

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
(Schwerpunkt: Abteilung Innere Medizin III Kardiologie und
Kreislaufkrankungen)

Oberflächenmarkerexpression auf verschiedenen Subtypen
von Monozyten spielen eine Rolle bei der
asymptomatischen Atherosklerose bei Frauen mit HIV

Der Verlust von CXCR4 Expression auf nicht-klassischen
Monozyten ist in Patienten mit HIV mit dem Auftreten einer
Atherosklerose assoziiert

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu
Tübingen

Vorgelegt von

Baas, Livia

2019

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler

2. Berichterstatter: Professor Dr. N. Braun

Tag der Disputation: 21.02.2019

Meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1. Das Humane Immundefizienz-Virus.....	9
1.1.1. Der Infektionsweg des Virus.....	9
1.1.2. Verlauf der HIV-Infektion.....	10
1.1.3. Immunaktivierung im Rahmen der HIV-Infektion.....	11
1.2. Atherosklerose	12
1.2.1. Allgemeines	12
1.2.2. Pathogenese	13
1.2.3. Atherosklerose und die HIV-Infektion.....	14
1.3. Monozyten	16
1.3.1. Heterogenität	16
1.3.2. Oberflächenmarker	18
1.4. Zielsetzung	22
2. Methoden und Material	23
2.1. Studiendesign.....	23
2.2. Intima-Media-Dicke Messung.....	24
2.3. Zellisolierung	24
2.3.1. Isolierung peripherer mononukleärer Zellen	24
2.3.2. Zellzählung und Vitalitätsbestimmung.....	25
2.3.3. Kryokonservierung.....	26
2.3.4. Auftauen konservierter Zellen	26
2.4. Durchflusszytometrie.....	26
2.4.1. Prinzip.....	26
2.4.2. Färbung der Zellen	27
2.4.3. Sortierung der Zellen am Flow Sorter	27
2.4.4. Charakterisierung der Monozyten mittels Durchflusszytometrie	28
2.5. Datenanalyse	28
2.6. Material	29
2.6.1. Technisches Equipment.....	29
2.6.2. Verbrauchsmaterialien	30

2.6.3.	Chemikalien	30
2.6.4.	Puffer und Medien.....	31
2.6.5.	Antikörper.....	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Charakteristika der Studienkohorte	33
3.2.	Qualität der verwendeten Proben.....	38
3.3.	Oberflächenexpression auf Monozyten-Populationen	39
3.3.1.	CX3CR1	39
3.3.2.	CD16.....	39
3.3.3.	CD192	40
3.3.4.	CD14.....	40
3.3.5.	CD163	41
3.3.6.	CD36.....	42
3.3.7.	CD195	42
3.3.8.	CD11b	43
3.3.9.	CXCR4	43
3.4.	Einfluss von HIV und subklinischer Atherosklerose auf die Häufigkeit der Monozyten-Populationen.....	44
3.4.1.	HIV Infektion	44
3.4.2.	Subklinische Atherosklerose	46
3.4.3.	HIV und subklinische Atherosklerose.....	48
3.5.	Einfluss von HIV und subklinischer Atherosklerose auf die Oberflächenexpression einzelner Monozyten-Populationen	50
3.5.1.	HIV Infektion	50
3.5.2.	Subklinische Atherosklerose	52
3.5.3.	HIV und subklinische Atherosklerose.....	54
3.6.	CXCR4-Expression auf nicht-klassischen Monozyten und subklinische Atherosklerose bei HIV	57
3.6.1.	Regressionsanalysen	57
3.6.2.	ViSNE-Darstellung der Daten.....	59
4.	Diskussion	62
4.1.	Oberflächenexpression auf Monozyten-Populationen.....	64
4.2.	Häufigkeit der Monozyten-Populationen bei HIV und subklinischer Atherosklerose	70

4.3. CXCR4 und subklinische Atherosklerose bei HIV-Patienten.....	72
4.4. Limitationen	75
5. Zusammenfassung	76
6. Literaturverzeichnis	78
7. Erklärung zum Eigenanteil der vorliegenden Dissertationsschrift.....	89
8. Danksagungen.....	90

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BMI	Body-Mass-Index
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BP	Blutdruck
CD	Cluster of differentiation
CVD	Cardiovascular disease
CRP	C-reaktives Protein
CR3	Complement receptor 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FKS	Fetales Kälberserum
FCS	Forward scatter
FU	Follow-up
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
HbA1C	Glycated Hemoglobin
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDL	High density lipoprotein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D related
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IMT	Intima media thickness
IQR	Interquartilsabstand
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
Ly6C	Lymphocyte Ag 6C
Mac-1	Macrophage-1 antigen

MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
MEM-NEAA	Minimal Essential Medium – Non-Essential Amino Acids
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MFI	Mean fluorescence intensity
n	Anzahl
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NYHA	New York Heart Association
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SB	Studienbeginn
sCD14	Soluble CD14
sCD163	Soluble CD163
SD	Standard deviation
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SSC	Sideward scatter
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
WHO	World Health Organization
WIHS	Women's Interagency HIV Study

1. Einleitung

1.1. Das Humane Immundefizienz-Virus

Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein lymphotropes Virus, gehörig zur Familie der Retroviren. Unterschieden werden HIV-1 und HIV-2, mit jeweils weiteren verschiedenen Subtypen. Während HIV-1 pandemisch verbreitet ist, tritt HIV-2 primär in Westafrika auf. Die AIDS-Erkrankung, als Folgeerkrankung der fortgeschrittenen Infektion, wurde erstmals 1981 als neu auftretendes Krankheitsbild beschrieben. Im Jahr 1983 gelang die Isolierung des Humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 aus einem Menschen.¹ Untersuchungen lassen vermuten, dass es Anfang des 20. Jahrhunderts zu einem Spezieswechsel vom Affen auf den Menschen kam.

Das Virus wird durch Kontakt mit Blut oder anderen infektiösen Körpersekreten, wie Sperma oder Vaginalsekret, übertragen. Häufigster Übertragungsweg ist der ungeschützte Geschlechtsverkehr.

Nach aktuellen Schätzungen der WHO lebten 2015 weltweit 36,7 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion, worunter etwa die Hälfte Frauen waren. Die Rate der Neuinfektionen lag bei 2,1 Millionen, und im Jahr 2009 kam es zu 1,1 Millionen HIV-bedingten Todesfällen.²

In Deutschland lebten Ende 2014 nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts 83.400 Menschen mit HIV, dabei bleibt die Infektion bislang überwiegend auf wenige Bevölkerungsgruppen beschränkt. Bei diesen Risikogruppen handelt es sich um Männer mit gleichgeschlechtlichen Sexualkontakten (72%), Personen mit Migrationshintergrund aus Hochprävalenzregionen (4,5%) und Personen mit intravenösem Drogenkonsum (7,5%).³

1.1.1. Der Infektionsweg des Virus

Zur Vermehrung benötigt das Retrovirus als Wirtszelle CD4+ T-Helferzellen, jedoch können auch andere Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen infiziert werden. Als Rezeptor dient dem Virus das Oberflächenmolekül CD4, an welches es mit dem Oberflächenprotein gp120

bindet.^{4 5} Weitere Korezeptoren sind an der Bindung beteiligt, hierunter der Chemokinrezeptor CCR5 auf monozytären Zellen und CXCR4 auf T-Zellen.⁶ Das HI-Virus-Genom wird über den Mechanismus der reversen Transkription in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Hierbei erfolgt die Umschreibung viraler einsträngiger RNA in doppelsträngige DNA über das viruseigene Enzym Reverse Transkriptase. Die Integration in das menschliche Erbgut erfolgt über ein weiteres virales Enzym, die Integrase.⁷ Nach Antigenkontakt der infizierten CD4+ T-Zelle kommt es zur Produktion und Freisetzung von Virusproteinen, welche weitere Zellen infizieren.

1.1.2. Verlauf der HIV-Infektion

Da sich in den vergangenen Jahren die Behandlungsmöglichkeiten durch den Einsatz antiretroviraler Kombinationstherapien (cART) deutlich verbessert haben, konnte die durchschnittliche Lebenserwartung HIV-Infizierter wesentlich gesteigert werden.⁸ Der typische Infektionsverlauf, mit dem Auftreten opportunistischer Infektionen, ist mittlerweile nicht mehr primär verantwortlich für die weiterhin reduzierte Lebenserwartung. Vielmehr leiden die Patienten im Langzeitverlauf gehäuft unter kardiovaskulären Erkrankungen, neurokognitiven Defiziten oder malignen Tumorerkrankungen.^{9 10 11}

Der klassische unbehandelte Infektionsverlauf verläuft in mehreren Stadien. Nach einer mehrwöchigen Inkubationszeit kommt es zu einer akuten Infektion mit Fieber, Nachtschweiß und Arthralgien, die einem grippalen Infekt ähnelt. Im Blutbild sind eine starke CD4+-T-Zell-Depletion, sowie eine hohe Plasma-Viruslast nachweisbar. Nach einem Wiederanstieg der Zellen und Abfall der Viruslast folgt eine meist mehrjährige chronische Phase. Eine leichte Lipodystrophie kann hier bereits besonders unter antiretroviraler Therapie auftreten. Durch die kontinuierliche Zerstörung von CD4+-Helferzellen kommt es in der Terminalphase zu einer Schwächung des Immunsystems und dem sogenannten erworbenen Immunschwächesyndrom (engl: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome), welches durch das Auftreten maligner Erkrankungen und opportunistischer Infektionen charakterisiert ist und unbehandelt letal endet.

1.1.3. Immunaktivierung im Rahmen der HIV-Infektion

Nicht nur die langsam entstehende Immunschwäche, sondern ebenso eine als Reaktion auf das Virus entstehende chronische Immunaktivierung stellt ein Problem für die Betroffenen dar. Diese systemische Überaktivierung gilt als zweiter wichtiger Faktor für den Krankheitsfortschritt.¹² Auch unter antiretroviralen Kombinationstherapien ist die anhaltende Immunaktivierung weiterhin mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.¹³

Es wird angenommen, dass die chronische Immunaktivierung als treibende Kraft der fortschreitenden CD4+-T-Zell-Depletion eine wichtige Rolle im Verlauf der Infektion spielt. Klinische Untersuchungen und das Auftreten von Lymphadenopathien bei HIV-Infizierten gaben erste Hinweise auf dieses Phänomen. Auch Untersuchungen des Blutbildes zeigten erhöhte Spiegel von Aktivations- (CD38, HLA-DR) sowie Proliferationsmarkern (Ki-67) auf peripheren CD4+ und CD8+ T-Zellen und eine Assoziation dieser mit sinkenden CD4+ T-Zell-Zahlen.¹⁴

Es wird vermutet, dass unterschiedliche Mechanismen bei der chronisch gesteigerten Immunantwort mitwirken. Die offensichtlichste Ursache scheint die direkte Immunantwort auf das Virus und seine Antigene zu sein, sie erklärt jedoch nicht vollständig, dass die Anzahl aktivierter T-Zellen die Zahl der tatsächlich infizierten Zellen bei weitem überschreitet.¹⁵ Auffällig ist außerdem, dass auch bei Patienten unter antiretroviraler Therapie und ohne nachweisbare Viruslast die Entzündungsmarker signifikant erhöht sind.¹⁶

Als weiterer wichtiger Faktor gilt eine früh auftretende Störung der intestinalen Barrierefunktion, wobei die Translokation von mikrobiellen Produkten, wie Lipopolysacchariden, in die Blutzirkulation inflammatorisch wirkt.¹⁷ Eine Assoziation zwischen hohen Spiegeln von Lipopolysacchariden (LPS) und der HIV-Infektion konnte nachgewiesen werden, der genaue Beitrag der mikrobiellen Translokation zur chronischen Immunaktivierung bleibt jedoch bislang unklar.¹⁸

Eine besonders wichtige Rolle spielt die chronische Inflammation bei der frühen Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, da der andauernde Entzündungszustand zu Schäden an den Gefäßwänden führen kann.

Der andauernde Entzündungszustand ist gekennzeichnet durch die erhöhte Aktivität und folglich verkürzte Lebensdauer von T-Zellen und Monozyten, sowie durch eine polyklonale B-Zellaktivierung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Ein Nachweis dieser Marker kann deshalb als wichtiger Parameter für die Aktivität und Progression der Krankheit eingesetzt werden.

1.2. Atherosklerose

1.2.1. Allgemeines

Die atherosklerotische Läsion und ihre Folgeerkrankungen stellen eine der Haupttodesursachen in den Industrienationen dar. Dies lässt sich unter anderem belegen durch die Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes, wonach 2014 338.056 Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen verstarben, was mit 39% aller Todesfälle die Haupttodesursache der Bundesrepublik Deutschland ausmachte. Vor allem Durchblutungsstörungen und akute Myokardinfarkte zeigten sich als führende Todesursache.¹⁹

Der Pathogenese der Atherosklerose liegt neben anderen Faktoren ein chronisch entzündlicher Prozess, an dem immunkompetente Zellen wie T-Zellen, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen beteiligt sind, zugrunde. Die Klärung der Bedeutung einzelner Zellpopulationen für die Läsionsentwicklung stellt ein aktuelles Ziel der Forschung dar.

Die Atherosklerose ist eine Systemerkrankung der Gefäße, sie entwickelt sich langsam und zeigt sich zu Beginn meist symptomlos in Form einer subklinischen Atherosklerose. Charakteristisch für die fortschreitende Veränderung der Gefäßwand ist die Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque im Gefäßlumen. Diese Plaque ist gekennzeichnet durch einen nekrotischen Kern, kalzifizierte Regionen, modifizierte Lipide, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Leukozyten und Schaumzellen.²⁰

Dieser sekundär degenerative Prozess führt zur Verhärtung und Verdickung der Gefäßwände, Abnahme der Elastizität und somit zu einer Einengung des Gefäßlumens und dem Auftreten kardiovaskulärer Beschwerden.

Folgerscheinungen stellen Thrombosen, koronare Herzerkrankungen mit Angina pectoris, akute Myokardinfarkte oder Schlaganfälle dar.

1.2.2. Pathogenese

Die Pathogenese der Atherosklerose ist nicht vollständig geklärt, jedoch spielen Monozyten eine zentrale Rolle bei ihrer Entstehung und Progredienz. Ausgegangen wird aktuell von einer "endothelialen Dysfunktion", die zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand für Plasmabestandteile, aber auch für Blutzellen führt.²⁰ Beteiligt an der Entwicklung dieser Endothelläsion können mechanische, immunologische oder auch biochemische Prozesse sein. Im weiteren Verlauf adhären Monozyten über bestimmte Adhäsionsmoleküle, wie P- und E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, an Endothelzellen und migrieren in die Intima der Gefäßwand.²¹ Die Monozytenmigration benötigt bestimmte Chemokinrezeptoren wie CCR2, CX3CR1 und CCR5, sowie Adhärenz an das Endothel über das beta 2 Integrin Mac-1.^{22 23 24} Diese Rezeptoren zeigen unterschiedliche Expression auf Monozyten-Populationen.²⁵ In der Gefäßwand differenzieren sie sich zu dendritischen Zellen und Makrophagen und sezernieren proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche an der weiteren Rekrutierung von Immunzellen beteiligt sind und die Progression der atherosklerotischen Läsion vorantreiben.²⁶ Makrophagen und Endothelzellen bilden in der Gefäßwand freie aggressive Sauerstoffradikale, welche sich an der Bildung einer chemisch modifizierten Form des Low Density Lipoproteins beteiligen.²⁷ Dieses oxidierte LDL (oxLDL) spielt eine essentielle Rolle für die Atherosklerose und führt nach Aufnahme durch Makrophagen über Scavenger-Rezeptoren zur Umwandlung dieser zu lipidgefüllten Schaumzellen.^{28 29} Nach Einwanderung glatter Muskelzellen in die Intima und der Produktion von extrazellulärer Matrix, kommt es zur Ausbildung des atherosklerotischen Plaques mit einem Lipidkern aus abgestorbenen

Schaumzellen, sowie umhüllenden Bindegewebes.^{20 30} Makroskopisch zeigen sich sogenannte "fatty streaks".

Die Ruptur des Plaques führt dann im Verlauf zur Aktivierung des Blutgerinnungssystems und Thrombusbildung.³¹ Durch die hierdurch entstehende Verringerung des Gefäßdurchmessers oder Ablösung des Thrombus kommt es zur typischen Symptomatik der Angina pectoris oder des akuten Myokardinfarkts bzw. eines Schlaganfalles.

1.2.3. Atherosklerose und die HIV-Infektion

Während bei den durch die HIV-Infektion entstehenden direkten Folgen, wie der Immunschwäche und AIDS, aufgrund antiretroviraler Therapie deutliche Fortschritte in den Behandlungsmöglichkeiten und der Prognose erzielt werden konnten, entziehen sich kardiovaskuläre Erkrankungen bislang den therapeutischen Optionen und spielen infolgedessen eine zunehmend wichtige Rolle als Todesursache im Verlauf der Infektion.^{32 10}

HIV-Patienten besitzen ein 1,5 bis 2-fach erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen,^{33 34} und die HIV-Infektion ist assoziiert mit höheren Raten an akuten Myokardinfarkten, Restenosen und Atherosklerose.^{35 36 37} Zahlreiche Studien zeigen bei HIV-Patienten eine positive Korrelation zwischen Messungen der Intima-Media-Dicke als Parameter für die Erfassung einer subklinischen Atherosklerose und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen.³⁸ Ebenso konnte bei HIV-positiven Patienten eine erhöhte Intima-Media-Dicke und eine schnellere Progression der subklinischen Atherosklerose im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe demonstriert werden.^{37 39} Es ist nicht vollständig bekannt, welche Mechanismen für dieses erhöhte Risiko bei HIV-Patienten verantwortlich sind, und inwieweit diese Mechanismen auch für die Pathogenese nicht HIV-infizierter Personen Gültigkeit besitzen.

Grundsätzlich werden vor allem sekundäre metabolische Störungen im Rahmen antiretroviraler Therapien für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse verantwortlich gemacht. Der Einsatz von Proteaseinhibitoren bei HIV-Patienten

und damit verbundene Lipidstörungen können zu einer frühzeitigen Entwicklung der Atherosklerose beitragen, erklären diese jedoch nicht vollständig.⁴⁰

Gleichzeitig ist in den letzten 20 Jahren das mittlere Alter HIV-Erkrankter und deren Lebenserwartung drastisch gestiegen. Zwischen 1990 und 2010 gesammelte Daten der Swiss HIV Cohort Study zeigten einen Anstieg der über 50-Jährigen von 5% auf knapp über 30%.¹¹

Mit steigender Lebenserwartung steigt auch die Rate altersbedingter Nebenerkrankungen. Von diesen Nebenerkrankungen sind ebenso zahlreiche mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert, darunter Diabetes mellitus Typ 2, Hypertonie und chronische Nierenerkrankungen.⁴¹ Relevant scheint ebenfalls die größere Prävalenz traditioneller kardiovaskulärer Risikofaktoren bei HIV-Risikokollektiven, darunter Rauchen und Dyslipidämie.³⁴

Zusätzlich zur HIV-Infektion an sich wird vermutet, dass das Vorkommen weiterer chronischer Infektionen zu dem erhöhten Risiko für Gefäßschäden signifikant beiträgt.^{42 43} Insbesondere die Infektion mit Hepatitis C wurde in einer Kohorte HIV-positiver Studienteilnehmer mit dem Auftreten atherosklerotischer Plaques, Schlaganfällen und akuten Myokardinfarkten in Verbindung gebracht,^{44 45} andere Studien fanden jedoch keinen solchen Zusammenhang.⁴⁶ Auch eine Infektion mit dem Cytomegalovirus scheint Auswirkungen auf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen bei HIV-Infizierten zu haben.⁴⁷

Mehrere Studien unterstützen die Vermutung, dass auch der Zeitpunkt des Beginns der antiretroviralen Therapie entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der chronischen Inflammation hat.⁴⁸ So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Behandlungsbeginn im akuten Anfangsstadium und höheren CD4+ Zellzahlen, im Vergleich zu fortgeschrittenen Stadien der Infektion, deutlich niedrigere Raten an Entzündungsmarkern und immunologischen Komplikationen aufzeigten, auch wenn beide Kohorten insgesamt eine effektive Kontrolle der Viruslast erreichten.^{49 50 51}

1.3. Monozyten

1.3.1. Heterogenität

Periphere Monozyten machen 10% der im Blut zirkulierenden Leukozyten aus und bilden Vorläuferzellen der Makrophagen und eines Teils der dendritischen Zellen. Als Zellen der Immunabwehr bestehen ihre wichtigsten Aufgaben in der Phagozytose körperfremder Bestandteile und der Antigenpräsentation.⁵² Die Einwanderung von Monozyten in das Gewebe bei inflammatorischen Prozessen wird ermöglicht durch unterschiedliche Oberflächenrezeptoren wie CCR2 oder CX3CR1.⁵³

Eine phänotypische Heterogenität der Monozyten-Populationen wurde erstmals 1989 beschrieben.⁵⁴ Die initiale Differenzierung fand aufgrund der unterschiedlichen Expression des LPS-Rezeptors CD14 und des Immunglobulin Rezeptors FcγRIII CD16 statt. Die Mehrzahl der Monozyten wurde als Population klassifiziert, welche kein CD16 exprimiert (CD14++CD16-Monozyten), und der Rest von rund 7-15% als CD16-positive Monozyten.⁵⁴

Der vermehrte Nachweis CD16-positiver Monozyten bei inflammatorischen Erkrankungen führte zu deren Einordnung als proinflammatorische Monozyten.⁵⁵ Die pathologisch relevante Bedeutung dieser proinflammatorischen Monozyten wurde durch deren erhöhten Nachweis bei Krankheitsbildern wie Sepsis, Erysipel, Hämolytisch-urämisches Syndrom, HIV-Infektion, koronare Herzkrankheit, rheumatoide Arthritis oder Sjögren-Syndrom verdeutlicht.^{56 57 58 59 60 61 62} Funktionell zeigen CD16-positive Monozyten höhere Produktionsraten an TNF-alpha und Interleukin-12 sowie niedrigere Produktionsraten des anti-inflammatorischen Signalstoffes Interleukin-10.^{63 64} Durch erhöhte Expression von HLA-DR wurde in mehreren Studien CD16-positiven Monozyten eine verbesserte Fähigkeit zur Antigenpräsentation zugesprochen.⁵⁴

Nach aktuellem Forschungsstand werden auch im Mausmodell zwei Monozyten-Populationen unterschieden, hier jedoch anhand ihrer Expression von Ly6C. Ly6C^{hi} Monozyten zeigen das Expressionsmuster CX3CR1^{lo} CCR2^{hi}. Sie werden bevorzugt in inflammatorischen Geweben angetroffen und

deswegen als "inflammatorische" Monozyten bezeichnet⁶⁵ und sind den humanen CD14+ Monozyten äquivalent. Ly6C^{lo} CCR2^{neg} CX3CR1^{hi} Monozyten überwachen im nicht-entzündlichen Zustand Blutgefäße, besitzen eine längere Überlebensdauer und werden auch "patrouillierende" Monozyten genannt.⁶⁶ Dieser Population entspricht die humane CD16-positive Untergruppe.⁶⁷ Auch wenn Genexpressionsanalysen eine enge Verwandtschaft der Populationen vermuten lassen,⁶⁸ ist die Übertragbarkeit der Daten auf menschliche Monozyten-Populationen umstritten.

Im Jahre 2003 wurden erstmals drei unterschiedliche humane Monozyten-Populationen beschrieben.⁶⁹ Die CD16-positiven Monozyten wurden anhand der Stärke ihrer CD14-Expression weiter unterteilt und im Jahre 2010 folgende offizielle Nomenklatur eingeführt:

Klassische CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten

Intermediäre CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten

Nicht-klassische CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten⁷⁰

Die gemeinsamen funktionellen Charakteristika der intermediären Population mit den anderen beiden Populationen lassen vermuten, dass klassische Monozyten im Knochenmark reifen und aus ihnen intermediäre und nicht-klassische Monozyten hervorgehen.^{70 71 72}

Nicht-klassische Monozyten scheinen als patrouillierende Subgruppe eine besondere Affinität für Gefäßwände aufzuweisen, in atherosklerotische Läsionen einzuwandern und CX3CR1 zu exprimieren, während klassische Monozyten insbesondere über CCR2 mit CCL2 interagieren.^{72 69}

Besonders der intermediären Gruppe wird eine proinflammatorische Rolle zugesprochen. Intermediäre Monozyten zeigen einen überlappenden Phänotyp und als herausragendes Merkmal hohe Expressionsraten von CCR5 und HLA-DR und spielen hiermit eventuell eine besondere Rolle bei der Antigenpräsentation.^{73 74 25} Ein Anstieg dieser Population konnte bei mehreren Erkrankungen beobachtet werden,^{73 58} und in epidemiologischen Studien wurde eine Assoziation zwischen intermediären Monozyten und kardiovaskulären

Endpunkten (z.B. akuter Myokardinfarkt, kardiovaskulär bedingter Tod) gefunden.⁷⁵

In Bezug auf die präferentielle Zytokinproduktion wurde in der Literatur keine Übereinstimmung gefunden. Während einige Studien besonders der intermediären Population eine hohe Produktionsrate an TNF-alpha, Interleukin-1 β und Interleukin 6 zusprechen,^{63 73 58} zeigten Wong et al. die höchste Produktion von TNF-alpha und Interleukin-1 β nach Stimulation mit Lipopolysacchariden durch nicht-klassische Monozyten⁷² und keinerlei Unterschiede bei der Produktion von Interleukin 6 und Interleukin 8. Ebenso zeigten Studien zu Interleukin 10 keine konsistenten Daten.^{76 72}

Monozyten können durch unterschiedliche Viren infiziert werden, hierunter auch HIV und HCV. Jedoch scheinen vorzugsweise CD16-positive Monozyten, aufgrund ihrer höheren CCR5- und CD4-Expression, mit dem HI-Virus infiziert zu werden.⁷⁷

Zahlreiche Studien lassen auch eine wichtige Rolle der Monozyten für das rasche Fortschreiten atherosklerotischer Gefäßschäden HIV-positiver Patienten vermuten. Von der Formation früher atherosklerotischer Läsionen, bis hin zur Plaqueruptur sind sie entscheidend an der Atheroprogression beteiligt.⁷⁸ Lösliches CD14 (sCD14) und CD163 (sCD163), welche beide als Monozytenaktivationsmarker gelten, und CCL2, ein auf Monozyten chemotaktisch wirkendes Zytokin, wurden mit subklinischer Atherosklerose und der Gesamtmortalität in Verbindung gebracht.^{79 80 81 82 83} Diese Korrelation ist unabhängig vom Gebrauch von Proteaseinhibitoren.

1.3.2. Oberflächenmarker

Mehreren verschiedenen Oberflächenmarkern auf Monozyten werden unterschiedliche Funktionen zugeordnet. In unserer Kohorte untersuchten wir das Expressionsmuster folgender Oberflächenmarker.

CCR2

CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) oder CD192 (cluster of differentiation 192) ist ein Chemokinrezeptor, der auf dem CCR2 Gen kodiert wird.

Hauptligand des Rezeptors ist CCL2, auch MCP1 (monocyte chemotactic protein-1) genannt. Dieses Chemokin rekrutiert Monozyten an den Ort aktiver Entzündungen und wird von einer Vielzahl von Zellen gebildet. Hauptproduktionsort stellen jedoch Makrophagen und Monozyten dar.⁸⁴

CX3CR1

CX3CR1 wurde vor allem auf NK-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen, T-Zellen, sowie Mikrogliazellen und Astrozyten nachgewiesen. Der Rezeptor interagiert vorzugsweise mit dem Chemokin CX3CL1 und ist für die Adhäsion und Migration von Leukozyten in das Gewebe verantwortlich. Zusätzlich agiert CX3CR1 als Korezeptor für HIV.⁸⁵

CD11b

CD11b (Integrin α -M) bildet zusammen mit CD18 den heterodimeren Komplementrezeptor 3 (CR3) oder Macrophage-1 Antigen (Mac-1) der β -2 Integrin-Familie. Der Rezeptor vermittelt die Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten an ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1).⁸⁶ Die konstitutionelle Expression von CD11b ist gering, kann jedoch bei Aktivierung schnell ansteigen und gilt somit als Aktivierungsmarker von Leukozyten.

CD163

CD163 ist ein Scavenger-Rezeptor, der vor allem von Zellen monozytärer Abstammung exprimiert wird. Frisch isolierte Monozyten zeigen zunächst eine geringe CD163-Expression, die jedoch mit deren Differenzierung zu Makrophagen ansteigt. Das Oberflächenantigen kann deshalb als diagnostischer Marker zur Überwachung der Makrophagenaktivierung eingesetzt werden.⁸⁷ Hohe Expressionsraten lassen sich vor allem in Heilungsphasen akuter und chronischer Entzündung finden. Eine lösliche Form des Rezeptors (sCD163) existiert im Plasma und ist insbesondere im Rahmen entzündlicher Erkrankungen erhöht.⁸⁸

CD184

CD184, auch CXCR4 oder SDF-1-Rezeptor genannt, wird durch das Chemokin CXCL12/SDF-1 und das Zytokin MIF (Makrophagen- Migrations- Inhibitions-Faktor) stimuliert. Der Chemokinrezeptor ist weit verbreitet auf Zellen des blutbildenden Systems wie Monozyten, Granulozyten oder Lymphozyten, wird aber auch von Endothelzellen und besonders Stammeszellen und Tumorzellen exprimiert. Der Oberflächenrezeptor spielt eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung von Stammes- und Progenitorzellen und deren Mobilisierung in das periphere Blut, sowie bei deren Verankerung im Knochenmark.⁸⁹ Neben der Organogenese ist die CXCR4/CXCL12-Achse außerdem an der Reparatur von Organschäden beteiligt.⁹⁰ Zusätzlich dient CXCR4 als wichtiger Korezeptor für das HI-Virus. Durch die Hemmung mit dem körpereigenen Agonisten SDF-1 konnte der Rückgang der Replikation des Virus gezeigt werden.^{6 91 92} Orte mit hoher SDF-1-Expression, wie Leber, Lunge und Knochenmark, zeigen sich als Orte mit hoher Metastasierungsrate, da Tumorzellen hohe CXCR4 Expressionsraten zeigen und bevorzugt in genannte Organe migrieren.

CD195

CD195, auch CCR5 genannt, ist ein Chemokinrezeptor, der beispielsweise auf T-Zellen, Makrophagen oder NK-Zellen exprimiert wird. Seine Liganden sind mitunter CCL3, CCL4, CCL5 und CCL8. Der Rezeptor ist beteiligt an der Chemotaxis von Leukozyten. CCR5 hat sich als wichtigster Korezeptor für HIV-1 herausgestellt, durch Kotransfektion von CD4 und CCR5 gelang es 1996 erstmals nicht humane Zellen mit HIV zu infizieren.⁶ Eine im selben Jahr entdeckte CCR5-Genmutation zeigte, dass betroffene homozygote Träger weitgehend vor einer HIV-Infektion geschützt sind.⁹³ Heterozygote Träger besitzen eine partielle Resistenz und zeigen ein verlangsamtes Fortschreiten der HIV Infektion.⁹³

CD36

CD36 wird nahezu ubiquitär exprimiert, vor allem aber auf Zellen der myeloischen Reihe wie Monozyten, Makrophagen, Erythroblasten und

Thrombozyten. Aber auch Adipozyten, mikrovaskuläre Endothelzellen oder glatte Muskelzellen können das Oberflächenmolekül tragen. Der Rezeptor zeichnet sich durch sein breites Ligandenspektrum von freien Fettsäuren, Thrombospondin, Phospholipiden, über native Lipoproteine, bis hin zu modifizierten Lipoproteinen aus. Die Vielfalt der Funktionen ist abhängig vom Zelltyp. Neben dem Transport langkettiger Fettsäuren dient CD36 auch als Adhäsionsmolekül oder als Scavenger-Rezeptor der Klasse B. Die Familie der Scavenger-Rezeptoren ist in der Lage, oxidiertes LDL, anionische Lipide und abgestorbene Zellen zu binden. Eine besondere Rolle wird CD36 bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques zugesprochen.⁹⁴ In atherosklerotischen Läsionen nehmen Makrophagen, die CD36 exprimieren, oxidiertes LDL auf, entwickeln sich zu Schaumzellen und sezernieren weitere proinflammatorische Zytokine, die das Geschehen vorantreiben.

1.4. Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll die folgende Fragestellung bearbeitet werden. Obwohl unterschiedliche Monozyten-Populationen einen spezifischen Beitrag zu der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD) zu leisten scheinen,⁹⁵ wurde die Heterogenität von Monozyten bei HIV-Erkrankten im Frühstadium und deren Einfluss auf das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen bislang nur unzureichend untersucht. Es ist von hoher klinischer Relevanz, immunologische Mechanismen zu identifizieren, die zur Entwicklung von subklinischer Atherosklerose bei HIV-Patienten beitragen, und diese anschließend in ein intensiviertes Früherkennungsprogramm für kardiovaskuläre Erkrankungen zu integrieren. Es stellt sich deshalb die Frage, ob es Unterschiede in der Verteilung klassischer, intermediärer und nicht-klassischer Monozyten bei HIV-Patientinnen mit asymptomatischer Atherosklerose gibt. Infolgedessen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die HIV-Erkrankung und subklinische Atherosklerose im Zusammenhang mit der Oberflächenmarkerexpression der einzelnen Monozyten-Populationen stehen, insbesondere auch, ob diese unabhängig von etablierten traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren sind und daher möglicherweise als neue Biomarker dienen können.

2. Methoden und Material

2.1. Studiendesign

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit der Women's Interagency HIV Study (WIHS) erstellt. Die Women's Interagency HIV Study wurde 1993 gegründet, um den Verlauf und das Voranschreiten der HIV-Erkrankung bei Frauen zu untersuchen. Insgesamt wurden über 4000 Frauen, sowohl HIV-positive als auch HIV-negative, seit Beginn der Studie in zwei Einschlussphasen (1994-1995 und 2001-2002) rekrutiert und in 10 Studienzentren über die USA verteilt nachverfolgt. Verlaufsuntersuchungen finden in regelmäßigen Intervallen von 6 Monaten statt und beinhalten standardisierte körperliche Untersuchungen, Probenentnahmen, sowie ausführliche Interviews zum allgemeinem Gesundheitszustand, zu Vor- und Nebenerkrankungen, Medikamenteneinnahme und kardiovaskulären Risikofaktoren. Im April 2004 wurde eine Substudie initiiert, die zusätzlich in einem Intervall von 2-3 Jahren Zeichen subklinischer Atherosklerose mit Hilfe von Intima-Media-Dicke Messungen sonographisch erfasst. Ausschlusskriterium für diese Substudie war eine positive Anamnese für koronare Herzerkrankung.

Proben und Daten von 92 Patientinnen des WIHS-Kollektivs wurden für die vorliegende Studie verwendet und anhand ihres HIV-Status und kardiovaskulären Profils in vier Gruppen stratifiziert:

HIV+/CVD+ (n=23)

HIV+/CVD- (n=23)

HIV-/CVD+ (n=23)

HIV-/CVD- (n=23)

Alle Gruppen wurden entsprechend Alter (+/- 5 Jahre), ethnischer Zugehörigkeit (Afroamerikaner/ Hispanoamerikaner vs. andere) und Raucherstatus (jemals vs. niemals) randomisiert. Alle 92 Teilnehmerinnen hatten einen duplexsonographischen Befund der Arteria carotis communis erhalten, waren jedoch frei von symptomatischen Gefäßerkrankungen. Die Patientengruppen

hatten vergleichbare sozioökonomische und demographische Daten, und jeder Studienteilnehmer erteilte seine Einverständniserklärung. Eine Genehmigung für die Durchführung der Studie lag seitens des jeweils zuständigen *Institutional Review Board (IRB)* vor (US-Analogon zur Ethikkommission IRB # 04-04-096E).

2.2. Intima-Media-Dicke Messung

Atherosklerotische Gefäßwandveränderungen lassen sich mit Intima-Media-Dicke Bestimmungen (IMD, IMT=Intima media thickness) frühzeitig erkennen. Mittels hochauflösender Sonographie wird hierbei die Arteria carotis communis exemplarisch dargestellt.

Gefäßwandveränderungen, wie Plaques, können sicher dargestellt, sowie Frühzeichen einer subklinischen Atherosklerose erfasst werden. Hierbei gilt eine Wanddicke der Intima ab 1,00 mm als pathologisch, und Werte über der 75. Perzentile gelten als verdächtig. Die Normwerte sind geschlechts-, sowie altersabhängig, Vorteile dieser Methode sind ihre weite und schnelle Verfügbarkeit, ihr nichtinvasives Vorgehen und die Risikofreiheit.

Im Rahmen der WHS wurde die Intima-Media-Dicke bei Visit 20-22 zwischen 2007 und 2012 und im Follow-up alle 2-3 Jahre bis 2014 erhoben. Mittels hochauflösendem B-Mode Ultraschall wurden 6 Abschnitte der rechten Arteria carotis communis dargestellt und die Intima-Media-Dicke bestimmt, wie in vorherigen Studien beschrieben.⁹⁶ Als Grenzwert für eine pathologische Verdickung galt eine IMT >1,5 mm in einem der gemessenen Abschnitte. In allen Studienzentren wurden standardisierte Protokolle für die Durchführung der sonographischen Untersuchung verwendet, und alle Auswertungen wurden in einem zentralisierten Lesezentrum (University of Southern California) vorgenommen.

2.3. Zellisolierung

2.3.1. Isolierung peripherer mononukleärer Zellen

Periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) lassen sich aufgrund unterschiedlicher Dichtegradienten von anderen Blutbestandteilen separieren.

Als Trennlösung wird ein synthetisches Polymer aus Saccharose (Ficoll-Paque™ PREMIUM, GE Healthcare) verwendet. Ficoll weist eine spezifische Dichte von 1,007 g/ml auf und damit eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, aber eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten.

Die benötigten PBMCs der WIHS-Kohorte wurden bereits im Vorfeld in den jeweiligen Studienzentren kryokonserviert. Für die Voruntersuchungen am La Jolla Institute for Allergy and Immunology wurde wie folgt vorgegangen:

Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank durchgeführt. Zur Gewinnung der PBMCs wurde 10 ml Vollblut mit 10 ml PBS 1:1 verdünnt. Das verdünnte Blut wurde vorsichtig über 15 ml Ficoll-Lösung in einem SepMate™ 50 Röhrchen geschichtet. Diese speziellen Zentrifugenröhrchen erlauben eine sichere und schnelle Isolierung mononukleärer Zellen und verhindern die vorzeitige Vermischung der unterschiedlich dichten Phasen. Anschließend wurde bei 1200 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert, sodass sich Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und tote Zellen am Boden des Röhrchens sammeln, während PBMCs in der gut sichtbaren Interphase, zwischen Trennlösung und Plasma, zu finden sind. Alle darauffolgenden Schritte wurden bei 4° Celsius auf Eis durchgeführt, sowie folgende Zentrifugationsschritte für 5 Minuten bei 500 g und 4° Celsius. Die obere Schicht, welche die angereicherten PBMCs beinhaltet, wurde zügig in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen geschüttet und zweimalig mit 15 ml PBS + 2% FKS gewaschen.

2.3.2. Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden die Zellen ein weiteres Mal mit 5 ml PBS + 2% FKS verdünnt und 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl 0,4% Trypanblau (Thermo Fisher Scientific) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde die Zellkonzentration von 10 µl der Zellsuspension mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Lebende Zellen nehmen die Substanz nicht auf, während abgestorbene und perforierte Zellen den Farbstoff aufnehmen und somit kräftig blau erscheinen. Die durchschnittliche Vitalität der kryokonservierten PBMCs der WIHS-Kohorte betrug 96%.

2.3.3. Kryokonservierung

Die Zellen wurden bei einer Standardkonzentration von 10-15 Millionen Zellen pro Kryoröhrchen bei -80° Celsius tiefgefroren und nach maximal 3 Monaten in Flüssigstickstoff umgelagert. Hierzu wurden die Zellen in 500 ml 12,5% FKS resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend 500 ml Einfriermedium mit 20% DMSO vorsichtig hinzu pipettiert. Das Einfrieren erfolgte bei -1° Celsius pro Minute mittels CoolCell, Cell Freezing Containers (Biocision).

2.3.4. Auftauen konservierter Zellen

In Vorbereitung wurden Zentrifugenröhrchen mit 8 ml erwärmten cRPMI bereitgestellt. Die Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37° Celsius rasch aufgetaut. Im Anschluss wurden die Zellen vorsichtig in 1 ml cRPMI gelöst und in das Zentrifugenröhrchen überführt. Nach jedem Auftauen wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und gezählt. Das Kryoröhrchen wurde weitere zweimal mit jeweils 1 ml cRPMI gewaschen, um die Überführung der Zellen vollständig zu ermöglichen.

2.4. Durchflusszytometrie

2.4.1. Prinzip

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Charakterisierung unterschiedlicher Zellpopulationen aufgrund ihres Streulicht- und Fluoreszenzverhaltens. Das Prinzip beruht auf der Emission optischer Signale, sobald eine Zelle nach Ansaugen durch eine Kapillare einzeln den fokussierten Laserstrahl passiert. Detektiert mittels Filtern und Verstärkern (Photomultiplier) wird zum einen die Lichtstreuung, zum anderen das Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorophore. Das Streulicht korreliert mit Größe, sowie weiteren Zelleigenschaften. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter = FSC) ist abhängig vom Volumen der Zelle und zeigt die Beugung des Lichts im flachen Winkel an. Das Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter = SSC) ist abhängig von der Granularität der Zelle, der Vesikelmenge und den Zellkerneigenschaften, und

zeigt die Beugung des Lichts im rechten Winkel an. Durch Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen können Zellpopulationen weiter differenziert werden. Mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper richten sich gegen bestimmte Oberflächenproteine (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung, CD = Cluster of differentiation). Eine quantitative Auswertung erlaubt die zweidimensionale Dot Plot Analyse. Durch das Setzen von „Gates“ kann eine Zellpopulation eingegrenzt werden.

2.4.2. Färbung der Zellen

Für die Anfärbung bestimmter Oberflächenmoleküle wurde die Zellsuspension in Reaktionsröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 500 g für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpräzipitat in 1 ml PBS resuspendiert. Zur Überprüfung der Zell Vitalität wurde 1 µl Live/Dead AF700 pro ml hinzugefügt und 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer und Zentrifugation (5 Minuten, 500 g, 4° Celsius) wurde der Überstand abgegossen, die Antikörper hinzugegeben und für weitere 30 Minuten im Dunkeln auf Eis gestellt. Nach der Inkubation wurde weitere zwei Mal mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Die verwendeten Antikörper werden in Kapitel 2.6.5 aufgeführt.

2.4.3. Sortierung der Zellen am Flow Sorter

Die Monozyten-Populationen wurden mithilfe des Cell Sorters FACSAria (BD Biosciences) am La Jolla Institute erschlossen und sortiert. Hierzu wurden 10 Millionen mit anti-CD14, anti-CD16, anti-CD3, anti-CD19, anti-CD66b, anti-Cd56 und Live/Dead gefärbte PBMCs pro WIHS-Proband verwendet. Mithilfe von CD14 und CD16 erfolgte eine Identifikation und Sortierung der Monozyten in klassische (CD14++), intermediäre (CD14++CD16+) und nicht-klassische Monozyten (CD14+CD16++) (Abb. 1).

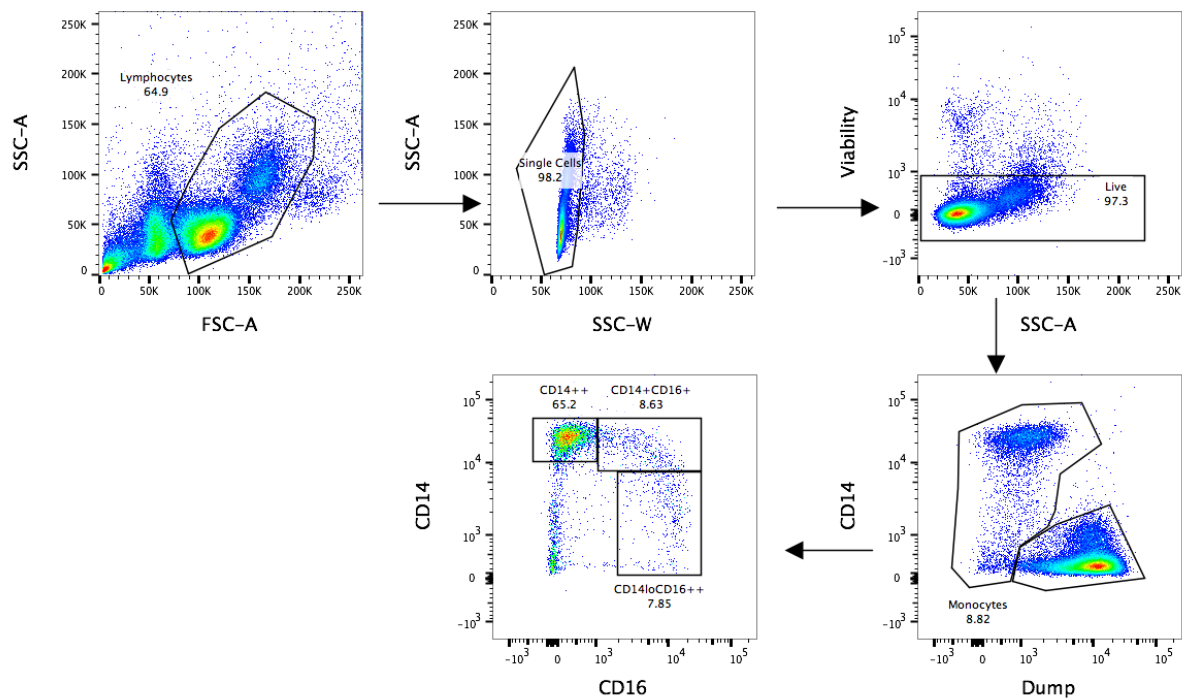


Abb. 1: Monozyten-Sortierung. Zuerst wurden intakte Zellen eingegrenzt mittels FSC/SSC (oben links), dann wurde eine Gate auf einzelne Zellen gesetzt mittels SSC-W (oben mittig) und auf lebende Zellen mittels Invitrogen Yellow (oben rechts). Im Anschluss wurde eine Exklusionsstrategie (dump channel) verwendet, um T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD19) und Neutrophile (CD66b) auszuschließen, welche alle in PerCP-Cy5.5 angefärbt waren (unten rechts).

2.4.4. Charakterisierung der Monozyten mittels Durchflusszytometrie

Zur Evaluation der unterschiedlichen Expression von Oberflächenrezeptoren auf den drei sortierten Monozytenpopulationen wurde im Anschluss eine Anfärbung mit weiteren Antikörpern vorgenommen. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde quantifiziert anhand der MFI (=mean fluorescence intensity). Die Daten wurden mithilfe der FlowJo Software Version v10.1 (Treestar Inc., Ashland, OR) und viSNE analysiert.

2.5. Datenanalyse

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS Statistics 22 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois) vorgenommen. Als quantitatives Maß der Fluoreszenzstärke wurde die MFI (mean fluorescence intensity) angegeben. Die Angabe der Daten

erfolgte als Mittelwert (mean) +/- Standardabweichung (SD), sowie bei schiefen Verteilungen als Median und Interquartilsabstand (IQR).

An statistischen Tests wurden mehrere Verfahren verwendet. In unabhängigen Stichproben wurden ordinal und quantitativ nicht normalverteilte Zielvariablen mittels Mann-Whitney Test verglichen. Kategorielle Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat Test verglichen. Im Falle von quantitativ normalverteilten Zielvariablen fand der t-Test für unabhängige Stichproben für einen Vergleich der Mittelwerte Anwendung. Bei $p < 0,05$ wurde von einem signifikanten Unterschied ausgegangen, wenn nicht anders beschrieben. Für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde die Varianzanalyse ANOVA verwendet. Um bei mehreren Variablen falsch positive Resultate zu vermeiden, wurde bei multiplen Vergleichen die Bonferroni-Korrektur angewendet, und das Signifikanzniveau auf $p=0,0125$ und $p=0,006$ herabgesetzt. Des Weiteren wurden Regressionsanalysen angewendet, um weitere Störfaktoren auszuschließen.

2.6. Material

2.6.1. Technisches Equipment

Zentrifuge	Sorvall Legend RT, Thermo Scientific, Waltham, USA
Wasserbad	Isotemp 210, Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbank	1300 Series A2, Thermo Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop	Primo Star, Zeiss, Oberkochen, DEU
Stickstofftank	LN2 Supply Tank, Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefrierschränke	-80°C VIP Plus, Panasonic, San Diego, USA -20°C, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank	4°C , VWR International, Radnor, USA
Durchflusszytometer	LSRII, BD, Franklin Lakes, USA FACS Aria Fusion, BD, Franklin Lakes, USA
Zellzählautomat	Invitrogen Countess, Thermo Fisher, Waltham USA
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg, DEU
Accu-jet pro	BrandTech, Essex, USA

2.6.2. Verbrauchsmaterialien

Nalgene 2 ml Einfrierröhrchen	Thermo Scientific, Waltham, USA
Einfrierkisten CoolCell	Biocision, San Rafael, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	BioPioneer Inc, San Diego, USA
SepMate 50 Röhrchen	Stemcell Technologies, Vancouver, CAN
5ml Rundboden-Röhrchen, PP	Fisher Scientific, Waltham, USA
5ml Rundboden-Röhrchen, PS	Fisher Scientific, Waltham, USA
Cluster Tubes	Fisher Scientific, Waltham, USA
Deckgläschen	Fisher Scientific, Waltham, USA
Objektträger	Fisher Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Hausser Scientific, Horsham, USA
Countess Zählkammern	Thermo Fisher, Waltham, USA
Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen	Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterile Pipettenspitzen	Genesee Scientific, San Diego, USA
Corning Filtersysteme	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

2.6.3. Chemikalien

PBS, pH 7,4 (1x)	Thermo Fisher, Waltham, USA
RPMI 1640 (1x)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
HEPES (1M)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Sodium Pyruvat (100mM)	Thermo Fisher, Waltham, USA
2-Mercaptoethanol (1000x, 55mM)	Thermo Fisher, Waltham, USA
MEM NEAA (100x)	Thermo Fisher, Waltham, USA
FKS	Gemini Bio-Products, West Sacramento, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau (0, 4 %)	Thermo Fisher, Waltham, USA

2.6.4. Puffer und Medien

cRPMI: 410 ml RPMI 1640
50 ml FKS (10%)
5 ml HEPES
5 ml Sodium/Pyruvat
5 ml MEM-NEAA
5 ml Beta-Mercaptoethanol

25% FKS: 75 ml RPMI 1640
25 ml FKS

12,5% FKS: 50 ml RPMI 1640
50 ml 25% FKS

Gefriermedium: 10 ml 25% FKS
10 ml RPMI 1640
5 ml DMSO

FACS Puffer: 450 ml PBS
50 ml FKS

Sorting Puffer: 915 ml PBS
50 ml FKS
10 ml EDTA
25 ml HEPES

2.6.5. Antikörper

Tab. 1: Antikörper

Spezifität	Isotyp	Konjugation	Klon	Herkunft	Hersteller
CD14	IgG2a	BV510	M5E2	Maus	BioLegend
CD16	IgG1,k	APC-Cy7	3G8	Maus	BioLegend
CD3	IgG2a	PerCP-Cy5.5	OKT3	Maus	Tonbo
CD19	IgG1,k	PerCP-Cy5.5	HIB19	Maus	Tonbo
CD66b	IgM,k	PerCP-Cy5.5	G10F5	Maus	BioLegend
CD56	IgG1,k	PerCP-Cy5.5	5.1H11	Maus	BioLegend
CD192	IgG2a	BV421	K036C2	Maus	BioLegend
CX3CR1	IgG2b	APC	2A9-1	Maus	BioLegend
CD11b	IgG1,k	PE-Cy7	ICRF44	Maus	BioLegend
CD163	IgG1	BV605	GHI/61	Maus	BioLegend
CD86	IgG2b,k	BV605	IT2.2	Maus	BioLegend
CD184	IgG2a	PE-Dazzle594	12G5	Maus	BioLegend
CD195	IgG1,k	PE	eBioT21	Maus	eBioscience
CD36		FITC		Maus	BD Bioscience
Live/dead		AF700			BD Bioscience

3. Ergebnisse

3.1. Charakteristika der Studienkohorte

Untersucht wurden 92 weibliche Probandinnen der WIHS Kohorte, die anhand des Alters, Raucherstatus und ethnischer Zugehörigkeit randomisiert, und je nach HIV und kardiovaskulärem Status (CVD=*cardiovascular disease*) in 4 Gruppen mit je 23 Probanden aufgeteilt wurden.

Tab. 2: Stratifizierung der Gesamtkohorte.

<u>Infektionsstatus</u>	<u>N</u>	<u>Kardiovaskuläre Erkrankung/IMT Status</u>
HIV-/CVD+	N=23	Mit neuen Läsionen seit 2004
HIV-/CVD-	N=23	Keine Läsionen in IMT Scans und keine KHK
HIV+/CVD+	N=23	Mit neuen Läsionen seit 2004
HIV+/CVD-	N=23	Keine Läsionen in IMT Scans und keine KHK

Der Altersdurchschnitt der Probandinnen betrug 46,7 Jahre (SD +/- 8,29). 65,9% waren zum Zeitpunkt der Evaluation Raucherinnen und 95,7% afroamerikanischer Abstammung. 85% der HIV-positiven Teilnehmerinnen befanden sich unter HAART (hoch aktiver antiretroviraler Therapie) und 91% unter ART (antiretroviraler Therapie). Des Weiteren hatten HIV-positive Frauen eine mediane CD4+ Zellzahl von 550,5 Zellen/ μ l (IQR 284-792). Weitere klinische und demographische Charakteristika, sowie evaluierte Laborparameter und HIV-Parameter, lassen sich Tabelle 3 entnehmen.

Tab. 3: Klinische Merkmale der Studienteilnehmer. Merkmale HIV-positiver und HIV-negativer Frauen der Women's Interagency HIV Study stratifiziert nach dem Vorhandensein subklinischer Atherosklerose.

Parameter	Alle Patienten n=92 (100%)	HIV- CVD- n=23 (25%)	HIV- CVD+ n=23 (25%)	HIV+ CVD- n=23 (25%)	HIV+ CVD+ n=23 (25%)	P*
Klinische Merkmale						
Mittleres Alter, J	46,74±8,29	44,70±6,73	47,74±9,32	46,70±8,46	47,83±8,61	0,553
BMI (kg/m ²)	28,54±6,45	30,22±6,04	27,40±6,06	27,38±4,96	29,12±8,34	0,371
BP sys (mmHG)	121,43 ±14,64	121,00 ±16,55	124,94 ±17,98	120,78 ±15,30	120,89 ±11,48	0,916
BP dias (mmHG)	71,27±9,14	69,53±9,53	69,38±8,11	72,94±10,66	71,89±7,86	0,677
BP sys > 130 mmHG	34 (37,0%)	6 (6,5%)	14 (15,2%)	5 (5,4%)	9 (9,8%)	0,027
BP dias > 85 mmHG	22 (23,9%)	3 (3,3%)	8 (8,7%)	5 (5,4%)	6 (6,5%)	0,375
Raucher	60 (65,9%)	18 (19,8%)	18 (19,8%)	10 (11,0%)	14 (15,4%)	0,058
Diabetes	22 (23,9%)	6 (6,5%)	8 (8,7%)	4 (4,3%)	4 (4,3%)	0,453
Framingham Risiko Score (%)	2,64±3,11	1,87±1,96	4,59±4,80	1,43±0,99	2,64±2,56	0,002
Framingham Risiko Score						
< 10%	85 (94,4%)	22 (24,4%)	19 (21,1%)	23 (25,6%)	21 (23,3%)	0,241
10 - 20%	5 (5,6%)	1 (1,1%)	3 (3,3%)	0 (0,0%)	1 (1,1%)	0,241
> 20%	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1,000
LVEF < 50%	2. (3,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,7%)	1 (1,7%)	0,732
NYHA Stadium						
- 1	26 (44,8%)	9 (15,5%)	4 (6,9%)	6 (10,3%)	7 (12,1%)	0,709
- 2	30 (51,7%)	6 (10,3%)	3 (5,2%)	11 (19,0%)	10 (17,2%)	
- 3	2 (3,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,7%)	1 (1,7%)	
- 4	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
NYHA > 2	32 (55,2%)	6 (10,3%)	3 (5,2%)	12 (20,7%)	11 (19,0%)	0,385
Demographien						
Rasse/ ethnische Zugehörigkeit						
- Afro-/ Hispano- Amerikaner	88 (95,7%)	22 (23,9%)	22 (23,9%)	22 (23,9%)	22 (23,9%)	1,000
- Andere	4 (4,3%)	1 (1,1%)	1 (1,1%)	1 (1,1%)	1 (1,1%)	
Mittleres Haushaltseinkommen/Jahr						
- < \$6000	19 (21,3%)	5 (5,6%)	6 (6,7%)	1 (1,1%)	7 (7,9%)	0,063
- \$6000 – \$12000	34 (38,2%)	5 (5,6%)	7 (7,9%)	12 (13,5%)	10 (11,2%)	

- \$12001 - \$18000	11 (12,4%)	4 (4,5%)	5 (5,6%)	2 (2,2%)	0 (0,0%)	
- \$18001 - \$24000	10 (11,2%)	4 (4,5%)	3 (3,4%)	1 (1,1%)	2 (2,2%)	
- \$24001 - \$30000	3 (3,4%)	1 (1,1%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	1 (1,1%)	
- \$30001 - \$36000	4 (4,5%)	0 (0,0%)	1 (1,1%)	1 (1,1%)	2 (2,2%)	
- \$36001 - \$75000		4 (4,5%)	0 (0,0%)	2 (2,2%)	0 (0,0%)	
- > \$75000	2 (2,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (2,2%)	0 (0,0%)	
Bildungsgrad						
- Kein Schulabschluss	36 (39,6%)	8 (8,8%)	9 (9,9%)	9 (9,9%)	10 (11,0%)	0,928
- High School Abschluss	31 (34,1%)	8 (8,8%)	9 (9,9%)	6 (6,6%)	8 (8,8%)	
- College Abschluss	22 (24,3%)	6 (6,6%)	5 (5,5%)	7 (7,7%)	4 (4,4%)	
- Universitätsabschluss	2 (2,2%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,1%)	
Kokain/Crack Konsum	8 (8,8%)	2 (2,2%)	4 (4,4%)	0 (0,0%)	2 (2,2%)	0,236
Heroinkonsum seit letztem Studienbesuch	3 (3,3%)	0 (0,0%)	3 (3,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,027
Bekannter i.v. Drogenkonsum	40 (43,5%)	7 (7,6%)	11 (12,0%)	11 (12,0%)	11 (12,0%)	0,547
Hepatitis C	40 (43,5%)	6 (6,5%)	9 (9,8%)	12 (13,0%)	13 (14,1%)	0,151
<i>Begleitmedikation bei Studieneintritt</i>						
Antihypertensiva	30 (32,6%)	5 (4,4%)	9 (9,8%)	7 (7,7%)	9 (9,8%)	0,537
Statine	5 (5,4%)	0 (0,0%)	2 (2,2%)	0 (0,0%)	3 (3,3%)	0,127
<i>Laborparameter</i>						
CRP (mg/ml) SB	5,06±8,32	3,50±3,97	5,85±7,14	5,15±11,48	5,75±9,16	0,765
CRP (mg/dl) FU	5,54±8,11	4,30±6,86	7,87±10,85	2,60±2,47	7,28±8,87	0,102
CRP> 0,2 mmHg SB	88 (95,7%)	22 (23,9%)	22 (23,9%)	22 (23,9%)	22 (23,9%)	1,000
CRP > 0,2 mmHg FU	84 (95,5%)	22 (25,0%)	21 (23,0%)	21 (23,9%)	20 (22,7%)	0,590
CRP Kategorien (mg/ml) Studienbeginn						
- <1,0 (low CVD risk)	24 (26,1%)	7 (7,6%)	6 (6,5%)	7 (7,6%)	4 (4,3%)	0,955
- 1,0 – 3,0 (average risk)	29 (31,5%)	6 (6,5%)	6 (6,5%)	6 (6,5%)	9 (9,8%)	
- 3,1 – 10,0 (high risk)	28 (30,4%)	8 (8,7%)	7 (7,6%)	6 (6,5%)	7 (7,6%)	
- > 10,0 (persistent increased)	11 (12,0%)	2 (2,2%)	4 (4,3%)	2 (2,2%)	3 (3,3%)	

inflammation)

CRP Kategorien (mg/dl) Follow-Up

- <1,0 (low CVD risk)	27 (30,7%)	9 (10,2%)	6 (6,8%)	8 (9,1%)	4 (4,5%)	0,310
- 1,0 – 3,0 (average risk)	22 (25,0%)	5 (5,7%)	5 (5,7%)	7 (8,0%)	5 (5,7%)	
- 3,1 – 10,0 (high risk)	28 (31,8%)	8 (9,1%)	7 (8,0%)	6 (6,8%)	7 (8,0%)	
- > 10,0 (persistent increased inflammation)	11 (12,5%)	1 (1,1%)	5 (5,7%)	0 (0,0%)	5 (5,7%)	
Kreatinin (mg/dl)	0,97±0,68	0,88±0,16	0,96±0,51	0,83±0,13	1,22±1,24	0,217
EGFR (ml/min/1,73m ²)	86,86±23,16	87,32±6,04	87,34 ±24,59	90,12 ±17,07	82,65 ±31,49	0,751
Nüchtern glukose (mg/dl)	95,20±30,46	95,55 ±26,71	98,16 ±43,50	91,91 ±13,79	95,80 ±35,06	0,931
HbA1c (%)	5,66±0,95	5,93±1,05	6,06±1,28	5,21±0,32	5,50±0,79	0,017
HbA1c 4,0 – 5,6%	50 (66,7%)	11 (14,7%)	8 (10,7%)	20 (26,7%)	11 (14,7%)	0,012
HbA1c 5,7 – 6,4%	16 (21,3%)	6 (8,0%)	5 (6,7%)	2 (2,7%)	3 (4,0%)	0,337
HbA1c > 6,5%	9 (12,0%)	5 (6,7%)	3 (4,0%)	0 (0,0%)	1 (1,3%)	0,090
Triglyceride (mg/dl)	125,42 ±90,76	99,13 ±47,62	123,11 ±86,86	114,11 ±55,24	168,57 ±139,54	0,068
Cholesterol (mg/dl)	178,67 ±40,61	169,87 ±31,11	194,16 ±51,02	161,17 ±35,36	193,48 ±36,45	0,010
Cholesterol > 200 mg/dl (je)	28 (54,9%)	6 (11,8%)	9 (17,6%)	4 (7,8%)	9 (17,6%)	0,061
Cholesterol 200 – 239 mg/dl	5 (11,1%)	2 (4,4%)	2 (4,4%)	1 (2,2%)	0 (0,0%)	0,611
Cholesterol > 240 mg/dl	10 (22,2%)	0 (0,0%)	5 (11,1%)	1 (2,2%)	4 (8,9%)	0,050
HDL (mg/dl)	49,26±14,70	52,26±11,74	53,79±14,10	47,35±18,22	43,95±12,62	0,115
HDL < 40 mg/dl	28 (49,1%)	4 (7,0%)	7 (12,3%)	8 (14,0%)	9 (15,8%)	0,047
HDL 40 – 59 mg/dl	10 (17,5%)	3 (5,3%)	4 (7,0%)	2 (3,5%)	1 (1,8%)	0,781
HDL > 60 mg/dl	19 (33,9%)	6 (10,7%)	8 (14,3%)	4 (7,1%)	1 (1,8%)	0,175
LDL (mg/dl)	103,85 ±35,48	97,65 ±34,02	112,61 ±43,79	91,04 ±30,22	117,80 ±29,38	0,045
LDL > 190 mg/dl	3 (4,1%)	0 (0,0%)	2 (2,7%)	0 (0,0%)	1 (1,4%)	0,349
LDL > 100 mg/dl	42 (57,5%)	10 (13,7%)	15 (20,5%)	7 (9,6%)	10 (13,7%)	0,317
LDL < 100mg/dl	31 (42,5%)	10 (13,7%)	6 (8,2%)	9 (12,3%)	6 (8,2%)	0,317
LDL < 70 mg/dl	11 (15,1%)	4 (5,5%)	2 (2,7%)	4 (5,5%)	1 (1,4%)	0,378
NTproBNP (ng/l)	257,32 ±980,11	70,50 ±77,51	166,98 ±209,50	202,28 ±549,20	494,98 ±1657,32	0,629
D-Dimere (mg/l)	0,92±1,15	-	1,26±1,49	0,42±0,16	-	0,505
Leukozyten (n/μl)	5,34±2,08	5,55±1,40	7,85±2,11	4,61±1,33	4,94±2,41	0,000

Thrombozyten (n/µl)	226,83 ±80,56	248,65 ±44,24	222,89 ±102,61	201,83 ±80,75	237,26 ±89,60	0,279
<i>HIV Parameter</i>						
CD4+ Nadir (n/µl)	240,36 ±133,12	-	-	231,26 ±134,36	250,33 ±134,33	0,641
CD4+ Zellen (n/m ³)	427,59 ±246,96	-	-	429,26 ±182,48	425,91 ±302,40	0,964
CD4+ Zellen >500 (n/ul)	16 (34,8%)	-	-	10 (21,7%)	6 (13,0%)	0,353
HIV RNA (Kopien/ml)	15349,28 ±48835,13	-	-	15884,78 ±62184,05	14813,78 ±31791,31	0,942
HIV RNA Detektionsstatus	26 (56,5%)			12 (26,1%)	14 (30,4%)	0,767
Abacavir, n (%)	15 (32,6%)			8 (17,4%)	7 (15,2%)	1,000
Tenofovir, n (%)	13 (28,3%)			7 (15,2%)	6 (13,0%)	1,000
Anzeichen für AIDS	32 (34,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	19 (20,7%)	13 (14,1%)	0,000
Klassische Monozyten/ Zellen gesamt	56,48±14,19	57,30 ±12,08	56,73 ±15,36	55,84 ±14,68	56,05 ±15,28	0,986
Intermediäre Monozyten/ Zellen gesamt	6,69±4,05	6,66±4,07	7,11±4,65	6,30±3,87	6,69±3,80	0,932
Nicht-klassische Monozyten/ Zellen gesamt	17,73±13,29	15,77±9,06	16,75 ±17,29	17,49 ±11,24	20,93 ±14,39	0,587
Klassische Monozyten/ Monozyten gesamt	69,53±16,07	70,88 ±12,08	71,14 ±18,68	69,69 ±15,52	66,42 ±17,81	0,745
Intermediäre Monozyten/ Monozyten gesamt	21,52±15,53	19,77 ±11,33	19,51 ±18,87	22,03 ±14,40	24,79 ±16,97	0,639
Nicht-klassische Monozyten/ Monozyten gesamt	7,79±4,35	8,11±4,68	8,23±5,21	7,03±3,24	7,79±4,21	0,791
CD16 -	69,53±16,07	70,88 ±12,08	71,14 ±18,68	69,69 ±15,52	66,41 ±17,81	0,745
CD16 +	29,31±16,11	27,88 ±12,02	27,74 ±18,86	29,05 ±15,37	32,58 ±17,90	0,723
Monozyten (n/µl)	2,53±1,30	2,69±1,11	3,00±0,00	2,30±1,55	2,48±1,38	0,558

Werte sind angegeben als n (%) oder Mittelwert ± Standardabweichung. BMI – body mass index, BP – Blutdruck, LVEF – Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, NYHA – New York Heart Association, CRP – C-reaktives Protein, EGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (MDRD), HbA1c – Glycated Hemoglobin, HDL – High-density lipoprotein, LDL – Low-density lipoprotein, BNP – B-Typ Natriuretisches Peptid, SB – Studienbeginn, FU – Follow-Up.

3.2. Qualität der verwendeten Proben

Die kryokonservierten PBMCs aus den 6 Studienzentren hatten nach dem Auftauen und Kontrolle mit der Zählkammer eine durchschnittliche Vitalität von 96,1%. Im folgenden Mittelwertplot sind einzelne Werte dargestellt für Studienzentrum 1-6.

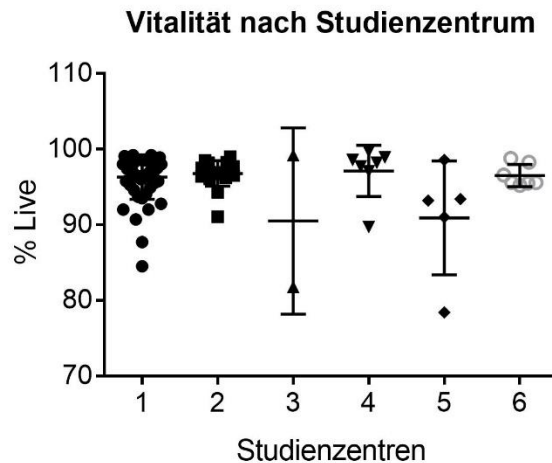


Abb. 2.1: Vitalität nach Studienzentrum. Darstellung der Vitalität der kryokonservierten PBMC's nach Studienzentrum 1-6 in Prozent (%).

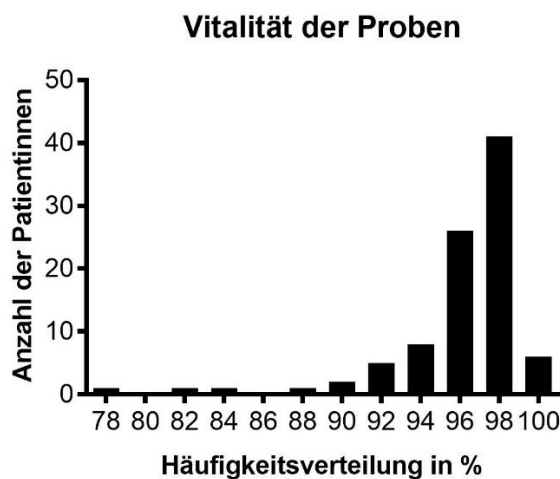


Abb. 2.2: Häufigkeitsverteilung der Probenvitalität. Die durchschnittliche Vitalität der kryokonservierten PBMC's betrug 96,1%.

Nach dem Sorting wiesen alle Monozytenpopulationen eine Reinheit >95% auf.

3.3. Oberflächenexpression auf Monozyten-Populationen

In der gesamten Kohorte (n=92) evaluierten wir die Oberflächenexpression von CXCR4, CCR5, CCR2, CD11b, CD163, CD36 und CX3CR1 auf klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten.

Die folgenden Grafiken zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität der entsprechenden Antikörper als Mittelwert +/- SD. Für die Analyse wurde nach Bonferroni-Korrektur $p < 0,0167$ als signifikant gewertet.

3.3.1. CX3CR1

Die niedrigste Expression von CX3CR1 findet sich auf klassischen Monozyten ($890,8 \pm 394,8$), gefolgt von intermediären Monozyten ($3659 \pm 1828,9$) und nicht-klassischen Monozyten ($3940,3 \pm 2213,5$). Zwischen Letzteren lässt sich kein signifikanter Unterschied finden, wobei zwischen klassischen und intermediären, sowie klassischen und nichtklassischen Monozyten ein jeweils signifikanter Unterschied besteht ($p < 0,001$).

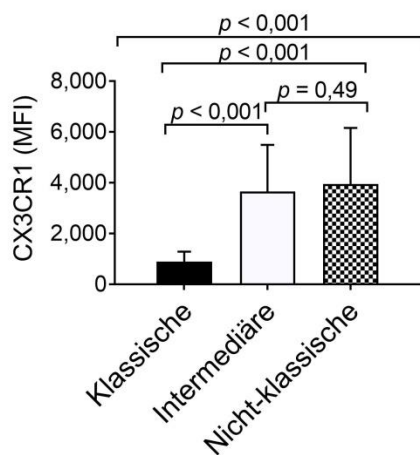


Abb. 3.1: Analyse der CX3CR1-Expression auf den Monozyten-Populationen.

3.3.2. CD16

Wie wir aufgrund des Sortings und der Definition der Populationen erwarten würden, finden wir die höchste Expression von dem Oberflächenmolekül CD16 auf nicht-klassischen Monozyten ($6586,8 \pm 2854$). Auf intermediären Monozyten lässt sich eine mittlere Expressionshöhe ($2664,7 \pm 1240$) und auf klassischen Monozyten die Niedrigste ($302,7 \pm 193,3$) finden. Die Unterschiede zwischen allen 3 Vergleichspaaren sind als signifikant zu werten ($p < 0,001$).

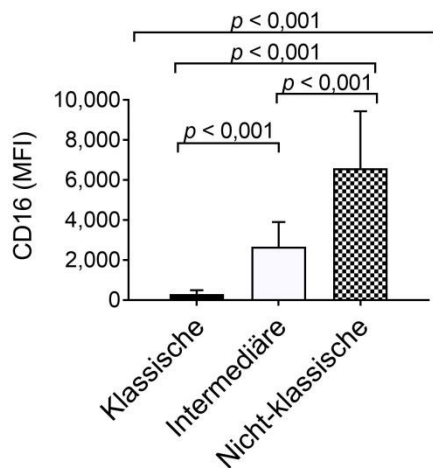


Abb. 3.2: Analyse der CD16-Expression auf den Monozyten-Populationen.

3.3.3. CD192

Auch hier sind die Unterschiede aller Vergleichsgruppen signifikant ($p < 0,001$). CD192 zeigt die höchste Expression auf klassischen Monozyten ($3604,5 \pm 1358,9$), gefolgt von intermediären Monozyten ($1327,9 \pm 578,7$) und nicht-klassischen Monozyten ($222,9 \pm 89,2$).

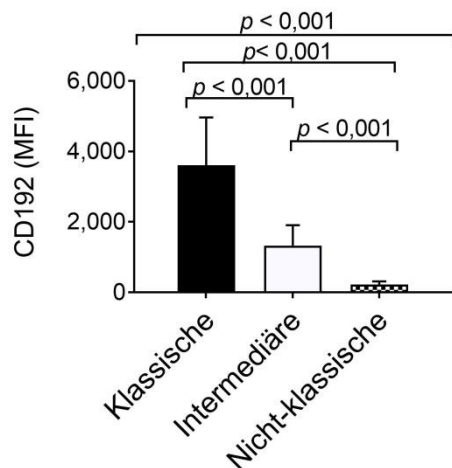


Abb. 3.3: Analyse der CD192-Expression auf den Monozyten-Populationen.

3.3.4. CD14

Die CD14-Expression bestätigt ebenfalls unsere Sorting-Qualität. Klassische Monozyten zeigen die höchsten Werte ($18014,4 \pm 4350,3$), intermediäre Monozyten einen mittleren Phänotyp ($12335,8 \pm 3084,2$) und nicht-klassische Monozyten die niedrigsten Werte ($1009,2 \pm 521,2$). Zwischen allen Gruppen besteht wieder ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

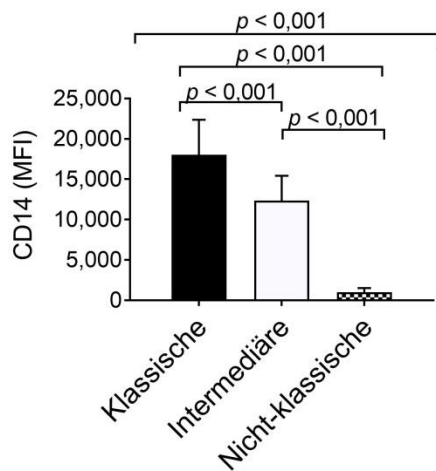


Abb. 3.4: Analyse der CD14-Expression auf den Monozyten-Populationen.

3.3.5. CD163

CD163 wird am stärksten von intermediären Monozyten exprimiert ($640,1 \pm 714$), gefolgt von klassischen ($630,5 \pm 472,1$) und nicht-klassischen Monozyten ($106,5 \pm 60,6$). Nur zwischen nicht-klassischen und intermediären, sowie nicht-klassischen und klassischen Monozyten, ist der Unterschied als signifikant zu werten ($p < 0,001$).

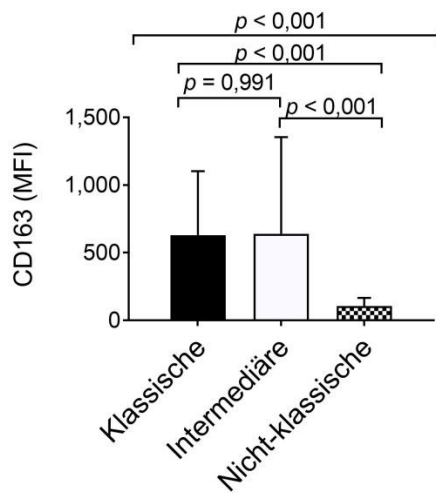


Abb. 3.5: Analyse der CD163-Expression auf den Monozyten-Populationen.

3.3.6. CD36

Das Oberflächenmolekül CD36 zeigt die höchste Expressionsrate auf klassischen Monozyten ($72528,7 \pm 24395,4$). Eine ebenfalls starke Expression zeigen intermediäre Monozyten ($62814 \pm 28912,6$). Zwischen beiden besteht ein signifikanter Unterschied ($p=0,009$). Nichtklassische Monozyten zeigen die niedrigste Expression ($5303,2 \pm 6801$), welche im Vergleich zu den beiden anderen Populationen als signifikant zu werten ist ($p < 0,001$).

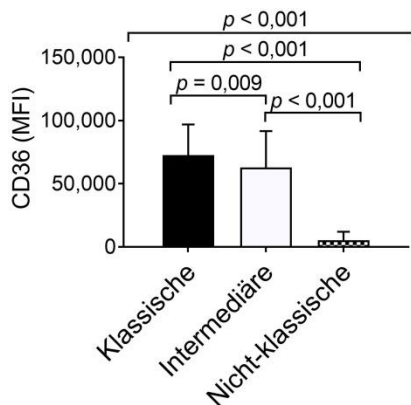


Abb. 3.6: Analyse der CD36-Expression auf den Monozyten-Populationen.

3.3.7. CD195

CD195, auch CCR5 genannt, wird gleichermaßen von klassischen ($218,5 \pm 75,8$) und intermediären Monozyten ($235 \pm 88,4$) exprimiert ($p=0,264$). Nichtklassische Monozyten zeigen die niedrigste Expression ($131,3 \pm 42,1$) und einen signifikanten Unterschied zu den beiden anderen Gruppen ($p < 0,001$).

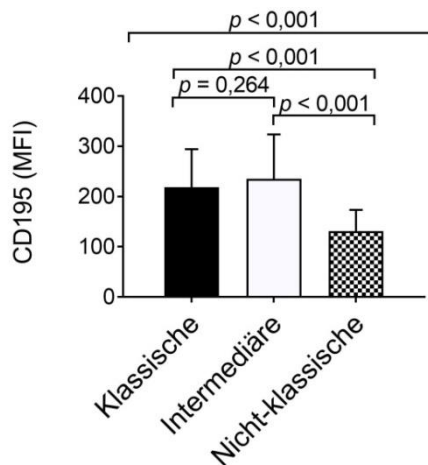


Abb. 3.7: Analyse der CD195-Expression auf den Monozyten-Populationen.

3.3.8. CD11b

Bei CD11b lassen sich wiederum signifikante Unterschiede zwischen allen 3 Vergleichsgruppen finden ($p < 0,001$). Die niedrigsten Werte zeigen nicht-klassische Monozyten ($2020,3 \pm 1520,5$), gefolgt von intermediären ($20381,3 \pm 6385,2$) und klassischen Monozyten ($26981 \pm 7866,3$).

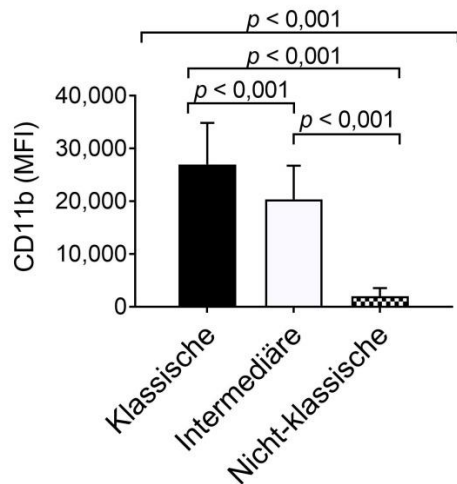


Abb. 3.8: Analyse der CD11b-Expression auf den Monozyten-Populationen.

3.3.9. CXCR4

CXCR4 wird am stärksten exprimiert von intermediären Monozyten ($2615,4 \pm 1252,9$). Eine mittelstarke Expression findet sich bei klassischen ($1977 \pm 991,2$) und die Niedrigste bei nicht-klassischen Monozyten ($564,9 \pm 584,2$). Alle 3 Vergleichsgruppen unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant voneinander ($p < 0,001$).

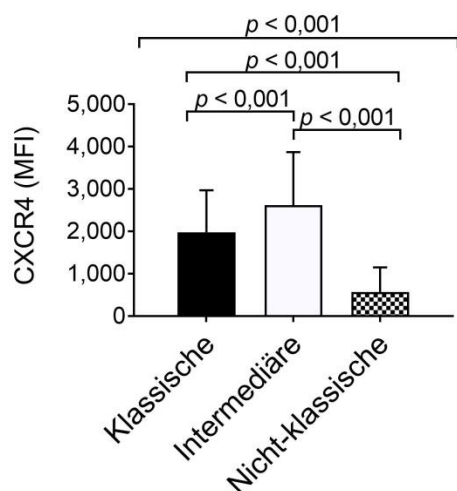


Abb. 3.9: Analyse der CXCR4-Expression auf den Monozyten-Populationen.

3.4. Einfluss von HIV und subklinischer Atherosklerose auf die Häufigkeit der Monozyten-Populationen

Mit dem t-Test für unabhängige Stichproben untersuchten wir die Auswirkung von HIV-Infektion und kardiovaskulärer Erkrankung auf das Vorkommen einzelner Monozyten-Populationen (Signifikanzniveau 0,05).

3.4.1. HIV Infektion

Bei HIV-positiven Probandinnen, im Vergleich zu HIV-negativen Probandinnen, lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung klassischer, intermediärer und nicht-klassischer Monozyten erkennen.

Tab. 3.1.1: Verteilung der Monozyten-Populationen nach HIV-Status. Aufteilung in klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten. Angabe als Mittelwert +/- SD.

	CD14++ (%)	CD14++CD16+ (%)	CD14+CD16++ (%)
HIV-	71,0±15,6	19,6±15,4	8,2±4,9
HIV+	68,1±16,6	23,4±15,6	7,4±3,7
p-Wert	0,38	0,247	0,404

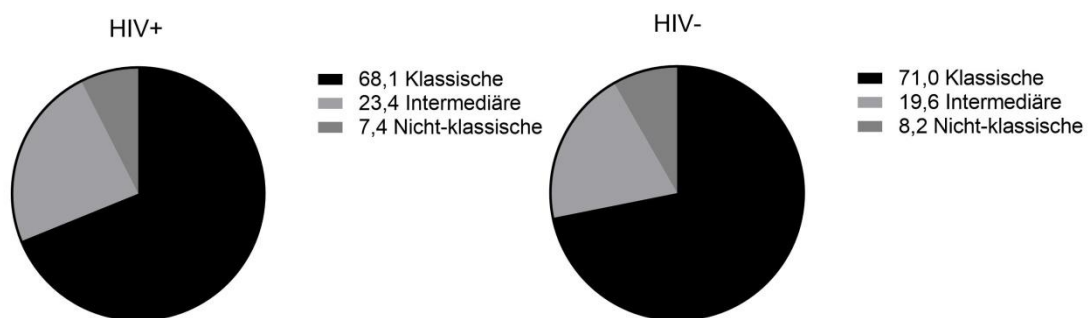


Abb. 4.1.1: Darstellung der Verteilung der Monozyten-Populationen nach HIV-Status.

Auch nach alter Nomenklatur und Einteilung anhand des CD16-Expressions-musters lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Tab. 3.1.2. Verteilung der Monozyten-Populationen nach HIV-Status. Aufteilung in CD16-negative und CD16-positive Monozyten. Angabe als Mittelwert +/- SD.

	CD16- (%)	CD16+ (%)
HIV-	71,0±15,6	27,8±15,6
HIV+	68,1±16,6	30,8±16,6
p-Wert	0,38	0,373

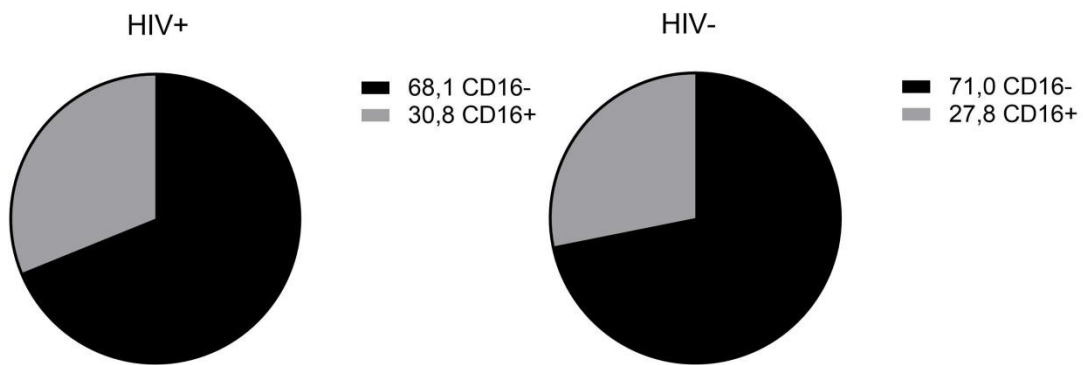


Abb. 4.1.2: Darstellung der Verteilung der Monozyten-Populationen nach HIV-Status.

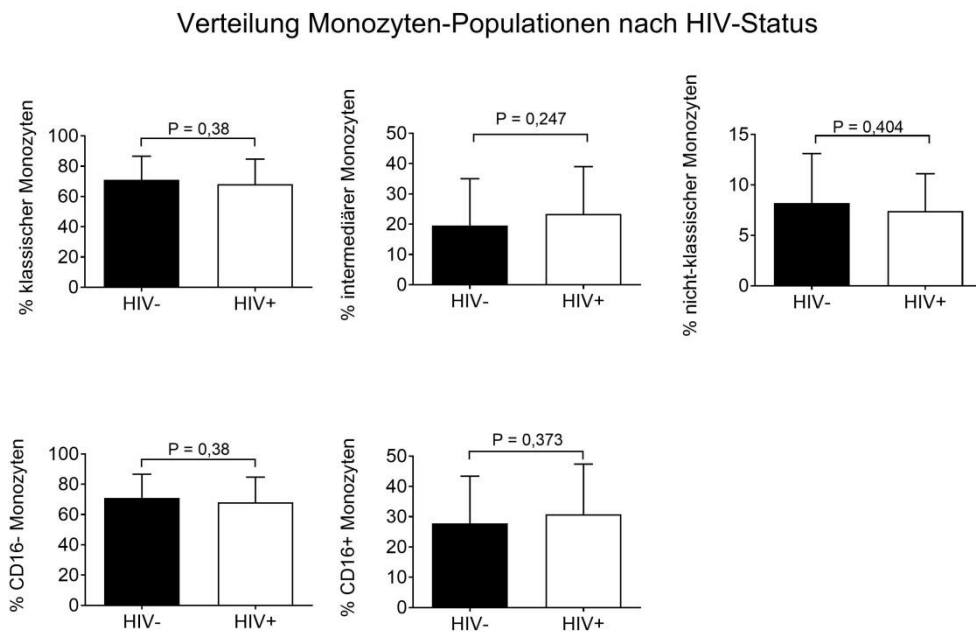


Abb. 4.1.3: Darstellung der Verteilung der Monozyten-Populationen nach HIV-Status.

3.4.2. Subklinische Atherosklerose

Ebenso in Bezug auf das Vorhandensein subklinischer Atherosklerose, sowie kardiovaskulärer Erkrankung, konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit einzelner Monozyten-Populationen beobachtet werden.

Tab. 3.2.1: Verteilung der Monozyten-Populationen nach CVD-Status. Aufteilung in klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten. Angabe als Mittelwert +/- SD.

	CD14++ (%)	CD14++CD16+ (%)	CD14+CD16++ (%)
CVD-	70,3±13,8	20,9±12,9	7,6±4,0
CVD+	68,8±18,2	22,1±17,9	8,0±4,7
p-Wert	0,656	0,702	0,63

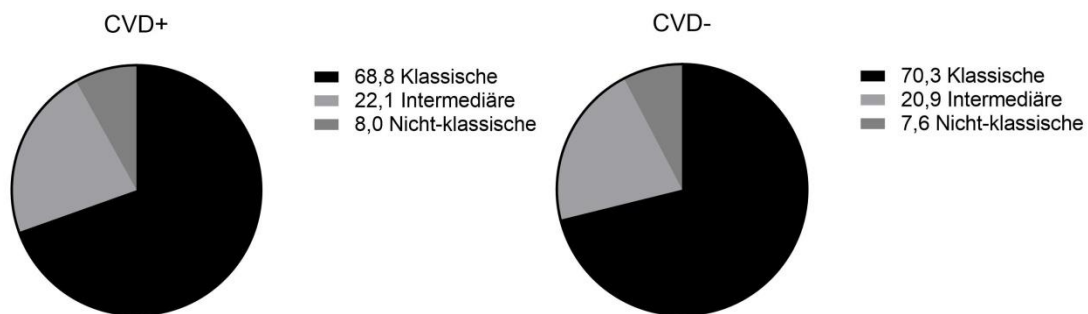


Abb. 4.2.1: Darstellung der Verteilung der Monozyten-Populationen nach CVD-Status.

Ebenso nach Einteilung anhand des CD16-Rezeptors unterscheiden sich beide Gruppen nicht signifikant.

Tab. 3.2.2: Verteilung der Monozyten-Populationen nach CVD-Status. Aufteilung in CD16-negative und CD16-positive Monozyten. Angabe als Mittelwert +/- SD.

	CD16- (%)	CD16+ (%)
CVD-	70,3±13,8	28,5±13,7
CVD+	68,8±18,2	30,2±18,3
p-Wert	0,656	0,617

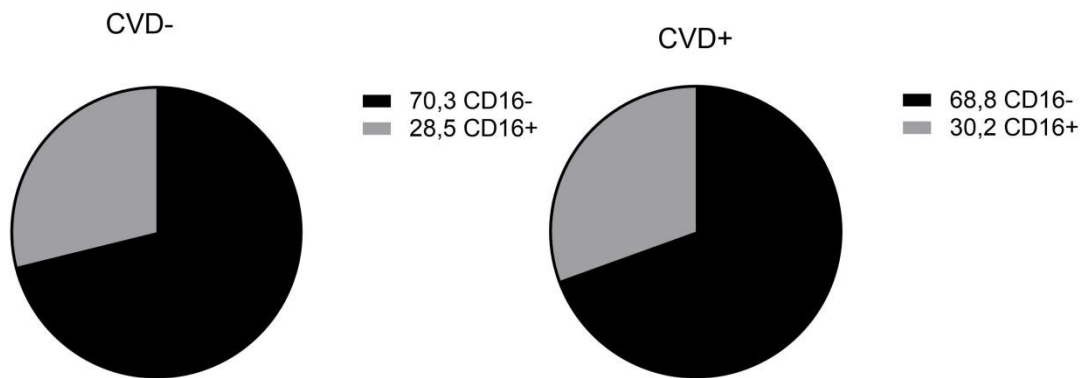


Abb. 4.2.2: Darstellung der Verteilung der Monozyten-Populationen nach CVD-Status.

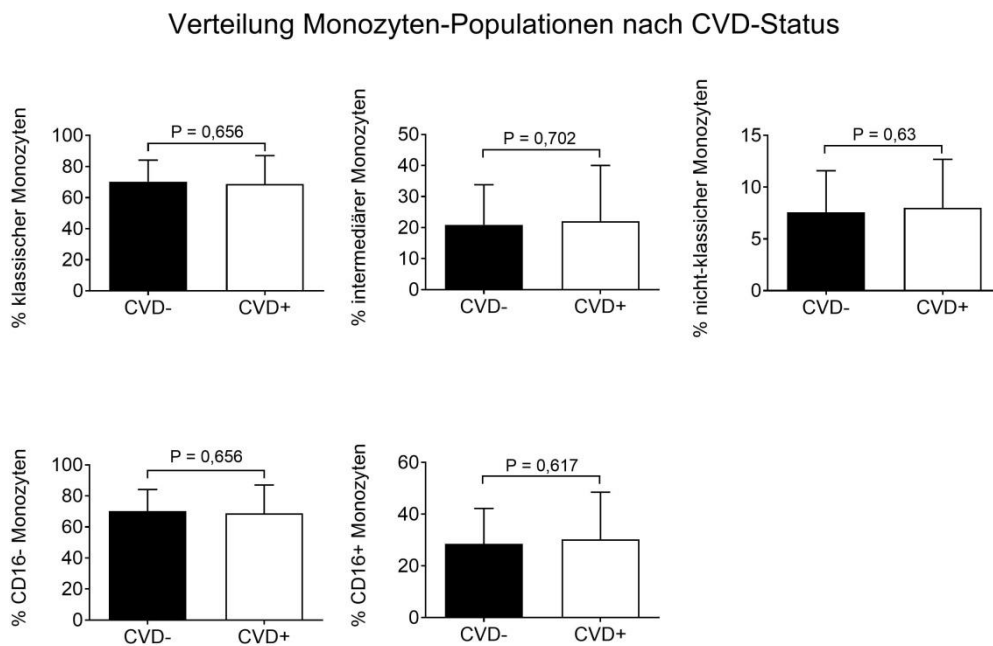


Abb. 4.2.3: Darstellung der Verteilung der Monozyten-Populationen nach CVD-Status.

3.4.3. HIV und subklinische Atherosklerose

Die Verteilung klassischer, intermediärer und nicht-klassischer Monozyten unterschied sich auch im Vergleich aller vier Gruppen nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant (Signifikanzniveau 0,0125 und 0,006).

Tab. 3.3.1: Verteilung der Monozyten-Populationen nach HIV-Status und CVD-Status. Aufteilung in klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten. Angabe als Mittelwert +/- SD.

	CD14++ (%)	CD14++CD16+ (%)	CD14+CD16++ (%)
HIV- CVD-	70,9±12,1	22±11,3	8,1±4,7
HIV- CVD+	71,1±18,7	24,8±18,9	8,2±5,2
HIV+ CVD-	69,7±15,5	19,8±14,4	7,8±3,2
HIV+ CVD+	66,4±17,8	19,5±17,0	7,0±4,2
p-Wert	0,745	0,639	0,791

Ebenso in Bezug auf das Vorkommen CD16-positiver und CD16-negativer Monozyten konnten wir keinen signifikanten Unterschied nachweisen.

Tab. 3.3.2: Verteilung der Monozyten-Populationen nach HIV-Status und CVD-Status. Aufteilung in CD16-negative und CD16-positive Monozyten. Angabe als Mittelwert +/- SD.

	CD16- (%)	CD16+ (%)
HIV- CVD-	70,9±12,1	29,1±12,0
HIV- CVD+	71,1±18,7	32,6±18,9
HIV+ CVD-	69,7±15,5	27,9±15,4
HIV+ CVD+	66,4±17,8	27,7±17,9
p-Wert	0,745	0,723

Verteilung Monozytensubpopulationen in 4 Gruppen

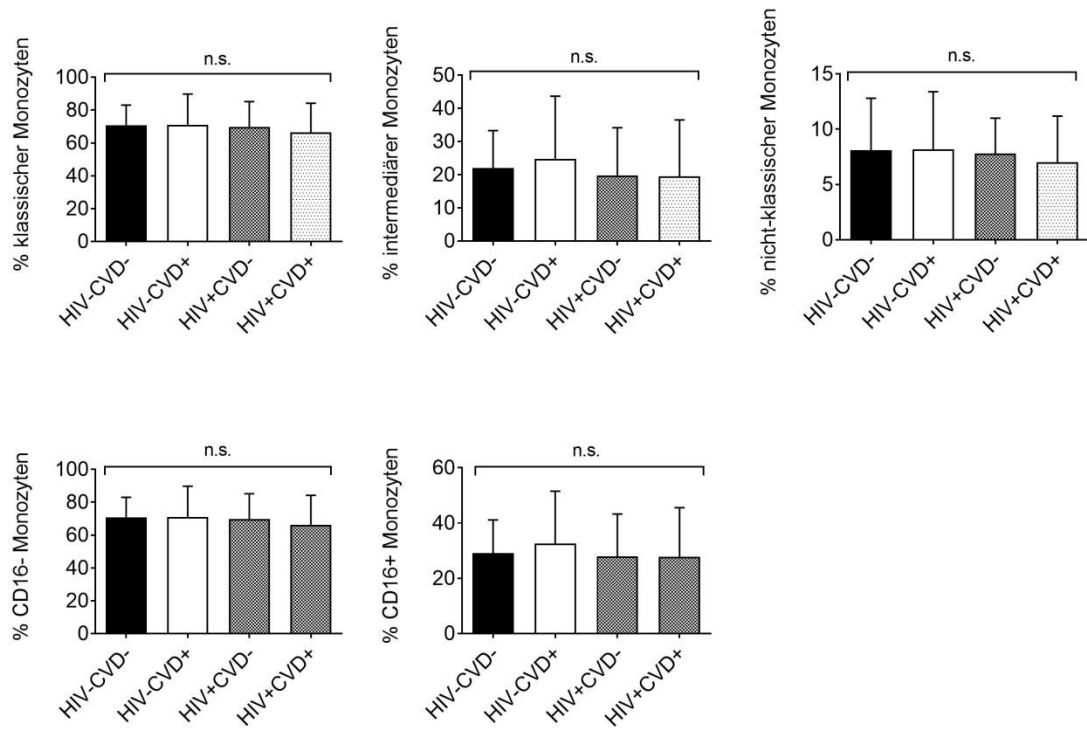


Abb. 4.3.1: Darstellung der Verteilung der Monozyten-Populationen nach HIV-Status und CVD-Status. (n.s. = nicht signifikant)

3.5. Einfluss von HIV und subklinischer Atherosklerose auf die Oberflächenexpression einzelner Monozyten-Populationen

Mithilfe des T-Tests für unverbundene Stichproben und ANOVA im Falle von mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen untersuchten wir im Anschluss Unterschiede der Expression aller Oberflächenrezeptoren auf den Monozyten-Populationen in Gruppen, stratifiziert nach HIV und kardiovaskulärer Erkrankung. Beschrieben werden in diesem Falle nur als signifikant gewertete Ergebnisse.

3.5.1. HIV Infektion

Der HIV Status scheint weder im Falle von klassischen, noch intermediären Monozyten Auswirkungen auf die Rezeptorexpression zu haben. Bei nicht-klassischen Monozyten und HIV hingegen lässt sich eine signifikant erniedrigte Expression von CD192 ($p=0,039$) und CD14 ($p=0,050$) beobachten. Ebenso erniedrigt auf nicht-klassischen Monozyten der HIV-Kohorte ist die Expression von CD163 ($p=0,013$), CD36 ($p=0,023$) und CD11b ($p=0,009$). Abschließend zeigen sich signifikant erniedrigte Expressionslevel von CXCR4 ($p=0,017$).

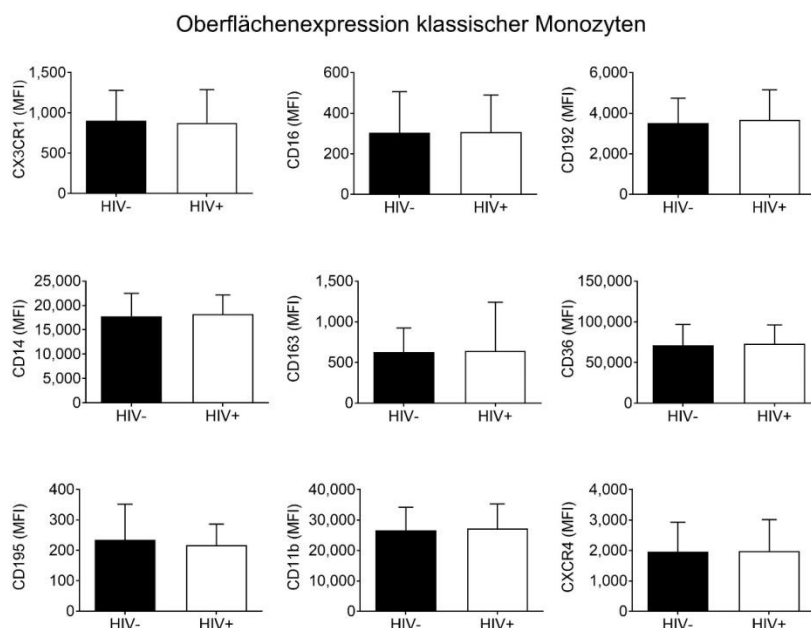


Abb. 4.4.1: Darstellung der Oberflächenexpression klassischer Monozyten nach HIV-Status.

Oberflächenexpression intermediärer Monozyten

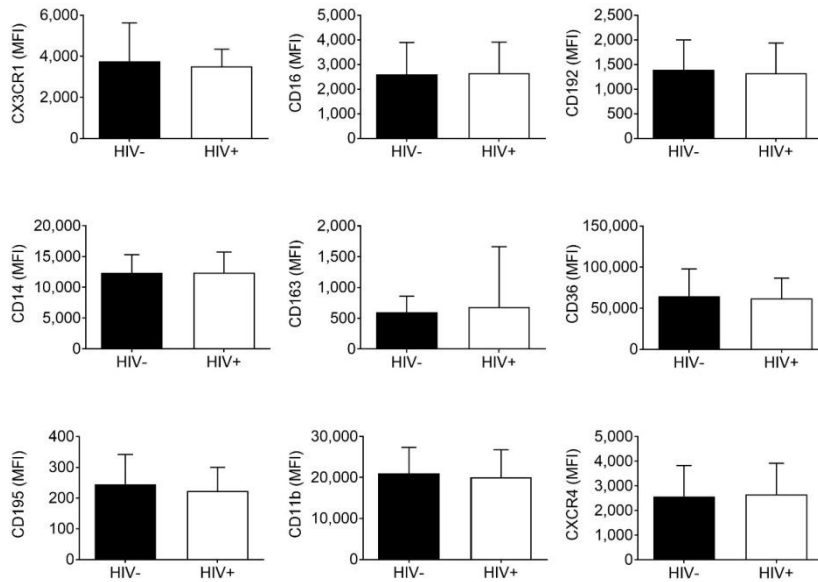


Abb. 4.4.2: Darstellung der Oberflächenexpression intermediärer Monozyten nach HIV-Status.

Oberflächenexpression nicht-klassischer Monozyten

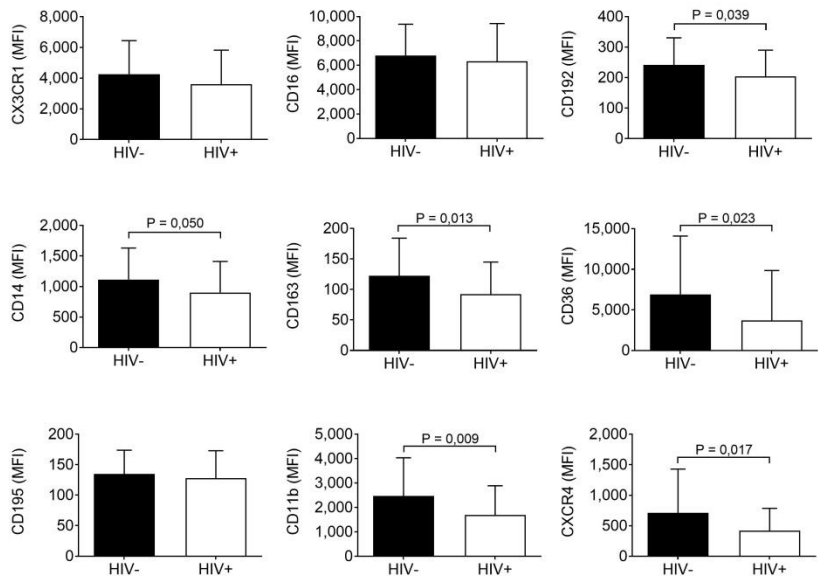


Abb. 4.4.3: Darstellung der Oberflächenexpression nicht-klassischer Monozyten nach HIV-Status.

3.5.2. Subklinische Atherosklerose

Auf klassischen Monozyten lässt sich bei kardiovaskulärer Erkrankung oder subklinischer Atherosklerose eine signifikant höhere Expression von CD163 finden ($p=0,027$). Auf intermediären Monozyten konnten keine Unterschiede in der Expressionshöhe der Marker gefunden werden. Nicht-klassische Monozyten zeigen im Falle von kardiovaskulärer Erkrankung erniedrigte Expressionsraten von CXCR4 ($p=0,028$).

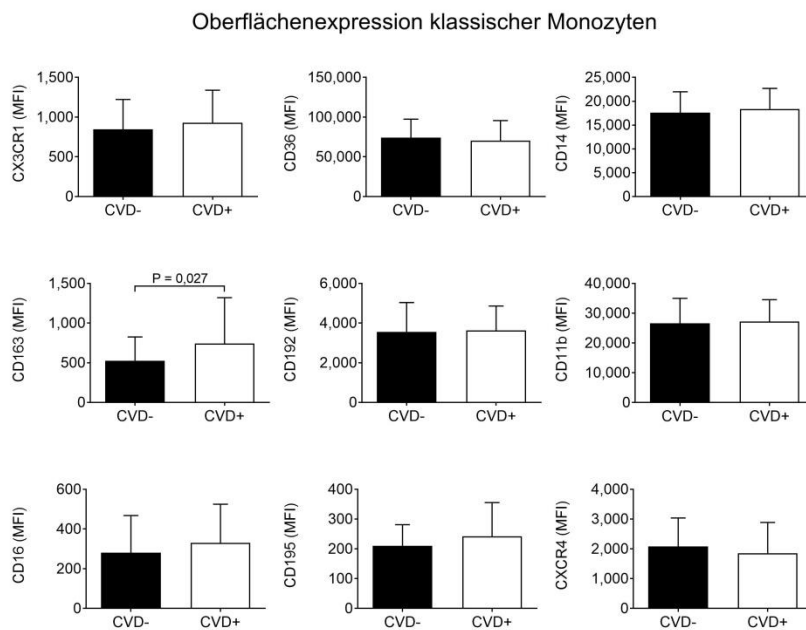


Abb. 4.4.4: Darstellung der Oberflächenexpression klassischer Monozyten nach CVD-Status.

Oberflächenexpression intermediärer Monozyten

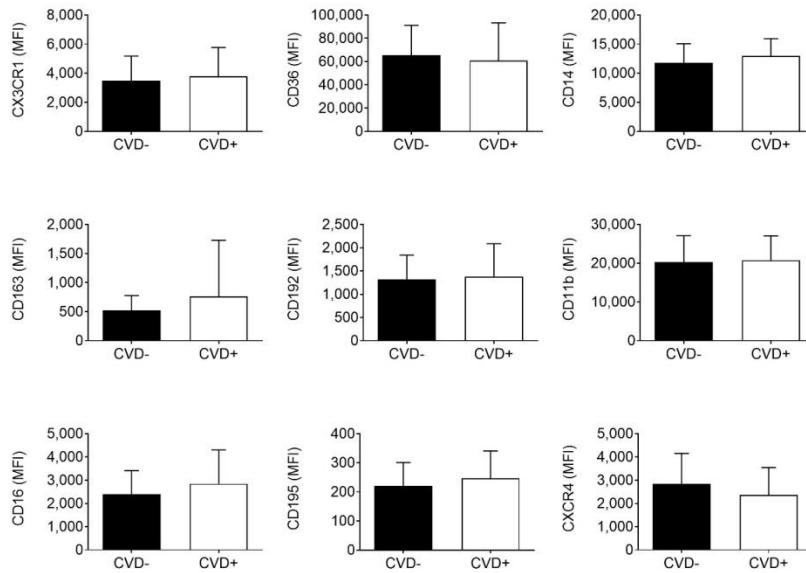


Abb. 4.4.5: Darstellung der Oberflächenexpression intermediärer Monozyten nach CVD-Status.

Oberflächenexpression nicht-klassischer Monozyten

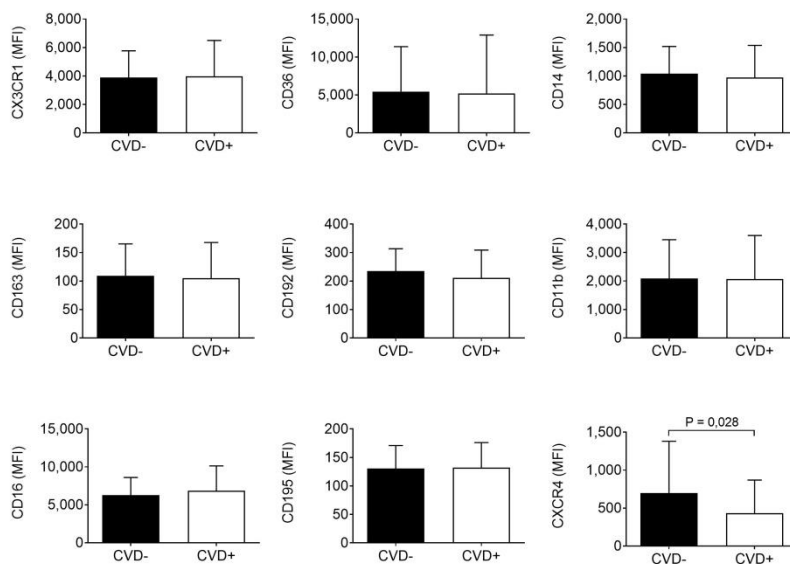


Abb. 4.4.6: Darstellung der Oberflächenexpression nicht-klassischer Monozyten nach CVD-Status.

3.5.3. HIV und subklinische Atherosklerose

Unter Einbezug beider Variablen (HIV und CVD) zeigen klassische Monozyten der HIV-CVD-Gruppe eine niedrigere CD195-Expression im Vergleich zu HIV-CVD+ ($p=0,04$).

Oberflächenexpression klassischer Monozyten 4-Gruppenvergleich

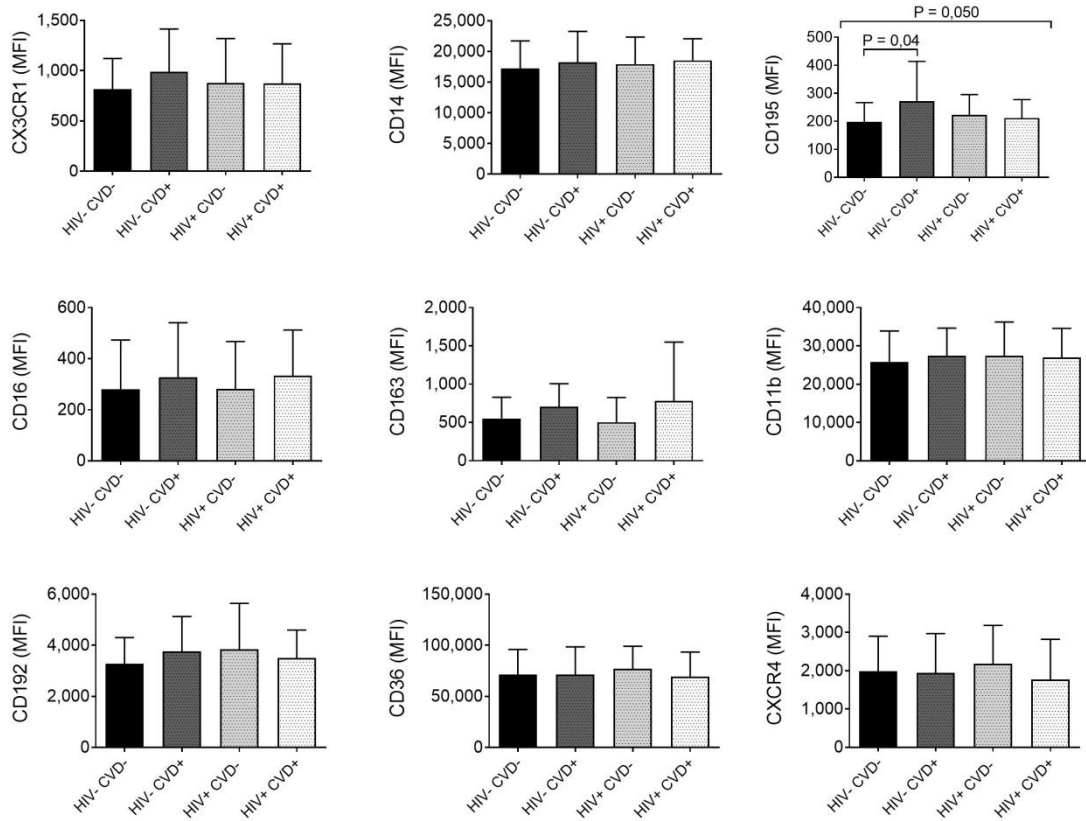


Abb. 4.4.7: Darstellung der Oberflächenexpression klassischer Monozyten nach HIV-Status und CVD-Status.

Bei der Rezeptorausstattung intermediärer Monozyten konnten wir keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Oberflächenexpression intermediärer Monozyten 4-Gruppenvergleich

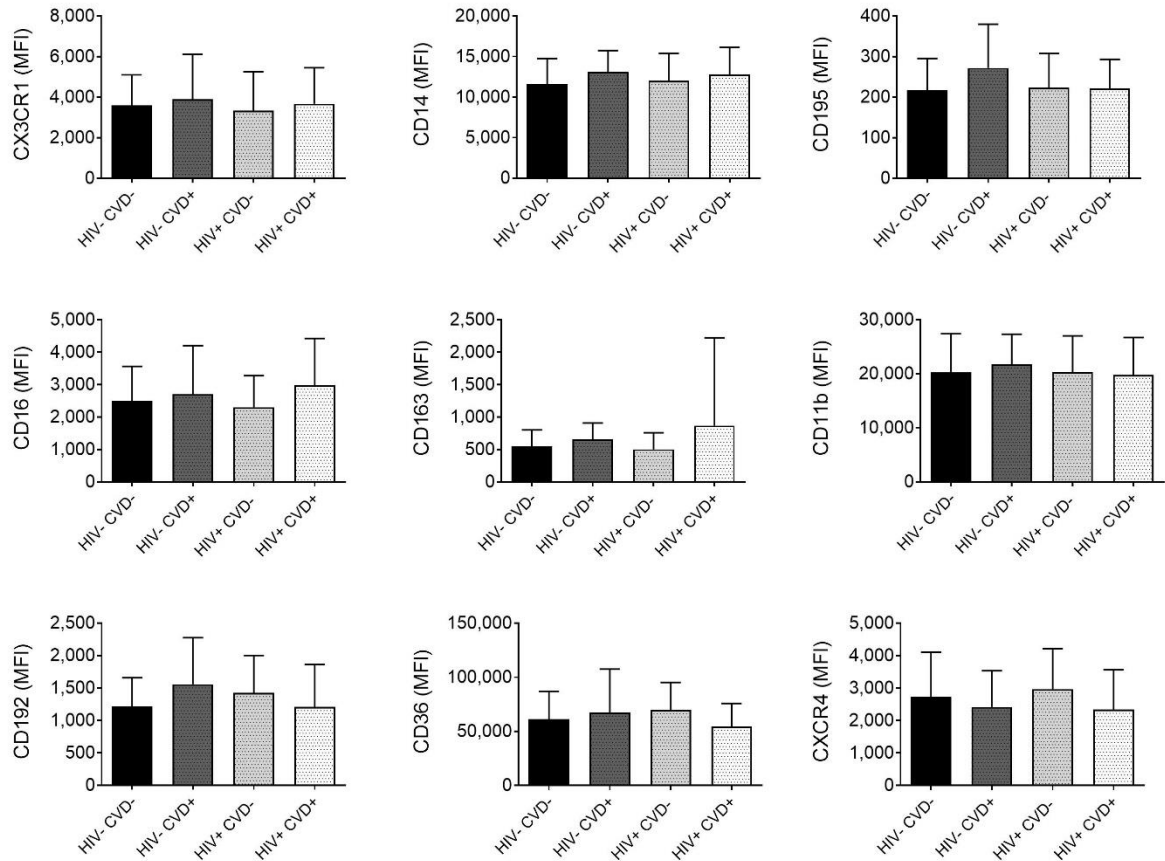


Abb. 4.4.8: Darstellung der Oberflächenexpression intermediärer Monozyten nach HIV-Status und CVD-Status.

Auf nicht-klassischen Monozyten hingegen zeigte sich bei HIV-CVD-Patientinnen eine höhere Expression von CD163 im Vergleich zu HIV+CVD- ($p=0,095$), die sich jedoch nicht als signifikant erwies. Ebenso wiesen Monozyten HIV+CVD+ Probandinnen niedrigere Raten an CD11b im Vergleich zu HIV-CVD+ ($p=0,075$) Frauen auf, und HIV-CVD- Frauen im Gegensatz zu HIV+CVD+ Frauen höhere Raten an CD192. Einen signifikanten Zusammenhang konnte man in Bezug auf die CXCR4-Expression erkennen. HIV-CVD- Studienteilnehmerinnen wiesen im Vergleich zu allen 3 Gruppen eine höhere Expression an CXCR4 auf (gesamt $p=0,006$)

Oberflächenexpression nicht-klassischer Monozyten 4-Gruppenvergleich

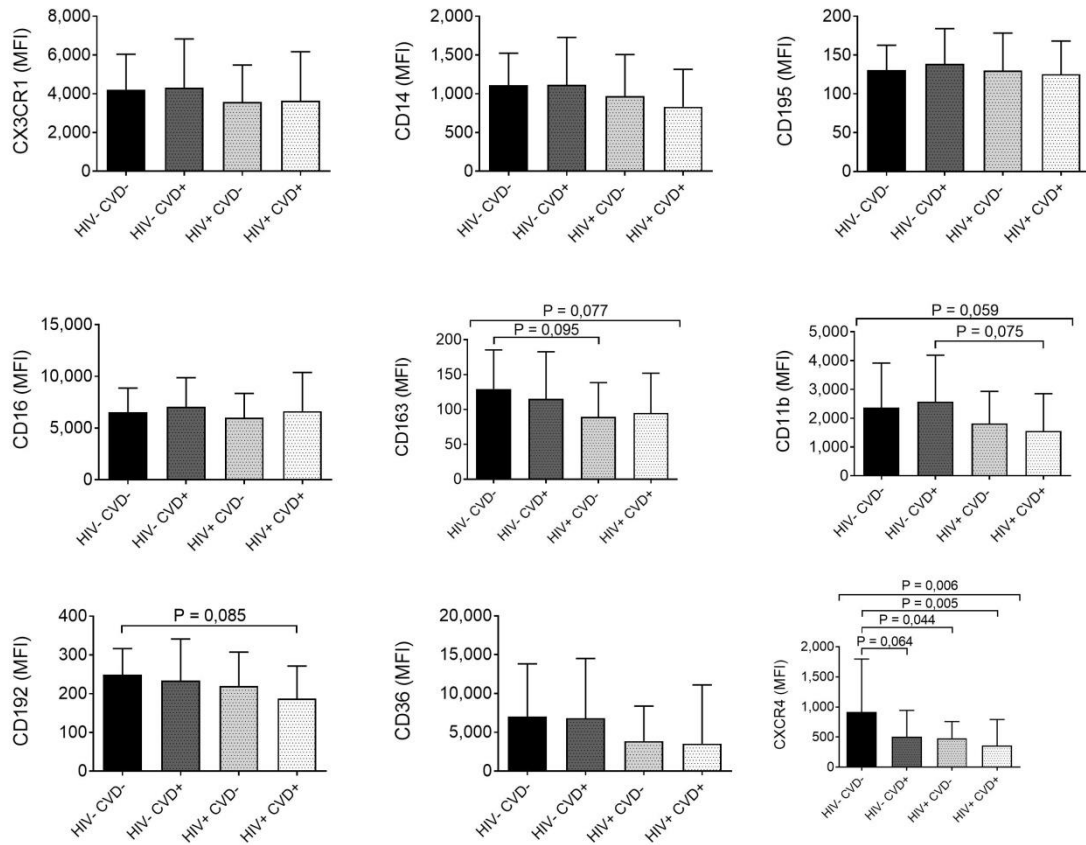


Abb. 4.4.9: Darstellung der Oberflächenexpression nicht-klassischer Monozyten nach HIV-Status und CVD-Status.

3.6. CXCR4-Expression auf nicht-klassischen Monozyten und subklinische Atherosklerose bei HIV

Hervorstechend zeigte sich insgesamt die signifikant unterschiedliche Expression des Oberflächenrezeptors CXCR4 auf nicht-klassischen Monozyten im Vergleich der vier Gruppen.

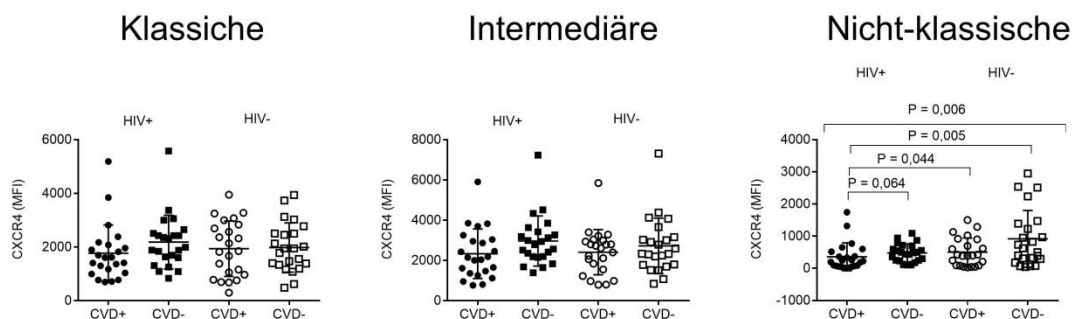


Abb. 4.5.1: Darstellung der CXCR4 Expression auf nicht-klassischen Monozyten nach HIV-Status und CVD-Status.

3.6.1. Regressionsanalysen

Um die CXCR4-Expression auf nicht-klassischen Monozyten näher zu untersuchen, führten wir Regressionsanalysen durch. Wir definierten β als Unterschied der Mittelwerte der MFI der CXCR4-Expression auf nicht-klassischen Monozyten.

Das unangepasste Regressionsmodell (Modell 1) war definiert wie folgt: HIV+/CVD+ vs. HIV-/CVD- [β -577 U, 95% Konfidenzintervall (-882 bis -232), $p=0,001$], HIV-/CVD+ vs. HIV-/CVD- [β -412 U, 95% Konfidenzintervall (-737 bis -87), $p=0,014$] und HIV+/CVD- vs. HIV-/CVD- [β -436 U, 95% Konfidenzintervall (-761 bis -111), $p=0,008$]. Im Modell 1 ist $p=0,006$ insgesamt.

Nach Berücksichtigung der Variablen Schulabschluss, Studienzentrum und injizierende Drogenkonsumenten, sah das angepasste Regressionsmodell (Modell 2) wie folgt aus: HIV+/CVD+ vs. HIV-/CVD- [β -472 U, 95% Konfidenzintervall (-782 bis -161), $p=0,003$], HIV-/CVD+ vs. HIV-/CVD- [β -308 U, 95% Konfidenzintervall (-645 bis 30), $p=0,074$] und HIV+/CVD- vs. HIV-/CVD- [β -552 U, 95% Konfidenzintervall (-863 bis -242), $p=0,001$]. Im Modell 2 ist $p=0,003$ insgesamt.

Der Zusammenhang zwischen CVD und CXCR4-Expression auf nicht-klassischen Monozyten verlor folglich nicht an Stärke, sondern bestätigte sich als signifikant.

Tab. 3.4: Regressionsanalysen. Stärke des Zusammenhangs zwischen niedriger CXCR4-Expression auf nicht-klassischen Monozyten und subklinischer Atherosklerose im unangepassten Modell 1 und nach Berücksichtigung der Variablen Schulabschluss, Studienzentrum und injizierender Drogenkonsum (Modell 2).

	Modell 1: unangepasst		Modell 2: angepasst	
	Differenz der MFI Mittelwerte (95% KI)	P*	Differenz der MFI Mittelwerte (95% KI)	P*
HIV-/CVD-	Ref.	-	Ref.	-
HIV+/CVD-	-436 (-761 bis -111)	0.009	-552 (-863 bis -242)	0.001
HIV-/CVD+	-412 (-737 bis -87)	0.014	-308 (-645 bis 30)	0.074
HIV+/CVD+	-557 (-882 bis -232)	0.001	-472 (-782 bis -161)	0.003

3.6.2. ViSNE-Darstellung der Daten

Mit der neuen Analyse­methode viSNE, die die anschauliche Darstellung hochdimensionaler FACS Daten ermöglicht,⁹⁷ konnte das Ergebnis unserer Analysen visuell veranschaulicht werden.

Jeder Punkt auf einer 2D viSNE Karte stellt eine einzelne Zelle dar. Jede Farbe im oberen Graphen stellt eine Monozyten-Population dar, basierend auf manuellem Gating. Die unteren Graphen stellen dasselbe Zellkollektiv dar, diesmal basiert die Farbe jedoch auf der Expressionshöhe des jeweiligen dargestellten Oberflächenproteins (rechts CD14, mittig CD16, links CXCR4). Dabei deutet blau auf eine niedrige Expression, rot hingegen auf eine hohe Expression hin.

HIV-CVD-

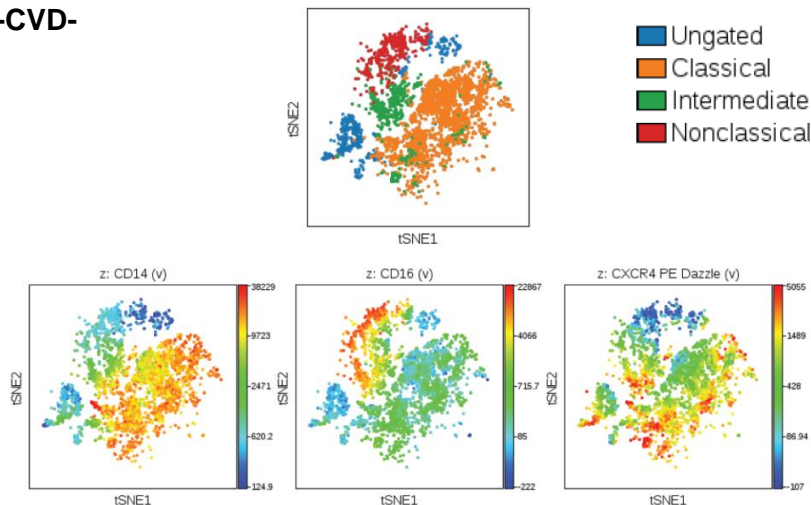


Abb. 4.5.2: ViSNE-Darstellung der Oberflächenexpression bei HIV-negativen und CVD-negativen Probandinnen. In der oberen Darstellung stellt sich die Eingrenzung der einzelnen Monozyten-Populationen nach manuellem Gating dar. Die unteren Darstellungen zeigen die Expressionshöhe von CD14, CD16 und CXCR4 in den jeweiligen Populationen. Blau weist auf eine niedrige Expression hin, rot auf eine starke Expression.

HIV-CVD+

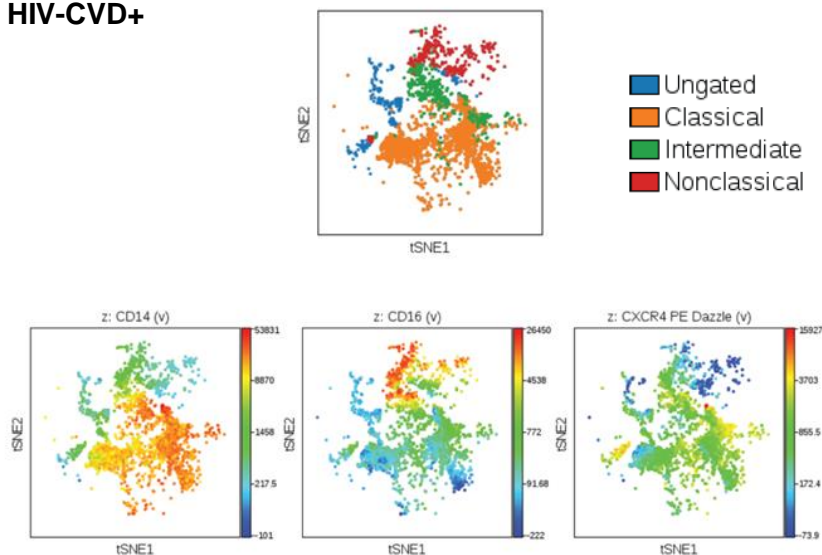


Abb. 4.5.3: ViSNE-Darstellung der Oberflächenexpression bei HIV-negativen und CVD-positiven Probandinnen. In der oberen Darstellung stellt sich die Eingrenzung der einzelnen Monozyten-Populationen nach manuellem Gating dar. Die unteren Darstellungen zeigen die Expressionshöhe der von CD14, CD16 und CXCR4 in den jeweiligen Populationen. Blau weist auf eine niedrige Expression hin, rot auf eine starke Expression.

HIV+CVD-

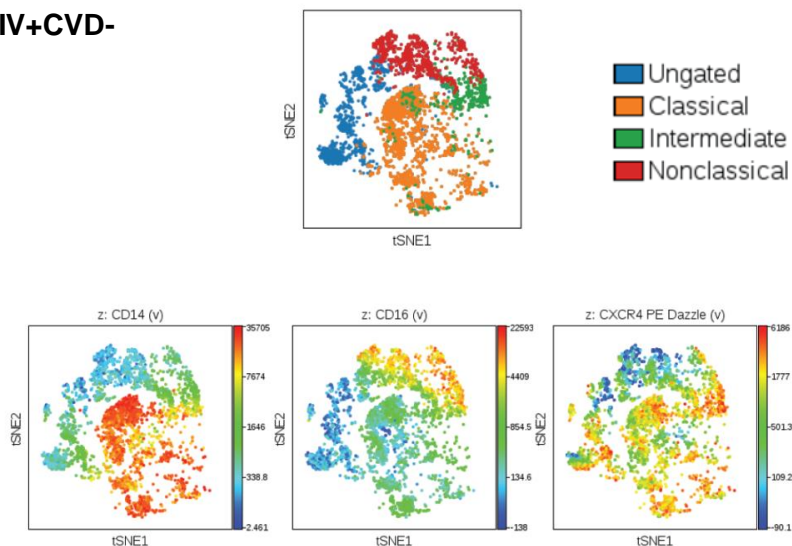


Abb. 4.5.4: ViSNE-Darstellung der Oberflächenexpression bei HIV-positiven und CVD-negativen Probandinnen. In der oberen Darstellung stellt sich die Eingrenzung der einzelnen Monozyten-Populationen nach manuellem Gating dar. Die unteren Darstellungen zeigen die Expressionshöhe der von CD14, CD16 und CXCR4 in den jeweiligen Populationen. Blau weist auf eine niedrige Expression hin, rot auf eine starke Expression.

HIV+CVD+

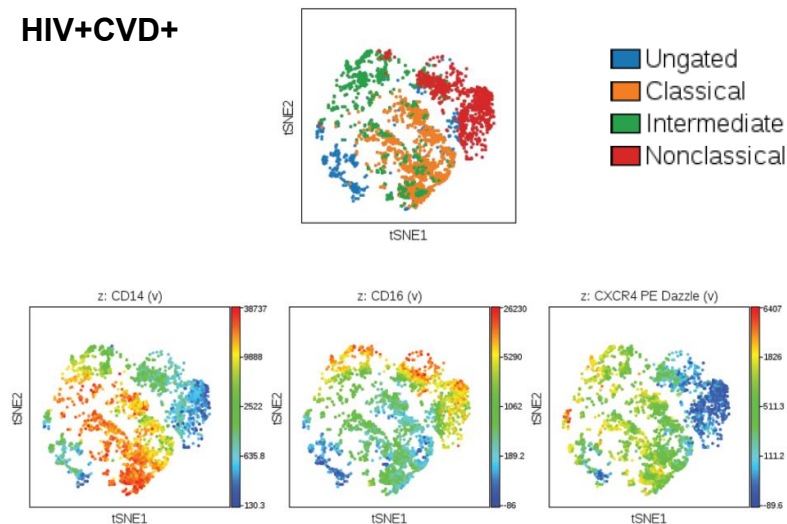


Abb. 4.5.4: ViSNE-Darstellung der Oberflächenexpression bei HIV-positiven und CVD-positiven Probandinnen. In der oberen Darstellung stellt sich die Eingrenzung der einzelnen Monozyten-Populationen nach manuellem Gating dar. Die unteren Darstellungen zeigen die Expressionshöhe der von CD14, CD16 und CXCR4 in den jeweiligen Populationen. Blau weist auf eine niedrige Expression hin, rot auf eine starke Expression.

Betrachten wir nun die Karten der 4 Gruppen im Vergleich, ist auffällig, dass CXCR4 bei HIV-positiven Probandinnen mit subklinischer Atherosklerose von nicht-klassischen Monozyten deutlich schwächer exprimiert wird.

4. Diskussion

Als zentrales Charakteristikum im Entstehungsmodell der Atherosklerose findet sich eine überschießende Inflammationsreaktion, an der zahlreiche immunkompetente Zellen beteiligt sind. Die Einwanderung proinflammatorischer Zellen in das Entzündungsareal unterliegt einer komplexen Dynamik, die nicht vollständig geklärt und verstanden ist. Im Blut zirkulierende Monozyten spielen nach aktuellem Forschungsstand eine Schlüsselrolle in diesem Prozess. Das Verständnis zugrundeliegender Pathomechanismen ist entscheidend, um Hochrisikopatienten frühzeitig zu identifizieren und späte Komplikationen, wie koronare Herzerkrankung und Myokardinfarkt, zu verhindern.

Als Modell zur Erforschung der Pathomechanismen und der Bedeutung peripherer Monozyten für die Entwicklung frühatherosklerotischer Läsionen wählten wir eine Kohorte HIV-positiver Patientinnen. Es ist bekannt, dass HIV-Patienten dem besonders frühen Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und deren Folgeerkrankungen unterliegen.^{35 37 34} Die HIV-Erkrankung ist ebenso insbesondere gekennzeichnet durch eine frühzeitig entstehende chronische Immunaktivierung. Es wird vermutet, dass diese Immunaktivierung, im Zusammenspiel mit Nebenwirkungen antiretroviraler Therapien, zu dem erhöhten kardiovaskulären Risiko beiträgt.³⁴ Aufgrund dieser anhaltenden Immunaktivierung bietet ein HIV-Patientenkollektiv günstige Bedingungen, diesen Zusammenhang zu untersuchen. Es wäre folglich denkbar, dass das Verständnis zugrundeliegender Pathomechanismen ebenso als allgemeingültiges Modell für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei nicht HIV-Infizierten dienen kann.

Wir entschieden uns, die zu vergleichenden Gruppen nach Alter, Raucherstatus und ethnischer Zugehörigkeit zu randomisieren, um eine Vergleichbarkeit der vier Gruppen zu ermöglichen, da diese Parameter bewiesenermaßen als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gelten. Um weitere Störfaktoren auszuschließen, prüften wir, ob sich der beobachtete Zusammenhang unter epidemiologischen Gesichtspunkten als weiterhin

signifikant erweist und bezogen in die statistische Auswertung die Variablen Schulabschluss, Studienzentrum und intravenöser Drogenkonsum ein.

Beim Vergleich unserer erhobenen patientenbezogenen Daten (Tabelle 3) fielen signifikante Unterschiede in der Verteilung des Framingham Risiko Scores auf, welcher das 10-Jahres-Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen abschätzt. Wie zu erwarten, zeigten beide Gruppen mit Probandinnen mit subklinischer Atherosklerose höhere Werte. Traditionelle Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, die in geläufige Framingham-Risikotabellen einfließen, wie arterieller Hypertonus, Diabetes, Rauchen und Hyperlipidämien, stellen auch bei HIV wichtige Parameter zur Risikoabschätzung dar. Somit stellt der Framingham Risiko Score eine gute Möglichkeit zur Abschätzung des Grundrisikos dar. Es ist jedoch unumstritten, dass solche Modelle kein ausreichendes Mittel darstellen, um das tatsächliche Risiko unter HIV-Patienten abzuschätzen.⁹⁸ Die D:A:D (Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs) Studie von 2007 fand, dass der Framingham Risiko Score das kardiovaskuläre Risiko bei HIV-Patienten leicht unterschätzt.⁹⁸ Dies könnte zum einen daran liegen, dass untersuchte HIV-Patienten zum größten Teil jünger sind als Patienten, für die jene Scoring-Systeme ursprünglich entwickelt wurden. Zum anderen beinhalten sie mögliche Auswirkungen der HIV Infektion an sich oder des Gebrauchs antiretroviraler Therapie auf den Gefäßzustand nicht. Folglich wurden neue Scoring-Systeme entwickelt und verbessert, die eine genauere Einschätzung unter Einbezug weiterer Variablen versprechen. Das D:A:D Vorhersagemodell beispielsweise beinhaltet zusätzlich Angaben zur Einnahme antiretroviraler Medikamente und CD4-Zellzahlen.⁹⁹ Friis-Møller et al. zeigten 2013, dass dieses Modell im Vergleich zum Framingham Risiko Score sich besser eignet, um das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei HIV-Patienten abzuschätzen.⁹⁹

Bei beiden Gruppen HIV-positiver Patientinnen untersuchten wir ebenfalls die Einnahmehäufigkeit von Abacavir, einem Medikament, das bei langfristiger Einnahme mit einem erhöhten Risiko für Herzinfarkt in Verbindung gebracht werden konnte. Wir konnten ausschließen, dass Unterschiede in der Einnahmehäufigkeit vorlagen und somit einen potentiellen Einfluss auf die

Ergebnisse hatten. Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede in der CD4-Zahl der Patientinnen und der HIV-Viruslast. Es ist sinnvoll, dies auszuschließen, da niedrige CD4-Zellzahlen und eine hohe Viruslast als Risikofaktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankung bei HIV Patienten gelten.⁴⁹

Man ist sich schlussendlich einig, dass HIV-Patienten eine intensiviertere Risikoabschätzung benötigen, um mögliche kardiovaskuläre Erkrankungen in frühen Stadien festzustellen. Diese Risikoevaluation sollte, zusätzlich zu traditionellen Risikofaktoren und HIV-bedingten Faktoren, jedoch auch bildgebende Untersuchungen der Gefäße beinhalten. Auf Möglichkeiten der bildgebenden Diagnostik wird im weiteren Verlauf der Diskussion eingegangen.

4.1. Oberflächenexpression auf Monozyten-Populationen

Es wird vermutet, dass CX3CR1, dem Rezeptor für CX3CL1, eine entscheidende Bedeutung für die Rekrutierung von Monozyten an den Ort inflammatorischen Geschehens zukommt.⁶⁹ Der Fractalkine-Chemokinrezeptor scheint hauptsächlich die Migration CD16+ proinflammatorischer Monozyten zu vermitteln.⁶⁹

Neben seiner Bedeutung für die Atherosklerose scheint CX3CR1 auch bei der HIV-Erkrankung involviert zu sein. Funktionelle Polymorphismen des Gens für CX3CR1 sind klinisch relevant für beide Pathologien.¹⁰⁰ Veränderungen des Gens für CX3CR1 wurden mit einer erhöhten Suszeptibilität für das HI-Virus assoziiert.⁸⁵ Probanden mit jenem M280 Polymorphismus zeigten gleichzeitig eine deutliche Verringerung kardiovaskulärer Erkrankungen, was eine wichtige Rolle des Rezeptors bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques vermuten lässt.¹⁰¹ Die proatherogene Rolle von CX3CR1 bestätigten Experimente an CX3CL1^{-/-} ApoE^{-/-} Mäusen, welche nach Defekt des entsprechenden Liganden für CX3CR1 eine deutliche Verlangsamung der Läsionsprogression bei diesen Mäusen zeigten.¹⁰² In unseren Untersuchungen zeigten klassische Monozyten im Gesamtkollektiv eine signifikant niedrigere Expression des Fractalkine-Rezeptors CX3CR1 als intermediäre und nicht-klassische Monozyten. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Rezeptorexpression in Bezug auf

HIV und subklinische Atherosklerose feststellen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigte Wong et al. die niedrigste Expression für CX3CR1 kodierende Gene in klassischen Monozyten.⁷² Bei der Untersuchung potentieller Prädiktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen bei HIV-positiven Patienten konnte Westhorpe et al. eine Assoziation der CX3CR1-Expression auf CD16+ Monozyten mit der Intima-Media-Dicke nachweisen. Jene Assoziation konnte nicht in der Kontrollgruppe HIV-negativer Probanden gezeigt werden.¹⁰³ Dies lässt sich mit der Vermutung in Vereinbarung bringen, dass insbesondere CD16+ Monozyten eine besondere proinflammatorische Rolle und Bedeutung für die Atheroprogession zukommt. Eine weitere Studie von 2013 zeigte, dass Expressionsraten von CX3CR1 mit der Progression der Intima-Media-Dicke bei HIV-Patienten korrelieren.¹⁰⁰ Dieses Ergebnis erscheint plausibel, denn in Humanstudien, sowie in Mausmodellen, konnte gezeigt werden, dass CX3CR1 für die Aufrechterhaltung der Monozytenadhäsion und das Überleben innerhalb des Plaques in atherosklerotisch veränderten Arterien verantwortlich zu sein scheint.¹⁰⁴ Wir stellten lediglich fest, dass klassische Monozyten insgesamt signifikant weniger CX3CR1 exprimieren als intermediäre und nicht-klassische Monozyten. Dass unsere Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der CX3CR1-Expression und kardiovaskulärer Erkrankung bei HIV-Patienten nicht feststellen konnten, könnte zum einen daran liegen, dass wir die Progression der Intima-Media-Dicke nicht untersuchten, könnte aber auch zum anderen an einer unzureichend großen Studienpopulation und Unterschieden in der Auswahl der Patientencharakteristika liegen. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um einen eventuellen Zusammenhang zu belegen.

Nach dem aktuellen Stand der Forschung nehmen der Chemokinrezeptor CCR2 und sein Ligand MCP-1 eine zentrale Rolle in der Zellrekrutierung und Atherogenese ein. CCR2 (CD192) zeigt in unseren Untersuchungen eine signifikant höhere Expression auf klassischen Monozyten, gefolgt von intermediären und nicht-klassischen Monozyten. Dieses Ergebnis ist stimmig mit früheren Beobachtungen⁵² und der Vermutung, dass CCR2 insbesondere für die Rekrutierung klassischer Monozyten an den Ort geschädigten Endothels

zuständig ist. CCR2-Defizienz bei Mäusen führt zu einer drastischen Veränderung der Monozyten Mobilisierung. Beispielsweise führt sie zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Mobilisierung klassischer Monozyten aus dem Knochenmark und folglich verringerten Anzahl zirkulierender klassischer Monozyten, nicht jedoch CD16-positiver Monozyten.⁸⁴ Daraus lässt sich folgern, dass CCR2 insbesondere für die Chemotaxis klassischer Monozyten essenziell ist, nicht jedoch CD16-positiver Monozyten. Ebenso verdeutlichen Experimente an CCR2-defizienten Mäusen die Bedeutung des Rezeptors und seines Liganden MCP-1 für die Atherosklerose. Boring et al. zeigte 1998, dass bei ApoE^{-/-} Mäusen die Abwesenheit von CCR2 die Läsionsformierung signifikant herabsetzt.²² Nicht-klassische Monozyten HIV-positiver Patientinnen zeigten in unserer Kohorte signifikant niedrigere Raten an CCR2 als nicht-klassische Monozyten HIV-negativer Frauen. In Übereinstimmung mit der Studie von Westhorpe et al. konnten wir keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen CCR2-Expression und subklinischer Atherosklerose bei HIV-Patienten feststellen.¹⁰³ Ebenso konnte CCR2 nicht als möglicher Prädiktor für die Atherosklerose Progression bei HIV-Patienten von Fernández-Sender et al. identifiziert werden.¹⁰⁰ Insgesamt lässt sich also die klare Funktion des Rezeptors für klassische Monozyten erkennen, aber keine prädiktive Aussagekraft für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen bei HIV-positiven Patienten.

Der Leukozytenaktivierungsmarker CD11b ist Teil des Zelladhäsionsmoleküls Mac-1 (CD11b/CD18) und beteiligt an der Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Entzündung.¹⁰³ Ebenso spielt das Oberflächenmolekül eine Rolle bei der Monozytenmigration in atherosklerotische Plaques und hohe CD11b Spiegel wurden im Mausmodell mit Atherosklerose in Verbindung gebracht.¹⁰⁵ CD11b zeigt in der gesamten Kohorte unserer Studie ein signifikant unterschiedliches Expressionsmuster auf allen drei Monozyten-Populationen. Die niedrigste Expression findet sich auf nicht-klassischen, gefolgt von intermediären und klassischen Monozyten. Dies lässt sich mit vorangegangenen Studien in Vereinbarung bringen.⁷² Nicht-klassische Monozyten HIV-Erkrankter zeigen zusätzlich in unseren Untersuchungen eine niedrigere Expression als

jene Monozyten HIV-negativer Frauen. Im Vergleich der vier Gruppen zeigt die Gruppe HIV-Erkrankter mit subklinischer Atherosklerose knapp nicht-signifikant niedrigere Werte auf nicht-klassischen Monozyten als die Gruppe HIV-negativer Frauen ohne kardiovaskuläre Erkrankungen ($p=0,059$). Westhorpe et al. führte 2014 eine ähnliche Studie durch und kam zu dem Schluss, dass zusätzlich zu CX3CR1, CD11b als unabhängiger Indikator für subklinische Atherosklerose bei HIV-Erkrankten dienen kann.¹⁰³ Er zeigte eine inverse Korrelation des Aktivierungsmarkers mit der Intima-Media-Dicke unabhängig von traditionellen Risikofaktoren. Wir konnten einen Zusammenhang solcher Stärke nicht feststellen. Um diesen Zusammenhang weiterführend zu prüfen, wäre es sinnvoll, größere Folgestudien durchzuführen.

Die Literatur kommt zu insgesamt widersprüchlichen Ergebnissen, wenn es um die Expression von CD163 auf Monozyten geht. Mit ursächlich hierfür scheinen vor allem Unterschiede in der Methode der Isolierung mononukleärer Zellen und der Verwendung von Antikörpern zu sein.⁸⁷ Bei der Aktivierung peripherer Monozyten und Makrophagen kann es zu einer Ablösung der membrangebunden Form des Rezeptors und einem Anstieg der löslichen Form sCD163 kommen.⁸³ Eine Erhöhung der freien Form lässt sich als Zeichen der Monozytenaktivierung bei vielen inflammatorischen Erkrankungen, mitunter auch HIV, feststellen.⁵¹ Ebenso konnte sCD163 mit der Atheroprogression bei HIV-Patienten in Verbindung gebracht werden.^{82 83 79} Wir konnten feststellen, dass der Scavenger-Rezeptor CD163 von nicht-klassischen Monozyten signifikant weniger exprimiert wird als von den anderen beiden Gruppen. Bei subklinischer Atherosklerose kam es jedoch auf klassischen Monozyten zu einer signifikanten Erhöhung der Expression, und bei nicht-klassischen bei HIV-Infektion zu einer Erniedrigung. Castley et al. zeigte 2014 ähnliche Verteilungen des Rezeptors auf den drei Populationen insgesamt, bei HIV-Infektion jedoch eine höhere Expression von CD163 auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten, wobei letzterer Unterschied nur zwischen einer Kontrollgruppe HIV-negativer Probanden und der Gruppe HIV-positiver Probanden mit hoher Viruslast bestand.⁸⁰ Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie von 2011, die auf intermediären Monozyten HIV-Infizierter signifikant höhere Spiegel an

CD163 fand.⁸⁷ Diese Theorie, dass die HIV-Infektion die Aktivierung CD16+ Monozyten unterstützt, konnten wir anhand der Messung dieses Aktivierungsmarkers nicht belegen. Einen möglichen Erklärungsansatz könnten Unterschiede in der untersuchten Kohorte bieten. Unsere Probandinnen hatten größtenteils eine kontrollierte Viruslast (Mittelwert 15.349), während unter den männlichen Probanden von Castley et al. im Schnitt eine höhere Viruslast zu finden war (Mittelwert 30.905). Unsere Studie beinhaltete leider nicht die Messung von sCD163, eine solche Messung hätte jedoch die Beobachtung, dass CD163 bei HIV-Patienten auf nicht-klassischen Monozyten signifikant weniger exprimiert wird, erklären können, indem es parallel zu einem Anstieg der löslichen Form des Rezeptors kommt. Bei Patienten mit HIV und Atherosklerose fanden wir ebenfalls eine Erniedrigung des Rezeptors, welche jedoch nicht signifikant war. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist somit unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

CD36, als Rezeptor für oxidiertes LDL, übernimmt eine entscheidende Rolle bei der zellulären Aufnahme und Metabolisierung von Lipiden und somit ebenso bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen. In experimentellen Studien zeigten CD36-defiziente Mäuse ein deutlich reduziertes Auftreten atherosklerotischer Plaques.¹⁰⁶ Moore et al. zeigte im Gegensatz dazu jedoch, dass bei CD36-defizienten Mäusen dennoch eine alternative und teils schwerwiegendere Form der Schaumzellbildung stattfinden kann und somit etablierte Paradigmen überdacht werden müssen.¹⁰⁷ Bei Patienten konnte gezeigt werden, dass, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, eine angeborene CD36-Defizienz einhergeht mit Dyslipidämie und eingeschränkter Glukosetoleranz, ebenso wie einer erhöhten Morbidität koronarer Herzerkrankungen.⁹⁴ In einer Kohorte HIV-positiver Patienten wurde eine erhöhte Expression von CD36 auf zirkulierenden Monozyten gezeigt, welche jedoch nicht direkt mit Messungen subklinischer Atherosklerose in Verbindung gebracht wurde.¹⁰⁸ Die Studie unterschied ebenso wenig zwischen einzelnen Monozyten-Populationen. Untersuchungen bei 67 Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigten hingegen, dass erniedrigte Expressionsraten von CD36 auf

mononukleären Zellen aus peripherem Blut mit subklinischer Atherosklerose assoziiert sind und mit der Höhe proinflammatorischer Zytokine im Serum korrelieren.¹⁰⁹ Unsere Ergebnisse zeigten, dass nicht-klassische Monozyten signifikant weniger CD36 exprimieren. Beim Vorkommen subklinischer Atherosklerose gab es keinen signifikanten Unterschied in der Expressionshöhe, bei HIV-positiven Frauen zeigten nicht-klassische Monozyten jedoch niedrigere Raten an CD36. Interessanterweise zeigte Boyer et al. 2007, dass die Oberflächenexpression von CD36, aber auch mRNA Level, durch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) moduliert werden kann.¹¹⁰ Das Zytokin ist an zahlreichen Entzündungsprozessen, wie Atherosklerose und Autoimmunreaktionen, wie rheumatoider Arthritis, beteiligt. Boyer zeigte, dass eine Herunterregulation des Oberflächenmoleküls CD36 auf peripheren mononukleären Zellen in der Gegenwart von TNF- α stattfindet und eine Zunahme der Expressionshöhe nach Gabe des TNF- α Blockers Adalimumab.¹¹⁰ Schon frühe Studien haben erkannt, dass TNF- α involviert ist in die virale Replikation und Pathogenese der HIV-Infektion. In einer prospektiven Kohortenstudie von 2015 wurde eine vermehrte Tumornekrosefaktor- α Produktion bei HIV-Erkrankten unter antiretroviraler Therapie gefunden, welche im Laufe der Krankheitsprogression zunimmt.¹¹¹ Diese Beobachtung könnte unser Ergebnis erklären, dass HIV zu einer Herunterregulation der CD36-Expression auf Monozyten führt. Es wäre denkbar, dass für den Nachweis eines ebenso signifikanten Zusammenhangs mit der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankung eine fortgeschrittene Krankheitsaktivität nötig wäre.

Der Chemokinrezeptor CCR5 wurde ursprünglich bekannt als Korezeptor für das HI-Virus bei der Infektion von Makrophagen.¹¹² Ohne CCR5 auf der Zelloberfläche ist es insbesondere R5 HIV-1 (M-tropisch), dem am häufigsten vorkommenden Stamm, nicht möglich, an Makrophagen oder andere CCR5-exprimierende Zellen anzudocken und diese zu infizieren.⁶ Beweisend hierfür ist die natürlich vorkommende Mutation des CCR5 Gens. Homozygote CCR5 Δ 32-Mutationsträger zeigen eine Resistenz gegen den entsprechenden Stamm.⁹³ Diesen Effekt macht sich in der HIV-Therapie die Behandlung mit

dem selektiven Entry-Inhibitor Maraviroc zunutze.¹¹² Nicht effektiv zeigt sich die Therapie bei sogenannten T-Zell-tropischen (X4) Stämmen, die CXCR4 als Korezeptor verwenden.⁶

Weitere Untersuchungen von Patienten mit dem CCR5 Δ 32-Allel zeigten eine reduzierte Anfälligkeit für koronare Herzerkrankung und einen Schutz vor Myokardinfarkt.¹¹² Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Hemmung von CCL2, CX3CR1 und CCR5 das Auftreten von Atherosklerose bei ApoE^{-/-} Mäusen verhindern kann.²³

Hsu et al. fanden 2016 eine Assoziation der Expression von CCR5 auf Monozyten mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei HIV-Patienten.¹¹³ Weitere Studien von 2013 lassen vermuten, dass CCR5 eine mögliche Vorhersagekraft für die Atherosklerose Entwicklung bei HIV-Patienten besitzt.¹⁰⁰ Es wird daher von Interesse sein, zu evaluieren, ob zugelassene CCR5 Inhibitoren, wie Maraviroc, sich ebenfalls positiv auf das kardiovaskuläre Risiko auswirken.

Bei CCR5 konnten wir in unserer Untersuchungsserie auf nicht-klassischen Monozyten eine signifikant niedrigere Expression finden, im Vergleich zu klassischen und intermediären Monozyten, welche einen ähnlichen Phänotyp zeigten. Unter Einbezug beider Variablen (HIV und CVD) zeigten klassische Monozyten der Kontrollgruppe (HIV-CVD-) eine knapp signifikant niedrigere CCR5-Expression im Vergleich zu HIV-CVD+ Probandinnen. Diese Beobachtung bestätigt, dass dem Chemokinrezeptor CCR5 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen zukommt.

4.2. Häufigkeit der Monozyten-Populationen bei HIV und subklinischer Atherosklerose

Da Monozyten eine zentrale Rolle bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen spielen, konzentrieren sich zahlreiche Studien auf die Untersuchung möglicher Unterschiede in der Ausprägung der einzelnen Subpopulationen.

Die Vermutung einer proinflammatorischen Bedeutung CD16+ Monozyten stützt sich mitunter auf Untersuchungen zu deren Vorkommen bei kardiovaskulären Erkrankungen.⁵⁵ Studien an Patienten mit koronarer Herzerkrankung zeigten

einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit CD16+ Monozyten und koronarer Herzerkrankung.⁵⁸ Ebenso konnte ein Zusammenhang mit der Stärke der KHK festgestellt werden.¹¹⁴ Rogacev et al. zeigte eine Assoziation zwischen der Häufigkeit intermediärer Monozyten und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, wie kardiovaskulärem Tod, akutem Myokardinfarkt und ischämischem Schlaganfall.⁷⁵

Wir konnten bei HIV-positiven Probandinnen mit subklinischer Atherosklerose keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung klassischer, intermediärer und nicht-klassischer Monozyten, sowie CD16+ und CD16- Monozyten, im Vergleich zu HIV-negativen Frauen ohne kardiovaskuläre Erkrankung feststellen. Man könnte somit annehmen, dass Veränderungen der Häufigkeit der Monozyten-Populationen sich als Marker für fortgeschrittene kardiovaskuläre Erkrankung eignen, nicht aber für eine subklinische Atherosklerose.

Ebenso konnte Longenecker et al. keinen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit einzelner Monozyten-Populationen und der Intima-Media-Dicke bei HIV-Positiven feststellen.¹¹⁵ Allerdings untersuchten Longenecker et al., sowie auch wir in unserer Studie, größtenteils Probanden unter antiretroviraler Therapie und mit niedriger Viruslast. In Bezug auf die HIV-Erkrankung an sich zeigten Studien von Castley et al. nur bei einer hohen Viruslast signifikante Unterschiede in der Verteilung der Populationen. So zeigten Patienten mit einer hohen Viruslast signifikant mehr intermediäre und signifikant erniedrigte klassische Monozyten.⁸⁰ Es wäre also denkbar, dass Veränderungen in der Verteilung der Monozyten-Populationen bei HIV nur bei hoher Krankheitsaktivität transparent sind.

Baker et al. zeigte hingegen in einer prospektiven Studie von 2014 mit 436 HIV-positiven Teilnehmern eine Assoziation zwischen der Anzahl CD16+ Monozyten und der Progression koronarer Kalzifizierung (CAC).¹¹⁶ Die CAC und IMT sind beides anerkannte nicht-invasive bildgebende Methoden, die zusätzlich zu traditionellen Risikoeinschätzungen angewendet werden, um die Wahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Erkrankungen abzuschätzen. Zahlreiche Studien bestätigen, dass die IMT-Bestimmung, sowie CAC-Scans eine positive

Vorhersagekraft für kardiovaskuläre Erkrankungen besitzen.¹¹⁷ Nicht einig ist man sich, welcher Marker die größere Vorhersagekraft besitzt. Während eine prospektive Studie asymptomatischer Probanden von Folsom et al. von 2008 und weitere Meta-Analysen zeigten, dass CAC-Scores koronare Herzerkrankung und kardiovaskuläre Erkrankungen insgesamt besser anzeigen, zeigte sich die Intima-Media-Dicke als besserer Prädiktor für Schlaganfall.¹¹⁷ Dem entgegen steht eine kleine prospektive Studie mit älterem Patientenkollektiv, in der sich CAC und IMT mit vergleichbarer Vorhersagekraft für koronare Herzerkrankung und kardiovaskuläre Erkrankungen präsentierten.¹¹⁸ Man könnte somit annehmen, dass die Intima-Media-Dicke sich besser eignet für die Abschätzung des kardiovaskulären Risikos im Alter, während die CAC den besseren Prädiktor für eine Kohorte junger asymptomatischer Patienten darstellt. Es sollte folglich überdacht werden, ob die Messung der Intima-Media-Dicke in unserer Studie den geeigneten Surrogat-Marker darstellt, und eventuell ein Zusammenhang zwischen subklinischer Atherosklerose und der Anzahl CD16+ Monozyten verdeckt blieb. Zusammenfassend bieten sich als Erklärungsansätze für den nicht nachweisbaren Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der Monozyten-Populationen und subklinischer Atherosklerose HIV-infizierter Frauen: die niedrige HIV-Krankheitsaktivität der Kohorte, das frühe Stadium der kardiovaskulären Erkrankung oder die diskutable Auswahl der Intima-Media-Dicke als Surrogat-Marker.

4.3. CXCR4 und subklinische Atherosklerose bei HIV-Patienten

Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Als G-Protein gekoppelter Rezeptor löst die Bindung seines Hauptliganden CXCL12, aber auch MIF, eine intrazelluläre Signalkaskade aus.¹¹⁹ Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von MAPK- und PI3K-Signaltransduktionswegen in Gange gesetzt wird, ebenso wie die Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium mittels Aktivierung der Phospholipase C. Außerdem kann eine β -Arrestin Rekrutierung, und folgende Endozytose des G-Protein-gekoppelten Rezeptors stattfinden.¹²⁰ Neben seiner zentralen Bedeutung für die Regulierung

der Mobilisierung von Stammes- und Progenitorzellen in das periphere Blut wird die Rolle von CXCR4 und seinem Liganden CXCL12 (SDF-1) für die Atheroprogression kontrovers diskutiert. Nach Myokardinfarkt, einer der häufigsten Komplikationen kardiovaskulärer Erkrankungen, führte in Studien die direkte Injektion von CXCL12 zur Reduktion der Infarktgröße.¹²¹ Die Rekrutierung von Progenitorzellen an den Ort der Schädigung, in diesem Falle das Myokard, scheint essenziell für diese Entwicklung zu sein.¹²⁰ Es ist bekannt, dass der Mechanismus einer Hochregulierung von CXCL12 und CXCR4 Hypoxie bedingt ist.¹²¹ Mäuse, denen CXCL12 injiziert wurde, entwickelten zudem stabilere Plaques, die ein geringeres Risiko für eine Plaqueruptur mit sich bringen.¹²² Dies könnten insgesamt Hinweise darauf sein, dass die CXCR4-vermittelte Rekrutierung von Progenitorzellen in atherosklerotische Läsionen sich atheroprotektiv auswirkt. In der Klinik findet die Modulierung der CXCR4/CXCL12-Achse bereits durch Gabe von M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) und folglich Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark Anwendung. CXCL12 und CXCR4 werden jedoch von einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert und genaue zellspezifische Aufgaben müssen noch geklärt werden. In Makrophagen beispielsweise, spielt CXCR4 eine Rolle bei der Makropinozytose, und so wird schlussendlich eine relevante Bedeutung für die Aufnahme von oxidiertem LDL und die Entstehung von Schaumzellen vermutet.¹¹⁹ Die Behandlung mit dem CXCR4-Inhibitor AMD3100 führte im Mausmodell zu vermehrten atherosklerotischen Läsionsgebieten durch verstärkte Mobilisierung Neutrophiler.¹¹⁹ Auch in Humanstudien gibt es viele Hinweise auf eine Bedeutung des Rezeptors und seines Liganden für die Atherogenese. Interessanterweise, ergaben genomweite Assoziationsstudien, dass CXCL12 möglicherweise ein wichtiges Kandidatengen für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankung darstellt.¹²³ Angina pectoris Patienten zeigten niedrigere Plasmalevel von CXCL12 und erniedrigte Expressionsraten von CXCR4 auf peripheren mononukleären Zellen, hinweisend wieder auf einen atheroprotektiven Effekt.¹²⁴ Eine weitere Studie mit Angina pectoris Patienten hingegen zeigte eine signifikant höhere Expression von an Plättchen-gebundenem CXCL12 auf Patienten mit akutem

Koronarsyndrom im Vergleich zu stabiler Angina pectoris und eine positive Korrelation der CXCL12-Expression mit der Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen. Ebenso korrelierten Plasma CXCL12-Level mit der Plättchenaktivierung, was für eine eher atherogene Rolle von CXCL12 spricht.¹²⁵ Immunhistochemische Färbungen atherosklerotischer Läsionen zeigten erhöhte Expressionsraten von CXCL12 im Vergleich zu gesunden Gefäßen.¹²⁶ Dieser hervorstechende Konflikt lässt sich insofern erklären, dass proinflammatorische Zellen, sowie auch Progenitorzellen, beide CXCR4-positiv sind und mithilfe der gleichen Mechanismen rekrutiert werden.¹²⁷ Auch wenn klinische Studien zu einem großen Teil widersprüchlich erscheinen, ist es doch eindeutig, dass CXCR4 und CXCL12 eine entscheidende Rolle für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen und kardiovaskulärer Erkrankungen spielen.

In unserer Studie konnten wir einen deutlichen Zusammenhang zwischen erniedrigter CXCR4 Expression auf nicht-klassischen Monozyten und subklinischer Atherosklerose bei HIV-Patientinnen feststellen. Dieser Zusammenhang zeigte sich ebenfalls unter Einbezug möglicher Störfaktoren, wie Schulabschluss, injizierender Drogenkonsum und Studienzentrum, in Regressionsanalysen als signifikant. Der Zusammenhang war ebenso reproduzierbar, wenn jeweils nur eine Variable HIV+ vs. HIV- und CVD+ vs. CVD- verglichen wurde. Die niedrige Expression von CXCR4 auf nicht-klassischen Monozyten von HIV-Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung könnte somit einen ungünstigen Phänotyp darstellen und die Funktion genannter Monozyten beeinträchtigen. Um herauszufinden, ob der vorgeschlagene Marker CXCR4 prädiktiv für die Entwicklung subklinischer Atherosklerose ist, wird es nötig sein, weitere prospektive longitudinale Studien durchzuführen. Ein solcher Marker mit wünschenswerter Vorhersagekraft wäre jedoch von immenser Bedeutung für die Früherkennung und Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen bei HIV-Erkrankten.

4.4. Limitationen

Unsere Kohorte beschränkte sich auf die Untersuchung von 92 Patientinnen mit oder ohne HIV-Infektion und Zeichen subklinischer Atherosklerose. Von der Studie ausgeschlossen waren Patientinnen mit manifester kardiovaskulärer Erkrankung und nicht-kontrollierter Viruslast. Diese engen Einschlusskriterien erwiesen sich als Vorteil, da wir uns darauf fokussierten, frühe Prädiktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen bei HIV-Patienten zu identifizieren, welche insbesondere eine kontrollierte Viruslast aufweisen. Diese Patienten mit niedriger Viruslast stellen nämlich die Mehrheit der Patienten in Industrienationen mit hohen Gesundheitsstandards dar. Ebenso ergeben sich hierdurch aber auch Grenzen in der Übertragbarkeit, beispielsweise auf Länder mit nicht vergleichbarer Gesundheitsversorgung. Als Surrogat-Parameter verwendeten wir die Intima-Media-Dicke statt klinischer Endpunkte. Ein Surrogat-Parameter stellt eine einfache und schnelle Methode dar, klinische Endpunkte vorherzusagen, sicherlich sind jedoch, wenn möglich, klinische Endpunkte vorzuziehen, um Trugschlüsse zu verhindern. Die Charakterisierung der Monozyten-Populationen und Messung von Oberflächenmarkern fand lediglich bei einem einzigen Studienbesuch statt. Es handelt sich hierbei also folglich eher um eine beobachtende und hypothesengenerierende Querschnittsstudie. Es wäre interessant, zu untersuchen, ob die Ergebnisse sich auf männliche Probanden übertragen lassen und was für einer Dynamik die Expression der Oberflächenmarker in prospektiven Longitudinalstudien unterliegt. Um die hier gemachten Beobachtungen zu belegen wird es von Nöten sein, weitere umfangreiche longitudinale Studien, mit vorzugsweise klinischen Endpunkten, durchzuführen, um ebenso mögliche zugrundeliegende kausale Zusammenhänge und Pathomechanismen zu klären.

5. Zusammenfassung

Weltweit sind 34 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert. HIV-infizierte Patienten tragen, trotz antiretroviraler Therapie und unabhängig vom Immunstatus, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer atherosklerotischer Erkrankungen. Nach jahrelang asymptomatischen Verlauf führt die Atherosklerose bei HIV-Patienten häufig vorzeitig zu einer Funktionseinschränkung des Herzen oder einem Myokardinfarkt. Die HIV-Infektion führt zur chronischen Immunaktivierung, welche im Zusammenspiel mit Nebenwirkungen antiretroviraler Therapien und traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko beiträgt. Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Progression bis hin zur Ruptur atherosklerotischer Läsionen spielen nach aktuellem Kenntnisstand eine Vielzahl inflammatorischer Zellen. Dennoch sind die genauen zugrundeliegenden Mechanismen nicht hinreichend geklärt. Monozyten spielen eine zentrale Rolle in diesem multifaktoriellen Inflammationsgeschehen, und die Untersuchung des Beitrages einzelner Subpopulationen stellt ein aktuelles Ziel der Forschung dar.

Basierend auf einer großen HIV-Studienkohorte (Women's Interagency HIV Study) untersuchten wir die Oberflächenexpression auf Monozyten von 92 Patientinnen, die Intima-Media-Dicke Messungen erhalten hatten, um das kardiovaskuläre Risiko abzuschätzen. Alle Patientinnen waren frei von symptomatischen kardiovaskulären Erkrankungen. Ziel der Studie war es, neue Biomarker ausfindig zu machen, die eine intensiviertere und verbesserte frühzeitige Risikoabklärung für asymptomatische Atherosklerose bei HIV-Infizierten ermöglichen.

Wir untersuchten Unterschiede in der Verteilung der Häufigkeit von drei Monozyten-Populationen. Es zeigte sich jedoch, dass in unserer Kohorte mit relativ niedriger HIV-Krankheitsaktivität und lediglich subklinischer Atherosklerose keine Unterschiede in der Verteilung klassischer, intermediärer und nicht-klassischer Monozyten vorliegen.

Wir konnten allerdings beobachten, dass insbesondere nicht-klassische Monozyten HIV-infizierter Frauen mit asymptomatischer Atherosklerose einen veränderten Phänotyp aufweisen. Diese Zellpopulation zeigte, unabhängig von traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren, eine signifikant erniedrigte Expression des Oberflächenrezeptors CXCR4, welcher in zahlreichen Studien mit kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht wurde. Es wird daher von Interesse sein, in größeren Folgestudien zu prüfen, ob dieses Ergebnis reproduzierbar ist. Es wäre wünschenswert, einen solchen Biomarker mit entsprechender Vorhersagekraft, zusätzlich zu traditionellen und HIV-bedingten Risikofaktoren und bildgebenden Untersuchungen, in ein Früherkennungsmodell für kardiovaskuläre Erkrankungen bei HIV-Patienten zu integrieren. Zusätzlich wäre es interessant, zugrundeliegende Pathomechanismen und das Zusammenspiel des Chemokinrezeptors mit seinen entsprechenden Liganden zu untersuchen. Das Verständnis dieser Mechanismen könnte als potentiell allgemeingültiges Modell für die Pathogenese atherosklerotischer Erkrankung auch bei nicht HIV-infizierten Patienten dienen.

6. Literaturverzeichnis

1. Gallo R, Sarin P, Gelmann E, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* (80-). 1983;4599:865-867.
2. UNAIDS. Global AIDS Update. 2016. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/global-aids-update-2016-pub/en/>. Accessed September 26, 2016.
3. Robert-Koch-Institut. Schätzung der Prävalenz und Inzidenz von HIV-Infektionen in Deutschland, Stand Ende 2014. *Epidemiol Bull.* 2015. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/Ausgaben/45_15.pdf?__blob=publicationFile. Accessed September 26, 2016.
4. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell.* 1998;93(5):681-684. doi:10.1016/S0092-8674(00)81430-0.
5. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science.* 1998;280(5371):1884-1888. doi:10.1126/science.280.5371.1884.
6. Moore J, Kitchen S. The CCR5 and CXCR4 coreceptors-central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. ... *Res Hum* 2004;20(1):111-126. <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/088922204322749567>.
7. Freed E. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet.* 2001;26:13-33.
8. Hogg R, Lima V, Sterne J, et al. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet.* 2008;372(9635):293-299. doi:10.1016/S0140-6736(08)61113-7.
9. Grulich A. Cancer: the effects of HIV and antiretroviral therapy, and implications for early antiretroviral therapy initiation. *Curr Opin HIV AIDS.* 2009;4(3):183-187.
10. French AL, Gawel SH, Hershov R, et al. Trends in mortality and causes of death among women with HIV in the United States: a 10-year study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;51(4):399-406. doi:10.1097/QAI.0b013e3181acb4e5.
11. Hasse B, Ledergerber B, Furrer H, et al. Morbidity and aging in HIV-infected persons: The swiss HIV cohort study. *Clin Infect Dis.* 2011;53(11):1130-1139. doi:10.1093/cid/cir626.
12. Giorgi J V, Hultin LE, McKeating J a, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis.* 1999;179(4):859-870. doi:10.1086/314660.
13. Lichtfuss G, Hoy J, Rajasuriar R, Kramski M, Crowe S, Lewin S. Biomarkers of immune dysfunction following combination antiretroviral therapy for HIV infection. *Biomark Med.* 2011;2:171-186.

14. Giorgi J, Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989;52:10-18.
15. Paiardini M, Müller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev.* 2013;254(1):78-101. doi:10.1111/imr.12079.
16. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, et al. T Cell Activation Is Associated with Lower CD4 + T Cell Gains in Human Immunodeficiency Virus – Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral Therapy. 2003;94121.
17. Brenchley JM, Price D a., Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12(12):1365-1371. doi:10.1038/nm1511.
18. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(9):655-666. doi:10.1038/nrmicro2848.
19. Statistisches Bundesamt. Todesursachen. 2015. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>. Accessed September 26, 2016.
20. Ross R. Atherosclerosis - An inflammatory disease. *N Engl J Med.* 2004;115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207.
21. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(11):2292-2301. doi:10.1161/ATVBAHA.107.149179.
22. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394(6696):894-897. doi:10.1038/29788.
23. Combadière C, Potteaux S, Rodero M, et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6Chi and Ly6Clo monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation.* 2008;117(13):1649-1657. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745091.
24. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, et al. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation.* 2007;115(12):1571-1580. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.683201.
25. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):41-57. doi:10.1007/s12026-012-8297-3.
26. Galkina E, Ley K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis*. *Annu Rev Immunol 2009 ; 27 165–197* doi101146/annurev.immunol021908132620 *Immune.* 2009;27:165-197. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132620.Immune.
27. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88(6):1785-1792.

- doi:10.1172/JCI115499.
28. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-809. doi:10.1038/362801a0.
 29. Podrez E a., Febbraio M, Sheibani N, et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest*. 2000;105(8):1095-1108. doi:10.1172/JCI8574E1.
 30. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(September):233-241. doi:10.1038/35025203.
 31. Wilson JM, Ferguson JJ. Platelet-endothelial interactions in atherothrombotic disease: Therapeutic implications. *Clin Cardiol*. 1999;22(11):687-698. doi:10.1002/clc.4960221103.
 32. Ives NJ, Gazzard BG, Easterbrook PJ. The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in London clinic. *J Infect*. 2001;42(2):134-139. doi:10.1053/jinf.2001.0810.
 33. Freiberg MS, Chang C-CH, Kuller LH, et al. HIV infection and the risk of acute myocardial infarction. *JAMA Intern Med*. 2013;173(8):614-622. doi:10.1001/jamainternmed.2013.3728.
 34. Savès M, Chêne G, Ducimetière P, et al. Risk factors for coronary heart disease in patients treated for human immunodeficiency virus infection compared with the general population. *Clin Infect Dis*. 2003;37(2):292-298. doi:10.1086/375844.
 35. Triant V a, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(7):2506-2512. doi:10.1210/jc.2006-2190.
 36. Segev a, Cantor WJ, Strauss BH. Outcome of percutaneous coronary intervention in HIV-infected patients. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2006;68(November):879-881. doi:10.1002/ccd.20774.
 37. Hanna D, Post W, Deal J, et al. HIV Infection Is Associated With Progression of Subclinical Carotid Atherosclerosis. *Clin Infect Dis*. 2015;61(Cvd):[Epub ahead of print]. doi:10.1093/cid/civ325.
 38. Hodis HN. The Role of Carotid Arterial Intima-Media Thickness in Predicting Clinical Coronary Events. *Ann Intern Med*. 1998;128(4):262. doi:10.7326/0003-4819-128-4-199802150-00002.
 39. Ross AC, Rizk N, O'Riordan MA, et al. Relationship between inflammatory markers, endothelial activation markers, and carotid intima-media thickness in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2009;49(7):1119-1127. doi:10.1086/605578.
 40. Henry K, Melroe H, Huebsch J et al. Severe premature coronary artery disease with protease inhibitors. *Lancet*. 1998.
 41. Beltran LM, Rubio-navarro A, Amaro- JM, Egido J, García-puig J, Moreno

- JA. Influence of immune activation and inflammatory response on cardiovascular risk associated with the human immunodeficiency virus. 2015:35-48.
42. Hemkens LG, Bucher HC. HIV infection and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2014;35(21):1373-1381. doi:10.1093/eurheartj/ehs528.
 43. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, et al. Association between hepatitis C virus seropositivity, carotid-artery plaque, and intima-media thickening. *Lancet*. 2002;359(9301):133-135. doi:10.1016/S0140-6736(02)07339-7.
 44. Sosner P, Wangermez M, Chagneau-Derrode C, Le Moal G, Silvain C. Atherosclerosis risk in HIV-infected patients: The influence of hepatitis C virus co-infection. *Atherosclerosis*. 2012;222(1):274-277. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.027.
 45. Bedimo R, Westfall a. O, Mugavero M, Drechsler H, Khanna N, Saag M. Hepatitis C virus coinfection and the risk of cardiovascular disease among HIV-infected patients. *HIV Med*. 2010;11(7):462-468. doi:10.1111/j.1468-1293.2009.00815.x.
 46. Tien PC, Schneider MF, Cole SR, et al. Association of hepatitis C virus and HIV infection with subclinical atherosclerosis in the women's interagency HIV study. *AIDS*. 2009;23(13):1781-1784. doi:10.1097/QAD.0b013e32832d7aa8.
 47. Hsue PY, Hunt PW, Sinclair E, Brecht B, Franklin A, Killian M, Hoh R, Martin JN, McCune JM, Waters DD DS. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. *AIDS*. 2006;20(18):2275-2283.
 48. Baker J V., Henry WK, Patel P, et al. Progression of carotid intima-media thickness in a contemporary human immunodeficiency virus cohort. *Clin Infect Dis*. 2011;53(8):826-835. doi:10.1093/cid/cir497.
 49. Ho JE, Scherzer R, Hecht FM, et al. The association of CD4+ T-cell counts and cardiovascular risk in treated HIV disease. *AIDS*. 2012;26(9):1115-1120. doi:10.1097/QAD.0b013e328352ce54.
 50. van Lelyveld SFL, Gras L, Kesselring A, et al. Long-term complications in patients with poor immunological recovery despite virological successful HAART in Dutch ATHENA cohort. *Aids*. 2012;26(4):465-474. doi:10.1097/QAD.0b013e32834f32f8.
 51. Burdo TH, Lentz MR, Autissier P, et al. Soluble CD163 made by monocyte/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2011;204(1):154-163. doi:10.1093/infdis/jir214.
 52. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557.
 53. Ingersoll M. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. - PubMed - NCBI. 2012;32(10):470-477. doi:10.1016/j.it.2011.05.001.Monocyte.

54. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock L. Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. *Blood*. 1989;74(7):2527-2534.
55. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81(3):584-592. doi:10.1189/jlb.0806510.
56. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, et al. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(10):2578-2586. doi:10.1002/art.10545.
57. Allen JB, Wong HL, Guyre PM, Simon GL, Wahl SM. Association of circulating receptor Fc gamma RIII-positive monocytes in AIDS patients with elevated levels of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest*. 1991;87(5):1773-1779. doi:10.1172/JCI115196.
58. Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, et al. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-?? levels. *Thromb Haemost*. 2004;92(2):419-424. doi:10.1160/TH04-02-0095.
59. Fingerle G, Pforte a, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood*. 1993;82(10):3170-3176. doi:7693040.
60. Fernandez GC, Ramos M, Gomez S, et al. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. *J Leukoc Biol*. 2005;78:853-861. doi:10.1189/jlb.0505251.1.
61. Horelt A, Belge K, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1319-1327. doi:10.1002/1521-4141(200205)32:5<1319::AID-IMMU1319>3.0.CO;2-2.
62. Wildenberg ME, Welzen-Coppens JMC, van Helden-Meeuwesen CG, et al. Increased frequency of CD16+ monocytes and the presence of activated dendritic cells in salivary glands in primary Sjögren syndrome. *Ann Rheum Dis* . 2009;68(3):420-426. doi:10.1136/ard.2008.087874.
63. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168(7):3536-3542. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3536.
64. Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, et al. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp Hematol*. 2004;32(8):748-755. doi:10.1016/j.exphem.2004.05.027.
65. Saha P, Geissmann F. Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol Cell Biol*. 2010;89(1):0. doi:10.1038/icb.2010.130.
66. Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science (80-)*. 2007;317:666-670.

67. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82. doi:10.1016/S1074-7613(03)00174-2.
68. Ingersoll M, Spanbroek R, Lottaz C, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*. 2010;115(3):10-20. doi:10.1182/blood-2009-07-235028.differential.
69. Ancuta P, Rao R, Moses a, et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med*. 2003;197(12):1701-1707. doi:10.1084/jem.20022156.
70. Ziegler-heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):5-7. doi:10.1182/blood-2010-02-258558.
71. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, et al. SuperSAGE evidence for CD14 ++CD16 + monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 2011;118(12):50-62. doi:10.1182/blood-2011-01-326827.
72. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16-e31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355.
73. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14brightCD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum*. 2012;64(3):671-677. doi:10.1002/art.33418.
74. Stansfield BK, Ingram D a. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin Transl Med*. 2015;4:5. doi:10.1186/s40169-014-0040-3.
75. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, et al. CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: A cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(16):1512-1520. doi:10.1016/j.jacc.2012.07.019.
76. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008;67(2):152-159. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x.
77. Ellery PJ, Tippett E, Chiu Y-L, et al. The CD16+ Monocyte Subset Is More Permissive to Infection and Preferentially Harbors HIV-1 In Vivo. *J Immunol*. 2007;178(10):6581-6589. doi:10.4049/jimmunol.178.10.6581.
78. Peter Libby, MD*, Matthias Nahrendorf, MD, PhD†, and Filip K. Swirski P. Monocyte Heterogeneity in Cardiovascular Disease. *October*. 2008;141(4):520-529. doi:10.1016/j.surg.2006.10.010.Use.
79. McKibben R a., Margolick JB, Grinspoon S, et al. Elevated levels of monocyte activation markers are associated with subclinical atherosclerosis in men with and those without HIV infection. *J Infect Dis*. 2015;211(8):1219-1228. doi:10.1093/infdis/jiu594.

80. Castley A, Berry C, French M, Fernandez S, Krueger R, Nolan D. Elevated Plasma Soluble CD14 and Skewed CD16+ Monocyte Distribution Persist despite Normalisation of Soluble CD163 and CXCL10 by Effective HIV Therapy: A Changing Paradigm for Routine HIV Laboratory Monitoring? *PLoS One*. 2014;9(12):e115226. doi:10.1371/journal.pone.0115226.
81. Nockher W a, Bergmann L, Scherberich JE. Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*. 1994;98(3):369-374.
82. Shaked I, Hanna DB, Gleißner C, et al. Macrophage inflammatory markers are associated with subclinical carotid artery disease in women with human immunodeficiency virus or hepatitis C virus infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(5):1085-1092. doi:10.1161/ATVBAHA.113.303153.
83. Burdo TH, Lo J, Abbara S, et al. Soluble CD163, a novel marker of activated macrophages, is elevated and associated with noncalcified coronary plaque in HIV-infected patients. *J Infect Dis*. 2011;204(8):1227-1236. doi:10.1093/infdis/jir520.
84. Serbina N V, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7(3):311-317. doi:10.1038/ni1309.
85. Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*. 2000;287(5461):2274-2277. doi:10.1126/science.287.5461.2274.
86. Westhorpe CL V, Maisa A, Spelman T, et al. Associations between surface markers on blood monocytes and carotid atherosclerosis in HIV-positive individuals. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(2):133-138. doi:10.1038/icb.2013.84.
87. Tippett E, Cheng WJ, Westhorpe C, et al. Differential Expression of CD163 on Monocyte Subsets in Healthy and HIV-1 Infected Individuals. *PLoS One*. 2011;6(5). doi:10.1371/journal.pone.0019968.
88. Wilson EMP, Singh A, Hullsiek KH, et al. Monocyte-activation phenotypes are associated with biomarkers of inflammation and coagulation in chronic HIV infection. *J Infect Dis*. 2014;210(9):1396-1406. doi:10.1093/infdis/jiu275.
89. Zou YR, Kottmann a H, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393(6685):595-599. doi:10.1038/31269.
90. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382(6592):635-638. doi:10.1038/382635a0.
91. Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al. The lymphocyte chemoattractant

- SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996;382(6594):829-833. doi:10.1038/382829a0.
92. Wu CH, Wang CJ, Chang CP, Cheng YC, Song JS, Jan JJ, Chou MC, Ke YY, Ma J, Wong YC, Hsieh TC, Tien YC, Gullen EA, Lo CF, Cheng CY, Liu YW, Sadani AA, Tsai CH, Hsieh HP, Tsou LK SK. Function-oriented development of CXCR4 antagonists as selective human immunodeficiency virus (HIV)-1 entry inhibitors. *J Med Chem*. 2015;58(3):1452-1465.
 93. Samson M, Libert F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996;382(6593):722-725. doi:10.1038/382722a0.
 94. Yuasa-Kawase M, Masuda D, Yamashita T, et al. Patients with CD36 deficiency are associated with enhanced atherosclerotic cardiovascular diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(3):263-275. doi:10.5551/jat.10603.
 95. Woollard KJ. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Mol Cell Biol*. 2010;7(2):1-19. doi:10.1038/nrcardio.2009.228.Monocytes.
 96. Kaplan RC, Sinclair E, Landay AL, et al. T Cell Activation and Senescence Predict Subclinical Carotid Artery Disease in HIV-Infected Women. 2011;203. doi:10.1093/infdis/jiq071.
 97. Amir ED, Davis KL, Tadmor MD, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol*. 2013;31(6):545-552. doi:10.1038/nbt.2594.
 98. Friis-Møller N, Worm SW. Can the risk of cardiovascular disease in HIV-infected patients be estimated from conventional risk prediction tools? *Clin Infect Dis*. 2007;45(8):1082-1084. doi:10.1086/521936.
 99. Friis-Møller N, Ryom L, Smith C, et al. An updated prediction model of the global risk of cardiovascular disease in HIV-positive persons; the Data-collection on Adverse Effects of Anti-HIV Drugs (D:A:D) Study. *Antivir Ther*. 2013;18:A23-A24. doi:10.1177/2047487315579291.
 100. Fernández-Sender L, Alonso-Villaverde C, Rull A, et al. A possible role for CCR5 in the progression of atherosclerosis in HIV-infected patients: a cross-sectional study. *AIDS Res Ther*. 2013;10:11. doi:10.1186/1742-6405-10-11.
 101. Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, Raselli S, Grigore L, Catapano AL. Effects of fractalkine receptor variants on common carotid artery intima-media thickness. *Stroke*. 2006;37(6):1558-1561. doi:10.1161/01.STR.0000221803.16897.22.
 102. Saederup N, Chan L, Lira S a., Charo IF. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: Evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation*. 2008;117(13):1642-1648. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743872.
 103. Westhorpe CL V, Maisa A, Spelman T, et al. Associations between

- surface markers on blood monocytes and carotid atherosclerosis in HIV-positive individuals. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(2):133-138. doi:10.1038/icb.2013.84.
104. Zerneck A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(11):1897-1908. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161174.
 105. Hearps AC, Maisa A, Cheng W-J, et al. HIV infection induces age-related changes to monocytes and innate immune activation in young men that persist despite combination antiretroviral therapy. *Aids.* 2012;26(November 2011):843-853. doi:10.1097/QAD.0b013e328351f756.
 106. Febbraio M, Podrez E a, Smith JD, et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest.* 2000;105(8):1049-1056. doi:10.1172/JCI9259.
 107. Moore KJ, Kunjathoor V V., Koehn SL, et al. Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *J Clin Invest.* 2005;115(8):2192-2201. doi:10.1172/JCI24061.
 108. Meroni L, Riva A, Morelli P, et al. Increased CD36 expression on circulating monocytes during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;38(3):310-313.
 109. Gómez-bañuelos E, Martín-márquez BT, Martínez-garcía EA, et al. Low Levels of CD36 in Peripheral Blood Monocytes in Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis : A Cross-Sectional Study in a Mexican Population. 2014;2014. doi:10.1155/2014/736786.
 110. Boyer JF, Balard P, Authier H, et al. Tumor necrosis factor alpha and adalimumab differentially regulate CD36 expression in human monocytes. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):R22. doi:10.1186/ar2133.
 111. Wada NI, Jacobson LP, Margolick JB, et al. The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation Nikolas. *AIDS.* 2015;29(4):463-471. doi:10.1097/QAD.0000000000000545.The.
 112. Jones KL, Maguire JJ, Davenport a. P. Chemokine receptor CCR5: From AIDS to atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 2011;162(7):1453-1469. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01147.x.
 113. Hsu DC, Ma YF, Hur S, et al. Plasma IL-6 levels are independently associated with atherosclerosis and mortality in HIV-infected individuals on suppressive ART. *AIDS.* 2016;30(13):2065-2074. doi:10.1097/QAD.0000000000001149.
 114. Ozaki Y, Imanishi T, Taruya A, et al. Circulating CD14+CD16+ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Circ J.* 2012;76(10):2412-2418. doi:10.1253/circj.CJ-12-0412.
 115. Longenecker CT, Funderburg NT, Jiang Y, et al. Markers of inflammation

- and CD8 T-cell activation, but not monocyte activation, are associated with subclinical carotid artery disease in HIV-infected individuals. *HIV Med.* 2013;14(6):385-390. doi:10.1111/hiv.12013.
116. Baker J V, Hullsiek KH, Singh A, et al. Immunologic predictors of coronary artery calcium progression in a contemporary HIV cohort. *AIDS.* 2014;28(6):831-840. doi:10.1097/QAD.000000000000145.
 117. Folsom AR, Kronmal R a, Detrano RC, et al. Coronary Artery Calcification Compared with Carotid Intima- Media Thickness in Prediction of Cardiovascular Disease Incidence: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Epidemiology.* 2008;168(12):1333-1339. doi:10.1001/archinte.168.12.1333.Coronary.
 118. Newman AB, Naydeck BL, Ives DG, et al. Coronary Artery Calcium, Carotid Artery Wall Thickness, and Cardiovascular Disease Outcomes in Adults 70 to 99 Years Old. *Am J Cardiol.* 2008;101(2):186-192. doi:10.1016/j.amjcard.2007.07.075.
 119. van der Vorst EPC, D??ring Y, Weber C. Chemokines and their receptors in Atherosclerosis. *J Mol Med.* 2015;93(9):963-971. doi:10.1007/s00109-015-1317-8.
 120. van der Vorst EPC, D??ring Y, Weber C. MIF and CXCL12 in cardiovascular diseases: Functional differences and similarities. *Front Immunol.* 2015;6(JUL):1-13. doi:10.3389/fimmu.2015.00373.
 121. Hu X, Dai S, Wu W-J, et al. Stromal Cell Derived Factor-1 Confers Protection Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Role of the Cardiac Stromal Cell Derived Factor-1 CXCR4 Axis. *Circulation.* 2007;116(6):654-663. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.672451.
 122. Akhtar S, Gremse F, Kiessling F, Weber C, Schober A. CXCL12 promotes the stabilization of atherosclerotic lesions mediated by smooth muscle progenitor cells in apoe-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(4):679-686. doi:10.1161/ATVBAHA.112.301162.
 123. Farouk SS, Rader DJ, Reilly MP, Mehta NN. CXCL12: A New Player in Coronary Disease Identified through Human Genetics. *Trends Cardiovasc Med.* 2010;20(6):204-209. doi:10.1016/j.tcm.2011.08.002.
 124. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, et al. Stromal cell-derived factor-1?? in unstable angina potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation.* 2002;106(1):36-42. doi:10.1161/01.CIR.0000020001.09990.90.
 125. Stellos K, Bigalke B, Langer H, et al. Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *Eur Heart J.* 2009;30(5):584-593. doi:10.1093/eurheartj/ehn566.
 126. Abi-Younes S, Sauty a, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster a D. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2000;86(2):131-138. doi:10.1161/01.RES.86.2.131.

127. Morimoto H, Takahashi M, Shiba Y, et al. Bone marrow-derived CXCR4+ cells mobilized by macrophage colony-stimulating factor participate in the reduction of infarct area and improvement of cardiac remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Pathol.* 2007;171(3):755-766.
doi:10.2353/ajpath.2007.061276.

7. Erklärung zum Eigenanteil der vorliegenden Dissertationsschrift

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitätsklinik Tübingen von Prof. Dr. Tobias Geisler betreut und unter Supervision von Dr. Karin Müller am La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego experimentell durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Klaus Ley, M.D. (La Jolla Institute for allergy and Immunology, San Diego), Robert C. Kaplan, Ph.D. (Albert Einstein College of Medicine, New York), Alan L. Landay, Ph.D. (Rush University, Chicago), David B. Hanna, Ph.D. (Alberst Einstein College of Medicine, New York) und Dr. Karin Müller (UKT, Post-Doc am La Jolla Institute).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Karin Müller von mir in Zusammenarbeit mit Erik Ehinger (Flow Cytometry Specialist, La Jolla Institute for Allergy and Immunology) selbstständig durchgeführt.

Die Sortierung der Monozyten-Populationen erfolgte unter Cheryl Kim durch die Flow Cytometry Facility am La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Dr. Karin Müller.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 11.03.2019

8. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Karin Müller für die direkte Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit, sowie Ihr Interesse mir eine wissenschaftliche Arbeitsweise zu vermitteln.

Herrn Prof. Tobias Geisler danke ich für seine freundliche Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Universität Tübingen zu übernehmen.

Dem Personal des La Jolla Institutes for Allergy and Immunology, San Diego, danke ich für die Aufnahme und kompetente Hilfe beim Durchführen der Messungen, insbesondere Herrn Prof. Klaus Ley für die Überlassung des Themas.

Ebenso danke ich all denen, die beruflich und privat stetig an meiner Seite standen.