

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

**Einfluss der Syphilis-Ko-Infektion auf die zelluläre Immunantwort während ei-
ner akuten HIV-Infektion**

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

vorgelegt von
Jasper Frieder Johannes Mundt
aus Homburg

promoviert am 17. Juli 2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Professorin Dr. med. C. Lehmann

2. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. V. di Cristanziano

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Professorin Dr. med. Clara Lehmann, Dr. med. Max Augustin.

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

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

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Professorin Dr. Clara Lehmann von mir mit Unterstützung von Herrn Lennart Nicksch und der medizinisch-technischen Assistentin Frau Ute Sandaradura da Silva ausgeführt worden. Alle durchflusszytometrischen Experimente wurden von mir selbst mit Unterstützung von Frau Ute Sandaradura da Silva erhoben. Die Krankengeschichten und statistischen Analysen wurden anschließend von mir selbst ausgewertet.

Zürich, den 17. Juli 2026

Unterschrift:

Danksagung

Vor allem möchte ich mich bei Frau Professorin Dr. med. Clara Lehmann bedanken. Als Leiterin der infektiologischen Ambulanz der Uniklinik Köln und principle investigator unserer Arbeitsgruppe, durfte ich von Ihrer Seite stets kontinuierliche wissenschaftliche Förderung, interessante akademische Diskussionen und eine exzellente Betreuung erfahren.

Ferner möchte ich mich bei Ute Sandaradura de Silva bedanken, die mich als kompetente technische Assistentin mit viel Geduld und Verständnis in die Welten der Laborarbeit einführte. Mein Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. med. Max Augustin, welcher mich kontinuierlich unterstützte und förderte, wo er nur konnte.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 ZUSAMMENFASSUNG	8
2 EINLEITUNG	9
2.1 Das humane Immundefizienz-Virus	9
2.2 Syphilis	12
2.3 HIV/Syphilis-Ko-Infektion	15
2.4 Gedächtniszellpopulationen und ihre Rolle in der HIV-Pathogenese	16
2.5 Rolle von Programmed cell death-1 (PD-1) und HLA-DR in Immunaktivierung und T-Zell Erschöpfung	17
2.6 Interferon-gamma (IFN- γ) als Modulator der Funktion und Erschöpfung von CD4 ⁺ -T-Gedächtniszellen	18
2.7 Ziel und Fragestellungen	20
2.7.1 Ziel	20
2.7.2 Fragestellungen	20
3 MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 Methoden	21
3.1.1 Patienten und Blutprobenakquise	21
3.1.2 Extraktion und Isolierung mononukleärer Zellen	22
3.1.3 PBMCs	22
3.1.4 Durchflusszytometrie	22
3.1.5 Extrazelluläre Färbung mononukleärer Zellen	24
3.1.6 Simoa Quanterix	25
3.1.7 Durchflusszytometrische Analyse und Oberflächenmarkern	25
3.1.8 Statistische Analyse	27
3.1.9 Laborbedingungen	28
3.2 Materialien	29
3.2.1 Apparaturen	29
3.2.2 Software	29
3.2.3 Chemikalien und Medien	30
3.2.4 Antikörper Durchflusszytometrie (MacQuant)	30
3.2.5 Simoa Zytokinmessungen	31
3.2.6 Plastikware	31

4	ERGEBNISSE	32
4.1	Patienten	32
4.2	Prozentuale Verteilung der CD4 ⁺ -T-Zellen (T _{CD4})	35
4.3	HLA-DR Expression auf CD4 ⁺ -T-Zellen (T _{CD4})	35
4.4	Relative Verteilung der zentralen T-Gedächtniszellen (T _{CM})	36
4.5	PD-1 Expression auf zentralen T-Gedächtniszellen (T _{CM})	38
4.6	Interferon-γ-Spiegel (IFN-γ) im peripheren Blut	39
4.7	Korrelation zwischen Interferon-γ-Spiegel (IFN-γ) und Viruslast (HIV-1 RNA Kopien/mL) in der ersten Kohorte (aHIV/S)	40
5	DISKUSSION	42
5.1	Fragen	42
5.2	Bidirektionale Interaktion zwischen HIV und Syphilis	43
5.3	Zentrale Gedächtnis-T-Zellen und HIV-Reservoirbildung	44
5.4	PD-1-Expression und T-Zell-Erschöpfung	46
5.5	HLA-DR-Expression und Immunaktivierung	46
5.6	Interferon-γ und HIV-Pathogenese	47
5.7	Schlussfolgerungen	48
6	LITERATURVERZEICHNIS	50
7	ANHANG	54
7.1	Abbildungsverzeichnis	54
7.2	Tabellenverzeichnis	55

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
AG	Arbeitsgemeinschaft
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrome
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD27	Cluster of differentiation 27
CD28	cluster of differentiation 28
CD4	Cluster of differentiation 4
CD45RO+	cluster of differentiation 45 RO, Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C
DAIG	deutsche AIDS-Gesellschaft e.V.
DMSO	Dimethylsulfoxid, Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
GALT	Darm-spezifische lymphatische Gewebe
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA-DR	humane Leukozytenantigen DR
IFN	Interferon
ISGs	Interferon-stimulierte Gene
JAK-STAT-Signalweg	Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription-Signalweg
MHC	major histocompatibility complex
MSM	Männer, die gleichgeschlechtliche Sexualkontakte mit anderen Männern haben
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	programmed cell death-1
pDCs	periphere dendritische Zellen
PLWH	People living with HIV
RKI	Robert-Koch-Institut
STIs	sexually transmitted infections (z.Bsp. Syphilis, Chlamydien, Gonorrhoe)
TNF	Tumornekrosefaktor
USA	United States of America
WHO	World Health Organization

Disclaimer: Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich, sofern nicht anders kenntlich gemacht, auf alle Geschlechter (männlich, weiblich, divers).

1 Zusammenfassung

Die in der in dieser Studie erhobenen Daten bieten eine aufschlussreiche Analyse im akuten Stadium der Ko-Infektion von HIV und Syphilis. Sie erlauben zudem einen Vergleich zu chronisch-infizierten HIV-Individuen (cHIV) unter ART sowie zu einer HIV-negativen und Syphilis-negativen Kontrollgruppe (CTRL).

Unsere erhobenen Daten unterstützen die Annahme, dass eine Ko-Infektion den klinischen Verlauf der HIV-Infektion verschlechtern kann.

Es besteht eine signifikant ausgeprägte Depletion von CD4⁺-T-Zellen (T_{CD4}) in der ersten Kohorte (aHIV/S). Dies verdeutlicht den pathologisch gesteigerten Verbrauch dieser Zellgruppe. Die beeinträchtigte Funktion, Aktivierung und Erschöpfung der T-Zellen, die bei einer akuten HIV/Syphilis-Ko-Infektion beobachtet werden, kann zu einer verminderten Kontrolle der HIV-Replikation führen. Dies könnte auch die erhöhte HI-Viruslast (RNA-Kopien/mL) in der ersten Kohorte (aHIV/S) im Vergleich zur zweiten Kohorte (aHIV) erklären.

Zudem ist die gesteigerte Expression von PD-1, HLA-DR sowie die erhöhten IFN-gamma-Spiegel bei ko-infizierten Patienten anzumerken. Dies sind deutliche Hinweise für die vermutete Annahme, dass bei einer Ko-Infektion eine erhöhte Aktivität und damit verbundene Komplexität der humanen Immunantwort vorliegt. Aufgrund dieser Annahme könnte man eine gesteigerte und schnellere Erschöpfung der Immunzellen vermuten. Daraus mag zum Beispiel eine Begünstigung für opportunistische Infektion resultieren.

In den Untersuchungen zeigen sich gewisse Trends. Einige Fragen bezüglich der Interaktion zwischen einer HIV- und Syphilis-Infektion bleiben offen. Es bedarf longitudinaler Studien mit besonderem Augenmerk auf die langfristigen Auswirkungen der Ko-Infektion HIV und Syphilis nach Beginn einer ART. Speziell die Untersuchung des HIV-Reservoirs wäre in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung. Es besteht nämlich hier Anlass zum Verdacht auf eine schnellere Etablierung eines HIV-Reservoirs. Einerseits aufgrund der gesteigerten PD-1 Expression, als auch aufgrund der erhöhten HI-Viruslast in den ko-infizierten Kohorten.

2 Einleitung

2.1 Das humane Immundefizienz-Virus

Seit der Isolierung des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) 1982 durch Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi gab es bahnbrechende Fortschritte in den Bereichen Therapie und Aufklärung [1, 2]. Die globale Belastung der Weltbevölkerung mit HIV beläuft sich aktuell auf rund 38 Millionen Menschen. Mit mehr als 40 Millionen Toten bis 2022, gilt die AIDS Pandemie als eine der tödlichsten [3]. Trotz der vielen Fortschritte hat HIV mit Hinblick auf seine sozialen und ökonomischen Implikationen weiterhin eine hohe Relevanz für die Gesundheit der Weltbevölkerung.

Das Virus ist ein RNA-Virus aus der Familie der Retroviridae, welches spezifische Immunzellen infiziert und zerstört, insbesondere CD4+ T-Lymphozyten. Eine HIV-Infektion verläuft bei jedem Wirt sehr unterschiedlich. Grundsätzlich wird von folgenden Phasen gesprochen: der akuten HIV-Infektion, der HIV-Infektion ohne Symptome, der HIV-Infektion mit Symptomen und AIDS, welches das Endstadium darstellt. Ohne Behandlung führt AIDS zu schweren opportunistischen Infektionen und Krebserkrankungen mit schließlich meist letalem Ausgang. Dank der Einführung antiretroviraler Medikamente zur Therapie einer Infektion mit HIV in den 1990er Jahren und deren stetigen Weiterentwicklung ist sie zu einer beherrschbaren chronischen Krankheit geworden [4]. Bei frühzeitiger Therapieinitiierung und regelmäßiger Medikamenteneinnahme gleicht die Lebenserwartung der PLWH (People Living With HIV, Menschen die mit HIV leben) fast der der HIV-negativen Allgemeinbevölkerung [5].

In dieser Arbeit wird der Fokus vor allem auf dem akuten retroviralen Syndrom (ARS) liegen, auch bekannt als primäre HIV-Infektion oder akute HIV-Infektion. Das ARS definiert sich entweder durch eine hohe HIV-1-Viruslast ohne einen positiven anti-HIV-1 ELISA oder durch einen positiven HIV-Test, wenn der Western Blot in weniger als 3 Banden positiv ist. Das Syndrom tritt typischerweise 2 bis 4 Wochen nach der Infektion mit HIV auf und kann bis zu 4 Wochen andauern [6]. Die Patienten leiden häufig an unspezifischen Symptomen wie Fieber, Hautausschlag, Fatigue, Kopfschmerzen, Pharyngitis und/oder Lymphadenopathie. 1985 wurde es durch Cooper et al. deshalb als Mononukleose-ähnliche Erkrankung beschrieben [7]. Diese Symptomatik stellt eine Folge der rapiden Virusvermehrung und der Immunantwort des Körpers auf die neue Infektion dar [6]. Eine frühzeitige Erkennung und damit die

erfolgreiche Stellung der Diagnose ist aufgrund der unspezifischen Symptome erschwert. Dies verdeutlicht auch die Rarität von Blutproben von Probanden im Stadium des ARS.

Fiebig et al. entwickelten 2003 ein System zur Einteilung der akuten HIV-Infektion (Abbildung 1). Dieses basiert auf dem Nachweis spezifischer viraler und immunologischer Marker aus Plasmaproben akut infizierter Probanden und erlaubt eine Einteilung in die Stadien I-VI. Das System ist besonders in der Forschung und Diagnostik relevant, um den Verlauf der Infektion zu verstehen und frühzeitig zu behandeln. Die Stadien definieren sich wie folgt:

Stadium I zeigt detektierbare virale Ribonukleinsäure mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction), Stadium II weist positive p24-Antigen gemessen durch ELISA auf (engl. enzyme-linked immunosorbent assay). Das Stadium III manifestiert sich mit HIV-spezifischen Antikörpern, detektiert mittels ELISA. In den Stadien IV und V fällt der Western Blot erstmals positiv aus. Stadium V unterscheidet sich hierbei durch das Bandenmuster von Stadium IV und markiert das Ende der akuten HIV-Infektion. Der progressive Übergang in das frühe chronische Stadium der Infektion, Fiebig-Stadium VI (erkennbar ab circa 3 Monaten nach erster RNA-Messung) zeigt den Übergang der Plasma-Viruslast in die Plateauphase der Infektion [6, 8, 9].

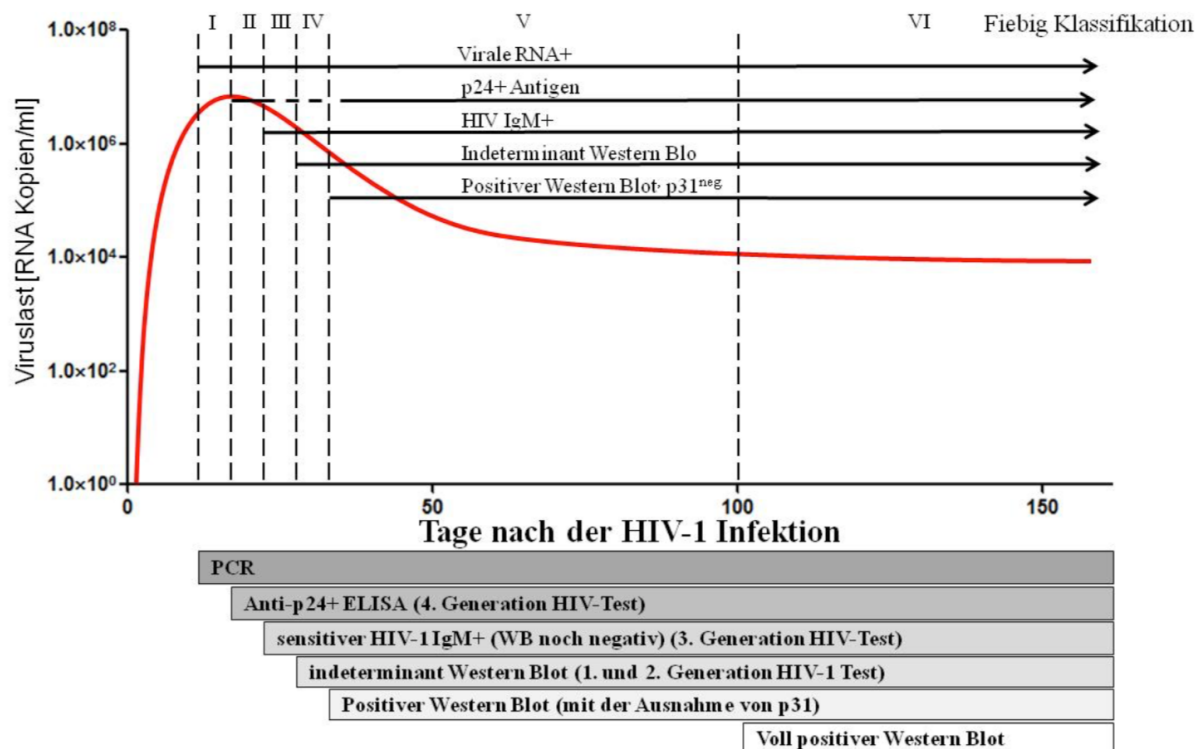


Abbildung 1 Fiebig Stadien; Viruslast (Kopien per ml) in Bezug auf Tage nach HIV-1 Transmission [9]

Es ist unerlässlich, dass Risikofaktoren für eine HIV-Infektion wie ungeschützter Geschlechtsverkehr, Sexualverhalten oder intravenöser Drogenabusus anamnestisch erfragt werden. Denn das akute retrovirale Syndrom (ARS) fungiert als Katalysator der Epidemie, da das Übertragungsrisiko durch eine hohe Viruslast stark gesteigert ist. Christopher D. Pilcher et al. zeigte in seiner Publikation, dass Personen beginnend vor dem Ausbruch des akuten retroviralen Syndroms und 6 Wochen lang danach, hyperinfektiös sind [10].

Nach Diagnosestellung einer HIV-Infektion und schneller Initiierung der kombinierten antiretroviralen Therapie (ART) gelingt in der Regel eine Suppression der Virusreplikation, ein Wiederanstieg der CD4⁺ Zellzahl und damit eine Rekonstitution des Immunsystems. Zusätzlich lässt sich durch eine effektive Senkung der HI-Viruslast auch das Übertragungsrisiko auf ein Minimum reduzieren [11].

Dabei lassen sich mehrere Hürden für eine Eradikation benennen. Zum einen kommt es rasch nach Beginn der Infektion zur Bildung des bereits o.g. latenten HIV-Reservoir, wo das Virus unerkant durch das Immunsystem persistieren kann. Latent infizierte CD4⁺-T-Gedächtniszellen (T_M), welche die virale Virussequenz als provirale HIV-DNA in ihrem eigenen Genom integriert haben, wandern unter anderem in das Darm-spezifische lymphatische Gewebe (GALT), Lymphknoten und das zentrale Nervensystem ein und bilden eine anatomische Barriere [12]. Bei Absetzen der Medikamente würde es zu einem erneuten Anstieg der

Viruslast kommen [13]. Des Weiteren führt die kontinuierliche Exposition des Immunsystems mit HIV-Antigenen zu einer Erschöpfung der T-Lymphozyten.

Im akuten Stadium einer HIV-Infektion beeinflussen ko-inzidente sexuell übertragbare Infektionen (STIs) die Pathogenese sowie die Immunantwort maßgeblich. Von besonderer klinischer Relevanz ist dabei die Syphilis-Ko-Infektion zu nennen.

2.2 Syphilis

Der Erreger dieser chronischen Infektionskrankheit ist das Bakterium *Treponema pallidum* subspezies *Pallidum*, welches die Syphilis hervorruft.

In den letzten Jahren zeigte sich eine deutliche Zunahme der STIs. Die Syphilis ist in Deutschland und weiteren Industriestaaten, wie den USA wieder auf dem Vormarsch [14, 15]. Laut WHO belief sich die globale Belastung durch Syphilis 2022 schätzungsweise auf 8 Millionen neue Fälle pro Jahr [16, 17]. Der überwiegende Anteil von Infektionen in den Industriestaaten liegt in der Gruppe der MSM [18]. Dies wurde mit einer Zunahme von riskantem Sexualverhalten erklärt [19]. Deutschland verzeichnet seit Beginn der 2000er Jahre einen Anstieg der gemeldeten Fälle (nichtnamentliche Meldungspflicht an das Robert Koch Institut (RKI) durch IfSG) mit 9519 Fällen im Jahr 2024 [14, 20, 21]. Dabei zeigt sich laut Statistik des RKIs ein Verhältnis von Mann zu Frau von 16:1 [20]. Die Entwicklung hierzulande korreliert deutlich mit dem internationalen Trend. Geografisch zeigte sich die höchste Inzidenz in den Ballungsräumen [14, 21].

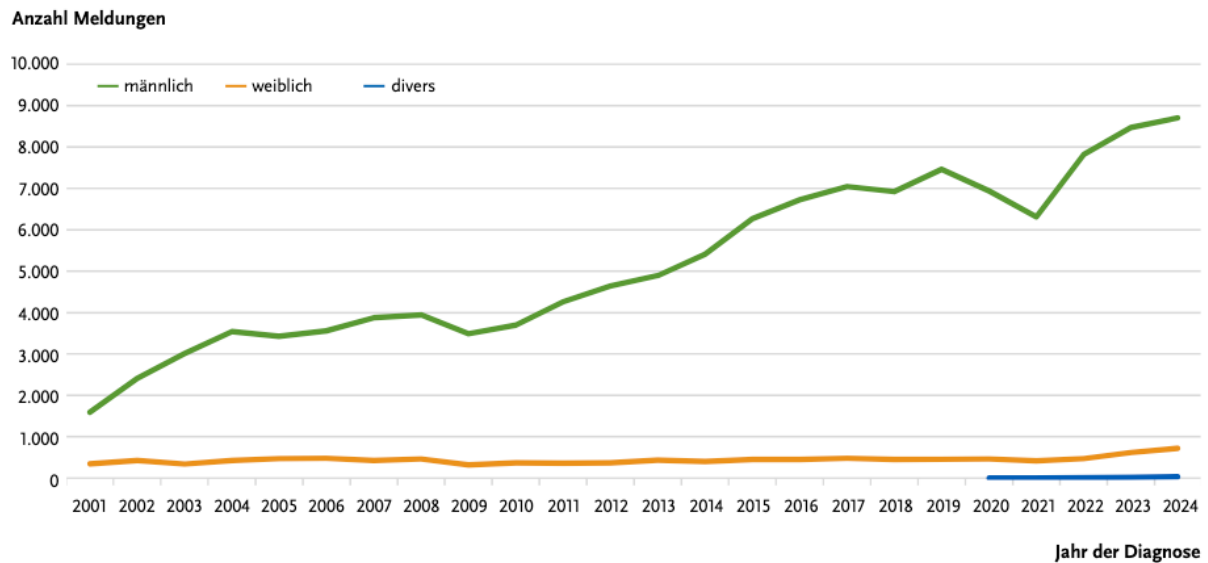


Abbildung 2 Syphilis in Deutschland: Anzahl der gemeldeten Fälle nach Geschlecht und Jahr der Diagnose, IfSG-Meldezahlen 2001 – 2024 ($n = 135.089$) [21]

Ende des 15. Jahrhunderts wurde die Syphilis erstmals auf dem europäischen Kontinent beschrieben. Ihre Entdeckung gelang 1905 durch Schaudinn und Hoffmann [18, 22]. Der Mensch stellt das einzige Erregerreservoir dar. Die Übertragung findet hauptsächlich sexuell statt, sehr selten nur vertikal von Mutter zu Kind (Syphilis connata). Eine verletzte Hautbarriere erweist sich meist als Eintrittspforte [18]. Als Inkubationszeit werden in der Literatur im Durchschnitt 3 Wochen angegeben, je nach Inokulum-Dichte der übertragenen Erreger.

Der Verlauf wird in vier Stadien (I-IV) eingeteilt. Sowohl eine symptomatische als auch eine asymptomatische Infektion können in einer chronischen Infektion münden. Wichtig ist es die Frühsyphilis (bis ein Jahr nach der Infektion) von der Spätsyphilis abzugrenzen. Die ersten beiden Stadien fallen in den Zeitraum der Frühsyphilis. In Stadium I äußert sich die Infektion meist durch eine derbe, schmerzlose Induration an der Eintrittspforte („Ulcus durum“) und ggf. einer regionalen Lymphadenopathie [18, 23]. Beides zusammen wird auch als Primärkomplex bezeichnet [18].

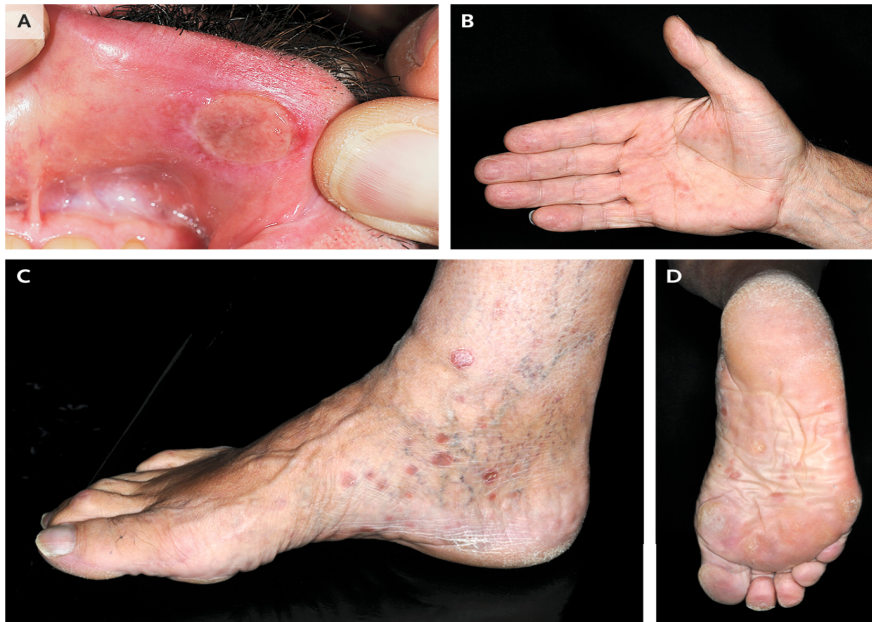


Abbildung 3 Schön, M. P., & Bertsch, H. P. (2016). *IMAGES IN CLINICAL MEDICINE. Primary and Secondary Syphilis. The New England journal of medicine*, 374(4), 372. <https://doi.org/10.1056/NEJMim1502476>; A *Ulcus durum* Oberlippe; B -D *Papulöses Syphilid* an Händen und Füßen; reproduced with permission from (scientific reference citation), Copyright Massachusetts Medical Society [24]

Im Stadium II kommt es unbehandelt nach 4-10 Wochen zu einer hämatogenen und lymphogenen Aussaat des Erregers [18]. Diese manifestiert sich durch generalisierte Krankheitsercheinungen, wie zum Beispiel Müdigkeit, Fieber, Nachtschweiß, Kopf-, Gelenk- oder Muskelschmerzen [18]. Sehr häufig wird auch eine harte Schwellung vieler Lymphknoten beobachtet (Polyskleradenitis). Aus dermatologischer Sicht sind hier noch Exantheme und Enantheme als Manifestation der Infektion zu nennen, wovon erstere gerne an Hand- und Fußflächen auftreten (Abbildung 3). Zudem sind viele weitere Symptome möglich, sodass die Syphilis auch als „der Affe“ unter den Krankheiten bezeichnet wird (Nachahmung/Nachäffen von Krankheiten) [25]. Zur besseren Erkenntnis der Infektion empfiehlt sich eine sorgfältige Anamnese, welche eine Sexualanamnese einschließen sollte. Bei bestätigter Infektion mit HIV sollte laut Deutsch-Österreichischer Leitlinie zur antiretroviralen Therapie der HIV-1-Infektion der DAIG Stand September 2020 ein Test auf weitere STDs, insbesondere Syphilis erfolgen [26].

Bleibt die Infektion unbehandelt und heilt nicht spontan aus, schließt sich dem symptomfreien Intervall die Spätsyphilis an [18]. Dank der zuverlässigen diagnostischen und therapeutischen Mittel im klinischen Alltag wird diese im deutschen Raum nur noch selten beobachtet. Der Spätsyphilis werden das dritte Stadium und die quartäre Syphilis zugeordnet. Während sich das Stadium III vor allem durch tuberöse Hautveränderungen (Syphilis tuberosa) und ulzerierende granulomatöse Veränderungen, sog. Gummen, die in jedem Organ auftreten können

(Syphilis gummosa) zeigt, rückt bei der quartären Syphilis die ZNS-Beteiligung in den Vordergrund [18].

2.3 HIV/Syphilis-Ko-Infektion

In den vergangenen Jahren wurde eine deutliche Zunahme der Syphilis-Inzidenz beobachtet [14]. Studien und Umfragen legen nahe, dass Fortschritte in der HIV-Therapie und -Prävention mit Veränderungen im Sexualverhalten einhergehen [27]. HIV-Risikominimierungsstrategien – wie der Verzicht auf Kondome bei HIV-serokonkordanten Partnern, eine effektive Viruslastsuppression sowie die HIV-Präexpositionsprophylaxe (PrEP) – können zu vermehrtem ungeschütztem Sexualverkehr führen und dadurch die Transmission anderer sexuell übertragbarer Infektionen, insbesondere der Syphilis, begünstigen [27]. Seit 2016 wird im Rahmen der Syphilis-Meldung nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) auch eine HIV-Ko-Infektion erfasst. Dabei besteht nach Angaben des RKI in circa einem Drittel aller Fälle eine bestehende Infektion mit HIV [20].

Einige Studien konnten beweisen, dass die HIV/Syphilis-Ko-Infektion eine klinisch relevante und gegenseitig verstärkende Kombination darstellt. Salado-Rasmussen et al. zeigte bereits, dass die Syphilis-Infektion den Erwerb von HIV erleichtern kann und umgekehrt [28, 29]. Auch Menschen mit antiretroviraler Therapie (ART) sind nach wie vor durch Ko-Infektionen, wie die Syphilis gefährdet [30, 31]. Die Syphilis kann den Krankheitsverlauf bei PLWH verschlechtern, wie durch eine gesteigerte CD4⁺-T-Zell-Depletion und erhöhte Plasma-HIV-1-RNA-Spiegel nachgewiesen wurde [32, 33]. Zudem gibt es Hinweise auf eine veränderte Immunreaktion bei vorliegender Ko-Infektion [34]. So scheint die HIV/Syphilis-Ko-Infektion durch eine Zunahme inflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-10, gekennzeichnet zu sein [35, 36].

Ein Risikofaktor für neurologische Komplikationen bei einer Syphilis-Infektion scheint unter anderem eine niedrige CD4⁺ Zellzahl zu sein, wie sie bei einer HIV/Syphilis-Ko-Infektion oftmals vorzufinden ist [37]. Einige Studien bekräftigen die Annahme, dass das HI-Virus den Verlauf einer Syphilis-Infektion verschlechtern kann. Dies zeigt sich durch mögliche neurologische Komplikationen und eine persistierende Infektion [28, 35, 38]. Auch ein früheres Auftreten der gravierenden Neurosyphilis wurde bei ko-infizierten Patienten in einzelnen Studien beobachtet [18, 37, 39].

Die Folgen einer Ko-Infektion scheinen mannigfaltig und sind bislang wenig erforscht.

2.4 Gedächtniszellpopulationen und ihre Rolle in der HIV-Pathogenese

Vor dem Hintergrund der immunologischen Veränderungen bei der HIV/Syphilis-Ko-Infektion rücken CD4⁺-T-Gedächtniszellen in den Fokus, da sie sowohl zentrale Effektoren der Immunantwort als auch das wichtigste Reservoir für persistierendes HIV darstellen. Syphilisbedingte Immunaktivierung und Zytokin-Veränderungen könnten deren Aktivierung, Migration und Differenzierung beeinflussen und somit zur viralen Persistenz und Immunpathogenese beitragen.

In der vorliegenden Studie lag ein besonderes Augenmerk auf CD4⁺ T-Gedächtniszellen (T_M), welche in weiteren Stufen der Differenzierung eingeteilt werden können: Stammzellgedächtnis-T-Zelle (T_{SCM}), Zentralgedächtnis-T-Zelle (T_{CM}), Effektorgedächtnis-T-Zelle (T_{EM}), Übergangsgedächtnis-T-Zelle (T_{TM}) und Terminaleffektor-T-Zelle (T_{TE}). Wie in *Abbildung 4* ersichtlich, folgt die Differenzierung einer progressiven Proliferation, wobei die Zelle in den jeweils ausgereifteren Typen übergehen kann. Zellen am Anfang der Differenzierungsreihe haben folglich ein größeres proliferatives und selbsterneuerndes Potential, dafür aber geringere Effektorfunktionen und umgekehrt.

Mithilfe der Oberflächenmarker Chemokinrezeptor CCR7 und TNF-Rezeptor CD27 können die CD4⁺-T-Gedächtniszellpopulationen weiter differenziert werden [40]. Sind die beiden Rezeptoren CCR7 und CD27 exprimiert und binden an die passenden Liganden, wird über die hochendothelialen Venolen der Lymphknoten der Eintritt in die sekundär lymphatischen Organe ermöglicht. CCR7⁺/CD27⁺ T-Zellen werden als Zentralgedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) zusammengefasst. Folglich migrieren CCR7⁻/CD27⁻ T-Zellen vermehrt in die peripher lymphatischen Gewebe und werden als Effektorgedächtnis-T-Zelle (T_{EM}) definiert. Als CCR7⁻/CD27⁺ bilden die Übergangsgedächtnis-T-Zellen (T_{TM}) eine Übergangsstufe. Der Fokus der Dissertation liegt hier vor allem auf den Zentralgedächtnis-T-Zellen (T_{CM}), da sie eine höhere Anzahl an replikationskompetenten HI-Viren aufweisen und daher ein wichtiges HIV-Reservoir darstellen [41, 42]. Die Zentralgedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) sind die direkten Nachfolger der Stammzellgedächtnis-T-Zelle (T_{SCM}). Unterschiedliche Mechanismen ermöglichen den Zentralgedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) ein langes Überleben und geben ihnen aufgrund der nahen Verwandtschaft zur Stammzellgedächtnis-T-Zelle (T_{SCM}) die Fähigkeit zur proliferativen Erneuerung [43].

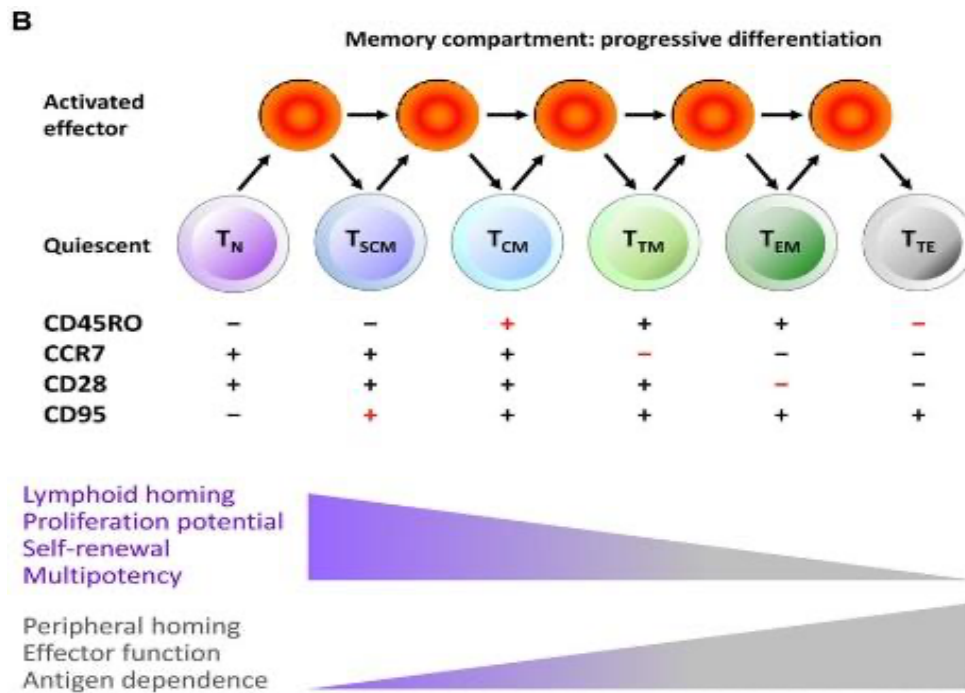


Abbildung 4 Gliederung der $CD4^+$ -T-Gedächtniszellen [40]

2.5 Rolle von Programmed cell death-1 (PD-1) und HLA-DR in Immunaktivierung und T-Zell Erschöpfung

Das humane Leukozytenantigen DR (HLA-DR) ist ein zentraler Marker der T-Zell-Aktivierung bei HIV-Infektionen. Seine persistierende Expression auf $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen spiegelt eine anhaltende Immunaktivierung wider, die eine Schlüsselrolle in der HIV-Pathogenese spielt. Chronische Immunaktivierung, angezeigt durch HLA-DR-Expression, ist eng mit einer erhöhten Expression des programmierten Zelltodproteins 1 (PD-1) auf T-Zellen assoziiert.

PD-1 ist ein wichtiger Immun-Checkpoint-Oberflächenrezeptor aus der Familie der CD28, der vor allem auf aktivierten B- und T-Lymphozyten exprimiert wird [44]. Nach vorangegangener Aktivierung durch Bindung des passenden Liganden helfen sie mittels inhibitorischer Signalwege überschießende und somit schädliche Immunantworten zu begrenzen [45].

Im Bereich der HIV-Forschung lassen sich mehrere Beobachtungen zu PD-1 festhalten. Die Expression von PD-1 auf T-Zellen bei PLWH zeigt sich gesteigert. Solche T-Zellen, die PD-1 exprimieren, zeigen eine höhere Anzahl an replikationskompetenten HI-Viren [46]. PD-1 positive T-Zellen verbleiben im Blut, trotz längerer Unterdrückung durch ART und spielen bei der Entstehung des HIV-Reservoir eine wichtige Rolle [46].

Bei HIV-Infektionen kennzeichnet die Koexpression von HLA-DR und PD-1 auf T-Zellen eine Population chronisch aktivierter, proliferierender und funktionell erschöpfter Zellen, die zur Immundysfunktion und viralen Persistenz beitragen. HLA-DR⁺-Gedächtnis- $CD4^+$ -T-Zellen sind

mit HIV-DNA angereichert und weisen erhöhte PD-1-Expressionsniveaus auf. Dies deutet darauf hin, dass diese Zellpopulation sowohl aktiviert als auch funktionell erschöpft ist und während einer antiretroviralen Therapie ein bedeutendes Reservoir für persistierendes HIV darstellt [47]. Die Frequenz HLA-DR⁺-T-Zellen korreliert sowohl mit der Größe des HIV-Reservoirs als auch mit dem Krankheitsverlauf, da diese Zellen anfälliger für Apoptose und immunologische Erschöpfung sind [48].

Zudem zeigen einige Studien auf, dass die PD-1 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen positiv mit der HI-Viruslast und negativ mit dem CD4⁺-Zellspiegel korreliert [49]. Auch therapeutisch wird der Einsatz einer PD-1 Blockade erprobt. Im Tiermodell konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch eine PD-1 Antikörper-Blockade die HI-Viruslast im Blutplasma gesenkt werden konnte [50]. PD-1 Immun-Checkpoint-Blocker könnten womöglich ein wertvolles Instrument zur Bekämpfung latent infizierter Zellen bei Menschen unter ART darstellen [51]. In dieser Studie lag der Fokus auf der Untersuchung der PD-1 Expression auf zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}).

2.6 Interferon-gamma (IFN-γ) als Modulator der Funktion und Erschöpfung von CD4⁺-T-Gedächtniszellen

Neben den Immun-Checkpoint-Rezeptoren wie PD-1 spielen auch Zytokine durch ihre stimulierende Wirkung im akuten Infektionsgeschehen eine wichtige Rolle. Gerade das HI-Virus sorgt in der akuten Phase für eine stark gesteigerte Zytokin-Ausschüttung, oftmals auch beschrieben als „Zytokin-Sturm“ [52]. IFN-γ wird vor allem von T-Zellen nach Antigenkontakt ausgeschüttet. Das Zytokin beeinflusst die Regulierung der Immunantwort des Wirts auf virale und intrazellulär bakterielle Krankheitserreger. Eine fokale Freisetzung von IFN-γ führt zu einer Vasodilatation und einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, was den Zustrom von Neutrophilen und Makrophagen zum Entzündungsherd fördert [53]. Auch bei der adaptiven Immunantwort ist IFN-γ als Modulator involviert. Es reguliert die Expression von MHC-I- und II-Molekülen, wirkt synergistisch mit anderen Zytokinen, wie IL-2 oder IL-4 und steuert somit die T-Zell-vermittelte Immunantwort [54].

In Bezug auf HIV sind die Konsequenzen für die Pathogenese komplex. IFN-γ kann aufgrund seiner integralen Rolle bei der Immunregulation und der proinflammatorischen antiviralen Reaktion als wertvoller Biomarker für die Bewertung der Immunkompetenz und der antiviralen Reaktion bei Menschen mit HIV Infektion dienen [53]. Bei einer mit HIV-1 infizierten Person wird die Produktion von IFN-γ bereits in der akuten Phase sowie während des gesamten Infektionsverlaufs kontinuierlich nachgewiesen. Ein Höchststand des IFN-γ Spiegel zeigt sich schon nach circa 20 Tagen nach der Infektion mit HIV-1 [55]. Durch eine Induktion der

adaptiven Immunantwort (T-Zellen) und durch die Förderung der Expression antiviraler Gene (ISGs) können Interferone, wie IFN- γ , die Replikation des HI-Virus besonders in der akuten Phase hemmen [56].

In der chronischen Phase der HIV-1-Infektion führen persistierend erhöhte Interferonspiegel zu einem Zustand chronischer Immunaktivierung und Inflammation, der zur Krankheitsprogression und zur Entstehung nicht AIDS-definierender Komorbiditäten beiträgt. Diese anhaltende Immunaktivierung kann zu einer funktionellen Erschöpfung des Immunsystems führen. Dies äußert sich unter anderem durch eine Verstärkung der CD4⁺-T-Zellen Depletion und einer erhöhten Virusreplikation [57].

Ein vertieftes Verständnis der Mechanismen, welche der Ausschüttung spezifischer Zytokine zugrunde liegen, könnte dazu beitragen, Immunreaktionen insbesondere im Kontext von Ko-Infektionen präziser zu bewerten. Sofern Interferone therapeutisch genutzt werden, scheint der Zeitpunkt des Einsatzes eine wichtige Rolle zu spielen.

Die zellulären Immunantworten, die durch eine akute HIV-1 und Syphilis-Ko-Infektion hervorgerufen werden, sind bislang kaum untersucht worden. Gerade in Bezug auf bestimmte Oberflächen-Marker wie PD-1 und HLA-DR sowie Interferone wie IFN- γ gibt es wenige Studien, welche diese in Kontext mit der Syphilis-Ko-Infektion untersuchen. Trotz bedeutender Fortschritte bei der Behandlung von Menschen mit HIV stellen Ko-Infektionen, wie Syphilis, nach wie vor eine ernsthafte Bedrohung dar, da sie sich durch schwerwiegendere Krankheitsverläufe bei Betroffenen auszeichnen können.

2.7 Ziel und Fragestellungen

2.7.1 Ziel

Ziel dieser Dissertation ist es, den Einfluss der Syphilis-Ko-Infektion auf die zelluläre Immunantwort sowohl während einer akuten als auch bei einer chronischen HIV-Infektion zu untersuchen. Im Fokus stehen hierbei die Untersuchung gewisser Zellpopulationen wie CD4⁺-T-Zellen (T_{CD4}) sowie die Bestimmung und Korrelation mit der Immunaktivierung anhand von selektierten Oberflächen-Markern wie PD-1, HLA-DR und Interferonen wie IFN- γ .

2.7.2 Fragestellungen

Folgende Fragestellungen sollen bearbeitet werden:

- 1) Zeigen Patienten mit einer akuten HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion niedrigere CD4-Zellzahlen im Vergleich zu Patienten mit einer HIV-Monoinfektion oder zu Patienten mit einer chronischen HIV-Infektion unter antiretroviraler Therapie?
- 2) Zeigt sich der Anteil der zentralen T-Gedächtniszellen bei Patienten mit einer akuten HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion vergrößert und ist hierbei eine Erhöhung der PD-1 Expression bei Patienten mit einer akuten und chronischen HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion festzustellen?
- 3) Zeigen Pat. mit einer akuten HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion eine höhere Immunaktivierung (HLA-DR Expression) im Vergleich zu Patienten mit einer HIV-Monoinfektion oder zu Patienten mit einer chronischen HIV-Infektion unter antiretroviraler Therapie?
- 4) Ist die Immunaktivierung im Sinne einer Erhöhung des Interferon- γ -Spiegel bei Patienten mit einer akuten HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion gesteigert und zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Viruslast (HIV-1 RNA Kopien/mL) und Interferon- γ -Spiegel?

3 Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Patienten und Blutprobenakquise

Die Blutproben, der in der Studie eingeschlossener Patienten, wurden im Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) der Universität zu Köln aufbereitet und analysiert.

Die untersuchten Proben akut HIV-infizierter Patienten entstammen aus der TOP-HIV-Kohorte, die in den letzten Jahren innerhalb der TTU-HIV des Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) aufgebaut wurde. Dieses Projekt stellt eine gemeinsame Anstrengung von 8 verschiedenen Forschern des DZIF TTU-HIV an den verschiedenen Partnerstandorten dar. Die Proben (PBMC und Serum) wurden von den verschiedenen DZIF-Zentren (Hamburg, Hannover, München) nach Köln verschickt. Es wurden in den Kohorten mit einer akuten HIV-Infektion ausschließlich Patienten in den Fiebig Stadien I-IV eingeschlossen.

Über mehrere Jahre wurde in Zusammenarbeit mit DZIF-Zentren in Hamburg, Hannover, München und Köln eine PBMC-Probenbank aufgebaut. Eingeschlossen wurden Proben aus folgenden Studiengruppen:

- Akute HIV-1-Infektion
- Akute HIV/Syphilis-Ko-Infektion im Stadium I oder II
- Chronische HIV-1-Infektion mit akuter Syphilis im Stadium I oder II
- HIV-negative Kontrollpersonen

Die Gruppe chronisch HIV-infizierter Patienten mit akuter Syphilis wurde an der Uniklinik Köln in Kooperation mit der infektiologischen Schwerpunktpraxis am Ebertplatz (Köln) rekrutiert.

Für jeden Patienten wurde eine PBMC-Probe (10×10^6 Zellen) und Plasma analysiert.

Alle HIV-negativen Kontrollen wurden im Umfeld der Mitarbeiter des ZMMK rekrutiert.

Das Projekt wurde von der Ethikkommission der Universität zu Köln (Nr. 15-180) genehmigt und erfolgte gemäß den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki (1996). Die Probanden erklärten sich mit der Blutentnahme zu weiteren Forschungszwecken einverstanden. Nur nach adäquater Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung wurden die Patienten bzw. Probanden in die Studie eingeschlossen.

Pro Patient wurden jeweils 2 EDTA-Röhrchen und 1 Serum Röhrchen durch eine periphere venöse Blutabnahme gewonnen. Alle asservierten Biomaterialien wurden anschließend zur weiteren Aufarbeitung und Isolierung mononukleärer Zellen im ZMMK gesammelt und verarbeitet.

3.1.2 Extraktion und Isolierung mononukleärer Zellen

Für die Isolierung mononukleärer Zellen wurden die Räumlichkeiten der Arbeitsgruppe (AG) Lehmann und AG Rybniker im 5. Obergeschoss des Zentrums für molekulare Medizin Köln (ZMMK), Robert-Koch-Straße 21, 50931 Köln, Deutschland genutzt. Es wurden periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut (PBMCs) isoliert, mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation über Polysaccharide.

Hierbei wurde Vollblut auf eine polysaccharidhaltige Trennlösung (BioColl®) geschichtet und danach zentrifugiert (1400 revolutions per minute, 21°C, 20 min). Die anschließend sichtbare Interphase enthielt die mononukleären Zellen und konnte nun abpipettiert werden.

3.1.3 PBMCs

Serum- und EDTA-Monovetten wurden nach der Blutentnahme gemäß Standardprotokoll zentrifugiert. Serum bzw. Plasma wurden ohne Erythrozytenbeimischung abgenommen, in 500 µl Aliquots überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

PBMCs wurden aus dem verbleibenden EDTA-Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation (Biocoll) isoliert und anschließend gewaschen. Die Zellzahl und Vitalität wurden anhand des Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Für nachfolgende durchflusszytometrische Analysen wurden PBMCs in Aliquots von 3-5 Millionen Zellen in 1 ml Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) kryokonserviert (kontrolliertes Einfrieren, anschließende Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -180°C).

3.1.4 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Experimente wurden in den Räumlichkeiten der AG Lehmann/Rybniker im 5. Obergeschoss des ZMMK ausgeführt. Der dort stationierte Durchflusszytometer MACSQuant Analyzer 10 ist mit drei Lasern ausgestattet (nm; 405, 488 und 640). Die Bestimmungen zur Handhabung infektiöser Biomaterialien sind erfüllt. Sowohl

durchflusszytometrische Analysen und antikörpergesteuerte Zellsortierungen zählen zu den Anwendungsmöglichkeiten des MACSQuant Analyzer 10.

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist ein etabliertes Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen auf Zellen in Suspension. Dabei wird die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion genutzt. Die Zielstrukturen auf der Zelloberfläche werden mit fluorchromkonjugierten Antikörpern markiert, sodass die Expression der jeweiligen Marker über Fluoreszenzsignale erfasst werden kann.

Für die Messung werden die Zellen im Durchflusszytometer nacheinander analysiert. Jede Zelle wird einzeln vom Laser erfasst. Aus der Lichtstreuung lassen sich grundlegende zelluläre Eigenschaften ableiten, während die Fluoreszenzemission Aufschluss über die Bindung der markierten Antikörper und damit über die Markerexpression gibt. Die gemessenen Signale werden softwarebasiert in Parameter umgerechnet und in Diagrammen dargestellt. Dadurch können definierte Zellpopulationen identifiziert und hinsichtlich ihres Expressionsprofils phänotypisiert werden.

Vor der finalen Festlegung des Messpanels wurden die eingesetzten Antikörper titriert, um eine optimale Verdünnung pro Probe zu bestimmen. Dies reduziert unspezifische Bindungen und trägt zu den reproduzierbaren, vergleichbaren Messergebnissen bei. Insgesamt wurden 17 fluorchromkonjugierte Antikörper verwendet (Tabelle 6).

Da jedes Fluorchrom spezifische Absorptions- und Emissionsspektren aufweist (Tabelle 1), können diese in der Praxis aufgrund ihrer Breite teilweise überlappen. Um solche spektralen Überschneidungen im Multiparameter-Panel zu korrigieren und die Spezifität der einzelnen Signale zu verbessern, wurde vor der Analyse eine Kompensation durchgeführt. Dadurch lassen sich Überlappungen charakterisieren und rechnerisch ausgleichen. Die Fluoreszenzsignale können so den jeweiligen Markern möglichst eindeutig zugeordnet werden.

Laser	Filter	Kanal	Miltenyi Färbungen
405 nm (violet)	450/50 nm	V1	Vio® Bright V423, Vio-Blue®, DAPI, Hoechst 33342, Viobility 405/452 Fixable Dye
405 nm (violet)	525/50 nm	V2	VioGreen™, Viobility 405/520 Fixable Dye
488 nm (blue)	525/50 nm	B1	FITC, Vio B515, Vio Bright B515, Vio Bright FITC, Viobility 488/520 Fixable Dye
488 nm (blue)	585/40 nm	B2	PE
488 nm (blue)	655–730 nm	B3	PerCP, PerCP-Vio 700, PE-Vio 615, Propidium iodide, 7-AAD
488 nm (blue)	750 nm LP	B4	PE-Vio 770
635 nm (red)	655–730 nm	R1	APC, Vio R667, VioBright R667
635 nm (red)	750 nm LP	R2	APC-Vio 770

Tabelle 1 Absorptions- und Emissionsspektren Quelle: Miltenyi Biotec, 09.03.2022,

3.1.5 Extrazelluläre Färbung mononukleärer Zellen

Die kryokonservierten PBMCs wurden bis zur Verarbeitung bei -180°C gelagert und vor der Färbung kurz bei 37°C aufgetaut. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen mit humanem Serum blockiert (10 min. auf Eis). Für die durchflusszytometrische Charakterisierung wurden Multicolor-Flow-Panels (MACS®, Miltenyi) eingesetzt, um die in dieser Arbeit relevanten Immunzellpopulation anhand etablierter Oberflächenmarker eindeutig abzugrenzen.

Aktivierte CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen wurden über HLA-DR identifiziert, da diese Marker eine Aktivierung der Zellen widerspiegeln.

Ergänzend wurden Marker zur Einordnung des Reifungs- und Regulationsstatus (CD45RA, CCR7, CD27) sowie inhibitorische Checkpoint-Moleküle (PD-1) erfasst. Dies war vor allem im Hinblick auf die T-Gedächtniszellpopulationen von essenzieller Bedeutung. Dadurch gelang eine Bestimmung der Aktivierungs-/Differenzierungszustände. Außerdem konnten

regulatorische bzw. erschöpfungsassoziierte Profile innerhalb der definierten Population beschrieben werden.

Nach dem Ansetzen der Färbung erfolgte eine Inkubation im Dunklen bei 4°C (20 min) und ein weiterer Waschschrift. Zur Vermeidung von Aggregation wurden die Zellen abschließend in FACS-Buffer (PBS mit EDTA und FCS) resuspendiert und vor der Messung über Zellsiebe filtriert.

3.1.6 Simoa Quanterix

Zur Bestimmung der Interferon- γ -Spiegel wurde die Simoa® („Single Molecule Array“) Technik der Firma Quanterix genutzt. Die Analyse der Proben fand in Paris statt. Simoa ist eine ultrasensitive, immunologische Nachweisttechnik zur Quantifizierung von Proteinen und anderen Biomarkern bzw. Zytokinen. Sie können auch in sehr niedrigen Konzentrationen erfasst werden, welches mit klassischen Immunoassays wie ELISA häufig nicht mehr zuverlässig gelingt. Im ersten Schritt wurden paramagnetische Mikropartikel („Beads“) mit spezifischen Capture-Antikörpern funktionalisiert und mit der Probe inkubiert, um den Zielanalyt zu binden. Anschließend erfolgte die Markierung durch einen zweiten, analytspezifischen Detektionsantikörper, der typischerweise über Biotin-Streptavidin-Interaktionen oder direkt mit einem Enzymreporter gekoppelt ist. Nach Waschschriften zur Minimierung von Hintergrundsignalen wurden die Beads in eine Mikrowell-Platte mit kleinen Reaktionskammern im Femtoliter-Bereich überführt. Durch gezielte Verdünnung wurde sichergestellt, dass statistisch meist nur ein einzelnes Bead pro Well vorliegt (Poisson-Verteilung). Einzelsignale ereignisse wurden hierdurch messbar.

Nach Zugabe eines fluorogenen Substrats wurde das Signal in jeder Mikrowell detektiert. Befand sich ein Enzymreporter in der Kammer, entstand aufgrund des winzigen Volumens rasch eine hohe Produktkonzentration, die als positives Signal („on“) registriert wurde. Leere Wells blieben negativ („off“). Bei niedrigen Konzentrationen ermöglichte dies eine digitale Auswertung, bei der der Anteil positiver Wells direkt mit der Anzahl gebundener Moleküle korreliert. Bei höheren Konzentrationen erlaubte eine analoge Intensitätsmessung die Erweiterung des dynamischen Messbereichs.

Der zentrale Vorteil von Simoa liegt in der Kombination aus effizienter Anreicherung und drastischer Volumenreduktion, was Nachweisgrenzen im fg/mL-Bereich ermöglicht. Dies prädestiniert die Methode für hochsensitive Anwendungen wie die Detektion von Zytokinen.

3.1.7 Durchflusszytometrische Analyse und Oberflächenmarkern

Nach der extrazellulären Färbung folgte die phänotypische Analyse unserer Zielzellen mittels Durchflusszytometrie. Die Voreinstellungen im MACS Quant Analyzer 10 wurden auf 100.000 gemessene Gesamtevents pro Probe festgelegt, um eine vergleichbare statistische

Auswertung zu gewährleisten. Einige wenige Proben lagen unterhalb dieser Grenze. Bei zu starker Abweichung wurden diese Proben aus unserer Untersuchung ausgeschlossen.

Dank der durchflusszytometrischen Analyse gelang es alle Zielzellen (Abbildung 5) zu definieren und zu quantifizieren. Hierfür wurden einerseits FACS-Diva und FlowJo Softwareprogramme verwendet. Diese Programme erlauben mittels gezielter Gating-Strategien eine Bestimmung der prozentualen Verteilung. Darüber hinaus kann die individuelle Rezeptorexpression genauestens untersucht werden.

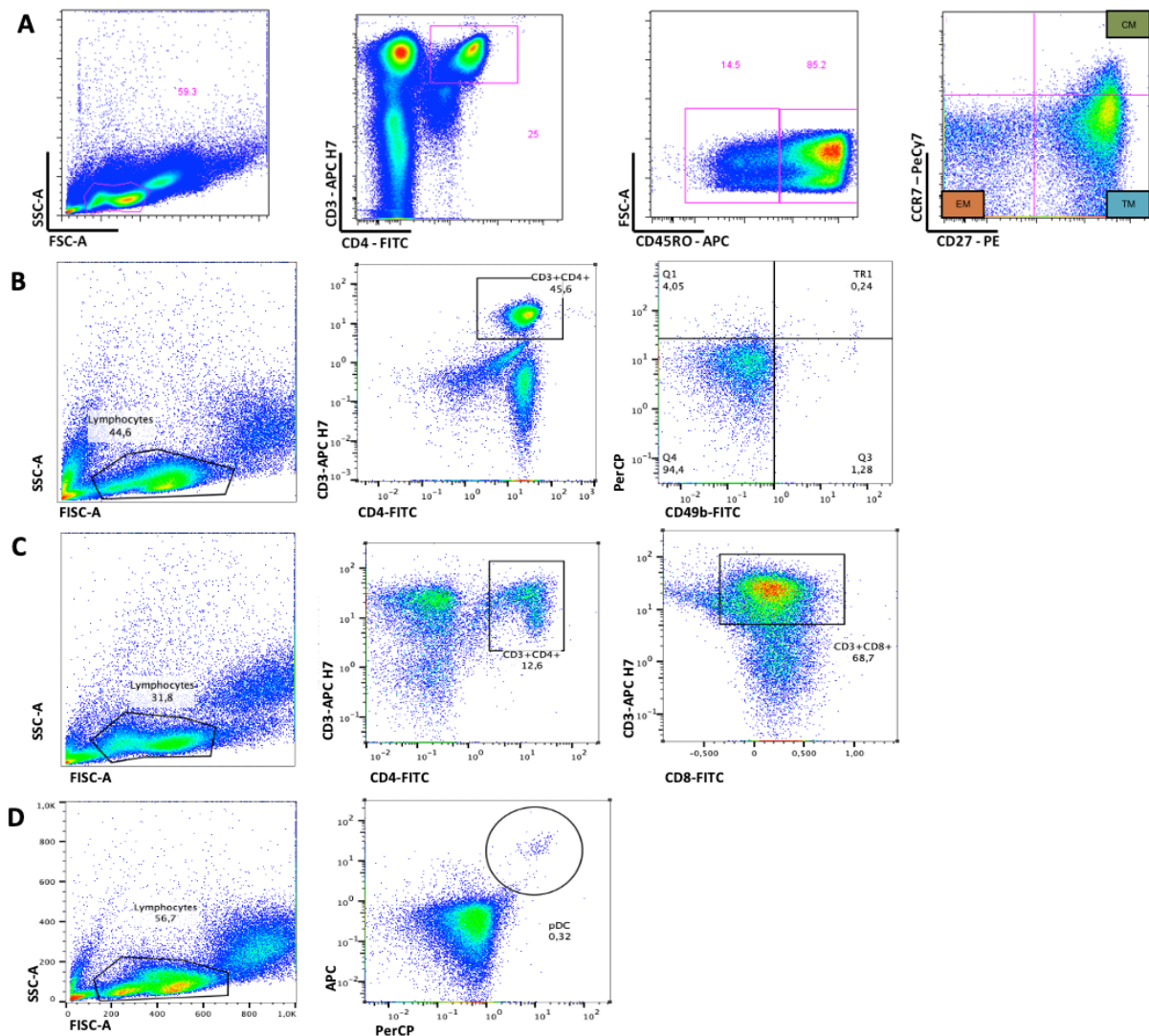


Abbildung 5 Durchflusszytometrie Gating Strategie; Exemplarisch gezeigt in (A) T-Gedächtniszellpanel mit CM, Zentralgedächtnis-T-Zellen; EM, Effektorgedächtnis-T-Zellen; TM, Übergangsgedächtnis-T-Zellen; (B) Tr1-Zellen; (C) CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen; (D) periphere dendritische Zellen (pDCs)

3.1.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse und graphische Darstellung aller Daten erfolgte mithilfe von GraphPad Software Prism 9. Zunächst wurden die Rohdaten mithilfe von Flowjo V und Microsoft Excel 16.56 in Prism eingespeist. Je nach Verteilung kamen bei normalverteilten Daten gepaarte bzw. ungepaarte T-Tests und bei nicht normalverteilten Daten zweiseitige Mann-Whitney- bzw. Wilcoxon-Tests zum Einsatz. Alle statistischen Analysen gehen von einem zweiseitigen Signifikanzniveau von $p < 0,05$ aus. In den einzelnen Abbildungen wurden folgende Abkürzungen verwendet, um das Signifikanzniveau darzustellen.

*	$p < 0.05$
**	$p < 0.01$
***	$p < 0.001$
****	$p < 0.0001$
ns	$p > 0.05$

Tabelle 2 Abkürzungen der Signifikanzniveau

Nichtparametrische Korrelationen wurden nach Spearman berechnet. Die Werte wurden als Median mit Interquartilsabstand (IQR) dargestellt.

3.1.9 Laborbedingungen

Die Experimente dieser Dissertation fanden in Laboren folgender Institute und Einrichtungen statt: Zentrum für molekulare Medizin Köln (ZMMK), Robert-Koch-Straße 21, 50931 Köln, Deutschland. Die Experimente dieser Arbeit wurden in Laborräumlichkeiten der Sicherheitsstufe S1 und S2 nach der Biostoffverordnung durchgeführt.

3.2 Materialien

Alle verwendeten Mittel der Dissertation zu Zwecken der durchgeführten Experimente und Datenanalyse werden im Folgenden in tabellarischer Form aufgelistet. Dies umfasst alle Experimente, die im ZMMK in Köln durchgeführt wurden.

3.2.1 Apparaturen

Bezeichnung	Hersteller
MacsQuant Analyser 10	Miltenyi Biotec, Deutschland
SIMOA SR-X	Quanterix, USA
SIMOA Mikronlete Washer	Quanterix, USA
Mikroskop Telaval31	Zeiss, Deutschland
Thermomix Comfort	Eppendorf, Deutschland
Makrofuge Z 466 K	Hermle, Deutschland
Mikrofuge Z 216 MK	Hermle, Deutschland

Tabelle 3 Apparaturen

3.2.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
FlowJo V	FloJo (LLC), USA
Prism 9.1.2	GraphPad Software Inc., USA
Microsoft Word 16 für Mac	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Excel 16 für Mac	Microsoft Corporation, USA

Tabelle 4 Software

3.2.3 Chemikalien und Medien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
PBS (Phosphat Buffered Saline)	Gibco, UK	14180-084
Biocoll-Trennlösung	Millipore, UK	L 6115
FCS (Fötales Kälberserum)	Biochrom, UK	S 0115
Trypanblau	Fluka, Thermo Fisher Scientific, USA	93595
DMSO	Sigma-Aldrich, USA	D 2650
2-Propanolol	Roth, USA	6752.3

Tabelle 5 Chemikalien und Medien

3.2.4 Antikörper Durchflusszytometrie (MacsQuant)

Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Hersteller
hu CD3	APC-H7	SK 7	Maus	BD
hu CD4	FITC	RPA-T4	Maus	BD
hu CD4	PE	M-T 466	Maus	Miltenyi Biotec
hu CD45RO	APC	REA 611	Mensch	Miltenyi Biotec
hu CCR7 (CD197)	PE-CY7	3D12	Ratte	BD
hu CD27	PE	M-T 271	Maus	BD
hu CD279 (PD-1)	BV 421	EH12.2H7	Maus	Biolegend
HLA-DR	PerCP	AC 122	Maus	Miltenyi Biotec

Tabelle 6 Antikörper Durchflusszytometrie

3.2.5 Simoa Zytokinmessungen

Bezeichnung	Bestellnummer
Human Cytokine 6-plex Panel Advantage Kit (IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-6, TNF- α)	102958
IFN- γ Advantage Kit	103337

Tabelle 7 Simoa Zytokinmessungen

3.2.6 Plastikware

Bezeichnung	Hersteller
Pipetten (10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Eppendorf, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Deutschland
Falcon-Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner, Deutschland
Falcon FACS-Röhrchen mit Zellsieb	Corning, USA
Mikroreaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Deutschland
Kryo-Einfriergerät Mr. Frosty	Nalgene, USA
Kryo-Röhrchen	Sarstedt, Deutschland
S-Monovette	Sarstedt, Deutschland

Tabelle 8 Plastikware

4 Ergebnisse

4.1 Patienten

Im Zuge unserer Untersuchung wurden insgesamt 60 Patienten eingeschlossen. Die Kohorten wurden wie folgt aufgeteilt und definiert:

- K1 - Kohorte 1 (aHIV/S) – akute HIV-Infektion mit Syphilis-Ko-Infektion (n = 15)
- K2 - Kohorte 2 (aHIV) – akute HIV-Infektion (n = 15)
- K3 - Kohorte 3 (cHIV/S) – chronische HIV-Infektion mit Syphilis-Ko-Infektion (n = 15)
- K4 - Kohorte 4 (CTRL) – HIV-negative Kontrollen (n = 15)

Abkürzungen: aHIV = akutes humanes Immundefizienz-Virus, cHIV = chronisches humanes Immundefizienz-Virus, S = Syphilis-Ko-Infektion, CTRL = HIV-negative Kontrollen

Tabelle 9 fasst die wichtigsten klinischen Charakteristika der eingeschlossenen Patienten zusammen.

In den Kohorten 1 und 2 wurden ausschließlich Baseline-Blutproben analysiert, die unmittelbar nach Diagnosestellung und vor Beginn der antiretroviralen Therapie (ART) entnommen wurden. Die mediane Viruslast betrug 1.460.000 RNA-Kopien/mL in Kohorte 1 und 949.000 RNA-Kopien/mL in Kohorte 2.

Kohorte 3 umfasste ART-behandelte Patienten, die sich mit einer neu diagnostizierten Syphilis vorstellten; die Blutentnahme erfolgte vor Beginn der antibiotischen Therapie. Alle Patienten dieser Gruppe lagen unter der Nachweisgrenze (<200 Kopien/mL), weshalb keine Viruslast angegeben wird.

Zur Beurteilung des Immunstatus wurden insbesondere die absolute CD4⁺-T-Zellzahl, die Viruslast sowie der CD4⁺-Nadirwert und der prozentuale Anteil der CD4⁺-T-Zellen berücksichtigt. Diese Parameter ermöglichen eine klinische Einordnung und die Korrelation mit den erhobenen Laborbefunden.

Die Altersmediane betrugen 36 (K1), 35 (K2), 45 (K3) und 37 Jahre (K4). In den ersten drei Kohorten waren ausschließlich männliche Patienten eingeschlossen, während die Kontrollgruppe aus 6 Frauen und 9 Männern bestand. Das CDC-Stadium A1 überwog in allen HIV-positiven Kohorten. Die medianen CD4⁺-T-Zellzahlen zeigten einen stufenweisen Anstieg von K1 (503 Zellen/ μ L) und K2 (515 Zellen/ μ L) über K3 (872 Zellen/ μ L) bis zur Kontrollgruppe (1230 Zellen/ μ L).

Der CD4⁺-Nadir beschreibt den historisch niedrigsten gemessenen CD4⁺-T-Zellwert eines Patienten und stellt einen wichtigen prognostischen Marker dar, unter anderem im Hinblick auf neurokognitive Beeinträchtigungen [58]. Die Medianwerte betrugen 503 (K1), 478 (K2) und 326 Zellen/ μ L (K3), wobei der niedrigste Wert in der chronischen Kohorte beobachtet wurde. Dies könnte mit dem höheren Durchschnittsalter sowie einem verzögerten Beginn der ART zusammenhängen.

Komorbiditäten umfassten vereinzelt chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Hepatitis-C-Infektionen sowie häufige internistische Erkrankungen wie arterielle Hypertonie oder Diabetes mellitus. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurden weitere Infektionen, insbesondere sexuell übertragbare Erkrankungen, ausgeschlossen, um immunologische Effekte der Syphilis-Ko-Infektion nicht zu verfälschen.

Im Folgenden werden Mediane mit Interquartilsabständen (25.–75. Perzentile) angegeben. Alle dargestellten Messungen beziehen sich auf Zellpopulationen aus peripherem Blut (PBMC-Proben).

Klinische Charakteristika

Klinische Charakteristika	K 1 (aHIV/S, n=15)	K 2 (aHIV, n=15)	K 3 (cHIV/S, n=15)	K 4 (CTRL, n=15)
Alter (Jahre, Median (IQR))	36 (26-40)	35 (29-40)	45 (41-56)	37 (28-59)
Geschlecht (%)				
Männlich	100	100	100	60
Weiblich				40
CD4 Zellzahl (Zellen/mm ³)	503 (388-599)	515 (285-538)	872 (477-974)	1230 (1020-1340)
CD4 Zellzahl Nadir (Zellen/mm ³)	503 (398-570)	478 (323-607)	326 (258-454)	/
Plasmaviruslast (Kopien/ml)	1.460.000 (292.500-8.403.936)	949.000 (94.729-7.485.000)	/	/

Tabelle 9 Klinische Charakteristika; IQR, Interquartile range, CD4, Cluster of differentiation 4; mm³, Kubikmillimeter; mL, Milliliter; %, Prozent

4.2 Prozentuale Verteilung der CD4⁺-T-Zellen (T_{CD4})

Die CD4⁺-T-Zellen (T_{CD4}) sind einer der wichtigsten Zielzellen des HIV-1. Sie geben Aufschluss über den Immunstatus eines Patienten. Daher folgte als einer der ersten Schritte der Vergleich der Frequenzen der T_{CD4} anteilig an den Lymphozyten in allen vier Kohorten im peripheren Blut (Abbildung 6).

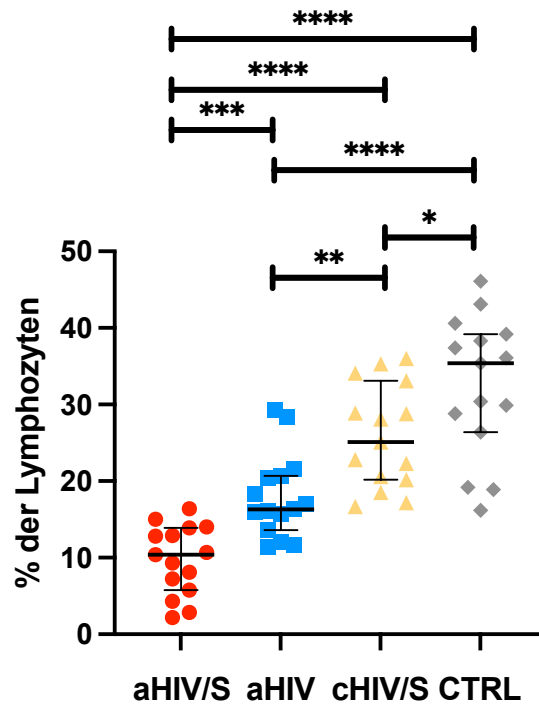


Abbildung 6 Prozentuale Verteilung der CD4⁺-T-Zellen; Kohorte 1 (aHIV/S); Kohorte 2 (aHIV); Kohorte 3 (cHIV/S); Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$

Abbildung 6 zeigt die niedrigste CD4⁺-T-Zellfrequenz (T_{CD4}) in Kohorte 1 (aHIV/S) (Median 10,4 %; IQR 5,78–13,9), signifikant niedriger als in allen übrigen Kohorten (vs. aHIV: $p = 0,0001$; vs. CTRL: $p < 0,0001$). Die Medianwerte betrugen 16,3 % für aHIV, 25,1 % für cHIV/S und 35,4 % für CTRL. Trotz ART lag die CD4⁺-T-Zellfrequenz in Kohorte 3 weiterhin signifikant unter der Kontrollgruppe ($p = 0,0336$).

4.3 HLA-DR Expression auf CD4⁺-T-Zellen (T_{CD4})

Im nächsten Schritt wurden verschiedene wichtige Zelloberflächenrezeptoren wie HLA-DR (Human Leukocyte Antigen - DR-Isotyp, MHC-Klasse-II-Zelloberflächenrezeptor) bestimmt.

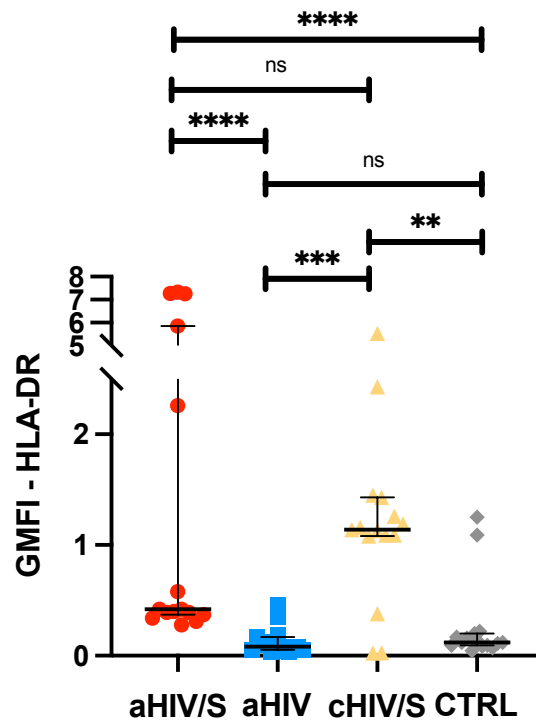


Abbildung 7 GMFI HLA-DR CD4⁺-T-Zellen; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; GMFI, Geometric Mean Fluorescence Intensity; HLA-DR, Human Leukocyte Antigen - DR-Isotyp

Die Medianwerte (IQR) betrugen: K1 0,42 (0,30–1,22), K2 0,08 (0,05–0,17), K3 1,14 (1,08–1,43) und K4 0,12 (0,09–0,20). Eine erhöhte HLA-DR-Expression zeigte sich insbesondere in den Kohorten mit Syphilis-Ko-Infektion (K1 und K3), zwischen denen kein signifikanter Unterschied bestand. Beide Kohorten unterschieden sich signifikant von K2 und den Kontrollen, am deutlichsten zwischen K1 und K2 ($p < 0,0001$) sowie gegenüber CTRL ($p < 0,001$). In K2 und K4 lagen die Werte eng beieinander.

In Abbildung 7 wurde aus Darstellungsgründen ein Achsenbruch in der y-Achse verwendet. Dargestellt ist die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (GMFI) von HLA-DR im Vergleich der vier Kohorten; die Streuung fällt hierbei erwartungsgemäß größer aus als bei relativen Anteilswerten.

4.4 Relative Verteilung der zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM})

Die Aufschlüsselung der T-Gedächtniszellen lieferte viele Erkenntnisse, jedoch liegt im Folgenden der Fokus vor allem auf der Population der zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}). Zunächst betrachten wir die relative Verteilung der T-Gedächtniszellen, welche sich als $CD45RO^+$ identifizieren lassen, über alle vier Kohorten.

Die Mediane ließen sich wie folgt ablesen: K1= 54.7 (46.9-64.9), K2= 67.6 (54.4-72.8), K3= 65.4 (51.9-71.6) und K4= 54.1 (48.7-64.3). Damit lag der höchste relative Anteil (%) der T-Gedächtniszellen an den $CD4^+$ -T-Zellen (T_{CD4}) in der zweiten Kohorte (K2, aHIV). Auf ähnlichem Niveau zeigte sich der Anteil der T-Gedächtniszellen in der dritten Kohorte. Kohorte 1 und Kohorte 2 lagen somit tiefer auf vergleichbarem Niveau. Zwischen der ersten und der zweiten Kohorte und der zweiten und der vierten Kohorte bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$ bzw. $p = 0.0240$). Unter den restlichen Kohorten ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen.

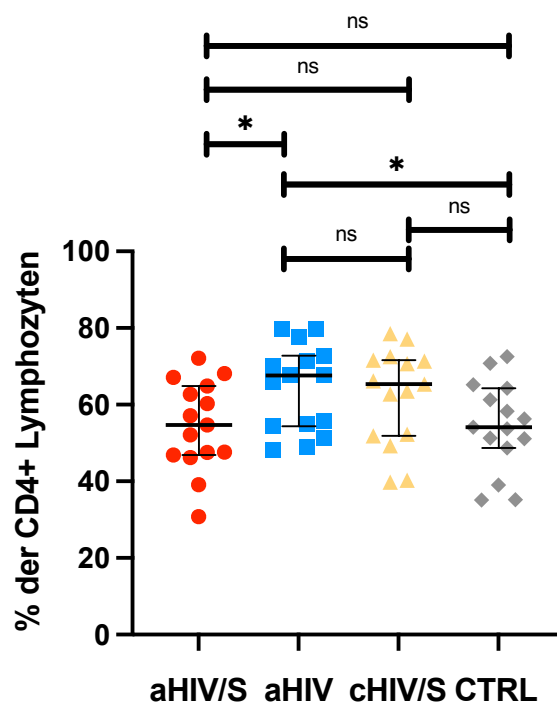


Abbildung 8 prozentuale Verteilung T-Gedächtniszellen unter $CD4^+$ -T-Zellen; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$

Es folgt die graphische Darstellung der relativen Verteilung (%) der zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}) (Abbildung 9). Zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}) exprimieren auf ihrer Oberfläche sowohl C-C Chemokin Rezeptor Typ 7 (CCR7) als auch „cluster of differentiation“ (CD27) und

spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung einer verstärkten Immunantwort des Organismus nach Pathogenkontakt.

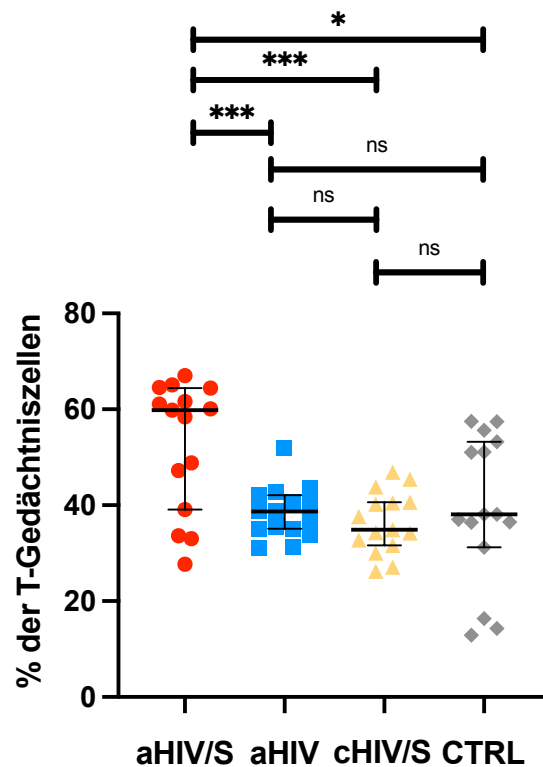


Abbildung 9 prozentualer Anteil der T_{CM} an T-Gedächtniszellen; $CD4^+$ -T-Zellen; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$

Beim ersten Blick auf *Abbildung 9* fällt auf, dass sich in der ersten Kohorte mit Abstand der höchste relative Anteil (%) der zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}) an den gesamten T-Gedächtniszellen fand. Der Median in K1 lag bei 59.8 (39.1-64.4). Zu allen drei weiteren ergab sich ein signifikanter Unterschied auf folgendem Niveau: K1 vs. K2 $p < 0.001$, K1 vs. K3 $p < 0.001$ und K1 vs. K4 $p < 0.05$. Besonders der Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Kohorte war auffallend stark. Die Kohorten zwei bis vier zeigten Werte auf vergleichbarem Niveau. Die Mediane lagen bei: K2= 38.7 (35.1-42.1), K3= 34.9 (31.6-40.6) und K4= 38.1 (31.2-53.2). Hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Kohorte 2 bis 4. Lediglich die hohe Streubreite in Kohorte 4 war noch anzumerken.

4.5 PD-1 Expression auf zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM})

Der programmierte Tod 1 (PD-1) spielt eine entscheidende Rolle bei der Mediation der T-Zellfunktion bei einer HIV-1 Infektion [58]. Daher liegt in dieser Studie ein besonderes

Augenmerk auf die Untersuchung der PD-1 Expression in allen Kohorten. Im Folgenden wird die PD-1 Expression auf zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}) als GMFI (Geometric Mean Fluorescence Intensity) dargestellt.

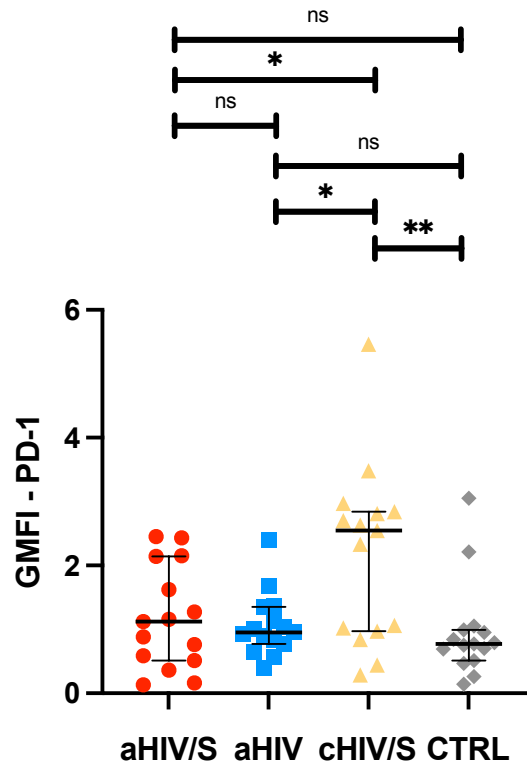


Abbildung 10 GMFI PD-1 T_{CM} ; $CD4^+$ -T-Zellen; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; PD-1, Programmed Death-1; GMFI, Geometric Mean Fluorescence Intensity

Zunächst ein Überblick über die Mediane, welche sich wie folgt verhielten: K1= 1.12 (0.51-2.14), K2= 0.95 (0.77-1.35), K3= 2.55 (0.97-2.84) und K4= 0.77 (0.51-0.99). Bemerkenswert war hier die hohe PD-1 Expression in Kohorte 3 (cHIV/S). Zu allen drei weiteren Kohorten zeigte sich ein signifikanter Unterschied (K3 vs. K1 $p < 0.05$, K3 vs. K2 $p < 0.05$ und K3 vs. K4 $p < 0.01$). In der ersten Kohorte konnte eine leicht erhöhte Expression von PD-1 im Vergleich zu der zweiten und dritten Kohorte festgestellt werden, allerdings nicht signifikant.

4.6 Interferon- γ -Spiegel (IFN- γ) im peripheren Blut

Die Interferon- γ -Spiegel (IFN- γ) wurden mithilfe der SIMOA Technologie im peripheren Blut für alle vier Kohorten bestimmt.

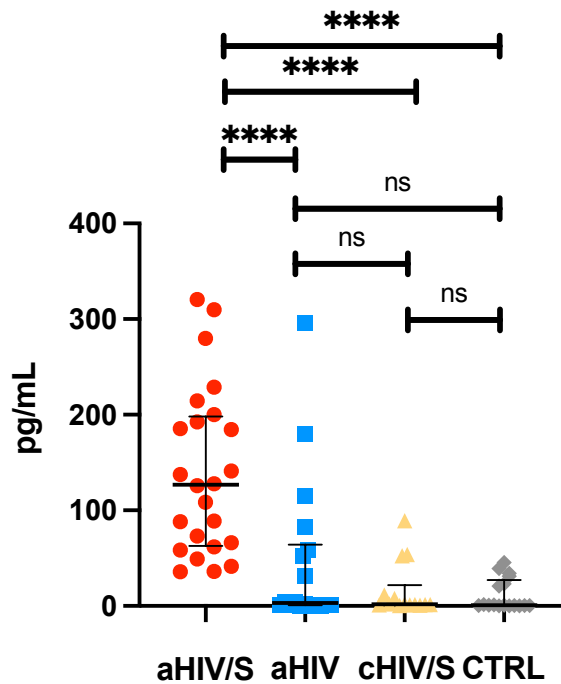


Abbildung 11 Interferon- γ -Spiegel (IFN- γ); K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$, pg/mL, Pikogramm pro Milliliter

In *Abbildung 11* ist deutlich zu erkennen, dass der Interferon- γ -Spiegel in Kohorte 1 stark erhöht war. Von der akut ko-infizierten Kohorte (aHIV/S) hin zu Kohorte 4 (CTRL) fiel der Spiegel sukzessive ab (Mediane: K1= 126.8 (62.96-198.1), K2= 3.11 (0.86-64.22), K3= 1.85 (1.17-21.8), K4= 0.89 (0.45-27.17)). Kohorte 1 (aHIV/S) wies zu allen weiteren Kohorten einen signifikanten Unterschied auf ($p < 0.0001$). Damit zeigte sich ein eindeutiges Bild in Bezug auf Interferon- γ . Alle weiteren Kohorten wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf. In Kohorte 2 (aHIV) zeigten sich vereinzelt starke Ausreißer nach oben.

4.7 Korrelation zwischen Interferon- γ -Spiegel (IFN- γ) und Viruslast (HIV-1 RNA Kopien/mL) in der ersten Kohorte (aHIV/S)

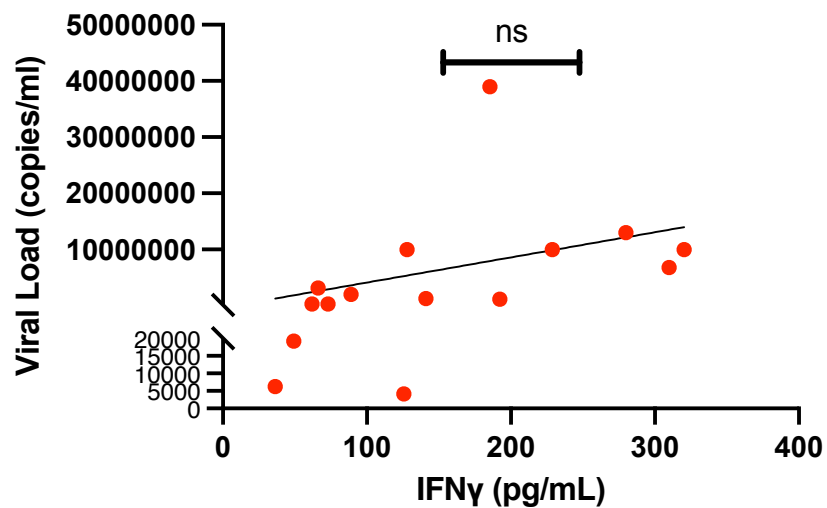


Abbildung 12 Korrelation IFN- γ / Viruslast; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; Interferon- γ , IFN- γ ; pg/mL, Pikogramm pro Milliliter; Viral load (copies/mL), Viruslast in HIV-1 RNA Kopien pro Milliliter

In *Abbildung 12* lässt sich erkennen, dass eine leicht positive Korrelation zwischen Interferon- γ -Spiegel (IFN- γ , pg/mL) und Viruslast (HIV-1 RNA Kopien/mL) herrscht. Je höher die Viruslast desto höher auch der Interferon- γ -Spiegel. Allerdings lag keine signifikante Korrelation vor ($p = 0.1131$).

5 Diskussion

Über den Krankheitsverlauf der Infektionskrankheiten HIV und Syphilis besteht singular betrachtet eine breite wissenschaftliche Erkenntnis. Im Hinblick auf die häufig anzutreffende Ko-Infektion, erscheinen die zellulären Zusammenhänge größtenteils noch unklar.

5.1 Fragen

In unserer Studie wurden folgende Fragestellungen untersucht und wie folgt beantwortet:

1) Zeigen Patienten mit einer akuten HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion niedrigere CD4-Zellzahlen im Vergleich zu Patienten mit einer HIV-Monoinfektion oder zu Patienten mit einer chronischen HIV-Infektion unter antiretroviraler Therapie?

Patienten mit akuter HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion (aHIV/S) zeigten die niedrigste CD4⁺-T-Zellfrequenz und unterschieden sich signifikant von Patienten mit HIV-Monoinfektion sowie von chronisch infizierten Patienten unter ART. Dies spricht für eine verstärkte CD4-Zell-Depletion bei akuter Ko-Infektion.

2) Zeigt sich der Anteil der zentralen T-Gedächtniszellen bei Patienten mit einer akuten HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion vergrößert und ist hierbei eine Erhöhung der PD-1 Expression bei Patienten mit einer akuten und chronischen HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion festzustellen?

Bei aHIV/S-Patienten zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil zentraler T-Gedächtniszellen (T_{CM}). Eine erhöhte PD-1-Expression wurde insbesondere bei chronisch HIV-infizierten Patienten mit Syphilis (cHIV/S) beobachtet; bei aHIV/S bestand lediglich eine nicht signifikante Tendenz.

3) Zeigen Patienten mit einer akuten HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion eine höhere Immunaktivierung (HLA-DR Expression) im Vergleich zu Patienten mit einer HIV-Monoinfektion oder zu Patienten mit einer chronischen HIV-Infektion unter antiretroviraler Therapie?

Patienten mit Syphilis-Ko-Infektion (aHIV/S und cHIV/S) zeigten eine signifikant erhöhte HLA-DR-Expression im Vergleich zu HIV-Monoinfizierten und Kontrollen. Zwischen den beiden ko-infizierten Gruppen (akut versus chronisch) bestand kein signifikanter Unterschied.

4) Ist die Immunaktivierung im Sinne einer Erhöhung des Interferon- γ -Spiegel bei Patienten mit einer akuten HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion gesteigert und zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Viruslast (HIV-1 RNA Kopien/mL) und Interferon- γ -Spiegel?

Patienten mit aHIV/S wiesen signifikant erhöhte Interferon- γ -Spiegel auf. Es zeigte sich eine positive, jedoch nicht statistisch signifikante Korrelation zwischen Interferon- γ -Spiegel und Viruslast.

5.2 Bidirektionale Interaktion zwischen HIV und Syphilis

Die unbehandelte HIV-Infektion zeichnet sich vor allem durch eine rasante Depletion der CD4⁺-T-Zellen (T_{CD4}) aus. Die T_{CD4} stehen im Zentrum des Angriffs des HI-Virus auf das menschliche Immunsystem [59]. Die Bindung des HIV-Protein „Envelope“ (Env) an den T-Zellen Oberflächenrezeptor CD4 stellt den Anfang der Infektionskaskade dar [60].

Da die CD4⁺-T-Zellen eine zentrale und komplexe Rolle in der Regulation der Immunantwort übernehmen, kommt es im Verlauf der Infektion zu diversen und schwerwiegenden Folgen für den Organismus. Durch die Produktion verschiedener Zytokine sowie der Expression von kostimulierenden Liganden, unterstützen sie beispielsweise die angeborene Immunantwort, fördern die Freisetzung von B-Zell-Antikörpern und begrenzen überschießende Immunreaktionen [61]. Die Depletion von CD4 T-Zellen hat tiefgreifende Folgen für die Wirtsabwehr und erhöht die Anfälligkeit für opportunistische Infektionen.

Bislang gibt es jedoch wenige Untersuchungen, die zeigen, dass eine Ko-Infektion mit *Treponema pallidum* (Syphilis) zusätzlich die Population der CD4⁺-T-Zellen (T_{CD4}) schwächt. *Treponema pallidum* Bakterien greifen nicht gezielt T-Zellen an. Eine vice-versa Begünstigung der beiden Infektionskrankheiten ist jedoch sehr naheliegend. Syphilis gehört zu einer Gruppe von Erregern, die genitale Ulzera hervorrufen können, welche die natürliche Hautbarriere stören und die HIV-Übertragung erleichtern. Genitale Ulzera lösen zudem lokale Entzündungsreaktionen aus, die CD4⁺-T-Zellen an den Infektionsort rekrutieren und HIV direkten Zugang zu seinen Zielzellen verschaffen [62, 63]. Die hohe Prävalenz von Syphilis bei Männern, die Sex mit Männern haben (MSM), macht sie zu einem bedeutenden Kofaktor der HIV-Übertragung [64, 65]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CD4⁺-T-Zellzahlen einen stufenweisen Anstieg von Kohorte 1 (aHIV/S) bis Kohorte 4 (CTRL) aufweisen, wobei Kohorte 1 im Vergleich zu allen anderen Kohorten signifikant niedrigere Werte aufwies. Die CD4⁺-T-Zellfrequenz (T_{CD4}) in Prozent (%) anteilig an den Lymphozyten gesamthaft in Kohorte 1 bis 4 betrug im Median: K1 (aHIV/s) = 10,4; K2 (aHIV) = 16,3; K3 (cHIV/S) = 25,1 und K4 (CTRL) = 35,4. Die Signifikanzniveaus verhielten sich wie folgt (P-Werte): aHIV/S – aHIV = 0.0001 (***); aHIV/S - cHIV/S < 0.0001 (****); aHIV/S – CTRL < 0.0001 (****); aHIV - cHIV/S = 0.0013 (**); aHIV – CTRL < 0.0001 (****); cHIV/S - CTRL = 0.0336 (*).

Buchacz et al. demonstrierten in einer Multicenter Studie, dass Patienten mit einer HIV-Infektion, sowohl ohne als auch unter ART, bei einer Syphilisinfektion einen signifikanten Anstieg der HI-Viruslast und einen signifikanten Rückgang der CD4⁺-T-Zellzahl aufzeigen [33]. Nicht nur der Rückgang der CD4⁺-T-Zellen korreliert mit den Ergebnissen dieser Studie, auch die HI-Viruslast (RNA-Kopien/mL) ist in der ersten Kohorte (1.460.000 RNA-Kopien/mL) im Median erhöht im Vergleich zur zweiten Kohorte (949.000 RNA-Kopien/mL). Ein Grund hierfür könnte sein, dass bei einer Ko-Infektion die humane Immunantwort zusätzlich geschwächt wird und der Körper der HIV-Replikation weniger entgegenzusetzen hat.

Rosa et al. korrelierten die CD4-Zellzahlen von ko-infizierten Patienten (HIV/Syphilis) mit den histologischen Befunden der Anzahl der Treponema auf Hautbiopsien, die durch Immunhistochemie nachgewiesen wurden. Es ist anzunehmen, dass Patienten mit einer CD4-Zellzahl von weniger als 250 Zellen/ μ l eine höhere Anzahl von Spirochäten in den histologisch untersuchten Hautbiopsien aufweisen [66]. Dies untermauert die bereits angesprochene bidirektionale Interaktion zwischen HIV und Syphilis.

5.3 Zentrale Gedächtnis-T-Zellen und HIV-Reservoirbildung

Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigte sich in der ersten Kohorte (aHIV/S) der höchste relative Anteil der zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}) an den gesamten T-Gedächtniszellen. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu allen restlichen Kohorten. Die Mediane der relativen Anteile (%) der zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}) an den gesamten T-Gedächtniszellen lagen bei: K1 (aHIV/S) = 59.8; K2 (aHIV) = 38.7; K3 = 34.9 und K4 (CTRL) = 38.1. Die Signifikanzniveaus verhielten sich wie folgt (P-Werte): aHIV/S – aHIV = 0.0007 (***); aHIV/S - cHIV/S = 0.0002 (***); aHIV/S – CTRL = 0.0153 (*); aHIV - cHIV/S = 0.3380 (ns); aHIV – CTRL = 0.8892 (ns); cHIV/S - CTRL = 0.5353 (ns). Besonders zur Gruppe der singular akut HIV-Kohorte war die Signifikanz stark ausgeprägt (P = 0.0007). Bei Kohorte 3 (cHIV/S) konnte eine hohe PD-1 Expression der T_{CM} identifiziert werden. In der ersten Kohorte (aHIV/S) ließ sich eine leicht erhöhte Expression von PD-1 im Vergleich zu der zweiten und dritten Kohorte feststellen, allerdings nicht signifikant.

Somit lässt sich die Annahme nach dem erhöhten Anteil der zentralen T-Gedächtniszellen bei Patienten mit einer akuten HIV-Infektion und gleichzeitiger Syphilis-Ko-Infektion bestätigen. Die PD-1 Expression fällt bei Betrachtung der T_{CM} für die ko-infizierten Kohorten 1 und 3, lediglich für die dritte Kohorte eindeutig erhöht aus. In der ersten Kohorte ließ sich nur eine Tendenz zur gesteigerten PD-1 Expression erkennen.

Tatsächlich beherbergen nicht alle CD4⁺-Gedächtnis-T-Zell-Untergruppen HIV in gleichem Maße in ihrem Genom, und einige haben eine längere Lebensdauer als andere. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, weisen zentrale T-Gedächtniszellen eine höhere Anzahl an replikationskompetenten HI-Viren auf und stellen ein wichtiges HIV-Reservoir dar [41, 42, 67]. Sie besitzen eine lange Halbwertszeit und stechen durch ein hohes Potenzial zu Selbsterneuerung und Homöostase hervor. Whitney et al. beschrieben, dass der Aufbau des Reservoirs bereits 3 Tage nach Transmission beginnen kann [68].

Die Persistenz von HIV in zentralen Gedächtnis-T-Zellen wird durch latente Infektion aufrechterhalten. Das Virus integriert sein genetisches Material in die Wirts-DNA, bleibt jedoch transkriptionsinaktiv und entzieht sich so sowohl der Immunüberwachung als auch der ART. Das Reservoir expandiert durch langsame klonale Proliferation infizierter Zellen [69]. Soriano-Sarabia et al. bestätigten, dass replizierfähiges Virus überwiegend im zentralen Gedächtnis-Kompartiment vorkommt, insbesondere bei Patienten unter langandauernder ART.

Der erhöhte Anteil zentraler Gedächtnis-T-Zellen in Kohorte 1 (aHIV/S) deutet darauf hin, dass eine Syphilis-Ko-Infektion mit einer schnelleren HIV-Reservoirbildung assoziiert sein könnte, insbesondere im Vergleich der beiden akuten HIV-Kohorten. Dies stellt jedoch eine Assoziation dar und keine gesicherte Kausalität; weitere longitudinale Studien sind erforderlich.

Schließlich weist der erhöhte Anteil zentraler Gedächtnis-T-Zellen auf chronische Immunaktivierung hin, die das Risiko einer beschleunigten Immunerschöpfung und möglicherweise ungünstigerer HIV-Verläufe birgt. Der direkte Zusammenhang zwischen erhöhten zentraler Gedächtnis-T-Zellen -Anteilen und klinischer Progression ist jedoch noch unzureichend geklärt [70].

5.4 PD-1-Expression und T-Zell-Erschöpfung

Programmed cell death protein 1 (PD-1) ist ein inhibitorischer Checkpoint-Rezeptor, der an PD-L1 und PD-L2 bindet und T-zellvermittelte Immunantworten dämpft [71]. Die Hauptfunktion dieses hemmenden Weges kann sowohl auf die naiven T-Zellen in einem frühen Aktivierungsstadium in den Lymphknoten als auch auf die pathogenen Effektor-T-Zellen und T-Gedächtniszellen Einfluss nehmen [72].

T-Zellen mit einer gesteigerten PD-1 Expression befinden sich meist in einem Zustand der zellulären Erschöpfung. Die betroffenen Zellen zeigen eine verringerte zelluläre Proliferation gepaart mit einer abgeschwächten zytotoxischen Funktion und Zytokinsekretion [71]. Seung, E., et al. konnte im Tiermodell zeigen, dass durch eine PD-1 Antikörper-Blockade die HI-Viruslast im Blutplasma gesenkt werden konnte [50]. Zudem deuten einige Studien darauf hin, dass die PD-1 Expression auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen positiv mit der HI-Viruslast korreliert und negativ mit der CD4⁺ Zellzahl [49, 71]. Somit kann PD-1 auch als ein Progressionsmarker gesehen werden [73]. Durch eine effektive ART wird die Zahl der PD-1 positiven T-Zellen verringert, jedoch verbleiben sie im Blut trotz längerer Unterdrückung durch ART und können womöglich bei der Entstehung des HIV-Reservoir eine wichtige Rolle spielen [46]. Insbesondere enthalten PD-1 exprimierende CD4⁺-T-Gedächtniszellen mehr provirale HIV-1 DNA als PD-1 arme Zellen [74].

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich signifikant erhöhte PD-1-Expressionen auf CD4⁺ T-Gedächtniszellen in Kohorte 3 (cHIV/S). Dies stimmt mit den Befunden von Macatangay BIC et al. überein [46]. Ohne Vergleichskohorte chronisch HIV-Infizierter unter ART ohne Syphilis, lässt sich jedoch der spezifische Einfluss der Ko-Infektion nicht eindeutig bestimmen.

5.5 HLA-DR-Expression und Immunaktivierung

Die HLA-DR-Expression war in beiden ko-infizierten Kohorten signifikant erhöht im Vergleich zu den nicht ko-infizierten Kohorten.

HLA-DR fällt in die Gruppe der proinflammatorischen Marker. In vielen Studien konnte bei Menschen mit einer HIV-Infektion ein Anstieg der HLA-DR Expression im Rahmen einer Ko-Infektion mit Syphilis nachgewiesen werden [75].

Als MHC-Klasse-2-Zelloberflächenrezeptor lassen sich durch den Nachweis der HLA-DR Expression Rückschlüsse auf den Aktivitätszustand der Zelle ziehen. HLA-DR⁺-CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen weisen eine hohe Frequenz von Aktivierungs- und Erschöpfungsmarkern auf. Zudem wird davon ausgegangen, dass diese Untergruppe von Gedächtnis-T-Zellen trotz erfolgreicher ART-Gabe, eine persistierende Infektion mit HIV zeigen und somit wesentlich

zum HIV-Reservoir beitragen [47]. Lee et al. konnte zeigen, dass im Untersuchungszeitraum von 3 bis <15 Jahren bei Patienten unter ART die Anzahl an HLA-DR⁺-CD4⁺-T-Zellen, welche mit HIV infiziert sind, knapp um ein Fünftel zunahm. HIV-DNA scheint sich sowohl in HLA-DR⁺- als auch in HLA-DR⁻-CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen zu halten, jedoch besonders in HLA-DR⁺-Zellen. Dies könnte womöglich eine größeres HIV-Reservoir bei Patienten mit Syphilis-Ko-Infektion begünstigen.

Lee et al. konnte auch eine gesteigerte Ki67-Expression auf den HLA-DR⁺-CD4⁺-T-Zellen festhalten. Die kombinierten Marker von Ki67/PD-1 waren bei der HLA-DR⁺-T-Zell-Untergruppe im Durchschnitt 19-fach bzw. 22-fach höher exprimiert als bei ihrem HLA-DR negativen Gegenstück. Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Gruppe mit chronischer HIV-Infektion (K3) eine signifikant höhere PD-1 Expression in der Gruppe der zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}) zeigte. PD-1 und HLA-DR könnten sich somit womöglich als wichtige Marker im Bereich der Forschung am HIV-Reservoir erweisen.

In unserer Untersuchung ist hervorzuheben, dass in der ersten Kohorte mit Syphilis-Ko-Infektion ein signifikanter Anstieg der HLA-DR Expression auf CD4⁺-T-Zellen (T_{CD4}) im Vergleich zur Kohorte 2 (aHIV) festzustellen war. Daraus auf eine resultierende Begünstigung bzw. Beschleunigung der Formation von HIV-Reservoir zu schließen, wäre zu voreilig. Wenn man jedoch die Daten von Lee et al. betrachtet, ist die Syphilis-Ko-Infektion als beeinflussender Faktor im Verlauf der Pathogenese zu berücksichtigen.

5.6 Interferon-γ und HIV-Pathogenese

In den Ergebnissen zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Interferon-γ-Spiegel in Kohorte 1 (aHIV/S) gegenüber allen anderen Kohorten. Die Viruslast korrelierte positiv mit dem IFN-γ-Spiegel in Kohorte 1 (aHIV/S), jedoch nicht in einem statistisch signifikanten Maße.

IFN-γ ist ein Typ-II-Interferon mit sowohl antiviralen als auch virusfördernden Effekten abhängig vom Kontext [76]. Es kann HIV-Replikation hemmen, aber auch durch Immunaktivierung Zielzellen anfälliger machen [53, 77]. Chronisch erhöhte IFN-γ-Spiegel können Immunschwächung und Reservoirbildung fördern [53].

Die Rolle von IFN-γ während einer HIV-Infektion ist kontrovers. Sowohl eine Begünstigung als auch eine Restriktion der Replikation sind beschrieben. Eine Restriktion wird durch die Hochregulation Interferon-stimulierter Gene (ISGs) erreicht sowie die Induktion antiviraler Enzyme. Hierbei spielt vor allem der JAK-STAT-Signalweg eine wichtige Rolle. Er stellt einen universellen Signalübertragungsmechanismus von Zelle zu Zelle dar, um die Genexpression durch extrazelluläre Signale wie Zytokine und Wachstumsfaktoren zu regulieren. Dadurch kann eine Beeinflussung und Steuerung von Zellentwicklung, Differenzierung und Immunfunktion

erfolgen [78]. Interferone können die HIV-Übertragung, die akute Virusvermehrung und die Pathogenese einschränken [77].

Unter gewissen Umständen kann es jedoch auch zu einer Begünstigung der Replikation kommen. Die IFN- γ vermittelte Immunaktivierung kann Zielzellen des HIV, insbesondere aktivierte CD4⁺-T-Zellen, vulnerabel für eine Infiltration machen. Zudem kann ein permanenter Anstieg der Typ-II-Interferone wie IFN- γ zu einer chronischen Aktivierung und schlussendlich zur Erschöpfung des Immunsystems führen. Dies würde Ausbildung und Vergrößerung des HIV-Reservoir bevorteilen [53]. Roff et al. beschreibt, dass In-vitro- und Ex-vivo-Studien die Verstärkung der HIV-1-Replikation und den damit verbundenen Erkrankungen belegen.

Die Rolle von IFN- γ bleibt kontrovers in Bezug auf die HIV-Infektion. Sicherlich spielt der Zeitpunkt der Betrachtung und somit das Stadium der Infektion eine wichtige Rolle. Die proinflammatorischen Effekte mit einer konsekutiven Begünstigung der Virusreplikation stehen im Kontrast zur antiviral gedachten Rolle der Typ-I-Interferone. IFN- γ verstärkt somit im Kontext chronischer HIV-Infektion eher die virale Persistenz und Pathogenese als die Virushemmung.

Kritisch zu diskutieren sind folgende Gesichtspunkte dieser Dissertation: Wichtige Einschränkungen sind die kleine Stichprobengröße ($n=60$), Geschlechterhomogenität (überwiegend Männer), fehlende Längsschnittdaten, fehlende Vergleichskohorte chronischer HIV-Infektion ohne Syphilis sowie die Beschränkung auf periphere Blutproben statt Gewebeuntersuchungen. Klinische Korrelationen waren nicht möglich.

Die vorliegenden Ergebnisse der 45 HIV-positiven Patienten und der 15 HIV-negativen Kontrollen stellen umfassende Momentaufnahmen dar. Um eine genaue Aussage über das HIV-Reservoir zu treffen, sollten daher longitudinale Proben sowie Proben aus lymphatischen Organen wie z.B. das terminale Ileum untersucht werden. An dieser Stelle muss jedoch nochmals auf die Seltenheit der untersuchten Blutproben bzw. des Kollektivs mit einer akuten HIV-Infektion in sehr frühen Stadien hingewiesen werden.

5.7 Schlussfolgerungen

Diese Studie zeigt, dass eine Syphilis-Ko-Infektion die HIV-Pathogenese sowohl in akuten als auch chronischen Stadien messbar beeinflusst:

1. CD4⁺-T-Zell-Depletion ist bei Ko-Infektion ausgeprägter; Viruslasten sind erhöht, verbessern sich jedoch nach Syphilisbehandlung.

2. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) sind bei akuter Ko-Infektion angereichert, was auf beschleunigte Reservoirbildung hinweisen könnte.

3. PD-1-Expression auf zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) ist bei chronischer Ko-Infektion erhöht und steht im Einklang mit T-Zell-Erschöpfung und Reservoirpersistenz.

4. HLA-DR-Expression ist bei akuter und chronischer Ko-Infektion erhöht und markiert aktivierte T-Zellen, die zur HIV-Persistenz beitragen.

5. IFN- γ -Spiegel sind bei akuter Ko-Infektion erhöht und spiegeln die komplexe Doppelrolle dieses Zytokins wider.

Diese Ergebnisse unterstützen die Empfehlung eines routinemäßigen Syphilis-Screenings bei PLWH und unterstreichen die Bedeutung einer schnellen Behandlung. Zukünftige Studien sollten größere, longitudinale und diversere Populationen untersuchen sowie Gewebereservoirs einbeziehen, um den Einfluss der Syphilis-Ko-Infektion auf das HIV-Reservoir und klinische Verläufe vollständig zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Gallo, R.C. and L. Montagnier, *The discovery of HIV as the cause of AIDS*. N Engl J Med, 2003. **349**(24): p. 2283-5.
2. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. 1983. Rev Invest Clin, 2004. **56**(2): p. 126-9.
3. UNAIDS, UNAIDS: Fact Sheet. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf, 2022.
4. Swinkels, H.M., et al., *HIV and AIDS*, in StatPearls. 2025: Treasure Island (FL).
5. Trickey, A., et al., *Life expectancy after 2015 of adults with HIV on long-term antiretroviral therapy in Europe and North America: a collaborative analysis of cohort studies*. Lancet HIV, 2023. **10**(5): p. e295-e307.
6. Macneal, R.J. and J.G. Dinulos, *Acute retroviral syndrome*. Dermatol Clin, 2006. **24**(4): p. 431-8, v.
7. Cooper, D.A., et al., *Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion*. Lancet, 1985. **1**(8428): p. 537-40.
8. Fiebig, E.W., et al., *Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection*. AIDS, 2003. **17**(13): p. 1871-9.
9. McMichael, A.J., et al., *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 11-23.
10. Pilcher, C.D., et al., *Brief but efficient: acute HIV infection and the sexual transmission of HIV*. J Infect Dis, 2004. **189**(10): p. 1785-92.
11. Phanuphak, N. and R.M. Gulick, *HIV treatment and prevention 2019: current standards of care*. Curr Opin HIV AIDS, 2020. **15**(1): p. 4-12.
12. Chun, T.W., et al., *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8869-73.
13. Sardo, L., et al., *Editorial: Novel Insights Into a Functional HIV Cure*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 797570.
14. Jansen K, B.V., *Syphilis in Deutschland in den Jahren 2020 – 2022 – Neuer Höchststand von Infektionen nach Rückgang während der COVID-19- Pandemie*. Epidemiologisches Bulletin, 2024. **Epid Bull 2024;7:3-24**.
15. van Kesteren, N.M., H.J. Hospers, and G. Kok, *Sexual risk behavior among HIV-positive men who have sex with men: a literature review*. Patient Educ Couns, 2007. **65**(1): p. 5-20.
16. Talhari, C., et al., *Acquired syphilis: update on clinical, diagnostic and therapeutic aspects(small star, filled)*. An Bras Dermatol, 2025.
17. WHO, *Global HIV, Hepatitis and STIs Programmes (HHS)*, W.F. SHEET, Editor. 2024.
18. Peeling, R.W., et al., *Syphilis*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17073.
19. Schmidt, R., P.J. Carson, and R.J. Jansen, *Resurgence of Syphilis in the United States: An Assessment of Contributing Factors*. Infect Dis (Auckl), 2019. **12**: p. 1178633719883282.
20. Jansen, K., *Syphilis in Deutschland im Jahr 2019 – Neuer Höchststand von Infektionen*. 2020(49): p. 3--13.
21. Jansen K, B.V., *Syphilis in Deutschland in den Jahren 2023 und 2024 – Neuer Höchststand von Infektionen mit verlangsamter Dynamik*. Epidemiologisches Bulletin, 2025. **2025;39:3-26**.
22. Kouznetsov, A.V. and J.C. Prinz, *Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffmann lymph-node biopsy*. Lancet, 2002. **360**(9330): p. 388-9.

23. Ishinaga, M. and E. Sasaki, *Clinical survey of syphilis at the Dermatological Clinic of Nippon Medical School Hospital from 1984 to 1988, with special reference to the recent clinical manifestations and evaluation of IgM antibodies to Treponema pallidum*. J Dermatol, 1990. **17**(10): p. 618-29.
24. Schon, M.P. and H.P. Bertsch, *IMAGES IN CLINICAL MEDICINE. Primary and Secondary Syphilis*. N Engl J Med, 2016. **374**(4): p. 372.
25. Hook, E.W., 3rd, *Syphilis*. Lancet, 2017. **389**(10078): p. 1550-1557.
26. (DAIG), D.A.-G., *Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-1-Infektion*. Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG), 2020. **Version 9**(Version 9).
27. Blut, A., *Treponema pallidum - Stellungnahme des Arbeitskreises Blut*. 2002, Robert Koch-Institut.
28. Salado-Rasmussen, K., *Syphilis and HIV co-infection. Epidemiology, treatment and molecular typing of Treponema pallidum*. Dan Med J, 2015. **62**(12): p. B5176.
29. Zellan, J. and M. Augenbraun, *Syphilis in the HIV-infected patient: an update on epidemiology, diagnosis, and management*. Curr HIV/AIDS Rep, 2004. **1**(3): p. 142-7.
30. Mendez-Lopez, A., et al., *Social and behavioural determinants of syphilis: Modelling based on repeated cross-sectional surveys from 2010 and 2017 among 278,256 men who have sex with men in 31 European countries*. Lancet Reg Health Eur, 2022. **22**: p. 100483.
31. Chan, P., et al., *Effects of syphilis infection among HIV-1-positive individuals on suppressive antiretroviral therapy*. AIDS Res Ther, 2022. **19**(1): p. 69.
32. Kofoed, K., et al., *Syphilis and human immunodeficiency virus (HIV)-1 coinfection: influence on CD4 T-cell count, HIV-1 viral load, and treatment response*. Sex Transm Dis, 2006. **33**(3): p. 143-8.
33. Buchacz, K., et al., *Syphilis increases HIV viral load and decreases CD4 cell counts in HIV-infected patients with new syphilis infections*. AIDS, 2004. **18**(15): p. 2075-9.
34. Kenyon, C., et al., *The immunological response to syphilis differs by HIV status; a prospective observational cohort study*. BMC Infect Dis, 2017. **17**(1): p. 111.
35. Koch, K., et al., *Increased Frequency of CD49b/LAG-3(+) Type 1 Regulatory T Cells in HIV-Infected Individuals*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2015. **31**(12): p. 1238-46.
36. Platten, M., et al., *Cytokine and Chemokine Signature in Elite Versus Viremic Controllers Infected with HIV*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2016. **32**(6): p. 579-87.
37. Ghanem, K.G., et al., *Neurosyphilis in a clinical cohort of HIV-1-infected patients*. AIDS, 2008. **22**(10): p. 1145-51.
38. Rompalo, A.M., et al., *Modification of syphilitic genital ulcer manifestations by coexistent HIV infection*. Sex Transm Dis, 2001. **28**(8): p. 448-54.
39. Tuddenham, S. and K.G. Ghanem, *Emerging trends and persistent challenges in the management of adult syphilis*. BMC Infect Dis, 2015. **15**: p. 351.
40. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. Eur J Immunol, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
41. Soriano-Sarabia, N., et al., *Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4+ T cells*. J Virol, 2014. **88**(24): p. 14070-7.
42. Barton, K., A. Winckelmann, and S. Palmer, *HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy*. Trends Microbiol, 2016. **24**(5): p. 345-355.
43. Chomont, N., et al., *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 893-900.
44. Chamoto, K., M. Al-Habsi, and T. Honjo, *Role of PD-1 in Immunity and Diseases*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017. **410**: p. 75-97.
45. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227-42.
46. Macatangay, B.J.C., et al., *T cells with high PD-1 expression are associated with lower HIV-specific immune responses despite long-term antiretroviral therapy*. AIDS, 2020. **34**(1): p. 15-24.

47. Lee, E., et al., *Memory CD4 + T-Cells Expressing HLA-DR Contribute to HIV Persistence During Prolonged Antiretroviral Therapy*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 2214.
48. Gougeon, M.L., et al., *Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression*. J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3509-20.
49. Brainard, D.M., et al., *Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice*. J Virol, 2009. **83**(14): p. 7305-21.
50. Seung, E., et al., *PD-1 blockade in chronically HIV-1-infected humanized mice suppresses viral loads*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77780.
51. Fromentin, R., et al., *CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART*. PLoS Pathog, 2016. **12**(7): p. e1005761.
52. Wang, Z., H. Shang, and Y. Jiang, *Chemokines and Chemokine Receptors: Accomplices for Human Immunodeficiency Virus Infection and Latency*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1274.
53. Roff, S.R., E.N. Noon-Song, and J.K. Yamamoto, *The Significance of Interferon-gamma in HIV-1 Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis*. Front Immunol, 2014. **4**: p. 498.
54. Johnson, H.M., *Gamma interferon: from antimicrobial activity to immune regulation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 667.
55. Stacey, A.R., et al., *Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3719-33.
56. Soper, A., et al., *Type I Interferon Responses by HIV-1 Infection: Association with Disease Progression and Control*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1823.
57. Sandler, N.G., et al., *Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression*. Nature, 2014. **511**(7511): p. 601-5.
58. Porichis, F. and D.E. Kaufmann, *Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy*. Curr HIV/AIDS Rep, 2012. **9**(1): p. 81-90.
59. Vidya Vijayan, K.K., et al., *Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 580.
60. Wilen, C.B., J.C. Tilton, and R.W. Doms, *HIV: cell binding and entry*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
61. Sanchez-Martinez, A., et al., *Cytotoxic CD4(+) T-cells during HIV infection: Targets or weapons?* J Clin Virol, 2019. **119**: p. 17-23.
62. Ahmed, J., et al., *Genital ulcer disease: A review*. J Family Med Prim Care, 2022. **11**(8): p. 4255-4262.
63. Piot, P. and M. Laga, *Genital ulcers, other sexually transmitted diseases, and the sexual transmission of HIV*. BMJ, 1989. **298**(6674): p. 623-4.
64. Kojima, N. and J.D. Klausner, *An Update on the Global Epidemiology of Syphilis*. Curr Epidemiol Rep, 2018. **5**(1): p. 24-38.
65. Bolan, R.K., et al., *Doxycycline prophylaxis to reduce incident syphilis among HIV-infected men who have sex with men who continue to engage in high-risk sex: a randomized, controlled pilot study*. Sex Transm Dis, 2015. **42**(2): p. 98-103.
66. Rosa, G., et al., *Secondary syphilis in HIV positive individuals: correlation with histopathologic findings, CD4 counts, and quantity of treponemes in microscopic sections*. J Cutan Pathol, 2016. **43**(10): p. 847-51.
67. Brenchley, J.M., et al., *T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis*. J Virol, 2004. **78**(3): p. 1160-8.
68. Whitney, J.B., et al., *Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys*. Nature, 2014. **512**(7512): p. 74-7.

69. Murray, A.J., et al., *The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence*. J Immunol, 2016. **197**(2): p. 407-17.
70. Weintrob, A.C., et al., *Syphilis co-infection does not affect HIV disease progression*. Int J STD AIDS, 2010. **21**(1): p. 57-9.
71. Eichbaum, Q., *PD-1 signaling in HIV and chronic viral infection--potential for therapeutic intervention?* Curr Med Chem, 2011. **18**(26): p. 3971-80.
72. Saresella, M., et al., *The PD-1/PD-L1 pathway in human pathology*. Curr Mol Med, 2012. **12**(3): p. 259-67.
73. Wang, X., et al., *B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection*. Eur J Immunol, 2008. **38**(11): p. 3226-36.
74. McGary, C.S., et al., *CTLA-4(+)PD-1(-) Memory CD4(+) T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques*. Immunity, 2017. **47**(4): p. 776-788 e5.
75. Wu, Y., et al., *Clinical and immunological characteristics of HIV/syphilis co-infected patients following long-term antiretroviral treatment*. Front Public Health, 2023. **11**: p. 1327896.
76. Kak, G., M. Raza, and B.K. Tiwari, *Interferon-gamma (IFN-gamma): Exploring its implications in infectious diseases*. Biomol Concepts, 2018. **9**(1): p. 64-79.
77. Krapp, C., et al., *Guanylate Binding Protein (GBP) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of HIV-1 Infectivity*. Cell Host Microbe, 2016. **19**(4): p. 504-14.
78. Xin, P., et al., *The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases*. Int Immunopharmacol, 2020. **80**: p. 106210.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Fiebig Stadien; Viruslast (Kopien per ml) in Bezug auf Tage nach HIV-1 Transmission [9]	11
Abbildung 2 Syphilis in Deutschland: Anzahl der gemeldeten Fälle nach Geschlecht und Jahr der Diagnose, IfSG-Meldezahlen 2001 – 2024 (n = 135.089) [21].....	13
Abbildung 3 Schön, M. P., & Bertsch, H. P. (2016). IMAGES IN CLINICAL MEDICINE. Primary and Secondary Syphilis. The New England journal of medicine, 374(4), 372. https://doi.org/10.1056/NEJMicm1502476 ; A Ulcus durum Oberlippe; B -D Papulöses Syphilid an Händen und Füßen; reproduced with permission from (scientific reference citation), Copyright Massachusetts Medical Society [24].....	14
Abbildung 4 Gliederung der CD4 ⁺ -T-Gedächtniszellen [40]	17
Abbildung 5 Durchflusszytometrie Gating Strategie; Exemplarisch gezeigt in (A) T-Gedächtniszellpanel mit CM, Zentralgedächtnis-T-Zellen; EM, Effektorgedächtnis-T-Zellen; TM, Übergangsgedächtnis-T-Zellen; (B) Tr1-Zellen; (C) CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen; (D) periphere dendritische Zellen (pDCs)	27
Abbildung 6 Prozentuale Verteilung der CD4 ⁺ -T-Zellen; Kohorte 1 (aHIV/S); Kohorte 2 (aHIV); Kohorte 3 (cHIV/S); Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001..	35
Abbildung 7 GMFI HLA-DR CD4 ⁺ -T-Zellen; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001; GMFI, Geometric Mean Fluorescence Intensity; HLA-DR, Human Leukocyte Antigen - DR-Isotyp	36
Abbildung 8 prozentuale Verteilung T-Gedächtniszellen unter CD4 ⁺ -T-Zellen; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001	37
Abbildung 9 prozentualer Anteil der T _{CM} an T-Gedächtniszellen; CD4 ⁺ -T-Zellen; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001	38
Abbildung 10 GMFI PD-1 T _{CM} ; CD4 ⁺ -T-Zellen; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001; PD-1, Programmed Death-1; GMFI, Geometric Mean Fluorescence Intensity	39
Abbildung 11 Interferon-γ-Spiegel (IFN-γ); K1, Kohorte 1 (aHIV/S); K2, Kohorte 2 (aHIV); K3, Kohorte 3 (cHIV/S); K4, Kohorte 4 (CTRL); ns, nicht signifikant; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001, pg/mL, Pikogramm pro Milliliter	40
Abbildung 12 Korrelation IFN-γ/ Viruslast; K1, Kohorte 1 (aHIV/S); ns, nicht signifikant; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001; Interferon-γ, IFN-γ; pg/mL, Pikogramm pro Milliliter; Viral load (copies/mL), Viruslast in HIV-1 RNA Kopien pro Milliliter	41

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Absorptions- und Emissionsspektren Quelle: Miltenyi Biotec, 09.03.2022,	24
Tabelle 2 Abkürzungen der Signifikanzniveau	28
Tabelle 3 Apparaturen	29
Tabelle 4 Software	29
Tabelle 5 Chemikalien und Medien	30
Tabelle 6 Antikörper Durchflusszytometrie	30
Tabelle 7 Simoa Zytokinmessungen	31
Tabelle 8 Plastikware	31
Tabelle 9 Klinische Charakteristika; IQR, Interquartile range, CD4, Cluster of differentiation 4; mm³, Kubikmillimeter; mL, Milliliter; %, Prozent	34