

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV,
Sektion für Klinische Infektiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Untersuchung der Suppressionskapazität der
polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells
(PMN-MDSCs)
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
Ashley Kathleen Neizert
aus New York

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rika Draenert

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Jan-Michael Abicht
PD Dr. med. Jan Groetzner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Eva Grützner

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
Zusammenfassung	4
1. Einleitung	5
1.1. Das humane Immundefizienzvirus (HIV)	5
1.1.1. Geschichte.....	5
1.1.2. Epidemiologie	5
1.1.3. Klassifikation, Struktur und Pathophysiologie des HI-Virus.....	6
1.1.4. Die Stadien der HIV-Infektion	7
1.1.5. HIV-Controller	9
1.2. HIV und das Immunsystem.....	10
1.2.1. Immunaktivierung.....	10
1.2.2. Immunerschöpfung	11
1.2.3. Die Rolle der CD8 ⁺ T-Zellen	12
1.3. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)	13
1.3.1. Definition, Phänotypisierung und Funktion.....	13
1.3.2. MDSCs in Tumorerkrankungen	14
1.3.3. MDSCs in der HIV-Infektion.....	14
1.4. Zielsetzung der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material	16
2.2. Methoden.....	19
2.2.1. Durchführung der Studie	19
2.2.2. Studiengruppen.....	20
2.2.3. Blutentnahme	21
2.2.4. Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)	21
2.2.5. Zellzahlbestimmung.....	22
2.2.6. Bestimmung der PMN-MDSC-Frequenz	22
2.2.7. Separation der Effektorzellen.....	23
2.2.7.1. Separation mit magnetischer Vorseparation und FACS.....	23

2.2.7.2.	Separation mittels Magnet	26
2.2.7.3.	Auswertung der Separationsqualität	27
2.2.8.	CFSE-Färbung der Targetzellen.....	27
2.2.9.	Proliferationsassay	27
2.2.10.	Ermittlung der CD8 ⁺ T-Zellproliferation.....	28
2.2.11.	Bestimmung der Immunaktivierung	28
2.2.12.	Gating-Strategien.....	30
2.2.13.	Quantifizierung der Suppressionskapazität.....	33
2.2.14.	Statistische Auswertung	33
3.	Ergebnisse	34
3.1.	Klinische Daten und PMN-MDSC-Frequenzmessungen.....	34
3.1.1.	Höhere PMN-MDSC-Frequenzen bei PR- versus bei CO-Patienten.....	36
3.1.2.	Signifikante Korrelationen zwischen PMN-MDSC-Frequenz und CD4-Zahl bzw. Viruslast	37
3.2.	Ergebnisse der Proliferationsassays	38
3.2.1.	Signifikante Hemmung der CD8 ⁺ T-Zellproliferation in der Gruppe PR.....	38
3.2.2.	Keine signifikanten Unterschiede in der Suppressionskapazität zwischen den Studiengruppen.....	39
3.2.3.	Negative Korrelation zwischen Suppressionskapazität und PMN-MDSC-Frequenz.....	40
3.2.4.	Keine Korrelation zwischen Suppressionskapazität und CD4-Zahl bzw. Viruslast.....	41
3.2.5.	Geringe Suppressionskapazität bei PMN-MDSC-Frequenz > 2,5 %	42
3.3.	Keine Korrelation zwischen Immunaktivierung und PMN-MDSC-Frequenz.....	43
3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	45
4.	Diskussion	46
4.1.	Diskussion der Methodik	46
4.1.1.	Patienten	46
4.1.2.	Uneinheitliche Definition der PMN-MDSCs.....	47
4.1.3.	Separationsmethoden	47
4.1.4.	Koinkubation von Zellen unterschiedlicher Probanden	47
4.1.5.	MDSCs des peripheren Blutes versus MDSCs in Organen	48
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	49
4.2.1.	Korrelation zwischen PMN-MDSCs und der Krankheitsprogression	49
4.2.2.	Verlust der Suppressionskapazität in der fortgeschrittenen HIV-Infektion	49

4.2.3. Immunaktivierung und PMN-MDSCs	50
4.3. Fazit und Ausblick	52
5. Literaturverzeichnis.....	53
6. Anhang.....	61
Danksagung.....	62
Eidesstattliche Versicherung.....	63

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ART	Antiretrovirale Therapie
BRO	Bronchialkarzinom-Patient
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester
CMV	Zytomegalievirus
CO	Controller
Cp	Copies
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FSC	Forward scatter
HC	Healthy control
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen - Isotyp DR
IL-2, -6, -8	Interleukin-2, -6, -8
MDSCs	Myeloid derived suppressor cells
- M-MDSCs	Monocytic myeloid derived suppressor cells
- PMN-MDSCs	Polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells
MHC	Major histocompatibility complex
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PHA	Phytohemagglutinin
PR	Progressor
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SSC	Side scatter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des HI-Virus.....	7
Abbildung 1.2: Verlauf der natürlichen HIV-Infektion	8
Abbildung 2.1: Studiendurchführung.....	19
Abbildung 2.2: PBMC-Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation	21
Abbildung 2.3: Das Prinzip der magnetischen Zellseparation	24
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Koinkubationsansatzes	28
Abbildung 2.5: Gatingstrategie PMN-MDSCs	30
Abbildung 2.6: Gating der CD8 ⁺ T-Zellproliferation	31
Abbildung 2.7: Bestimmung der Immunaktivierung der CD8 ⁺ T-Zellen	32
Abbildung 3.1: Vergleich der PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppen	36
Abbildung 3.2: Korrelation zwischen PMN-MDSC-Frequenz und CD4-Zahl bzw. Viruslast	37
Abbildung 3.3: Hemmung der CD8 ⁺ T-Zellproliferation durch PMN-MDSCs	38
Abbildung 3.4: Vergleich der Suppressionskapazitäten der Studiengruppen	39
Abbildung 3.5: Korrelation zwischen Suppressionskapazität und PMN-MDSC-Frequenz	40
Abbildung 3.6: Keine Korrelation zwischen Suppressionskapazität und Viruslast bzw. CD4-Zahl.....	41
Abbildung 3.7: Suppressionskapazität bei PMN-MDSC-Frequenz < 2,5 % und > 2,5 %.....	42
Abbildung 3.8: Vergleich der Immunaktivierung zwischen den Studiengruppen	43
Abbildung 3.9: Keine Korrelation zwischen Immunaktivierung, PMN-MDSC-Frequenz und Suppressionskapazität	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien	16
Tabelle 2.2: Medien und Pufferlösungen	16
Tabelle 2.3: Antikörper	17
Tabelle 2.4: Verbrauchsartikel	17
Tabelle 2.5: Geräte	18
Tabelle 2.6: Software	18
Tabelle 3.1: Klinische Daten und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppe PR	34
Tabelle 3.2: Klinische Daten und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppe CO.....	34
Tabelle 3.3: Klinische Daten und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppe BRO.....	35
Tabelle 3.4: Charakteristika und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppe HC	35
Tabelle 3.5: Zusammenfassung der klinischen Daten und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppen	35

Zusammenfassung

Die HIV-1-Infektion ist durch die Ausbildung einer progredienten Immunschwäche gekennzeichnet. Zahlreiche Zellen des Immunsystems, darunter CD4⁺ T-Zellen, zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen verlieren im Verlauf der Erkrankung essentielle Effektorfunktionen. Insbesondere der persistenten Immunaktivierung wird eine wesentliche Rolle in diesem Prozess zugeschrieben, welcher als Immunerschöpfung bezeichnet wird.

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) beschreiben eine heterogene Population unreifer myeloischer Zellen, die sich hauptsächlich in zwei Subgruppen untergliedert: monozytäre MDSCs (M-MDSCs) und polymorphonukleäre MDSCs (PMN-MDSCs). MDSCs expandieren in einer Vielzahl von Erkrankungen und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit, T-Zellantworten zu hemmen, aus. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die immunsuppressive Funktion der PMN-MDSCs in der chronischen HIV-1-Infektion zu untersuchen und zu eruieren, ob sie dem Phänomen der Immunerschöpfung unterliegt.

Zu diesem Zweck wurden PMN-MDSCs des peripheren Bluts mit CD8⁺ T-Zellen in Proliferationsassays koinkubiert. Die Blutproben wurden Patienten in der chronischen HIV-1-Infektion, HIV-Controllern, Bronchialkarzinompatienten und gesunden Probanden entnommen. Nach der Koinkubation wurde die Suppressionskapazität, welche ein Maß für die Hemmung der T-Zellproliferation durch die PMN-MDSCs darstellt, zwischen den Studiengruppen verglichen. Zusätzlich wurde die PMN-MDSC-Frequenz und das Ausmaß der Immunaktivierung der CD8⁺ T-Zellen bestimmt.

Die suppressive Aktivität der PMN-MDSCs bestätigte sich in allen untersuchten Studiengruppen. Dabei konnte erstmals nachgewiesen werden, dass PMN-MDSCs in der unbehandelten, chronischen HIV-1-Infektion ihre Suppressionskapazität verlieren. Es zeigte sich, dass die Hemmung der T-Zellproliferation bei PMN-MDSC-Frequenzen > 2,5 % niedriger ausfiel als bei Frequenzen < 2,5 %. Darüber hinaus wurden Korrelationen zwischen der PMN-MDSC-Frequenz, Viruslast und CD4-Zellzahl festgestellt. Zwischen quantitativen und qualitativen Eigenschaften der PMN-MDSCs und den Immunaktivierungsmarkern CD38 und HLA-DR bestand hingegen kein signifikanter Zusammenhang.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass PMN-MDSCs in der fortgeschrittenen HIV-1-Infektion ihre immunsuppressive Funktion verlieren und somit von der Immunerschöpfung betroffen sind.

1. Einleitung

1.1. Das humane Immundefizienzvirus (HIV)

1.1.1. Geschichte

Im Jahr 1981 wurde in den USA eine ungewöhnliche Häufung von Erkrankungen an der Pneumocystis-jirovecii-Pneumonie und Kaposi-Sarkomen beobachtet. Die betroffenen Patienten litten zusätzlich unter weiteren Erkrankungen, die zumeist nur bei einem schweren Immundefekt auftreten [1, 2]. Das erworbene Immunschwächesyndrom AIDS (engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome) wurde damit zum ersten Mal beschrieben. 1983 gelang der Arbeitsgruppe um Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier am Institut Pasteur die Isolierung eines Retrovirus, das sie als Lymphadenopathie-Virus benannten und als auslösenden Erreger für AIDS verantwortlich machten [3]. Seit 1986 wird das Virus auf Empfehlung des International Committee on the Taxonomy of Viruses als Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) bezeichnet [4].

Nach heutigen Erkenntnissen entstand das humanpathogene HI-Virus infolge mehrerer Übertragungen des Simianen Immunodefizienz-Virus (SIV) von ihren natürlichen Wirten auf den Menschen. Rückrechnungen lassen vermuten, dass die erste Transmission des Virus auf den Menschen zu Beginn des letzten Jahrhunderts erfolgte [5]. Man unterscheidet zwischen zwei Virustypen: HIV-1 und HIV-2. Genanalysen nach ging HIV-1 aus dem SIV_{cpz} des zentralafrikanischen Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*) hervor [6]. HIV-2 dagegen leitet sich von dem SIV_{sm} der Rußmangaben (*Cercocebus atys*) ab [7]. Das im Gegensatz zu HIV-1 weniger pathogene HIV-2 ist in Westafrika endemisch und für weniger als 1 % aller HIV-Infektionen verantwortlich [8]. Diese Arbeit beschränkt sich ausschließlich auf die weltweit am häufigsten auftretende Virusvariante HIV-1 [9].

1.1.2. Epidemiologie

Laut dem Gemeinsamen Programm der Vereinten Nationen für HIV/AIDS (UNAIDS) waren 2018 weltweit 37,9 Millionen Menschen mit HIV infiziert, wovon 770 000 Erkrankte an AIDS-assoziierten Erkrankungen starben [10]. In Deutschland belief sich nach Angaben des Robert-Koch-Instituts die Zahl der HIV-positiven Menschen im Jahr 2018 auf 87 900 [11].

Dank breiterem Zugang zur antiretroviralen Therapie (ART), Investitionen in Aufklärungsarbeit und verbesserter Unterstützung von HIV-Infizierten können bei der Bekämpfung der HIV-Pandemie Fortschritte festgestellt werden. Seit dem Höchststand 2004 wurde ein globaler

Rückgang AIDS-assoziiierter Todesfälle um mehr als 55 % verzeichnet. Die Zahl der jährlichen Neuinfektionen ist seit 1997 um 40 % gefallen. Zudem verdreifachte sich zwischen 2010 und 2018 die Zahl der HIV-Infizierten, die eine Therapie bezogen. Allerdings sind diese Entwicklungen geographisch ungleich verteilt: Während in Westeuropa, Nordamerika und in Subsahara-Afrika die AIDS-assoziierte Mortalität und die Zahl der Neuinfektionen sanken, stieg die Inzidenz in Osteuropa und Zentralasien zwischen 2010 und 2017 um 29 %. Der Zugang zur ART ist aus strukturellen, kulturellen oder finanziellen Gründen nicht überall in gleichem Maße gewährleistet [10].

Die höchsten HIV-Prävalenzraten in der Bevölkerung zwischen 15 - 49 Jahren weisen Swasiland (2018: 27,3 %) und Lesotho (2018: 23,6 %) auf. Dies ist mit gravierenden Konsequenzen für die Wirtschaftskraft und Wettbewerbsfähigkeit dieser Länder verbunden [12-15]. Trotz wichtiger Fortschritte stellt HIV weiterhin eine globale Herausforderung auf medizinischer, sozialer und wirtschaftlicher Ebene dar.

1.1.3. Klassifikation, Struktur und Pathophysiologie des HI-Virus

HIV ist ein Retrovirus aus der Gattung der Lentiviren. Charakteristisch für Lentiviren (von lat. *lentus* = langsam) ist die Auslösung von chronischen, langsam fortschreitenden Erkrankungen, die zumeist mit Immunschwäche und Pathologien des zentralen Nervensystems vergesellschaftet sind. Als Retrovirus integriert sich das HI-Virus nach der Transkription seiner Ribonukleinsäure (RNA) in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) in das Genom seiner Wirtszelle.

Das HIV-1-Viruspartikel ist 100 – 120 nm groß und wird von einer Lipoproteinhülle umgeben (Abbildung 1.1). Bestandteil dieser Hülle sind die Glykoproteine gp120 und gp41, die für die Bindung des Virus an seine Zielzelle essenziell sind. Das kegelförmige Nukleokapsid enthält zwei Kopien der HIV-RNA. Zudem sind die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease in dem Virion verpackt. Das Virusgenom besteht aus neun Genen. *Gag* (group-antigen), *pol* (polymerase) und *env* (envelope) zählen zu den Hauptgenen. *Gag* codiert Proteine des Viruskernstücks, *pol* Enzyme der Virusreplikation und –integration und *env* Glykoproteine der Virushülle. Zusätzlich verfügt das HI-Virus über sechs kürzere akzessorisch-regulatorische Gene: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* [8].

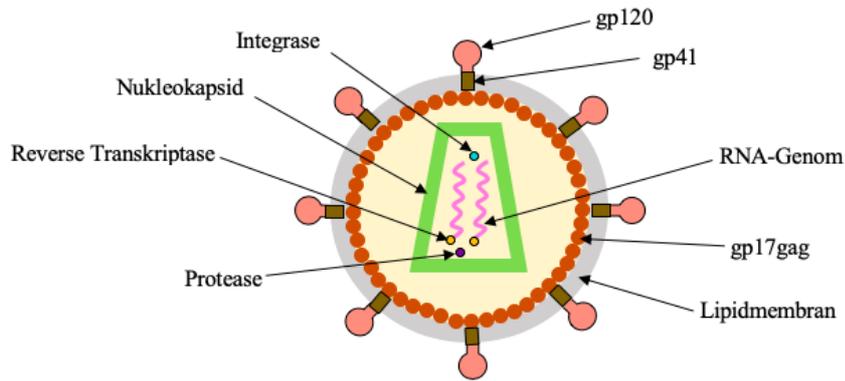


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des HI-Virus (angelehnt an [16])

Das HI-Viruspartikel wird von einer Lipiddoppelschicht umgeben, in welche die Glykoproteine gp120 und gp41 eingebettet sind. Das Matrixprotein p17 bindet von der Innenseite an die Membran. Das Kapsid enthält das virale Genom in Form von zwei RNA-Molekülen sowie die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease.

Das primäre Angriffsziel des HI-Virus sind Zellen, die das CD4-Oberflächenmolekül tragen. Dazu zählen insbesondere die CD4⁺ T-Helferzellen, die eine wichtige Rolle in der Immunabwehr einnehmen. Sie sind wesentlich an der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von MHC-Klasse-II-tragenden antigenpräsentierenden T-Zellen und Makrophagen beteiligt. Außerdem induzieren sie die Antikörperproduktion durch B-Zellen und unterstützen die Einwanderung von Immunzellen in entzündetes Gewebe. Auch Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und Mikrogliazellen des ZNS exprimieren in geringerem Maße das CD4-Oberflächenmolekül. Sie gehören dadurch ebenfalls zu den potentiellen Wirtszellen des Virus [16, 17].

Im Lymphgewebe, dem wichtigsten Virusreservoir, kann das Virus über lange Zeit persistieren. Hier kann der Erreger innerhalb ruhender Zellen der Detektion durch das Immunsystem entgehen. Dies ist vor allem der verminderten bzw. fehlenden Expression viraler Antigene auf der Zelloberfläche der Zellen geschuldet. Erst bei Aktivierung der infizierten Zelle wird das virale Genom transkribiert. Nach Transkription, Spleißung und Translation der messenger RNA (mRNA) werden die Viruskomponenten zu neuen Virionen zusammengebaut, die nach Freisetzung weitere Zellen infizieren und somit den Virusreplikationszyklus schließen [16].

1.1.4. Die Stadien der HIV-Infektion

Der Verlauf der HIV-1-Infektion gliedert sich in drei Phasen: akute Infektion, Latenzphase und symptomatische Phase/AIDS:

Akute Infektion: Innerhalb von 1 - 6 Wochen nach Infektion treten bei 40 – 90 % der HIV-Infizierten grippeähnliche Symptome wie Fieber, Durchfall, Abgeschlagenheit, Nachtschweiß, Lymphadenopathie und Myalgien auf. Ferner können auch orale Ulzerationen, Hautauschlag und Gewichtsverlust erste Manifestationen der Infektion sein. Die symptomatische Phase hält in der Regel 7 - 10 Tage an, doch wird die Infektion in diesem Stadium aufgrund der unspezifischen Natur der Symptome bzw. ihrer Abwesenheit oftmals nicht erkannt [18].

Die akute Infektion ist durch eine hohe Virusreplikationsrate gekennzeichnet, die zu einer Viruslast von mehr als 1×10^6 viralen RNA-Kopien pro Milliliter Plasma führen kann [19]. Die CD4-Zahl sinkt meist auch messbar im peripheren Blut (Abbildung 1.2). Allein im Gastrointestinaltrakt sterben 30 – 60 % aller CD4⁺ T-Zellen ab [20, 21]. Infolgedessen kommt es zum vermehrten Übertritt bakterieller Bestandteile in den Blutkreislauf. Dieser Prozess wird als mikrobielle Translokation bezeichnet und zählt zu den potentiellen Auslösern der chronischen Immunaktivierung (Kapitel 1.2.1) [22].

Nach Einsetzen der adaptiven Immunantwort wird zumeist eine Rekonstitution der CD4-Zahl im peripheren Blut beobachtet. Zudem werden u.a. HIV-spezifische CD8⁺ T-Zellen gebildet, welchen eine entscheidende Rolle bei der initialen Kontrolle der Virusreplikation zugeschrieben wird [23]. Die Viruslast fällt, jedoch kann die Virusvermehrung nicht vollkommen unterbunden werden [21].

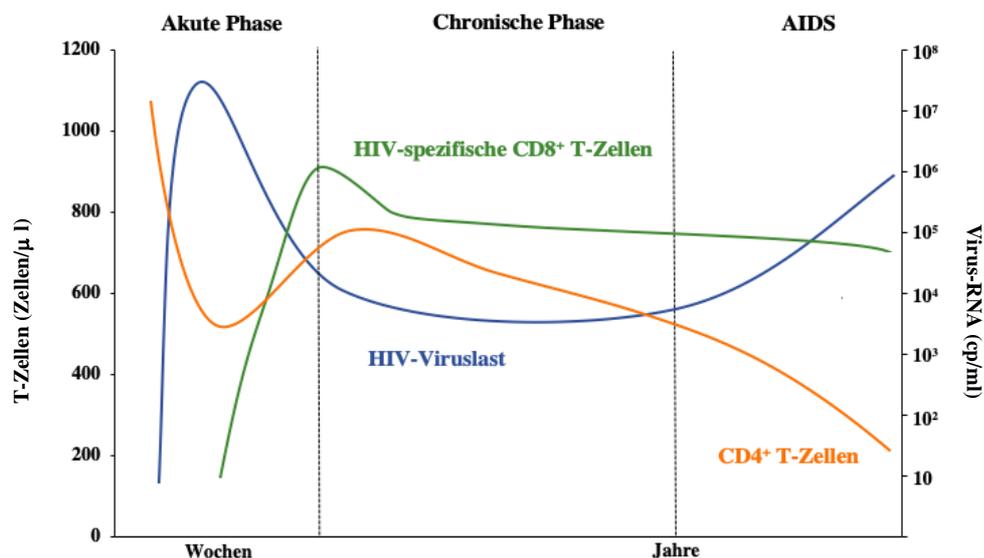


Abbildung 1.2: Verlauf der natürlichen HIV-Infektion (angelehnt an [24] und [18])

In den Wochen nach der Infektion steigt die Viruslast, während die CD4-Zellzahl abfällt. U.a. nach Einsetzen der CD8⁺ Immunantwort sinkt die Virämie und die CD4-Zellzahl erholt sich, wenn auch nicht vollständig. Im weiteren Verlauf nimmt jedoch die CD4-Zellzahl allmählich ab. Nach der asymptomatischen Phase, welche 5 – 10 Jahre anhält, kommt es vermehrt zu opportunistischen Infektionen. Bei einer CD4-Zellzahl unter 200/µl ist das Stadium AIDS erreicht.

Latenzstadium: An die akute Infektion schließt sich die Latenzphase an, die bei den meisten Patienten klinisch symptomlos verläuft. Die Virämie pendelt sich nach dem initialen Peak in der akuten Phase auf ein individuell unterschiedliches Niveau ein, welches als „viraler Setpoint“ bezeichnet wird. Letzterer ist ein maßgeblicher Prädiktor für die Krankheitsprogression zum AIDS-Stadium und den Abfall der CD4⁺ T-Zellen [25]. Der Verlust dieser Zellen beträgt ca. 40 – 80 Zellen/ μ l pro Jahr, wobei der Wert individuell variiert [26]. Zu den Gründen für den CD4-Zellverlust zählen die Zytotoxizität des Virus, die Eliminierung infizierter Zellen durch zytotoxische T-Zellen, die persistierende Immunaktivierung und die gestörte T-Zellregeneration [16]. Trotz des äußerlich scheinbar stabilen Zustands schreitet die Erkrankung dennoch weiter fort und führt unbehandelt meist nach 5 – 10 Jahren zum Auftreten HIV-assoziiierter Krankheiten [27].

Symptomatisches Stadium/ AIDS: In der symptomatischen Phase treten AIDS-definierende Erkrankungen auf, welche auf die schwere Störung der zellulären Immunabwehr zurückzuführen sind. Zu diesen zählen z.B. die Pneumocystis-jirovecii-Pneumonie, die Soor-Ösophagitis, die Reaktivierung einer Zytomegalievirus (CMV) -Infektion und das Kaposi-Sarkom. Ursache für diese Erkrankungen sind Infektionen mit opportunistischen Erregern, die aufgrund der herabgesetzten Immunabwehr lebensbedrohlich für den HIV-Patienten sein können [16]. Zusätzlich besteht in diesem Stadium ein erhöhtes Risiko für das Auftreten neurologischer Komplikationen, wie z.B. der HIV-assoziierten Enzephalopathie, Demenz und der peripheren Polyneuropathie [28]. Laborchemisch manifestiert sich der fortgeschrittene Immundefekt in einer CD4-Zellzahl $< 200/\mu$ l [29]. Ohne ART versterben die Patienten in der Regel innerhalb von 2 - 4 Jahren nach Auftreten der ersten AIDS-Symptome [18].

1.1.5. HIV-Controller

Ein geringer Anteil der HIV-Patienten ist in der Lage, die Infektion über viele Jahre ohne ART zu kontrollieren. Patienten, welche die Virämie ohne Therapie unter 2000 Kopien (cp)/ml halten können, werden als HIV-Controller bezeichnet (< 1 % der HIV-Infizierten) [30]. Wenn keine Viruslast nachweisbar ist, spricht man von Elite-Controllern (ca. 0,3 % der HIV-Infizierten) [31]. Neben einer starken HIV-spezifischen Immunantwort sind eine normale CD4-Zellzahl sowie ein verzögerter Eintritt in die progressive Phase der Infektion charakteristisch. Insbesondere die HLA-Allele B57 und B27, aber auch Polymorphismen der Corezeptoren C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor-5 (CCR5) und CCR2 werden mit diesen protektiven Eigenschaften assoziiert [32]. Weiterhin können Fluchtmutationen, welche die virale Fitness einschränken, zu einer spontanen

Kontrolle der Virusvermehrung führen. Insgesamt scheinen jedoch günstige Faktoren auf der Seite des Wirts eine größere Rolle zu spielen [31].

1.2. HIV und das Immunsystem

1.2.1. Immunaktivierung

Als Folge der HIV-1-Infektion etabliert sich ein Zustand der chronischen Immunaktivierung, der in der Pathogenese der Erkrankung eine zentrale Bedeutung einnimmt. Er kennzeichnet sich durch die Expansion von T-Zellen mit aktiviertem Phänotyp und erhöhte Serumspiegel an proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen wie z.B. Interferon- α (INF- α), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8) [33-35]. Zu möglichen Ursachen der Immunaktivierung zählen u.a. die Virämie, die mikrobielle Translokation im Gastrointestinaltrakt und eine Coinfektion mit weiteren Viren, wie z.B. mit CMV [22, 33, 36].

Der chronische Inflammationszustand beeinträchtigt über zahlreiche Mechanismen die Homöostase des Immunsystems. Zum einen bewirkt er einen erhöhten T-Zellumsatz, da aktivierte T-Zellen eine kürzere Lebensdauer besitzen. Dies führt zur Depletion des naiven T-Zellpools und somit zu einer eingeschränkten Regenerationskapazität des Immunsystems [37]. Zum anderen soll die Immunaktivierung die Entwicklung von CD4⁺ T-Gedächtniszellen verhindern [38].

Während der CD4-Zellverlust ursprünglich auf die Zytotoxizität des HI-Virus zurückgeführt wurde, geht man mittlerweile davon aus, dass vor allem die chronische Immunaktivierung den Abfall der CD4-Zellen bewirkt [39]. Denn lediglich 0.01 – 1 % der CD4⁺ T-Zellen sind zu einem gegebenen Zeitpunkt mit dem Virus infiziert, sodass die direkte virale Infektion der Zellen allein nicht den massiven CD4-Zellverlust erklärt [40].

Einer Studie von *Deeks et al.* zufolge prognostiziert der Grad der Immunaktivierung vor Therapiebeginn, der analog zum viralen Setpoint als „Aktivierungs-Setpoint“ bezeichnet wird, unabhängig von der Viruslast die Geschwindigkeit des CD4-Zellverlusts im Krankheitsverlauf [41]. In der Tat gilt die Immunaktivierung als besseres prognostisches Kriterium für das Fortschreiten der Erkrankung zu AIDS und zum Tod als die CD4-Zellzahl oder die Viruslast [42, 43]. Darüber hinaus ist sie potentiell mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten weiterer Erkrankungen behaftet, welche die Lebenserwartung des HIV-Infizierten senken. Dies leitet sich aus der Erkenntnis ab, dass chronische Inflammationszustände eine wichtige Rolle in einer

Vielzahl pathologischer Prozesse spielen, wie z.B. bei Atherosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen und dem metabolischen Syndrom [44].

Immunhistochemisch wird das Ausmaß der Immunaktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen anhand der Oberflächenmarker CD38 und humanes Leukozytenantigen - Isotyp DR (HLA-DR) gemessen [45]. Das transmembranöse Glykoprotein CD38 nimmt als Enzym und Rezeptor multiple Funktionen wahr. So ist es an der Regulation zytoplasmatischer Calcium- und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) -Konzentrationen sowie an Zelladhäsionsprozessen beteiligt [46, 47].

HLA-DR ist ein Oberflächenmolekül, welches durch Antigenpräsentation an T-Helferzellen die Immunantwort initiieren kann [48]. Gleichzeitig stellt das Molekül einen Marker der Immunaktivierung dar. Ähnlich wie CD38 wird HLA-DR in der progressiven HIV-Infektion vermehrt auf der Zelloberfläche von CD8⁺ T-Zellen exprimiert [49].

1.2.2. Immunerschöpfung

Die Immunerschöpfung beschreibt den Verlust von Effektorfunktionen von T-Zellen bei Antigenpersistenz in Infektionen und Tumorerkrankungen. Zu den Effektorfunktionen zählen beispielsweise die Zytokinproduktion und die Proliferation [50]. Zahlreiche Immunzellen in der fortgeschrittenen HIV-Infektion sind von diesem Prozess betroffen. So stellten *Betts et al.* fest, dass die Polyfunktionalität von CD8⁺ T-Zellen von Patienten in der progressiven HIV-Infektion eingeschränkt ist [51]. Der Begriff „Polyfunktionalität“ bezog sich auf fünf Funktionen, darunter z.B. die Zytokinproduktion und die Degranulation. Auch bei CD4⁺ T-Zellen zeigte sich, dass die Produktion von IL-2 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) in der chronischen HIV-Infektion abnimmt [52]. Zudem beobachteten *McNeil et al.* eine signifikant niedrigere Proliferation von HIV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen bei hoher Viruslast, als bei Viruslasten unter der Nachweisgrenze [53]. Ferner unterliegen auch B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) der Immunerschöpfung [54, 55].

Die Genese der Immunerschöpfung ist noch unzureichend geklärt. Eine Hypothese ist, dass die chronische Immunaktivierung dazu beiträgt, indem sie die Hochregulierung von inhibitorischen Rezeptoren induziert. Zu diesen Rezeptoren zählen z.B. das lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) und das programmed cell death protein 1 (PD-1) [56]. PD-1 wird eine Hemmung der Zellproliferation und der IFN- γ -Produktion durch die Hochregulation eines Transkriptionsfaktors zugeschrieben [57]. Der Marker korreliert nach einer Studie von *Day et al.* positiv mit der Viruslast und einer eingeschränkten CD8⁺ T-Zellfunktion [58].

Im Übrigen ist die Immunerschöpfung nicht auf die HIV-Infektion beschränkt. Auch in weiteren Virusinfektionen wie der Hepatitis B- und C-Infektion verlieren T-Zellen im Krankheitsverlauf ihre Funktionsfähigkeit [59, 60]. Es wird vermutet, dass die Immunerschöpfung einen wichtigen Prozess darstellt, der die Viruspersistenz in chronischen Infektionen begünstigt [61].

1.2.3. Die Rolle der CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ T-Zellen sind ein Bestandteil der erworbenen Immunantwort und nehmen eine wichtige Stellung in der Bekämpfung von Viren und Tumorzellen ein. Das Hauptmerkmal der CD8⁺ T-Zellen ist die Zytotoxizität. Diese wird vor allem durch Exozytose von Granula vermittelt, welche die Zelltod-induzierenden Enzyme Perforin und Granzym enthalten. Doch kann der Zelltod auch durch direkten Zellkontakt mittels Expression von Fas-Liganden auf der Zelloberfläche herbeigeführt werden. Außerdem sezernieren CD8⁺ T-Zellen Zytokine wie z.B. INF- γ (zytotoxische Wirkung, Makrophagenaktivierung) und IL-2 (Stimulation der klonalen Expansion von B- und T-Lymphozyten) [17].

Schon wenige Jahre nach der Entdeckung des HI-Virus wurden HIV-spezifische CD8⁺ T-Zellen beschrieben, die in der Lage sind, virusinfizierte Zellen zu eliminieren [62]. Weitere Bedeutung kam dieser Zellpopulation nach Studien zu, welche einen zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Anstieg der CD8⁺ T-Zellen in der akuten Infektion und dem Abfall der Plasmavirämie darlegten [23, 63]. Auch die Escape-Mutationen, die das HI-Virus vollzieht um der Erkennung durch die T-Zellen zu entkommen, demonstrieren den starken Immundruck den die CD8⁺ T-Zellen auf das Virus ausüben [64]. Zudem zeigten In-vivo-Studien an Rhesusaffen nach Depletion der CD8⁺ T-Zellen einen signifikanten Anstieg der Plasmavirämie, die nach der Regeneration der HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellpopulation wieder abfiel [65, 66].

CD8⁺ T-Zellen erschöpfen jedoch im Verlauf der HIV-Erkrankung (Kapitel 1.2.2). Darüber hinaus sind weitere Faktoren für die eingeschränkte Effektivität der Zellen verantwortlich: Zum einen wird ihre Differenzierung und Aktivierung durch die Dysfunktion der CD4⁺ T-Zellen behindert [67]. Zum anderen weisen bestimmte Gewebe mit hoher HIV-Replikationsrate, wie z.B. Lymphknotenfollikel, eine begrenzte Zugänglichkeit für CD8⁺ T-Zellen auf [68].

Die T-Zellerschöpfung trägt letztendlich dazu bei, dass der HIV-infizierte Organismus die Kontrolle über die Virusreplikation verliert.

1.3. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)

1.3.1. Definition, Phänotypisierung und Funktion

MDSCs beschreiben eine heterogene Gruppe unreifer myeloischer Zellen, die bei zahlreichen Tumorerkrankungen und Infektionskrankheiten expandieren. Sie zeichnen sich insbesondere durch ihre Fähigkeit aus, Immunantworten zu hemmen [69]. Es wird vermutet, dass diese Zellpopulation überschießende Immunreaktionen verhindert und somit eine regulatorische Aufgabe im Immunsystem wahrnimmt [70]. Ihr genauer Stellenwert ist jedoch weder im gesunden noch im erkrankten Organismus abschließend geklärt.

Young et al. wiesen erstmals 1987 auf „suppressive Knochenmarkszellen“ bei Bronchialkarzinomen hin, welche die Blastogenese von T-Zellen hemmten [71]. Zunächst waren weder der Phänotyp noch die Funktionen der Zellen klar definiert, was die Vergleichbarkeit der Studien in diesem Forschungsgebiet erschwerte. 2016 publizierten *Bronte et al.* eine Empfehlung zur einheitlichen Charakterisierung der MDSCs, die dieser Arbeit zugrunde liegt (Kapitel 2.2.6) [72].

Im Wesentlichen lassen sich MDSCs phänotypisch in zwei Gruppen aufteilen: monozytäre MDSCs (M-MDSCs), welche als $CD11b^+CD14^+HLA-DR^{-/lo}CD33^+$ definiert werden und polymorphonukleäre MDSCs (PMN-MDSCs), welche die Oberflächenmarker $CD11b^+CD14^-CD15^+CD66b^+$ exprimieren [72]. Da diese Arbeit die suppressive Funktion der PMN-MDSCs untersucht, wird im Folgenden lediglich diese Zellentität beschrieben.

Die immunhemmende Aktivität der PMN-MDSCs wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt, u.a. mittels der Produktion von Arginase-1 (ARG1) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Diese Enzyme führen zur Depletion des L-Arginins, eine für die T-Zellaktivierung und -proliferation wichtige Aminosäure. Außerdem produzieren MDSCs reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese induzieren die Nitrosylierung des T-Zellrezeptors, was wiederum die Interaktion der T-Zelle mit antigenpräsentierenden Zellen behindert [69]. Zwar modulieren PMN-MDSCs auch die Funktionen natürlicher Killerzellen und dendritischer Zellen, jedoch sind bislang die inhibierenden Effekte auf T-Effektorzellen am besten beschrieben [73].

1.3.2. MDSCs in Tumorerkrankungen

In der Tumorforschung haben MDSCs ihren größten Stellenwert gefunden. Ihre Eigenschaft, T-Zellantworten zu beeinträchtigen, wurde bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen, wie z.B. bei Bronchialkarzinomen, Nierenzellkarzinomen und dem hepatozellulären Karzinom nachgewiesen [74-76]. Neben der Schwächung der Anti-Tumor-Immunität sollen MDSCs an dem Remodeling der Tumormikroumgebung beteiligt sein [77]. So können sie mittels der Ausschüttung von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) die Tumorangiogenese induzieren [78]. Ferner sollen sie die Bildung prä-metastatischer Nischen vorantreiben [79]. Mit der zunehmenden Bedeutung von Immuntherapien in der Tumorbehandlung ist es möglich, dass MDSCs zukünftig eine Anwendung im klinischen Kontext finden werden [77].

1.3.3. MDSCs in der HIV-Infektion

MDSCs sind in der HIV-1-Infektion aufgrund ihrer potentiell immunregulatorischen Funktionen und ihrer Hemmung von T-Zellen von wissenschaftlichem Interesse.

Unsere Arbeitsgruppe unter *Vollbrecht et al.* berichtete 2012 erstmals, dass ART-naive HIV-Patienten in der chronischen Infektion signifikant höhere PMN-MDSC-Frequenzen im peripheren Blut aufweisen, als HIV-Controller und gesunde Probanden. Wurde die ART initiiert, fiel die PMN-MDSC-Frequenz deutlich ab. Infolgedessen wurde angenommen, dass das HI-Virus eine Rolle bei der Expansion dieser Zellpopulation spielt. Unsere Arbeitsgruppe demonstrierte außerdem positive Korrelationen zwischen PMN-MDSC-Frequenz, Viruslast und Immunaktivierung. Dagegen wurde eine inverse Korrelation zwischen PMN-MDSC-Frequenz und der CD4-Zellzahl beschrieben. Koinkubationsexperimente zeigten, dass PMN-MDSCs die CD8⁺ T-Zellproliferation hemmten. Diese Erkenntnisse führten zu dem Schluss, dass MDSCs zur T-Zelldysfunktion und Immunerschöpfung in der HIV-1-Infektion beitragen [80].

Zhang et al. postulierten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der PMN-MDSC-Frequenz und Markern der Krankheitsprogression, wie der Viruslast und dem Abfall der CD4-Zellzahl. Die Arbeitsgruppe beschreibt zudem, dass PMN-MDSCs die IFN- γ -Sekretion von CD8⁺ T-Zellen hemmen. Darüber hinaus wurde eine signifikant höhere Expression des inhibitorischen Moleküls PD-1 auf PMN-MDSCs von HIV-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen. Die In-vitro-Blockade des PD-1-Oberflächenproteins reduzierte das immunhemmende Potenzial der PMN-MDSCs [81].

Dross et al. wiesen in SIV-infizierten Rhesusaffen nach, dass die MDSC-Population im Median zu 90 % aus PMN-MDSCs besteht. Des Weiteren wurden die MDSC-Frequenzen über den Verlauf der Infektion gemessen. Die Frequenzen sanken bei Beginn der ART und stiegen bei

Therapieunterbrechung an. Im Übrigen wurden die höchsten HIV-spezifischen T-Zellantworten von Versuchstieren generiert, die vergleichsweise geringe MDSC-Frequenzen vorwiesen. Weiterhin konnte bezüglich der immunsuppressiven Wirkung kein Unterschied zwischen PMN-MDSCs aus dem peripheren Blut und gewebeständigen PMN-MDSCs festgestellt werden [82]. Anders als in der Tumorforschung ist die Stellung der MDSCs in der HIV-Infektion weitgehend unklar. Aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaft stellt sich jedoch die dringende Frage, welche Bedeutung dieser Zellentität in der HIV-Pathogenese zukommt.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Immunerschöpfung, welche für das fortgeschrittene Krankheitsstadium der HIV-1-Infektion charakteristisch ist, verlieren zahlreiche Immunzellen, darunter zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen zunehmend ihre Effektorfunktionen [51, 52, 54]. Dies wirft die Frage auf, inwiefern PMN-MDSCs von diesem Prozess betroffen sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Suppressionskapazität der PMN-MDSCs, d.h. die Fähigkeit, die CD8⁺ T-Zellproliferation zu hemmen, in der chronischen HIV-1-Infektion zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde mittels Zellkulturen die Suppressionskapazität der PMN-MDSCs von HIV-Patienten, Bronchialkarzinom-Patienten und gesunden Probanden analysiert. Zusätzlich wurde die Immunaktivierung der CD8⁺ T-Zellen gemessen, um zu evaluieren, ob ein Zusammenhang zwischen dieser und der Funktion der PMN-MDSCs besteht.

Wir nahmen an, dass die Suppressionskapazität der PMN-MDSCs in den fortgeschrittenen Stadien der HIV-Infektion als Ausdruck der Immunerschöpfung abnimmt. Weiterhin vermuteten wir, dass die Suppressionskapazität von dem Grad der Immunaktivierung abhängt. Diese Hypothese führte zu folgenden Fragestellungen:

- Bestehen Unterschiede zwischen der Suppressionskapazität der PMN-MDSCs von HIV-Patienten, Bronchialkarzinom-Patienten und gesunden Menschen? Weisen PMN-MDSCs von HIV-Patienten in der chronischen Infektion als Zeichen der Immunerschöpfung niedrigere immuninhibierende Funktionen auf?
- Steht die Suppressionskapazität in Zusammenhang mit dem Krankheitsfortschritt, gemessen an der CD4-Zellzahl und der Viruslast?
- Korreliert die Suppressionskapazität mit der Konzentration der PMN-MDSCs im Blut?
- Ist die Suppressionskapazität vom Grad der Immunaktivierung abhängig?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Biocoll (Ficoll®)	Biochrom GmbH, Berlin
Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (1x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EasySep™CD66b Selektionskit #18682A	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Titriplex®	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS) Gold	Biochrom GmbH, Berlin
Fix & Perm® Medium A	Life Technologies, Frederick, USA
Hanks' Balanced Salt Solution (BSS) (1x)	Biochrom GmbH, Berlin
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Buffer Solution (1M)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin 200mM (100x)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin / Streptomycin (100x)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phytohaemagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Trypanblau	Life Technologies, Grand Island, USA

Tabelle 2.2: Medien und Pufferlösungen

Medium	Zusammensetzung
Hanks	Hanks' BSS ohne Glutamin, supplementiert mit: - 5 ml HEPES Puffer [1M] - 5 ml L-Glutamin [200 mM] - 5 ml Penicillin [10.000 U/ml]/Streptomycin [10 mg/ml]
R10	RPMI 1640 Medium ohne Glutamin, supplementiert mit: - 5 ml HEPES Puffer [1 M] - 5 ml L-Glutamin [200 mM] - 5 ml Penicillin [10.000 U/ml]/Streptomycin [10 mg/ml] - 50 ml FCS (hitzeinaktiviert, 1 h, 56 °C)
PBS+	Dulbecco's PBS supplementiert mit: - 189,84 mg EDTA [1 mM] - 10 ml FCS (hitzeinaktiviert, 1 h, 56 °C)

Tabelle 2.3: Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Markierung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Menge je 10⁶ Zellen</u>	<u>Hersteller</u>
CD8	Pacific Blue	Mouse	5 µl	BioLegend, San Diego, USA
CD8	PerCP	Mouse	1 µl	BioLegend, San Diego, USA
CD11b	FITC	Mouse	3 µl	BioLegend, San Diego, USA
CD14	APC	Mouse	3 µl	BioLegend, San Diego, USA
CD15	PerCP	Mouse	3 µl	BioLegend, San Diego, USA
CD15	FITC	Mouse	4 µl	BioLegend, San Diego, USA
CD38	PE	Mouse	15 µl	BioLegend, San Diego, USA
CD66b	PE	Mouse	2 µl – 3 µl	BioLegend, San Diego, USA
EasySep™CD66b Selektionskit #18682A	/	/	0,75 µl – 1 µl	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
HLA-DR	APC	Mouse	5 µl	BioLegend, San Diego, USA

Tabelle 2.4: Verbrauchsartikel

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
C-Chip, Zählkammer	NanoEnTek USA Inc., Seoul, Südkorea
Combitips® plus 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
EDTA-Monovette, KE/9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS-Röhrchen, steril, mit Deckel	Corning Science, Tamaulipas, Mexiko
Freezing Container Mr. Frosty™	Nalgene, Wiesbaden
Nunc™ Kryo-Röhrchen 1,8 ml; Innengewinde	Thermo Scientific, Langenselbold
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Einmalpipette 5 ml	TTP, Ibbenbüren
Serologische Einmalpipette 10 ml	ALP, Chorges, Frankreich
Zellkulturflasche, Filter, 25 cm ²	TPP, Ibbenbüren
Zellkulturplatte 24-Loch, Flachboden	Corning Inc., Corning, USA
Zellkulturplatte 96-Loch, konischer Boden	Corning Inc., Corning, USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP, Ibbenbüren
Zentrifugenröhrchen 50 ml	TPP, Ibbenbüren

Tabelle 2.5: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Durchflusszytometer	FACSAria™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Durchflusszytometer	FACSCalibur™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Durchflusszytometer	FACSCanto™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Durchflusszytometer	MoFlo Astrios Cell Sorter EQ	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA
Feinwaage	BP 61	Sartorius AG, Göttingen
Heizwasserbad	1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Inkubationsschrank	Heracell®	Thermo Scientific, Langenselbold
Kühlschrank	Bosch Cooler	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
Magnet für Separation	EasySep™ 92744	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
Mikroskop	Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Pipettierhilfe	Pipetboy® acu 2	Integra, Biebertal
Sterilwerkbank	NU-437-400E Class II	NuAire Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA
Sterilwerkbank	Type S 2010 Model 1.2	Heto-Holten AS, Allerød, Dänemark
Vortexgerät	Vortex-Genie®2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Zählsystem	CASY®1 TT	OLS OMNI Life Science, Bremen
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Z 360 K	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 2.6: Software

Name	Hersteller
Cell-Quest Pro™ Software Version 6.0	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSDIVA™ Software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FlowJo® Version 10.2	Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
GraphPad Prism® 8.2.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft® Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Durchführung der Studie

Zur Untersuchung des immunsuppressiven Potenzials der PMN-MDSCs führten wir 26 Koinkubationsversuche durch. Im ersten Schritt wurden die Effektorzellen (PMN-MDSCs) aus dem peripheren Blut des Probanden isoliert. Aus dem Blut eines Gesunden wurden die Targetzellen (CD8⁺ T-Zellen) gewonnen. Effektor- und Targetzellen wurden anschließend unter Proliferationsstimulation koinkubiert. Zudem wurde eine Inkubation *ohne* PMN-MDSCs als Kontrolle angelegt. Nach 72 h wurde die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen gemessen, anhand welcher die Hemmung dieser Zellentität durch die PMN-MDSCs errechnet wurde. Des Weiteren wurden die PMN-MDSC-Frequenz und die Immunaktivierung der CD8⁺ T-Zellen gemessen.

Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht des Studienablaufs. Die experimentellen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einem Labor der gentechnischen Sicherheitsstufe 1 und biologischer Schutzstufe 2 durchgeführt, bzw. wenn vorschriftsgemäß erforderlich (Zellsortierung unfixierter Proben HIV-1-positiver Patienten) in einem Labor der Sicherheitsstufe 3.

Ab der Färbung mit fluorchrom-markierten Antikörpern wurde aufgrund ihrer Lichtempfindlichkeit im Dunkeln gearbeitet.

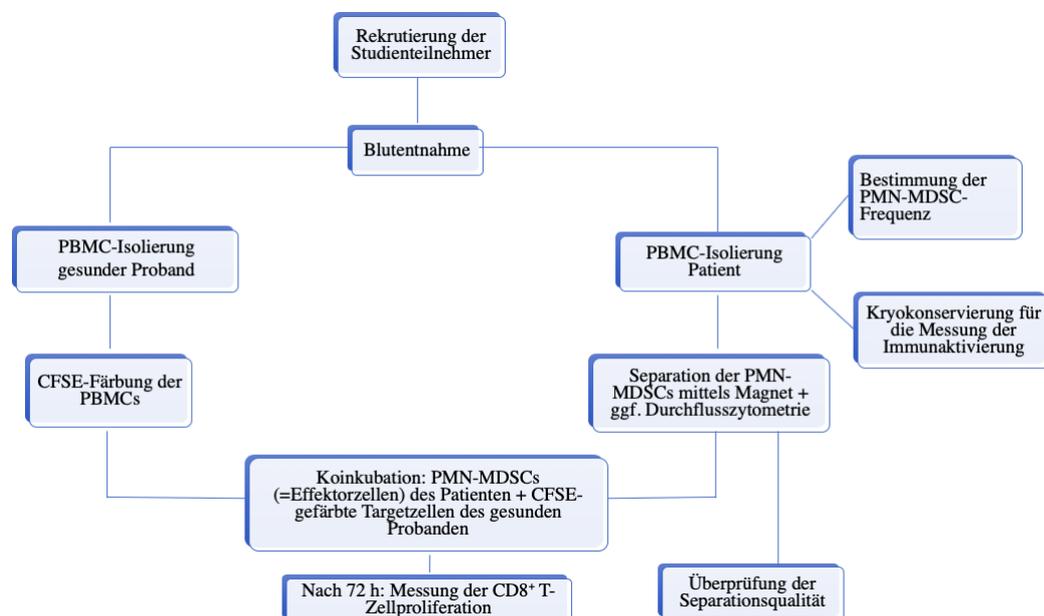


Abbildung 2.1: Studiendurchführung

Nach der Blutentnahme wurden Effektor- und Targetzellen isoliert und koinkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der CD8⁺ T-Zellproliferation. Zusätzlich wurden die PMN-MDSC-Frequenz, die Immunaktivierung und die Separationsqualität gemessen. PBMCs = peripheral blood monocyctic cells, CFSE = Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester

2.2.2. Studiengruppen

Im Zeitraum von November 2015 bis August 2017 wurden insgesamt 20 Patienten und 29 gesunde Probanden für die Studie rekrutiert. Die Studienteilnehmer wurden vor der Probenentnahme über Studienzweck, Freiwilligkeit der Teilnahme, Rücktrittsrecht und Risiken der Blutentnahme aufgeklärt. Die Zustimmung wurde mittels einer Patienteneinwilligungserklärung schriftlich festgehalten. Die Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) lag zu Beginn der Studie vor. Es wurden vier Studiengruppen gebildet, deren Einschlusskriterien im Folgenden beschrieben werden:

A) HIV-1-Progressors (PR, n = 10): Patienten mit chronischer HIV-1-Infektion aus der Infektionsambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der LMU, mit einer CD4-Zellzahl $< 400/\mu\text{l}$ und einer Viruslast > 10.000 cp/ml. Eine Ausnahme stellte ein Patient mit einer Viruslast von 2100 cp/ml dar, welcher dennoch aufgrund seiner niedrigen CD4-Zellzahl ($80/\mu\text{l}$) in die Studie aufgenommen wurde. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme hatten die Studienteilnehmer höchstens zwei Wochen eine antiretrovirale Kombinationstherapie erhalten.

B) HIV-1-Controller (CO, n = 5): Patienten, die ihre HIV-Infektion ohne antiretrovirale Therapie kontrollieren. Als Einschlusskriterien galten eine CD4-Zellzahl $> 500/\mu\text{l}$ und eine Viruslast < 2000 cp/ml. Diese Patienten wurden ebenfalls aus der oben genannten Infektionsambulanz sowie aus dem MVZ Karlsplatz rekrutiert.

C) Bronchialkarzinompatienten (BRO, n = 6): Patienten, bei welchen ein nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) im UICC-Stadium III oder IV vorlag, wurden auf Station 4 (Pneumologie) der Medizinischen Klinik und Poliklinik V der LMU rekrutiert. Die maximale Behandlungszeit mit Chemo-/Radiotherapie vor Probenentnahme betrug weniger als 14 Tage.

D) Gesunde Probanden (HC, n = 5): Aus den Blutproben fünf HIV-negativer, gesunder Probanden wurden PMN-MDSCs isoliert, um ihre Funktion im gesunden Menschen zu untersuchen und um Vergleiche mit oben genannten Gruppen anzustellen. Zusätzlich wurden für jeden Proliferationsassay dieser Studie CD8^+ T-Zellen als Targetzellen benötigt. Hierfür wurden 24 gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen.

2.2.3. Blutentnahme

Für jeden Versuch wurden jeweils zwei Probanden Blut aus einer peripheren Vene entnommen. Die Blutprobe des ersten Probanden diente der Isolation der PMN-MDSCs. Im Durchschnitt wurden 40 - 60 ml Blut (4 - 6 EDTA-Röhrchen) abgenommen. Ein zweiter, gesunder Proband stellte mittels seiner Blutprobe die CD8⁺ T-Zellen.

Die Blutproben wurden innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme weiterverarbeitet. Zunächst wurde das Blut zentrifugiert (1500 rounds per minute (rpm), 10 min., Raumtemperatur (RT)). Im nächsten Schritt erfolgte die Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes.

2.2.4. Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

PBMCs, welche die PMN-MDSCs sowie auch B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und NK-Zellen einschließen, lassen sich mittels Dichtegradientenzentrifugation aus EDTA-Vollblut isolieren. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der Trennung der Blutkomponenten nach ihrer Dichte. Nach Unterlegen des Bluts mit dem Trennungsmittel Ficoll wandern die Bestandteile mit der höchsten Dichte während der Zentrifugation auf den Grund des Zentrifugenröhrchens. Ficoll ist ein synthetisches Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, welches eine höhere Dichte als PBMCs und eine geringere Dichte als Erythrozyten, Granulozyten und Zelltrümmer besitzt. Die PBMCs reichern sich somit in der sogenannten „Interphase“ zwischen Plasma- und Ficollphase an (Abbildung 2.2).

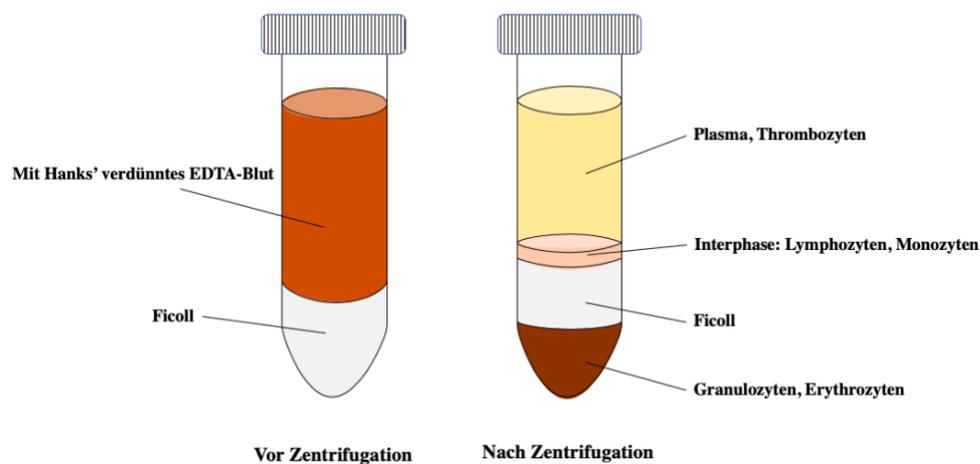


Abbildung 2.2: PBMC-Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation

Nach Verdünnung des Blutes mit Hanks' wurde das Gemisch mit dem Trennmittel Ficoll unterlegt (links). Während der Zentrifugation trennen sich die Blutbestandteile nach ihrer Dichte auf (rechts). Die PBMCs reichern sich in der sogenannten „Interphase“ an.

Für die PBMC-Isolierung wurde im ersten Schritt das Blut mit Hanks verdünnt und mit Ficoll-Lösung unterlegt. Nach der Zentrifugation (1500 rpm, 30 min., RT, ohne Beschleunigung, ohne Bremse) wurde die Interphase abpipettiert und in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Als Nächstes erfolgten drei „Waschschritte“, um Thrombozyten- und Ficoll-Residuen aus der Zellsuspension zu entfernen. Ein „Waschschritt“ bezieht sich im Folgenden auf die Zugabe von Hanks, einer Zentrifugation (1500 rpm, 10 min., RT) und der Abpipettierung des Überstands nach der Zentrifugation. Anschließend wurden die PBMCs je nach ihrem weiteren Verarbeitungszweck in den Medien R10 oder PBS+ aufgefangen. R10 ist ein Zellkulturmedium. PBS ist eine isotonische Pufferlösung, die das Arbeiten bei einem konstanten, physiologischen pH (7,4) ermöglicht. Sie wird bei Verdünnungs- und Reinigungsprozessen verwendet. PBS+ enthält zusätzlich EDTA, welches der Agglutination der Zellen vorbeugt.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die PBMCs aufgeteilt und für folgende Zwecke eingesetzt:

- Messung der PMN-MDSC-Frequenz (Kapitel 2.2.6)
- Gewinnung von Target- und Effektorzellen für die Koinkubation (Kapitel 2.2.7 und 2.2.8)
- Bestimmung der Immunaktivierung (Kapitel 2.2.11)

2.2.5. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zahl der isolierten Zellen erfolgte anhand des automatischen Zellzählgeräts CASY®1 TT. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 10 ml des isotonischen Puffers Casy®ton verdünnt.

Das Gerät schleust die Zellen durch eine Messpore in eine Messkapillare, der ein elektrisches Feld anliegt. Bei diesem Prozess werden Puffer-Elektrolyte in der Messpore verdrängt, wodurch ein elektrischer Puls generiert wird. Durch die Analyse der Pulse bestimmt das Gerät die Zahl der Zellen in der Suspension [83].

2.2.6. Bestimmung der PMN-MDSC-Frequenz

Zur durchflusszytometrischen Messung des prozentualen PMN-MDSC-Anteils an den PBMCs wurde ein FACS (fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung) -Ansatz hergestellt:

Zunächst wurden 1 Mio. PBMCs nach Zugabe von 2 ml PBS-FCS einem Waschgang unterzogen. Daraufhin wurden die PMN-MDSCs immunhistochemisch angefärbt (CD11b FITC, CD14 APC, CD15 PerCP, CD66b PE; je 3 µl/Mio. Zellen). Nach 30-minütiger Inkubationszeit (4 °C) wurden die Zellen erneut mit 2 ml PBS gewaschen, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Eine 15-minütige Inkubation mit Fix & Perm® Medium A bei RT diente der Fixierung der Zellen. Nach

Auswaschen des Fixationsmediums wurden die Zellproben in 200 µl PBS resuspendiert und bis zur FACS-Messung (FACSCalibur™) im Kühlschrank (4°C) gelagert.

2.2.7. Separation der Effektorzellen

Die Separation der Effektorzellen (PMN-MDSCs) erfolgte anhand einer der folgenden Methoden:

- Magnetische Vorseparation der CD66b⁺ Zellen + Zellsortierung der CD15⁺ CD66b⁺ Zellen mittels FACS (Kapitel 2.2.7.1) oder
- Ausschließlich magnetische Separation der CD66b⁺ Zellen (Kapitel 2.2.7.2)

Bei Versuchen mit den Studiengruppen PR und BRO wurde überwiegend die magnetische Separationsmethode angewandt, da diese Gruppen hohe PMN-MDSC-Frequenzen vorwiesen. Dadurch konnten gute Reinheiten mit diesem Verfahren erzielt werden (Kapitel 2.2.7.3). Die „Reinheit“ bezieht sich auf den Prozentanteil der PNM-MDSCs von der Gesamtheit der separierten Zellen. Sie stellt ein Maß für Separationsqualität dar. Je höher der Prozentanteil, desto höher die Reinheit der separierten Zellen.

Dagegen schloss sich in den Assays der Studiengruppen HC und CO aufgrund erfahrungsgemäß schlechterer Reinheiten nach alleiniger magnetischer Separation eine durchflusszytometrische Sortierung mittels FACS an. Insgesamt erfolgten 14 FACS- und 12 Magnetseparationen.

2.2.7.1. Separation mit magnetischer Vorseparation und FACS

Nach der PBMC-Isolierung (Kapitel 2.2.4) wurden die Thrombozyten mittels Zentrifugation der Zellsuspension entfernt (870 rpm, 10 min., RT, ohne Bremse). Die Zellen wurden anschließend in ein steriles Reagenzröhrchen (fortan als Reagenzröhrchen A bezeichnet) überführt und in PBS+ resuspendiert, um eine Konzentration von 10 Mio. Zellen/100 µl PBS+ zu erreichen.

Magnetische Vorseparation von CD66b⁺ Zellen

Vor der FACS-Sortierung fand eine magnetische Vorseparation der CD66b⁺ Zellen aus den PBMCs statt. Für diesen Prozess wurde das EasySep™CD66b Selektionskit für Vollblut verwendet. Zunächst wurden die Zielzellen mit einem monoklonalen Antikörper markiert, der an das CD66b Oberflächenantigen bindet. Da PR- und BRO-Patienten in der Regel höhere PMN-MDSC-Frequenzen als Gesunde und HIV-Controller vorweisen, wurden bei ersteren beiden Studiengruppen größere Antikörpermengen verwendet [80, 84]. Bei PR- und BRO-Proben wurden 1 µl Antikörper/Mio. PBMCs, bei Proben gesunder Probanden und HIV-Controllern 0,75 µl

Antikörper/Mio. PBMCs eingesetzt. Die Antikörper-Zellsuspension wurde 15 min. im Dunkeln bei RT inkubiert.

Im folgenden Schritt wurden magnetische Partikel (= magnetic MicroBeads) hinzugefügt, die Konjugate mit den zellgebundenen Antikörpern in der Suspension bilden. Die Menge der magnetischen MicroBeads entsprach der Menge der zuvor eingesetzten Antikörper.

Nach 10-minütiger Inkubation wurde das Reagenzröhrchen A mit PBS+ auf 2 ml aufgefüllt und für 6 min. in den EasySep™Magnet gestellt. Der Magnet generiert in seinem Inneren ein Hochgradienten-Magnetfeld, welches Zellen mit Antikörper-Bead-Konjugaten (in diesem Fall CD66b⁺ Zellen) an der Wand des Röhrchens adhären lässt (Abbildung 2.3).

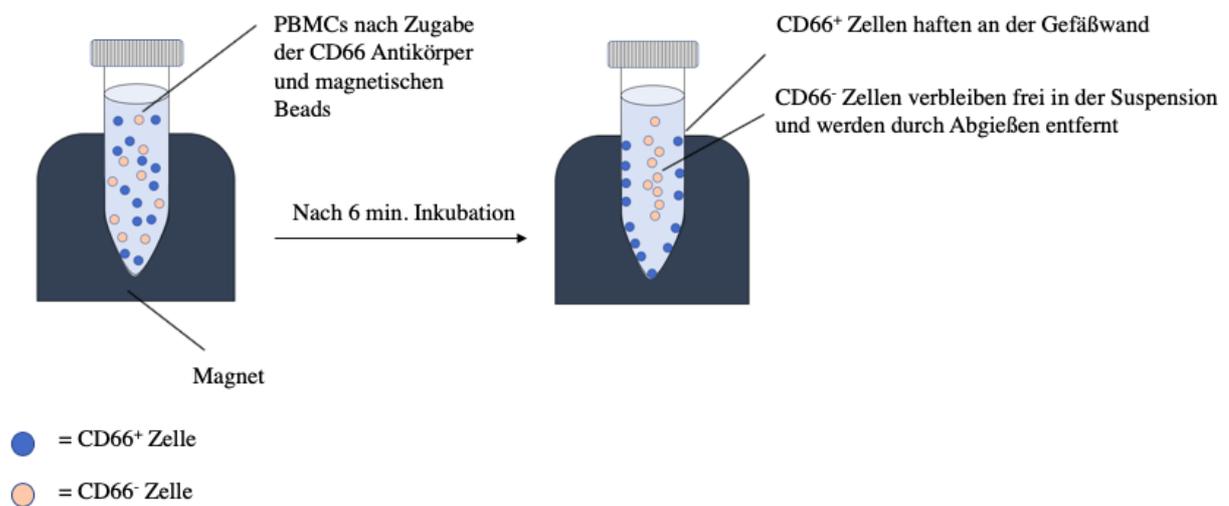


Abbildung 2.3: Das Prinzip der magnetischen Zellseparation

Die magnetische Zellseparation dient der Separation von Zellen, die zuvor durch Antikörper und magnetische Beads markiert wurden. Bei Platzierung der Zellsuspension in den Magnet adhären die Zellen mit Antikörper-Bead-Konjugaten an der Gefäßwand. Der Überstand wird nach der Inkubationszeit abgegossen. Nach Entnahme des Reagenzröhrchens aus dem Magnet werden die separierten Zellen in PBS resuspendiert.

Der Überstand wurde im nächsten Schritt in ein weiteres Reagenzröhrchen B abgegossen, welches wiederum 6 min. in den Magnet platziert wurde. Der Überstand aus dieser zweiten Inkubation wurde in ein Sammelgefäß abgegossen. Nun wurden die CD66b⁺ Zellen mit jeweils 1 ml PBS+ von der Gefäßwand der Reagenzröhrchen A und B gespült und im Reagenzröhrchen A zusammengeführt, welches erneut 6 min. in den Magnet gestellt wurde. Nach Abgießen des Überstands (in das Sammelgefäß) wurden die CD66b⁺ Zellen in PBS resuspendiert und mittels der C-Chip Zählkammer ausgezählt. Die Konzentration der Zellsuspension wurde auf 1 Mio. Zellen/50 µl PBS eingestellt.

Die gesammelten Überstände enthielten PBMCs, die durch die magnetische Separation von PMN-MDSCs getrennt wurden. Diese PBMCs definierten wir als PBMCs *ohne* PMN-MDSCs. Nach einer Zentrifugation (1500 rpm, 10 min., RT) wurde die Konzentration der Zellsuspension mit R10 auf 1 Mio. Zellen/ml angepasst. Bis zur Bestückung der Zellkulturplatte wurden die PBMCs *ohne* PMN-MDSCs im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) gelagert.

Färbung der CD15⁺ CD66b⁺ Zellen für die FACS-Sortierung

Nach der magnetischen Separation der CD66b⁺ Zellen erfolgte die Erstellung eines FACS-Ansatzes für die Zellsortierung. Hierzu wurden die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD15 und CD66b 30 min. inkubiert (CD15 FITC: 4 µl /Mio. Zellen; CD66b PE: 2 µl /Mio. Zellen, RT).

Nach zweimaligem Waschen à 8 min. mit jeweils 2 ml PBS+ wurden die Zellen in 500 µl PBS+ resuspendiert. Innerhalb von 2 h nach diesem Schritt wurde die Zellsortierung eingeleitet.

FACS-Sortierung der CD15⁺ CD66b⁺ Zellen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse und Trennung von verschiedenen Zellpopulationen. Das Verfahren beruht auf der Messung von Streulicht und Fluoreszenzsignalen, während die Zellen perlschnurartig durch einen Laserstrahl geführt werden. Je größer das Zellvolumen, desto größer das Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter). Das Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter) hingegen hängt von der Granularität der Zelle ab. Zugleich werden die Zellen auf fluoreszenzmarkierte Antikörper untersucht. Da jeder Fluoreszenzfarbstoff ein charakteristisches Emissionsspektrum besitzt, können verschiedene Farbstoffe gleichzeitig eingesetzt werden, um eine Vielzahl von Oberflächenmerkmalen der Zelle zu untersuchen. Zusätzlich ist auch die Sortierung der Zellen in separate Auffanggefäße möglich [85].

Das FACS der Proben HIV-positiver Patienten wurde mithilfe des MoFlo Astrios Cell Sorter EQ des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München (TUM) durchgeführt. Die Zellsortierung der Proben gesunder Probanden und der Bronchialkarzinompatienten erfolgte durch das Durchflusszytometer FACSAria™ am Forschungszentrum KUBUS des Dr. von Haunerschen Kinderspitals (LMU). Es wurden unterschiedliche Durchflusszytometer für die Zellsortierung eingesetzt, da die HIV-Proben vorschriftsgemäß in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 bearbeitet werden mussten.

Die Durchflusszytometer trennten die CD15⁺ CD66b⁺ PMN-MDSCs von den restlichen PBMCs. Im Anschluss wurden die sortierten PMN-MDSCs zwei Waschschritten unterzogen, um das

EDTA, welches im PBS+ Puffer enthalten ist, auszuwaschen. Damit wurde eine Proliferationshemmung der CD8⁺ T-Zellen durch EDTA verhindert [86]. Die Zellzahl wurde anhand der C-Chip Zählkammer bestimmt und die Konzentration der Zellsuspension mit R10 auf 1 Mio. Zellen/ml verdünnt.

2.2.7.2. Separation mittels Magnet

Die alleinige magnetische Separation unterschied sich vom oben beschriebenen Prozess bei drei Versuchsschritten:

1) Die magnetische Separation der PMN-MDSCs wurde anhand des Oberflächenmarkers CD66b vorgenommen, während beim FACS-Sorting zusätzlich der Oberflächenmarker CD15 hinzugezogen wurde.

2) Es wurden geringere Antikörper- und Bead-Mengen eingesetzt, da hohe Antikörpermengen mit vermehrten unspezifischen Bindungen einhergehen, welche die Reinheit der isolierten Zellen beeinträchtigen. Die Menge des eingesetzten CD66b-Antikörpers variierte zwischen 0,28 - 3,5 µl pro 10 Mio. Zellen.

Dagegen wurden bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung die Zellen mit unspezifischen Antikörperbindungen aussortiert. Daher konnten bei diesem Verfahren höhere Antikörpermengen eingesetzt werden, um die Zellausbeute zu erhöhen.

3) Die 6-minütigen Magnet-Inkubationen wurden sieben Mal wiederholt. Mit jedem Abgießen des Überstands wurden Zellen ohne Antikörper-Bead-Bindung entfernt. Somit wurde durch die mehrfachen Inkubationen eine kontinuierliche Verbesserung der Reinheit der isolierten Zellen erreicht. Aus den Überständen wurden wie oben beschrieben PBMCs *ohne* PMN-MDSCs gewonnen.

Vor der letzten Magnetinkubation wurde R10 anstelle von PBS+ verwendet, um das EDTA auszuwaschen. Nach Überstandentfernung wurden die CD66b⁺ Zellen von der Gefäßwand gespült und mittels C-Chip Zählkammer gezählt. Die Konzentration der Zellsuspension wurde mit R10 auf 1 Mio. Zellen/ml eingestellt.

2.2.7.3. Auswertung der Separationsqualität

Zur Validierung der erfolgreichen Separation bestimmten wir durchflusszytometrisch die Reinheit, d.h. den Anteil der PMN-MDSCs an den mittels Magnet und/oder FACS separierten Zellen. Dazu wurde ein FACS-Ansatz nach Protokoll (Kapitel 2.2.6) erstellt. Die untere Grenze der erforderlichen Reinheit setzen wir auf 60 % fest. Im Median konnte ein Reinheitsgrad von 89,5 % erreicht werden.

Mittels des gleichen Verfahrens wurde die Abwesenheit der PNM-MDSCs in der Zellpopulation PBMCs *ohne* PMN-MDSCs sichergestellt. Die PBMCs *ohne* PMN-MDSCs enthielten im Median 0,08 % PMN-MDSCs.

2.2.8. CFSE-Färbung der Targetzellen

Die CD8⁺ T-Zellen eines gesunden Probanden stellten die Targetzellen in den Koinkubationen dar. Um nach der Koinkubation ihre Proliferation quantifizieren zu können, wurden PBMCs eines gesunden Probanden mit Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester (CFSE) angefärbt. CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher an intrazelluläre Moleküle bindet. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt, sodass die Fluoreszenzintensität sukzessive mit jeder neuen Zellgeneration abnimmt. Dies erlaubt die durchflusszytometrische Messung der Zellproliferation [87].

Für die Färbung wurden 10 Mio. PBMCs in 1 ml R10 mit 2 µl CFSE [5mM] für 8 min. im Dunkeln inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit R10, um das überschüssige CFSE zu entfernen. Die Konzentration der Zellsuspension wurde mit R10 auf 1 Mio. Zellen/ml eingestellt. Für die Positiv- und Negativkontrolle wurden CFSE-ungefärbte PBMCs zurückgestellt. Bis zu ihrer Weiterverwendung wurden die Zellen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert.

2.2.9. Proliferationsassay

Die Targetzellen wurden mit PMN-MDSCs bzw. mit PBMCs *ohne* PMN-MDSCs in einem Verhältnis von 1:2 in 24- oder 96-Well Platten pipettiert. Zur Stimulation der Proliferation wurde Phytohaemagglutinin (PHA) (5 µl/ml) hinzugefügt. In der Positivkontrolle wurden Targetzellen mit ungefärbten autologen PBMCs in der Ratio 1:2 unter PHA-Stimulation koinkubiert. Die Negativkontrolle enthielt die gleiche Zusammensetzung ohne PHA-Stimulation.

Der Zellansatz wurde anschließend für 72 h in einen Brutschrank gestellt (37 °C, 5 % CO₂). Abbildung 2.4 zeigt eine schematische Darstellung eines Koinkubationsansatzes.

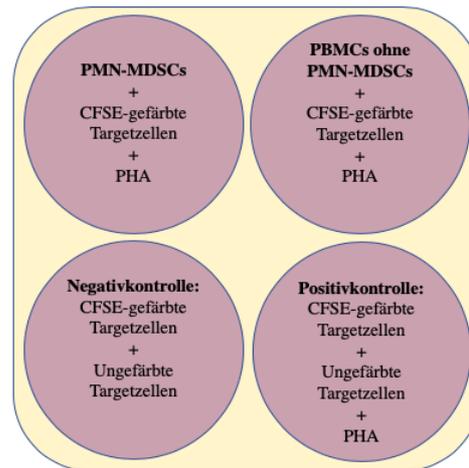


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Koinkubationsansatzes

CFSE-gefärbte Targetzellen und PMN-MDSCs / PBMCs *ohne* PMN-MDSCs wurden im Verhältnis 1:2 unter PHA-Stimulation inkubiert. Die Positivkontrolle enthielt CFSE-gefärbte Targetzellen und ungefärbte PBMCs sowie PHA; die Negativkontrolle enthielt die gleiche Zusammensetzung ohne PHA.

2.2.10. Ermittlung der CD8⁺ T-Zellproliferation

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Ermittlung der CD8⁺ T-Zellproliferation von jeder der in Abbildung 2.4 gezeigten Koinkubationspaaren. Dazu wurden FACS-Ansätze nach Protokoll erstellt (Kapitel 2.2.6). Zur Färbung der Zellen wurde ein CD8 PerCP Antikörper (1 µl/Mio. Zellen) verwendet. Mittels FACSCalibur™ wurde anschließend die Proliferation bestimmt.

Die Negativ- und Positivkontrollen dienen der Überprüfung der Reliabilität der Ergebnisse: In der Negativkontrolle proliferierten die Targetzellen idealerweise mangels PHA kaum. Dank der Positivkontrolle konnte auf eine erfolgreiche PHA-stimulierte Proliferation geprüft werden.

2.2.11. Bestimmung der Immunaktivierung

Zur Bestimmung der Immunaktivierung wurden die unmittelbar nach der PBMC-Isolation eingefrorenen Zellen aufgetaut, angefärbt und mittels FACS analysiert.

Kryokonservierung der Zellen: Die PBMCs wurden zur Sedimentierung der Zellen zentrifugiert (1500 rpm, 10 min., 4 °C) und in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Vorgekühlte Kryoröhrchen wurden mit jeweils 8 - 10 Mio. Zellen befüllt. Zur langsamen Temperatursenkung wurden die Kryoröhrchen mithilfe des Freezing-Containers Mr. Frosty über Nacht bei -80 °C eingefroren, bevor sie nach 24 h in einen Stickstofftank (-196 °C) überführt wurden.

Auftauen der Zellen: Die kryokonservierten Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 ml R10 und zwei Waschsritten (1. Zentrifugation: 4 °C; 2. Zentrifugation: RT) wurde erneut R10 zur Resuspension des Zellpellets hinzugefügt. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl und –viabilität.

Bestimmung der Immunaktivierung: Die Immunaktivierung der CD8⁺ T-Zellen wurde mittels FACS anhand der Oberflächenmarker CD38 und HLA-DR gemessen. Die immunhistochemische Anfärbung der aufgetauten PBMCs wurde nach Protokoll (Kapitel 2.2.6) mit folgender Antikörperkombination durchgeführt: CD8 Pacific Blue: 5 µl/Mio. Zellen, CD38 PE: 15 µl/Mio. Zellen, HLA-DR APC: 5 µl/Mio. Zellen. Im letzten Schritt wurde der Anteil der CD38⁺ HLA-DR⁺ CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen durch das FACSCanto™ II -Gerät gemessen.

2.2.12. Gating-Strategien

Gating: PMN-MDSCs

PMN-MDSCs werden als $CD11b^+ CD14^- CD15^+ CD66b^+$ Zellen definiert [72]. Das erste Gate wurde auf die Monozytenpopulation gesetzt, welche die MDSCs enthält (Abbildung 2.5a). Daraufhin wurden $CD11b^+ CD14^-$ Zellen selektiert (Abbildung 2.5b). Nach dem Gating auf die Marker CD15 und CD66b stellten sich die PMN-MDSCs im rechten oberen Quadranten des Dotplots dar (Abbildung 2.5c). Da die Anzahl der Monozyten individuell variiert, wurde die PMN-MDSC-Frequenz als Prozentanteil der PBMCs ausgedrückt.

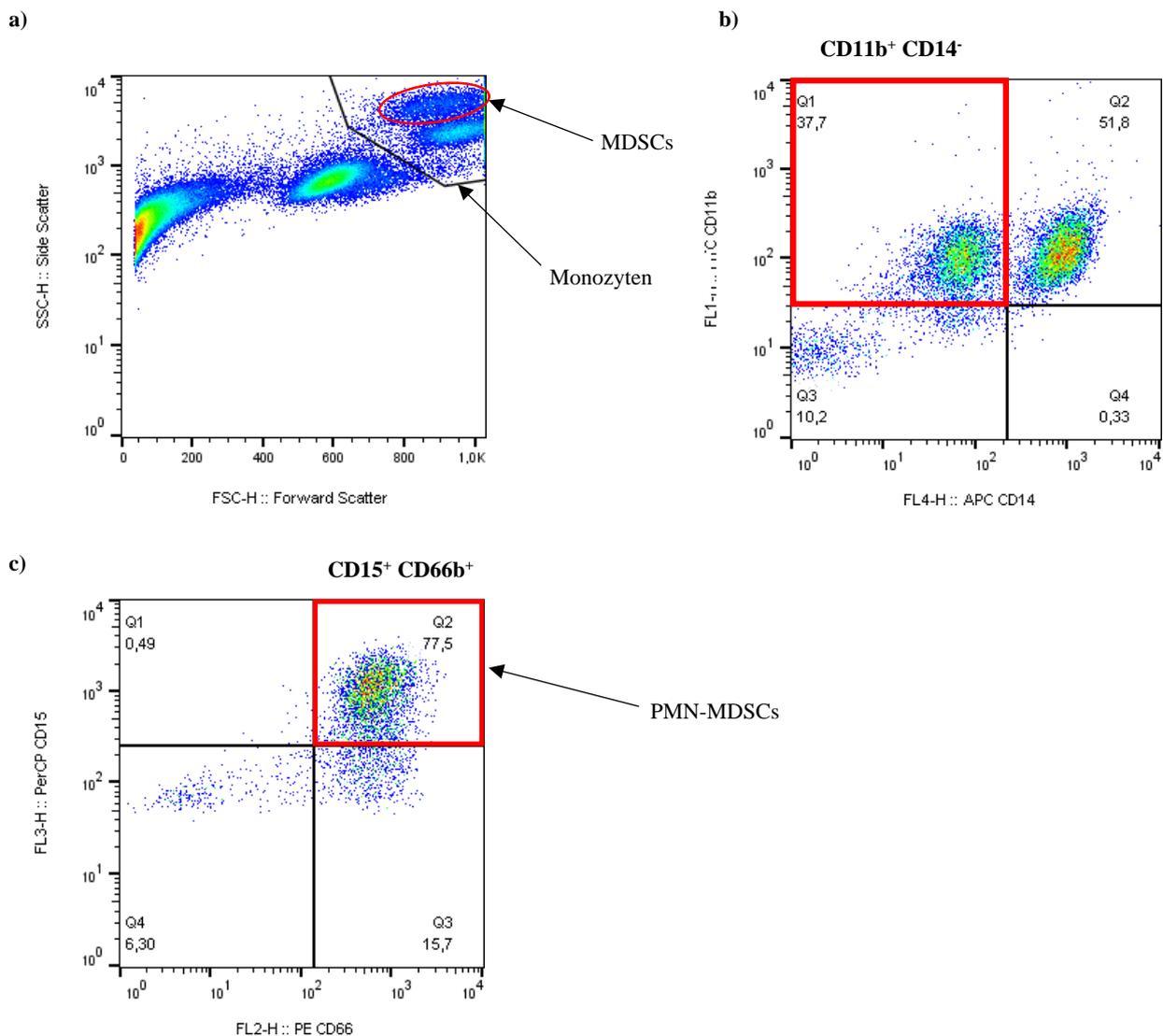


Abbildung 2.5: Gatingstrategie PMN-MDSCs

a) Das erste Gate wurde auf die Monozyten gesetzt (schwarz). Das rote Oval markiert die MDSCs. **b)** Es folgte die Selektion von $CD11b^+ CD14^-$ Zellen (rot) **c)** Im nächsten Schritt wurde diese Population auf die Oberflächenmarker CD15 und CD66b untersucht. Die PMN-MDSCs stellten sich in dem rechten oberen Quadranten dar (rot).

Gating: CD8⁺ T-Zellproliferation

Die Zellproliferation wurde mithilfe der CFSE-Färbung messbar gemacht. Nach dem Gating auf Lymphozyten (Abbildung 2.6a) und CD8⁺ T-Zellen wurden letztere mit ihren Tochterpopulationen im rechten oberen Quadranten des Dotplots abgebildet (Abbildung 2.6b). Die „älteste“ und CFSE-reichste Generation stellte sich am Weitesten rechts auf der x-Achse dar. Die Proliferation wurde anhand des prozentualen Zuwachses der Ursprungspopulation quantifiziert (Abbildung 2.6c).

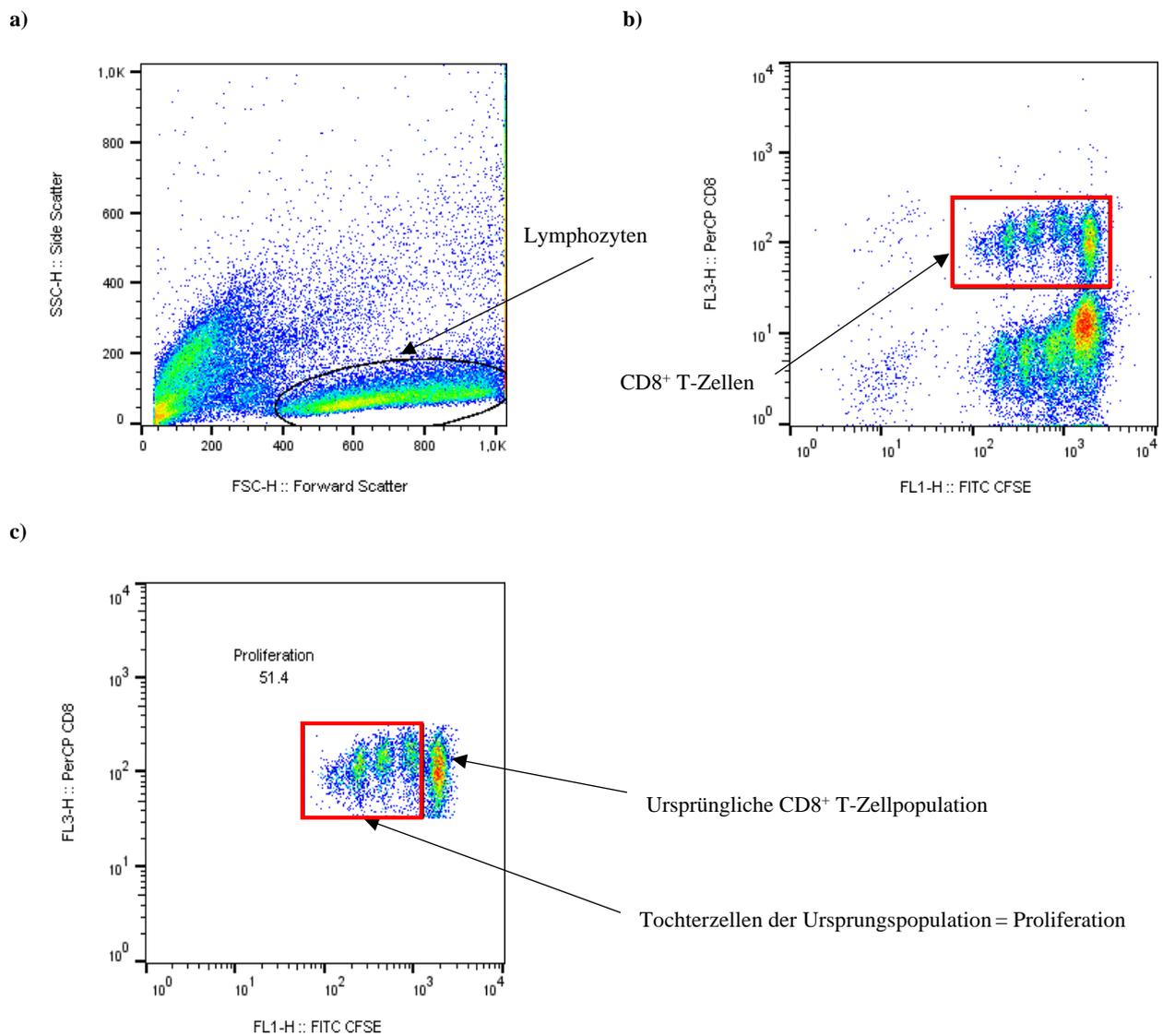


Abbildung 2.6: Gating der CD8⁺ T-Zellproliferation

a) Zur Messung der CD8⁺ T-Zellproliferation wurde im ersten Schritt das Gate auf die Lymphozyten gesetzt. **b)** Im roten Rechteck werden die CFSE-gefärbten CD8⁺ Zellen dargestellt. **c)** Die proliferierten CD8⁺ Zellen liegen links der Ursprungspopulation (rotes Rechteck).

Gating: Immunaktivierung der CD8⁺ T-Zellen

Das erste Gate wurde auf die Lymphozyten gesetzt (Abbildung 2.7a). Darauf folgte das Gating auf CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 2.7b). Im nächsten Schritt wurden die CD8⁺ T-Zellen auf die Marker CD38 und HLA-DR untersucht (Abbildung 2.7c und 2.7d).

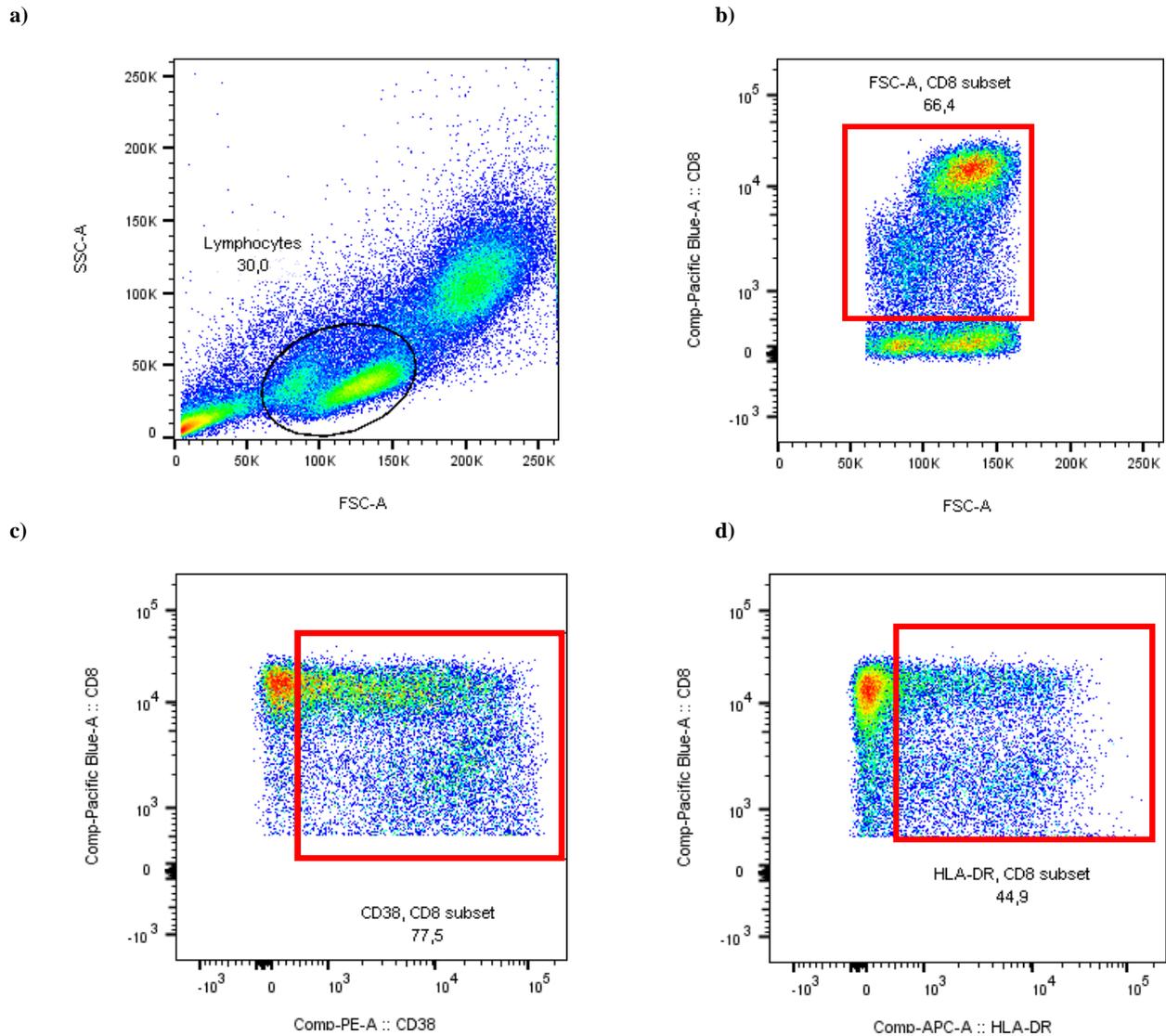


Abbildung 2.7: Bestimmung der Immunaktivierung der CD8⁺ T-Zellen

Nach dem Gating auf **a)** Lymphozyten und **b)** CD8⁺ T-Zellen wurden letztere auf die Aktivierungsmarker **c)** CD38 und **d)** HLA-DR untersucht.

2.2.13. Quantifizierung der Suppressionskapazität

Das Ausmaß der Proliferationshemmung der CD8⁺ T-Zellen durch PMN-MDSCs lässt sich auch als „Suppressionskapazität“ ausdrücken. Folgende Formel diente der Berechnung der Suppressionskapazität:

$$\text{Suppressionskapazität (\%)} = \frac{\text{Proliferation PMN-MDSCs} - \text{Proliferation PBMCs ohne PMN-MDSCs}}{\text{Proliferation PBMCs ohne PMN-MDSCs}} \times 100$$

Ein negatives Ergebnis bedeutete, dass die PMN-MDSCs die CD8⁺ T-Zellproliferation hemmten. Je negativer die Suppressionskapazität, desto stärker die Hemmung. Dementsprechend wies ein positives Ergebnis darauf hin, dass die Proliferation nicht gehemmt wurde.

2.2.14. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse wurde die GraphPad Prism[®] Software Version 8.2 verwendet. Eine Normalverteilung der Werte wurde nicht angenommen. Es wurden nicht-parametrische Tests angewandt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test herangezogen. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau bei beiden Tests wurde auf $p \leq 0.05$ festgelegt. War das Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests signifikant, wurde zudem der Mann-Whitney-Test genutzt, um mithilfe von Paarvergleichen zu bestimmen, zwischen welchen Gruppen ein signifikanter Unterschied vorlag. Dabei wurde das Signifikanzniveau mittels Bonferroni-Korrektur angepasst. Da drei Paarvergleiche durchgeführt wurden (PR vs. HC, PR vs. CO, PR vs. BRO), lag dieses bei $p < 0.0167$. Zur Testung einer linearen Korrelation zwischen zwei Variablen wurden Rangkorrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt. Verbundene Stichproben wurden mittels des Rangsummentests nach Wilcoxon untersucht.

In den graphischen Darstellungen der Ergebnisse werden lediglich signifikante Ergebnisse der statistischen Tests angezeigt.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten und PMN-MDSC-Frequenzmessungen

In den Tabellen 3.1 – 3.4 werden die klinischen Daten der untersuchten Studiengruppen und die Ergebnisse der PMN-MDSC-Frequenzmessungen dargestellt. Tabelle 3.5 fasst diese Daten zusammen und zeigt Median und Range der PMN-MDSC-Frequenzen, CD4-Zellzahlen und HIV-Viruslasten.

Tabelle 3.1: Klinische Daten und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppe PR

ID	Geschlecht	Alter	CD4-Zellzahl (1/ μ l)	Viruslast (cp/ml)	Zeitpunkt der Infektion/ Diagnose	CDC-Klassifikation	PMN-MDSC-Frequenz
PR1	M	36	80	2.100	1996	C3	6,76
PR2	M	56	179	922.406	2016	C3	3,52
PR3	M	18	322	600.000	9/2016	A2	14,41
PR4	M	71	199	78.379	2005	C3	1,22
PR5	M	43	80	360.000	2/2016	C3	4,95
PR6	M	54	4	53.501	2005	C3	8,05
PR7	M	40	32	650.000	1/2017	C3	0,54
PR8	M	41	355	51.000	2017	A2	0,90
PR9	M	59	19	193.604	2002	C3	1,12
PR10	M	28	4	5.999.674	9/1996	C3	0,23

Tabelle 3.2: Klinische Daten und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppe CO

ID	Geschlecht	Alter	CD4-Zellzahl (1/ μ l)	Viruslast (cp/ml)	Zeitpunkt der Infektion/ Diagnose	CDC-Klassifikation	PMN-MDSC-Frequenz
CO1	W	25	644	< 40	1/2017	A1	0,18
CO2	M	45	923	< 40	12/2012	A1	0,09
CO3	M	67	1085	1104	4/2007	A1	0,44
CO4	M	42	763	1940	2004	A2	0,13
CO5	W	27	1064	< 40	unbekannt	A1	0,12

Tabelle 3.3: Klinische Daten und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppe BRO

ID	Geschlecht	Alter	Diagnose	UICC Stadium TNM Klassifikation	Zeitpunkt der Diagnose	PMN- MDSC- Frequenz
BRO1	M	48	NSCLC Adenokarzinom	IV T4 Nc M1b	08/2016	6,76
BRO2	W	48	NSCLC Adenokarzinom	IV T2 N3 M1	10/2016	1,80
BRO3	M	73	NSCLC Adenokarzinom	IIIa cT3 cN2 cM0	10/2016	1,62
BRO4	M	63	NSCLC Plattenepithelkarzinom	IIIa T3 N1 M0	11/2016	3,09
BRO5	M	75	NSCLC NOS*	IV cT4 N3 M1a	05/2016	2,70
BRO6	M	70	NSCLC Adenokarzinom	IV T4 N2 M1	06/2017	2,97

* not otherwise specified = nicht weiter spezifiziert

Tabelle 3.4: Charakteristika und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppe HC

ID	Geschlecht	Alter	PMN-MDSC-Frequenz
H1	M	56	0,57
H2	W	42	0,11
H3	M	32	0,48
H4	M	35	1,85
H5	M	31	0,33

Die Tabelle führt die gesunden Probanden auf, von welchen PMN-MDSCs separiert wurden. Die gesunden Studienteilnehmer, welche die CD8⁺ T-Zellen (Targetzellen) stellten, sind hier nicht berücksichtigt.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der klinischen Daten und PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppen

Studiengruppe	Median PMN- MDSC- Frequenz	Range PMN- MDSC- Frequenz	Median CD4-Zahl (1/ μ l)	Range CD4- Zahl	Median Viruslast (cp/ml)	Range Viruslast
PR (n=10)	2,39	0,23 - 14,41	80	4 - 355	276.802	2.100- 5.999.674
CO (n=5)	0,13	0,09 - 0,44	923	644 - 1.085	40	< 40 – 1.940
BRO (n=6)	2,84	1,62 - 6,76	/	/	/	/
HC (n=5)	0,48	0,11 - 1,85	/	/	/	/

3.1.1. Höhere PMN-MDSC-Frequenzen bei PR- versus bei CO-Patienten

Wir bestimmten die Quantität der PMN-MDSCs (PMN-MDSC-Frequenz) im peripheren Blut der Studienprobanden, um sie zwischen den Studiengruppen zu vergleichen und mit Parametern des Krankheitsverlaufs zu korrelieren. Es zeigten sich statistisch signifikant höhere PMN-MDSC-Frequenzen in der Gruppe PR vs. CO ($p = 0.0013$) (Abbildung 3.1). Dagegen lieferte der Vergleich PR vs. BRO ($p = 0.87$) keine statistische Signifikanz. Der p-Wert des Vergleichs PR vs. HC ($p = 0.04$) wies auf einen Trend zu höheren Frequenzen in der Gruppe PR hin. Das statistisch nicht signifikante Ergebnis ist wahrscheinlich auf die geringe Größe der Studiengruppe HC zurückzuführen.

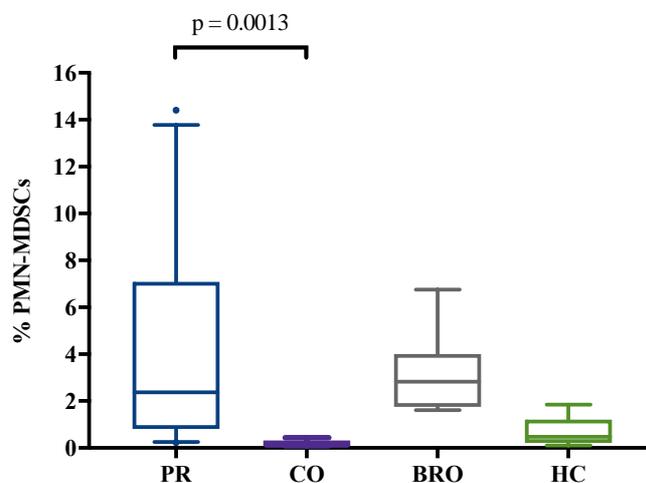


Abbildung 3.1: Vergleich der PMN-MDSC-Frequenzen der Studiengruppen

Der Kruskal-Wallis-Test stellte signifikante Unterschiede zwischen den PMN-MDSC-Frequenzen (% PMN-MDSCs) der Studiengruppen fest ($p = 0.0025$). Im darauffolgenden Vergleich der Gruppen mittels des Mann-Whitney-Tests zeigten sich signifikant höhere Frequenzen bei PR- im Vergleich zu CO-Patienten ($p = 0.0013$). Der Unterschied zwischen den Gruppen PR vs. BRO ($p = 0.87$) und PR vs. HC ($p = 0.04$) war nicht signifikant. (PR: $n = 10$; CO: $n = 5$; BRO: $n = 6$; HC: $n = 5$)

3.1.2. Signifikante Korrelationen zwischen PMN-MDSC-Frequenz und CD4-Zahl bzw. Viruslast

Bei HIV-positiven Studienteilnehmern (PR und CO) wurde eine negative Korrelation zwischen der PMN-MDSC-Frequenz und der CD4-Zahl festgestellt ($p = 0.031$, $r = -0.56$) (Abbildung 3.2a). Zudem bestand eine positive Korrelation zwischen der PMN-MDSC-Frequenz und der HIV-Viruslast ($p = 0.043$, $r = 0.53$) (Abbildung 3.2b). Drei PR-Patienten wiesen trotz niedriger CD4-Zellzahlen geringe PMN-MDSC-Frequenzen auf. Im Gegensatz dazu präsentierte sich ein PR-Patient mit einer PMN-MDSC-Frequenz in Höhe von 14,41 %, trotz einer CD4-Zellzahl von 346/ μ l. Wie in Abbildung 3.2 ersichtlich, weicht die PMN-MDSC-Frequenz dieses Patienten deutlich von der Mehrheit der Werte ab.

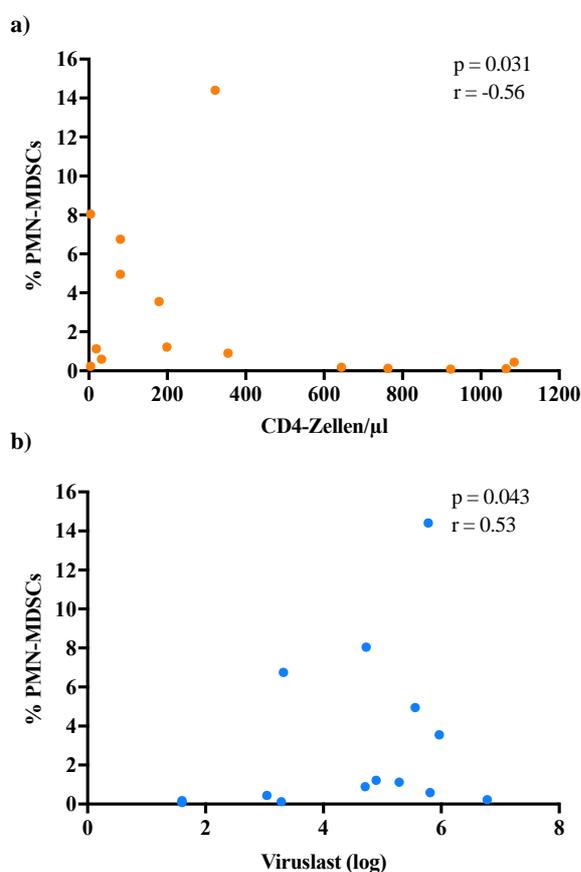


Abbildung 3.2: Korrelation zwischen PMN-MDSC-Frequenz und CD4-Zahl bzw. Viruslast

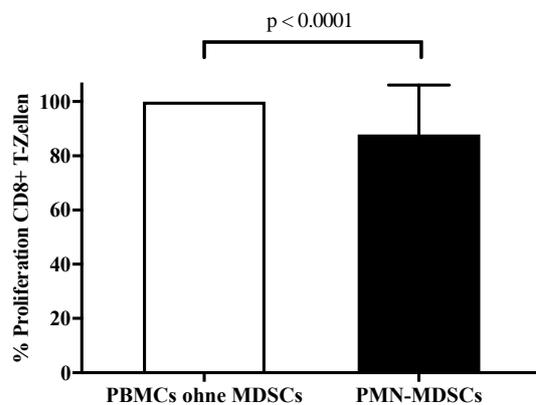
a) Negative Korrelation zwischen PMN-MDSC-Frequenz und CD4-Zellzahl ($p = 0.031$, $r = -0.56$). **b)** Positive Korrelation zwischen PMN-MDSC-Frequenz und Viruslast ($p = 0.043$, $r = 0.53$). (Rangkorrelationsanalyse nach Spearman, PR und CO: $n = 15$)

3.2. Ergebnisse der Proliferationsassays

3.2.1. Signifikante Hemmung der CD8⁺ T-Zellproliferation in der Gruppe PR

Neben der Quantität der PMN-MDSCs interessierten uns ihre qualitativen Eigenschaften, darunter insbesondere ihre Fähigkeit, T-Zellantworten zu hemmen. Diese wurde durch Koinkubation von CD8⁺ T-Zellen *mit* und *ohne* PMN-MDSCs untersucht. Abbildung 3.3 stellt dar, wie stark die CD8⁺ T-Zellproliferation ausfiel. Eine statistisch signifikante Hemmung konnten wir in der Gesamtpopulation ($p < 0.0001$) und in der Gruppe PR ($p = 0.0039$) verzeichnen.

a) Gesamtpopulation:



b) PR:

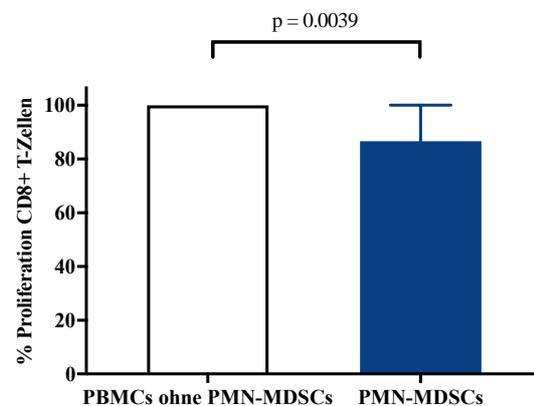


Abbildung 3.3: Hemmung der CD8⁺ T-Zellproliferation durch PMN-MDSCs

Die CD8⁺ T-Zellproliferationsraten bei Koinkubation *mit* und *ohne* PMN-MDSCs wurden miteinander verglichen. In der Darstellung wurde die Proliferation der Koinkubation *ohne* PMN-MDSCs auf 100 % gesetzt. Von dieser wurde die CD8⁺ T-Zellproliferation der Koinkubation *mit* PMN-MDSCs als prozentualer Anteil ausgedrückt.

a) In der Gesamtpopulation ($p < 0.0001$) und **b)** in der Gruppe PR ($p = 0.0039$) zeigte sich eine signifikante Hemmung. (Wilcoxon-Test, Gesamtpopulation: $n = 26$; PR: $n = 10$)

3.2.2. Keine signifikanten Unterschiede in der Suppressionskapazität zwischen den Studiengruppen

Um zu untersuchen, ob hinsichtlich der Stärke der Hemmung Unterschiede zwischen den Studiengruppen bestehen, wurden die Suppressionskapazitäten der PMN-MDSCs verglichen. Die Suppressionskapazität stellt dar, wie stark die T-Zellproliferation in der Koinkubation *mit* PMN-MDSCs vs. *ohne* PMN-MDSCs gehemmt wurde. Dabei steht eine negative Suppressionskapazität für die Hemmung der CD8⁺ T-Zellproliferation, während ein positiver Wert anzeigt, dass keine Hemmung erfolgt ist.

Beim Vergleich der Suppressionskapazitäten zwischen den Studiengruppen stellten wir keinen signifikanten Unterschied fest ($p = 0.27$) (Abbildung 3.4).

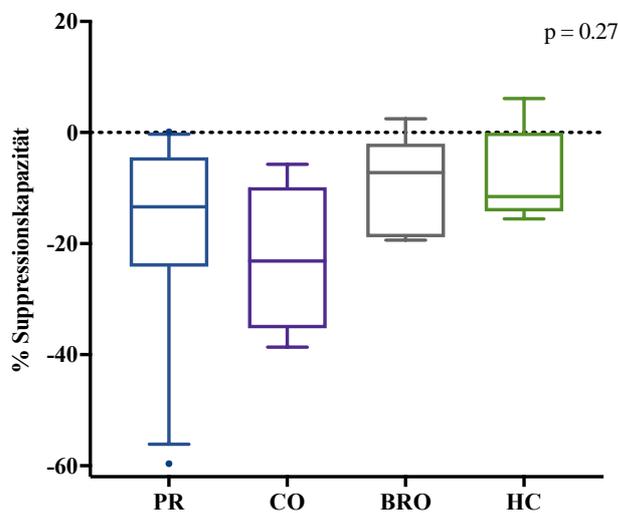


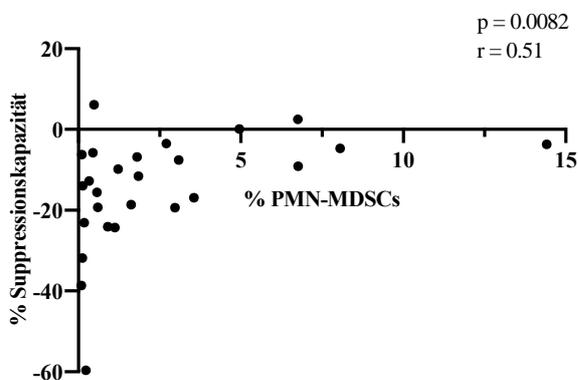
Abbildung 3.4: Vergleich der Suppressionskapazitäten der Studiengruppen

Die Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Suppressionskapazität waren nicht signifikant ($p = 0.27$). (Kruskal-Wallis-Test, PR: $n = 10$; CO: $n = 5$; BRO: $n = 6$; HC: $n = 5$)

3.2.3. Negative Korrelation zwischen Suppressionskapazität und PMN-MDSC-Frequenz

Der Zusammenhang zwischen quantitativen und qualitativen Eigenschaften der PMN-MDSCs wurde anhand von Korrelationen zwischen der PMN-MDSC-Frequenz und der Suppressionskapazität analysiert. In der Gesamtpopulation ($p = 0.0082$, $r = 0.51$) und in der Gruppe PR ($p = 0.0022$, $r = 0.87$) war die Korrelation zwischen den zwei Parametern signifikant (Abbildung 3.6). Die Abbildung demonstriert eine deutliche Streuung der Ergebnisse in der Gruppe PR. Die Suppressionskapazität war umso schwächer ausgeprägt, je höher die PMN-MDSC-Frequenz war.

a) Gesamtpopulation:



b) PR:

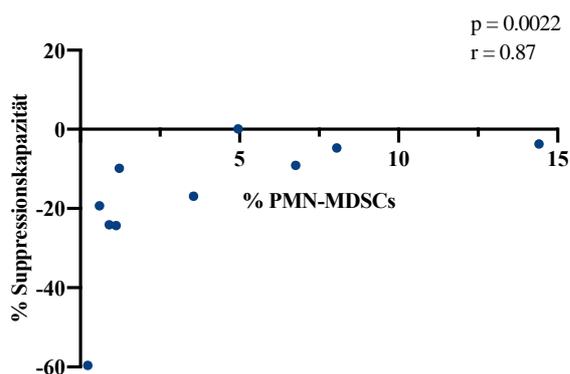


Abbildung 3.5: Korrelation zwischen Suppressionskapazität und PMN-MDSC-Frequenz

Zwischen der Suppressionskapazität der PMN-MDSCs und ihrer Frequenz bestand **a)** in der Gesamtpopulation ($p = 0.0082$, $r = 0.51$) und **b)** in der Gruppe PR ($p = 0.0022$, $r = 0.87$) eine signifikante Korrelation. (Rangkorrelationsanalyse nach Spearman, Gesamtpopulation: $n = 26$; PR: $n = 10$)

3.2.4. Keine Korrelation zwischen Suppressionskapazität und CD4-Zahl bzw. Viruslast

Als nächstes untersuchten wir, ob zwischen der Suppressionskapazität der PMN-MDSCs und dem Fortschreiten der HIV-Infektion ein Zusammenhang besteht. Hierzu korrelierten wir in den Gruppen PR und CO die Suppressionskapazität mit der CD4-Zellzahl ($p = 0.78$, $r = -0.079$) und der Viruslast ($p = 0.60$, $r = 0.15$). Die Ergebnisse waren nicht signifikant (Abbildung 3.5).

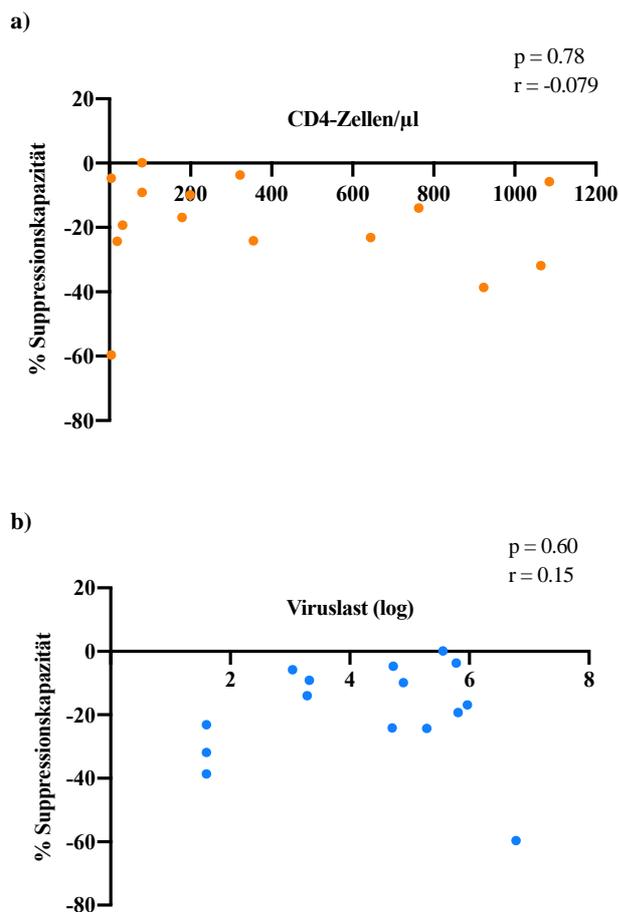


Abbildung 3.6: Keine Korrelation zwischen Suppressionskapazität und Viruslast bzw. CD4-Zahl

a) Das Verhältnis zwischen CD4-Zellzahl und Suppressionskapazität war statistisch nicht signifikant ($p = 0.78$, $r = -0.079$).

b) Das Verhältnis zwischen Viruslast und Suppressionskapazität war statistisch nicht signifikant ($p = 0.60$, $r = 0.15$).

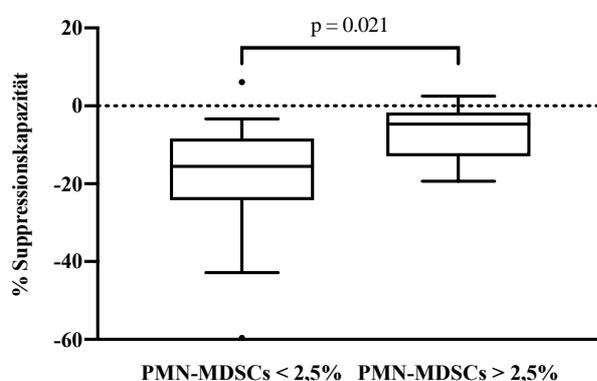
(Rangkorrelationsanalyse nach Spearman, PR und CO: $n = 15$)

3.2.5. Geringe Suppressionskapazität bei PMN-MDSC-Frequenz > 2,5 %

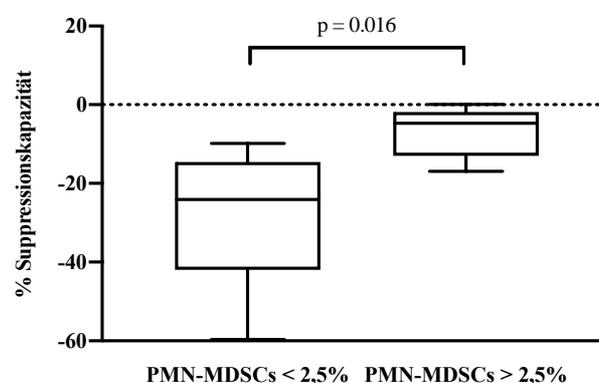
Um die obige Feststellung, dass sich die Suppressionskapazitäten bei hohen und niedrigen Frequenzen unterscheiden näher zu untersuchen, stellten wir einen Vergleich der Suppressionskapazitäten bei Frequenzen unter und über 2,5 % an. Diese Schwelle wurde willkürlich gewählt. Es zeigte sich, dass die Suppressionskapazität signifikant schwächer ausgeprägt war, wenn die PMN-MDSC-Frequenz über 2,5 % lag als unter dieser Frequenz.

Abbildung 3.7 stellt den Zusammenhang basierend auf den Ergebnissen von allen Studienprobanden ($p = 0.021$), PR- und BRO-Patienten ($p = 0.012$) und ausschließlich PR-Patienten dar ($p = 0.016$).

a) Gesamtpopulation:



b) PR:



c) PR und BRO:

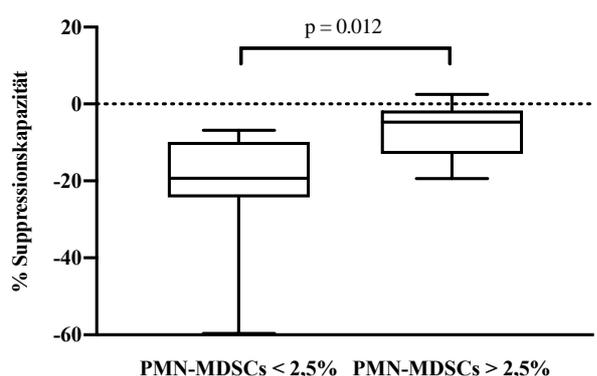


Abbildung 3.7: Suppressionskapazität bei PMN-MDSC-Frequenz < 2,5 % und > 2,5 %

a) In der Gesamtpopulation war die Suppressionskapazität bei PMN-MDSC-Frequenzen über 2,5 % signifikant geringer als bei Frequenzen unter 2,5 % ($p = 0.021$). Diese Beobachtung zeigte sich auch in den Gruppen b) PR ($p = 0.016$) und c) PR und BRO ($p = 0.012$) (Mann-Whitney-Test, Gesamtpopulation: $n = 26$; PR: $n = 10$; PR und BRO: $n = 16$)

3.3. Keine Korrelation zwischen Immunaktivierung und PMN-MDSC-Frequenz

Abschließend untersuchten wir die Immunaktivierung der CD8⁺ T-Zellen, die in der HIV-Infektion mit Krankheitsprogression und Immunerschöpfung assoziiert wird [39]. Dabei gingen wir der Frage nach, inwiefern die Immunaktivierung in Zusammenhang mit der Frequenz und der Suppressionskapazität der PMN-MDSCs steht.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, erwies sich der Grad der Immunaktivierung in der Gruppe PR am höchsten und wesentlich ausgeprägter im Vergleich zu den Gruppen CO ($p = 0.0031$) und HC ($p = 0.0016$) (Abbildung 3.8) [36, 88]. Zwischen den Gruppen PR und BRO zeigte sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied.

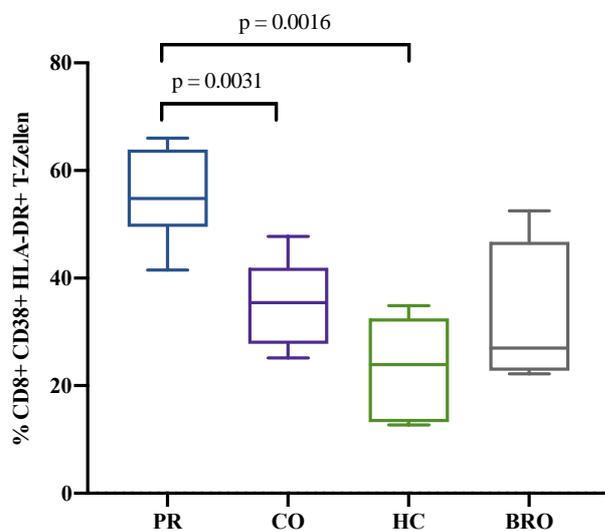


Abbildung 3.8: Vergleich der Immunaktivierung zwischen den Studiengruppen

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte hinsichtlich der Immunaktivierung einen signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen ($p = 0.0025$). Der Grad der Immunaktivierung bei PR-Patienten war signifikant höher als bei CO- ($p = 0.0031$) und HC-Probanden ($p = 0.0016$). (Mann-Whitney-Test, PR: $n = 8$; CO: $n = 5$; BRO: $n = 4$; HC: $n = 5$)

Wir hatten angenommen, dass die PMN-MDSC-Frequenz positiv mit der Immunaktivierung korreliert. Weiterhin hatten wir erwartet, dass die Funktion der PMN-MDSCs mit zunehmender Immunaktivierung erschöpft. Es zeigten sich jedoch weder zwischen Immunaktivierung und PMN-MDSC-Frequenz ($p = 0.67$, $r = 0.10$) noch zwischen Immunaktivierung und Suppressionskapazität ($p = 0.27$, $r = -0.25$) statistisch relevante Zusammenhänge (Abbildung 3.9).

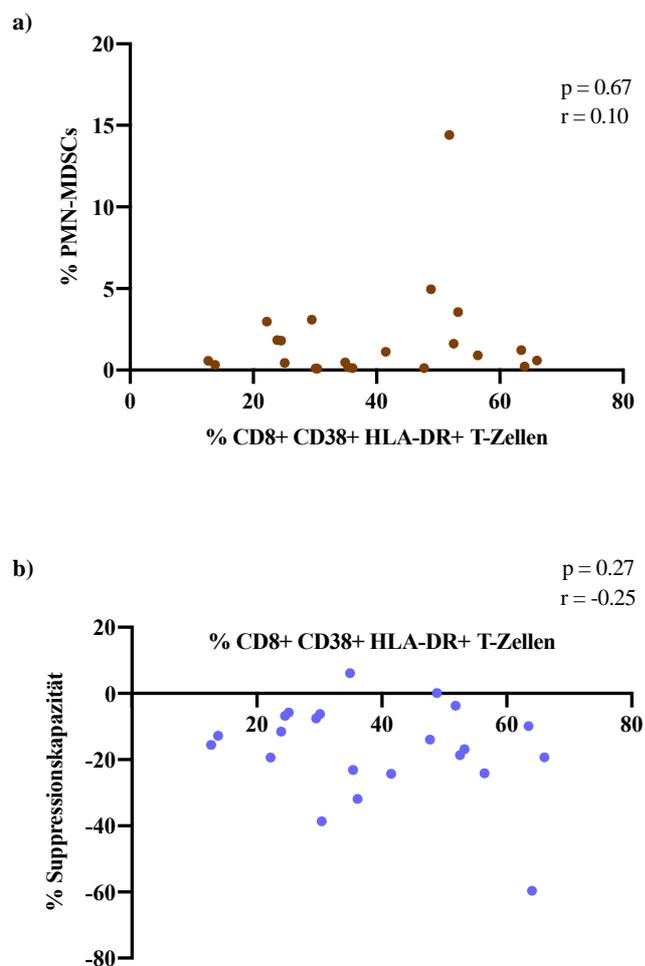


Abbildung 3.9: Keine Korrelation zwischen Immunaktivierung, PMN-MDSC-Frequenz und Suppressionskapazität

a) Die Immunaktivierung und PMN-MDSC-Frequenz korrelierten nicht signifikant miteinander ($p = 0.67$, $r = 0.10$).

b) Zwischen Immunaktivierung und Suppressionskapazität konnte ebenso keine signifikante Korrelation festgestellt werden ($p = 0.27$, $r = -0.25$) (Rangkorrelationsanalyse nach Spearman, $n = 22$)

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lassen sich aus den Untersuchungen folgende Beobachtungen festhalten:

- Die PMN-MDSC-Frequenz bei Patienten in der fortgeschrittenen HIV-Infektion war signifikant höher bei HIV-Controllern.
- Die PMN-MDSC-Frequenz von HIV-Patienten korrelierte positiv mit der Viruslast und invers mit der CD4-Zellzahl. Diese Parameter sind Indikatoren des Krankheitsfortschritts.
- In der Gesamtpopulation und in der Gruppe PR zeigte sich eine signifikant geringere CD8⁺ T-Zellproliferation bei Koinkubation *mit* PMN-MDSCs als *ohne* PMN-MDSCs. Dabei wurde festgestellt, dass die Suppressionskapazität signifikant mit der Frequenz der PMN-MDSC korrelierte, d.h. je höher die Frequenz um so niedriger die hemmende Wirkung. Es zeigte sich, dass Frequenzen über 2,5 % mit einer signifikant niedrigeren Suppressionskapazität assoziiert waren, als Frequenzen unter 2,5 %. Da die Viruslast mit Fortschreiten der Erkrankung ansteigt und parallel dazu die MDSC-Frequenz zunimmt, man also in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zunehmend PMN-MDSC nachweisen kann, bedeutet dies, dass die Suppressionskapazität der PMN-MDSCs mit Fortschreiten der HIV-Erkrankung abnimmt.
- Entgegen unserer Erwartung konnte kein Zusammenhang zwischen der mit dem Krankheitsfortschritt abnehmenden Suppressionskapazität und der Immunaktivierung, gemessen an der Expression von CD38 und HLA-DR auf CD8⁺ T-Zellen, festgestellt werden.

4. Diskussion

Das HI-Virus führt im Verlauf der Infektion zu tiefgreifenden immunologischen Veränderungen. Der Verlust der CD4⁺ T-Zellen, welcher auf die Zytotoxizität des Virus sowie auf die chronische Immunaktivierung zurückgeführt wird, ist bislang am besten erforscht [37]. Zudem verlieren CD8⁺ T-Zellen, welche für die Viruskontrolle essentiell sind, wichtige Effektorfunktionen [50]. Dieser Funktionsverlust wird als Immunerschöpfung bezeichnet.

Die in den 1980er Jahren erstmals beschriebenen MDSCs besitzen vermutlich immunregulatorische Funktionen, deren Rolle in der HIV-Pathogenese noch weitgehend ungeklärt ist [80, 89, 90]. Das Ziel vorliegender Arbeit bestand darin, das immunsuppressive Potenzial der PMN-MDSCs in der chronischen HIV-1-Infektion mittels Zellkulturen näher zu untersuchen.

Bei zunehmender PMN-MDSC-Frequenz zeigte sich ein Verlust der Suppressionskapazität, welcher darauf hindeutet, dass PMN-MDSCs im fortgeschrittenen Krankheitsstadium der HIV-Infektion erschöpfen. Die Suppressionskapazität korrelierte allerdings gegen unsere Erwartungen nicht signifikant mit dem Grad der Immunaktivierung der CD8⁺ T-Zellen.

4.1. Diskussion der Methodik

4.1.1. Patienten

Wir rekrutierten insgesamt 15 HIV-Patienten, davon 13 Männer und 2 Frauen. In der Gruppe PR konnten lediglich Männer für unsere Studie rekrutiert werden. In Deutschland beträgt der Frauenanteil der HIV-Infizierten weniger als 20 %, dementsprechend niedrig war auch die Zahl der weiblichen Neuvorstellungen in unserer HIV-Ambulanz [11]. Allerdings ist uns nicht bekannt, dass geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der PMN-MDSC-Funktion vorliegen. Dagegen beschreibt die Arbeitsgruppe *Verschoor et al.*, dass das Alter mit einer erhöhten MDSC-Frequenz assoziiert ist [91]. In ihrer Studie wurden signifikant höhere MDSC-Frequenzen bei Menschen zwischen 61 - 99 Jahren, als bei Menschen zwischen 19 - 59 Jahren beobachtet. Jedoch wurde in der Gruppe der Senioren nicht zwischen kranken und gesunden Probanden differenziert, obwohl die Expansion der MDSCs in zahlreichen Erkrankungen nachgewiesen wurde [75, 76, 92]. Da die Altersspanne und das durchschnittliche Alter nicht stark zwischen unseren Studiengruppen variierten, schlossen wir, dass das Alter der Studienprobanden keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

4.1.2. Uneinheitliche Definition der PMN-MDSCs

Eine wesentliche Herausforderung in der MDSC-Forschung stellt der Mangel einheitlich eingesetzter Marker für die Definition humaner MDSCs dar. Dies ist der großen Heterogenität unreifer myeloischer Zellen geschuldet und erschwert erheblich die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien. Zwar besteht in der wissenschaftlichen Literatur ein Konsensus hinsichtlich der Differenzierung zwischen M-MDSCs und PMN-MDSCs, doch kommen weiterhin unterschiedliche Marker zur Selektion der Zellen zum Einsatz. Unsere Arbeit hielt sich an die im Jahr 2016 publizierte Empfehlung von *Bronte et al.* zur Nomenklatur der MDSCs [72]. Sowohl die dort vorgeschlagenen immunphänotypischen Kriterien als auch die Anforderungen an die immuninhibierende Funktion wurden in unserer Studie erfüllt.

4.1.3. Separationsmethoden

Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Separation der PMN-MDSCs angewandt: die magnetische Separation sowie eine Kombination aus magnetischer Vorseparation und anschließender Zellsortierung mittels FACS. Die durchflusszytometrischen Analysen nach der Separation stellten jedoch die Gleichwertigkeit beider Verfahren sicher. Die Reinheiten beider Verfahren waren hoch (Kapitel 2.2.7.3).

Die Separationsverfahren führten wir ausschließlich anhand frischer Blutproben durch, da diverse Arbeitsgruppen gezeigt hatten, dass die Kryokonservierung quantitative und qualitative Eigenschaften der PMN-MDSCs beeinflusst: In den experimentellen Arbeiten von *Grützner et al.* aus unserer Arbeitsgruppe zeigte sich ein Verlust von durchschnittlich 92 % der PMN-MDSCs nach dem Einfrieren der Zellen [93]. Ähnlich demonstrierten *Kotsakis et al.* eine Verringerung der PMN-MDSCs um 69 % durch den Einfrierprozess [94].

4.1.4. Koinkubation von Zellen unterschiedlicher Probanden

In den Koinkubationen verwendeten wir Targetzellen von gesunden Probanden und Effektorzellen von Probanden der Studiengruppen. Bei der Kultur von Zellen heterogenen Ursprungs ist es möglich, dass Störeffekte durch Immunstimulation erzeugt werden [95]. Letztere entsteht unter anderem, wenn T-Zellen „fremde“ MHC-Moleküle erkennen [96]. Eine Ausnahme stellten die Positiv- und Negativkontrollen dar, in welchen ausschließlich autologe Zellen angelegt wurden. Da die Proliferationsraten der Positivkontrolle und die der Koinkubation *ohne* PMN-MDSCs vergleichbar waren, gab es keinen Anhalt auf eine ausgeprägte Zellaktivierung durch den

unterschiedlichen Ursprung der Zellen. Außerdem lagen der Berechnung der Suppressionskapazität die Koinkubationen *mit* PMN-MDSCs und *ohne* PMN-MDSCs zugrunde, in welchen gleichermaßen Zellen zweier Spender koinkubiert wurden. *Zhang et al.* dagegen inkubierten PMN-MDSCs von HIV-Patienten mit autologen CD8⁺ T-Zellen und beobachteten ebenfalls eine Hemmung der T-Zellproliferation [81]. Im Gegensatz zu dieser Arbeitsgruppe verglich unsere Studie jedoch die CD8⁺ T-Zellhemmung zwischen verschiedenen Studiengruppen. Daher verwendeten wir ausschließlich CD8⁺ T-Zellen von gesunden Probanden, um gleiche Verhältnisse bezüglich der Funktionsfähigkeit der Targetzellen in allen Studiengruppen zu schaffen.

Unsere Targetzellen setzten sich aus CFSE-gefärbten PBMCs zusammen. Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE ermöglichte die Messung der Zellproliferation. Durch die Anfärbung der CD8⁺ T-Zellen konnte die Proliferationshemmung in dieser spezifischen Zellfraktion betrachtet werden. Die Inkubation mit PBMCs statt mit reinen CD8⁺ T-Zellen bietet den Vorteil, dass die Verhältnisse im Blut, in welchem die Zellpopulationen ebenfalls nicht isoliert vorliegen, realitätsgreuer wiedergespiegelt werden. Allerdings kann der Einfluss weiterer PBMC-Subpopulationen auf die Proliferation nicht ausgeschlossen werden. Doch war für dies für Ergebnisse nicht ausschlaggebend, da PBMCs des jeweiligen Spenders in allen Wells vorlagen. Folglich herrschten diesbezüglich in allen Wells gleiche Bedingungen.

4.1.5. MDSCs des peripheren Blutes versus MDSCs in Organen

Unsere Studie untersuchte qualitative und quantitative Merkmale der PMN-MDSCs des peripheren Blutes. Im murinen Tumormodell wurden MDSCs jedoch auch in Milz, Knochenmark und Lymphknoten beschrieben [97, 98]. Es stellt sich daher die Frage, welche Rolle gewebsständige MDSCs in der HIV-Infektion spielen und inwiefern diese mit MDSCs des Blutes vergleichbar sind. Derzeit liegen allerdings noch keine Daten zu PMN-MDSCs in menschlichen Organen vor.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Korrelation zwischen PMN-MDSCs und der Krankheitsprogression

Die MDSC-Population expandiert in der fortschreitenden HIV-1-Infektion sowie in einer Reihe weiterer Erkrankungen [69, 99]. In Einklang mit der Studienlage zeigten sich in unserer Studie deutlich höhere PMN-MDSC-Frequenzen bei PR- als bei CO-Patienten. Dies hatten bereits auch zuvor *Vollbrecht et al.*, *Tumino et al.* und *Zhang et al.* berichtet [80, 81, 100]. Dagegen lag kein signifikanter Frequenzunterschied zwischen PR- und BRO-Patienten vor. Das entsprach unseren Erwartungen, da auch BRO-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöhte Frequenzen vorweisen [75]. Der Unterschied zwischen den Gruppen PR und HC war ebenfalls nicht signifikant. Dies lag vermutlich an der geringen Größe der Gruppe HC, in welcher ein abweichender Wert stark ins Gewicht fiel. Mit einem p-Wert von 0.04 ist dennoch ein Trend zu signifikant höheren Frequenzen in der Gruppe PR als bei Gesunden feststellbar.

Mehreren Studien zufolge korreliert die Frequenz der PMN-MDSCs in der HIV-1-Infektion positiv mit der Krankheitsprogression: Je höher die Viruslast und je niedriger die CD4-Zellzahl, desto höher die Frequenz (Kapitel 1.3.3). Dies wurde auch in unserer Kohorte beobachtet (Kapitel 3.1.2). Sogar bei ART-Patienten beobachteten *Tumino et al.*, dass Patienten mit einer CD4-Zahl unter 400 Zellen/ μ l signifikant höhere PMN-MDSC-Frequenzen aufweisen, als solche mit CD4-Zahlen jenseits dieser Schwelle. Eine Korrelation zwischen der Frequenz und der Viruslast bei ART-Patienten lag jedoch nicht vor, was wahrscheinlich auf die Suppression der Virämie durch die ART zurückging [101].

Die Expansion der PMN-MDSCs und ihre Korrelation mit der Krankheitsprogression weist auf eine Rolle dieser Zellentität in der chronischen HIV-Infektion hin. Unsere Proliferationsassays demonstrieren jedoch, dass nicht allein die Frequenz entscheidend ist, sondern auch das Ausmaß ihrer Aktivität.

4.2.2. Verlust der PMN-MDSC-Suppressionskapazität in der fortgeschrittenen HIV-Infektion

Die immuninhibierenden Eigenschaften der PMN-MDSCs wurden in der HIV-Infektion und in zahlreichen weiteren Krankheitsentitäten beschrieben [77, 80, 101, 102]. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen in allen untersuchten Studiengruppen gehemmt wurde (Kapitel 3.2.1). Weiterhin unterschied sich die Suppressionskapazität der PMN-MDSCs

zwischen den Gruppen nicht signifikant. Bei den PR-Patienten fiel jedoch eine deutliche Streuung der Suppressionskapazitäten auf. Es wurde festgestellt, dass die Hemmung der CD8⁺ T-Zellproliferation bei hohen PMN-MDSC-Frequenzen schwächer ausfiel, als bei niedrigen Frequenzen (Kapitel 3.2.5). Unsere Studie wies somit nach, dass PMN-MDSCs in der chronischen, unbehandelten HIV-1-Infektion ihre Suppressionskapazität verlieren. Vergleichbare Daten hinsichtlich des Funktionsverlusts der PMN-MDSCs in der HIV-Infektion oder in anderen pathogenen Prozessen sind uns nicht bekannt.

Über die Gründe für den Funktionsverlust der PMN-MDSCs lassen sich nach derzeitigem Kenntnisstand nur Vermutungen anstellen. Die ausgeprägte Immunaktivierung könnte (ähnlich wie bei der T-Zellerschöpfung) einer der verantwortlichen Faktoren darstellen (Kapitel 4.2.3). Zudem könnte ein Befall der PMN-MDSCs durch das HI-Virus eine Dysfunktion der Zellen induzieren. Denn *Sui et al.* zufolge kann SIV sowohl PMN-MDSCs als auch M-MDSCs in Affen infizieren [103]. *Qin et al.* infizierten humane M-MDSCs *in vitro* mit dem HI-Virus und wiesen den CD4⁺ Oberflächenrezeptor sowie auch die Corezeptoren CXC-Motiv-Chemokinrezeptor (CXCR4) und CCR5 auf den Zellen nach, die das Virus benötigt, um an die Wirtszelle zu binden [90]. Welche Konsequenz daraus folgt und ob die Funktion der MDSCs durch die Infektion der Zellen tatsächlich beeinträchtigt wird, ist noch offen.

4.2.3. Immunaktivierung und PMN-MDSCs

In der HIV-Infektion wird der chronischen Immunaktivierung eine maßgebliche Rolle in der Erschöpfung der T-Zellen und der Krankheitsprogression zugeschrieben [36, 42]. Wir untersuchten daher, ob auch zwischen dem Verlust der Suppressionskapazität der PMN-MDSCs und der Immunaktivierung ein Zusammenhang vorliegt. Die Expression der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR auf CD8⁺ T-Zellen war in der Gruppe PR im Vergleich zu CO und HC erhöht, doch korrelierte die Immunaktivierung weder mit der Frequenz noch mit der Suppressionskapazität der PMN-MDSCs. Eine Erklärung dafür ist, dass CD38 und HLA-DR Oberflächenmarker der T-Zellen darstellen, während PMN-MDSCs Vorläufern der Granulozyten entstammen, welche anderen Signalwegen unterliegen [104, 105]. Auch *Tumino et al.* detektierten keine Korrelation zwischen CD38⁺ T-Zellen und der PMN-MDSC-Frequenz [100]. Allerdings zeigte die Studie eine positive Korrelation der PMN-MDSC-Frequenz mit Mediatoren wie IL-2R α und IFN- α . Diese Zytokine sind mit Entzündung, Infektion und Immunaktivierung assoziiert. Ähnlich dokumentierten *Dross et al.* eine stärkere Korrelation der PMN-MDSC-Frequenz mit den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF und Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF) als mit der Viruslast [82].

Zudem wurde in einer weiterführenden Studie unserer Arbeitsgruppe beobachtet, dass hohe Interleukin-8 (IL-8)-Plasmaspiegel mit einer erhöhten PMN-MDSC-Frequenz und mit einer Erniedrigung der Suppressionskapazität assoziiert sind [106]. IL-8 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut ins Gewebe fördert. Es wird durch eine Vielzahl aktivierter Zellen ausgeschüttet, wie z.B. von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen [107].

Zusammengefasst deuten die signifikanten Korrelationen zwischen pro-inflammatorischen Mediatoren und der Funktion bzw. Frequenz von PMN-MDSCs auf einen Zusammenhang mit der Immunaktivierung hin.

4.3. Fazit und Ausblick

In chronischen Virusinfektionen wie der HIV-1-Infektion ist das Immunsystem nicht in der Lage, das Virus zu eliminieren. Es etabliert sich ein Zustand persistierender Immunaktivierung, welcher für den Funktionsverlust zahlreicher Immunzellen verantwortlich gemacht wird [36].

MDSCs wird eine wichtige regulatorische Rolle zugeschrieben, indem sie den gesunden Organismus vor überschießenden Immunreaktionen schützen und zur Wiederherstellung der immunologischen Homöostase beitragen [69, 70]. Unsere Studie zeigte allerdings, dass PMN-MDSCs in der chronischen, unbehandelten HIV-1-Infektion ihre Suppressionskapazität verlieren. Ähnlich wie T-Zellen scheinen PMN-MDSCs somit dem Prozess der Immunerschöpfung zu unterliegen. Weiterhin bestätigt unsere Studie, dass die Frequenz der PMN-MDSCs mit Parametern der Krankheitsprogression korreliert. Welche Bedeutung diese Beobachtungen für die Immunpathogenese und das Outcome des Patienten hat, ist bislang noch unklar. Diesbezüglich bietet der Zusammenhang zwischen PMN-MDSCs und der Immunaktivierung einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Studien.

Mittels der derzeit verfügbaren ART kann eine nahezu normale Lebenserwartung für HIV-Infizierte erreicht werden, doch steht die Entdeckung einer kurativen Therapie noch aus [108]. Die zunehmenden Resistenzen, die Persistenz des Virusreservoirs und der Wiederanstieg der Viruslast nach Therapieunterbrechung stellen weiterhin Grenzen der ART dar [109]. Angesichts dieser Herausforderungen hat sich in den letzten Jahren das Konzept der „functional cure“ etabliert, welches auf die Kontrolle der Infektion ohne ART abzielt. In diesem Rahmen werden Ansätze verfolgt, die u.a. auf der Reduktion des Virusreservoirs und auf der Optimierung der Immunantwort beruhen [110]. Ein erweitertes Verständnis der MDSCs und ihrer regulatorischen Aufgaben in der HIV-1-Infektion könnte daher in der Entwicklung neuer immunbasierter Therapien einen Beitrag leisten. Darüber hinaus steht noch aus, inwiefern MDSCs als prognostische Marker genutzt werden können. Die vielfältigen Aspekte der MDSCs bieten ein bislang weitgehend unausgeschöpftes Potenzial, die Immunpathogenese zahlreicher Erkrankungen besser zu verstehen und neue Therapiemöglichkeiten zu konzipieren.

5. Literaturverzeichnis

1. Centers for Disease Control. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981;**30**(25): S. 305-8.
2. Hymes, K.B., T. Cheung, J.B. Greene, N.S. Prose, A. Marcus, H. Ballard, D.C. William, L.J. Laubenstein. Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. *Lancet.* 1981;**2**(8247): S. 598-600.
3. Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;**220**(4599): S. 868-71.
4. Case, K. Nomenclature: human immunodeficiency virus. *Ann Intern Med.* 1986;**105**(1): S. 133.
5. Korber, B., M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B.H. Hahn, S. Wolinsky, T. Bhattacharya. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science.* 2000;**288**(5472): S. 1789-96.
6. Gao, F., E. Bailes, D.L. Robertson, Y. Chen, C.M. Rodenburg, S.F. Michael, L.B. Cummins, L.O. Arthur, M. Peeters, G.M. Shaw, P.M. Sharp, B.H. Hahn. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature.* 1999;**397**(6718): S. 436-41.
7. Hirsch, V.M., R.A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R.H. Purcell, P.R. Johnson. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature.* 1989;**339**(6223): S. 389-92.
8. Draenert, R. Pathophysiologie der HIV-Infektion, in HIV 2018/2019, C. Hoffmann und J. Rockstroh, (Hrsg.). Hamburg: Medizin Fokus Verlag; 2018. S. 23-41.
9. Faria, N.R., A. Rambaut, M.A. Suchard, G. Baele, T. Bedford, M.J. Ward, A.J. Tatem, J.D. Sousa, N. Arinaminpathy, J. Pepin, D. Posada, M. Peeters, O.G. Pybus, P. Lemey. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science.* 2014;**346**(6205): S. 56-61.
10. UNAIDS. Fact sheet - Global AIDS update 2019 [Internet]. New York: Vereinte Nationen; 2019. Verfügbar unter: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf [17.08.2019].
11. Robert-Koch-Institut. HIV/AIDS in Deutschland – Eckdaten der Schätzung [Internet]. Berlin: 2018. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/Eckdaten/EckdatenDeutschland.pdf?__blob=publicationFile [21.12.2019].
12. The World Bank in Lesotho [Internet]. Washington, D.C.: Weltbank; 2018. Verfügbar unter: <https://www.worldbank.org/en/country/lesotho/overview> [12.12.2018].
13. Bollinger, L., J. Stover. The Economic Impact of AIDS in Swaziland [Internet]. Washington, D.C.: The Futures Group International; 1999. Verfügbar unter: <http://www.policyproject.com/pubs/SEImpact/swazilan.pdf> [21.12.2018].
14. UNAIDS. Country fact sheet Eswatini: HIV and AIDS Estimates [Internet]. New York: Vereinte Nationen; 2018. Verfügbar unter: <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/swaziland> [17.08.2019].
15. UNAIDS. Country fact sheet Lesotho: HIV and AIDS Estimates [Internet]. New York: Vereinte Nationen; 2018. Verfügbar unter: <http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/lesotho> [17.08.2019].
16. Murphy, K., C. Weaver. Das erworbene Immunschwächesyndrom (AIDS), in Janeway Immunologie. Berlin: Springer Verlag; 2018. S. 743-70.

17. Murphy, K., C. Weaver. Die T-Zell-vermittelte Immunität, in Janeway Immunologie. Berlin: Springer Verlag; 2018. S. 443-516.
18. Rockstroh, J. Einleitung, in HIV 2018/2019, C. Hoffmann und J. Rockstroh, (Hrsg.). Hamburg: Medizin Fokus Verlag; 2018. S. 2-14.
19. Lavreys, L., J.M. Baeten, J. Overbaugh, D.D. Panteloeff, B.H. Chohan, B.A. Richardson, K. Mandaliya, J.O. Ndinya-Achola, J.K. Kreiss. Virus load during primary Human Immunodeficiency Virus (HIV) type 1 infection is related to the severity of acute HIV illness in Kenyan women. *Clin Infect Dis.* 2002;**35**(1): S. 77-81.
20. Guadalupe, M., E. Reay, S. Sankaran, T. Prindiville, J. Flamm, A. McNeil, S. Dandekar. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2003;**77**(21): S. 11708-17.
21. Flint, S.J., V.R. Racaniello, L.W. Enquist, A.M. Skalka. Human Immunodeficiency Virus Pathogenesis, in Principles of virology. Washington, DC: ASM Press; 2009. S. 165-98.
22. Brenchley, J.M., D.A. Price, T.W. Schacker, T.E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B.R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J.N. Martin, F.M. Hecht, L.J. Picker, M.M. Lederman, S.G. Deeks, D.C. Douek. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;**12**(12): S. 1365-71.
23. Borrow, P., H. Lewicki, B.H. Hahn, G.M. Shaw, M.B. Oldstone. 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): S. 6103-10.
24. Grützner, E., R. Draenert. Immundefekt bei HIV [Internet]. München: HIV&more; 2015. Verfügbar unter: <https://www.hivandmore.de/archiv/2015-3/immundefekt-bei-hiv.shtml> [12.12.2018].
25. Lyles, R.H., A. Munoz, T.E. Yamashita, H. Bazmi, R. Detels, C.R. Rinaldo, J.B. Margolick, J.P. Phair, J.W. Mellors. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis.* 2000;**181**(3):**872-80**.
26. Mellors, J.W., A. Muñoz, J.V. Giorgi, J.B. Margolick, C.J. Tassoni, P. Gupta, L.A. Kingsley, J.A. Todd, A.J. Saah, R. Detels, J.P. Phair, C.R.j. Rinaldo. Plasma Viral Load and CD4+ Lymphocytes as Prognostic Markers of HIV-1 Infection. *Annals of Internal Medicine.* 1997;**126**(12): S. 946-54.
27. HIV/AIDS [Internet]. Genf: Weltgesundheitsorganisation; 2017. Verfügbar unter: <https://www.who.int/features/qa/71/en/> [21.06.2019].
28. Singer, E.J., M. Valdes-Sueiras, D. Commins, A. Levine. Neurologic presentations of AIDS. *Neurol Clin.* 2010;**28**(1): S. 253-75.
29. Institute of Medicine (US) Committee on Social Security. Low CD4 Count as an Indicator of Disability, in HIV and Disability: Updating the Social Security Listings. Washington (DC): National Academies Press; 2010.
30. Galperin, M., C. Farenc, M. Mukhopadhyay, D. Jayasinghe, A. Decroos, D. Benati, L.L. Tan, L. Ciacchi, H.H. Reid, J. Rossjohn, L.A. Chakrabarti, S. Gras. CD4(+) T cell-mediated HLA class II cross-restriction in HIV controllers. *Sci Immunol.* 2018;**3**(24).
31. Walker, B.D., X.G. Yu. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat Rev Immunol.* 2013;**13**(7): S. 487-98.
32. International H. I. V. Controllers Study. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science.* 2010;**330**(6010): S. 1551-7.
33. Maartens, G., C. Celum, S.R. Lewin. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet.* 2014;**384**(9939): S. 258-71.

34. Douek, D.C., M. Roederer, R.A. Koup. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med.* 2009;**60**: S. 471-84.
35. Ronsholt, F.F., H. Ullum, T.L. Katzenstein, J. Gerstoft, S.R. Ostrowski. Persistent inflammation and endothelial activation in HIV-1 infected patients after 12 years of antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2013;**8**(6): S. e65182.
36. Appay, V., D. Sauce. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008;**214**(2): S. 231-41.
37. Hazenberg, M.D., D. Hamann, H. Schuitemaker, F. Miedema. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol.* 2000;**1**(4): S. 285-9.
38. Younes, S.A., B. Yassine-Diab, A.R. Dumont, M.R. Boulassel, Z. Grossman, J.P. Routy, R.P. Sekaly. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med.* 2003;**198**(12): S. 1909-22.
39. Miedema, F., M.D. Hazenberg, K. Tesselaar, D. van Baarle, R.J. de Boer, J.A. Borghans. Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis. *Front Immunol.* 2013;**4**: S. 298.
40. Klatt, N.R., A. Chahoudri, G. Silvestri. Human Immunodeficiency Viruses: Pathogenesis, in *Encyclopedia of virology*, B.W.J. Mahy und M.H.V. Van Regenmortel, (Hrsg.). Amsterdam; Boston: Academic Press; 2008. S. 534-42.
41. Deeks, S.G., C.M. Kitchen, L. Liu, H. Guo, R. Gascon, A.B. Narvaez, P. Hunt, J.N. Martin, J.O. Kahn, J. Levy, M.S. McGrath, F.M. Hecht. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood.* 2004;**104**(4): S. 942-7.
42. Liu, Z., W.G. Cumberland, L.E. Hultin, H.E. Prince, R. Detels, J.V. Giorgi. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1997;**16**(2): S. 83-92.
43. Giorgi, J.V., L.E. Hultin, J.A. McKeating, T.D. Johnson, B. Owens, L.P. Jacobson, R. Shih, J. Lewis, D.J. Wiley, J.P. Phair, S.M. Wolinsky, R. Detels. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis.* 1999;**179**(4): S. 859-70.
44. Deeks, S.G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med.* 2011;**62**: S. 141-55.
45. Savarino, A., F. Bottarel, F. Malavasi, U. Dianzani. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *AIDS.* 2000;**14**(9): S. 1079-89.
46. Aarhus, R., R.M. Graeff, D.M. Dickey, T.F. Walseth, H.C. Lee. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem.* 1995;**270**(51): S. 30327-33.
47. Aksoy, P., T.A. White, M. Thompson, E.N. Chini. Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;**345**(4): S. 1386-92.
48. Crux, N.B., S. Elahi. Human Leukocyte Antigen (HLA) and Immune Regulation: How Do Classical and Non-Classical HLA Alleles Modulate Immune Response to Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections? *Front Immunol.* 2017;**8**: S. 832.
49. Kestens, L., G. Vanham, C. Vereecken, M. Vandenbruaene, G. Vercauteren, R.L. Colebunders, P.L. Gigase. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol.* 1994;**95**(3): S. 436-41.

50. Kahan, S.M., E.J. Wherry, A.J. Zajac. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*. 2015;**479-480**: S. 180-93.
51. Betts, M.R., M.C. Nason, S.M. West, S.C. De Rosa, S.A. Migueles, J. Abraham, M.M. Lederman, J.M. Benito, P.A. Goepfert, M. Connors, M. Roederer, R.A. Koup. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2006;**107**(12): S. 4781-9.
52. Kannanganat, S., B.G. Kapogiannis, C. Ibegbu, L. Chennareddi, P. Goepfert, H.L. Robinson, J. Lennox, R.R. Amara. Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J Virol*. 2007;**81**(21): S. 12071-6.
53. McNeil, A.C., W.L. Shupert, C.A. Iyasere, C.W. Hallahan, J.A. Mican, R.T. Davey, Jr., M. Connors. High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4(+) T cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;**98**(24): S. 13878-83.
54. Moir, S., J. Ho, A. Malaspina, W. Wang, A.C. DiPoto, M.A. O'Shea, G. Roby, S. Kottlil, J. Arthos, M.A. Proschan, T.W. Chun, A.S. Fauci. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med*. 2008;**205**(8): S. 1797-805.
55. Mikulak, J., F. Oriolo, E. Zaghi, C. Di Vito, D. Mavilio. Natural killer cells in HIV-1 infection and therapy. *AIDS*. 2017;**31**(17): S. 2317-2330.
56. Tian, X., A. Zhang, C. Qiu, W. Wang, Y. Yang, C. Qiu, A. Liu, L. Zhu, S. Yuan, H. Hu, W. Wang, Q. Wei, X. Zhang, J. Xu. The upregulation of LAG-3 on T cells defines a subpopulation with functional exhaustion and correlates with disease progression in HIV-infected subjects. *J Immunol*. 2015;**194**(8): S. 3873-82.
57. Quigley, M., F. Pereyra, B. Nilsson, F. Porichis, C. Fonseca, Q. Eichbaum, B. Julg, J.L. Jesneck, K. Brosnahan, S. Imam, K. Russell, I. Toth, A. Piechocka-Trocha, D. Dolfi, J. Angelosanto, A. Crawford, H. Shin, D.S. Kwon, J. Zupkosky, L. Francisco, G.J. Freeman, E.J. Wherry, D.E. Kaufmann, B.D. Walker, B. Ebert, W.N. Haining. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med*. 2010;**16**(10): S. 1147-51.
58. Day, C.L., D.E. Kaufmann, P. Kiepiela, J.A. Brown, E.S. Moodley, S. Reddy, E.W. Mackey, J.D. Miller, A.J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E.J. Wherry, H.M. Coovadia, P.J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G.J. Freeman, B.D. Walker. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;**443**(7109): S. 350-4.
59. Boni, C., P. Fisicaro, C. Valdatta, B. Amadei, P. Di Vincenzo, T. Giuberti, D. Laccabue, A. Zerbini, A. Cavalli, G. Missale, A. Bertoletti, C. Ferrari. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol*. 2007;**81**(8): S. 4215-25.
60. Radziewicz, H., C.C. Ibegbu, M.L. Fernandez, K.A. Workowski, K. Obideen, M. Wehbi, H.L. Hanson, J.P. Steinberg, D. Masopust, E.J. Wherry, J.D. Altman, B.T. Rouse, G.J. Freeman, R. Ahmed, A. Grakoui. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol*. 2007;**81**(6): S. 2545-53.
61. Khaitan, A., D. Unutmaz. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011;**8**(1): S. 4-11.
62. Walker, B.D., S. Chakrabarti, B. Moss, T.J. Paradis, T. Flynn, A.G. Durno, R.S. Blumberg, J.C. Kaplan, M.S. Hirsch, R.T. Schooley. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature*. 1987;**328**(6128): S. 345-8.
63. Koup, R.A., J.T. Safrit, Y. Cao, C.A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, D.D. Ho. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of

- viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994;**68**(7): S. 4650-5.
64. Price, D.A., P.J. Goulder, P. Klenerman, A.K. Sewell, P.J. Easterbrook, M. Troop, C.R. Bangham, R.E. Phillips. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;**94**(5): S. 1890-5.
 65. Schmitz, J.E., M.J. Kuroda, S. Santra, V.G. Sasseville, M.A. Simon, M.A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B.J. Scallon, J. Ghayeb, M.A. Forman, D.C. Montefiori, E.P. Rieber, N.L. Letvin, K.A. Reimann. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 1999;**283**(5403): S. 857-60.
 66. Matano, T., R. Shibata, C. Siemon, M. Connors, H.C. Lane, M.A. Martin. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol.* 1998;**72**(1): S. 164-9.
 67. Janssen, E.M., E.E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M.G. von Herrath, S.P. Schoenberger. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature.* 2003;**421**(6925): S. 852-6.
 68. Connick, E., T. Mattila, J.M. Folkvord, R. Schlichtemeier, A.L. Meditz, M.G. Ray, M.D. McCarter, S. Mawhinney, A. Hage, C. White, P.J. Skinner. CTL fail to accumulate at sites of HIV-1 replication in lymphoid tissue. *J Immunol.* 2007;**178**(11): S. 6975-83.
 69. Gabrilovich, D.I., S. Nagaraj. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;**9**(3): S. 162-74.
 70. Millrud, C.R., C. Bergenfelz, K. Leandersson. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget.* 2017;**8**(2): S. 3649-3665.
 71. Young, M.R., M. Newby, H.T. Wepsic. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res.* 1987;**47**(1): S. 100-5.
 72. Bronte, V., S. Brandau, S.H. Chen, M.P. Colombo, A.B. Frey, T.F. Greten, S. Mandruzzato, P.J. Murray, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, P.C. Rodriguez, A. Sica, V. Umansky, R.H. Vonderheide, D.I. Gabrilovich. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016;**7**: S. 12150.
 73. Seddiki, N., V. Brezar, R. Draenert. Cell exhaustion in HIV-1 infection: role of suppressor cells. *Curr Opin HIV AIDS.* 2014;**9**(5): S. 452-8.
 74. Zea, A.H., P.C. Rodriguez, M.B. Atkins, C. Hernandez, S. Signoretti, J. Zabaleta, D. McDermott, D. Quiceno, A. Youmans, A. O'Neill, J. Mier, A.C. Ochoa. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 2005;**65**(8): S. 3044-8.
 75. Feng, P.H., K.Y. Lee, Y.L. Chang, Y.F. Chan, L.W. Kuo, T.Y. Lin, F.T. Chung, C.S. Kuo, C.T. Yu, S.M. Lin, C.H. Wang, C.L. Chou, C.D. Huang, H.P. Kuo. CD14(+)S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;**186**(10): S. 1025-36.
 76. Hoechst, B., L.A. Ormandy, M. Ballmaier, F. Lehner, C. Kruger, M.P. Manns, T.F. Greten, F. Korangy. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology.* 2008;**135**(1): S. 234-43.
 77. Marvel, D., D.I. Gabrilovich. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest.* 2015;**125**(9): S. 3356-64.
 78. Yang, L., L.M. DeBusk, K. Fukuda, B. Fingleton, B. Green-Jarvis, Y. Shyr, L.M. Matrisian, D.P. Carbone, P.C. Lin. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+

- cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004;**6**(4): S. 409-21.
79. Safarzadeh, E., M. Orangi, H. Mohammadi, F. Babaie, B. Baradaran. Myeloid-derived suppressor cells: Important contributors to tumor progression and metastasis. *J Cell Physiol*. 2018;**233**(4): S. 3024-3036.
80. Vollbrecht, T., R. Stirner, A. Tufman, J. Roider, R.M. Huber, J.R. Bogner, A. Lechner, C. Bourquin, R. Draenert. Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells. *AIDS*. 2012;**26**(12): S. F31-7.
81. Zhang, Z.N., N. Yi, T.W. Zhang, L.L. Zhang, X. Wu, M. Liu, Y.J. Fu, S.J. He, Y.J. Jiang, H.B. Ding, Z.X. Chu, H. Shang. Myeloid-Derived Suppressor Cells Associated With Disease Progression in Primary HIV Infection: PD-L1 Blockade Attenuates Inhibition. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;**76**(2): S. 200-8.
82. Dross, S.E., P.V. Munson, S.E. Kim, D.L. Bratt, H.C. Tunggal, A.L. Gervassi, D.H. Fuller, H. Horton. Kinetics of Myeloid-Derived Suppressor Cell Frequency and Function during Simian Immunodeficiency Virus Infection, Combination Antiretroviral Therapy, and Treatment Interruption. *J Immunol*. 2017;**198**(2): S. 757-66.
83. Die Technologie im CASY [Internet]. Bremen: OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG. Verfügbar unter: <https://cellcounting.de/die-technologie-im-casy/> [23.08.2019].
84. Vetsika, E.K., F. Koinis, M. Gioulbasani, D. Aggouraki, A. Koutoulaki, E. Skalidaki, D. Mavroudis, V. Georgoulas, A. Kotsakis. A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. *J Immunol Res*. 2014;**2014**: S. 659294.
85. Prinzip der Durchflusszytometrie [Internet]. Mainz: Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Verfügbar unter: <http://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflusszytometrie/prinzip-der-durchflusszytometrie.html> [23.08.2019].
86. Tucker, J.D., M.L. Christensen. Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutat Res*. 1987;**190**(3): S. 225-8.
87. Lyons, A.B., C.R. Parish. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1994;**171**(1): S. 131-7.
88. Vollbrecht, T., H. Brackmann, N. Henrich, J. Roeling, U. Seybold, J.R. Bogner, F.D. Goebel, R. Draenert. Impact of changes in antigen level on CD38/PD-1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells in chronic, untreated HIV-1 infection. *J Med Virol*. 2010;**82**(3): S. 358-70.
89. Gabrilovich, D.I. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*. 2017;**5**(1): S. 3-8.
90. Qin, A., W. Cai, T. Pan, K. Wu, Q. Yang, N. Wang, Y. Liu, D. Yan, F. Hu, P. Guo, X. Chen, L. Chen, H. Zhang, X. Tang, J. Zhou. Expansion of monocytic myeloid-derived suppressor cells dampens T cell function in HIV-1-seropositive individuals. *J Virol*. 2013;**87**(3): S. 1477-90.
91. Verschoor, C.P., J. Johnstone, J. Millar, M.G. Dorrington, M. Habibagahi, A. Lelic, M. Loeb, J.L. Bramson, D.M. Bowdish. Blood CD33(+)HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells are increased with age and a history of cancer. *J Leukoc Biol*. 2013;**93**(4): S. 633-7.
92. Greten, T.F., M.P. Manns, F. Korangy. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol*. 2011;**11**(7): S. 802-7.
93. Grützner, E., R. Stirner, L. Arenz, A.P. Athanasoulia, K. SchrodL, C. Berking, J.R. Bogner, R. Draenert. Kinetics of human myeloid-derived suppressor cells after blood draw. *J Transl Med*. 2016;**14**: S. 2.

94. Kotsakis, A., M. Harasymczuk, B. Schilling, V. Georgoulas, A. Argiris, T.L. Whiteside. Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples. *J Immunol Methods*. 2012;**381**(1-2): S. 14-22.
95. Bain, B., M.R. Vas, L. Lowenstein. The Development of Large Immature Mononuclear Cells in Mixed Leukocyte Cultures. *Blood*. 1964;**23**: S. 108-16.
96. Murphy, K., C. Weaver. Der Haupthistokompatibilitätskomplex und seine Funktionen, in *Janeway Immunologie*. Berlin: Springer Verlag; 2018. S. 303.
97. Porembka, M.R., J.B. Mitchem, B.A. Belt, C.S. Hsieh, H.M. Lee, J. Herndon, W.E. Gillanders, D.C. Linehan, P. Goedegebuure. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;**61**(9): S. 1373-85.
98. Kumar, V., S. Patel, E. Tcyganov, D.I. Gabrilovich. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*. 2016;**37**(3): S. 208-20.
99. Garg, A., 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): S. 441-51.
100. Tumino, N., M.T. Bilotta, C. Pinnetti, A. Ammassari, A. Antinori, F. Turchi, C. Agrati, R. Casetti, V. Bordoni, E. Cimini, I. Abbate, M.R. Capobianchi, F. Martini, A. Sacchi. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Increased in Early Phases of Primary HIV Infection Depending on TRAIL Plasma Level. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;**74**(5): S. 575-82.
101. Tumino, N., F. Turchi, S. Meschi, E. Lalle, V. Bordoni, R. Casetti, C. Agrati, E. Cimini, C. Montesano, V. Colizzi, F. Martini, A. Sacchi. In HIV-positive patients, myeloid-derived suppressor cells induce T-cell anergy by suppressing CD3zeta expression through ELF-1 inhibition. *AIDS*. 2015;**29**(18): S. 2397-407.
102. Serafini, P. Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: the good, the bad, and the ugly. *Immunol Res*. 2013;**57**(1-3): S. 172-84.
103. Sui, Y., B. Frey, Y. Wang, R. Billeskov, S. Kulkarni, K. McKinnon, T. Rourke, L. Fritts, C.J. Miller, J.A. Berzofsky. Paradoxical myeloid-derived suppressor cell reduction in the bone marrow of SIV chronically infected macaques. *PLoS Pathog*. 2017;**13**(5): S. e1006395.
104. Murphy, K., C. Weaver. Anhänge - Die CD-Antigene, in *Janeway Immunologie*. Berlin: Springer Verlag; 2018. S. 1036.
105. Reddy, M., E. Eirikis, C. Davis, H.M. Davis, U. Prabhakar. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods*. 2004;**293**(1-2): S. 127-42.
106. Grützner, E., A. Neizert, R. Stirner, R. Conca, I. Andrä, L. Wolff, M. Schiemann, L.M. Holdt, C. Klein, J.R. Bogner, R. Draenert. Suppressive capacity of PMN-MDSCs is lost in advanced stages of HIV-1 infection. *Translational Medicine Communications*. 2020, (in Druck).
107. Baggiolini, M., I. Clark-Lewis. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*. 1992;**307**(1): S. 97-101.
108. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Survival of HIV-positive patients starting antiretroviral therapy between 1996 and 2013: a collaborative analysis of cohort studies. *Lancet HIV*. 2017;**4**(8): S. e349-e356.
109. Marsden, M.D., J.A. Zack. Eradication of HIV: current challenges and new directions. *J Antimicrob Chemother*. 2009;**63**(1): S. 7-10.

110. Davenport, M.P., D.S. Khoury, D. Cromer, S.R. Lewin, A.D. Kelleher, S.J. Kent. Functional cure of HIV: the scale of the challenge. *Nat Rev Immunol.* 2019;**19**(1): S. 45-54.

6. Anhang

Publikation

High frequencies of PMN-MDSCs are associated with low suppressive capacity in advanced stages of HIV-1 infection

Eva M Grützner; Ashley Neizert; Renate Stirner; Raffaele Conca; Immanuel Andrä; Lisa Wolff; Matthias Schiemann; Lesca M Holdt; Christoph Klein; Johannes R Bogner; Rika Draenert, Translational Medicine Communications (2020)

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all jenen bedanken, ohne die das Gelingen dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Rika Draenert für die freundliche Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung bedanken. Ihre außergewöhnliche fachliche Kompetenz, strukturierte Vorgehensweise und Begeisterung für die Forschung werden mir stets Vorbild sein.

Ganz besonders danken möchte ich auch meiner Betreuerin Frau Dr. rer. biol. hum. Eva Grützner, die mich in die Methodik der Koinkubation einarbeitete und mich weit darüber hinaus in jeder Phase der Arbeit mit durchdachtem Rat und konstruktiver Kritik unterstützte.

Herzlicher Dank geht an Frau Renate Stirner, die mich geduldig in die wissenschaftliche Laborarbeit einführte und bei jeglichen methodischen und organisatorischen Fragen zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. med. Johannes Bogner danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Labor der Sektion Klinische Infektiologie der LMU durchzuführen. Ihm und seinem Team in der Infektionsambulanz bin ich für die engagierte Unterstützung bei der Rekrutierung der Studienteilnehmer äußerst dankbar.

Ich danke weiterhin den zahlreichen Patienten und Probanden, die ihr Blut für die Studie zur Verfügung stellten und ohne welche diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Meinen Geschwistern Christina und Nicholas Neizert danke ich für das aufmerksame Korrekturlesen und die immerwährende moralische Unterstützung.

Mein tiefster Dank gilt meinem Vater Christoph Neizert, der mir das Studium ermöglicht, und wertvolle Anregungen für meinen Lebensweg gegeben hat.

Eidesstattliche Versicherung

Neizert, Ashley

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

**Untersuchung der Suppressionskapazität der
polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells
(PMN-MDSCs)
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 in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 14.12.2020

Ort, Datum

Ashley Neizert
