührung mit HIV-infizierten Zellen hat.

Die Röhrchen wurden mit Plastikstopfen verschlossen und kurz geschüttelt. Im Anschluss wurden sie für 20 Minuten in Raumtemperatur inkubiert und nach Passieren dieser Zeit mit 2 ml Waschpuffer (PBS/0,1% BSA/0,5% Saponin) gewaschen. Es folgte die Zentrifugation bei 1800 rpm für 2 Minuten. Nach insgesamt 25 Minuten ab Anfang wurde erneut der Wasch- und Zentrifugationsschritt vollzogen. Ebenso nach insgesamt 30 Minuten ab Beginn. Nachdem angenommen werden konnte, dass nach 3 Waschschritten das Formalin (4%) weitestgehend ausgewaschen wurde, mussten die Röhrchen (mit Stopfen bis zum zweiten Ring verschlossen) und der Ständer intensiv mit Ethanol (70%) eingesprüht und dekontaminiert werden. Im Anschluss konnte das S3-Labor verlassen und im S2-Labor weitergearbeitet werden.

Hier wurden in jedes Röhrchen 100 µl des primären Antikörpers zum Färben verabreicht (αp24). Jedes Röhrchen wurde im Anschluss geschüttelt und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrritte mit jeweils 2 ml Waschpuffer und ein Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm für 3 Minuten.

Nach dem Zentrifugieren wurden 50 µl des zweiten Antikörpers (© ab6785; LOT: GR247029-24; Abcam) in jedes Röhrchen verabreicht und erneut bei 4°C für 30 Minuten belassen zum Inkubieren. Nach einmaligem Waschschrtritt mit 2 ml Waschpuffer erfolgte eine erneute Zentrifugation (1200 rpm, 3 Minuten). Letztlich wurden zu jedem Röhrchen 50 µl Formalin/PBS 2% verabreicht und es erfolgte die Darstellung des Ergebnisses an der Durchflusszytometrie.

### 3.2 Env-Sequenzen

In dieser Arbeit wurden 60 Env-Sequenzen von ECs aus der Veröffentlichung Pernas M. et al. (Prevalence of HIV-1 dual infection in long-term nonprogressor-elite controllers, JOURNAL J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 64 (3), 225-231

(2013)) genommen. Die Genbank Accession numbers lauten KC595150-175; KC595177-18; KC595186; KC595191-197; KC595199; KC595201-205; KC595208; KC595210, KC595214-220; KC595222-224.

Ebenso wurden 101 Env-Sequenzen von Patienten mit normaler Krankheitsprogression aus der Veröffentlichung (Seaman et al. 2010), Tiered Categorization of a Diverse Panel of HIV-1 Env Pseudoviruses for Assessment of Neutralizing Antibodies. In: Journal of virology 84 (3) 2010), verwendet. Die Genbank Accession numbers lauten hier U08455, EU123924, AF063223, EF117265, AY713411, DQ318211, EU513197, EU513188, EF117271, EF210734, AY835438, AY835442, DQ388515, EF210726, EU289184, EF210732, AF004885, AY173956, EF117272, AY424138, EF117273, EU289186, EF117269, DQ411852, AY835445, EF117274, AY835441, AY835451, EF117267, AY835449, AY424079, EU289193, DQ411850, DQ388514, EU513193, EF117270, AF407160, EU289200, EU289197, AF407152, EU513184, EF210725, AF407158, EU289183, EU513183, DQ435683, EU289202, EU513182, AY835446, EU289190, EU513190, EF117257, EU289191, AF407148, EU513195, EU289189, AY835452, EF210735, DQ411853, DQ411851, DQ388517, DQ435682, DQ388516, EU513194, EU289196, EF210727, EU683891, AY835439, AY835448, AY423984, EU289185, EF117268, AY835447, EF117259, EU513189, EF117266, DQ411854, EF117254, EF210728, EF117258, EF117261, AF407156, EU513187, EF117262, EF210729, EU513199, EF117255, EF042692, EF117264, EF210730, EU513191, EU513185, AY835444, AY835450, EF210733, EU513198, EF210731, EF117263, EU513186, EF117260, EU513196.

### 3.3 Protein Alignment

Die einzelnen Env-Sequenzen (ECs und Progressoren) wurden über ein Protein-Alignment des NCBI („National Center for Biotechnology Information“) analysiert ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) mit dem Algorithmus Protein-Protein BLAST. Als Referenzsequenz wurde das Env-Protein von HXB2 (Genbank accession



number K03455) verwendet. Für das HXB2-Env Gen sind die Proteindomänen V1V2, V3, CD4bs und MPER in der folgenden Abbildung charakterisiert:

### K03455.1

#### Reference strain HXB2

##### > K03455.1\_full\_length\_Env

MRVKEKYQHLWRWGWRTMLLGLMLICSATEKLWVTVYVYGVVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWVATHACVPTDNPQEVVLVN  
VTENFNMWKNMVEQMEDIISLWDQSLKP **CVKLTPLCVSLKCTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKGEIKNCSFNISTSIRGKVQKEYAFF**  
**YKLDIIPIDNDTTSYKLTSCNTSVITQAC**PKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFNGTGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGS  
LAEDEVVIRS **VNFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHCNISRAKWNNTLKQIASKLREQ**  
**FGNKTIIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRICKQIINMWQKVGKAMYAPPIS**  
**QQIRCSSNITGLLLTRDGGNSNNESEIFRPGGDMRDNR**SELYKYVVKIEPLGVAPTAKRRRVQREKRAVIGALFLGFLGAAGS  
TMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQQLLQTLVWGKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSN  
KSLQIWNHTTMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLE **LDKWASLWNWFNITNWLWYIK**LFIMIVGGLVGLRIVFAVLSI  
VNRVRQGYSPLSFQTHLPTPRGDRPEGIEEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDLLRSLCLFSYHRLRDLILLIVTRIVELLGRRGWEA  
LKYWWNLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVQACRAIRHIPRRIRQGLERILL

#### V1V2-loop

##### > K03455.1\_V1V2loop

**CVKLTPLCVSLKCTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKGEIKNCSFNISTSIRGKVQKEYAFFYKLDIIPIDNDTTSYKLTSCNTSVITQAC**

#### Glycan-V3-site

##### > K03455.1\_GlycV3site

**VNFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHCNISRAKWNNTLKQIASKLREQFGNN**  
**KTIIFKQ**

#### MPER

##### > K03455.1\_MPER

**LDKWASLWNWFNITNWLWYIK**

#### CD4-binding site

##### > K03455.1\_CD4BS

**SSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRICKQIINMWQKVGKAMYAPPISQQIRCSSNITG**  
**LLLTRDGGNSNNESEIFRPGGDMRDNR**

Abbildung 3.3: HXB2-Gen mit Proteindomänen der einzelnen zu untersuchten Regionen

Durch den Protein-Blast konnten diese sites auch in den anderen Env-Sequenzen identifiziert werden. Hierbei wurden die einzelnen Regionen der Bindungsstellen jeweils allein verglichen. Es konnte somit die zugehörige Region aus den einzelnen Sequenzen herausfiltriert werden. Die entnommenen

Regionen wurden in einem Dokument untereinander aufgeschrieben und auf Referenzlänge gekürzt. Mit den gekürzten Regionen in Textdatei (.txt) wurde erneut ein Protein-Alignment durchgeführt. Aus diesem Alignment wurde ein FASTA-file generiert.

#### 3.4 Analyse der N-linked Glykosylierung

Das FASTA-file mit den Protein-Alignments wurde mit Hilfe des N-GlycoSite tools der Los Alamos HIV sequence database auf N-linked Glykosylierung untersucht (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>). In den Einstellungen der Seite wurden ausgewählt: exclude NP[ST] patters, First position asparagine (N) in NN[ST][ST] pattern (include the second N), reference coordinates HXB2 (HIV-1).

Die einzelnen Daten mit den dazugehörigen Anfangssequenzen wurden in eine Tabelle eingefügt. Hierbei wurde für jede Bindungsregion jeweils die Länge der Region (Anzahl der Aminosäuren), die Anzahl der Glykosylierungen sowie die Glykosylierungsdichte (Anzahl der Glykosylierungen/aa \* 100) bestimmt.

#### 3.5 Statistische Untersuchungen

Die Daten wurden mit statistischen Methoden analysiert. Hierbei wurden die Glykosylierungsdichten von V1V3, V3, CD4bs, MPER und Gesamt-Env von Progressoren und ECs jeweils miteinander verglichen. Primär wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Waren die Zahlen normal verteilt, so konnte ein einfacher t-Test durchgeführt werden. Waren die Zahlen nicht normal verteilt, so wurde der Mann-Whitney Test angewendet. Im Folgenden werden die einzelnen statistischen Verfahren näher beschrieben.

##### 3.5.1. D'Agostino & Pearson Test

Diese statistische Methode befasst sich mit der Normalverteilung von Daten. Der Test basiert auf die Untersuchung von Schiefe und Kurtosis und erkennt, wie weit bestimmte Daten von einer Normalverteilung oder Gaußschen Distribution entfernt sind. Aus diesen Diskrepanzen wird ein p-value errechnet, das die Signifikanz der Ergebnisse zeigt. Primär wurden unsere Daten durch diesen Test auf Normalverteilung verglichen. Hierbei wurden die Glykosylierungsdichten aus den gewonnenen Ergebnissen genommen und für jede Bindungsstelle einzeln

verglichen. Dies wurde sowohl für die Sequenzen von ECs und Progressoren durchgeführt.

Der D'Agostino & Pearson Test empfiehlt sich ab einer Datenlage von 20 zu vergleichenden Daten aufwärts, da ansonsten keine sinnvollen Ergebnisse anhand des Mittelwertes errechnet werden können. Ist das p value über 0.05 so kann von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden. Die Idee dieses Tests entspricht diesem das unabhängig voneinander gewonnene Daten verglichen werden und einem Mittelwert zugeordnet werden. Das bedeutet, dass selbst „Messfehler“ in der Gesamtheit normalverteilt sein können.

Speziell wird die Probe Schiefe und Wölbung, in unserem Beispiel  $\sqrt{x_1}$  und  $x_2$ , in diesem Testverfahren getrennt voneinander untersucht, ob zufällig genommene Proben aus einer „normalen“ Population entnommen wurden. Im Wesentlichen besteht die mathematische Formel aus,

$$A^2(\sqrt{x_1}) + A^2(x_2)$$

wobei  $A^2(\sqrt{x_1})$  und  $A^2(x_2)$  eine Annäherung beschreiben sollen. Dieser Test wird oft auch als „omnibus“ Test genannt, da er Abweichungen von der Normalität erkennen kann mithilfe der Schiefe und der Wölbung (Yap und Sim 2011).

### 3.5.2. Standard t-Test

Sofern unsere Daten normalverteilt waren, wurden die einzelnen Regionen mit Hilfe des einfachen t-Test auf Unterschiede geprüft. Dieser Test ist ein Hypothesentest, der zwei normalverteilte Datensätze anhand des Mittelwertes auf eine statistische Signifikanz untersucht. In diesem Verfahren muss es ebenfalls eine hohe Datenlage geben, damit der „zentrale Grenzwertsatz“ gegeben ist. Im Grunde genommen werden zwei Mittelwerte miteinander verglichen. Zuvor sollte die Differenz beider Mittelwerte ermittelt werden, diese bildet den Grundsatz des Verfahrens. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Varianz. Dies bedeutet, dass die Daten, die weiter entfernt vom Mittelwert sind, stärker berücksichtigt werden.

In unserem Beispiel wurden die Mittelwerte aus einer Bindungsregion von ECs mit der gleichen Bindungsregion von Progressoren verglichen. Beim t-Test muss man zwischen der Nullhypothese und der Alternativhypothese unterscheiden. Bei ersterer besteht keine Differenz zwischen den Mittelwerten, im Vergleich zur

letzteren. Da in unseren Daten Proben von zwei verschiedenen Populationen verglichen werden, muss von einer Differenz der Mittelwerte ausgegangen werden.

### 3.5.3. Mann-Whitney Test

Ein weiterer Test, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist der Mann-Whitney Test oder Mann-Whitney U-Test. Waren die zu vergleichenden Daten in der Arbeit nicht normal verteilt und waren die Gegebenheiten für die Durchführung eines einfachen t-Test nicht erfüllt, so wurde dieses Testverfahren benutzt. Er dient zum Vergleich zweier unabhängiger Proben miteinander. Im Vergleich zu den vorherigen Tests können bei diesem auch eine kleine Anzahl an Daten verwendet werden. Ein weiterer Aspekt dieses Verfahrens ist die Ordinalskalierung, die der abhängigen Variablen unterstellt ist.

Die Proben werden miteinander nicht berechnet, wie in den vorherigen Testverfahren, sondern primär rangiert. Das bedeutet, dass keine Messungen mit diesen Daten durchgeführt werden, im Gegenteil werden sie in Ränge eingeteilt. Die Abstände (absolut) zwischen den Daten werden nicht berücksichtigt. Es findet primär eine Skalierung der Daten anhand deren Größe und unabhängig deren Gruppe statt. Im Anschluss werden die einzelnen Daten, vom kleinsten ausgehend, rangiert und in der jeweiligen Gruppe eingeteilt. Letztlich werden die einzelnen Zahlen der einzelnen Ränge zusammengezählt und es bildet sich eine Rangsumme. Für die endgültige Berechnung des Testwerts U wird die größere Rangsumme benutzt. Die verwendete Formel lautet:

$$U = x1*x2 + [x1*(x1+1)/2] - V$$

U = Testsignifikanz

x1 = Proben mit größerer Rangsumme

x2 = Proben mit kleinerer Rangsumme

V = größere Rangsumme

Besteht eine große Anzahl an Proben ( $x > 30$ ) kann die Signifikanz errechnet werden. Hierbei wird der gewonnen U-Wert standardisiert mithilfe einer weiteren Formel:

$$A = U-t^{\mu}/r^{\mu} = (U-(x1*x2/2))/(\sqrt{x1*x2(x1+x2+1)/12})$$

$t^{\mu}$  = mittlerer Wert der Streuung des U-Wertes

$r^{\mu}$  = Standardfehler von U

$x1$  = Proben mit größerer Rangsumme

$x2$  = Proben mit kleinerer Rangsumme

Eine Signifikanz liegt vor, wenn der U-Wert höher als der „kritische Wert der Standardverteilung“ ist. Das bedeutet, dass sich die „zentralen Tendenzen“ der zwei Gruppen signifikant unterscheiden (Nachar 2008).

#### 3.5.4. Einfaktorielle Varianzanalyse

In unserer Datenverarbeitung wurde neben dem t-Test auch die Varianzanalyse (ANOVA) benutzt zum Vergleich abhängiger Daten/Gruppen miteinander. Hierbei wird der mittlere Wert jeder Datenlage/Gruppe untereinander verglichen. Wir benutzten diesen Test zum Vergleich mehrere Gruppen, im Gegensatz zum t-Test, der immer zum Vergleich von zwei Datensätzen bei uns benutzt wurde. Das Prinzip basiert im Vergleichen abhängiger Daten/Proben. In diesem Sinne waren unsere Proben durch die „natürliche Paarung“ miteinander verbunden, das bedeutet, dass die Messwerte der einen Bindungsstelle die Messwerte der anderen Bindungsstelle beeinflussen. Unsere Messwerte stammen von verschiedenen Bindungsstellen, haben jedoch einen Zusammenhang. Mit diesem Verfahren wird keine mathematische Differenz zwischen den Daten gemessen, sondern ein signifikanter Unterschied. Würde man in diesem Testverfahren zwei Gruppen nur untersuchen, ist dieses dem t-Test gleichgestellt.

In unserem Datensatz wurde der mittlere Wert einer unabhängigen Größe auf Unterschiede zwischen den abhängigen Gruppen miteinander verglichen. Zuerst wurden die Mittelwerte der einzelnen Datengruppen berechnet. Nun sollten diese auf Signifikanz untereinander überprüft werden. Auch die einfaktorielle Varianzanalyse versucht größere Messunterschiede (Abweichungen) innerhalb der einzelnen Gruppen zu berücksichtigen und aufzuklären. Die Basis dieses Verfahren ist die Erstellung einer „Gesamtquadratsumme“ (Kyun Kim 2017).

Diese bildet sich aus der Quadratsumme zwischen den Datengruppen und der Quadratsumme innerhalb der jeweiligen Datengruppe:

$$\text{Gesamtquadratsumme} = \text{Quadratsumme}^{\text{zwischen Datengruppen}} + \text{Quadratsumme}^{\text{innerhalb der Gruppe}}$$

Zu ersterem, hierbei wird der mittlere Wert der gesamten Datengruppe vom mittleren Wert einer Probe (der jeweiligen Datengruppe) unterschieden. Bei der Quadratsumme innerhalb der jeweiligen Datengruppe werden die gemessenen Abweichungen untersucht und verglichen vom mittleren Wert der jeweiligen Probe. Am Ende wird die Signifikanz anhand des Unterschiedes mit der sogenannten „F-Statistik“ untersucht. Hierbei handelt es sich um eine „Prüfgröße“. Falls diese über dem kritischen Wert liegt besteht ein signifikanter Unterschied zwischen mindestens zwei der zu untersuchenden Datengruppen. Diese „F-Statistik“ wird aus dem Median der Abweichungsquadrate und der Division dieser durch deren Freiheitsgrade bestimmt. In weiteren Tests kann dann errechnet werden, zwischen welchen Gruppen es genau einen Unterschied gibt (Wahid et al.).

#### 3.5.5. Balkendiagramm/Substraktions-Balkendiagramm

Zur Veranschaulichung wurden die relativen Glykosylierungshäufigkeiten jeder Bindungsregion, die verglichen wurde, und des Gesamt-Envs in einem Balkendiagramm abgebildet. Neben der statistischen Signifikanz wurde in der Graphik die Quartile aus 25%-, 50%- (Median) und 75%-Perzentil abgebildet. Zusätzlich wurde die relative Glykosylierungshäufigkeit in den einzelnen Aminosäurepositionen des Blasts (Tool: [https://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/GLYCOSITE/glycosite\\_main.cgi](https://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/GLYCOSITE/glycosite_main.cgi)) mit der Option: “Number of N-linked glycosylation sites by position” ermittelt. Aus diesen Daten wurde außerdem ein Substraktions-Balkendiagramm erstellt, das die Unterschiede in der Glykosylierungshäufigkeit in den einzelnen Aminosäurepositionen des Blasts zwischen ECs und Progressoren zeigt. Dafür wurden die relativen Häufigkeiten pro Aminosäureposition der ECs von denen der Progressoren subtrahiert.

### 3.6. Glycan Shield mapping

Nach der Publikation von (Wagh et al. 2018) (Completeness of HIV-1 Envelope Glycan Shield at Transmission Determines Neutralization Breadth, 2018) haben HIV-infizierte Patienten eine höhere Breite der neutralisierenden Antikörper je dichter oder kompletter die Glykosylierungen um das Env sind als bei Patienten, deren Env-Protein, Lücken im Glykosylierungsschild aufweist. Durch ein online-Tool können fehlende Glykosylierungen (PNGs) als auch die Größe der Leckage aufgezeigt werden (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYSHIELDMAP/glyshieldmap.html>). Hierzu wurden die zu untersuchten Env-Sequenzen in das Feld „Paste amino acid alignment“ hinzugefügt. Bei „Is HXB2 in the alignment?“ sollte „No“ ausgewählt werden. Nachdem man „submit“ betätigt, werden die einzelnen Sequenzen analysiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Zeitlicher Verlauf der laborchemischen Ergebnisse des Fallbeispiels

Man erkennt in den untenstehenden Grafiken den zeitlichen Ergebnisverlauf verschiedener laborchemischer Untersuchungen bei der Patientin. Es ergibt sich zu jederzeit ein positiver HIV-Suchtest. Der HIV-Westernblot ist zu Beginn bis zum 128. Tag als „grenzwertig“ beschrieben und wird in weiteren Bluttests der Patientin bis zum 5513. Tag als „positiv“ bewertet. Der durchgeführte HIV-Line-Immunoassay am 27.7.2018 ergibt ebenfalls ein positives Ergebnis. HIV-PCRs des Plasmas vom 11. bis zum 9041. Tag waren zu jedem Zeitpunkt negativ, ebenso eine HIV-PCR der Leukozyten vom 107., HIV-PCRs der Lymphozyten vom 1799. bis 3005. Tag sowie eine HIV-PCR von CD4-Lymphozyten vom 1932. Tag.

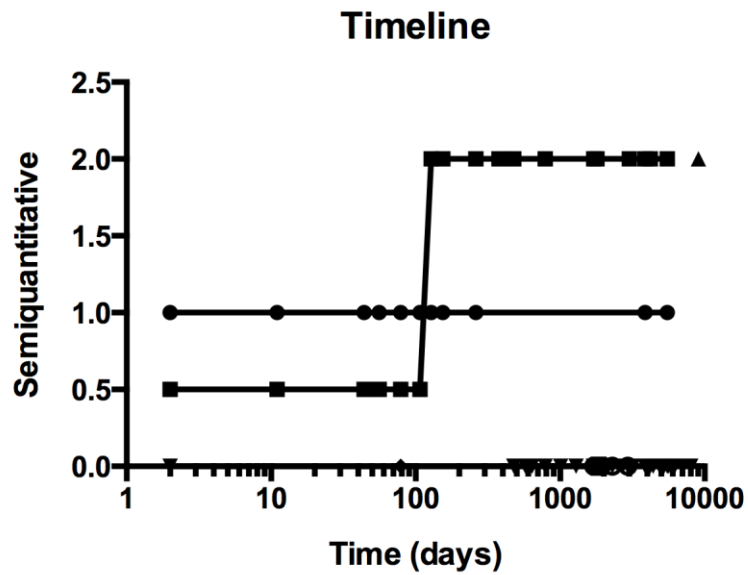
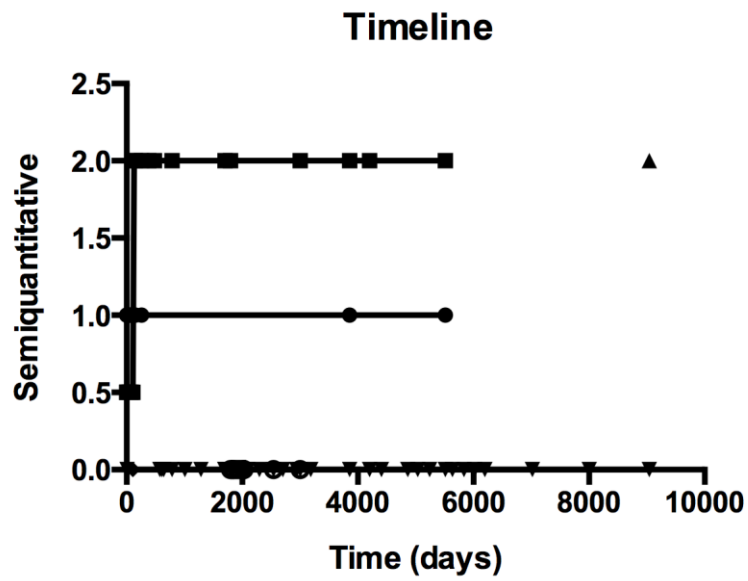
Die einzelnen Proteinbanden des Westernblots wurden getrennt grafisch aufgezeigt. Bei gp160 (Env) erkennt man, bis auf einen Abschwung zwischen dem 11. und 44. Tag, einen durchgehenden Nachweis dieser Proteinbande bis zum 5513. Tag. Dagegen weist gp120 (Env) Fluktuationen auf mit zunächst keinem Nachweis und zwischenzeitlicher Positivität bis zum 378. Tag. Letztlich ist diese Proteinbande ab dem 4202. Tag nicht mehr bei der Patientin

nachweisbar. Bei p68 (Pol) besteht ebenfalls eine Fluktuation mit nachweisbaren und nicht nachweisbaren Banden über den zeitlichen Verlauf hinweg. Dagegen ist bei p55 (Pol) wie bei gp160 (Env) ein anfänglicher Abschwung zu verzeichnen sowie ein durchgehender Nachweis bis zum letzten Tag. Ebenfalls Schwankungen über den zeitlichen Verlauf hinweg weisen die Banden p52 (Pol), gp41 (Env), p40 (Gag), p34 (Pol) und p18 (Gag) auf. Sie alle sind, bis auf gp41 (Env), zum Ende der Grafik hin negativ. Letztlich zeigen p25 (Gag) wie auch gp160 (Env) und p55 (Pol) eine überwiegend durchgehende Nachweisbarkeit im Westernblot auf.

Bezüglich der absoluten CD4-Zellzahl kann man über die Jahre einen stetigen Anstieg dieser verzeichnen. Ebenso ergibt sich parallel ein Anstieg des CD4/CD8-Quotienten.

Interessant ist, dass die Immunantwort der Patientin über den Beobachtungszeitraum hinweg nicht konstant ist, sondern fluktuiert. Es ist offen, ob dieses Phänomen durch Schwankungen des Immunsystems hervorgerufen wird oder ob es auf eine geringe Hintergrundreplikation des Virus hindeuten könnte. Dennoch deutet sich durch die steigende CD4-Zellzahl über die Jahre, eine Verbesserung der Immunität der Patientin an, trotz weiterhin positiver HIV-Infektion.

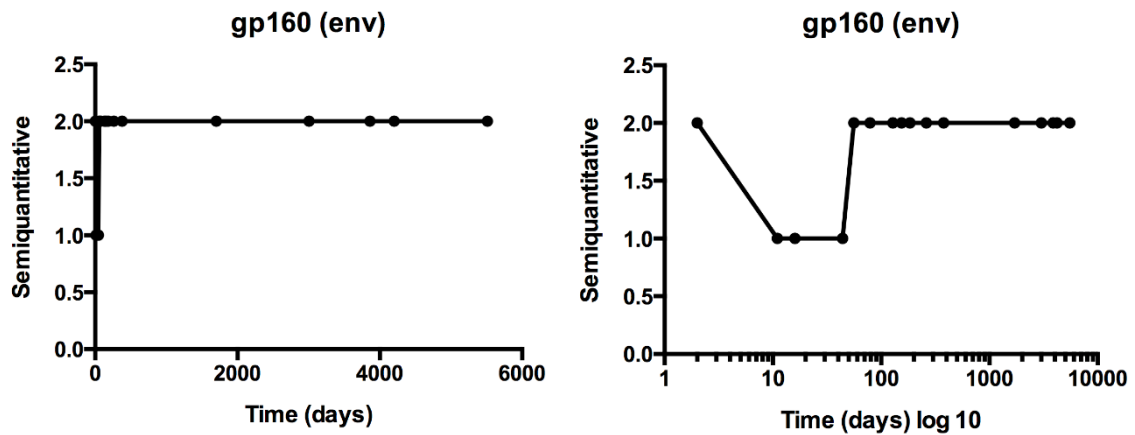




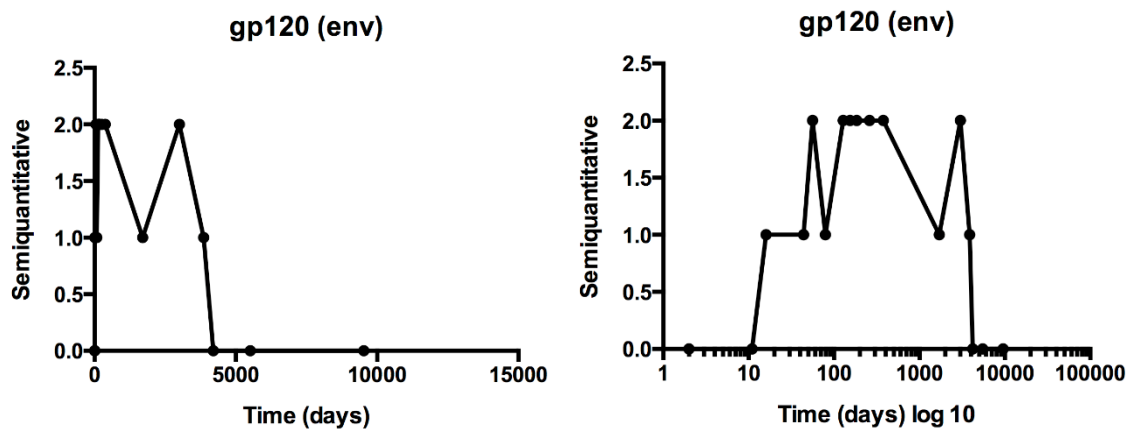
- HIV-Suchtest
- HIV-Western Blot
- ▲ HIV-Line Immunoassay
- ▼ HIV-1 PCR (Plasma)
- ◆ HIV-1-PCR (Leukozyten)
- HIV-1-PCR (Lymphozyten)
- ◻ HIV-1-PCR (CD4 Lymphozyten)

**Abbildung 4.1a:** Zeitliche Verlaufsgrafik der Ergebnisse immunologischer Untersuchungen des Fallbeispiels. Daten als Punktdiagramm mit Verbindungslinien. Für die Bezeichnungen der Kurven, siehe Legende. X-Achse: Zeit in Tagen; Y-Achse: Semiquantitativ (0= negativ; 0,5 = grenzwertig; 1 = positiv; 2 = positiv)

A



B



C

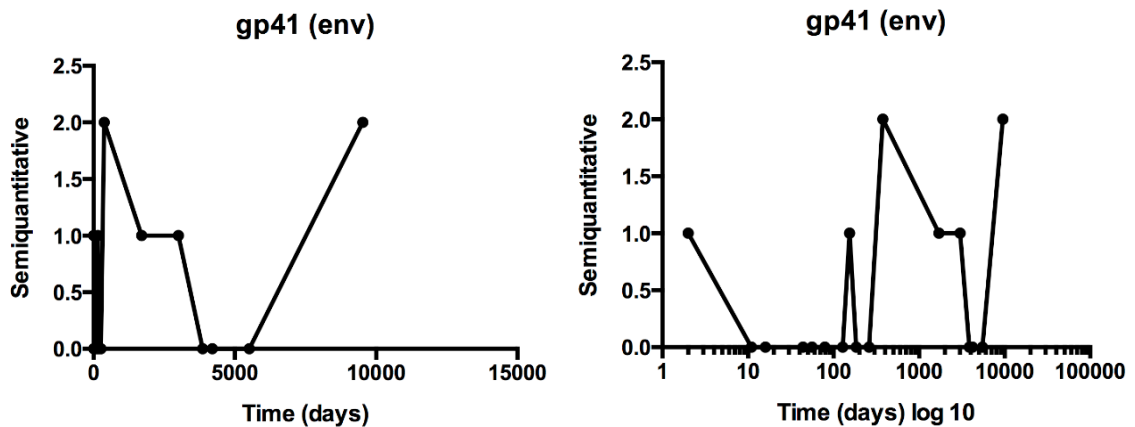
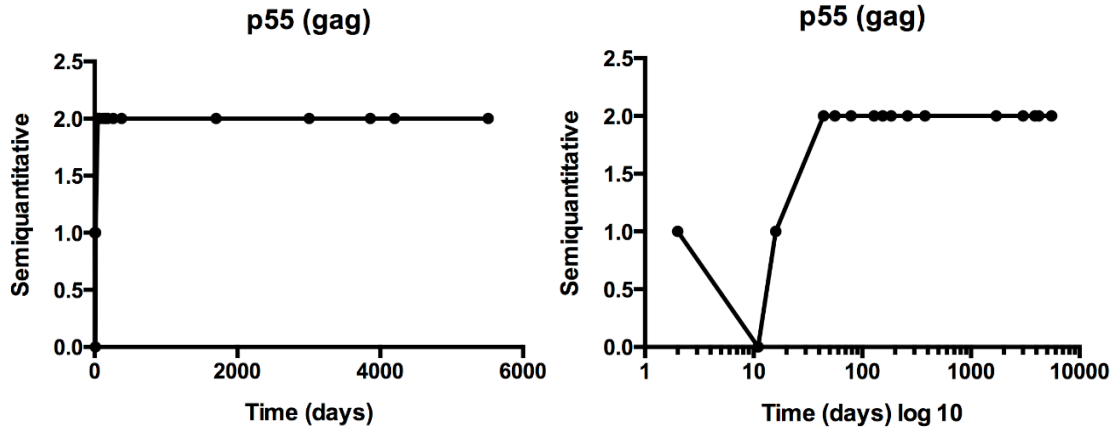
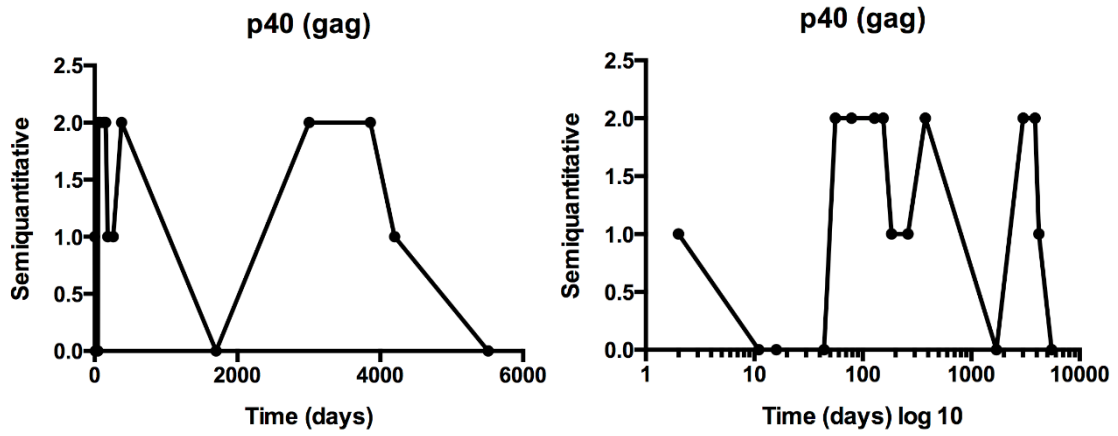


Abbildung 4.1b: Darstellung des Westernblots mit zeitlichem Verlauf der einzelnen Banden (A-C). Man erkennt eine durchgehende Positivität bei gp160. Hingegen wird gp120 ab ca. dem 4000. Tag negativ, gp41 fluktuiert mit z. T. Re-/Aktivierung. 0 = negativ/nicht nachweisbar, 1 = grenzwertige Reaktion, 2 = positiv

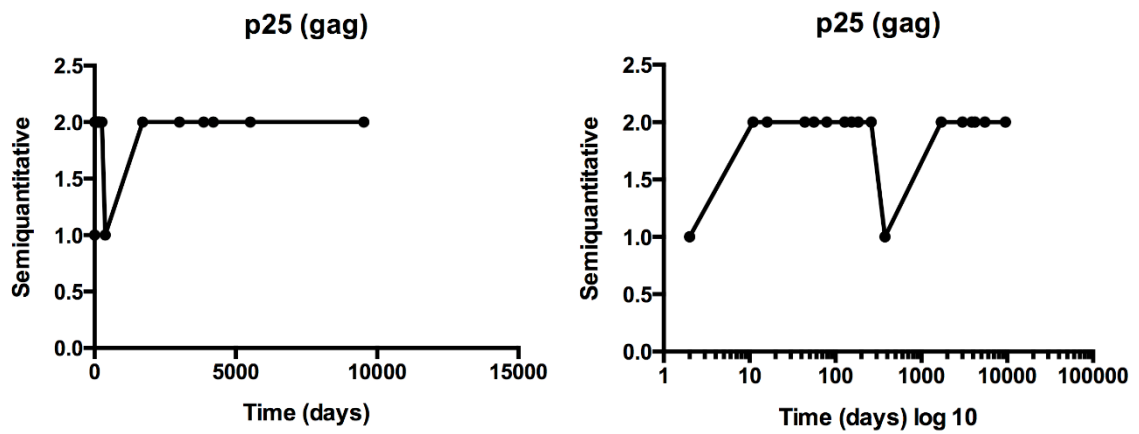
D



E



F



G

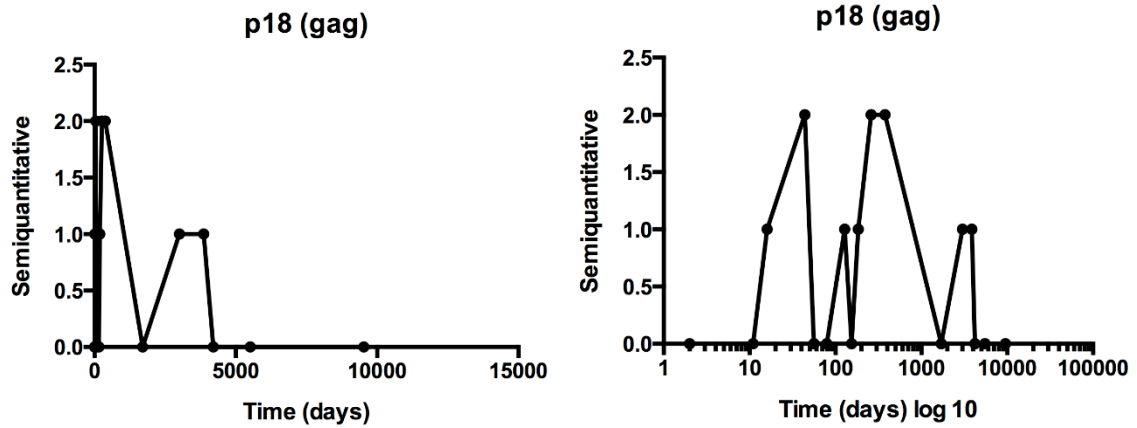
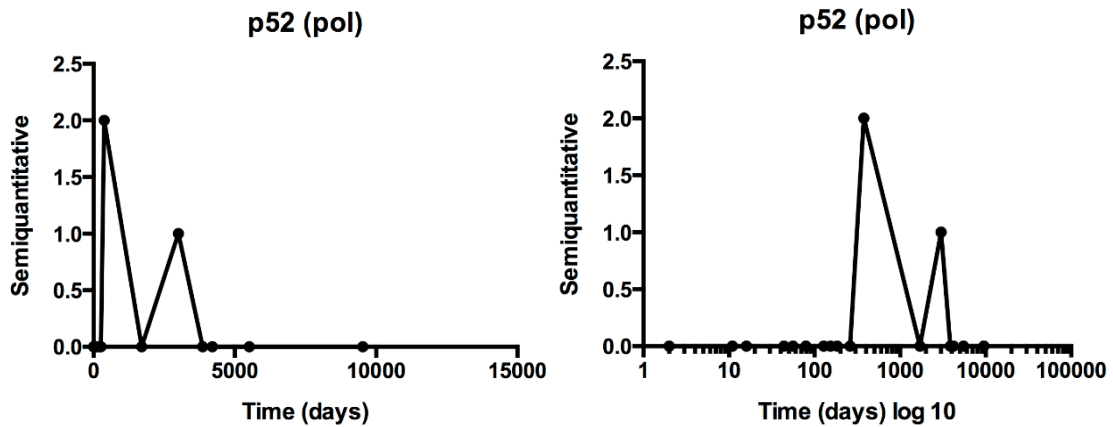
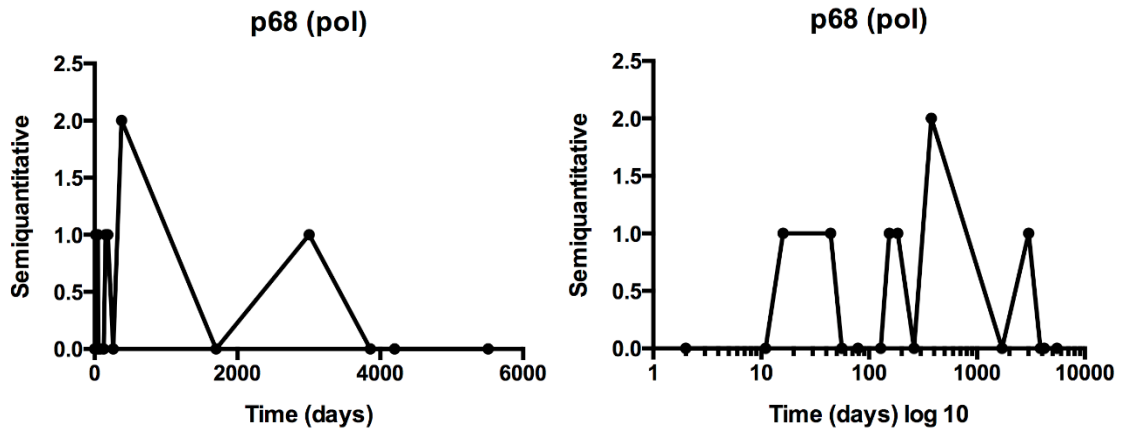


Abbildung 4.1c: Darstellung des Westernblots mit zeitlichem Verlauf der einzelnen Banden (D-G). Man erkennt eine durchgehende Positivität von p55 und p25. Hingegen weisen p18 und p40 eine Re-/Aktivierung auf und sind schließlich zum Ende hin aktuell negativ. 0 = negativ, 1 = grenzwertig, 2 = positiv

H



I



J

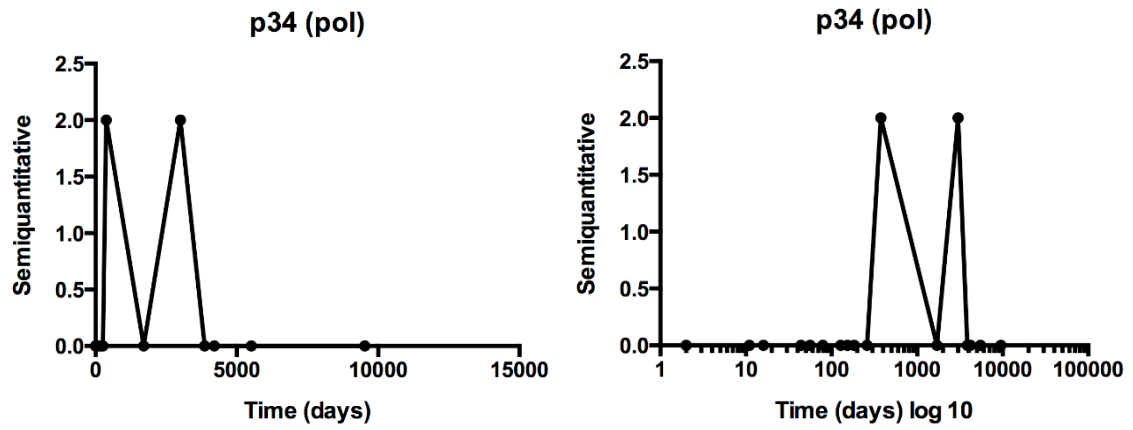
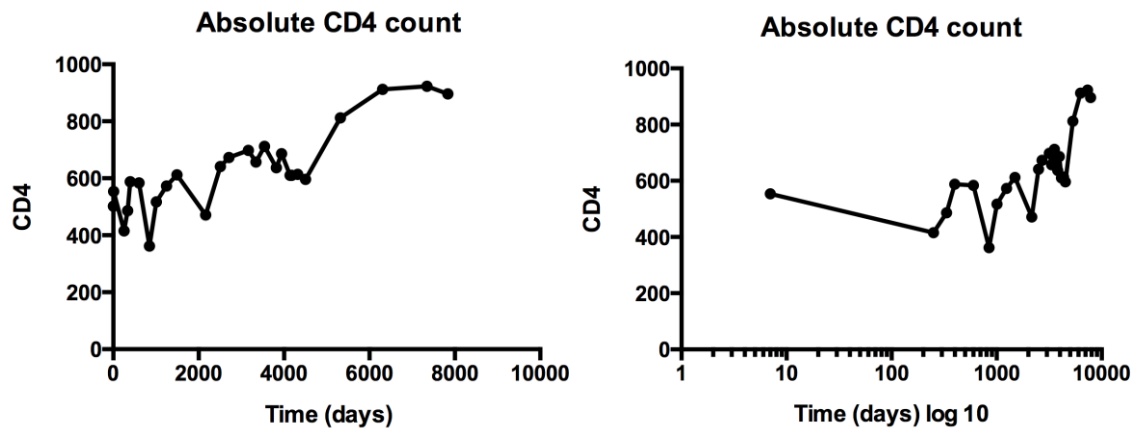


Abbildung 4.1d: Darstellung des Westernblots mit zeitlichem Verlauf der einzelnen Banden (H-J). Man erkennt eine Reaktivierung des Immunsystems bei p52, p68 und p34. 0 = negativ/nicht nachweisbar, 1 = grenzwertig, 2 = positiv

K



L

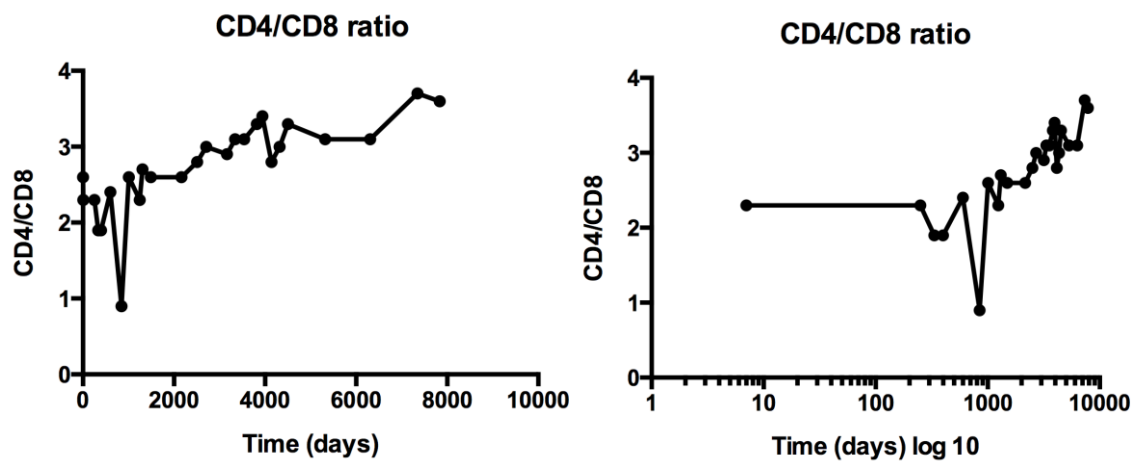


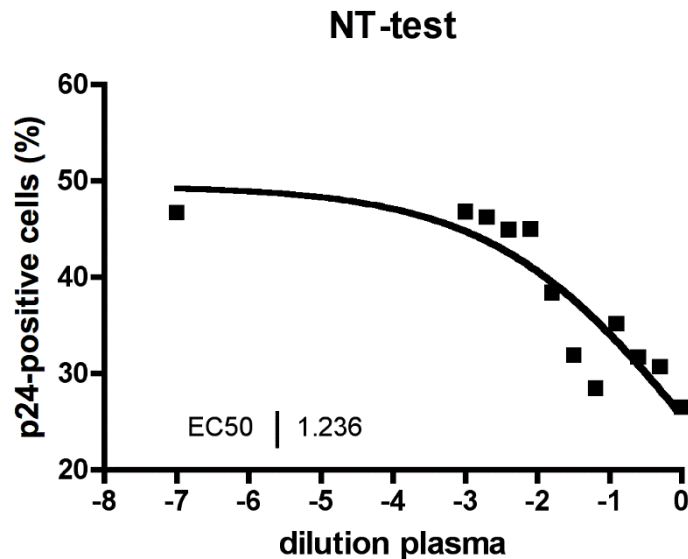
Abbildung 4.1e: Darstellung der absoluten CD4-Zellzahl ( $n/\mu l$ ) und des CD4/CD8-Quotienten im zeitlichen Verlauf der Patientin (K-L). Man erkennt über die Jahre einen deutlichen Anstieg der CD4-Zellzahl mit parallelem Anstieg des Quotienten aus CD4/CD8.

#### 4.1.1. HLA-Typisierung

Die Patientin ist negativ für die HLA Typen B57:01, B52:01 und B27:05. Ihr HLA Ergebnis lautet nach der SSP Methode HLA B57:02. Aus Archivdaten erkennt man, dass die Patientin bereits im Jahr 2006 ein negatives Testergebnis für HLA B27 hatte. In der Literatur wurde das Allel B57:02 als protektiv bezüglich virämischer Kontrolle bei HIV-1 Infektionen erkannt (Salgado et al. 2014). Insgesamt gilt HLA B57 als begünstigender Faktor in der Entstehung virämischer Kontrolle (Ramírez de Arellano et al. 2019). In gleicher Publikation (Salgado et al. 2014) konnte mit in vivo Kontrollen gezeigt werden, dass die Viruskontrolle bei

HLA B57-positiven ECs nicht mit defekten Viren assoziiert ist, sondern offenbar über immunologische Kontrolle erfolgt.

#### 4.1.2. Ergebnis des Neutralisationstests/p24-Färbung



**Abbildung 4.1.2: Neutralisationstest des Fallbeispiels.** Der Neutralisationswert in der höchsten Verdünnung beträgt 46,67%. Der EC50 liegt bei 1.236.

Man erkennt keine relevante Neutralisierung des Virus. Neutralisierende Antikörper sind kaum vorhanden. Der Neutralisationswert bei maximaler Verdünnung beträgt 46,67%. Anhand der Ergebnisse muss man das Medium um den Faktor  $10^{1,2636}$  verdünnen, um eine 50%-ige Inhibition zu erzielen. Es wird deutlich, dass die Viruskontrolle der Patientin aktuell nicht durch neutralisierenden Antikörpern vonstattengeht.

#### 4.2. Vergleich der Glykosylierungsdichte von V1V2 bei ECs und Progressoren

Die Glykosylierungsdichte von jeder Bindungsstelle wurde zwischen Sequenzen von Progressoren („HIV-1“) und von ECs verglichen („HIV-1 ECs“). Man erkennt eine mittlere Glykosylierungsdichte von ca. 8% in der untersuchten Region (d.h. jede 12. Aminosäure trägt eine Glykosylierung). Die 25% und 75% Perzentile beträgt jeweils ca. 7 und 9 %. Nach dem D'Agostino & Pearson omnibus normality test besteht eine Normalverteilung der Daten ( $p$  value > 0,05). Es lässt sich kein

statistisch signifikanter Unterschied der PNG der V1V2-Region zwischen Patienten mit normaler Krankheitsprogression und ECs feststellen ( $p = 0.4051$ , Standard t-Test).

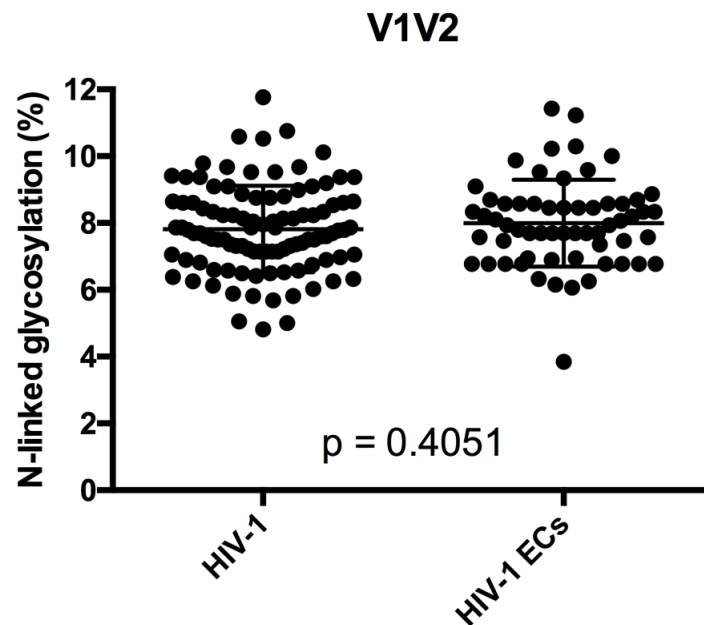
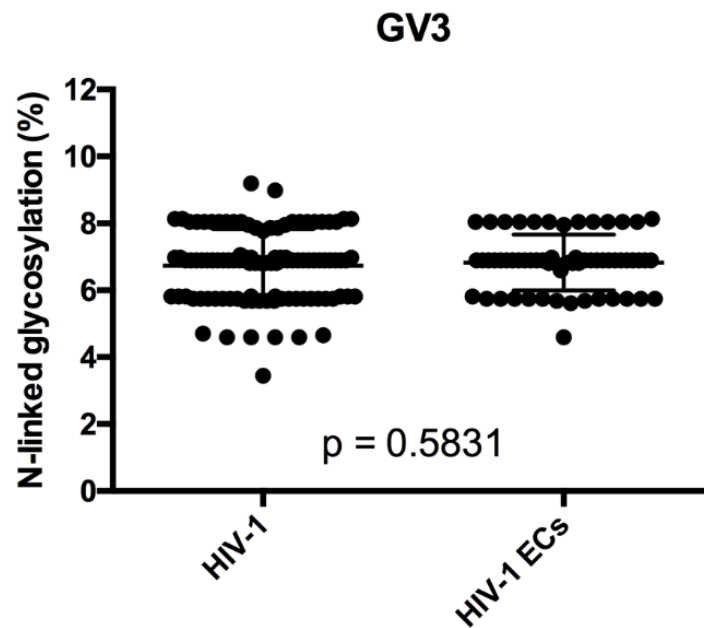


Abbildung 4.2: Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen Progressoren (HIV-1) und von ECs (HIV-1 ECs) der Bindungsregion V1V2. Daten als Scatter dot plot mit mean und SD. Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden mit dem Students t-Test für normalverteilte Werte analysiert ( $p = 0.2457$ ).

#### 4.3. Vergleich der Glykosylierungsdichte von V3 bei ECs und Progressoren

Man erkennt eine mittlere Glykosylierungsdichte von ca. 7 % in der untersuchten Region (d.h. jede 11. Aminosäure trägt eine Glykosylierung). Die 25% und 75% Perzentile beträgt jeweils ca. 6 und 8 %. Nach dem D'Agostino & Pearson omnibus normality test besteht eine Normalverteilung der Daten ( $p \text{ value} > 0,05$ ). Es lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der PNG der V3-Region zwischen Progressoren und ECs feststellen ( $p = 0.5831$ , Standard t-Test).





**Abbildung 4.3:** Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen Progressoren (HIV-1) und von ECs (HIV-1 ECs) der Bindungsregion V3. Daten als Scatter dot plot mit mean und SD. Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden mit dem Standard T-test für normalverteilte Werte analysiert ( $p = 0.5831$ ).

#### 4.4. Vergleich der Glykosylierungsdichte von CD4 bei ECs und Progressoren

Man erkennt eine mittlere Glykosylierungsdichte von ca. 6 % in der untersuchten Region (d.h. jede 10. Aminosäure trägt eine Glykosylierung). Die 25% und 75% Perzentile beträgt jeweils ca. 5 und 7 %. Nach dem D'Agostino & Pearson omnibus normality test besteht eine Normalverteilung der Daten ( $p \text{ value} > 0,05$ ). Es lässt sich ein deutlich statistisch signifikanter Unterschied in der PNG der CD4-Region zwischen Progressoren und ECs feststellen ( $p = 0.0001^{***}$ , Standard t-Test).

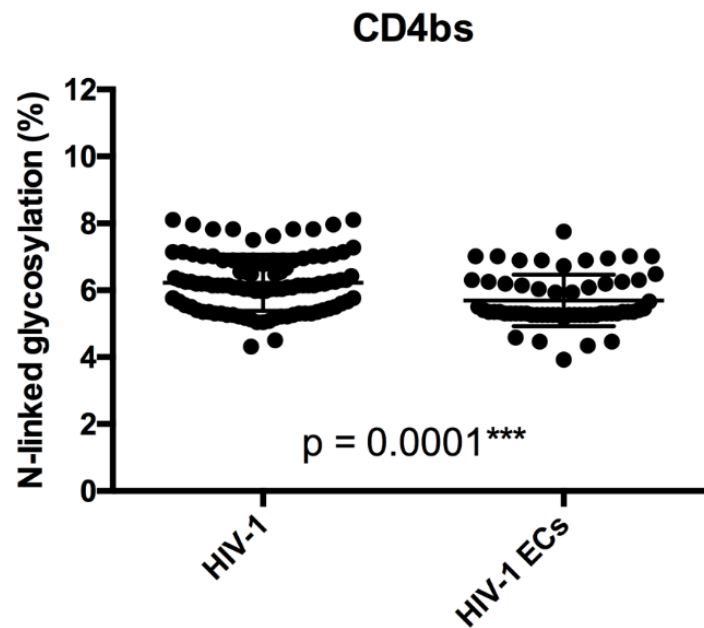


Abbildung 4.4: Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen Progressoren (HIV-1) und von ECs (HIV-1 ECs) der Bindungsregion CD4. Daten als Scatter dot plot mit mean und SD. Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden mit dem Standard T-test für normalverteilte Werte analysiert ( $p = 0.0001^{***}$ ).

#### 4.5. Vergleich der Glykosylierungsdichte von CD4bs bei ECs und Progressoren

Man erkennt eine mittlere Glykosylierungsdichte von  $< 1\%$  in der untersuchten Region (d.h. fast keine Aminosäure trägt eine Glykosylierung). Die 25% und 75% Perzentile beträgt bei beiden  $< 1\%$ . Nach dem D'Agostino & Pearson omnibus normality test besteht keine Normalverteilung der Daten ( $p$  value  $< 0,0001$ ). Es lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der PNG der CD4-Region zwischen Progressoren und ECs feststellen ( $p = 0.0104^*$ , Standard t-Test).

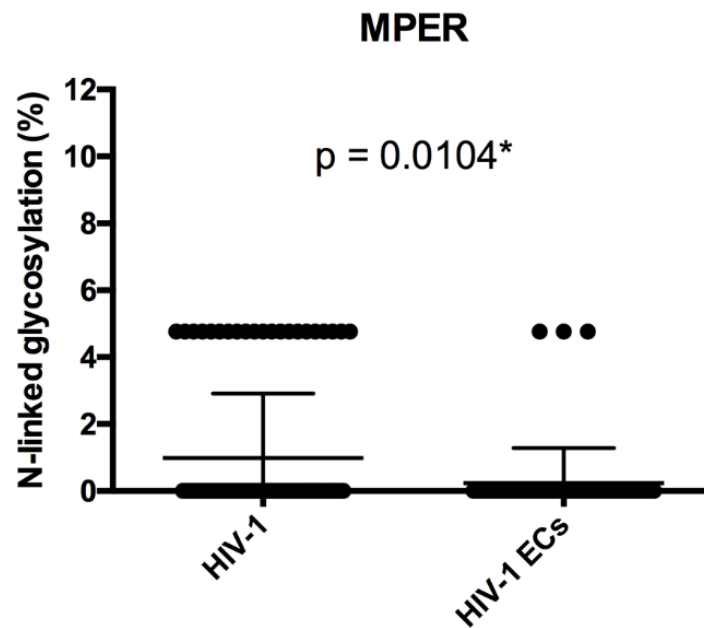
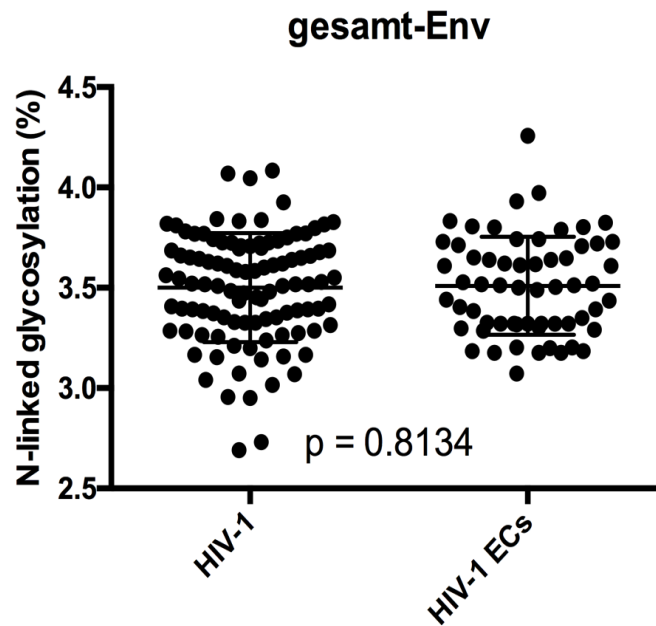


Abbildung 4.5: Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen Progressoren (HIV-1) und von ECs (HIV-1 ECs) der Bindungsregion MPER. Daten als Scatter dot plot mit mean und SD. Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test für nicht-normalverteilte Werte analysiert ( $p = 0.0104^*$ ).

#### 4.6. Vergleich der Glykosylierungsdichte des gesamten ENVs bei ECs und Progressoren

Man erkennt eine mittlere Glykosylierungsdichte von  $< 1\%$  in der untersuchten Region (d.h. grob es gibt fast keine Aminosäure, die eine Glykosylierung trägt). Die 25% und 75% Perzentile beträgt bei beiden  $< 1\%$ . Nach dem D'Agostino & Pearson omnibus normality test besteht keine Normalverteilung der Daten ( $p$  value  $< 0,0001$ ). Es lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der PNG des Gesamt-ENVs zwischen Progressoren und ECs feststellen ( $p = 0.8134$ , Standard t-Test).



**Abbildung 4.5:** Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen Progressoren (HIV-1) und von ECs (HIV-1 ECs) des gesamten ENVs. Daten als Scatter dot plot mit mean und SD. Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test für nicht-normalverteilte Werte analysiert ( $p = 0.8134$ ).

#### 4.7. Vergleich der drei auffälligen MPER Sequenzen miteinander

Des Weiteren wurden die drei auffälligen MPER-Sequenzen aus den Sequenzen der ECs, die positiv für Glykosylierungen waren, weiter untersucht. Deren Env-Sequenzen entsprechen:

**KC595175**

```

MRVKGIRKNYQHLWRWGAMLLGLLMICSATDKLWVTVYYGVPVWKEATTTLCASDAKAYDTEVHNVWA
THACVPTDPNPQEVGLENVTEDFNMWKNNMVEQMEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDLKNATDT
NSSTTEGGEMKNCFSNITNIRDKVKKEYALFYKLDVVPIDNDDNSSYRLISCNTSVITQACPKVSFEPIPIH
YCAPAGFAILKCKDKKFKSGKGQCKNVSTIQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEEVIRSDNFTDNAKTIVQLN
ESIEINCTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGQIIEIRQAHCNLSRARWENTLKQIATKLREQFKNKTIVFNHSS
GGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNSTKLFNSTWDSNSTWNGTEGSNNTGGNDTLTLPKRQIINMWQEVGK
AMYAPPPIRGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSSNETETFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAK
RRVVQREKRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARLLLSGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGI
KQLQARVLAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNVSWSNKSLNEIWDNMTWMQWEKEINNYTSLIY
TLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWTWFDITNWLWYIKIFIMVVGGLVGLRIVFTVLSIVNRVRQGYSP
SFQTRLPTQRGPDRPEGIEEGGERDRDRSGRLVGGFLALFWDDLWLSLCLFSYRRLRDLILLIVTRIVELLG
RRGWEVLKYWWNLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVLQRAYRAILHIPTRIRQGLERALL

```

#### KC595194

MRVKGIRKNYQHLWRWGTMMLGLLMICSAAEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWA  
THACVPTDPNPQEVVLGNVTENFNMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDWKNATN  
TTTTNTTATNITGSSGKMWEKGEIKNCSFNVTNIRDKIQREYGLFYKLDVVPIGNSNSSYRLINCNTSVITQ  
ACPKVSFDPIPIHYCAPAGFAILKCNDDKFNGTGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEIEVIRSAN  
FTDNAKTIIVQLKEPITINCTRPSNNTRRSIHIGPGRAFYATEAITGDIRQAYCTLNKTKWNNTLQQIATKLRA  
QLSNITTIVFNRSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSVWKANSTWNSTEGSNNNAGNITLPCRICK  
IINMWQEVGKAMYAPPIRGQISCSSNITGLLLTRDGGNITNGTEIFRPGGGMDRDNWRSELYKYKVVKIEPL  
GIAPTKAKRRVVQREKRAVGIGAMFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQHHL  
LQLTVWGKQLQARVLAVERYLKDQQLLGMWGCSEGLICTTTPWNASWSNKSLSNIWDNMTWMEWEK  
EINNYTGLIYTLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITEWLWYIKIFIMIVGGLVGLRIVFTVLSIVNR  
VRQGYSPFSQTHLPAPRGPDRPEGIGEEGEGDRAKSSQLVGGFLALFWVDLRDLCLFSYHRLRDLILLI  
VTRIVELLGRRGWEVLKYWWNLLQYWSQELKNSAISLLNATAIAVAEGTDRVIELVRRACRAILHIPTRIRQ  
GLERALL

#### KC595197

MRVKGIMKNCQHLWRWGITLLGILMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDKEVHNVWAT  
HACVPTDPNPQEVVLENTDFNVWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDYNNATNA  
NSSSVEKGEIQNCSFNITNIKDKVQKTYALFYKLDVVPIDNASSYRLISCNTSVLTQACPKVSFEPIPIHFCA  
PAGFAILKCRDTKFNGKGTCKNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEIEVIRSDNFTNNARTIIVQLEQS  
VKINCTRPNNTNRKSIHIGPGKAFYAAREIIGDIRQAFCTINRTEWNNTLGQIVKKLREQFGNKTIIFNSSSGG  
DPEIVMHSFNCGGEFFYCNTTQLFNSTWNSTTRNDTEGNITLPCRICKIINMWQEVGKAMYAPPISGQISC  
SSNITGILLTRDGGNTNGNNTETFRPGGGMDRDNWRSELYKYKVVKIEPLGIAPTRAKRRVVQKEKRAVGI  
GAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGKQLQARVLAVERY  
LQDQQLRGIWGCSEGLICTTAVPWNTSWSNKSLSKAIWDNMTWMMQWEKEISNYTGLIYTLIEESQNQQEKN  
EQELLELDKWESLWNWFNITNWLWYIKIFIMIVGGLVGLRIILAVLSIVNRVRKGYSPFSQTHLPTPRGPDR  
PEGTEEEGGERDRDRSERLVTGLLPLIWDLLRSLCLSSYHRLRDLILIVTRIVELLGRRGWEVLKYWWTLL  
QYWSQELKNSAVSSFDAIAIIVAGGTDRRIEGLQRICRALLHIPVRIRQGLERALL

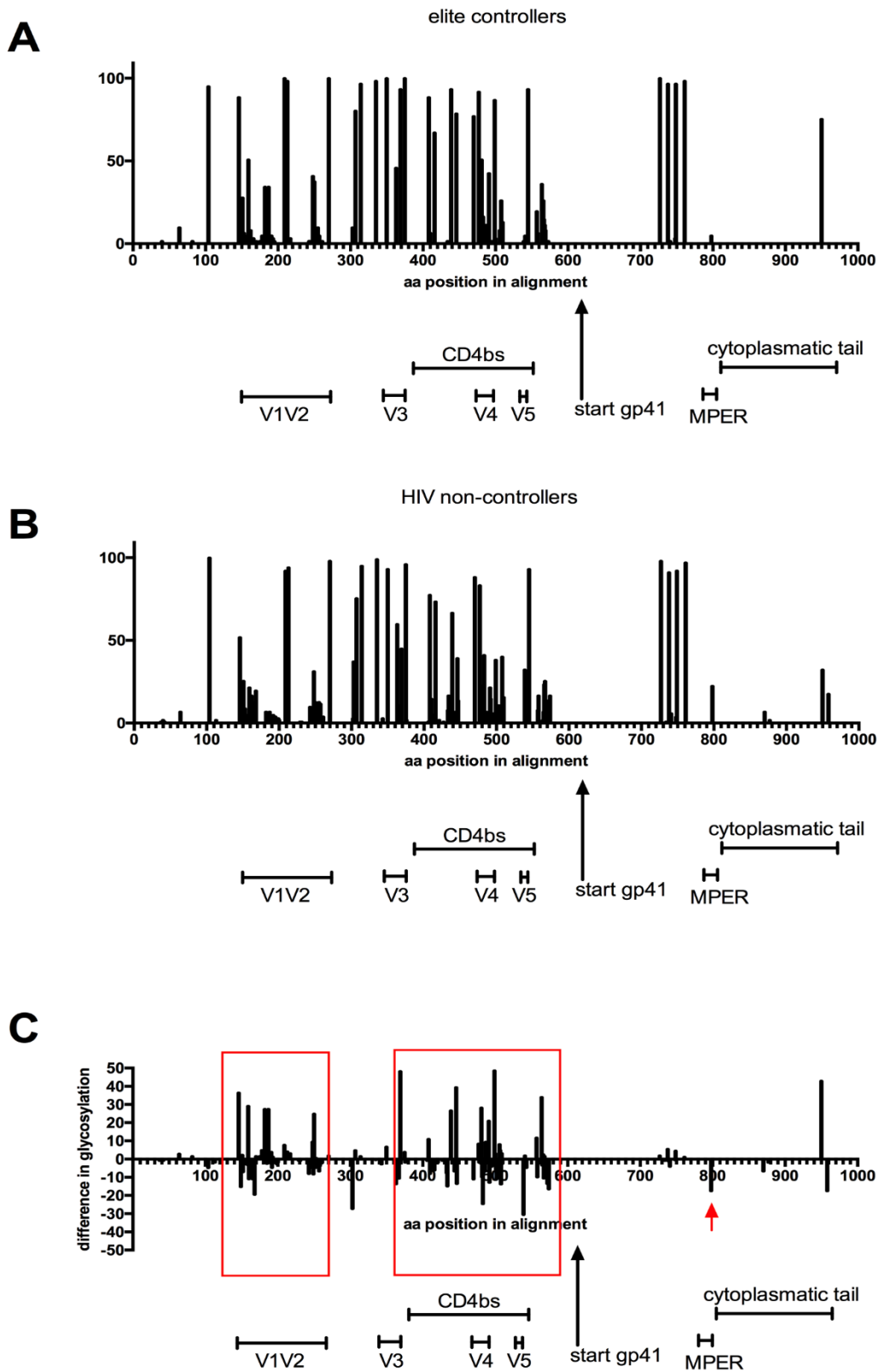
Die interessanten Regionen für jede Env-Sequenz wurden auf Referenzlänge verkürzt und waren für **KC595175** LDKWDSLWSWFNITNWLWYIK, für **KC595194** LDKWASLWNWFNITEWLWYIK und für **KC595197** LDKWESLWNWFNITNWLWYIK. Versucht man einen Vergleich zu ziehen zwischen den drei Sequenzen mit Glykosylierung und den 57 Sequenzen ohne Glykosylierung, so kann man nach Anwendung des Fisher's exact test eine entsprechende Wahrscheinlichkeitstheorie aufstellen. Es ergibt sich primär ein Zusammenhang zwischen der N-Glykosylierung und der Entstehung eines EC ( $p = 0,0062$ ). Leider liegt die Sensitivität beim Vergleich der Daten nur bei 5% und die Spezifität bei 79%. Nach den Ergebnissen besteht eine ca. 60%ige Wahrscheinlichkeit, falls man keine Glykosylierung in der MPER-Region aufweist, ein Progressor zu werden.

#### 4.8. Vergleich der Glykosylierungsdichten zwischen ECs und Progressoren entlang der Aminosäurepositionen

Bisher wurde die Glykosylierungsdichte in einzelnen Regionen (V1V2, V3, CD4bs, MPER) betrachtet. Im Folgenden soll die Glykosylierungsdichte in Bezug auf einzelne Aminosäurepositionen des Env-Proteins untersucht werden. Dazu wurden mit Hilfe des Glykosylierungs-Tools (s. Methodenteil) die relative Häufigkeit der Glykosylierung in jeder einzelnen Aminosäureposition des gemeinsamen Blasts von den Sequenzen von ECs und Progressoren bestimmt und für die beiden Gruppen angegeben (Abb. 4.8a und b). Man erkennt, dass in bestimmten Positionen in nahezu 100% der untersuchten Sequenzen eine PNG auftritt, während in anderen Positionen in einem geringeren Anteil PNGs auftreten. Es fällt auf, dass insbesondere das gp120 von Env (Blast-Position 1-600) sowohl bei ECs als auch bei Progressoren sehr stark glykosyliert ist, während des gp41-Protein deutlich weniger PNGs aufweist. In der Abbildung sind auch PNGs innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von gp41 zu erkennen. Diese werden in vivo jedoch nicht glykosyliert, weil sie im intrazellulären Bereich des Proteins liegen. Um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der PNG in den einzelnen aa-Positionen zwischen ECs und Progressoren (NP) gibt, wurde die Differenz der PNG-Häufigkeit ( $PNG_{EC} - PNG_{NP}$ ) ermittelt (Abb. 4.8c). Man erkennt, dass es Unterschiede in der PNG zwischen ECs und Progressoren gibt (andernfalls gäbe es keine Balken in Abb. 4.8c). Man erkennt auch, dass in Abhängigkeit von der Position ECs mal mehr PNG-sites und mal weniger als Progressoren besitzen. Die größten Unterschiede treten dabei in den Regionen V1V2 und CD4bs auf. Auch die Hypoglykosylierung in der MPER-Region bei ECs ist in Abb. 4.8c deutlich zu erkennen (hervorgehoben durch Pfeil).

Speziell werden drei der vier Regionen hier hervorgehoben. Man erkennt in der V1V2 Region der Abbildung 4.8c eine insgesamt positiv ausgerichtete Glykosylierungsdifferenz der gesamten PNGs. Die positive Differenz der Glykosylierungen der ECs überwiegen in dieser Region. Das gleiche erkennt man auch in der Region CD4bs. Hier sind deutlich positive Glykosylierungsdifferenzen zu erkennen, d.h. der Gewinn durch die Differenz der absoluten Zahlen der PNGs der ECs in diesem Bereich ist größer als der der

Progressoren. Bei der Region MPER erkennt man einen Verlust für die ECs in der negativen Glykosylierungsdichte. Hier weisen prozentual gesehen ECs geringere PNGs auf als Progressoren.



**Abbildung 4.8:** Glykosylierungsdichte in relativen Zahlen mit Aminosäureposition im alignment bei ECs und Progressoren. Unten erkennt man die bildmorphologische Differenz der beiden oberen Abbildungen mit „Gewinnen und Verlusten“.



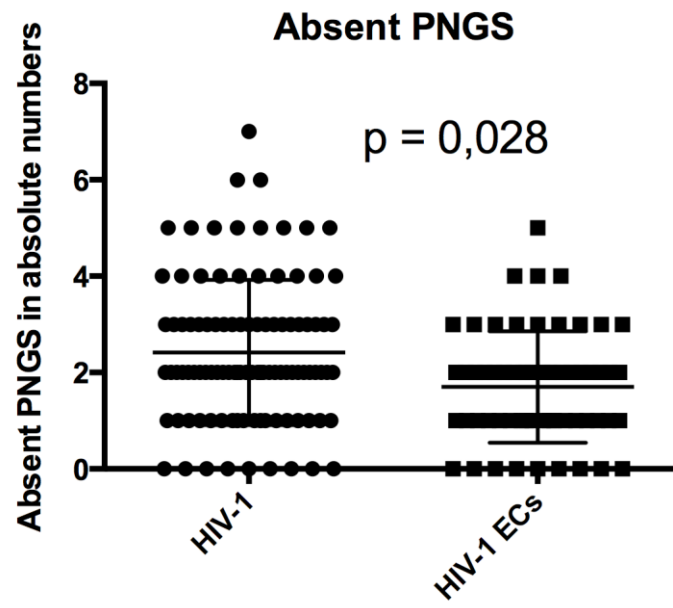
#### 4.9. Glycan Shield Mapping – Vergleich der Progressoren und ECs

Durch das Tool (s. Methodenteil) konnten Ergebnisse über die Glycan hole area sowie den fehlenden PNGs gewonnen werden. Beide Gruppen der zu untersuchenden Sequenzen (Progressoren und ECs), wurden auf diese Parameter statistisch verglichen. Das Gebiet am Env, an dem Glykanen (Glycan hole area) fehlen, ergibt keinen statistischen Unterschied zwischen ECs und Progressoren ( $p = 0,2046$ ;  $p < 0,05$ ). Progressoren haben größere Areale dieses Gebiets im Vergleich zu ECs. Hieraus könnte man schließen, dass das Glykosylierungsnetz der Elite Controller dichter ist oder weniger freien Raum hat als bei den Progressoren. Hingegen zeigt sich ein deutlicher statistischer Unterschied bei den fehlenden Glykosylierungsstellen (absent PNGS) zwischen den beiden Parteien ( $p = 0,028$ ;  $p < 0,05$ ). Es scheint hier, als hätten ECs jedoch insgesamt weniger ausbleibende Glykosylierungsstellen als Progressoren.

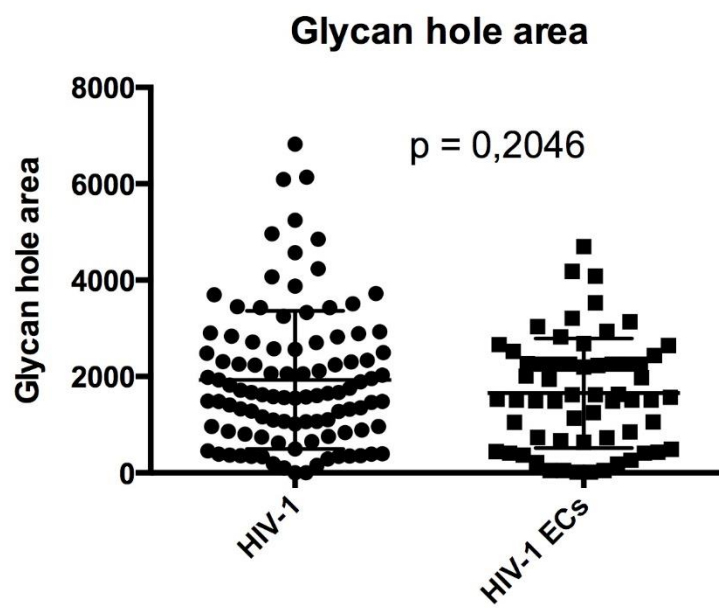
Man könnte aus diesen Ergebnissen schließen, dass ECs ein dichteres Netz an Glykosylierungen aufweisen und weniger Glykosylierungen fehlen als bei Progressoren. Hinsichtlich der Literatur aus Wagh et al. würden die zu untersuchten ECs, neutralisierende Antikörper aufweisen mit einer viel größeren Breite als die der Progressoren. Man muss bedenken, dass bei diesem Tool fehlende Glykosylierungen in hypervariablen Regionen nicht in der Analyse berücksichtigt wurden, da eine hohe strukturelle Flexibilität mit Neusequenzierung und Längenvariationen der Sequenz in diesen Regionen die Analyse durcheinanderbringen können.

Aus den Ergebnissen erkennt man, dass Elite Controller breiter aufgestellt neutralisierende Antikörper aufweisen, die womöglich auch zur Kontrolle der Viruslast beitragen und sich negativ auf die virale Fitness auswirken. Ebenso führen schwer glykosylierte Proteine zu einer besseren Antwort von neutralisierenden Antikörpern bedingt durch eine effektivere Präsentation dieser durch dendritische Zellen (Oligomannose Bindung) (Behrens und Crispin 2017).

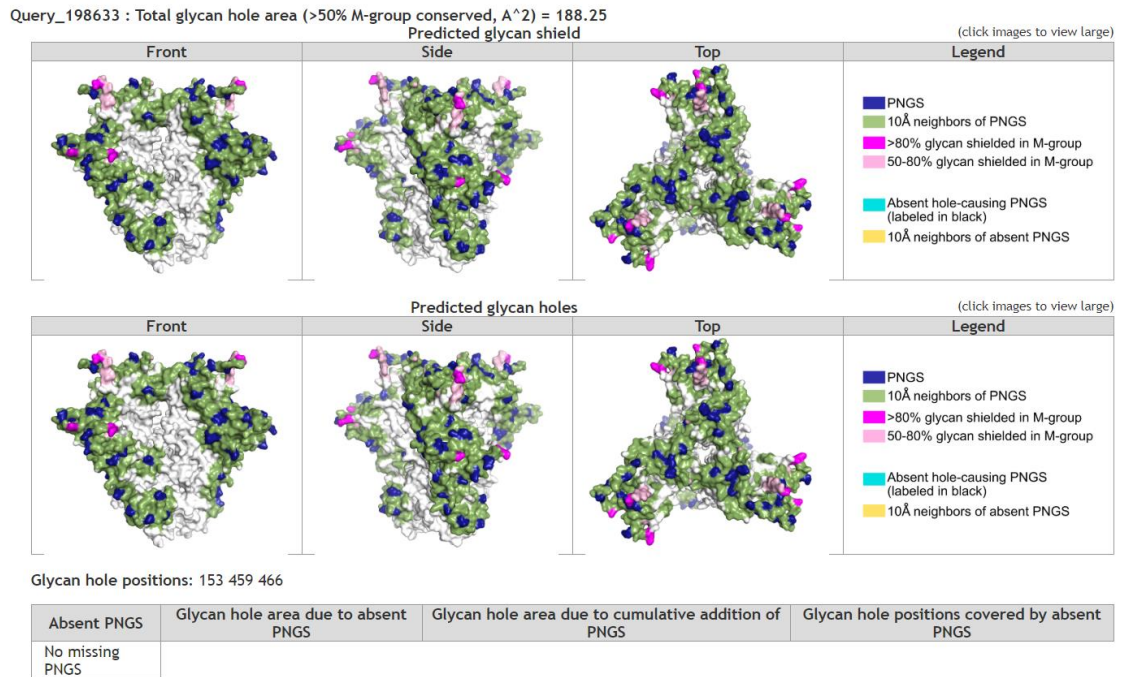
A



B



C



**Abbildung 4.9:** A. Vergleich der fehlenden Glykosylierungen bei ECs und Progressoren. Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied. Progressoren weisen mehr fehlende PNGs auf. B. Vergleich des freien/leeren Gebietes der Glykosylierungslücke zwischen ECs und Progressoren. Ein statistisch signifikanter Unterschied ergibt sich nicht. Aus diesem Blickwinkel betrachtet, haben Progressoren ein größeres Areal an Glykosylierungslücken als ECs. C. Beispiel eines Env-Proteins eines EC nach dem Tool (Glycan Shield Mapping) der Los Alamos database. Fehlende Glykosylierungsstellen sind nicht nachzuweisen.

## 5. Diskussion

Hinsichtlich des Einflusses von Glykosylierungen in der Krankheitsprogression der HIV-Erkrankung schälen sich zwei Hypothesen aus den Ergebnissen heraus. Elite Controller, ein Bruchteil der HIV-positiven Population, können selbst in Abwesenheit antiretroviraler Therapie ihre Viruslast unter 50 Kopien/ml kontrollieren und supprimieren (Morley et al. 2019). Hierzu als Beispiel diene die Patientin aus dem Universitätsklinikum Würzburg. Diese schaffte es früh nach der Primärinfektion ihre Viruslast zu kontrollieren. Ihr HLA Typ B57 begünstigt, wie bei den meisten ECs, eine langsame Krankheitsprogression. Ein Neutralisationstest ergab keine signifikante Neutralisation ( $IC_{50} < 50$ ), da ihr gp120 (Env) und gp41 (Env) seit 2005 bzw. 2004 nicht mehr nachweisbar sind. Jedenfalls erkennt man deutliche Fluktuationen bis 2004/05 in verschiedenen Proteinbanden (gp120, 41; p68, 52, 40, 34, 18) im Westernblot, als Hinweis auf eine doch ständige Immunreaktivierung, die jedoch letztlich, bis auf gp160, p55 und p25, aufhört. Dies könnte über die Jahre eine Art „Elimination“ des HI-Virus durch den eigenen Organismus oder das Immunsystem bedeuten.

Bezüglich der **Hypothese 1** stützt sich diese darauf, dass ECs generell weniger Glykosylierungen aufweisen als Progressoren (Abb. 4.5). Das gp120 Monomer besitzt fünf konstante Regionen (C1-5) sowie fünf variable Regionen (V1-5). Zudem ist gp120 schwer glykosyliert mit einer Glykosylierungsmasse, die zum Teil 50% der Gesamtmasse des Monomers aufbringt (Wang et al. 2013). Nach unseren Daten weisen die Regionen CD4bs (Teil von gp120) und MPER einen statistisch signifikanten Unterschied in der Glykosylierungsdichte gegenüber den Progressoren (Abb. 4.4/4.5) auf. Ebenso zeigen sich deutliche Unterschiede vor allem in der MPER-Region im Substraktions-Balkendiagramm, aus dem resultiert, dass die HI-Viren der ECs im Bereich MPER und z. T. CD4bs hypoglykosyliert sind im Vergleich zu den Progressoren. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es einen Einfluss der Glykosylierung auf den Status eines HIV-Infizierten (Progressor oder Elite Controller) und dessen Krankheitsprogression gibt. Dies kann durch mehrere Argumente auch gefestigt werden. Erstens, der Escape Mechanismus ist assoziiert mit einer Zunahme der Env-Länge als auch mit der Glykosylierungsdichte (van Gils et al. 2010; Bunnik

et al. 2010). In unseren Ergebnissen weisen Progressoren eine höhere Glykosylierungsdichte auf, sodass von einem erfolgreichen Escape Mechanismus/Mutation des Virus auszugehen ist und somit eine höhere virale Fitness zu verzeichnen ist (van Gils et al. 2010). Der Selektionsdruck, den das HI-Virus während der Primärinfektion durch autologe Antikörper erfährt, treibt die Evolution der HIV Env-Sequenz an (Silver et al. 2019). Insbesondere zählt hierzu die CD4bs, die sich unter dem Selektionsdruck einer Konformationsänderung unterzieht, sodass Glykosylierungen zugänglich werden, die vorher verhüllt waren. In diese Region können dann breitneutralisierende Antikörper speziell gegen diese Region anbinden und neutralisieren, was auch zu einer Viruskontrolle führt (Silver et al. 2019). Zudem zeigen Studien, dass die künstliche Entnahme von Glykosylierungen aus dem Env-Protein mit einer Zunahme der Neutralisation einhergeht und somit eine bessere Kontrolle der Virämie entsteht (Mayr und Zolla-Pazner 2015). Ein weiterer Hinweis darauf, dass Glykosylierungen den Krankheitsverlauf beeinflussen, wäre die Tatsache, dass Virusvarianten mit geringeren PNGs einfacher für glykosylierungsabhängige, breit neutralisierende Antikörper sind, so dass auch hier eine bessere Viruskontrolle entstehen kann. Hinzufügend weichen die Ergebnisse der Abb. 4.9 von dieser Hypothese ab. ECs haben hier weniger fehlende PNGs als Progressoren und weisen auch weniger leeres Areal der Glykosylierungslücken auf. Nach unserer Hypothese müsste es genau andersherum sein. Limitiert ist dieses Tool durch eine Herangehensweise, die auf Wahrscheinlichkeit beruht und die Glykosylierung in den variablen Regionen nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse aus diesem Tool deuten darauf hin, dass neutralisierende Antikörper von ECs eine größere Breite aufweisen oder eine breitere Antwort als die der Progressoren. Ein Anhaltspunkt jedoch, der sich mit den bisherigen Ergebnissen nicht nachvollziehen lässt.

**Hypothese 2** stützt sich auf das Glycan-Shield-Mapping tool. Demnach könnten ECs weniger Glykosylierungslücken und somit ein dichteres Netz an Zuckerresten aufweisen als normale Progressoren. Wenn schon Glykosylierungen an der Oberfläche des Env-Proteins ungefähr 50% des Gesamtgewichts des Proteins ausmachen, gäbe es mehr Angriffsstellen für das

Immunsystem. Nach Jan et al. 2019 gibt es ein sogenanntes C-typ Lectin typ 2 (DC-SIGN), das an Fucose- und Mannose-Zuckerresten (Glykanen) von Viren bindet. Dieser dient als eine Art Rezeptor, den das angeborene Immunsystem zur Präsentation der T-Zellen verwendet. Dies veranschaulicht die Wichtigkeit des Immunsystems, mit dem das Virus degradiert wird und in Schach gehalten werden kann, sodass auch hier eine Viruskontrolle wie bei ECs entstehen kann. Voraussetzung für diese Art der Elimination ist eine hohe Konzentration an Glykanen vom Mannose-Typ. Diese Art von HI-Viren wird sehr effizient gefangen und degradieren auch sehr schnell, sodass eine Übertragung an CD4-Zellen zur Transmission sehr gering ist. Diese Hypothese wird ebenfalls unterstützt von der Aussage, dass „LNTPs breitere und potentere neutralisierende Antikörperantworten haben als Progressoren“ (Bunnik et al. 2010). Somit könnte doch das dichtere Netz an Glykanen bei ECs eine wichtige Rolle spielen in der Präsentation an das humorale Immunsystem und damit verbunden einer stärkeren Immunantwort, der das Virus nicht entweichen kann und zur Kontrolle gezwungen wird.

## **6. Fazit/Ausblick**

Zwei Hypothesen stützen mit verschiedenen Gewichtungen die Wichtigkeit von Glykosylierungen am Env-Protein für die Krankheitsprogression und Viruskontrolle. In Anbetracht der Tatsache, dass das Tool, das zur Detektion von Glykosylierungslücken dient, sehr auf Wahrscheinlichkeit beruht und keine tatsächlichen Aussagen über Glykosylierungslücken macht, sollte dieses eher mit Vorsicht betrachtet werden. Präferiert wird somit Hypothese 1, dass Elite Controller generell hypoglykosyliert im Vergleich zu Progressoren sind. Unterstützt wird diese Aussage dadurch, dass gewisse Glykosylierungen vonnöten sind, um die Env-Funktion aufrecht zu erhalten (Lumngwena et al. 2019). Ebenso zeigen die Ergebnisse, dass die Region CD4bs und MPER einen signifikanten Unterschied in der Glykosylierung aufweisen und interessante Regionen für weitere Forschung sind. Abbildung 4.8 C macht nochmals deutlich, dass sich ECs mit HI-Viren infizieren, die vor allem in der MPER Region hypoglykosyliert sind. Verdeutlicht wird das auch, dass breitneutralisierende

Antikörper an Regionen besser angreifen können, die hypoglykosyliert sind (Silver et al. 2019). Durch den selektiven Druck, den das HI-Virus erfährt, kommt es zu Glykosylierungen, um dem Immunsystem zu entweichen. Hierzu könnten Hyperglykosylierungen an bestimmten Regionen (V1/2, Glycan V3) die virale Fitness reduzieren, da es zum Beispiel weniger affin gegenüber CD4-Rezeptoren wird und somit die Viruskontrolle steigt. Unsere Ergebnisse zusammen mit dem Fallbeispiel der Elite Controllerin verdeutlichen, dass ein günstiger HLA-Typ als auch eine günstige Glykosylierung des Virus benötigt wird. Mehrere Theorien (Wang et al. 2013; Morley et al. 2019; Bunnik et al. 2010) basieren darauf, dass sich das Fenster zum Elite Controller und somit zum Krankheitsverlauf sehr schnell bei der Primärinfektion schließt, da der Selektionsdruck zu Escape-Glykosylierungen entweder die virale Fitness verstärkt oder zu einer schlechteren Immunkontrolle führt. Hier wird auch die Wichtigkeit des Immunsystems während der Primärinfektion deutlich. Insbesondere die humorale Immunität als auch der genetische Hintergrund (HLA) sind Ausdruck, dass ECs eher eine Konsequenz der Immunsurveillance sind (Bunnik et al. 2010).

Insgesamt wurde gezeigt, dass sowohl Glykosylierungen als auch das Immunsystem den Krankheitsverlauf beeinflussen können, vor allem in der frühen Phase der Infektion. In diesem Zusammenhang wäre die Entwicklung von Vakzinen, die Glykan-Peptide an der Oberfläche des Env-Proteins erkennen und eliminieren oder die T-Zell Antwort verstärken von großer Bedeutung für weitere Forschungen. Die Beobachtungen dieser Arbeit machen deutlich, wie viele Faktoren zur Therapie der HIV-Erkrankung beitragen. Sicherlich gibt es nicht die eine Lösung, sondern diese wird viel mehr multi-, statt unifaktoriell sein.

Umso wichtiger ist es, so früh wie möglich zu therapieren, im Sinne von so früh wie möglich testen. Insbesondere Risikopopulationen sollten sich regelmäßig einem Routinescreen unterziehen, um das wichtige Fenster kurz nach Infektion (window of opportunity) nicht zu verpassen.

## 7. Zusammenfassung

### 7.1. Einleitung

N-Glykosylierungen spielen beim Env-Gen eine wichtige Rolle. Sie dienen nicht nur als „Escape-Phänomen“ zur Verhinderung einer Elimination des Virus durch neutralisierende Antikörper. Es hat sich gezeigt, dass bestimmte Menschen sich mit HIV infizieren können, aber es zu keinem Zeitpunkt zu AIDS-typischen Symptomen kommt, ohne die Einnahme antiretroviraler Therapie (ART). Solche Menschen werden als Elite Controller bezeichnet. Ihr Organismus kann selbst die Viruslast in sehr geringen Grenzen halten (< 50 Kopien/ml). Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von N-Glykosylierungen in der Entstehung von Elite Controller zu untersuchen und prozentuell eine Tendenz zu schaffen, inwieweit die Glykosylierungsdichte des Env-Proteins entscheidend ist. Hierzu wird eine Patientin aus dem Universitätsklinikum Würzburg als Einleitungsbeispiel vorgeführt, die mit HIV infiziert ist, bei der aber keine Viruslast mehr nachweisbar ist, ohne dass sie jemals eine ART eingenommen hätte.

### 7.2. Material und Methoden

Primär werden schematisch die laborchemischen Ergebnisse der Patientin in zeitlicher Relevanz aufgezeigt. Hierzu zählen die Ergebnisse der Westernblots, HIV-Suchteste, HIV-Line-Immunoassays, HIV-RTPCRs des Plasmas, der Leukozyten, der Lymphozyten und der CD4- und CD8-Zellen. Hinzugenommen wird die CD4/CD8-Quotient als auch die HLA Typisierung. Im Anschluss erfolgt die Auswertung von 60 Env-Sequenzen von Elite Controller und 101 Env-Sequenzen von jeweiligen Veröffentlichungen. Hierbei wird die Glykosylierungsdichte der V1V2, Glykan V3, CD4bs und MPER Region jeder Sequenz errechnet. Diese werden, via statistischen Methoden nach Prüfung der Normalverteilung, zwischen den Regionen der ECs und der Progressoren verglichen und die Ergebnisse auf statistische Relevanz geprüft. Zuletzt werden die Positionen der jeweiligen Glykosylierungen im alignment gefunden und die Differenzen zwischen ECs und Progressoren in einem Substraktions-Balkendiagramm dargestellt.



### 7.3. Ergebnisse und Diskussion

Es zeigt sich, dass die Auswertung der Patientendaten einen HLA Typ B27 aufweist, der laut Studien die Entstehung eines Elite Controller begünstigt. Zudem weist diese Patientin eine geringe Neutralisierung auf, was für eine entsprechende „Elimination/Auswaschung“ ihres Virus spricht. Interessant ist, dass die Immunantwort der Patientin über den Beobachtungszeitraum hinweg nicht konstant ist, sondern fluktuiert. Es ist offen, ob dieses Phänomen durch Schwankungen des Immunsystems hervorgerufen wird oder ob es auf eine geringe Hintergrundreplikation des Virus hindeuten könnte.

Des Weiteren zeigt der Vergleich der ECs und Progressoren einen signifikanten Unterschied der Glykosylierung in der MPER und CD4bs Region als auch Regionen, die generell bei ECs hyper- oder hypoglykosyliert sind (Abb. 4.8 C). Ein Tool zur Auswertung von Glykosylierungslücken ergab einen diskrepanten Ansatz zu den bisherigen Theorien. Nichtsdestotrotz wurden zwei Hypothesen entwickelt, die Glykosylierungen/Glykane im Einfluss der Krankheitsprogression bewerten. Letztlich sind für die Kontrolle der Viruslast und einen günstigen Krankheitsverlauf ein hypoglykosyliertes HI-Virus, ein HLA-Typ B57 als auch eine starke Immunantwort vonnöten. Alles in allem spielen diese Faktoren während der Primärinfektion eine wichtige Rolle, damit das „window of opportunity“ nicht verpasst wird.

## 8. Anhang

### 8.1. Literaturverzeichnis

Abrams, D.; Levy, Y.; Losso, M. H.; Babiker, A.; Collins, G.; Cooper, D. A. et al. (2009): Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. In: *The New England journal of medicine* 361 (16), S. 1548–1559. DOI: 10.1056/NEJMoa0903175.

Almeida, Jorge R.; Sauce, Delphine; Price, David A.; Papagno, Laura; Shin, So Youn; Moris, Arnaud et al. (2009): Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. In: *Blood* 113 (25), S. 6351–6360. DOI: 10.1182/blood-2009-02-206557.

Arion, Dominique; Parniak, Michael A. (1999): HIV resistance to zidovudine: the role of pyrophosphorolysis. In: *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2 (2), S. 91–95. DOI: 10.1054/drup.1999.0076.

Arthos, James; Cicala, Claudia; Nawaz, Fatima; Byrareddy, Siddappa N.; Villinger, Francois; Santangelo, Philip J. et al. (2018): The Role of Integrin  $\alpha 4\beta 7$  in HIV Pathogenesis and Treatment. In: *Current HIV/AIDS reports* 15 (2), S. 127–135. DOI: 10.1007/s11904-018-0382-3.

Bailey, Justin; Blankson, Joel N.; Wind-Rotolo, Megan; Siliciano, Robert F. (2004): Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. In: *Current opinion in immunology* 16 (4), S. 470–476. DOI: 10.1016/j.coi.2004.05.005.

Bailey, Justin R.; Williams, Thomas M.; Siliciano, Robert F.; Blankson, Joel N. (2006): Maintenance of viral suppression in HIV-1–infected HLA-B\*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. In: *Journal of Experimental Medicine* 203 (5), S. 1357–1369. DOI: 10.1084/jem.20052319.

Baral, Stefan; Beyrer, Chris; Muessig, Kathryn; Poteat, Tonia; Wirtz, Andrea L.; Decker, Michele R. et al. (2012): Burden of HIV among female sex workers in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. In: *The Lancet Infectious Diseases* 12 (7), S. 538–549. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70066-X.

Benlahrech, Adel; Harris, Julian; Meiser, Andrea; Papagatsias, Timos; Hornig, Julia; Hayes, Peter et al. (2009): Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (47), S. 19940–19945. DOI: 10.1073/pnas.0907898106.

Betts, Michael R.; Nason, Martha C.; West, Sadie M.; Rosa, Stephen C. de; Migueles, Stephen A.; Abraham, Jonathan et al. (2006): HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. In: *Blood* 107 (12), S. 4781–4789. DOI: 10.1182/blood-2005-12-4818.

Bibas, Michele; Antinori, Andrea (2009): EBV and HIV-Related Lymphoma. In: *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 1 (2), e2009032. DOI: 10.4084/MJHID.2009.032.

Bobat, Raziya (2020): HIV infection in children and adolescents. Cham: Springer.

Bour, S.; Geleziunas, R.; Wainberg, M. A. (1995): The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. In: *Microbiological Reviews* 59 (1), S. 63–93.

Branson, Bernard M.; Owen, S. Michele; Wesolowski, Laura G.; Bennett, Berry; Werner, Barbara G.; Wroblewski, Kelly E.; Pentella, Michael A. (2014): Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection : updated recommendations. Online verfügbar unter [https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447/cdc\\_23447\\_DS1.pdf](https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447/cdc_23447_DS1.pdf).

Burt, Richard K.; Verda, Larissa (2004): Immune Reconstitution. In: Robert Lanza (Hg.): *Handbook of stem cells*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, S. 745–761.

CDC (Hg.) (2014): HIV Surveillance Report. Centers for Disease Control and Prevention.

- Centers for Disease Control and Prevention (2011): HIV Testing Among Men Who Have Sex with Men --- 21 Cities, United States, 2008. In: *Weekly* (21), 60:694. Online verfügbar unter <https://jvi.asm.org/content/jvi/88/6/3340.full.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention (2012): HIV Infections Attributed to Male-to-Male Sexual Contact — Metropolitan Statistical Areas, United States and Puerto Rico, 2010. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).
- Chadburn, Amy; Abdul-Nabi, Anmaar M.; Teruya, Bryan Scott; Lo, Amy A. (2013): Lymphoid proliferations associated with human immunodeficiency virus infection. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 137 (3), S. 360–370. DOI: 10.5858/arpa.2012-0095-RA.
- Chatterjee, Koushik (2010): Host genetic factors in susceptibility to HIV-1 infection and progression to AIDS. In: *Journal of genetics* 89 (1), S. 109–116.
- Chen, Huabiao; Ndhlovu, Zaza M.; Liu, Dongfang; Porter, Lindsay C.; Fang, Justin W.; Darko, Sam et al. (2012): TCR clonotypes modulate the protective effect of HLA class I molecules in HIV-1 infection. In: *Nature immunology* 13 (7), S. 691–700. DOI: 10.1038/ni.2342.
- Chun, T. W.; Carruth, L.; Finzi, D.; Shen, X.; DiGiuseppe, J. A.; Taylor, H. et al. (1997): Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. In: *Nature* 387 (6629), S. 183–188. DOI: 10.1038/387183a0.
- Cock, Kevin M. de; Bunnell, Rebecca; Mermin, Jonathan (2006): Unfinished business--expanding HIV testing in developing countries. In: *The New England journal of medicine* 354 (5), S. 440–442. DOI: 10.1056/NEJMp058327.
- Cockerham, Leslie R.; Hatano, Hiroyu (2015): Elite control of HIV: is this the right model for a functional cure? In: *Trends in microbiology* 23 (2), S. 71–75. DOI: 10.1016/j.tim.2014.11.003.
- Cohen, G. B.; Gandhi, R. T.; Davis, D. M.; Mandelboim, O.; Chen, B. K.; Strominger, J. L.; Baltimore, D. (1999): The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. In: *Immunity* 10 (6), S. 661–671.
- Cohen, Myron S.; Shaw, George M.; McMichael, Andrew J.; Haynes, Barton F. (2011): Acute HIV-1 Infection. In: *The New England journal of medicine* 364 (20), S. 1943–1954. DOI: 10.1056/NEJMra1011874.
- Consolidated guidelines on HIV testing services. 5Cs: consent, confidentiality, counselling, correct results, and connection (2015). Geneva: World Health Organization (Guidelines).
- Craigie, Robert (2012): The molecular biology of HIV integrase. In: *Future virology* 7 (7), S. 679–686. DOI: 10.2217/FVL.12.56.
- Cresswell, Peter; Ackerman, Anne L.; Giodini, Alessandra; Peaper, David R.; Wearsch, Pamela A. (2005): Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. In: *Immunological reviews* 207, S. 145–157. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00316.x.
- DiNenno, Elizabeth A. (2017): Recommendations for HIV Screening of Gay, Bisexual, and Other Men Who Have Sex with Men — United States, 2017. In: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 66. DOI: 10.15585/mmwr.mm6631a3.
- Emu, Brinda; Fessel, Jeffrey; Schrader, Shannon; Kumar, Princy; Richmond, Gary; Win, Sandra et al. (2018): Phase 3 Study of Ibalizumab for Multidrug-Resistant HIV-1. In: *The New England journal of medicine* 379 (7), S. 645–654. DOI: 10.1056/NEJMoa1711460.
- Erickson, Christian P.; McNiff, Todd; Klausner, Jeffrey D. (2006): Influenza vaccination and false positive HIV results. In: *The New England journal of medicine* 354 (13), S. 1422–1423. DOI: 10.1056/NEJMc053417.
- Euler, Zeld; Schuitemaker, Hanneke (2012): Cross-reactive broadly neutralizing antibodies: timing is everything. In: *Frontiers in immunology* 3. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00215.

- Fanales-Belasio, Emanuele; Raimondo, Mariangela; Suligo, Barbara; Buttò, Stefano (2010): HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. In: *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 46 (1), S. 5–14. DOI: 10.4415/ANN\_10\_01\_02.
- Flores-Villanueva, P. O.; Yunis, E. J.; Delgado, J. C.; Vittinghoff, E.; Buchbinder, S.; Leung, J. Y. et al. (2001): Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (9), S. 5140–5145. DOI: 10.1073/pnas.071548198.
- Freeman, Michael M.; Seaman, Michael S.; Rits-Volloch, Sophia; Hong, Xinguo; Kao, Chia-Ying; Ho, David D.; Chen, Bing (2010): Crystal structure of HIV-1 primary receptor CD4 in complex with a potent antiviral antibody. In: *Structure (London, England : 1993)* 18 (12), S. 1632–1641. DOI: 10.1016/j.str.2010.09.017.
- Furler, Robert L.; Newcombe, Kevin L.; Del Rio Estrada, Perla M.; Reyes-Terán, Gustavo; Uittenbogaart, Christel H.; Nixon, Douglas F. (2019): Histoarchitectural Deterioration of Lymphoid Tissues in HIV-1 Infection and in Aging. In: *AIDS research and human retroviruses* 35 (11-12), S. 1148–1159. DOI: 10.1089/AID.2019.0156.
- Gallerano, Daniela; Cabauatan, Clarissa R.; Sibanda, Elopy N.; Valenta, Rudolf (2015): HIV-Specific Antibody Responses in HIV-Infected Patients: From a Monoclonal to a Polyclonal View. In: *International archives of allergy and immunology* 167 (4), S. 223–241. DOI: 10.1159/000438484.
- Ganesan, Anuradha; Chattopadhyay, Pratip K.; Brodie, Tess M.; Qin, Jing; Gu, Wenjuan; Mascola, John R. et al. (2010): Immunologic and virologic events in early HIV infection predict subsequent rate of progression. In: *The Journal of infectious diseases* 201 (2), S. 272–284. DOI: 10.1086/649430.
- Ganser-Pornillos, Barbie K.; Pornillos, Owen (2019): Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. In: *Nature reviews. Microbiology* 17 (9), S. 546–556. DOI: 10.1038/s41579-019-0225-2.
- Gao, F.; Bailes, E.; Robertson, D. L.; Chen, Y.; Rodenburg, C. M.; Michael, S. F. et al. (1999a): Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. In: *Nature* 397 (6718), S. 436–441. DOI: 10.1038/17130.
- Gao, Feng; Bailes, Elizabeth; Robertson, David L.; Chen, Yalu; Rodenburg, Cynthia M.; Michael, Scott F. et al. (1999b): Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. In: *Nature* 397 (6718), S. 436. DOI: 10.1038/17130.
- Garg, H.; Blumenthal, R. (2008): Role of HIV Gp41 mediated fusion/hemifusion in bystander apoptosis. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (20), S. 3134–3144. DOI: 10.1007/s00018-008-8147-6.
- Goulder, Philip J. R.; Watkins, David I. (2004): HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. In: *Nature reviews. Immunology* 4 (8), S. 630–640. DOI: 10.1038/nri1417.
- Harrisons Innere Medizin (2016). New York: Mc Graw Hill Education.
- Heeney, Jonathan L.; Dalgleish, Angus G.; Weiss, Robin A. (2006): Origins of HIV and the Evolution of Resistance to AIDS. In: *Science* 313 (5786), S. 462–466. DOI: 10.1126/science.1123016.
- Hirbod, T.; Broliden, K. (2007): Mucosal immune responses in the genital tract of HIV-1-exposed uninfected women. In: *Journal of internal medicine* 262 (1), S. 44–58. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01822.x.
- HIV/AIDS surveillance in Europe 2013 (2014). In: 2363-3085. Online verfügbar unter <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144506/1/HIV%20AIDS%20surveillance%20in%20Europe%202013%20%28Eng%29.pdf>.
- HIV-2 Infection Surveillance --- United States, 1987--2009 (2011). In: *Weekly* (29), S. 985–988.
- Hof, Herbert; Dörries, Rüdiger (2017): Medizinische Mikrobiologie. 540 Abbildungen. Unter Mitarbeit von Gernot Geginat, Dirk Schlüter und Constanze Wendt. 6., unveränderte Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

- Hrecka, Kasia; Hao, Caili; Gierszewska, Magda; Swanson, Selene K.; Kesik-Brodacka, Malgorzata; Srivastava, Smita et al. (2011): Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. In: *Nature* 474 (7353), S. 658–661. DOI: 10.1038/nature10195.
- Huang, Xiaojie; Chen, Hui; Li, Wei; Li, Haiying; Jin, Xia; Perelson, Alan S. et al. (2012): Precise determination of time to reach viral load set point after acute HIV-1 infection. In: *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 61 (4), S. 448–454. DOI: 10.1097/QAI.0b013e31827146e0.
- Humanes Immunschwachevirus (HIV) (2004). In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 47 (1), S. 83–95.
- Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections (1989). In: *MMWR supplements* 38 (7), S. 1–7.
- Ioannidis, J. P.; Rosenberg, P. S.; Goedert, J. J.; Ashton, L. J.; Benfield, T. L.; Buchbinder, S. P. et al. (2001): Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. In: *Annals of internal medicine* 135 (9), S. 782–795.
- Jain, Vivek; Hartogensis, Wendy; Bacchetti, Peter; Hunt, Peter W.; Hatano, Hiroyu; Sinclair, Elizabeth et al. (2013): Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. In: *The Journal of infectious diseases* 208 (8), S. 1202–1211. DOI: 10.1093/infdis/jit311.
- Julg, B.; Pereyra, F.; Buzón, M. J.; Piechocka-Trocha, A.; Clark, M. J.; Baker, B. M. et al. (2010): Infrequent recovery of HIV from, but robust exogenous infection of activated CD4+ T-cells from HIV elite controllers. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51 (2), S. 233–238. DOI: 10.1086/653677.
- Kiepiela, Photini; Ngumbela, Kholiswa; Thobakgale, Christina; Ramduth, Dhanwanthie; Honeyborne, Isobella; Moodley, Eshia et al. (2007): CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. In: *Nature medicine* 13 (1), S. 46–53. DOI: 10.1038/nm1520.
- Kumar, Praveen (2013): Long term non-progressor (LTNP) HIV infection. In: *The Indian Journal of Medical Research* 138 (3), S. 291–293.
- Kwong, Peter D.; Mascola, John R. (2012): Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies. In: *Immunity* 37 (3), S. 412–425. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.08.012.
- Kyun Kim, Tae (2017): Understanding one-way ANOVA using conceptual figures. In: *Korean Journal of Anesthesiology* 70. DOI: 10.4097/kjae.2017.70.1.22.
- Lambotte, Olivier; Ferrari, Guido; Moog, Christiane; Yates, Nicole L.; Liao, Hua-Xin; Parks, Robert J. et al. (2009): Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. In: *AIDS (London, England)* 23 (8), S. 897–906. DOI: 10.1097/QAD.0b013e328329f97d.
- Lécureux, Camille; Girault, Isabelle; Chéret, Antoine; Versmisse, Pierre; Nembot, Georges; Meyer, Laurence et al. (2013): CD8 T-cells from most HIV-infected patients lack ex vivo HIV-suppressive capacity during acute and early infection. In: *PloS one* 8 (3), e59767. DOI: 10.1371/journal.pone.0059767.
- Lichterfeld, Mathias; Kavanagh, Daniel G.; Williams, Katie L.; Moza, Beenu; Mui, Stanley K.; Miura, Toshiyuki et al. (2007): A viral CTL escape mutation leading to immunoglobulin-like transcript 4-mediated functional inhibition of myelomonocytic cells. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (12), S. 2813–2824. DOI: 10.1084/jem.20061865.
- Lin, George; Baribaud, Frédéric; Romano, Josephine; Doms, Robert W.; Hoxie, James A. (2003): Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. In: *Journal of virology* 77 (2), S. 931–942. DOI: 10.1128/jvi.77.2.931-942.2003.

- Lingappa, Jaisri R.; Reed, Jonathan C.; Tanaka, Motoko; Chutiraka, Kasana; Robinson, Bridget A. (2014): How HIV-1 Gag assembles in cells: Putting together pieces of the puzzle. In: *Virus research* 193, S. 89–107. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.07.001.
- Loftin, Lamorris M.; Kienzle, Martha; Yi, Yanjie; Collman, Ronald G. (2011): R5X4 HIV-1 coreceptor use in primary target cells: implications for coreceptor entry blocking strategies. In: *Journal of translational medicine* 9 Suppl 1, S3. DOI: 10.1186/1479-5876-9-S1-S3.
- Loussert-Ajaka, I.; Ly, T. D.; Chaix, M. L.; Ingrand, D.; Saragosti, S.; Courouce, A. M. et al. (1994): HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. In: *Lancet (London, England)* 343 (8910), S. 1393–1394.
- Maes, Margaret E.; Colombo, Gloria; Schulz, Rouven; Siegert, Sandra (2019): Targeting microglia with lentivirus and AAV: Recent advances and remaining challenges. In: *Neuroscience Letters* 707. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134310.
- Manches, Olivier; Frleta, Davor; Bhardwaj, Nina (2014): Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. In: *Trends in immunology* 35 (3), S. 114–122. DOI: 10.1016/j.it.2013.10.003.
- Martinson, J. J.; Chapman, N. H.; Rees, D. C.; Liu, Y. T.; Clegg, J. B. (1997): Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. In: *Nature genetics* 16 (1), S. 100–103. DOI: 10.1038/ng0597-100.
- McMichael, Andrew J.; Borrow, Persephone; Tomaras, Georgia D.; Goonetilleke, Nilu; Haynes, Barton F. (2010): The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (1), S. 11–23. DOI: 10.1038/nri2674.
- Migueles, Stephen A.; Connors, Mark (2002): The Role of CD4(+) and CD8(+) T Cells in Controlling HIV Infection. In: *Current infectious disease reports* 4 (5), S. 461–467. DOI: 10.1007/s11908-002-0014-2.
- Migueles, Stephen A.; Laborico, Alisha C.; Shupert, W. Lesley; Sabbaghian, M. Shirin; Rabin, Ronald; Hallahan, Claire W. et al. (2002): HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. In: *Nature immunology* 3 (11), S. 1061–1068. DOI: 10.1038/ni845.
- Moir, S.; Malaspina, A.; Ogwaro, K. M.; Donoghue, E. T.; Hallahan, C. W.; Ehler, L. A. et al. (2001): HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (18), S. 10362–10367. DOI: 10.1073/pnas.181347898.
- Moir, Susan; Malaspina, Angela; Pickeral, Oxana K.; Donoghue, Eileen T.; Vasquez, Joshua; Miller, Natalie J. et al. (2004): Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (5), S. 587–599. DOI: 10.1084/jem.20032236.
- Mwimanzi, Philip; Markle, Tristan J.; Martin, Eric; Ogata, Yoko; Kuang, Xiaomei T.; Tokunaga, Michiyo et al. (2013): Attenuation of multiple Nef functions in HIV-1 elite controllers. In: *Retrovirology* 10, S. 1. DOI: 10.1186/1742-4690-10-1.
- Nachar, Nadim (2008): The Mann-Whitney U: A Test for Assessing Whether Two Independent Samples Come from the Same Distribution. In: *TQMP* 4 (1), S. 13–20. DOI: 10.20982/tqmp.04.1.p013.
- Ngo-Giang-Huong, N.; Candotti, D.; Goubar, A.; Autran, B.; Maynard, M.; Sicard, D. et al. (2001): HIV type 1-specific IgG2 antibodies: markers of helper T cell type 1 response and prognostic marker of long-term nonprogression. In: *AIDS research and human retroviruses* 17 (15), S. 1435–1446. DOI: 10.1089/088922201753197105.
- Norris, Philip J.; Pappalardo, Brandee L.; Custer, Brian; Spotts, Gerald; Hecht, Frederick M.; Busch, Michael P. (2006): Elevations in IL-10, TNF-alpha, and IFN-gamma from the earliest point of HIV Type 1 infection. In: *AIDS research and human retroviruses* 22 (8), S. 757–762. DOI: 10.1089/aid.2006.22.757.
- Nyamweya, Samuel; Hegedus, Andrea; Jaye, Assan; Rowland-Jones, Sarah; Flanagan, Katie L.; Macallan, Derek C. (2013): Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. In: *Reviews in medical virology* 23 (4), S. 221–240. DOI: 10.1002/rmv.1739.

- Pancera, Marie; Majeed, Shahzad; Ban, Yih-En Andrew; Chen, Lei; Huang, Chih-chin; Kong, Leopold et al. (2010): Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (3), S. 1166–1171. DOI: 10.1073/pnas.0911004107.
- Parkin, Jacqueline; Cohen, Bryony (2001): An overview of the immune system. In: *The Lancet* 357 (9270), S. 1777–1789. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
- Pereyra, Florencia; Jia, Xiaoming; McLaren, Paul J.; Telenti, Amalio; de Bakker, Paul I W; Walker, Bruce D. et al. (2010): The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. In: *Science (New York, N.Y.)* 330 (6010), S. 1551–1557. DOI: 10.1126/science.1195271.
- Peters, Philip J.; Westheimer, Emily; Cohen, Stephanie; Hightow-Weidman, Lisa B.; Moss, Nicholas; Tsoi, Benjamin et al. (2016): Screening Yield of HIV Antigen/Antibody Combination and Pooled HIV RNA Testing for Acute HIV Infection in a High-Prevalence Population. In: *JAMA* 315 (7), S. 682–690. DOI: 10.1001/jama.2016.0286.
- Porichis, Filippos; Kaufmann, Daniel E. (2012): Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. In: *Current HIV/AIDS reports* 9 (1), S. 81–90. DOI: 10.1007/s11904-011-0106-4.
- Ramírez de Arellano, Eva; Díez-Fuertes, Francisco; Aguilar, Francisco; La Torre Tarazona, Humberto Erick de; Sánchez-Lara, Susana; Lao, Yolanda et al. (2019): Novel association of five HLA alleles with HIV-1 progression in Spanish long-term non progressor patients. In: *PLoS one* 14 (8), e0220459. DOI: 10.1371/journal.pone.0220459.
- Saag, Michael S.; Benson, Constance A.; Gandhi, Rajesh T.; Hoy, Jennifer F.; Landovitz, Raphael J.; Mugavero, Michael J. et al. (2018): Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. In: *JAMA* 320 (4), S. 379–396. DOI: 10.1001/jama.2018.8431.
- Sacha, Jonah B.; Chung, Chungwon; Rakasz, Eva G.; Spencer, Sean P.; Jonas, Anna K.; Bean, Alexander T. et al. (2007): Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (5), S. 2746–2754.
- Saez-Cirion, A.; Jacquelin, B.; Barré-Sinoussi, F.; Müller-Trutwin, M. (2014): Immune responses during spontaneous control of HIV and AIDS: what is the hope for a cure? In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1645). DOI: 10.1098/rstb.2013.0436.
- Salgado, Maria; Swanson, Michael D.; Pohlmeier, Christopher W.; Buckheit, Robert W.; Wu, Jin; Archin, Nancie M. et al. (2014): HLA-B\*57 elite suppressor and chronic progressor HIV-1 isolates replicate vigorously and cause CD4+ T cell depletion in humanized BLT mice. In: *Journal of virology* 88 (6), S. 3340–3352. DOI: 10.1128/JVI.03380-13.
- Sallusto, Federica; Geginat, Jens; Lanzavecchia, Antonio (2004): Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. In: *Annual review of immunology* 22, S. 745–763. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
- Sande, Merle A.; Volberding, Paul (2012): The medical management of AIDS. 2012. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders (Sande's HIV / AIDS medicine). Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10552179>.
- Schable, C.; Zekeng, L.; Pau, C. P.; Hu, D.; Kaptue, L.; Gurtler, L. et al. (1994): Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group O infections. In: *Lancet (London, England)* 344 (8933), S. 1333–1334.
- Schneidewind, Arne; Brockman, Mark A.; Yang, Ruifeng; Adam, Rahma I.; Li, Bin; Le Gall, Sylvie et al. (2007): Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. In: *Journal of virology* 81 (22), S. 12382–12393. DOI: 10.1128/JVI.01543-07.

- Seaman, Michael S.; Janes, Holly; Hawkins, Natalie; Grandpre, Lauren E.; Devoy, Colleen; Giri, Ayush et al. (2010): Tiered Categorization of a Diverse Panel of HIV-1 Env Pseudoviruses for Assessment of Neutralizing Antibodies. In: *Journal of virology* 84 (3), S. 1439–1452. DOI: 10.1128/JVI.02108-09.
- Shah, Ira (2006): Correlation of CD4 count, CD4% and HIV viral load with clinical manifestations of HIV in infected Indian children. In: *Annals of tropical paediatrics* 26 (2), S. 115–119. DOI: 10.1179/146532806X107458.
- Soghoian, Damien Z.; Jessen, Heiko; Flanders, Michael; Sierra-Davidson, Kailan; Cutler, Sam; Pertel, Thomas et al. (2012): HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. In: *Science translational medicine* 4 (123), 123ra25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003165.
- Suerbaum, Sebastian; Burchard, Gerd Dieter; Kaufmann, Stefan H. E.; Schulz, Thomas F. (Hg.) (2016): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 8. Aufl. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-48678-8>.
- Sundquist, Wesley I.; Kräusslich, Hans-Georg (2012): HIV-1 assembly, budding, and maturation. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (7), a006924. DOI: 10.1101/cshperspect.a006924.
- The Global HIV/AIDS pandemic, 2006 (2006). In: *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 55 (31), S. 841–844.
- Thomas C. Quinn (2016): Global epidemiology of HIV Infection.
- Turville, Stuart; Wilkinson, John; Cameron, Paul; Dable, Joanne; Cunningham, Anthony L. (2003): The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. In: *Journal of leukocyte biology* 74 (5), S. 710–718. DOI: 10.1189/jlb.0503208.
- UNAIDS (Hg.) (2014): The Gap Report.
- van Bockel, David J.; Price, David A.; Munier, Mee Ling; Venturi, Vanessa; Asher, Tedi E.; Ladell, Kristin et al. (2011): Persistent survival of prevalent clonotypes within an immunodominant HIV gag-specific CD8+ T cell response. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (1), S. 359–371. DOI: 10.4049/jimmunol.1001807.
- van Gulck, Ellen; Bracke, Lotte; Heyndrickx, Leo; Coppens, Sandra; Atkinson, Derek; Merlin, Céline et al. (2012): Immune and Viral Correlates of “Secondary Viral Control” after Treatment Interruption in Chronically HIV-1 Infected Patients. In: *PLOS ONE* 7 (5), e37792. DOI: 10.1371/journal.pone.0037792.
- Vigano, Selena; Utschneider, Daniel T.; Perreau, Matthieu; Pantaleo, Giuseppe; Zehn, Dietmar; Harari, Alexandre (2012): Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells? In: *Clinical & developmental immunology* 2012, S. 153863. DOI: 10.1155/2012/153863.
- Vingert, Benoit; Perez-Patrigéon, Santiago; Jeannin, Patricia; Lambotte, Olivier; Boufassa, Faroudy; Lemaitre, Fabrice et al. (2010): HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. In: *PLoS pathogens* 6 (2), e1000780. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000780.
- Virologisches Institut Klinische Chemie und Molekulare Virologie Universitätsklinikum Erlangen (Hg.) (2012): Humanes T-Zell-Leukämievirus Typ1 (HTLV-1). Infektion, Pathogenese und Therapie. *Retrovirus Bulletin* 2012 (4). Erlangen.
- Wagh, Kshitij; Kreider, Edward F.; Li, Yingying; Barbian, Hannah J.; Learn, Gerald H.; Giorgi, Elena et al. (2018): Completeness of HIV-1 Envelope Glycan Shield at Transmission Determines Neutralization Breadth. In: *Cell reports* 25 (4), 893-908.e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.09.087.
- Wahid, Zaharah; Latiff, Ahmad Izwan; Ahmad, Kartini: Application of one-way ANOVA in completely randomized experiments. In: *J. Phys.: Conf. Ser.* 949 (1), S. 12017. DOI: 10.1088/1742-6596/949/1/012017.
- Ward, Andrew B.; Wilson, Ian A. (2015): Insights into the trimeric HIV-1 envelope glycoprotein structure. In: *Trends in biochemical sciences* 40 (2), S. 101–107. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.12.006.



- Weinberger, Ariel D.; Perelson, Alan S. (2011): Persistence and emergence of X4 virus in HIV infection. In: *Mathematical biosciences and engineering : MBE* 8 (2), S. 605–626. DOI: 10.3934/mbe.2011.8.605.
- Wibmer, Constantinos Kurt; Moore, Penny L.; Morris, Lynn (2015): HIV broadly neutralizing antibody targets. In: *Current opinion in HIV and AIDS* 10 (3), S. 135–143. DOI: 10.1097/COH.000000000000153.
- Wilens, Craig B.; Tilton, John C.; Doms, Robert W. (2012): HIV: cell binding and entry. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (8). DOI: 10.1101/cshperspect.a006866.
- Worobey, Michael; Gemmel, Marlea; Teuwen, Dirk E.; Haselkorn, Tamara; Kunstman, Kevin; Bunce, Michael et al. (2008): Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. In: *Nature* 455 (7213), S. 661–664. DOI: 10.1038/nature07390.
- Yap, B. W.; Sim, C. H. (2011): Comparisons of various types of normality tests. In: *Journal of Statistical Computation and Simulation* 81 (12), S. 2141–2155. DOI: 10.1080/00949655.2010.520163.
- Youngblood, Ben; Wherry, E. John; Ahmed, Rafi (2012): Acquired transcriptional programming in functional and exhausted virus-specific CD8 T cells. In: *Current opinion in HIV and AIDS* 7 (1), S. 50–57. DOI: 10.1097/COH.0b013e32834ddcf2.
- Zaunders, John; van Bockel, David (2013): Innate and Adaptive Immunity in Long-Term Non-Progression in HIV Disease. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 95. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00095.
- Zaunders, John J.; Ip, Susanna; Munier, Mee Ling; Kaufmann, Daniel E.; Suzuki, Kazuo; Brereton, Choechoe et al. (2006): Infection of CD127+ (interleukin-7 receptor+) CD4+ cells and overexpression of CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4 T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. In: *Journal of virology* 80 (20), S. 10162–10172. DOI: 10.1128/JVI.00249-06.
- Zaunders, John J.; Munier, Mee Ling; Kaufmann, Daniel E.; Ip, Susanna; Grey, Pat; Smith, Don et al. (2005): Early proliferation of CCR5(+) CD38(+++) antigen-specific CD4(+) Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. In: *Blood* 106 (5), S. 1660–1667. DOI: 10.1182/blood-2005-01-0206.
- Zheng, Nan; Fujiwara, Mamoru; Ueno, Takamasa; Oka, Shinichi; Takiguchi, Masafumi (2009): Strong ability of Nef-specific CD4+ cytotoxic T cells to suppress human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication in HIV-1-infected CD4+ T cells and macrophages. In: *Journal of virology* 83 (15), S. 7668–7677. DOI: 10.1128/JVI.00513-09.

## 8.2. Abbildungsverzeichnis/Bildrechte

Abbildung 1.1: Struktur von HIV-1; *mit schriftlicher Genehmigung des ABW Wissenschaftsverlags* (Harrisons Innere Medizin 2016; Teil 8, Die HIV-Erkrankung: AIDS und verwandte Krankheitsbilder; Abb. 226-2 B; ISBN: 9783940615503)

Abbildung 1.2: Infektionen der einzelnen HIV-1 Subtypen in Korrelation zur Gesamtzahl der HIV-1 Infizierten zwischen 2004 und 2007 in relativen Zahlen, modifiziert (Hemelaar, Joris; Gouws, Eleanor; Ghys, Peter D.; Osmanov, Saladin (2011): Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. In: AIDS (London, England) 25 (5), S. 679–689. DOI: 10.1097/QAD.0b013e328342ff93)

Abbildung 1.7: Vergleich Elite Controller vs Post-treatment Controller; mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe Scheller des Instituts für Virologie und Immunologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Abbildung 1.7.9: Env-Protein mit Bindungsstellen für neutralisierende Antikörper; *mit schriftlicher Genehmigung des ABW Wissenschaftsverlags* (Harrisons Innere Medizin 2016; Teil 8, Die HIV-Erkrankung: AIDS und verwandte Krankheitsbilder; Abb. 226-28; ISBN: 9783940615503)

Abbildung 3.3: HXB2 Gen mit Proteindomänen der einzelnen zu untersuchten Regionen, mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe Scheller des Instituts für Virologie und Immunologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Abbildung 4.1a: Zeitliche Verlaufsgrafik der Ergebnisse immunologischer Untersuchungen des Fallbeispiels; nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.1b: Darstellung des Westernblots mit zeitlichem Verlauf der einzelnen Banden (A-C). Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.1c: Darstellung des Westernblots mit zeitlichem Verlauf der einzelnen Banden (D-G). Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.1d: Darstellung des Westernblots mit zeitlichem Verlauf der einzelnen Banden (H-J). Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.1e: Darstellung der absoluten CD4-Zellzahl und CD4/CD8-Quotienten im zeitlichen Verlauf der Patientin (K-L). Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.1.2: Neutralisationstest des Fallbeispiels. Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.2: Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen HIV-Patienten mit normaler Krankheitsprogression (HIV-1) und von Elite Controller (HIV-1 ECs) der Bindungsregion V1V2. Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.3: Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen HIV-Patienten mit normaler Krankheitsprogression (HIV-1) und von Elite Controller (HIV-1 ECs) der Bindungsregion V3. Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.4: Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen HIV-Patienten mit normaler Krankheitsprogression (HIV-1) und von Elite Controller (HIV-1 ECs) der Bindungsregion CD4. Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.5: Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen HIV-Patienten mit normaler Krankheitsprogression (HIV-1) und von Elite Controller (HIV-1 ECs) der Bindungsregion MPER. Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.5: Vergleich der Glykosylierungsdichte zwischen HIV-Patienten mit normaler Krankheitsprogression (HIV-1) und von Elite Controller (HIV-1 ECs) des gesamten ENVs. Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.8: Glykosylierungsdichte in relativen Zahlen mit Aminosäureposition im alignment bei Elite Controller und Progressoren. Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.9 A: Vergleich der fehlenden Glykosylierungen bei Elite Controller und Progressoren. Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.9 B: Vergleich des freien/leeren Gebietes der Glykosylierungslücke zwischen Elite Controller und Progressoren. Nach eigener Erstellung mittels GraphPad PRISM ©

Abbildung 4.9 C: Beispiel eines Env-Proteins eines Elite Controller nach dem Tool (Glycan Shield Mapping) der Los Alamos database. Aus dem Tool „Glycan Shield Mapping“ der Los Alamos database, © Copyright Triad National Security, LLC. All Rights Reserved

## **Danksagung**

## Lebenslauf