

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Die Rolle von Interleukin-10  
für den Wirkmechanismus von  
monozytären myeloid-derived suppressor cells  
(M-MDSC)  
in der chronischen HIV-1 Infektion**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Lukas Philipp Arenz**

aus Herrenberg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Rika Draenert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Eberle

PD Dr. Bernd Sporer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2019

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Humane Immunschwäche Virus (HIV) – Ein globales Problem .....	1
1.2	Der Ablauf der Infektion mit dem Humanen Immunschwäche Virus (HIV) ....	2
1.2.1	Erste Phase, die Primärinfektion .....	2
1.2.2	Zweite Phase, die asymptomatisch Phase.....	2
1.2.3	Dritte Phase, das erworbene Immunschwächesyndrom .....	3
1.3	Zytotoxische CD8-T-Zellen in der HIV Infektion .....	4
1.4	Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) .....	4
1.4.1	Expansion und Akkumulation von MDSC .....	5
1.4.2	Identifizierung von MDSC .....	6
1.4.3	MDSC in der HIV Infektion .....	6
1.4.4	Mechanismen der CD8-T-Zell Hemmung durch humane M-MDSC.....	8
1.5	Interleukin-10 (IL-10).....	9
1.5.1	IL-10 in der HIV Infektion .....	10
1.6	Zielsetzung der Arbeit .....	12
2	Material.....	13
2.1	Verbrauchsmaterial.....	13
2.2	Geräte.....	14
2.3	Chemikalien und Reagenzien.....	15
2.4	Medien .....	16
2.5	Antikörper .....	16
2.6	Software.....	17
3	Methodik.....	18
3.1	Schematischer Versuchsablauf.....	18
3.2	Studienteilnehmer.....	19
3.2.1	Studienkohorte .....	19
3.2.2	Positivkontrolle .....	19
3.2.3	Negativkontrolle.....	19
3.3	Blutentnahme .....	20
3.4	PBMC Isolierung aus Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation .....	21
3.5	Zellzahlbestimmung .....	22
3.6	Färbung von PBMC mit Fluoreszenzantikörpern (IL-10 ex vivo).....	22

3.7	Magnetseparation von CD8-T-Zellen und CFSE-Färbung.....	23
3.8	Inkubation der CFSE gefärbten CD8-T-Zellen mit IL-10-R $\alpha$ blockierendem Antikörper .....	23
3.9	Magnetseparation von CD14-Zellen.....	24
3.10	Durchflusszytometrie .....	24
3.11	FACS-Sortierer .....	25
3.12	Proliferationsassays.....	26
3.13	FACS Analyse und Auswertung.....	28
3.13.1	Gating von M-MDSC .....	28
3.13.2	Gating der IL-10 <sup>+</sup> M-MDSC .....	29
3.13.3	Gating der IL-10 <sup>+</sup> Monozyten.....	30
3.13.4	Gating Proliferationsassays.....	31
3.14	Berechnung der suppressiven Kapazität .....	32
3.15	Statistische Auswertungen.....	32
4	Ergebnisse .....	34
4.1	Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren weisen höhere M-MDSC Frequenzen als HIV-1 Patienten und gesunde Probanden auf.....	34
4.2	Keine Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und Viruslast oder CD4-T-Zellen bei HIV-1 .....	36
4.3	Anteil an IL-10 <sup>+</sup> M-MDSC von HIV Patienten und gesunden Probanden ist größer als der von Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren .....	37
4.4	Keine Korrelation zwischen Anteil der IL-10 <sup>+</sup> M-MDSC und Viruslast oder CD4 Zahl.....	38
4.5	Inverse Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und IL-10 Produktion bei HIV-1 Infektion.....	39
4.6	Signifikant mehr spontane IL-10 Produktion von M-MDSC im Vergleich zu Monozyten .....	40
4.7	M-MDSC hemmen die Proliferation von CD8-T-Zellen signifikant .....	41
4.8	Keine Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und suppressiver Kapazität... ..	42
4.9	Keine Wiederherstellung der CD8-T-Zell Proliferation unter Zugabe eines IL-10-R $\alpha$ blockierenden Antikörpers .....	43
5	Diskussion.....	44
5.1	Keine Erhöhung von M-MDSC in der chronischen HIV Infektion .....	44
5.1.1	Zeitpunkt der Blutprobenbearbeitung.....	45
5.1.2	Auswertung (Gating der M-MDSC).....	45
5.2	Zusammenhang zwischen M-MDSC Frequenz und IL-10 Produktion.....	46

5.2.1	Erschöpfung der IL-10 Produktion.....	46
5.2.2	Negative Rückkopplung .....	47
5.3	M-MDSC als IL-10 Hauptproduzenten .....	47
5.4	Keine Wirkung des IL-10-Rezeptor blockierenden Antikörpers auf Wiederherstellung der T-Zell Proliferation .....	48
5.5	M-MDSC Frequenz und suppressive Kapazität.....	50
5.6	Klinische Bedeutung und Ausblick.....	51
6	Literaturverzeichnis .....	52
7	Anhänge .....	57
7.1	Probandenliste IL-10 ex vivo .....	57
7.2	Probandenliste Proliferationsassays .....	59
7.3	Ausführliches Ethikvotum .....	60
7.4	Danksagung.....	61
7.5	Eidesstattliche Versicherung.....	62

## **Zusammenfassung der Arbeit**

Mit über 36 Millionen Erkrankten, stellt die unheilbare HIV Infektion mit ihrer Komplikation des erworbenen Immunschwächesyndroms (AIDS) nach wie vor eines der größten Probleme der globalen Gesundheit dar. In letzter Zeit rückt die Erforschung einer funktionellen Heilung immer mehr in den Fokus. Eine der Voraussetzungen dafür ist ein Immunsystem mit effektiven CD8-T-Zell Antworten. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) sind eine heterogene Gruppe unausgereifter Zellen myeloischem Ursprungs, die bei verschiedenen Erkrankungen über unterschiedliche Mechanismen T-Zell Proliferation inhibieren können. In der vorliegenden Arbeit überprüften wir zunächst, ob in der chronischen HIV-1 Infektion erhöhte Frequenzen des monozytären Subtyps der MDSC (M-MDSC) nachweisbar sind. Dabei konnten wir im Vergleich zu gesunden Probanden keine erhöhte Frequenz und keine Korrelation mit Anzahl der CD4-T-Zellen oder HI-Viruskopien feststellen. Die von uns isolierten M-MDSC waren jedoch in der Lage CD8-T-Zell Proliferation zu inhibieren. Als nächstes überprüften wir, ob das immunmodulatorische Zytokin Interleukin-10 (IL-10) für den proliferationshemmenden Charakter der M-MDSC verantwortlich sein könnte. Interessanterweise konnten wir eine deutliche Spontanproduktion von IL-10 durch M-MDSC nachweisen, die signifikant höher war als die von Monozyten ( $p < 0,0001$ ). Das Ausmaß der IL-10 Produktion korrelierte invers mit der Höhe der M-MDSC Frequenz. Die CD8-T-Zell Proliferation konnte durch den Einsatz eines Interleukin 10-Rezeptor blockierenden Antikörpers allerdings nicht wiederhergestellt werden.

Die vorliegende Arbeit erbrachte neue Erkenntnisse über die Eigenschaften und die Wirkungsweise von M-MDSC in der chronischen HIV-Infektion. Obwohl M-MDSC das Zytokin IL-10 produzieren, ist dieses zumindest nicht allein für die immuninhibitorischen Eigenschaften der M-MDSC verantwortlich. Vermutlich ist es aber Teil eines komplexen immunologischen Regelungsnetzwerkes. Die IL-10 Produktion der M-MDSC nimmt bei fortschreitender HIV-Infektion ab, was darauf hindeutet, dass auch dieser Zelltyp im Infektionsverlauf seine Funktion verliert. Weitere vertiefende Forschung ist notwendig, um die Rolle der M-MDSC und ihre suppressive Wirkungsweise auf T-Zellen vollständig klären zu können.

## Abkürzungen

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
APC	Allophycocyanin
cART	Combined antiretroviral therapy
CD 4	Cluster of Differentiation 4
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Foxp3	Forkhead box P3
FSC	Forward Scatter
HC	Healthy Controls
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen-DR
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IL-10	Interleukin 10
IL-10-R $\alpha$ -AB	IL-10-Receptor Alpha Blocking Antibody
IL-6	Interleukin 6
LCMV	Lymphozytärer Choriomeningitisvirus
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monomethyl-l-arginine
MDSC	Myeloid derived suppressor cells
M-MDSC	Monocytic myeloid derived suppressor cells
n.a.	not applicbale
NOHA	N-Hydroxy-L-Arginin
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PMN-MDSC	Polymorphnuclear myeloid derived suppressor cells
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SSC	Side Scatter
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Humane Immunschwäche Virus (HIV) – Ein globales Problem

Über 30 Jahre nach der Identifizierung des Retrovirus HIV, stellt der Erreger des Immunschwächesyndroms AIDS nach wie vor eine große Herausforderung an die Menschheit dar. Bleibt das Immunschwächesyndrom unbehandelt, verläuft die Krankheit rasch tödlich. Im Jahr 2016 infizierten sich weltweit 1,8 Millionen Menschen neu mit dem HI-Virus, was zu einer Gesamtzahl von 36,7 Millionen Erkrankten im selben Jahr führte. Menschen, die mit dem HI-Virus infiziert sind, können zum aktuellen Stand 2018 immer noch nicht geheilt werden. Allerdings hat sich Dank der hocheffektiven Therapiemöglichkeit mit der Kombination verschiedener antiretroviraler Medikamente (cART) die Lebenserwartung HIV Infizierter an die durchschnittliche Lebenserwartung der Normalbevölkerung angeglichen. Der kontinuierlich wachsende Anteil HIV Infizierter unter cART weltweit führt dabei zu einer abnehmenden Zahl an AIDS assoziierten Todesfällen[1]. Dennoch bestehen nach wie vor zahlreiche Probleme, aus denen ein uneingeschränkt großer Handlungsbedarf resultiert:

- Armut, Gewalt, mangelhafte (Sexual)-Bildung, Hunger, Stigma und Ausgrenzung führen weiterhin zu hohen HIV Inzidenzen.
- Die Testung auf HIV und die Bereitstellung von antiretroviralen Medikamenten in strukturschwachen Regionen der Erde kann aktuell nur unzureichend gewährt werden. Nur 53% der weltweit mit HIV Infizierten hatte 2016 Behandlungszugang [1].
- Auch wenn die cART erfolgreiche Viruskontrolle verspricht, so verbleibt das Virus im Körper in verschiedenen Reservoirs und ist nicht beseitigt. Abbruch einer antiretroviralen Therapie führt zum Krankheitsfortschritt.
- Für Wirksamkeit und zur Vorbeugung von Virusresistenzen, ist die tägliche und unterbrechungsfreie Einnahme von HIV Medikamenten eine notwendige Voraussetzung.
- Wie jede medikamentöse Therapie, so hat auch die cART ihre Nebenwirkungen, die teilweise zu Einschränkungen und Abbruch der Therapie führen.

Nur durch die Entwicklung einer Impfung oder einer heilenden Therapieform wird die Eradikation von HIV und AIDS in der Zukunft möglich sein. Um der globalen Herausforderung dabei gerecht zu werden ist Grundlagen- und translationale medizinische Forschung in Kombination mit andere Disziplinen und Wissenschaften weiterhin von herausragender Bedeutung[2].

## **1.2 Der Ablauf der Infektion mit dem Humanen Immunschwäche Virus (HIV)**

Bei HIV handelt es sich um ein Retrovirus, der seine genetische Information in das menschliche Genom einarbeitet und langfristig das Immunsystem zerstört[3, 4]. Die Infektion mit dem HI-Virus erfolgt in den häufigsten Fällen sexuell über den Kontakt mit Körperflüssigkeiten infizierter Personen. Weitere Ansteckungsmöglichkeiten bestehen parenteral durch kontaminierte Injektionsnadeln, infektiöse Blutprodukte oder Nadelstichverletzungen. Auch vertikal kann das Virus bei der Geburt oder über die Muttermilch von der Mutter auf das Kind übertragen werden. Gelangt das HI-Virus in den Körper, befällt es Zellen, die das CD4-Oberflächenantigen tragen und wichtig für ein funktionierendes Immunsystem sind [5, 6]. Das sind hauptsächlich CD4-T-Zellen, aber auch Makrophagen, Monozyten, Langerhanszellen der Epidermis und Teile der Mikroglia. Charakteristisch für die HIV Infektion ist ihr Ablauf in mehreren Phasen:

### **1.2.1 Erste Phase, die Primärinfektion**

Im Anschluss an die Infektion kommt es zu einer ausgeprägten und hohen Virusvermehrung im Körper. Dies zeigt sich in der Mehrzahl der Fälle in einem grippeähnlichen Krankheitsbild, dem akuten retroviralen Syndrom. Typische und häufige Symptome dafür sind Fieber, geschwollene Lymphknoten, Kopfschmerzen und Müdigkeit. Die Primärinfektion kann jedoch auch asymptomatisch verlaufen. Das Immunsystem beginnt sich mit dem Virus auseinanderzusetzen. Es kommt zur Ausbildung von virusspezifischen CD8-T-Zellen und Antikörpern. Dies wird als Serokonversion bezeichnet. Der Nachweis der Antikörper gegen HIV kommt im HIV Test zum Tragen. [7]

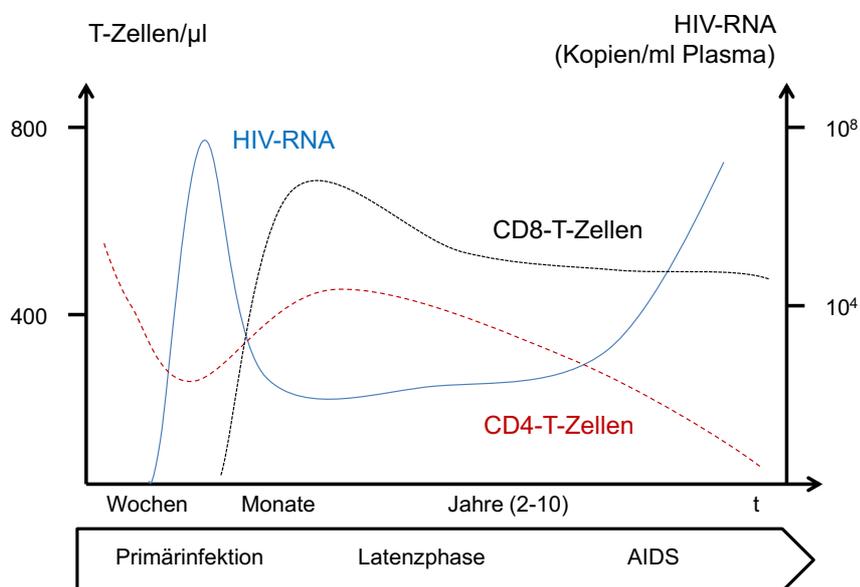
### **1.2.2 Zweite Phase, die asymptomatisch Phase**

Aufgrund der ausgeprägten Immunreaktion sinkt die Anzahl der Viren im Blut auf ein relativ niedriges Niveau. Der Körper scheint die Infektion kontrollieren zu können und

die Betroffenen zeigen keinerlei Symptome. Daher spricht man in der asymptomatischen Phase auch von der Latenzphase. Die Erkrankung schreitet im lymphatischen Gewebe jedoch weiterhin aktiv voran und gewinnt kontinuierlich Oberhand über das Immunsystem[8].

### 1.2.3 Dritte Phase, das erworbene Immunschwächesyndrom

Im Median nach 6-8 Jahren verliert das Immunsystem vollständig die Kontrolle über die Replikation des Virus. Nach und nach werden mehr CD4-T-Zellen infiziert und zerstört. Ist die Anzahl an CD4-T-Zellen weit genug gesunken, ist das Immunsystem nicht in mehr in der Lage, seine Aufgaben korrekt auszuführen. Es kommt dann zu opportunistischen Infektionen. Erreger können dabei Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten sein, die bei gesunden immunkompetenten Personen nicht zu einer Erkrankung führen würden. Auch die Entstehung von bestimmten Malignomen, wie dem Kaposi-Sarkom oder Non-Hodgkin-Lymphomen ist möglich. Das schwerwiegende erworbene Versagen des Immunsystems, das in dieser letzten Krankheitsphase auftritt, wird dann als „Acquired Immune Deficiency Syndrome“ (AIDS) bezeichnet [9].



**Abbildung 1: Ablauf der HIV-Infektion.** Die Primärinfektion ist geprägt durch eine hohe Virusreplikation und messbar hohe Viruslast. Es kommt zum Abfall der CD4-T-Zellen. Mit Einsetzen der Immunantwort (u.a. CD8-T-Zellen) kann das Virus unterdrückt werden und es kommt zum Anstieg der CD4-T-Zellen (Beginn der Latenzphase). Nach Jahren der Latenz, kommt es zur Immunerschöpfung. Das Virus beginnt erneut sich zu replizieren. Die CD4-T-Zellen sinken ab. Es besteht kein ausreichender Schutz vor Erregern opportunistischer Infektionen. Das Endstadium AIDS ist erreicht[10][11].

### 1.3 Zytotoxische CD8-T-Zellen in der HIV Infektion

Im Gegensatz zu anderen viralen Infektionen ist das menschliche Immunsystem nicht in der Lage das HI-Virus zu beseitigen. Über die Jahre erkrankt der Großteil der HIV-Infizierten an AIDS[12]. Um ein Fortschreiten der HIV Infektion in dieses Stadium zu verhindern, ist die Einnahme von antiretroviral wirkenden Medikamenten eine Notwendigkeit.

Allerdings gibt es eine kleine Gruppe (<1%) an HIV-Infizierten, deren Immunsystem auch ohne antiretrovirale Therapie kompetent genug ist, die Virusreplikation über viele Jahre hinweg unter die Nachweisgrenze zu supprimieren und somit ein Fortschreiten der Erkrankung verhindern. Diese Patienten werden als „HIV Controller“ bezeichnet. [13-15]. Verschiedene Ursachen werden als Grund für die besondere Immunkompetenz der „HIV Controller“ diskutiert[15]. Von besonderem Interesse sind dabei CD8-T-Zellen, die bei diesen Patienten vor allem besonders qualitativ hochwertig ausgeprägt sind. Insbesondere ist dabei die Fähigkeit zur Degranulation (CD107a Mobilisation), Zytokin- und Chemokinproduktion beschrieben[16-18], aber auch bessere Proliferationsfähigkeit[19], bessere Erkennung von viralen Proteinen (Gag) [20]und ein geringerer Grad der Immunaktivierung[18]. CD8-T-Zellen haben im Immunsystem die Aufgabe, körpereigene infizierte oder entartete Zellen zu erkennen und zu zerstören. Dazu gehört auch die Beseitigung von Viren. Tatsächlich sind bei „HIV Controllern“ die CD8-T-Zellen in der Lage bereits zu einem frühen Zeitpunkt die HIV Replikation zu unterbrechen und die Virusanzahl im Blut zu reduzieren. [16, 21-23]. Bei Patienten, die in der HIV Erkrankung fortschreiten („HIV Progressor“), weisen die CD8-T-Zellen allerdings Defizite in der Funktionalität auf, welche die Qualität der Immunantwort auf HIV stark beeinträchtigt[16]. Es kommt zur Immunerschöpfung. Die Gründe hierfür sind bisher nicht geklärt. Die Existenz der „HIV-Controller“ mit ihrer starken CD8-T-Zell Antwort gibt Forschern jedoch die Möglichkeit Ursachen für die besondere Immunkompetenz herauszuarbeiten und diese Erkenntnisse in die Entwicklung einer Therapieform der HIV-Infektion einfließen zu lassen.

### 1.4 Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)

Eine Ursache für die virale Persistenz und den Verlust der adäquaten CD8-T-Zell Funktion in der HIV Infektion ist die Präsenz von Myeloid-derived suppressor cells (MDSC). MDSC sind eine heterogene Gruppe von unausgereiften Zellen der

myeloischen Reihe, die in der Lage sind CD8-T-Zell Proliferation zu unterbinden und somit eine adäquate Immunantwort verhindern[24-26](Vgl. 1.4.3).

Bevor die Präsenz dieser Zellsorte in der chronischen HIV Infektion nachgewiesen werden konnte, kam es bereits zu zahlreichen Publikationen über MDSC bei malignen Tumoren. Erstmals wurden sie mit ihren immunsuppressiven Eigenschaften im Jahr 1987 in einem Mausmodell mit Lungenkrebs als „Bone Marrow Suppressor Cells“ beschrieben[27]. 1995 folgte dann die Beschreibung bei Menschen im Bereich von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals Bereich[28]. Später kamen weitere Tumorarten dazu[29-32]. Für die vorliegende Arbeit von Bedeutung ist der Nachweis von MDSC bei Lungenkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, malignen Melanom und B-Zell Non Hodgkin Lymphom [33-38].

#### **1.4.1 Expansion und Akkumulation von MDSC**

In vielen weiteren Situationen, in denen der Körper pathologischen Reizen ausgesetzt ist, akkumulieren MDSC. Solche Reize können Trauma, akute und chronische Entzündung, Sepsis und Infektionen parasitärer, bakterieller und viraler Art sein [39]. Durch ein besonderes Milieu aus Botenstoffen, Wachstums- und Regulierungssignalen kommt es dazu, dass Zellen des Immunsystems, die normalerweise zu Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen oder neutrophilen Granulozyten ausreifen würden, sich nicht mehr richtig entwickeln können. In einem unausgereiften Übergangszustand gewinnen sie dann durch weitere Aktivierung immunsuppressive Eigenschaften. Zu den Aktivierungs- und Regulierungssignalen werden unter anderen Botenstoffe wie IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-13/4, S100A8/9 und IFN- $\gamma$  gezählt [32, 40, 41]. Die physiologische Funktion von MDSC ist vermutlich die eines Regulators der Immunantwort. Reagiert das Immunsystem zu stark oder zu lange auf ein Pathogen, so akkumulieren MDSC, um das Immunsystem zu dämpfen und den Körper vor extensiver Gewebeschädigung zu bewahren. Tumore und manche Infektionen sind in der Lage sich ein Milieu aus den oben genannten Botenstoffen zu schaffen. Sie nutzen den eigentlich autoprotektiven Mechanismus der MDSC, um sich selbst vor einem Zugriff des Immunsystems zu schützen.

## 1.4.2 Identifizierung von MDSC

Die häufig an Mausmodellen durchgeführten Versuche kamen zu dem Schluss, dass MDSC als Identifizierungsmerkmal die Oberflächenantigene CD11b und GR1 tragen. Bei Menschen sind MDSC allerdings schwerer zu markieren, da humane Zellen im Gegensatz zum murinen Modell keinen spezifischen Zellmarker wie GR1 exprimieren. Die Schwierigkeit der MDSC Identifizierung zeigt sich daher in der Literatur durch die Beschreibung einer Vielzahl verschiedener MDSC Phänotypen[42]. Oftmals besteht die Gefahr andere Zelltypen fälschlicherweise als MDSC zu bezeichnen. Daher zeichnete sich in den letzten Jahren ein Konsens ab, der eine Art von Mindeststandard für die Beschreibung von MDSC festlegt. Dabei müssen mindestens zwei Kriterien erfüllt sein[43, 44]:

1. Phänotypische Merkmale: Auf Grund morphologischer, biochemischer und funktioneller Überschneidungen konnten sich in den vergangenen Jahren zwei MDSC Subtypen durchsetzen:
  - **PMN-MDSC** (engl. *polymorphnuclear MDSC*)
    - Oberflächenmoleküle: CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>int</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>
    - Polymorpher Zellkern
    - Ähnlichkeit mit neutrophilen Granulozyten
  - **M-MDSC**(engl. *monocytic MDSC*)
    - Oberflächenmoleküle: CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-low</sup>CD15<sup>-</sup>
    - Mononukleärer Zellkern
    - Ähnlichkeit mit Monozyten
2. Nachweis immunsuppressiver Eigenschaften: Dies zeigt sich hauptsächlich in der Fähigkeit der MDSC T-Zell Proliferation und Aktivität zu supprimieren und unterscheidet sie damit von neutrophilen Granulozyten und Monozyten.

## 1.4.3 MDSC in der HIV Infektion

### 1.4.3.1 PMN-MDSC

Unsere Arbeitsgruppe wies im Jahr 2012 zum ersten Mal erhöhte PMN-MDSC Frequenzen bei chronisch HIV Infizierten ohne cART nach. Interessanterweise zeigten jedoch „HIV Controller“ niedrigere PMN-MDSC Frequenzen auf. PMN-MDSC korrelierten positiv mit Viruslast und negativ mit CD4-T-Zellen. Desweiteren konnten

diese in vitro eine CD8-T-Zell Proliferation inhibieren und die Expansion von regulatorischen T Zellen (Vgl. 1.4.4.5) induzieren. Beginn einer antiretroviralen Therapie führte zu einem Absinken der PMN-MDSC Frequenz[26]. Passend hierzu konnten auch in einer anderen Studie keine PMN-MDSC bei therapierten HIV-Patienten ohne Viruslast nachgewiesen werden[45]. Tumino et al. konnten bei HIV-Infizierten ebenfalls erhöhte PMN-MDSC Frequenzen im Vergleich zu Gesunden messen, allerdings keine Unterschied zwischen therapierten und chronisch Infizierten. PMN-MDSC konnten in dieser Studie nachweislich die Expression der CD3- $\zeta$ -Ketten des T-Zell Rezeptor Komplexes reduzieren, welche wichtig für die Kopplung von Antigen und T-Zell Rezeptor sind [25]. Bereits in der HIV Primärinfektion sind PMN-MDSC erhöht, allerdings niedriger als in der chronischen Infektion[46]. Im Widerspruch hierzu beobachtet eine andere Studie jedoch keinen Unterschied in Höhe der Frequenz zwischen akuter und chronischer HIV Infektion und zieht Rückschlüsse hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen Höhe der PMN-MDSC Frequenz und Parametern der fortschreitenden Erkrankung in der Primärinfektion [47].

#### **1.4.3.2 M-MDSC**

Erhöhte M-MDSC Frequenzen konnten bei HIV-1 Patienten ohne Therapie gemessen werden[24, 48]. Nach Therapiebeginn sanken diese ab, verblieben aber immer noch auf einem höheren Niveau, als bei gesunden Kontrollpatienten[24, 45]. Eine positive Korrelation von M-MDSC mit der Viruslast und eine inverse Korrelation mit CD4 Zellen konnte bei nicht therapierten Patienten festgestellt werden[24], nicht allerdings bei Patienten unter cART [45]. M-MDSC Expansion konnten in vitro sowohl direkt durch das HIV-Protein gp120 und *Tat*[24, 45], als auch indirekt über das Protein gp120 und IL-6 induziert werden[48]. M-MDSC konnten sowohl die Proliferation von CD8-T-Zellen, als auch deren Funktion inhibieren, allerdings auf Grund unterschiedlicher Mechanismen(vgl.1.4.4)[24, 48]. Auch CD4-T-Zellen konnten in ihrer Funktion durch M-MDSC gehemmt werden. Im Gegensatz zu den erwähnten Forschungsergebnissen, konnten in unserer Arbeitsgruppe bei chronischen HIV Patienten ohne cART bisher keine erhöhten M-MDSC Frequenzen gemessen werden[26].

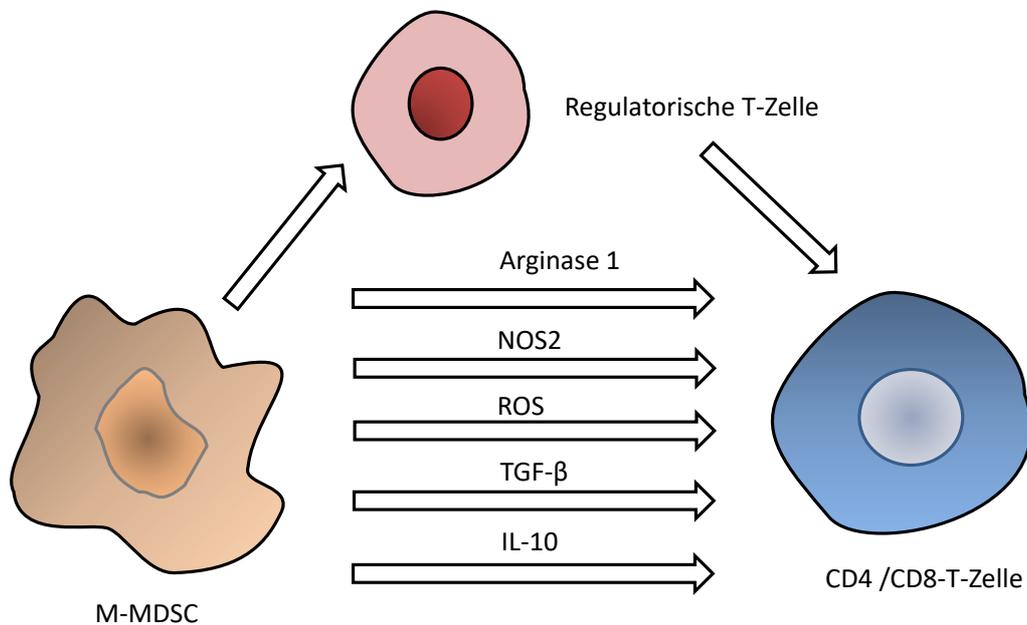
#### 1.4.4 Mechanismen der CD8-T-Zell Hemmung durch humane M-MDSC

Verschiedene Mechanismen der T-Zell Suppression durch humane M-MDSC sind beschrieben. Dabei kommt es je nach Erkrankung zu teilweise unterschiedlichen und teilweise überlappenden Suppressionsmechanismen.

In verschiedenen Studien wird die suppressive Aktivität von M-MDSC mit einer erhöhten Arginase-1 Aktivität erklärt [24] [33] [37] [38] [49] [50]. Durch eine erhöhte Arginase-1 Aktivität kommt es zu einem Verbrauch an L-Arginin, welches für eine funktionierende T-Zell Proliferation und die Ausbildung der CD3 $\zeta$  Kette des T-Zell Rezeptor Komplexes von wichtiger Bedeutung ist [51]. In allen Studien konnte die immunsuppressive Aktivität der M-MDSC in vitro durch Addition des Arginase-1 Inhibitors N-Hydroxy-L-Arginin (NOHA) oder durch Zugabe des Substrats L-Arginin wieder aufgehoben werden. Ein weiteres Enzym, welches L-Arginin als Substrat verbraucht ist die Stickstoffmonoxid-Synthase NOS2. Bei Influenza A und auch HIV konnte die suppressive MDSC Aktivität durch die Zugabe des NOS2 Inhibitors N<sup>G</sup>-monomethyl-l-arginine (L-NMMA) in vitro wieder aufgehoben werden[48, 49]. MDSC sind darüber hinaus in der Lage über bestimmte Sauerstoffradikale (ROS, engl. *reactive oxygen species*) die CD8-T-Zell Funktion zu schwächen[52]. Die Zugabe des ROS inaktivierenden Enzyms Katalase führte in vitro zur Wiederherstellung der CD8-T-Zell Proliferation[48, 53]. Regulatorische T-Zellen beeinflussen das Immunsystem und sollen den Körper vor Autoimmunität schützen[54]. M-MDSC können CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen induzieren, die in der Lage sind T-Zellen zu inhibieren[33] [45, 48].

M-MDSC von Patienten mit malignem Melanom zeigten eine erhöhte ex-vivo Sekretion von TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ , engl. *Transforming Growth Factor beta*). Dies führte zu Suppression von T-Zell Proliferation und -Funktion. Die Wiederherstellung der T-Zell Proliferation wurde durch Zugabe von TGF- $\beta$  blockierenden Antikörpern in vitro wiederhergestellt [36]. Ebenfalls konnten in einer Studie bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Aszites HLA-DR<sup>-</sup> Monozyten gefunden werden, die TGF- $\beta$ 2 und IL-10 produzierten und T-Zell Proliferation inhibierten. Auch hier war dieser Effekt durch Zugabe von TGF- $\beta$ 2 Antikörpern in Kombination mit IL-10-Rezeptor blockierenden Antikörpern reversibel[55].

In einer Prostatakarzinomstudie konnten ebenfalls IL-10 produzierende M-MDSC gemessen werden[56]. Bei HIV konnten M-MDSC in Koinkubation mit CD4-T-Zellen diese zur IL-10 Produktion anregen[48].



**Abbildung 2:** Beschriebene Wirkmechanismen von M-MDSC auf T-Zell Proliferation/-Funktion.

## 1.5 Interleukin-10 (IL-10)

Interleukine gehören zur Gruppe der Zytokine. Diese sind Signalstoffe des Immunsystems. Sie werden hauptsächlich von Leukozyten sezerniert und regeln die Antwort des Immunsystems auf das Eindringen von Antigenen. Interleukin-10 ist ein Homodimer und Polypeptid, welches aus 160 Aminosäuren zusammengesetzt ist [57]. Seiner Funktionsweise nach ist es ein Immunmodulator.

Es wird unter anderem von Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, B-Zellen und T-Zellen produziert. Bei Infektionen des Körpers durch Bakterien, Viren, Würmer oder Protozoen reagiert das Immunsystem stark auf die Eindringlinge. Damit das Immunsystem nicht zu intensiv aktiviert wird und dem eigenen Körpergewebe schadet, benötigt es eine Regulierung. IL-10 ist solch ein Regulator, der das Immunsystem hemmen kann, falls es zu stark oder zu lange aktiv ist. Dabei muss der Zeitpunkt und die Stärke der immunregulatorischen Wirkung genau abgepasst sein, damit sowohl eindringende Pathogene beseitigt, als auch der eigene Körper unbeschädigt bleibt [58,

59]. Allerdings gibt es bestimmte Erkrankungen, bei denen die Wirkung von IL-10 eine effektive Infektionsbekämpfung verhindert. Eindrucksvoll waren dabei zwei Studien an Mäusen, die mit dem Lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV) infiziert wurden. Normalerweise verursacht dieses eine chronische Infektion. Wie bei HIV war das Immunsystem der Mäuse also nicht in der Lage das Virus aus dem Körper zu beseitigen. Allerdings konnten Mäuse, die durch gentechnische Veränderung kein IL-10 produzieren konnten, den chronischen LCMV-Typ CL13 durch eine starke T-Zell Antwort beseitigen. Gentechnisch unveränderte Mäuse zeigten dagegen den zu erwartenden Funktionsverlust von T-Zellen und eine persistierende Virusinfektion. Wenn diese gentechnisch unveränderten Mäuse allerdings mit IL-10 blockierendem Antikörper behandelt wurden, waren auch sie in der Lage das Virus zu beseitigen[60, 61].

### 1.5.1 IL-10 in der HIV Infektion

IL-10 ist im Plasma von HIV-positiven Patienten erhöht und korreliert mit Höhe der Viruslast. Ebenso verhält es sich mit dem Gehalt an IL-10 mRNA in HIV PBMC [62-64]. Im Verlauf der Erkrankung sind höhere IL-10 Level mit schnellerem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert. Der Beginn einer cART führte nach 6 Monaten zur Abnahme der IL-10 Spiegel, bleibt aber etwas höher als bei Gesunden[62]. „HIV-Controller“ weisen gleiche IL-10 Plasmaspiegel auf wie gesunde Kontrollpatienten[64].

Interessanterweise konnte auch bei HIV Patienten mit hohen Viruslasten nach Zugabe eines IL-10 Rezeptor blockierenden Antikörpers eine Zunahme der Proliferation von CD4 und CD8-T-Lymphozyten in vitro beobachtet werden [63, 64].

Nachweislich sind in der HIV-Infektion verschiedene Zelltypen in der Lage, IL-10 mRNA zu produzieren. Zu ihnen gehören Monozyten, CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killerzellen. Dabei produzierten B- und T-Zellen IL-10 mRNA auf einem vergleichbaren Niveau wie Monozyten[63]. Verschiedene Forschungsgruppen identifizierten hingegen Monozyten als Hauptproduzenten von IL-10 in der HIV Infektion [64-66]. Monozyten werden direkt durch das HI-Virus, aber unabhängig von der Bindung an CD4 Oberflächenrezeptoren zur Produktion von IL-10 angeregt[65]. Auch regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) können die IL-10 Produktion von Monozyten induzieren[64]. Durch Entfernung von  $T_{regs}$  aus den PBMC konnte die CD4-T-Zell Proliferation wieder zunehmen [64].

Im Gegensatz zu der hier beschriebenen immundämpfenden IL-10 Wirkung, steht eine Studie, welche die Trägerschaft mit dem IL-10 1082G Allel untersucht. Dieses Allel geht mit einer erhöhten IL-10 Produktion einher, was bei Trägern mit einem langsameren Absinken der CD4-T-Zellen assoziiert war und insgesamt in einem längeren Überleben resultierte [67].

Die Ergebnisse dieser Studie machen deutlich, dass ein vermutlich sehr komplexes regulatorisches Netzwerk und unterschiedliche Einflussfaktoren die Wirkungsweise von IL-10 verschieden beeinflussen können.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Neue Erkenntnisse über die Vorgänge im Immunsystem während der akuten und chronischen Infektion mit dem HI-Virus ermöglichen das Forschen an Ansätzen, die in Zukunft zur Heilung der Infektionskrankheit führen könnten. CD8-T-Zellen verhindern die Vermehrung des HI-Virus im Körper und können bei manchen Menschen das Virus über einen sehr langen Zeitraum unterdrücken, sodass sich die Immunschwächekrankheit AIDS auch ohne Behandlung erst sehr spät manifestiert. „Myeloid derived suppressor cells“ (MDSC) sind unreife Vorläuferzellen aus der myeloischen Zellreihe, welche T-Zell Proliferation inhibieren können. Das verhindert eine adäquate Immunantwort auf das HI-Virus. Das Zytokin Interleukin-10 (IL-10) ist im Serum von HIV-Patienten erhöht und beeinflusst ebenfalls T-Zell Antworten. IL-10 wird von verschiedenen Zellarten sezerniert. Auch Monozyten sind als IL-10 Produzenten beschrieben. Monozytäre MDSC (M-MDSC) sind mit Monozyten verwandt. Über die genauen Wirkmechanismen von M-MDSC in der HIV Infektion ist bisher wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher folgende Fragestellungen:

1. Sind M-MDSC und PMN-MDSC selbst in der Lage unstimuliert und ex vivo IL-10 zu produzieren?
2. Korreliert die M-MDSC Frequenz mit Höhe der IL-10 Produktion?
3. Gibt es einen Unterschied in der IL-10 Produktion zwischen M-MDSC und Monozyten?
4. Lässt sich der supprimierende Einfluss von M-MDSC auf die Proliferation von CD8-T-Zellen durch die Zugabe eines IL-10 Rezeptor blockierenden Antikörpers wieder aufheben?

## 2 Material

### 2.1 Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
<b>BD Falcon™ Cell Strainer 12x75mm mit Cell Strainer Kappe, 35 µm</b>	BD Biosciences	Heidelberg, DE
<b>C-Chip Disposable Hemocytometer mit 2 Zählkammern</b>	NanoEnTek USA Inc.	Pleasanton, US
<b>Combitips advanced 10ml</b>	Eppendorf AG	Hamburg, DE
<b>Combitips plus</b>	Eppendorf AG	Hamburg, DE
<b>Falcon® Rundbodenröhrchen Polystyrol 5ml</b>	Corning Incorporated	New York, US
<b>Latex-Einweghandschuhe Sempercare®</b>	Semperit AG Holding	Wien, AT
<b>Mullkompreße Gazin® 10x10 cm</b>	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG	Rengsdorf, DE
<b>Pipettenspitzen 20µl/200µl/1000 µl</b>	Kuhnle GmbH	Karlsruhe, DE
<b>Safe-Lock Tubes 1,5 ml</b>	Eppendorf AG	Hamburg, DE
<b>Safety-Multifly® Kanüle</b>	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, DE
<b>Serologische Einmalpipette 5ml/10ml</b>	TTP Thermoplastics GmbH	Ibbenbüren, DE
<b>S-Monovette® 9ml K3E</b>	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, DE
<b>Zellkulturflasche, Filter</b>	TPP Thermoplastics GmbH	Ibbenbüren, DE
<b>Zellkulturplatte, 96-Loch</b>	Corning Incorporated	New York, US
<b>Zentrifugenröhrchen 15ml/50ml</b>	TPP Thermoplastics GmbH	Ibbenbüren, DE

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

## 2.2 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
<b>Durchflusszytometer FACS ARIA™ III</b>	BD Biosciences	Heidelberg, DE
<b>Durchflusszytometer, FACS Calibur™</b>	BD Biosciences	Heidelberg, DE
<b>Durchlichtmikroskop, DIALUX 20 EB</b>	Leitz	Wetzlar, DE
<b>Heizwasserbad, Modell 1083</b>	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, DE
<b>Inkubationsschrank, Heracell®</b>	ThermoFisher Scientific	Schwerte, DE
<b>Kühlschrank, Bosch Cooler</b>	Robert Bosch GmbH	Gerlingen, DE
<b>Laborautoklavier, Typ 3850 EL</b>	Tuttnauer	Breda, NL
<b>Personal Computer, HP Compaq Elite Computer 8300 Microtower</b>	HP Inc.	Palo Alto, US
<b>Pipetten, Eppendorf Reference® 100µl/10µl</b>	Eppendorf AG	Hamburg, DE
<b>Pipetten, PIPETMAN® Classic 1000µl/20µl</b>	Gilson, Inc.	Middleton, US
<b>Pipettierhilfe, Pipetboy acu 2</b>	Integra Biosciences GmbH	Biebertal, DE
<b>Repetitive Pipette Multipette® plus</b>	Eppendorf AG	Hamburg, DE
<b>Sicherheitswerkbank, Model Labgard 437 Class II</b>	NuAire	Plymouth, US
<b>Sicherheitswerkbank, Safe 2010 Model 1.2</b>	Heto-Holten	Allerød, DK
<b>Vortexgerät, Vortex-Genie® 2</b>	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, USA
<b>Zellzählsystem, CASY® Model TT</b>	Schärfe System GmbH	Reutlingen, DE
<b>Zentrifuge, Centrifuge 5810R</b>	Eppendorf AG	Hamburg, DE
<b>Zentrifuge, Sorvall Super T21</b>	ThermoFisher Scientific	Schwerte, DE

Tabelle 2: Geräte

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

<b>Lösung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
<b>Biocoll (Ficoll®)</b>	Biochrom AG	Berlin, DE
<b>CFSE</b>	BioLegend, Inc.	San Diego, US
<b>Dulbecco's PBS</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE
<b>EasySep™ Human CD8 Positive Selection Kit</b>	STEMCELL Technologies GmbH	Köln, DE
<b>EasySep™ Magnet</b>	STEMCELL Technologies GmbH	Köln, DE
<b>EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit</b>	STEMCELL Technologies GmbH	Köln, DE
<b>EDTA</b>	Merck KGaA	Darmstadt, DE
<b>FCS Superior</b>	Biochrom AG	Berlin, DE
<b>Fixation Medium A</b>	ThermoFisher Scientific	Schwerte, DE
<b>Gibco™ Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28</b>	ThermoFisher Scientific	Schwerte, DE
<b>Hanks' Salt Solution</b>	Biochrom AG	Berlin, DE
<b>HEPES Solution</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE
<b>Kompensationspartikel-Set: BD™ CompBead Anti Mouse IgG, κ</b>	BD Biosciences	Heidelberg, DE
<b>L-Glutamine 200mM</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE
<b>Permeabilization Medium B</b>	ThermoFisher Scientific	Schwerte, DE
<b>Propidium Iodide</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE
<b>RPMI 1640 Medium</b>	Biochrom AG	Berlin, DE

**Tabelle 3:** Chemikalien und Reagenzien

## 2.4 Medien

<b>Medium =</b>	<b>Grundmedium</b>	<b>+ Supplement</b>
<b>R10</b>	RPMI 1640 (ohne L-Glutamin und HEPES)	+ 5ml L-Glutamin (200 mM)  + 5ml Penicillin (10 000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml) + 5 ml HEPES Puffer (1M)  + 50 ml FCS (hitzeinaktiviert, 1 h, 56°C)
<b>Hanks</b>	Hanks' Salt Solution (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	+ 5ml L-Glutamin (200 mM)  + 5ml Penicillin (10 000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml) + 5 ml HEPES Puffer (1M)
<b>PBS +</b>	Dulbecco's PBS	+ 10 ml FCS + 1 mM EDTA

Tabelle 4: Medien

## 2.5 Antikörper

<b>IL-10 Produktion von M-MDSC ex vivo unstimuliert</b>					
<b>Antigen</b>	<b>Fluoreszenz</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>	<b>je 10<sup>6</sup> Zellen</b>
<b>CD14</b>	FITC	Mouse IgG1, κ	BioLegend, Inc.	San Diego, US	5 µl
<b>CD14</b>	FITC	Mouse IgG2a, κ	BioLegend, Inc.	San Diego, US	5 µl
<b>CD33</b>	PE	Mouse IgG1, κ	BioLegend, Inc.	San Diego, US	1 µl
<b>HLA-DR</b>	PerCP	Mouse IgG2a, κ	BioLegend, Inc.	San Diego, US	2 µl
<b>Isotype Control</b>	PerCP	Mouse IgG2a, κ	BioLegend, Inc.	San Diego, US	2 µl
<b>IL-10</b>	APC	Rat IgG2a	BD Biosciences	Heidelberg, DE	1,5 µl
<b>Isotype Control</b>	APC	Rat IgG2a, κ	BD Biosciences	Heidelberg, DE	1,5 µl

Tabelle 5: Antikörper IL-10 Produktion ex vivo

---

**Proliferationshemmung durch M-MDSC**


---

<b>Antigen</b>	<b>Fluoreszenz</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>	<b>je 10<sup>6</sup> Zellen</b>
<b>CD14</b>	FITC	Mouse IgG2a, κ	BioLegend, Inc.	San Diego, US	3 µl
<b>CD33</b>	PE	Mouse IgG1, κ	BioLegend, Inc.	San Diego, US	1 µl
<b>HLA-DR</b>	APC	Mouse IgG2a, κ	BioLegend, Inc.	San Diego, US	3 µl
<b>CD8</b>	PerCP	Mouse IgG1, κ	BioLegend, Inc.	San Diego, US	1 µl
<b>IL-10 Ra</b>	-	Mouse IgG1	R&D Systems, Inc.	Minneapolis, US	50 µl

---

**Tabelle 6:** Antikörper Proliferationsassays

## 2.6 Software

<b>Software</b>	<b>Firma</b>	<b>Sitz</b>
<b>CellQuest™ Pro Software Version 6.0</b>	BD Biosciences	Heidelberg, DE
<b>FACS Diva™ Version 8.0.1</b>	BD Biosciences	Heidelberg, DE
<b>FlowJo Version 9.5.2 /10</b>	Tree Star, Inc.	Ashland, USA
<b>GraphPad Prism Version 5</b>	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
<b>Microsoft Office 2010</b>	Microsoft Corporation	Redmond, USA

---

**Tabelle 7:** Software

### 3 Methodik

#### 3.1 Schematischer Versuchsablauf

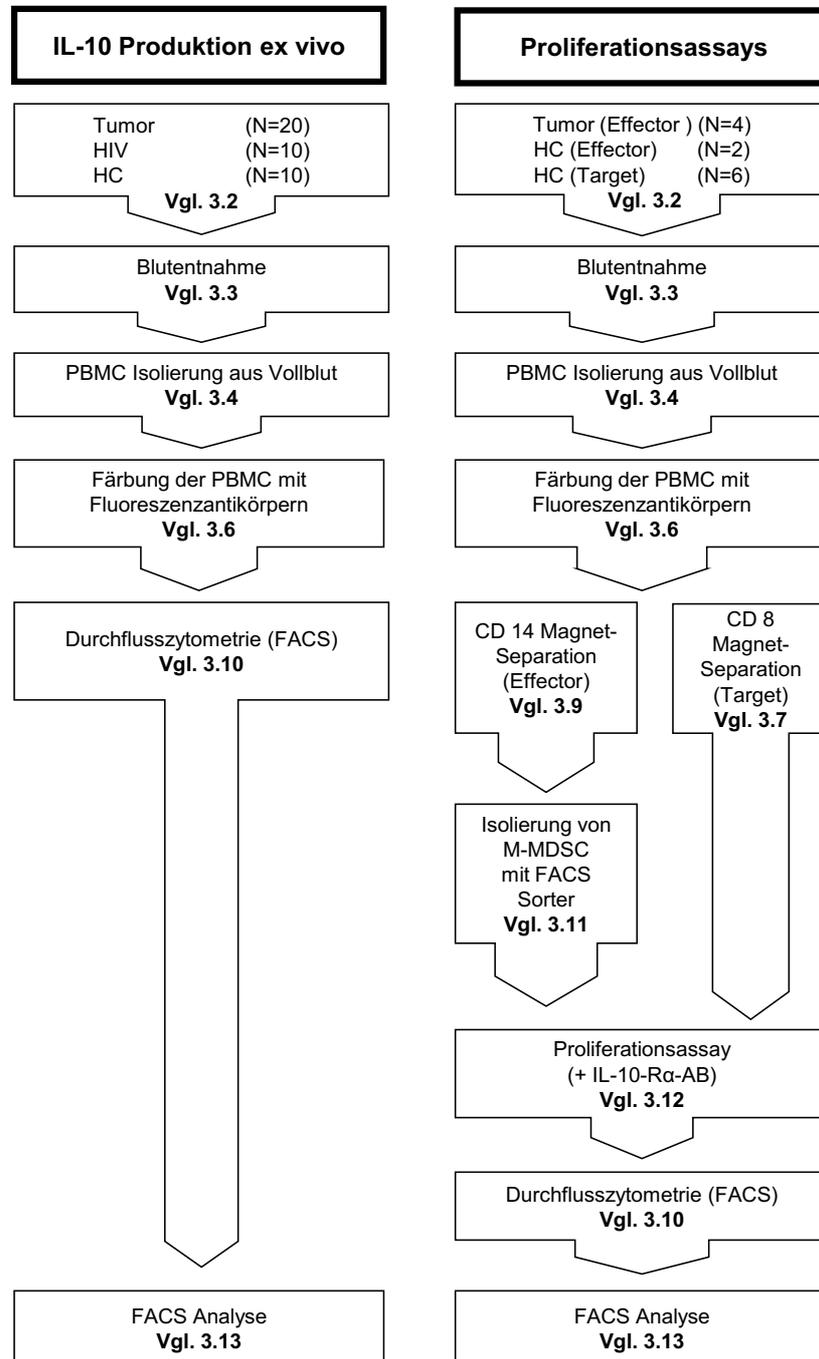


Abbildung 3: Schematischer Versuchsablauf.

## **3.2 Studienteilnehmer**

Nach der Genehmigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München rekrutierten wir für unsere Studie 34 Patienten aus dem Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, sowie 17 freiwillige gesunde Probanden. Etwaige Vor- und Nachteile an der Studienteilnahme, sowie Rücktrittsrechte und Freiwilligkeit der Studienteilnahme wurden von ärztlicher Seite ausführlich dargestellt. Die Einwilligung zur Studienteilnahme erfolgte schriftlich durch Unterzeichnung der Patienteneinwilligung.

### **3.2.1 Studienkohorte**

Für die immunologischen Untersuchungen an M-MDSC und PMN-MDSC wurden 10 therapienaive (keine cART), chronisch HIV-infizierte Patienten über die infektiologische Abteilung in die Studie eingeschlossen. Die HIV Patienten wiesen im Median eine Viruslast von 11 053 Kopien/ml und eine CD4-T-Zellzahl von 64 Zellen/ $\mu$ l auf (Vgl. Tabelle 8 und Anhang 7.1). Zum Studienzeitpunkt gab es keinen FACS Cell Sorter der biologischen Sicherheitsstufe 3 in München, sodass keine infektiösen Zellen sortiert werden konnten. Für die Durchführung der Proliferationsassays wurden daher M-MDSC von Tumorpatienten (n=4) und gesunden Probanden (n=2) verwendet (Vgl. Tabelle 8,9 und Anhang 7.1 und 7.2).

### **3.2.2 Positivkontrolle**

Patienten mit fortgeschrittenem und therapienaivem Tumorleiden stellten die Positivkontrollen dar. 24 Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren ohne Therapie wurden entweder über die internistische oder dermatologische Klinikabteilung in die wissenschaftliche Untersuchung integriert.

### **3.2.3 Negativkontrolle**

Es wurden 10 Blutproben von freiwilligen Probanden ohne Vorerkrankungen als Negativkontrollen für die IL-10 Messung ex vivo und 7 Probanden für die Proliferationsassays akquiriert (Vgl. Tabelle 8,9 und Anhang 7.1 und 7.2).

	<b>Kohorte</b>	<b>Positivkontrolle</b>	<b>Negativkontrolle</b>
<b>Probanden gesamt</b> <b>(n=40)</b>	<b>HIV</b> <b>(n=10)</b>	<b>Maligner Tumor</b> <b>(n=20)</b>	<b>Gesunde Probanden</b> <b>(n=10)</b>
Median Alter Jahre	48 (33-54)	75 (41 – 86)	49 (26-54)
Median CD4 <sup>+</sup> T- Lymphozyten/ $\mu$ l	64 (4-450)	n.a.	n.a.
Median Viruskopien/ml	111 053 (10 695-543 000)	n.a.	n.a.
Weiblich	n = 1	n = 10	n = 8
Männlich	n = 9	n = 10	n = 2

**Tabelle 8:** Studienteilnehmer IL-10 Produktion ex vivo

<b>Probanden gesamt</b> <b>(n=11)</b>	<b>Maligner Tumor</b> <b>(n=4)</b>	<b>Gesunde Probanden</b> <b>(n=7)</b>
Median Alter	75 (54-81)	31 (27-54)
Frauen	n = 2	n = 4
Männer	n = 2	n = 3

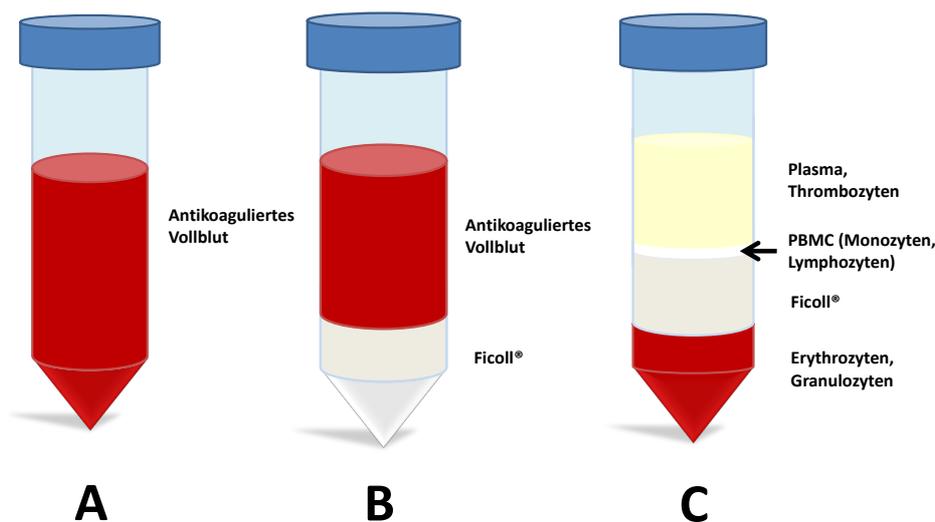
**Tabelle 9:** Probanden Proliferationsassay

### 3.3 Blutentnahme

Den Probanden wurde 9-27 ml Vollblut abgenommen. Nach der Entnahme wurden die Blutproben umgehend im Labor in einer sterilen Werkbank weiterverarbeitet.

### 3.4 PBMC Isolierung aus Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation

M-MDSC sind Teil von peripheren mononukleären Blutzellen (engl. *PBMC, peripheral blood mononuclear cells*), die zunächst aus dem Vollblut separiert werden mussten. Dafür wurde die Dichtegradientenzentrifugation mit dem Ficoll® Medium angewandt. Beim Ficoll® Medium handelt es sich um ein Polymer aus hydrophilen Polysacchariden, welches eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten besitzt, aber eine kleinere als Granulozyten und Erythrozyten. Damit lassen sich die verschiedenen Zellkompartimente aufteilen. Zunächst wurde das antikoagulierte Vollblut aus dem Blutentnahmeröhrchen in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Hanks' Medium verdünnt (Abbildung 4A). Im Anschluss daran folgte die Unterschichtung des verdünnten Vollblutes mit 13ml Ficoll® (Abbildung 4B). Durch Zentrifugation (RT, 30 Minuten, 1500 U/min, ohne Bremse) trennten sich nun auf Grund der verschiedenen Dichteverhältnisse die einzelnen Blutkompartimente voneinander. Die abgetrennten PBMC (Abbildung 4C) ließen sich mittels Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen. Um Verunreinigungen mit anderen Zellen zu reduzieren folgten drei Waschvorgänge (RT, 10min, 1500 U/min). Die ersten zwei Vorgänge erfolgten mit Hanks', der letzte Vorgang mit R10.



**Abbildung 4: PBMC-Isolierung:** A) Antikoaguliertes Vollblut nach Blutentnahme. B) Antikoaguliertes Vollblut auf Ficoll®-Phase nach langsamer Unterschichtung mit Pipette. C) Auftrennung der Blutkompartimente nach Zentrifugation. Erythrozyten und Granulozyten setzten sich am Boden ab. Darüber die Ficoll®-Phase. Darüber eine dünne Schicht PBMC, gefolgt von einer Plasma/Thrombozyten-Phase.

### 3.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit dem automatischen Zellzählssystem CASY® TT der Schärfe System GmbH bestimmt. 50 µl Zellsuspension wurden in 10 ml Messpuffer CASY®ton resuspendiert. Beim Messvorgang passierten die Zellen in einer Messkapillare einen elektrischen Strom. Daraufhin konnte das Zählssystem die Größe und Anzahl der Zellen pro ml berechnen.

### 3.6 Färbung von PBMC mit Fluoreszenzantikörpern (IL-10 ex vivo)

Für die extrazelluläre Färbung wurden jeweils 1 Millionen PBMC in drei FACS Rörchen überführt, in 2ml PBS+1%FCS gewaschen und anschließend zentrifugiert (4°C, 10 min, 1500 U/min). Nach Abgießen des Überstandes und Resuspension in 50 µl PBS folgte das Hinzufügen der extrazellulären Antikörper im Dunkeln. Davon wurden drei Ansätze mit unterschiedlichen Antikörpern angelegt:

1. Sample: HLA-DR PerCP 2µl, CD33 PE 1 µl, CD14 FITC 5 µl
2. Isotyp PerCp: Isotyp-Kontrolle PerCP (anstatt HLA-DR) 2µl, CD33 PE 1µl, CD14 FITC 5 µl
3. Isotyp APC: HLA-DR PerCP 2 µl, CD33 PE 1 µl, CD14 FITC 5 µl (in diesem Ansatz wird später der intrazelluläre IL-10 Antikörper durch eine Isotyp-Kontrolle ausgetauscht, s.u.)

Die Anfertigung der drei Ansätze war notwendig, um in der späteren FACS Auswertung Schwellenwerte für HLA-DR und IL-10 mittels Isotyp-Kontrollen generieren zu können. Die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern folgte bei 4°C für 30 Minuten im Kühlschrank. Es schlossen sich ein erneuter Waschgang, die Zellfixation mit 100µl Fix/Perm Solution A und 15 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur an. In einem weiteren Schritt folgte die Permeabilisierung der Zellmembran mittels der Zugabe von 100 µl Fix/Perm Solution B und 15-minütiger Inkubation im Dunkeln. Dieser Schritt war notwendig, damit Fluoreszenz-Antikörper in die Zelle gelangen konnten, um dort intrazelluläre Protein anzufärben. 1,5 µl des Fluoreszenzantikörpers IL-10-APC wurden für die Ansätze „Sample“ und „Isotyp PerCP“ appliziert. Dergleichen wurde für den Ansatz „Isotyp APC“ 1,5 µl Isotyp-Kontrolle APC hinzugefügt. Die Zellen aller Ansätze wurden für weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschgänge und Resuspension in 200 µl PBS für die Durchflusszytometrie (Vgl. 3.10).

### 3.7 Magnetseparation von CD8-T-Zellen und CFSE-Färbung

Für die in 3.12 beschriebenen Proliferationsassays war es von Notwendigkeit im Vorhinein aus den PBMC CD14-Zellen und CD8-T-Zellen zu separieren. Die CD8-T-Zellen dienten später als die Zellen, auf die ein Einfluss getestet werden sollte. Daher werden diese Zellen auch als „Targetzellen“ bezeichnet. Dafür wurden  $20 \times 10^6$  PBMC in 200  $\mu$ l PBS+ aufgenommen ( $10^6$  Zellen/100  $\mu$ l PBS+). Nach Zugabe von 20  $\mu$ l CD8-Antikörper inkubierten die Zellen für 15 Minuten. Danach erfolgte die Zugabe von 20  $\mu$ l magnetischen „beads“ (1  $\mu$ l/1 Mio Zellen) und weiteren 15 Minuten Inkubation. Die magnetischen beads hefteten sich nun an die zuvor markierten Zellen. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten in einen Magneten gestellt. Durch das Magnetfeld blieben die zu separierenden magnetisch markierten Zellen am Rand des Zentrifugenröhrchens kleben. Nicht magnetisch markierte Zellen hingegen fielen der Schwerkraft folgend auf den Boden des Röhrchens. Nach 5 Minuten im Magneten konnten die magnetisch unmarkierten Zellen in einen anderen Behälter abgegossen werden. Die am Rand haftenden CD8-T-Zellen wurden mit 2ml PBS+ resuspendiert. Danach kam das Zellgemisch noch für zwei weitere Isolierungsvorgänge in den Magneten. Nach insgesamt drei Durchläufen blieben etwa  $2 \times 10^6$  CD8-Zellen übrig.

CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der von Zellen aufgenommen werden kann. Durch Zellteilung, wird die Hälfte des CFSE Farbstoffs an die Tochterzellen weitergeben. Damit lassen sich Zellproliferationen sehr gut beobachten.

Für die CFSE Färbung wurden die CD8-T-Zellen in 1 ml R10 resuspendiert und 2  $\mu$ l CFSE hinzugefügt. Danach wurden die Zellen 8 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend 3-mal in je 10 ml R10 gewaschen. Nach dem dritten Waschgang wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt.

### 3.8 Inkubation der CFSE gefärbten CD8-T-Zellen mit IL-10-R $\alpha$ blockierendem Antikörper

Für einen Teil des Proliferationsassays war es notwendig einen Teil der CFSE gefärbten CD8-T-Zellen mit einem IL-10-R $\alpha$  blockierenden Antikörper gemeinsam zu inkubieren. Dafür wurden  $0,3 \times 10^6$  CFSE CD8-T-Zellen mit 15  $\mu$ g IL-10-R $\alpha$  blockierenden Antikörpers in 0,3 ml R10 für mindestens 2h inkubiert. Dies sollte eine möglichst

vollständige Besetzung der IL-10 Rezeptoren ermöglichen. Die Zellen wurden anschließend mit 450  $\mu\text{l}$  R10 verdünnt und davon 50  $\mu\text{l}$  später in die Proliferationskammern eingesetzt.

### 3.9 Magnetseparation von CD14-Zellen

Die CD14<sup>+</sup>-Zellen beinhalten die CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-/low</sup> M-MDSC. Diese Zellen dienen als Effektorzellen. Sie sollten die CD8-T-Zellen an der Proliferation hindern.

Das Vorgehen zur magnetischen Separation von CD14<sup>+</sup>-Zellen ist identisch mit dem im Punkt 3.7. beschriebenen Prozedere. Am Ende der drei Separationsdurchgänge im Magneten, blieben hier allerdings  $5 \times 10^6$  Zellen übrig. Diese wurden im Anschluss in eine 15ml FACS Tube überführt und in 10ml PBS+ gewaschen. Um die CD14-Zellen für den späteren Sortierungsvorgang im FACS-Sortierer vorzubereiten, mussten diese zunächst mit weiteren Antikörpern gefärbt werden. Verwendet wurden: CD14 FITC  $3 \mu\text{l}/1 \times 10^6$  Zellen, CD33 PE  $1 \mu\text{l}/1 \times 10^6$  Zellen, HLA-DR APC  $3 \mu\text{l}/1 \times 10^6$  Zellen. Der Ansatz wurde dann bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10ml PBS+ gewaschen. Eine anschließende Fixierung der Zellen folgte in diesem Fall nicht, da die Zellen für den Proliferationsassay lebendig bleiben mussten. Nach dem letzten Waschdurchgang wurden die Zellen in 500  $\mu\text{l}$  PBS+ resuspendiert.

### 3.10 Durchflusszytometrie

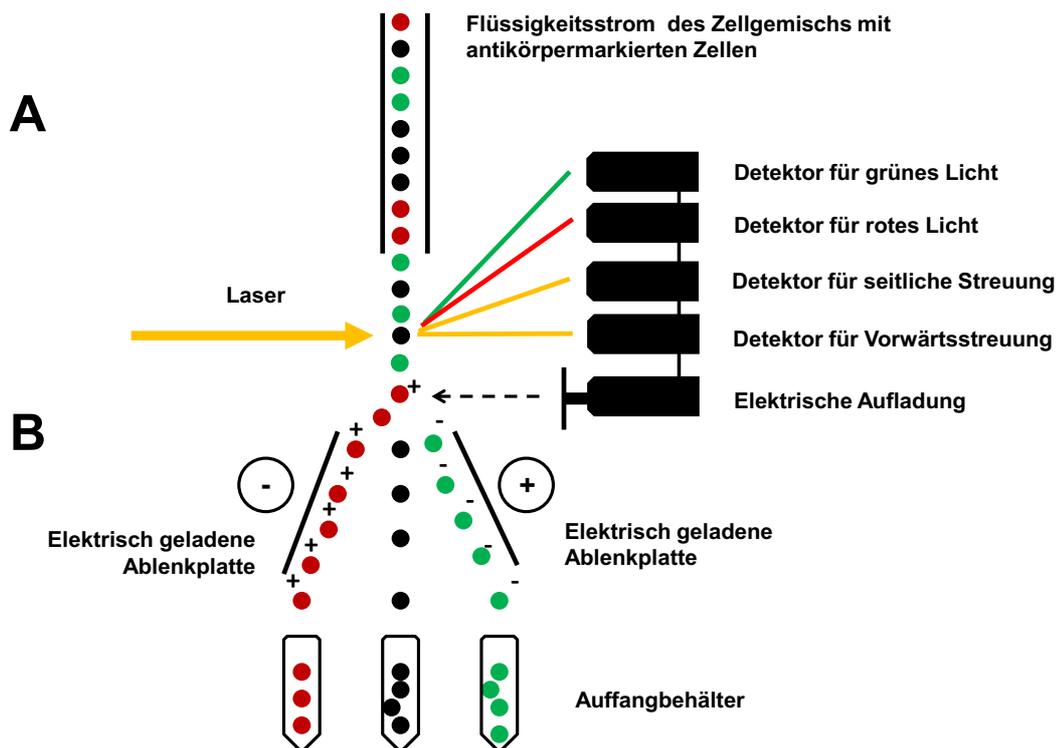
In einem Durchflusszytometer können fluoreszenzmarkierte Zellen gemessen werden. Die markierten Zellen werden in ihrer Suspension einzeln und nacheinander in einem dünnen Strahl durch eine Kapillare gespült und dabei von einem Laserstrahl erfasst. Das beim Auftreffen auf die Zellen entstehende Streulicht wird von einem Detektor erfasst und ermöglicht die Bestimmung der Zellgröße (FSC, engl. *Forward Scatter*) und Granularität (SSC, engl. *Side Scatter*). Der Laserstrahl beleuchtet desweiteren die auf den Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe. Die beleuchteten Zellen emittieren nun ein charakteristisches Licht, welches von weiteren Detektoren erfasst werden kann (Abbildung 5A). Dies ermöglicht die Analyse und Größenbestimmung einzelner Populationen innerhalb der zuvor isolierten PBMC.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden an einem FACS Calibur (BD Biosciences) durchgeführt. Von den einzelnen Proben wurden jeweils 100 000 Zellen analysiert.

### 3.11 FACS-Sortierer

Ein Fluss-Sortier erweitert ein Durchflusszytometer um eine weitere Einheit. Zellgemische können hierbei nicht nur analysiert, sondern auch in einzelne Populationen aufgeteilt werden. Die Zellen werden zunächst mittels eines Laserstrahls analysiert (Vgl.3.10). Werden Zellen mit bestimmten Oberflächeneigenschaften (z.B. CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-/low</sup>) detektiert, löst das einen elektrischen Impuls aus. Dieser Impuls verpasst den Zellen eine negative oder positive Ladung genau in dem Moment, in dem der Zellstrahl aus der Kapillare tritt und sich in einzelne Flüssigkeitstropfen auflöst. Jeder Flüssigkeitstropfen beinhaltet nun eine Zelle mit entweder positiver, negativer oder keiner Ladung. Die geladenen Zellen fallen nun an ebenfalls elektrisierten Ablenkplatten vorbei. Dabei werden positiv geladene Zellen zur negativ geladenen Ablenkplatte und negativ geladene Zellen zur positiv geladenen Platte gezogen. Am Ende dieses Vorgangs fallen die Zellen in unterschiedliche Auffangbehälter (Vgl. Abbildung 5B).

Für den Immunoassay mussten die zuvor separierten CD14-Zellen (vgl. 3.9) in HLA-DR<sup>low/-</sup> (M-MDSC) und HLA-DR<sup>high</sup> (Monozyten) getrennt werden. Dafür wurde der Fluss-Sortierer FACS Aria (BD Biosciences) benutzt. Der Sortierer wurde zunächst für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe kalibriert. Danach wurden die CD14 Zellen durch einen Filterdeckel in Filter-FACS-Tubes pipettiert und anschließend von der Maschine sortiert. Nach dem Sortieren wurden die Zellen in 10ml R10 resuspendiert, abzentrifugiert und unter dem Mikroskop gezählt. Abschließend wurden die sortierten Zellen auf eine Konzentration von  $1,2 \times 10^6$ /ml eingestellt.

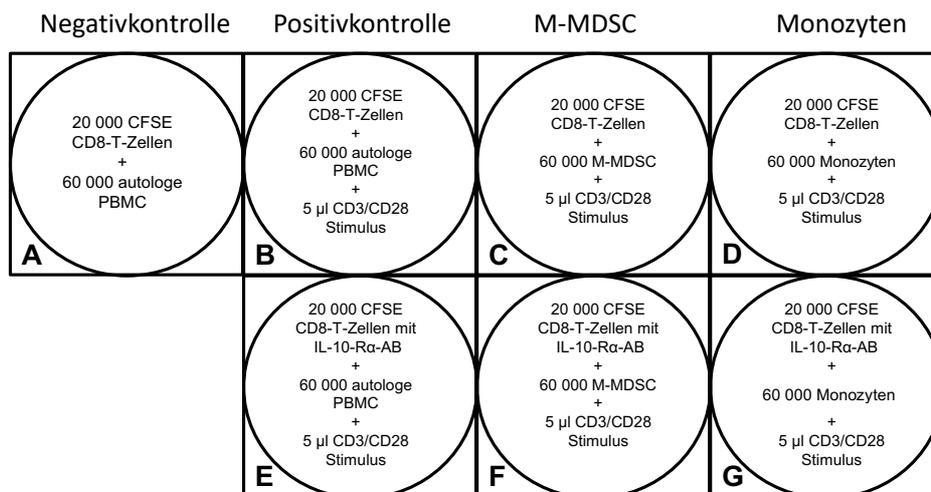


**Abbildung 5: Prinzip der Durchflusszytometrie und eines FACS-Sortierers:** **A)** Antikörper markierte Zellen fließen nacheinander durch eine Kapillare und werden dabei von einem Laserstrahl getroffen. Bei Auftreffen des Laserstrahls auf der Zelloberfläche wird er unterschiedlich abgelenkt oder regt Fluoreszenzfarbstoffe an. Verschiedene Photodetektoren sind dabei in der Lage die abgelenkten Lichtstrahlen zu analysieren. Dies erlaubt die Bestimmung der Größe, Granularität und Art der exprimierten Oberflächenrezeptoren (markiert durch Fluoreszenzantikörper) untersuchter Zellen. **B)** Bei Detektion bestimmter Oberflächenmerkmale (z.B. CD14<sup>+</sup>) wird im Computer eine elektrische Ladung erzeugt, die den Zellstrahl genau dann trifft, wenn der Zell-Flüssigkeitsstrahl durch die Kapillare durchtritt und beginnt sich in Tröpfchen aufzulösen. Je nach Ladung werden die Tröpfchen dann über elektrisch geladene Platten abgelenkt, so dass die Sortierung der Zellen in unterschiedliche Populationen gelingt [68][69].

### 3.12 Proliferationsassays

Bei einem Proliferationsassay werden Zellen eines gesunden Spenders („Target“) mit Zellen eines Patienten („Effektor“) zusammengeführt. Dabei wird beobachtet, ob die Effektorzellen die Targetzellen in ihrer Zellproliferation beeinflussen. In dieser Arbeit wurden isolierte CD8-T-Zellen von gesunden Spendern, mit isolierten M-MDSC oder Monozyten koinkubiert. Sinn des Versuchs war es, einen proliferationshemmenden Einfluss der M-MDSC auf die CD8-T-Zellen nachzuweisen. In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob eine IL-10 Rezeptorblockade, die gehemmte Proliferation wiederherstellen könne.

Angesetzt wurden die Proliferationsassays auf 96-Loch-Zellkulturplatten. Die Target- und Effektorzellen wurden dabei im Verhältnis 3:1 zusammengeführt (20 000 CFSE gefärbte CD8-Targetzellen wurden mit 60 000 Effektorzellen (autologe PBMC oder M-MDSC oder Monozyten) koinkubiert). Gleichzeitig wurde der Versuch mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle verglichen. Hinzu kam noch eine Versuchsreihe mit der Zugabe eines IL-10-Rezeptor- $\alpha$ -blockierenden Antikörpers. Daraus ergab sich folgendes Koinkubationsschema:



**Abbildung 6: Schema Proliferationsassay:** **A)** Negativkontrolle: CD8-T-Zellen (T) : Autologe PBMC (E) = T:E=1:3, keine Stimulation. **B)** Positivkontrolle: CD8-T-Zellen (T) : Autologe PBMC (E) = T:E=1:3, Proliferationsstimulation mit CD3/CD28. **C)** CD8-T-Zellen (T) : M-MDSC (E) = T:E = 1:3; Proliferationsstimulus. **D)** CD8-T-Zellen (T) : Monozyten (E)= T:E = 1:3; Proliferationsstimulus. **E)** Positivkontrolle: CD8-T-Zellen mit IL-10-R $\alpha$  blockierender Antikörper (IL-10-R $\alpha$ -AB) (T) : autologe PBMC (E) = T:E = 1:3; Proliferationsstimulus. **F)** CD8-T-Zellen mit (IL-10-R $\alpha$ -AB) (T) + M-MDSC (E) = T:E= 1:3; Proliferationsstimulus. **G)** CD8-T-Zellen mit (IL-10-R $\alpha$ -AB) (T) : Monozyten (E) =T:E= 1:3, Proliferationsstimulus.

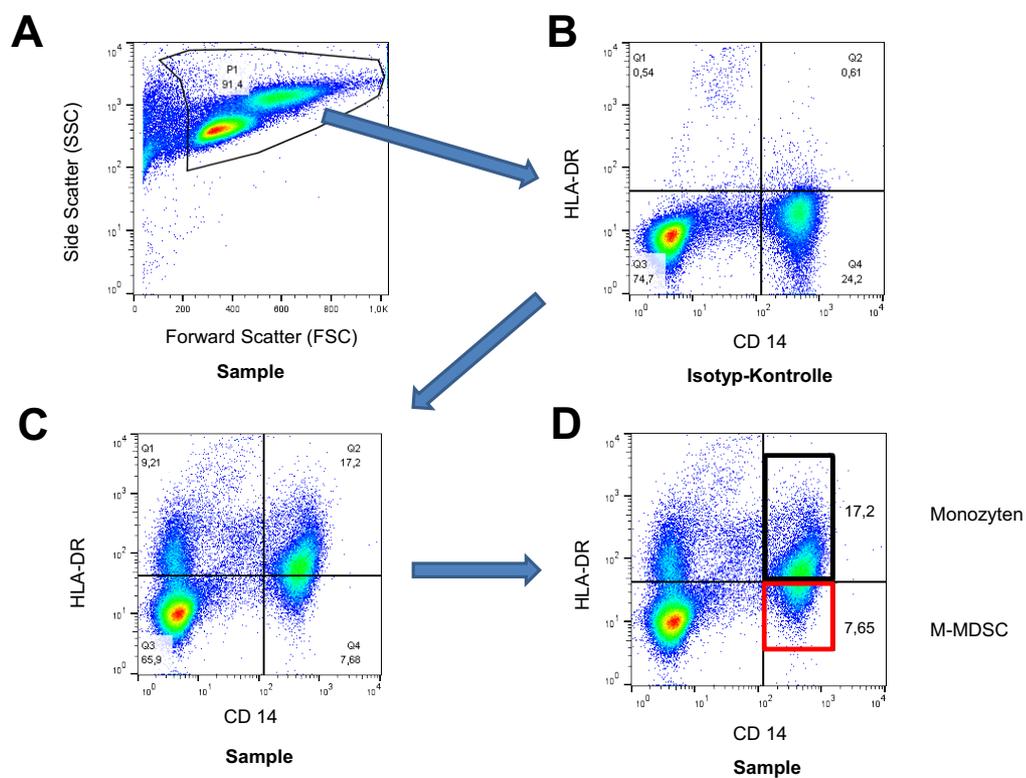
Über den CD3 Rezeptor können T-Zellen aktiviert werden. Zur Anregung der Proliferation wurde den Zellen daher mit Ausnahme der Negativkontrolle 5  $\mu$ l eines CD3/CD28 Stimulus zugesetzt. Die Zellen wurden für 72h im Brustschrank koinkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach 48h wurde abends je 1 $\mu$ l Golgi-Stop Monensin in die Zellkulturplatte gegeben. Dadurch akkumulierten Proteine innerhalb der Zelle. 24h später wurden die einzelnen Kompartimente der Zellkulturplatte ausgewertet. Dafür wurden diese jeweils mit 1 $\mu$ l CD8 PerCP gefärbt und nach 30 Minuten Antikörperinkubation fixiert. Im Anschluss konnten die Zellen per Durchflusszytometer ausgewertet werden (vgl. 3.10).

### 3.13 FACS Analyse und Auswertung

Die Messungen der Durchflusszytometrie wurden am Computer mittels der Software CellQuestPro aufgezeichnet. Anschließend folgte die Auswertung der Messung mit Hilfe der Analysesoftware FlowJo.

#### 3.13.1 Gating von M-MDSC

Das Gating der  $CD14^+HLA-DR^{-/low}$  M-MDSC erfolgte nach den in Abbildung 7 dargestellten Schritten.



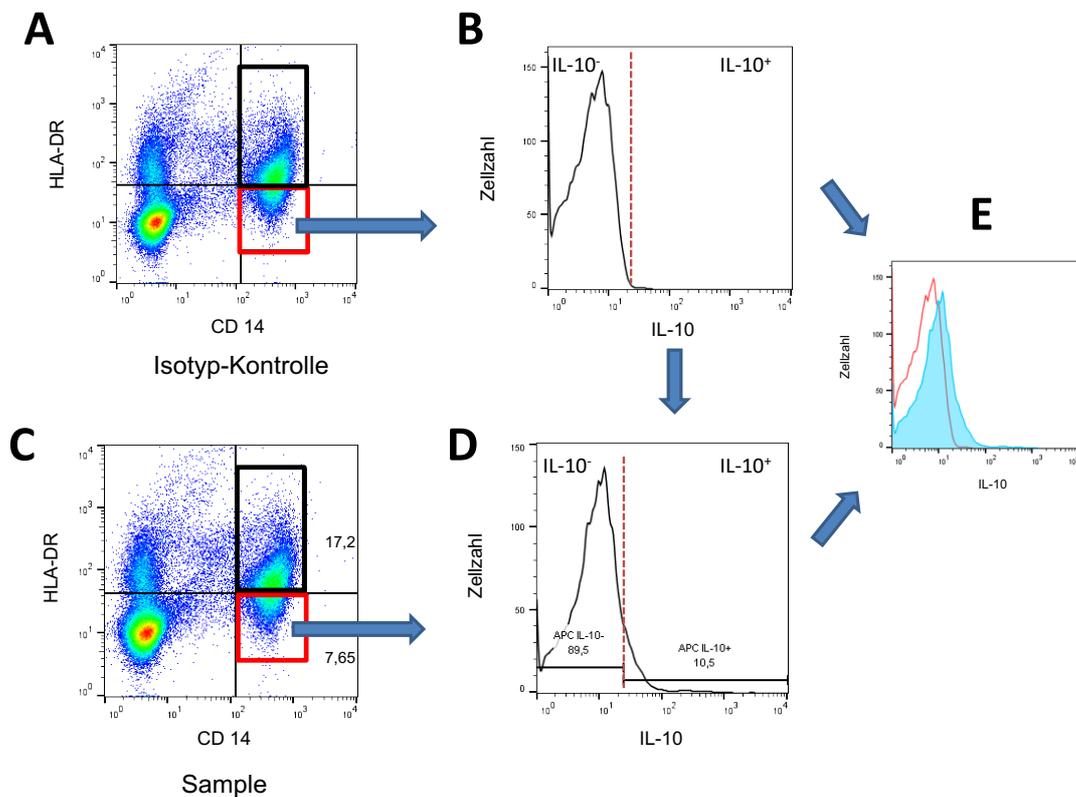
**Abbildung 7: Gating Strategie für M-MDSC (Repräsentativ am Beispiel von Proband Tumor 39).** A) Gate auf die Monozyten-/Lymphozytenpopulation innerhalb der PBMC. B) Definition eines HLA-DR Grenzwertes (Grenze zwischen  $HLA-DR^+$  und  $HLA-DR^{-/low}$ ) mittels HLA-DR Isotyp-Kontrolle in einer parallelen Messung (C) Der mittels Isotyp-Kontrolle ermittelte Grenzwert wird auf die zu untersuchende Probe (Sample) angewendet. Es entstehen Gates für die  $HLA-DR^+$  und  $HLA-DR^-$ -Population. D)  $CD14^+HLA-DR^+$ -Zellen wurden als Monozyten definiert (schwarzes Gate).  $CD14^+HLA-DR^{-/low}$  Zellen, wurden als M-MDSC definiert (rotes Gate).

Für die Definition des  $HLA-DR^{-/low}$  Bereichs verwendeten wir eine Isotyp-Kontrolle. Diese bindet auf Grund ihrer Eigenschaften unspezifisch an Proteine, die Ähnlichkeiten mit dem eigentlich zu markierendem Oberflächenprotein aufweisen. Zellen, die an die

Isotyp-Kontrolle binden, repräsentieren also die unspezifischen Bindungen eines Antikörpers. Alle Zellen, die bei der Messung der eigentlichen Probe über dem Schwellenwert liegen, gingen in der Isotyp-Kontrolle keine unspezifischen Bindungen ein und müssen daher für das untersuchte Protein positiv sein.

### 3.13.2 Gating der IL-10<sup>+</sup> M-MDSC

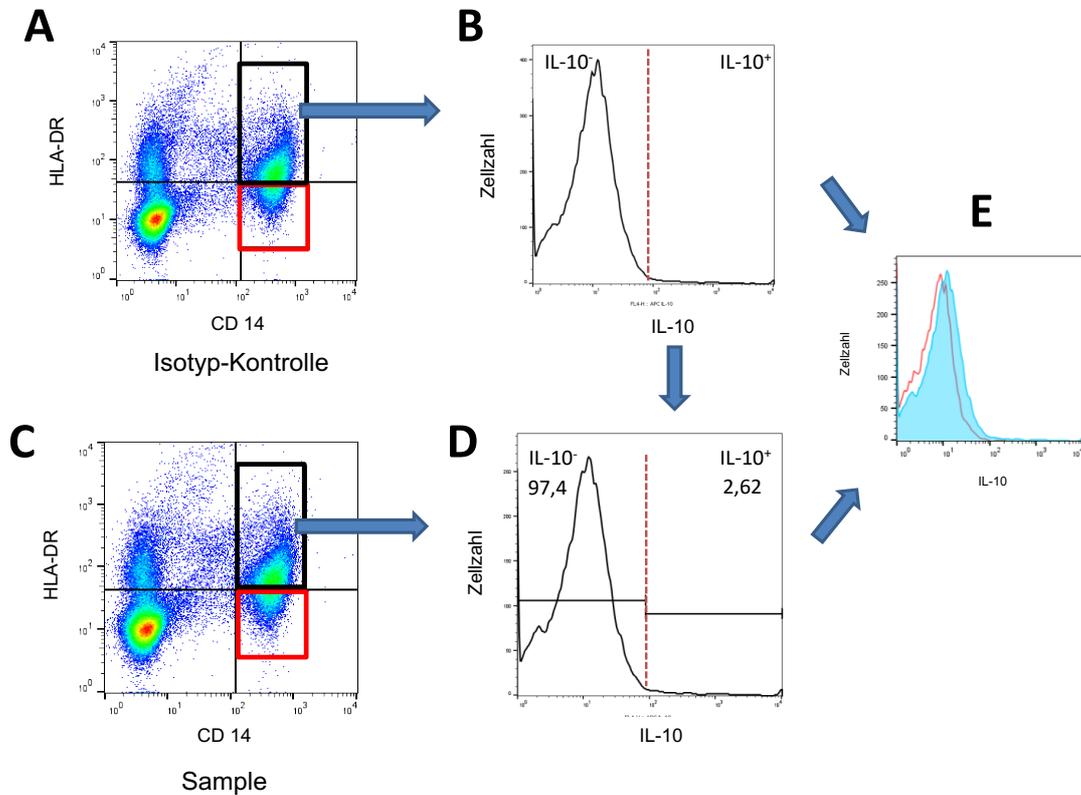
Für die intrazelluläre IL-10 Färbung wurde zur Ermittlung des IL-10 Schwellenwertes zwischen positiven und negativen Zellen ebenfalls eine Isotyp-Kontrolle verwendet. Das Gating der IL-10<sup>+</sup> M-MDSC erfolgte nach einem Verfahren, welches in Abbildung 8 aufgeführt ist.



**Abbildung 8: Gating Strategie für IL-10<sup>+</sup> M-MDSC (Repräsentativ am Beispiel von Tumor 39).** A) Gating der M-MDSC (roter Kasten) in einer parallelen Probe mit IL-10 Isotyp-Kontrolle B) Definition eines IL-10 Grenzwertes (IL-10<sup>+</sup> M-MDSC und IL-10<sup>-</sup> M-MDSC) im Histogramm. C) Gate auf M-MDSC in der zu untersuchenden Probe (Sample). D) IL-10 Schwellenwert aus Isotyp-Kontrolle wird auf das IL-10 Histogramm der Probe angewendet. E) Gemeinsame Darstellung beider Histogramme (Isotyp-Kontrolle und Sample) in einem Schaubild.

### 3.13.3 Gating der IL-10<sup>+</sup> Monozyten

Das Gating der IL-10<sup>+</sup> Monozyten erfolgte nach einem Verfahren, welches in Abbildung 9 aufgeführt ist.

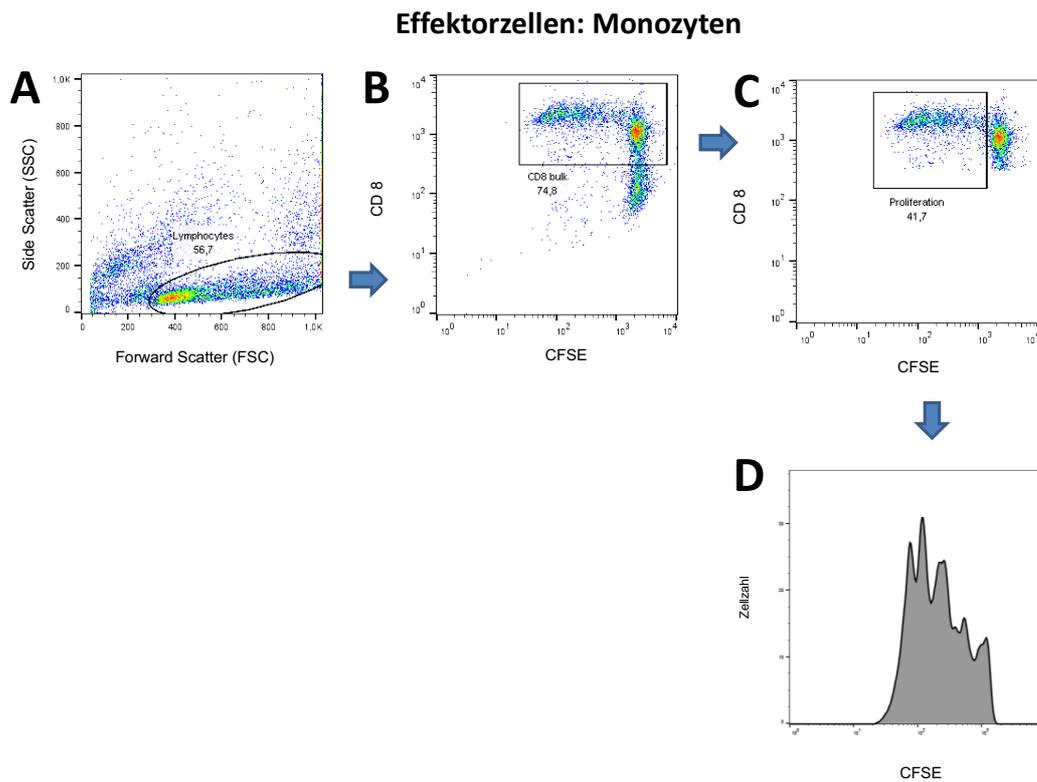


**Abbildung 9: Gating Strategie für IL-10<sup>+</sup> Monozyten (Repräsentativ am Beispiel von Tumor 39).** A) Gating der Monozyten (schwarzer Kasten) in einer parallelen Probe mit IL-10 Isotyp-Kontrolle B) Definition eines IL-10 Grenzwertes (IL-10<sup>+</sup> M-MDSC und IL-10<sup>-</sup> M-MDSC) im Histogramm. C) Gate auf Monozyten in der zu untersuchenden Probe (Sample). D) IL-10 Schwellenwert aus Isotyp-Kontrolle wird auf das IL-10 Histogramm der Probe angewendet. E) Gemeinsame Darstellung beider Histogramme (Isotyp-Kontrolle und Sample) in einem Schaubild.

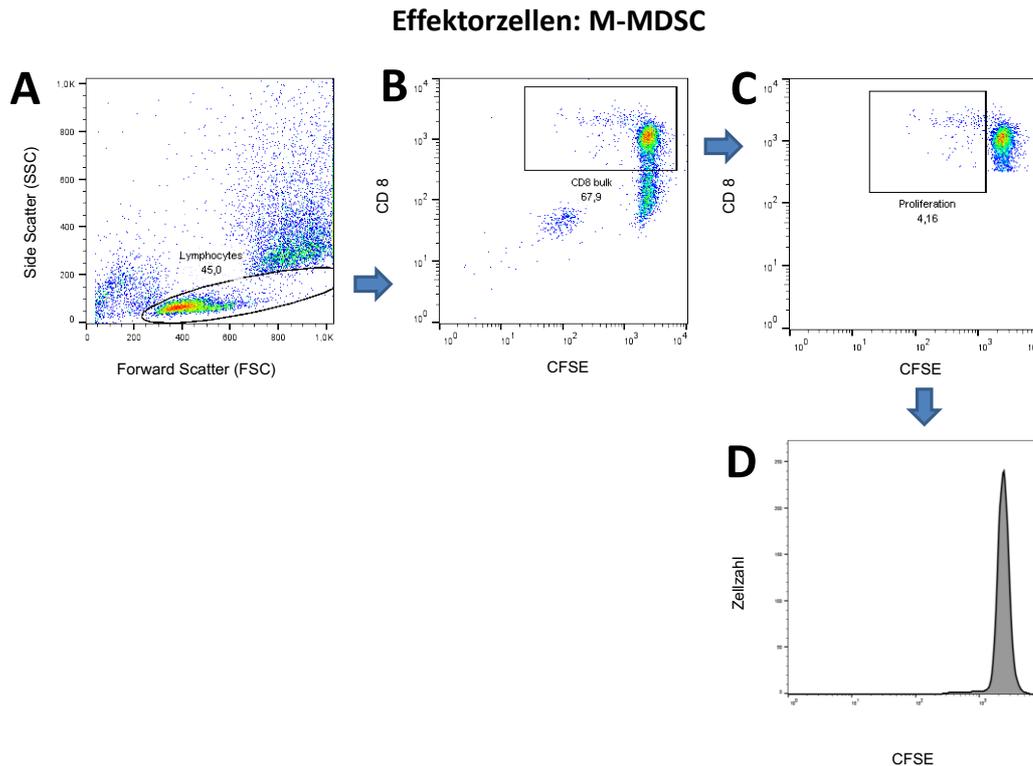
### 3.13.4 Gating Proliferationsassays

Nach 72h Koinkubation von Target- und Effektorzellen und anschließender Antikörperfärbung wurden die CD8 T-Zell Proliferation im Durchflusszytometer ausgewertet (Vgl. 3.10). Die Gatingstrategie ist in Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

Durch die CFSE Färbung können die einzelnen Populationen der sich teilenden Zellen sichtbar gemacht werden und somit die Zellproliferation gemessen werden.



**Abbildung 10: Gatingstrategie für Proliferationsassays. Beispielhafte Auswertung für Monozyten als Effektorzellen. Repräsentatives Vorgehen am Beispiel von H033 (Target) und Tumor 76 (Effektor). A) Gating auf Lymphozytenpopulation im Forward/Side Scatter. B) Gating der CD8-T-Zellen. C) Gating auf Anteil der proliferierenden CD8-T-Zellen. D) Darstellung der proliferierenden CD8-T-Zellen als Histogramm.**



**Abbildung 11: Gatingstrategie für Proliferationsassays. Beispielhafte Auswertung für M-MDSC als Effektorzellen. Repräsentatives Vorgehen am Beispiel von H033 (Target) und Tumor 76 (Effektor).** A) Gating auf Lymphozytenpopulation im Forward/Side Scatter. B) Gating der CD8-T-Zellen. C) Gating auf Anteil der proliferierenden CD8-T-Zellen. D) Darstellung der proliferierenden CD8-T-Zellen als Histogramm.

### 3.14 Berechnung der suppressiven Kapazität

Diese wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Suppressive Kapazität (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{Proliferation (CD8-T-Zellen mit M-MDSC)}}{\text{Proliferation (CD8-T-Zellen mit Monozyten)}} \right) \times 100$$

### 3.15 Statistische Auswertungen

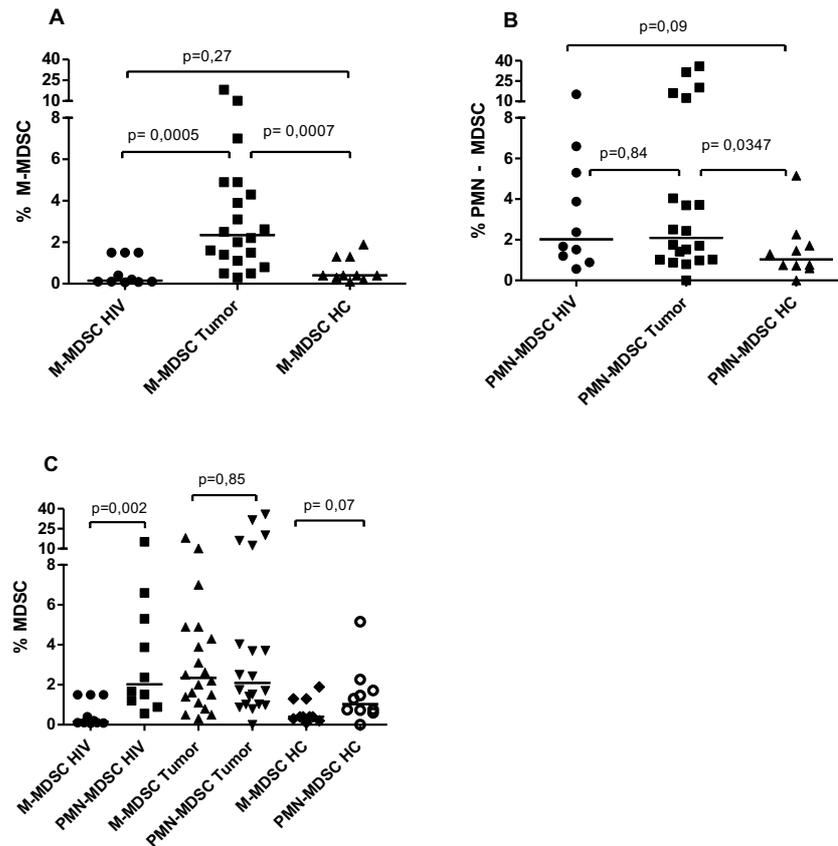
Bei den verschiedenen MDSC Frequenzen in den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen handelt es sich um unabhängige Stichproben. Um die zentralen Tendenzen beider Gruppen vergleichen zu können, wurden die Mediane daher mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Für die Auswertung der Proliferationsassays ermittelten wir zunächst die Mediane der CD8-T-Zell Proliferation für Intervention mit M-MDSC oder Monozyten. Da es sich hierbei um abhängige Stichproben handelte, verglichen wir die Mediane unter Anwendung des Wilcoxon-Test. Für die Berechnung

einer möglichen Korrelation zwischen verschiedenen Parametern (z.B. M-MDSC vs. Viruslast) verwendeten wir die Rangkorrelation nach Spearman. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von  $<0,05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren weisen höhere M-MDSC Frequenzen als HIV-1 Patienten und gesunde Probanden auf

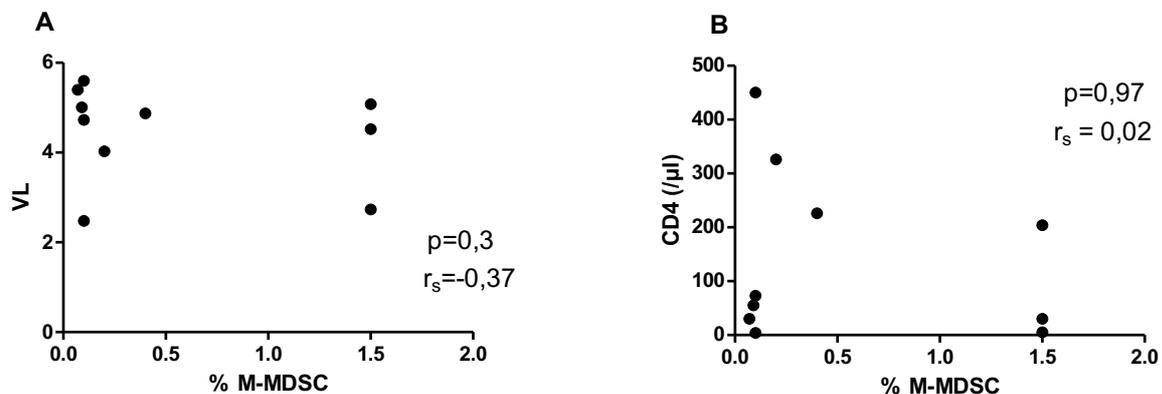
Zunächst überprüften wir die Höhe der M-MDSC und PMN-MDSC Frequenzen in den einzelnen Studienpopulationen (chronische HIV-1 Infektion, fortgeschrittene Tumore, gesunde Probanden (HC)). M-MDSC von Tumorpatienten sind im Vergleich zu HIV-1 Patienten und gesunden Probanden signifikant erhöht (Tumor vs. HIV  $p=0,0005$ ; Tumor vs. HC  $p=0,0007$ ; Mann-Whitney-Test). HIV-1 und Tumorpatienten besitzen PMN-MDSC Frequenzen auf demselben Niveau, die beide im Vergleich zu HC erhöht sind (HIV vs. HC:  $p = 0,09$ ; Tumor vs. HC:  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test). Im Vergleich der beiden MDSC Subtypen konnten wir feststellen, dass bei HIV-1 die PMN-MDSC Frequenz signifikant größer als die M-MDSC Frequenz ist ( $p = 0,002$ ; Mann-Whitney-Test). MDSC Frequenzen von Tumorpatienten waren auf vergleichbarem Niveau ( $p = 0,85$ , Mann-Whitney-Test). Gesunde Probanden (HC) wiesen ebenfalls höhere PMN-MDSC Frequenzen im Vergleich zu M-MDSC auf. ( $p = 0,07$ ; Mann-Whitney-Test). HIV-1 Patienten präsentieren also keine erhöhten M-MDSC Frequenzen. Im Gegensatz dazu sind erhöhte M-MDSC Frequenzen bei Tumorpatienten messbar (vgl. Abbildung 12).



**Abbildung 12: M-MDSC und PMN-MDSC Frequenzen bei chronisch HIV-1 infizierten Patienten ohne cART im Vergleich zu Tumorpatienten (Tumor) und gesunden Probanden (HC).** Angegeben ist der Anteil der MDSC an gesamt gemessenen PBMC in Prozent. **A)** M-MDSC von Tumorpatienten sind im Vergleich zu HIV-1 und HC signifikant erhöht ( $p=0,0005$ ;  $p=0,0007$  Mann-Whitney-Test). **B)** Tumorpatienten und HIV-1 Patienten besitzen PMN-MDSC Frequenzen auf demselben Niveau, die beide im Vergleich zu HC erhöht sind (HIV vs. HC:  $p = 0,09$ ; Tumor vs. HC:  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test). **C)** Die PMN-MDSC Frequenz von HIV-1 Patienten ist signifikant größer als die M-MDSC Frequenz ( $p = 0,002$ ; Mann-Whitney-Test).

## 4.2 Keine Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und Viruslast oder CD4-T-Zellen bei HIV-1

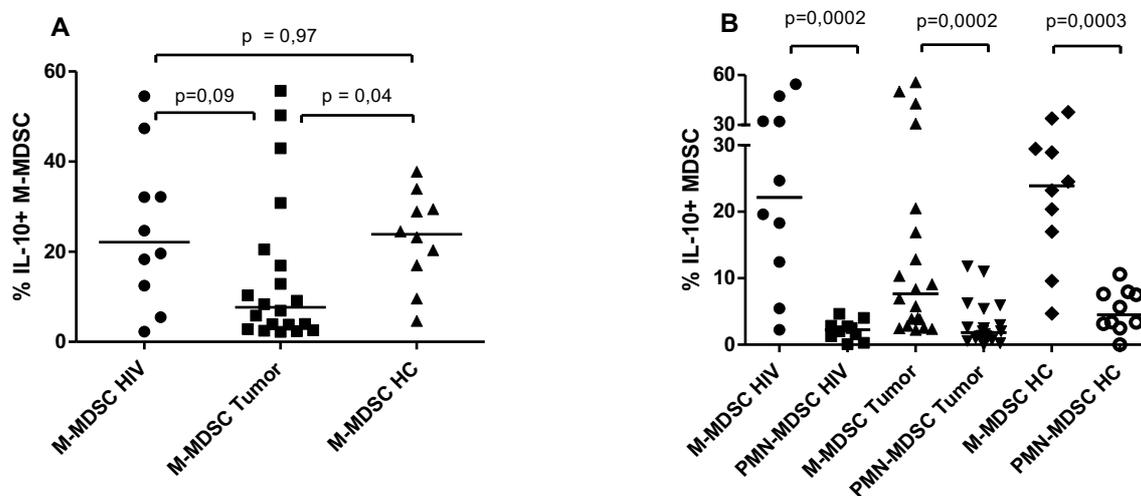
Als nächstes untersuchten wir, ob es einen Zusammenhang zwischen Höhe der gemessenen M-MDSC Frequenz und Markern der klinischen Progression der HIV Infektion gibt. Dabei verglichen wir HIV-1-Viruslast (VL) und Höhe der CD4-T-Zellen mit der M-MDSC Frequenz bei HIV-1 Patienten. Weder für die Viruslast ( $\rho=-0,37$ ;  $p=0,3$ ; Spearman), noch für die CD4-T-Zell Anzahl ( $\rho=0,02$ ,  $p=0,97$ , Spearman) ergab sich dabei eine Korrelation (vgl. Abbildung 13). Ein Fortschreiten der HIV-Infektion scheint demnach zumindest nicht direkt mit der M-MDSC Frequenz zusammenzuhängen.



**Abbildung 13: Korrelation zwischen M-MDSC und HIV-1 Viruslast (VL) oder CD4-T-Zellzahl (CD4).** A) Keine Korrelation zwischen Viruslast und M-MDSC Frequenz ( $\rho=-0,37$ ;  $p=0,3$ ; Spearman). B) Keine Korrelation zwischen Höhe der CD4-T-Zellen und der M-MDSC Frequenz ( $\rho=0,02$ ,  $p=0,97$ ; Spearman).

### 4.3 Anteil an IL-10<sup>+</sup>M-MDSC von HIV Patienten und gesunden Probanden ist größer als der von Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren

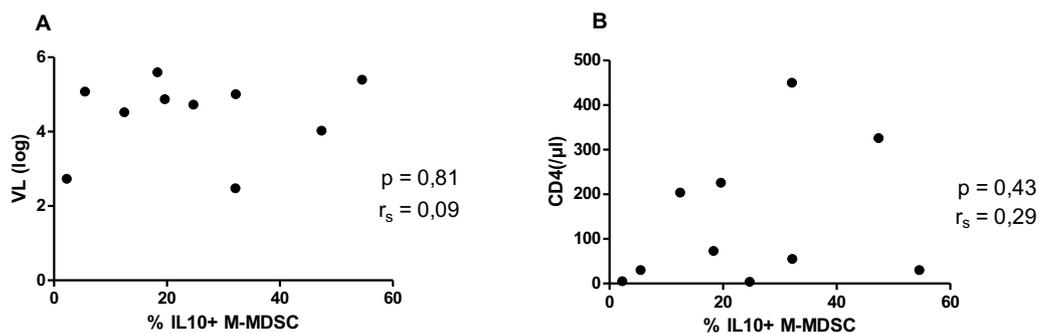
Als nächstes untersuchten wir, ob M-MDSC Interleukin-10 produzieren können. M-MDSC von HIV Patienten und gesunden Probanden produzierten IL-10 auf einem vergleichbaren Niveau, aber signifikant mehr, als Tumor M-MDSC. Interessanterweise war der Anteil an IL-10<sup>+</sup> HIV M-MDSC und IL-10<sup>+</sup> HC M-MDSC trotz niedrigerer M-MDSC Frequenzen höher, als der von Tumorpatienten mit hohen M-MDSC Frequenzen ( $p=0,09$ ; Mann-Whitney-Test). Derselbe Effekt ließ sich auch im Vergleich von gesunden Probanden mit Tumorpatienten feststellen ( $p=0,04$ ; Mann-Whitney-Test). Im Vergleich mit PMN-MDSC war der Anteil an IL-10<sup>+</sup> M-MDSC in allen Gruppen signifikant höher (HIV:  $p=0,0002$ ; Tumor:  $p=0,0002$ ; HC:  $p=0,0003$ ; Mann-Whitney-Test). Innerhalb der beiden MDSC Subtypen sind es also die M-MDSC, die hauptsächlich IL-10 produzieren (vgl. Abbildung 14).



**Abbildung 14: Anteil der IL-10<sup>+</sup> MDSC an gesamt M-MDSC.** A) Anteil der IL-10<sup>+</sup> M-MDSC von HIV-1 Patienten und gesunden Probanden ist höher als der von Patienten mit Tumoren ( $p=0,09$ ;  $p=0,04$ ; Mann-Whitney-Test). B) Der Anteil der IL-10<sup>+</sup> M-MDSC ist im Vergleich mit IL-10<sup>+</sup> PMN-MDSC in allen Gruppen signifikant höher ( $p<0,05$ ; Mann-Whitney-Test).

#### 4.4 Keine Korrelation zwischen Anteil der IL-10<sup>+</sup>M-MDSC und Viruslast oder CD4 Zahl

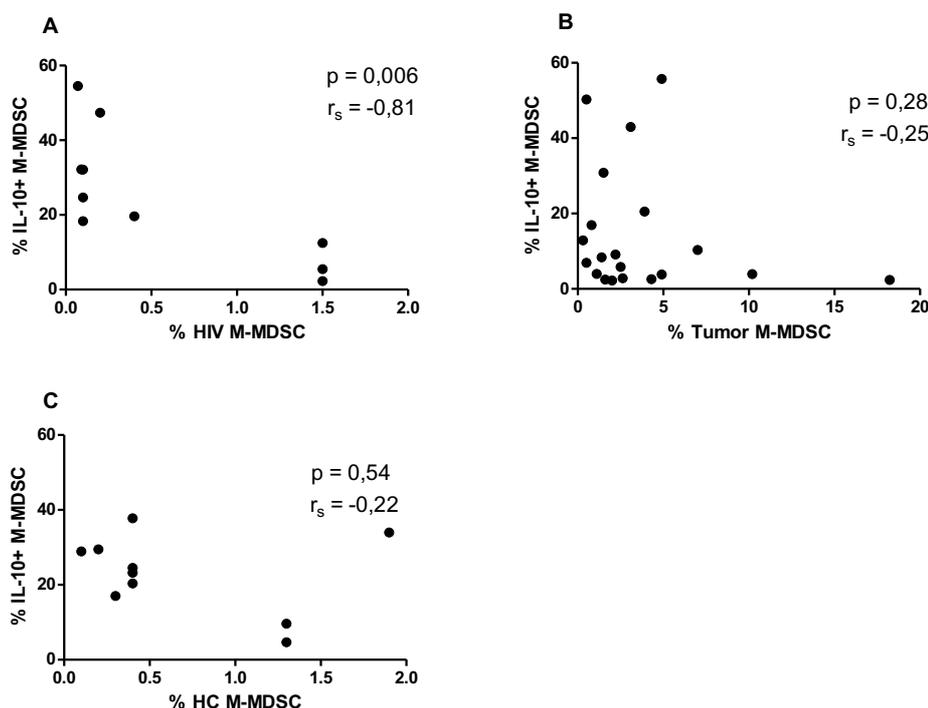
Als nächstes stellten wir uns die Frage, ob der Anteil der IL-10<sup>+</sup>M-MDSC mit Markern der klinischen Progression in der HIV-Erkrankung korrelierte. Dafür überprüften wir zunächst eine mögliche Korrelation zwischen den IL-10 produzierenden M-MDSC und der gemessenen Viruslast der Patienten. Dabei konnten wir keine Korrelation feststellen ( $\rho=0,09$ ;  $p=0,81$ ; Spearman). Des Weiteren interessierte uns ein Zusammenhang zwischen IL-10 produzierenden M-MDSC und der Höhe der CD4-T-Zellen. Auch hier ergab sich keine Korrelation ( $\rho=0,29$ ;  $p=0,43$ ; Spearman). Ein Fortschreiten der HIV-Infektion scheint demnach zumindest nicht direkt mit einer Zunahme der IL-10 Produktion von M-MDSC zusammenzuhängen (vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Korrelation zwischen Anteil IL-10 produzierender HIV M-MDSC mit Viruslast und CD4-T-Zellzahl.** A) Keine Korrelation zwischen Anteil der IL-10 produzierenden Zellen und Höhe der Viruslast ( $r_s=0,09$ ;  $p=0,81$ ; Rangkorrelation nach Spearman). B) Keine Korrelation zwischen Anteil der IL-10 produzierenden M-MDSC und Höhe der CD4-T-Zellen ( $r_s= 0,29$ ;  $p=0,43$ ; Rangkorrelation nach Spearman).

#### 4.5 Inverse Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und IL-10 Produktion bei HIV-1 Infektion

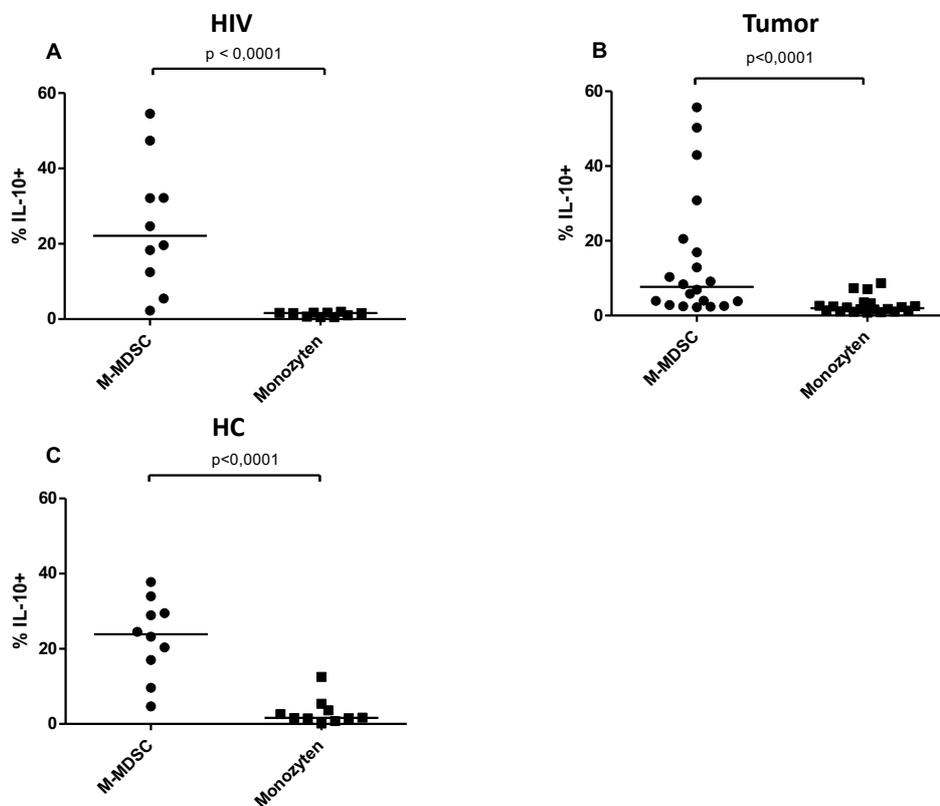
Da wir keine Korrelation zwischen Anzahl der IL-10 produzierenden M-MDSC und Markern der HIV Progression feststellen konnten, vermuteten wir eine mögliche Abhängigkeit zwischen Höhe der M-MDSC Frequenz und Anzahl der IL-10 produzierenden Zellen. Dabei konnten wir in der chronischen HIV-1 Infektion eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Anzahl der IL-10 produzierender Zellen und der M-MDSC Frequenz finden ( $\rho = -0,81$ ;  $p = 0,006$ ; Spearman). Bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren und gesunden Probanden, war diese Korrelation schwächer und erreichte keine Signifikanz (Tumor:  $\rho = -0,25$ ;  $p = 0,28$ ; HC:  $\rho = -0,22$ ;  $p = 0,54$ ; Spearman). Es zeigte sich demnach, dass hohe M-MDSC Frequenzen mit einem Funktionsverlust der Zellen einhergehen, der sich in einer reduzierten IL-10 Sezernierung zeigt (vgl. Abbildung 16).



**Abbildung 16: Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und Anteil an IL-10 produzierenden M-MDSC.** A) HIV-1: Inverse Korrelation zwischen M-MDSC und IL-10<sup>+</sup>M-MDSC ( $\rho = -0,81$ ;  $p = 0,006$ ; Spearman). B) Tumor: Trend zur inversen Korrelation zwischen M-MDSC und IL-10<sup>+</sup>M-MDSC ( $\rho = -0,25$ ;  $p = 0,28$ ; Spearman). C) HC: Keine signifikante inverse Korrelation zwischen M-MDSC und IL-10<sup>+</sup>M-MDSC ( $\rho = -0,22$ ;  $p = 0,54$ ; Spearman).

#### 4.6 Signifikant mehr spontane IL-10 Produktion von M-MDSC im Vergleich zu Monozyten

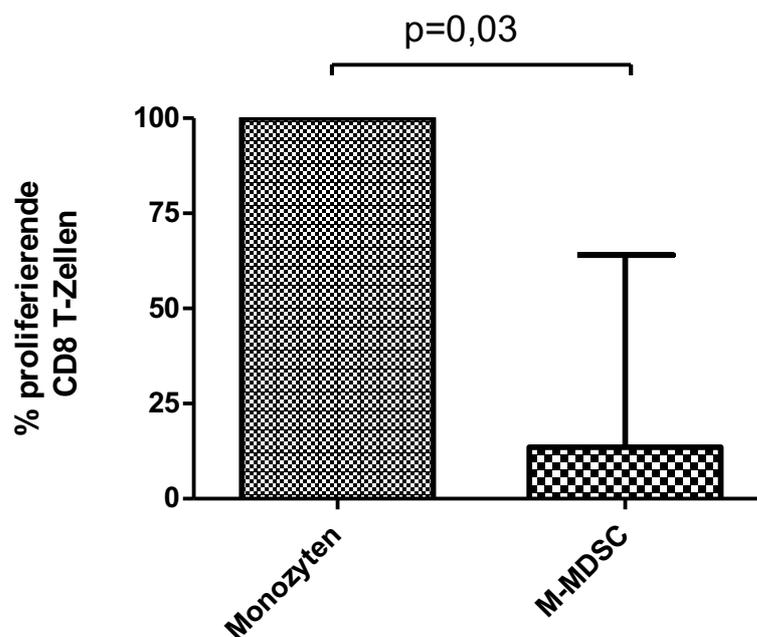
Auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu Monozyten und beschriebener IL-10 Produktion durch Monozyten, interessierte uns die IL-10 Produktion der M-MDSC im Vergleich zu Monozyten. Interessanterweise konnten wir in allen drei Untersuchungsgruppen (HIV, Tumor, HC) einen signifikant größeren Anteil an IL-10 produzierenden Zellen im Vergleich zu Monozyten feststellen. M-MDSC produzieren also selbstständig Interleukin-10 in einem Umfang, der die Produktion von Monozyten statistisch signifikant übertrifft (vgl. Abbildung 17).



**Abbildung 17: Anteil IL-10 produzierenden Zellen im Vergleich zwischen M-MDSC und Monozyten bei HIV, Tumor und HC. A) HIV:** Signifikant größerer Anteil an IL-10<sup>+</sup> M-MDSC im Vergleich zu Monozyten ( $p < 0,0001$ ; Mann-Whitney-Test). **B) Tumor:** Signifikant größerer Anteil an IL-10<sup>+</sup> M-MDSC im Vergleich zu Monozyten ( $p < 0,0001$ ; Mann-Whitney-Test). **C) HC:** Signifikant größerer Anteil an IL-10<sup>+</sup> M-MDSC im Vergleich zu Monozyten ( $p < 0,0001$ ; Mann-Whitney-Test).

#### 4.7 M-MDSC hemmen die Proliferation von CD8-T-Zellen signifikant

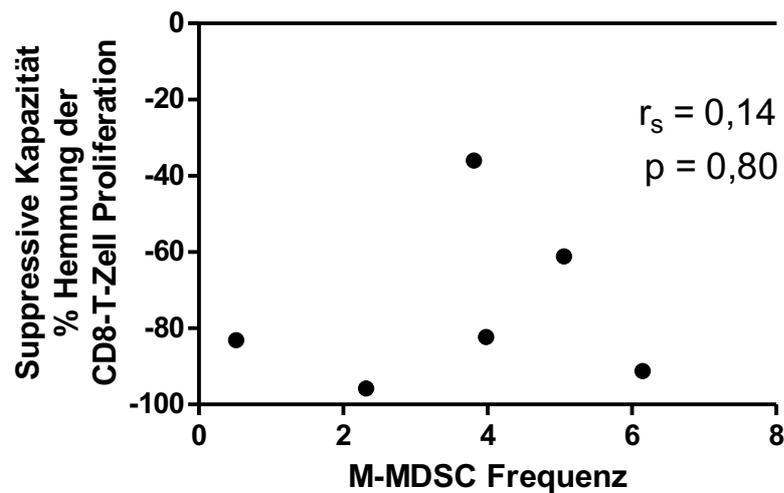
Um die immunsuppressive Kapazität der von uns als M-MDSC definierten CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-low</sup> Zellen zu bestätigen, führten wir Proliferationsassays aus. Dabei koinkubierten wir zuvor mittels eines FACS Sorters isolierte M-MDSC oder Monozyten von Tumorpatienten (n=4) und gesunden Probanden (n=2) mit CD8-T-Zellen von gesunden Probanden. Die Proliferation unter Zugabe von Monozyten wurde auf 100% gesetzt und die Proliferation unter Zugabe der M-MDSC im Verhältnis dazu berechnet. Die CD8-T-Zell Proliferation konnte durch M-MDSC im Vergleich mit Monozyten signifikant gehemmt werden (p=0,03; Wilcoxon matched pairs test) (vgl. Abbildung 18).



**Abbildung 18: Koinkubation von CD8-T-Zellen mit Monozyten oder M-MDSC.** Die CD8-T-Zellen wurden mit einem CD3/CD8 Stimulus zur Proliferation angeregt. Im Vergleich zu Monozyten hemmen M-MDSC die Proliferation von CD8-T-Zellen signifikant (p=0,03; Wilcoxon matched pairs test).

#### 4.8 Keine Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und suppressiver Kapazität

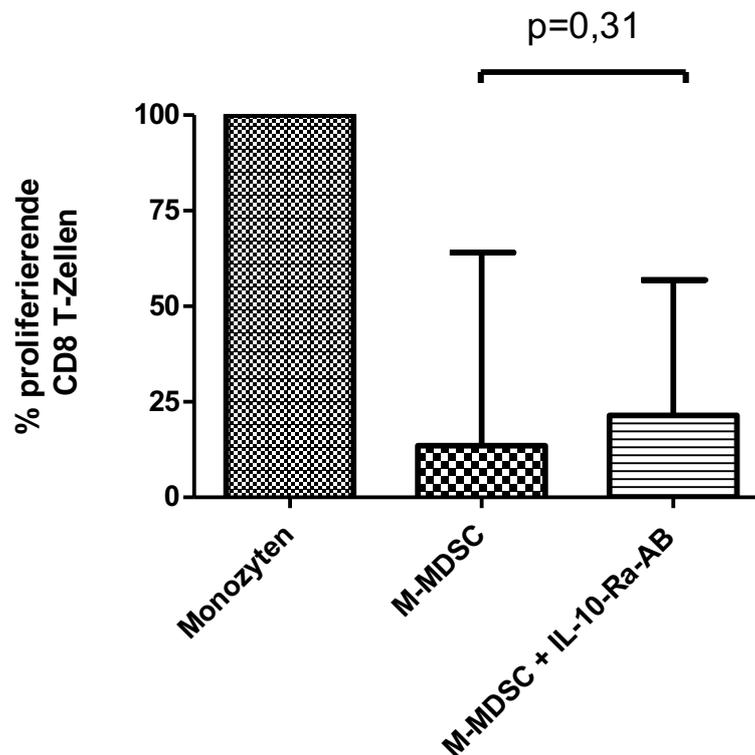
Zur Überprüfung der Fragestellung, ob die Höhe der M-MDSC Frequenz mit ihrer suppressiven Funktion korreliert, errechneten wir zunächst die suppressive Kapazität der untersuchten M-MDSC (vgl. 3.14). Im Anschluss untersuchten wir einen möglichen Zusammenhang. Dabei ergab sich keine Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und suppressiver Kapazität ( $\rho=0,14$ ;  $p=0,80$ , Spearman). Die Stärke des suppressiven Charakters von M-MDSC muss daher von anderen Einflussfaktoren abhängig sein.



**Abbildung 19:** Keine Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und suppressiver Kapazität ( $\rho=0,14$ ;  $p=0,80$ , Spearman).

#### 4.9 Keine Wiederherstellung der CD8-T-Zell Proliferation unter Zugabe eines IL-10-R $\alpha$ blockierenden Antikörpers

Auf Grund des erhöhten Anteils IL-10 produzierender M-MDSC vermuteten wir einen Zusammenhang zwischen der IL-10 Produktion und der suppressiven Eigenschaften der M-MDSC. Wir postulierten, dass eine Hemmung des IL-10 Signalwegs durch einen IL-10 blockierenden Antikörper die suppressive Wirkung der M-MDSC aufheben und die CD8-T-Zell Proliferation wiederherstellen könnte. Wir wiederholten die Proliferationsassays unter Zugabe eines IL-10 Rezeptor Alpha blockierenden Antikörpers (IL-10-R $\alpha$ -AB) mit Monozyten oder M-MDSC. Die Proliferation unter Zugabe von Monozyten wurde auf 100% gesetzt und die Proliferation unter Zugabe des IL-10-R $\alpha$ -AB oder der M-MDSC + IL-10-R $\alpha$ -AB im Verhältnis dazu berechnet. Im Gegensatz zu unseren Erwartungen konnte die Zugabe des blockierenden Antikörpers die CD8-T-Zell Proliferation bei M-MDSC ( $p=0,31$ ; Wilcoxon matched pairs test), nicht wiederherstellen. IL-10 scheint für die Suppression der CD8-T-Zell Proliferation also zumindest nicht direkt und alleine verantwortlich zu sein.



**Abbildung 20: Koinkubation von CD8-T-Zellen mit Monozyten oder M-MDSC mit Zugabe eines IL-10 Rezeptor alpha blockierenden Antikörpers (IL-10-R $\alpha$ -AB).** Die Zugabe eines IL-10 RAB ergab keine Zunahme der Proliferation bei Monozyten ( $p=0,69$ ; Wilcoxon matched pairs test). Ebenso wenig ergab sich eine Zunahme der Proliferation bei M-MDSC ( $p=0,31$ ; Wilcoxon matched pairs test).

## 5 Diskussion

Der Zweck der durchgeführten Forschungsarbeit war die Fragestellung, inwieweit IL-10 für die Wirkungsweise von M-MDSC verantwortlich ist. Wir beschreiben im Blut von HIV Patienten, Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren und gesunden Probanden CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-low</sup> M-MDSC, die signifikant mehr IL-10 produzieren, als Monozyten. CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-low</sup> M-MDSC sind in unserer Studie nachweislich in der Lage CD8-T-Zell Proliferation zu inhibieren. Allerdings ist der inhibitorische Wirkmechanismus nicht allein IL-10 abhängig.

### 5.1 Keine Erhöhung von M-MDSC in der chronischen HIV Infektion

Bei der Überprüfung der M-MDSC Frequenzen konnten wir bei chronischen HIV Patienten ohne Therapie im Vergleich zu gesunden Probanden keine Veränderung feststellen. Bei beiden Gruppen lag der Median der M-MDSC Frequenz bei etwa 0,5 %. Dieses Ergebnis war in Übereinstimmung mit einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe [26] und den Ergebnissen von Zhang et al.[47]. Wang *et al.* erwähnen in ihrer Veröffentlichung zwar erhöhte M-MDSC Frequenzen, allerdings wird in ihrer Publikation auch lediglich eine Frequenz von im Median 0,5% angegeben[45]. Dies entspricht in Höhe der Frequenz unseren Ergebnissen und damit auch der Höhe von gesunden Probanden. Allerdings kamen andere Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Qin *et al.* konnten für ihre Studie an 61 chronisch, untherapierten HIV Patienten einen Median an M-MDSC Frequenz von circa 4% als Anteil aller PBMC messen[24]. Das waren signifikant mehr M-MDSC als bei gesunden Kontrollen. Garg *et al.* konnten einen Median an M-MDSC Frequenz von 12,81% messen, allerdings wurden nur 5 HIV Patienten untersucht[48]. Ebenso verhält es sich mit der Korrelation von M-MDSC Frequenz und CD4-T-Zell Anzahl oder HIV- Viruslast. Während unsere Arbeitsgruppe kein Korrelation feststellen konnte, war diese durch die Arbeitsgruppe von Qin *et al.* positiv messbar [24]. Die verschiedenen Ergebnisse könnten durch geografische Unterschiede und den Einschluss verschiedener Ethnien bedingt sein. Während Qin *et al.* für ihre Untersuchungen hauptsächlich Probanden aus Ostasien rekrutierten, kamen unsere Probanden mehrheitlich aus Mitteleuropa. Dass unterschiedliche Genotypen einen unmittelbaren Einfluss auf immunologische Kontrolle haben ist belegt[20, 70, 71]. Auch könnte die geografische Dominanz

verschiedener HIV-Subtypen einen Einfluss auswirken. Da bei Krebs unterschiedliche Tumorentitäten auch unterschiedliche MDSC Antworten hervorrufen können [39], ist es vorstellbar, dass auch unterschiedliche HIV Subtypen unterschiedliche MDSC Subtypen und Frequenzen hervorrufen. Während in Westeuropa der HIV-1-M-B Subtyp den Großteil der Infektionen ausmacht, sind es in China die Subtypen HIV-1-CRF01\_AE, HIV-1-M-C, HIV-1-M-B, HIV-1-CRF07\_BC und HIV-1-CRF08\_BC[72-74]. Genotyp der Probanden und HIV-Subtyp könnten also einen Einfluss auf MDSC Frequenz und Krankheitsprogress nehmen, der es schwierig macht verschiedene Studien direkt miteinander zu vergleichen.

### 5.1.1 Zeitpunkt der Blutprobenbearbeitung

Untersuchung aus unserem Labor kamen zu dem Ergebnis, dass M-MDSC nicht später als 4h nach Blutentnahme untersucht werden sollten, um eine Adhärenz der M-MDSC mit der Oberfläche von Labormaterialien (z.B. Reagenzglas) zu vermeiden. Auch das Einfrieren und Wiederauftauen der Zellen führt zu einer signifikanten Reduktion der M-MDSC Frequenz[75]. Hinzukommend ist zu bemerken, dass die Kryokonservierung von M-MDSC dazu führt, dass sie ihr inhibitorisches Potenzial auf T-Zellen verlieren[76]. Diese Tatsachen veranlassten uns dazu, MDSC immer nur aus frischem Blut zu untersuchen und auch die Transportwege möglichst kurz zu halten, ebenso wie es auch in anderen Studien gemacht wird [33, 43, 48] Die übereinstimmende Meinung hinsichtlich der MDSC-Forschung ist heute, dass diese Zellen nur aus frischem Material untersucht werden können.

### 5.1.2 Auswertung (Gating der M-MDSC)

In der Vergangenheit herrschte Uneinigkeit über die Phänotypisierung der verschiedenen MDSC-Subtypen. Erst 2016 schlugen Bronte *et al.* nach einer umfassenden Metaanalyse ein einheitliches Vorgehen zur Definition der MDSC Subtypen vor, welches zum einen die phänotypischen Oberflächenmarker für PMN- und M-MDSC klar festlegt und zum anderen den Nachweis einer Proliferationshemmung von T-Zellen einfordert[44]. M-MDSC wurden demnach als Zellen, die CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>low/-</sup> CD15<sup>-</sup> sind, definiert. Ältere Studien benutzten teilweise andere Oberflächenmerkmale oder Kombinationen (z.B. CD16, CD80, CD83, CD86, VEGFR, IL4R $\alpha$ , CD125) [39] zur Identifizierung von MDSC und konnten den Nachweis der Immunsuppression teilweise nicht erbringen. Wir hielten uns an die von Bronte *et al.*

empfohlenen phänotypische Marker von M-MDSC (CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> CD15<sup>-</sup>) und den Nachweis einer immunsuppressiven Wirkung.

Eine weitere Uneinigkeit besteht über das Vorgehen des korrekten Gatings von MDSC. Während wir uns bei der Gatingstrategie am Procedere von Hoechst et al. orientierten (vgl. 3.13) [33], wählten sowohl Qin *et al.*, als auch Garg *et al.* ein anderes Gating. Einen besonderen Stellenwert bekommt diesbezüglich die Auswahl des korrekten HLA-DR Schwellenwertes, der Zellpopulationen in ein HLA-DR<sup>+</sup> und ein HLA-DR<sup>-/low</sup> Kompartiment einteilt. Da die CD14<sup>+</sup> Population bezüglich des HLA-DR Markers keine klare Aufteilung in zwei Populationen zeigt, jedoch trotzdem unterteilt werden muss, kann man ohne die Verwendung einer Isotyp-Kontrolle eigentlich keine klare Aussage über den korrekten Schwellenwert treffen. Leider wurden sowohl in der Studie von Qin *et al.*, als auch von Garg *et al.* keine Isotyp-Kontrollen verwendet, sodass die ermittelten Ergebnisse schwierig mit unseren vergleichbar sind.

## **5.2 Zusammenhang zwischen M-MDSC Frequenz und IL-10 Produktion**

Wir konnten in unsere Studie den Nachweis erbringen, dass M-MDSC in der Lage sind selbstständig und ex-vivo IL-10 zu produzieren. Die Anzahl der IL-10 produzierenden M-MDSC war dabei bei HIV größer als bei Patienten mit soliden Tumoren, obwohl diese höhere M-MDSC Frequenzen aufweisen konnten. Zwischen M-MDSC Frequenz und IL-10 Produktion konnten wir bei HIV zudem eine negative Korrelation feststellen.

### **5.2.1 Erschöpfung der IL-10 Produktion**

Normalerweise reagiert das Immunsystem bei einer Infektion nur solange auf ein Pathogen, bis dieses beseitigt werden kann und infizierte Zellen abgetötet sind. Charakteristisch für die HIV-Infektion ist eine dauerhafte Stimulation des Immunsystems durch die Persistenz des Erregers. Mit dem zunehmenden Mangel an funktionell wichtigen CD4-T-Zellen stellt der kontinuierliche Kampf gegen das HI-Virus und opportunistische Infektionen eine immense Herausforderung für die körpereigene Abwehr dar. Dieser Belastung ist das Immunsystem auf Dauer nicht gewachsen. Es kommt zur Immunerschöpfung, die Hämatopoese, Zelllebensdauer, -differenzierung und -funktion betrifft [77]. Das Modell der Immunerschöpfung als

Resultat der chronischen und fortgeschrittenen HIV-Infektion ist hinreichend etabliert. Als Ausdruck der Immunerschöpfung verlieren CD8 T-Zellen im Laufe der Erkrankung ihre Effektivität. Statt viele Effektorfunktionen auszuüben (Produktion von Interferon-gamma, TNF-alpha, IL-2 und der Degranulation), können sie nur noch ein oder zwei Zytokine produzieren und proliferieren schlechter [16, 17, 78-81]. Aber auch für andere Zellsorten ist eine Erschöpfung mit Fortschreiten der HIV-Infektion beschrieben [82, 83]. Somit ließe sich die reduzierte IL-10 Produktion von höheren M-MDSC Frequenzen damit erklären, dass auch M-MDSC im Verlauf der HIV-Infektion einen Funktionsverlust erfahren. Sie wären somit eine weitere Zellsorte, die sich im Krankheitsverlauf erschöpft.

Auch Tumore erzeugen ein kontinuierliches Milieu aus Entzündungszellen und Botenstoffen[30, 84], welches die M-MDSC Funktionen beeinflussen könnte. Somit lässt sich auch die reduzierte IL-10 Produktion der hohen Tumor M-MDSC Frequenzen erklären. Allerdings konnten wir innerhalb der Tumorprobanden keine signifikante Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und IL-10 Produktion messen.

### **5.2.2 Negative Rückkopplung**

Eine weitere Erklärung für die reduzierte IL-10 Produktion von hohen M-MDSC Frequenzen wäre zudem das Einsetzen eines negativen Rückkopplungskreises, der starke IL-10 Sekretion selbst inhibiert. Zumindest für Monozyten ist solch ein Mechanismus beschrieben und könnte daher auf Grund ihrer phänotypischen und morphologischen Ähnlichkeit auch für M-MDSC zutreffen[85]. Auch vermehrte IL-10 Konzentrationen im Plasma könnten über diesen Mechanismus einwirken. Hohe IL-10 Konzentrationen sind im Plasma von HIV Patienten beschrieben und korrelieren mit dem Infektionsverlauf [62-64]. Somit könnten hohe Plasmakonzentrationen die IL-10 Produktion von hohen M-MDSC Frequenzen drosseln. Um solche Hypothesen verifizieren zu können, müssten IL-10 Plasmakonzentrationen bestimmt werden und ihr Ausmaß mit der Anzahl an IL-10 produzierenden M-MDSC verglichen werden.

### **5.3 M-MDSC als IL-10 Hauptproduzenten**

Unserem Wissen nach weist unsere Studie zum ersten Mal in der chronischen HIV-1 Infektion nach, dass CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-low</sup> M-MDSC signifikant mehr IL-10 produzieren

als CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Monozyten. Dass CD14<sup>+</sup>-Zellen IL-10 produzieren, ist bekannt und wurde in mehreren Studien nachgewiesen[64-66]. In diesen Studien wurden allerdings immer CD14<sup>+</sup> Zellen untersucht, ohne die Differenzierung zwischen HLA-DR<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>-/low</sup> Zellen zu machen. Es ist also möglich, dass in diesen Studien die IL-10 Produktion durch M-MDSC fälschlicherweise den Monozyten zugeschrieben wurde. Das könnte auch daran liegen, dass zwei dieser Studien (Hagiwara *et al.*; Ji *et al.*) zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurden, als die Bedeutung der M-MDSC für die HIV Infektion noch nicht bekannt war. Zwei Studien bei malignen Tumoren bekräftigen die These, dass M-MDSC innerhalb der CD14<sup>+</sup> Population die IL-10 Hauptproduzenten sind [55, 56]. Bereits 1999 wurde in einer Studie CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> Zellen mit den gleichen Eigenschaften identifiziert. Diese Studie untersuchte CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> Monozyten in malignem Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Neben IL-10 wurde eine gleichzeitige TGF- $\beta$  Expression bei diesen Zellen nachgewiesen. Die Zellen waren in der Lage T-Zell Proliferation und IFN- $\gamma$  Produktion zu inhibieren. Hervorzuheben ist, dass die CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> Zellen lediglich im malignen Aszites, nicht aber im peripheren Blut auffindbar waren[55].

In einer weiteren Studie an Patienten mit Prostatakarzinom (unter LHRH-Agonist Therapie) konnten auch hier erhöhte CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> Zellen gemessen werden. Diese konnten die T-Zell Proliferation reduzieren und nachweislich mehr IL-10 produzieren als CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Zellen. Aufgrund geringer Zellzahlen konnten in dieser Studie keine Proliferationsassays mit Rezeptor blockierenden Antikörpern durchgeführt werden. Zudem wurden nur 5 Prostatakarzinom Patienten untersucht[56].

#### **5.4 Keine Wirkung des IL-10-Rezeptor blockierenden Antikörpers auf Wiederherstellung der T-Zell Proliferation**

Um die proliferationshemmenden Eigenschaften der M-MDSC zu beweisen, führten wir Proliferationsassays durch und konnten feststellen, dass M-MDSC die CD8-T-Zell Proliferation signifikant inhibierten. Durch Einsatz eine IL-10-Rezeptor blockierenden Antikörpers beobachteten wir jedoch, dass offenbar nicht oder zumindest nicht allein das IL-10 für die proliferationshemmende Wirkung verantwortlich ist. Hierfür könnten verschiedene Ursachen möglich sein.

Die für diese Studie verwendete Proliferationsassaytechnik war eine unspezifische mixed lymphocyte reaction. Dabei werden „Targetzellen“ (CD8-T-Zellen) von gesunden Spendern mit „Effektorzellen“ (M-MDSC) zusammen *in vitro* inkubiert. Die Targetzellen wurden unspezifisch durch einen CD3/CD28-Stimulus zur Proliferation angeregt. Dies entspricht nicht den Gegebenheiten *in vivo*, bei denen T-Zellen spezifisch durch Antigenpräsentation anderer Zelltypen zur Zellvermehrung angeregt werden. Bronte et al. schlagen daher einen 3-armigen Proliferationsassay vor. Hierbei werden gesunde T-Zellen durch Antigenpräsentierende Zellen zunächst spezifisch stimuliert und danach die MDSC hinzugefügt. Dies soll *in vivo* Gegebenheiten besser darstellen und M-MDSC Funktionen antigenspezifisch testen[44]. Die Durchführung eines solchen Assays ist sehr aufwendig. Zudem sind wir der Ansicht, dass zur orientierenden Überprüfung von M-MDSC Funktionen auch die unspezifische Stimulation ausreichend ist.

Zum Studienzeitpunkt gab es keinen FACS Cell Sorter der biologischen Sicherheitsstufe 3 in München. Somit hatten wir nicht die Möglichkeit das infektiöse Blut von HIV-Patienten für unsere Versuche zu untersuchen. Daher entschieden wir uns die M-MDSC von Patienten mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und von gesunden Probanden für die Untersuchungen zu verwenden. Hierbei stellt sich die Frage, ob M-MDSC von Tumorpatienten und gesunden Probanden genauso funktionieren und reagieren wie HIV M-MDSC, da beispielsweise Tumor M-MDSC signifikant weniger IL-10 produzierten. Verschieden Erkrankungen induzieren unterschiedliche MDSC Phänotypen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen[39, 42, 44]. Für Tumore ist bekannt, dass unterschiedliche Zytokinkonzentrationen- und Mischverhältnisse zur Induktion von unterschiedlichen MDSC Subtypen führt und dass dies auch die Mechanismen der immunsuppressiven Aktivität beeinflussen könnte[86, 87]. Konkret ist für NSCLC die Wirkung über Sauerstoffradikale(ROS) beschrieben[35], die wir in unserem Proliferationsassay nicht testeten. In einer anderen Studie wird aber über positive Wirkung eines IL-10-R $\alpha$ -AB bei NSCLC berichtet[88]. Überlegt werden muss auch, ob das Wirken des IL-10-R $\alpha$ -AB vielleicht mit einer hohen Präsenz von HI-Viruskopien zusammenhängen könnte und daher vor allem im HIV-Modell wirkt. Jedenfalls beobachteten Kwon *et al.* in ihren Experimenten eine Zunahme der CD4-T-Zell Proliferation nach Addition eines IL-10-R $\alpha$ -AB nur bei virämischen Patienten[64].

Das Zusammenspiel verschiedener Zellsorten im Immunsystem ist sehr komplex. In vitro lässt sich dieses Zusammenspiel nur begrenzt reproduzieren. Verschiedene Mechanismen der Inhibition der T-Zell Proliferation wurden beschrieben (vgl. 1.4.4). In der Vorliegenden Studie wurde allein die Wirkung einer IL-10-Blockade auf die Proliferationsfähigkeit von CD8-T-Zellen überprüft. Vermutlich spielen aber auch andere Zytokine eine wichtige Rolle. In einer Studie mit Patientinnen mit Ovarialkarzinom gelang im malignen Aszites der Nachweis von CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> Monozyten, die nachweislich IL-10 produzierten. Zeitgleich konnte bei diesen Zellen auch die Produktion des Zytokins TGF- $\beta$  nachgewiesen werden. In Proliferationsassays inhibierten die CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> Monozyten T-Zell Proliferation. Von daher kann man die in der Studie beschriebenen Zellen als M-MDSC bezeichnen. Eine Wiederzunahme der Proliferation der T-Zellen konnte nur durch die gleichzeitige Substitution von IL-10-R $\alpha$ -AB und TGF- $\beta$ -AB hergestellt werden. Der Einsatz einer der beiden Antikörper alleine reichte dafür nicht aus. Wenn man dieses Ergebnis auf unsere Studie überträgt, stellt sich die Frage, ob nicht vielleicht andere Zytokine gemeinsam mit IL-10 eine Rolle für die inhibitorische Wirkung der M-MDSC spielen könnten. Die Überprüfung der TGF- $\beta$  Produktion von M-MDSC wäre von großem Interesse und folglich daraufhin auch die Durchführung von Koinkubationsassays mit gemeinsamen Einsatz von IL-10-R $\alpha$ -AB und TGF- $\beta$ -AB.

Die Studien von Loercher *et al.*[55] und Vuk-Pavlović *et al.* [56] beweisen, dass IL-10 CD8-T-Zell Proliferation inhibieren kann. Allerdings muss es ein komplexes Zusammenspiel zwischen den Zellen geben, das Blockaden von unterschiedlichen Botenstoffen voraussetzt, um T-Zell Proliferation wieder herstellen zu können.

## 5.5 M-MDSC Frequenz und suppressive Kapazität

Wir konnten keine Korrelation zwischen M-MDSC Frequenz und Höhe der suppressiven Kapazität feststellen. Allerdings sind 6 Koinkubationsassays zu wenig, um daraus statistisch eine valide Schlussfolgerung zu ziehen. Als Folge des vermuteten Funktionsverlustes von M-MDSC ist es möglich, dass sich bei größerer Untersuchungszahl ein signifikantes Ergebnis einstellen könnte. Im Zuge davon wäre die Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen IL-10 produzierenden M-MDSC und der suppressiven Kapazität zusätzlich von wissenschaftlichem Interesse.

## **5.6 Klinische Bedeutung und Ausblick**

Angesichts der globalen Dimension der unheilbaren HIV-Infektion ist die Suche nach Heilungsformen für die Erkrankung von großer Bedeutung. Für die HIV-Infektion ist in den letzten Jahren auch die Suche nach immunologischen Heilungsansätzen in den Vordergrund gerückt. Die Bedeutung des Zytokins IL-10 für die Proliferationseigenschaften von CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen wurde in verschiedenen Studien beschrieben. In unsere Studie konnten wir erstmals nachweisen, dass dieses IL-10 zu signifikanten Anteilen von M-MDSC produziert wird. Obwohl M-MDSC die Proliferation von CD8-T-Zellen hemmen konnten, wurde dies zumindest nicht allein durch die Wirkung von IL-10 verursacht. Für die Wirkungsweise von IL-10 ist die Einbindung in ein komplexes regulatorisches Netzwerk beschrieben. In der Zukunft muss weitere Grundlagenforschung betrieben werden, die weitere Suppressionsmechanismen von M-MDSC untersucht und ein Zusammenspiel mit der von uns beschriebenen IL-10 Sekretion aufdeckt. Somit könnte durch gezielte Blockade verschiedener Mechanismen und Botenstoffe die proliferationshemmenden Eigenschaften der M-MDSC aufgehoben werden. Somit könnten CD8-T-Zellen ungehemmt proliferieren und das HI-Virus dauerhaft im Sinne einer funktionellen Heilung supprimieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. UN AIDS Fact Sheet 2017 , UNAIDS, 2017;  
[http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf)  
am 19.08.2017 um 15.18 Uhr
2. Barre-Sinoussi, F., A.L. Ross, and J.-F. Delfraissy, *Past, present and future: 30 years of HIV research*. Nat Rev Micro, 2013. **11**(12): p. 877-883.
3. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-871.
4. Gallo, R., et al., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 865-867.
5. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-767.
6. Klatzmann, D., et al., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 767-768.
7. Tindall, B. and D.A. Cooper, *Primary HIV infection: host responses and intervention strategies*. AIDS, 1991. **5**(1): p. 1-14.
8. Pantaleo, G., et al., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature, 1993. **362**(6418): p. 355-358.
9. Gupta, P., et al., *Enhanced Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Correlates with Development of AIDS*. Virology, 1993. **196**(2): p. 586-595.
10. Simon, V., D.D. Ho, and Q.A. Karim, *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*. Lancet, 2006. **368**(9534): p. 489-504.
11. Herold, G. (Hrsg.) (2013): Innere Medizin 2013, G. Herold, Köln
12. Murphy, Kenneth M. (2009): Janeway Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
13. Lambotte, O., et al., *HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1—Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication*. Clinical Infectious Diseases, 2005. **41**(7): p. 1053-1056.
14. Rinaldo, C., et al., *High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5838-42.
15. Thèze, J., et al., *HIV controllers: A multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression*. Clinical Immunology, 2011. **141**(1): p. 15-30.
16. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
17. Ferre, A.L., et al., *Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control*. Blood, 2009. **113**(17): p. 3978-3989.
18. Owen, R.E., et al., *HIV(+) elite controllers have low HIV-specific T cell activation yet maintain strong, polyfunctional T cell responses*. AIDS (London, England), 2010. **24**(8): p. 1095-1105.
19. Migueles, S.A., et al., *HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors*. Nature Immunology, 2002. **3**: p. 1061.
20. Pereyra, F., et al., *Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy*. The Journal of Infectious Diseases, 2008. **197**(4): p. 563-571.
21. Walker, C., et al., *CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication*. Science, 1986. **234**(4783): p. 1563-1566.

22. Borrow, P., et al., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 6103-10.
23. Migueles, S.A., et al., *HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(6): p. 2709-2714.
24. Qin, A., et al., *Expansion of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Dampens T Cell Function in HIV-1-Seropositive Individuals*. Journal of Virology, 2013. **87**(3): p. 1477-1490.
25. Tumino, N., et al., *In HIV-positive patients, myeloid-derived suppressor cells induce T-cell anergy by suppressing CD3zeta expression through ELF-1 inhibition*. AIDS, 2015. **29**(18): p. 2397-407.
26. Vollbrecht, T., et al., *Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells*. AIDS, 2012. **26**(12): p. F31-7.
27. Young, M.R., M. Newby, and H.T. Wepsic, *Hematopoiesis and Suppressor Bone Marrow Cells in Mice Bearing Large Metastatic Lewis Lung Carcinoma Tumors*. Cancer Research, 1987. **47**(1): p. 100-105.
28. Pak, A.S., et al., *Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Clinical Cancer Research, 1995. **1**(1): p. 95-103.
29. Almand, B., et al., *Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(1): p. 678-689.
30. Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha, *Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4499-506.
31. Diaz-Montero, C.M., et al., *Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2009. **58**(1): p. 49-59.
32. Marvel, D. and D.I. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected*. The Journal of Clinical Investigation, 2015. **125**(9): p. 3356-3364.
33. Hoechst, B., et al., *A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 234-43.
34. Liu, J., et al., *Aberrant frequency of IL-10-producing B cells and its association with Treg and MDSC cells in Non Small Cell Lung Carcinoma patients*. Human Immunology, 2016. **77**(1): p. 84-89.
35. Huang, A., et al., *Increased CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2013. **62**(9): p. 1439-1451.
36. Filipazzi, P., et al., *Identification of a New Subset of Myeloid Suppressor Cells in Peripheral Blood of Melanoma Patients With Modulation by a Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulation Factor–Based Antitumor Vaccine*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(18): p. 2546-2553.
37. Poschke, I., et al., *Immature Immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low Cells in Melanoma Patients Are Stat3hi and Overexpress CD80, CD83, and DC-Sign*. Cancer Research, 2010. **70**(11): p. 4335-4345.

38. Lin, Y., et al., *Immunosuppressive CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2011. **117**(3): p. 872-881.
39. Greten, T.F., M.P. Manns, and F. Korangy, *Myeloid derived suppressor cells in human diseases*. *Int Immunopharmacol*, 2011. **11**(7): p. 802-7.
40. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 162-174.
41. Goh, C., S. Narayanan, and Y.S. Hahn, *Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections?* *Immunological Reviews*, 2013. **255**(1): p. 210-221.
42. Poschke, I. and R. Kiessling, *On the armament and appearances of human myeloid-derived suppressor cells*. *Clin Immunol*, 2012. **144**(3): p. 250-68.
43. Dumitru, C.A., et al., *Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2012. **61**(8): p. 1155-1167.
44. Bronte, V., et al., *Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards*. 2016. **7**: p. 12150.
45. Wang, L., et al., *Expansion of myeloid-derived suppressor cells promotes differentiation of regulatory T cells in HIV-1+ individuals*. *AIDS*, 2016. **30**(10): p. 1521-31.
46. Tumino, N.P., et al., *Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Increased in Early Phases of Primary HIV Infection Depending on TRAIL Plasma Level. [Miscellaneous Article]*. 2017: *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* April 15, 2017;74(5):575-582.
47. Zhang, Z.-N., et al., *Myeloid-Derived Suppressor Cells Associated With Disease Progression in Primary HIV Infection: PD-L1 Blockade Attenuates Inhibition*. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2017. **76**(2): p. 200-208.
48. Garg, A. and S.A. Spector, *HIV type 1 gp120-induced expansion of myeloid derived suppressor cells is dependent on interleukin 6 and suppresses immunity*. *J Infect Dis*, 2014. **209**(3): p. 441-51.
49. De Santo, C., et al., *Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008. **118**(12): p. 4036-4048.
50. Cai, W., et al., *Clinical Significance and Functional Studies of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Chronic Hepatitis C Patients*. *Journal of Clinical Immunology*, 2013. **33**(4): p. 798-808.
51. Rodríguez, P.C. and A.C. Ochoa, *Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives*. *Immunological Reviews*, 2008. **222**(1): p. 180-191.
52. Kusmartsev, S., et al., *Antigen-Specific Inhibition of CD8<sup>+</sup>T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species*. *The Journal of Immunology*, 2004. **172**(2): p. 989-999.
53. Tacke, R.S., et al., *Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species*. *Hepatology*, 2012. **55**(2): p. 343-353.
54. Rouse, B.T., P.P. Sarangi, and S. Suvas, *Regulatory T cells in virus infections*. *Immunological Reviews*, 2006. **212**(1): p. 272-286.
55. Loercher, A.E., et al., *Identification of an IL-10-Producing HLA-DR-Negative Monocyte Subset in the Malignant Ascites of Patients with Ovarian Carcinoma That Inhibits Cytokine Protein Expression and Proliferation of Autologous T Cells*. *The Journal of Immunology*, 1999. **163**(11): p. 6251-6260.
56. Vuk-Pavlović, S., et al., *Immunosuppressive CD14(+)/HLA-DR(low/-) Monocytes in Prostate Cancer*. *The Prostate*, 2010. **70**(4): p. 443-455.
57. Walter, M.R., *The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014. **380**: p. 191-212.

58. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(9): p. 5771-5777.
59. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor*. Annual Review of Immunology, 2001. **19**(1): p. 683-765.
60. Brooks, D.G., et al., *Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo*. Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1301-1309.
61. Ejrnaes, M., et al., *Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade*. The Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(11): p. 2461-2472.
62. Stylianou, E., et al., *IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression—down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy*. Clinical and Experimental Immunology, 1999. **116**(1): p. 115-120.
63. Brockman, M.A., et al., *IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells*. Blood, 2009. **114**(2): p. 346-356.
64. Kwon, D.S., et al., *CD4+ CD25+ regulatory T cells impair HIV-1-specific CD4 T cell responses by upregulating interleukin-10 production in monocytes*. J Virol, 2012. **86**(12): p. 6586-94.
65. Ji, J., et al., *HIV-1 induces IL-10 production in human monocytes via a CD4-independent pathway*. International Immunology, 2005. **17**(6): p. 729-736.
66. Hagiwara, E.R.I., et al., *Effect of HIV Infection on the Frequency of Cytokine-Secreting Cells in Human Peripheral Blood*. AIDS Research and Human Retroviruses, 1996. **12**(2): p. 127-133.
67. Erikstrup, C., et al., *Reduced mortality and CD4 cell loss among carriers of the interleukin-10 -1082G allele in a Zimbabwean cohort of HIV-1-infected adults*. AIDS, 2007. **21**(17): p. 2283-2291.
68. Murphy, Kenneth M. (2009): Janeway Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
69. Vollmar, Angelika (2013): Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
70. Carrington, M. and B.D. Walker, *Immunogenetics of Spontaneous Control of HIV*. Annual review of medicine, 2012. **63**: p. 131-145.
71. Fellay, J., et al., *A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1*. Science (New York, N.Y.), 2007. **317**(5840): p. 944-947.
72. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. Trends in Molecular Medicine, 2012. **18**(3): p. 182-192.
73. Buonaguro, L., M.L. Tornesello, and F.M. Buonaguro, *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype Distribution in the Worldwide Epidemic: Pathogenetic and Therapeutic Implications*. Journal of Virology, 2007. **81**(19): p. 10209-10219.
74. Yuan, R., et al., *Prevalence of different HIV-1 subtypes in sexual transmission in China: a systematic review and meta-analysis*. Epidemiology and Infection, 2016. **144**(10): p. 2144-2153.
75. Grutzner, E., et al., *Kinetics of human myeloid-derived suppressor cells after blood draw*. J Transl Med, 2016. **14**(1): p. 2.
76. Kotsakis, A., et al., *Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples*. Journal of Immunological Methods, 2012. **381**(1-2): p. 14-22.
77. Appay, V. and D. Sauce, *Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences*. The Journal of Pathology, 2008. **214**(2): p. 231-241.
78. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 350-354.
79. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1198-1202.

80. Shankar, P., et al., *Impaired function of circulating HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic human immunodeficiency virus infection*. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3094-3101.
81. Kostense, S., et al., *Persistent numbers of tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, but loss of interferon- $\gamma$ <sup>+</sup> HIV-specific T cells during progression to AIDS*. *Blood*, 2002. **99**(7): p. 2505-2511.
82. Seddiki, N. and D.E. Kaufmann, *Editorial overview: cell dysfunction and exhaustion in HIV infection*. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2014. **9**(5): p. 437-438.
83. Seddiki, N., V. Brezar, and R. Draenert, *Cell exhaustion in HIV-1 infection: role of suppressor cells*. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2014. **9**(5): p. 452-458.
84. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 436-444.
85. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1991. **174**(5): p. 1209-1220.
86. Solito, S., et al., *Highlights on Molecular Mechanisms of MDSC-Mediated Immune Suppression: Paving the Way for New Working Hypotheses*. *Immunological Investigations*, 2012. **41**(6-7): p. 722-737.
87. Solito, S., et al., *Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2014. **1319**(1): p. 47-65.
88. Feng, P.-H., et al., *CD14<sup>+</sup>S100A9<sup>+</sup> Monocytic Myeloid-derived Suppressor Cells and Their Clinical Relevance in Non–Small Cell Lung Cancer*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2012. **186**(10): p. 1025-1036.

## 7 Anhänge

### 7.1 Probandenliste IL-10 ex vivo

<b>Probanden Tumor</b>				
<b>ID</b>	<b>Alter</b>	<b>F/M</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Stadium</b>
<b>Tumor 18</b>	60	F	NSCLC (Adenokarzinom)	UICC IV
<b>Tumor 20</b>	81	F	Hepatozelluläres Karzinom	-/-
<b>Tumor 22</b>	80	M	Malignes Melanom	AJCC III
<b>Tumor 25</b>	41	F	NSCLC (Adenokarzinom)	UICC III
<b>Tumor 27</b>	74	M	NSCLC (Plattenepithelkarzinom)	UICC III
<b>Tumor 28</b>	68	M	NSCLC (Plattenepithelkarzinom)	UICC IV
<b>Tumor 30</b>	77	M	Plattenepithelkarzinom der Trachea	-/-
<b>Tumor 33</b>	57	M	Malignes Melanom	AJCC IV
<b>Tumor 34</b>	86	F	NSCLC (Adenokarzinom)	UICC IV
<b>Tumor 35</b>	48	M	Malignes Melanom	AJCC Ib
<b>Tumor 36</b>	78	F	Malignes Melanom	-/-
<b>Tumor 37</b>	69	F	Mamma Karzinom (Adenokarzinom)	Lungen- metastasen
<b>Tumor 38</b>	83	F	NSCLC (Adenokarzinom)	UICC IV
<b>Tumor 39</b>	75	F	SCLC	Extensive Disease
<b>Tumor 40</b>	81	F	Kolon Karzinom	UICC IV
<b>Tumor 41</b>	66	M	NSCLC (Plattenepithelkarzinom)	UICC IV
<b>Tumor 42</b>	56	F	NSCLC (Plattenepithelkarzinom)	UICC IV
<b>Tumor 43</b>	70	M	NSCLC (Großzelliges Karzinom)	UICC III
<b>Tumor 46</b>	82	M	Plattenepithelkarzinom der Zunge	-/-
<b>Tumor 47</b>	79	M	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	Ann-Arbor IV

<b>Probanden HIV</b>				
<b>ID</b>	<b>Alter</b>	<b>F/M</b>	<b>Viruskopien/ml</b>	<b>CD4/<math>\mu</math>l</b>
<b>M 099</b>	54	M	53 501	4
<b>M 100</b>	41	F	300	450
<b>M 101</b>	52	M	10 695	326
<b>M 102</b>	40	M	393 938	73
<b>M 103</b>	51	M	33 208	204
<b>M 104</b>	45	M	543	5
<b>M 106</b>	47	M	102 107	55
<b>M 107</b>	53	M	120 000	30
<b>M 108</b>	33	M	74 941	226
<b>M 109</b>	48	M	250 000	30

<b>Probanden gesund</b>		
<b>ID</b>	<b>Alter</b>	<b>F/M</b>
<b>H002</b>	40	F
<b>H003</b>	43	M
<b>H004</b>	47	F
<b>H005</b>	52	F
<b>H006</b>	50	F
<b>H007</b>	42	F
<b>H008</b>	50	F
<b>H010</b>	54	M
<b>H013</b>	50	F
<b>H055</b>	26	F

## 7.2 Probandenliste Proliferationsassays

<b>Probanden Tumor</b>				
<b>ID</b>	<b>Alter</b>	<b>F/M</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Stadium</b>
<b>Tumor 72</b>	73	M	NSCLC (Adenokarzinom)	UICC III
<b>Tumor 74</b>	81	F	NSCLC (Adenokarzinom)	UICC IV
<b>Tumor 76</b>	76	F	NSCLC (nicht definiert)	TNM pT2 cN0 M0
<b>Tumor 77</b>	54	M	NSCLC (Adenokarzinom)	UICC III

<b>Probanden gesund</b>		
<b>ID</b>	<b>Alter</b>	<b>F/M</b>
<b>H 014</b>	54	F
<b>H 018</b>	45	F
<b>H 019</b>	31	M
<b>H 020</b>	30	M
<b>H 033</b>	27	F
<b>H 040</b>	43	F
<b>H 046</b>	29	M

## 7.3 Ausführliches Ethikvotum



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Frau  
PD Dr. R. Draenert  
Med. Poliklinik – Infektiologie  
Pettenkoferstr. 8a  
80336 München

Vorsitzender:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Telefon+49 (0)89 5160 - 5191  
Telefax+49 (0)89 5160 - 5192  
Ethikkommission@  
med.uni-muenchen.de

[www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de](http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de)

Postanschrift:  
Pettenkoferstr. 8a  
D-80336 München

Hausanschrift:  
Pettenkoferstr. 8  
D-80336 München  
München, 16.01.2013 Hb/ sc

<b>Titel:</b>	<b>Untersuchung von Vorkommen und Bedeutung von MDSC in der HIV- Infektion</b>
<b>Antragsteller:</b>	<b>PD Dr. R. Draenert</b>
<b>Projekt- Nr.</b>	<b>227-11</b>

Sehr geehrte Frau Kollegin Draenert,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 08.01.2013 mit der Vorstellung eines Flyers zu der o. g. Studie.

Es bestehen keine ethisch-rechtlichen Bedenken gegen die Verwendung des rekrutierungsunterstützenden Materials, so dass die schon ausgesprochene ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit weiter Gültigkeit hat.

Ich wünsche Ihrer Studie weiterhin einen guten Verlauf.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. G. Paumgartner (stellv. Vorsitzender), PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach

## 7.4 Danksagung

Mein größter Dank gebührt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Rika Draenert. Sie ermöglichte mir die Bearbeitung eines wichtigen und spannenden Themas in der HIV-Forschung. Als verlässliche Ansprechperson stand sie mir hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite und förderte mich in allen Belangen. Als kompetente Wissenschaftlerin, Klinikerin und Persönlichkeit ist sie mir größtes Vorbild, sodass es mir eine Ehre war unter ihrer Aufsicht promovieren zu dürfen. Für ihren uneingeschränkten Einsatz und ihre freundliche Art bin ich sehr dankbar.

Dem Leiter der Sektion Infektiologie, Herrn Prof. Dr. med. Johannes Bogner, danke ich vielmals für die Aufnahme in die Sektion Infektiologie und tatkräftige Unterstützung der Forschungsarbeit.

Zu großem Dank bin ich der Labortechnischen Assistentin Renate Stirner verpflichtet. Sie führte mich geduldig in die Arbeitsmethoden der Immunologie ein und war auf Grund ihres großen Erfahrungsschatzes eine wichtige Stütze. Dank ihrer herzlichen Art, ihrer Kollegialität und wertvollen Persönlichkeit werde ich mich immer gerne an die Zusammenarbeit erinnern.

Meinen Laborkolleginnen Eva Grützner und Julia Plagge danke ich für Hilfsbereitschaft, Verlässlichkeit und die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Dem gesamten Team der Infektionsambulanz möchte ich für die freundliche Aufnahme in das Team, die konstruktive Zusammenarbeit und die Hilfe beim Akquirieren der Patienten herzlich danken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Großeltern, meiner Großtante und meinem Großonkel, die während meines Studiums und der Promotion immer voll hinter mir standen.

Lucia danke ich für ihre volle Unterstützung und den guten Zuspruch jeden Tag.

Ich danke der Friedrich-Ebert-Stiftung für die finanzielle und ideelle Förderung während meines Studiums und der Promotion.

Mein letzter Dank gilt den zahlreichen Probanden, die oftmals trotz schwieriger persönlicher Situationen bereitwillig an der Studie partizipierten. Ich bin voller Zuversicht, dass die HIV-Infektion in Zukunft geheilt werden kann.

## 7.5 Eidesstattliche Versicherung

### Eidesstattliche Versicherung

Arenz, Lukas Philipp

---

Name, Vorname

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

**Die Rolle von Interleukin-10 für den Wirkmechanismus von monozytären  
myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC) in der chronischen HIV-1 Infektion**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 05.09.2019

Lukas Arenz

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand