

Untersuchung funktioneller und mitochondrialer Eigenschaften von NK-Zellen in der Frühphase der HIV-Infektion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Gregor Hörr

aus Göttingen

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Jacob Nattermann
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Sigmar Kunz

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.02.2023

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Allgemeine Innere Medizin
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Strassburg

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|---------------|
| 1. Einleitung | - 8 - |
| 1.1. Die HIV-Infektion | - 8 - |
| 1.1.1. Das Humane Immundefizienz-Virus | - 8 - |
| 1.1.2. Infektion | - 8 - |
| 1.1.3. Verlauf der Infektion..... | - 9 - |
| 1.1.4. Therapie..... | - 10 - |
| 1.2. Bakterielle Translokation | - 11 - |
| 1.3. Natürliche Killer-Zellen | - 12 - |
| 1.3.1. NK-Zell-Subpopulationen..... | - 13 - |
| 1.3.2. NK-Zell-Rezeptoren | - 14 - |
| 1.3.3. Metabolismus von NK-Zellen | - 14 - |
| 1.3.4. NK-Zellen bei HIV-Infektion | - 16 - |
| 1.4. Zielsetzung der Arbeit | - 17 - |
| 2. Material und Methoden | - 18 - |
| 2.1. Material..... | - 18 - |
| 2.1.1. Geräte..... | - 18 - |
| 2.1.2. Verbrauchsmaterial..... | - 19 - |
| 2.1.3. Reagenzien..... | - 19 - |
| 2.1.4. Primer | - 20 - |
| 2.1.5. Antikörper | - 21 - |
| 2.1.6. Zytokine | - 23 - |
| 2.1.7. Kits..... | - 23 - |
| 2.1.8. Puffer und Medien | - 23 - |
| 2.1.9. Untersuchungsmaterial | - 24 - |

| | | |
|------------|--|---------------|
| 2.2. | Methoden | - 26 - |
| 2.2.1. | Zellkultur und zellbiologische Methoden | - 26 - |
| 2.2.1.1. | Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer..... | - 26 - |
| 2.2.1.2. | LPS-Kultur | - 26 - |
| 2.2.2. | Immunologische Methoden..... | - 26 - |
| 2.2.2.1. | Zellisolation | - 26 - |
| 2.2.2.1.1. | Isolation peripherer Blutlymphozyten..... | - 26 - |
| 2.2.2.1.2. | Immunmagnetische Isolation von NK-Zellen | - 27 - |
| 2.2.2.2. | Einfrieren und Auftauen von Zellen | - 28 - |
| 2.2.2.3. | Ko-Inkubations-Assay | - 28 - |
| 2.2.2.4. | Durchflusszytometrie (FACS)..... | - 29 - |
| 2.2.2.4.1. | Färbung lebender Zellen..... | - 29 - |
| 2.2.2.4.2. | Färbung von Zelloberflächenmolekülen..... | - 30 - |
| 2.2.2.4.3. | Färbung intrazellulärer Zytokine | - 30 - |
| 2.2.2.5. | Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) | - 31 - |
| 2.2.2.6. | LEGENDplex-Assay | - 31 - |
| 2.2.3. | Molekularbiologische Methoden | - 32 - |
| 2.2.3.1. | RNA-Extraktion | - 32 - |
| 2.2.3.2. | Quantifizierung von RNA..... | - 32 - |
| 2.2.3.3. | Reverse Transkription | - 32 - |
| 2.2.3.4. | Echtzeit-PCR..... | - 33 - |
| 2.2.4. | Statistische Methoden..... | - 34 - |
| 3. | Ergebnisse..... | - 35 - |
| 3.1. | Funktionalität von NK-Zellen | - 35 - |
| 3.2. | IFN- γ -Produktion im Verlauf der Infektion..... | - 40 - |
| 3.3. | Phänotypische Charakterisierung funktionell divergenter NK-Zellen..... | - 42 - |

| | | |
|--------|--|--------|
| 3.4. | Mitochondriale und metabolische Genexpressionsanalyse | - 44 - |
| 3.5. | Mitochondriale Masse und Membranpotenzial im Krankheitsverlauf | - 45 - |
| 3.6. | Bakterielle Translokation bei der HIV-Infektion..... | - 49 - |
| 3.7. | <i>In vitro</i> Kultur für bakterielle Translokation | - 51 - |
| 3.7.1. | Einfluss von LPS auf die Funktion nicht-aufgereinigter NK Zellen | - 51 - |
| 3.7.2. | Expression des LPS-Rezeptors TLR4 auf NK-Zellen | - 52 - |
| 3.7.3. | Einfluss von LPS auf die Funktion aufgereinigter NK-Zellen..... | - 53 - |
| 3.7.4. | Einfluss einer Monozyten-Depletion auf die LPS-induzierte Hemmung der NK-Zell-Funktion | - 54 - |
| 3.7.5. | Analyse der Überstände der LPS-Kultur | - 55 - |
| 4. | Diskussion | - 58 - |
| 4.1. | NK-Zell-Funktionalität bei HIV | - 58 - |
| 4.2. | Phänotypische Charakterisierung..... | - 60 - |
| 4.3. | Mitochondriale Veränderungen von NK-Zellen..... | - 62 - |
| 4.4. | Bakterielle Translokation und LPS-Kultur..... | - 64 - |
| 5. | Zusammenfassung | - 70 - |
| 6. | Abbildungsverzeichnis | - 72 - |
| 7. | Tabellenverzeichnis | - 73 - |
| 8. | Literaturverzeichnis | - 74 - |
| 9. | Danksagung | - 93 - |
| 10. | Veröffentlichungen | - 94 - |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| ADCC | <i>engl.</i> antibody dependent cell-mediated cytotoxicity |
| AIDS | erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>engl.</i> acquired immune deficiency syndrome) |
| BFA | Brefeldin A |
| cART | <i>engl.</i> combined antiretroviral therapy |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> complementary deoxyribonucleic acid) |
| ELISA | Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay |
| FACS | <i>engl.</i> fluorescence activated cell sorting |
| FSC | Vorwärtsstreulicht (<i>engl.</i> forward scatter) |
| HIV | humanes Immundefizienz-Virus |
| I-FABP | <i>engl.</i> intestinal fatty acid binding protein |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| KIR | <i>engl.</i> killer immunoglobulin-like receptors |
| LBP | <i>engl.</i> lipopolysaccharide binding protein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | magnetische Zellsortierung (<i>engl.</i> magnetic activated cell sorting) |
| MCMV | Murines Cytomegalievirus |
| MFI | mittlere Fluoreszenzintensität |
| MTG | MitoTracker Green |
| mTOR | <i>engl.</i> mammalian target of Rapamycin |
| NCR | natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (<i>engl.</i> natural cytotoxicity receptors) |
| NKR | Natürliche-Killerzell-Rezeptoren |
| NK-Zellen | natürliche Killer-Zellen |
| PBMC | periphere mononukleare Blutzellen (<i>engl.</i> peripheral blood mononuclear cells) |

| | |
|------|--|
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction) |
| RFI | relative Fluoreszenzintensität |
| RNA | <i>engl.</i> ribonucleic acid |
| SSC | Seitwärtsstreulicht (<i>engl.</i> side scatter) |
| STAT | <i>engl.</i> signal transducer and activator of transcription |
| TGF | transformierender Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> transforming growth factor) |
| TMRE | Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester |
| TNF | Tumornekrosefaktor |

1. Einleitung

1.1. Die HIV-Infektion

1.1.1. Das Humane Immundefizienz-Virus

Das Humane Immundefizienz Virus ist ein 120 nm großes, behülltes RNA-Virus und gehört taxonomisch zur Gattung der Lentiviren aus der Familie der Retroviren (Freed EO und Martin MA, 2007). Jedes Viruspartikel besteht aus einer Lipidmembran mit Hüllproteinen wie gp120 und gp41. In dieser befindet sich das Capsid-Protein p24, das je zwei einzelsträngige ss(+)-RNA-Stränge enthält (Gelderblom, 1991). Außerdem enthalten im Capsid sind die Enzyme für die Vermehrung, wie Reverse Transkriptase, Integrase und Protease (Engelman und Cherepanov, 2012).

Es sind zwei Arten des Virus bekannt, HIV-1 und HIV-2 (Barré-Sinoussi et al., 1983; Clavel et al., 1986). HIV-1 wird in die Gruppen M, N, O und P unterteilt, die wiederum in verschiedene Subtypen differenziert werden können (Robertson et al., 2000). Je nach geografischer Lage unterscheidet sich das Vorkommen und die Häufigkeit der Arten und der einzelnen Typen. HIV-1 ist das virulentere und daher das weltweit häufigere und in Europa vorherrschende Virus (Gilbert et al., 2003).

1.1.2. Infektion

Weltweit lebten Ende 2018 37,9 Millionen Menschen mit HIV, 1,7 Millionen infizierten sich 2018 neu (WHO, 2020). Die Übertragung erfolgt über Blut oder andere infektiöse Körperflüssigkeiten, wobei das Risiko der Übertragung mit der Viruslast in der Körperflüssigkeit korreliert (Shaw und Hunter, 2012). Der häufigste Übertragungsweg ist die sexuelle Übertragung. Aber auch über die gemeinsame Nutzung verunreinigter Utensilien beim intravenösen Drogenkonsum, Stichverletzungen an kontaminierten Instrumenten, die Gabe von kontaminierten Blutprodukten und die Übertragung von einer infizierten Mutter auf das Kind bei der Geburt oder beim Stillen sind mögliche Infektionswege (Deeks et al., 2015).

Über die Bindung des Oberflächenproteins gp120 an den CD4-Rezeptor erkennt das Virus die Zielzellen. Der CD4-Rezeptor wird hauptsächlich von T-Zellen, aber auch von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Durch die Bindung kommt

es zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren, und es erfolgt eine Bindung an die Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 (Dean et al., 1996; Feng et al., 1996). Durch die Bindung an CD4 und die Korezeptoren tritt bei gp41 eine Konformationsänderung ein. Das Virus penetriert die Zielzelle, sodass das virale Kapsid in das Zytoplasma der Zielzelle gelangt (Murphy und Weaver, 2018). Die viruseigene Reverse Transkriptase wandelt die virale RNA in DNA um. Diese provirale DNA wird zum Zellkern transportiert und durch eine virale Integrase an einer beliebigen Stelle in das Genom der Wirtszelle integriert (German Advisory Committee Blood, 2016). Mit der Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom ist die Infektion der Zelle abgeschlossen, und durch die zelleigene Genomvermehrung kommt es zur persistierenden HIV-Infektion. Nach erfolgter viraler Proteinsynthese entstehen Polyproteinprodukte, die durch die HIV-Protease in ihre funktionellen Bestandteile zerteilt werden, sodass lebenswichtige Proteine für das Virus entstehen (Kohl et al., 1988).

1.1.3. Verlauf der Infektion

Nach der Integration in das Genom der Wirtszelle beginnt die Virusreplikation und der weitere Befall CD4-positiver Zellen. In den ersten Wochen der Infektion, der Akutphase, treten Symptome ähnlich eines grippalen Infekts wie Fieber, Lymphknotenschwellung oder Durchfall auf. In dieser Zeit steigt die Viruslast im Blut stark an, während die Zahl der T-Helferzellen stark abnimmt (Kelley et al., 2007).

In dieser akuten Phase der Infektion sind Untersuchungen besonders interessant, da die direkten Wirkungen des Virus auf verschiedene Zellen untersucht werden können.

Nach der Akutphase der Infektion verringert sich das Krankheitsgefühl, es werden Antikörper gegen das Virus gebildet, die Viruslast sinkt wieder und die Zahl der T-Helferzellen erholt sich. Diese Latenzphase mit geringen Symptomen beträgt ohne Therapie mehrere Monate bis hin zu zehn Jahren (Muñoz et al., 1989).

In dieser Zeit wird das Immunsystem jedoch zunehmend geschwächt. Es kommt zur Störung der zellulären Immunantwort, und diese Immunschwäche führt ohne adäquate Therapie zu AIDS. AIDS ist klinisch gekennzeichnet durch das Auftreten von opportunistischen Infektionen, die durch die enorme Immunschwächung tödlich verlaufen (Deeks et al., 2015).

In der chronischen Phase der Infektion kann untersucht werden, welche Langzeitveränderungen die Infektion zur Folge hat. Da Patienten zu diesem Zeitpunkt

meist eine wirksame Therapie erhalten, sind Effekte weitgehend auf indirekte Mechanismen zurückzuführen. Von besonderem Interesse sind Untersuchungen über einen längeren Verlauf der Infektion, um Einflüsse des Virus auf Veränderungen in Abhängigkeit von der Viruslast und der Dauer der Infektion beurteilen zu können.

1.1.4. Therapie

Um einen fortschreitenden Immundefekt und die Entstehung von AIDS zu verhindern, muss die Vermehrung des Virus durch eine wirksame antiretrovirale Therapie unterdrückt werden. Dafür steht mittlerweile eine Vielzahl an Medikamenten zur Verfügung. Bei diesen handelt es sich um Stoffe, die das Eindringen des Virus in die Zelle verhindern (Entry-Inhibitoren) oder um Inhibitoren für essenzielle Enzyme des Virus, wie der Reversen Transkriptase, Integrase oder Protease (Arts und Hazuda, 2012).

Durch die Benutzung nur eines Medikamentes kann es schnell zur Bildung von Resistenzen kommen. Deswegen wird für die Therapie eine Kombination von mehreren Medikamenten verwendet (*engl.* combined antiretroviral therapy (cART)) (Clavel und Hance, 2004). Auch diese sind regelmäßig auf ihre Wirksamkeit zu überprüfen und gegebenenfalls anzupassen.

Bei regelmäßiger Einnahme kann die Viruslast im Blut dauerhaft unter die Nachweisgrenze von 40 Kopien/ml gesenkt werden. Dabei ist für den Erfolg ein möglichst früher Beginn der Therapie entscheidend. Umso höher die CD4-T-Zellzahl bei Therapiebeginn, desto schneller kann sich diese erholen und desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit für nicht AIDS bedingte Morbiditäten (Kelley et al., 2009). Außerdem ist zu beachten, dass die Therapie nicht heilend ist. Bei richtiger Anwendung wird die Replikation des HI-Virus fast vollständig unterdrückt. Nach Absetzen der Medikamente ist das Virus aber innerhalb kurzer Zeit wieder nachweisbar (Davey et al., 1999).

Seit Einführung der cART hat die AIDS bedingte Mortalität signifikant abgenommen. Im Vergleich zur Normalbevölkerung besteht aber trotz antiretroviraler Therapie eine verkürzte Lebenserwartung (Lohse et al., 2007; The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2008). Einen Grund dafür stellt ein erhöhtes Auftreten von nicht HIV assoziierten Morbiditäten wie Herz-Kreislauf-, Leber- und Nierenerkrankungen dar (El-Sadr et al., 2006). Auch Koinfektionen, wie zum Beispiel mit Hepatitis C, beeinflussen die HIV-

Infektion negativ. Dadurch wird der normale Verlauf der Infektion beschleunigt und die Wirksamkeit einer Therapie verschlechtert sich (Winnock et al., 2004).

1.2. Bakterielle Translokation

Bakterielle Translokation beschreibt das Vorhandensein bakterieller Produkte der physiologischen Darmflora im systemischen Kreislauf bei fehlender Bakteriämie (Sandler und Douek, 2012). Dieses Phänomen wird vor allem bei verschiedenen Erkrankungen mit Störungen der Darmbarriere beobachtet (Kelly et al., 2012; Pastor Rojo et al., 2007; Sandler et al., 2011a). Auch bei der HIV-Infektion wurde die Zunahme bakterieller Bestandteile im Blut bereits vielfach beschrieben (Chege et al., 2011; d'Ettorre et al., 2011; Sandler et al., 2011b). Dabei wird eine Störung der Barrierefunktion der Darmwand (*engl.* leaky gut) durch die HIV-Infektion als Ursache angesehen (Brenchley et al., 2006; Estes et al., 2010; Nazli et al., 2010). Diese Schädigung setzt sich dabei aus verschiedenen Ereignissen an der Schleimhaut des Darms zusammen. Einerseits kommt es bereits früh in der Infektion zu einer schweren Depletion von CD4(+)-Zellen in der Mukosa und zu einer verminderten luminalen IgA-Konzentration durch B-Zell-Dysfunktion (Gordon et al., 2010; Kotler et al., 1984; Sankaran et al., 2008). Diese geringeren IgA-Spiegel und insbesondere der Verlust von CD4(+)-TH17-Zellen erleichtern eine Zunahme von Bakterien und damit eine erhöhte bakterielle Translokation. (Bettelli et al., 2008) Außerdem kommt es aufgrund einer überschießenden Immunreaktion und anhaltender Entzündung in der Mukosa zu gestörter Differenzierung und Apoptose von Enterozyten sowie Zerstörung von Tight Junctions (Estes et al., 2010; Heise et al., 1991; Marchetti et al., 2013). Dadurch entsteht eine Schädigung der Integrität des Darmepithels mit vermehrter bakterieller Translokation. Daraus resultierend sind im Blut von HIV(+) verschiedene Bestandteile wie bakterielle 16s rDNA oder LPS als Zellwandbestandteil von gram(-) Bakterien in erhöhten Konzentrationen nachweisbar (d'Ettorre et al., 2011; Kramski et al., 2011). Diese Erhöhung führt als Reaktion des Körpers zur Steigerung von LBP als Plasmaprotein zur Bindung von LPS und sCD14, welches von Monozyten ebenfalls zur LPS-Bindung produziert wird (Brenchley et al., 2006). Ein weiteres Protein im Blut, das mit bakterieller Translokation assoziiert und bei HIV(+) erhöht ist, ist I-FABP, das nur von Enterozyten produziert und aufgrund von Schädigung ins Blut abgegeben

wird (Sandler et al., 2011b). Sowohl die bakteriellen Bestandteile wie LPS und 16s rDNA, aber auch LBP, sCD14 und I-FABP dienen damit als Marker für bakterielle Translokation. Das Vorhandensein bakterieller Bestandteile im Blut scheint auch Einfluss auf den klinischen Zustand der Patienten zu haben. Erhöhte bakterielle Translokation konnte mit dem Fortschreiten der Krankheit und erhöhter Sterblichkeit bei HIV(+) in Verbindung gebracht werden (Nockher et al., 1994). Die dauerhafte Stimulation des Immunsystems durch bakterielle Bestandteile im Blut führt zu einer persistierenden Aktivierung und es wird angenommen, dass diese chronische Aktivierung einen Grund für die Dysfunktionalität des Immunsystems bei HIV(+)-Patienten darstellt (Ancuta et al., 2008; Brechley et al., 2006). Verschiedene Effekte durch bakterielle Translokation wurden bereits für Monozyten und CD-4-T-Zellen untersucht (Klatt et al., 2013). Für weitere Zellen des Immunsystems fehlen aber Daten über den direkten Einfluss von bakterieller Translokation auf die Funktion dieser Zellen, sodass dies in der vorliegenden Arbeit mit dem Fokus auf natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) untersucht werden soll.

1.3. Natürliche Killer-Zellen

NK-Zellen gehören zu den Lymphozyten und sind wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems. Charakteristisch ist die Expression von CD56 und das Fehlen des CD3-Rezeptors (CD56(+) CD3(-)). NK-Zellen kommen innerhalb von Gewebe, aber auch im Blut vor. Im peripheren Blut sind unter physiologischen Bedingungen 5-15 % der Lymphozyten NK-Zellen, während in Geweben wie der Leber bis zu 45 % NK-Zellen anzutreffen sind (Björkström et al., 2016; Robertson und Ritz, 1990; Whiteside und Herberman, 1994).

Das besondere Merkmal dieser Zellen ist die Fähigkeit, maligne veränderte oder virusinfizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung zu erkennen und zu eliminieren. Damit dienen sie der Eindämmung von Infektionen, bevor über das adaptive Immunsystem eine Immunantwort vermittelt wird. Damit sie keine eigenen, gesunden Zellen zerstören, können sie anhand der Expression von „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) Klasse I körpereigene von fremden, veränderten oder infizierten Zellen unterscheiden. Alle kernhaltigen, körpereigenen und gesunden Zellen besitzen dieses Oberflächenprotein und werden durch hemmende Rezeptoren der NK-Zellen erkannt, sodass keine Aktivierung stattfindet und dadurch eine Selbsttoleranz gegeben ist.

Körperfremde, virusinfizierte oder maligne transformierte Zellen besitzen einen anderen MHC I oder eine verminderte MHC I-Expression und können dadurch von den NK-Zellen erkannt und angegriffen werden (Ploegh, 1998). Dieser Mechanismus wird mit der „Missing self“-Hypothese beschrieben (Ljunggren und Kärre, 1985). Aber die Erkennung des MHC I ist nur ein Teil der Aktivierung von NK-Zellen. Von zentraler Bedeutung ist die Balance zwischen hemmenden und aktivierenden Signalen. Überwiegen die aktivierenden Signale gegenüber den hemmenden und wird die Zelle aktiviert, stehen der NK-Zelle verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Der Hauptmechanismus der NK-Zellen besteht in der natürlichen Zytotoxizität. Dieser wird durch eine Vielzahl von aktivierenden Rezeptoren vermittelt (Moretta et al., 2000; Moretta et al., 2001). Eine Möglichkeit ist die Sezernierung von Perforin und Granzym. Diese sind in den zytotoxischen Granula der NK-Zellen gespeichert, lysieren nach Freisetzung die Zielzelle und leiten deren Apoptose ein (Lowin et al., 1995). Auch über die Hochregulierung der Todesliganden wie TRAIL und FasL, die von NK-Zellen exprimiert werden, ist eine Apoptose der Zielzelle möglich (Degli-Esposti, 1999; Oshimi et al., 1996).

Des Weiteren besitzen NK-Zellen durch die Freisetzung von Zytokinen wie IFN- γ , TNF α und GM-CSF wichtige antivirale und immunregulatorische Funktionen (Cuturi et al., 1989; Smyth et al., 2005). Durch die Produktion und Sezernierung von IFN- γ wird die Entwicklung von T-H1-Zellen gefördert und Makrophagen stimuliert, sodass ihre Phagozytoseaktivität gesteigert wird.

Außerdem stellen NK-Zellen eine Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar (Vivier et al., 2011). Ein Großteil der NK-Zellen besitzt den Fc γ -Rezeptor III (CD16). Dieser kann den Fc-Teil von gebundenen Antikörpern erkennen und die NK-Zelle aktivieren. Diese Form der NK-Zell-Aktivierung wird als ADCC (*engl.* Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) bezeichnet (Wang et al., 2015).

1.3.1. NK-Zell-Subpopulationen

Innerhalb der Gruppe der NK-Zellen werden verschiedene Populationen anhand der Expression von CD56 unterschieden. Etwa 90 % der NK-Zellen im peripheren Blut gehören zu den CD56^{dim}-NK-Zellen. Diese exprimieren CD16 sowie KIR und sind für die natürliche Zytotoxizität zuständig. Eine andere wichtige Gruppe sind die CD56^{bright}-NK-Zellen. Diese sind durch das Fehlen bzw. das geringe Vorhandensein von CD16 und KIR gekennzeichnet. Außerdem besitzen sie nur eine geringe natürliche Zytotoxizität, aber

produzieren Zytokine wie IFN- γ und TNF- α . Sie reagieren stark auf IL-2 oder IL-15 (Cooper et al., 2001). Es wird diskutiert, dass die CD56^{brigh}-NK-Zellen einen unreiferen Phänotyp darstellen und sich später zu CD56^{dim}-NK-Zellen entwickeln (Michel et al., 2016). Diese Einteilung erfasst nicht die komplette Vielfalt der NK-Zellen, jedoch ist sie die derzeit verbreitetste und wichtigste Einteilung von Subpopulationen.

1.3.2. NK-Zell-Rezeptoren

NK-Zellen besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren, die für ihre Funktion entscheidend sind. Rezeptoren können aktivierend oder inhibierend wirken. Das Zusammenspiel aller Signale entscheidet, ob ein Angriff stattfindet oder nicht. Die Rezeptoren von NK-Zellen werden Natürliche-Killerzell-Rezeptoren (NKR) genannt.

Die wichtigsten Gruppen der NKR umfassen die „killer immunoglobulin-like receptors“ (KIR), die „natural cytotoxicity receptors“ (NCR) und die CD94/NKG2-Rezeptoren.

Rezeptoren aus der Gruppe der KIR können je nach Rezeptor aktivierend oder hemmend wirken. Als Liganden wurden bisher HLA-A, -B und -C (Jamil und Khakoo, 2011) sowie HLA-G identifiziert (Rajagopalan und Long, 1999; Rajagopalan und Long, 2005). Zur Gruppe der NCR gehören Rezeptoren wie NKp30, NKp44 oder NKp46. Diese haben alle eine aktivierende Funktion, wobei bisher kaum Liganden bekannt sind (Moretta et al., 2001). Die CD94/NKG2-Rezeptoren dienen der Erkennung von HLA-E (Braud et al., 1998).

Jede NK-Zelle exprimiert nur einen Teil der Rezeptoren, sodass nicht alle identisch sind. Die Rezeptorzusammensetzung auf der Oberfläche der NK-Zellen verändert sich im Laufe ihrer Entwicklung. Die Rezeptoren können dadurch in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, wie zum Beispiel Reifungsmarker (CD27, CD57, CD127, KLRG1), Aktivierungsmarker (CD69, CD38, NKG2D) oder Erschöpfungsmarker (PD1) (Abel et al., 2018; Bi und Tian, 2017).

Auch chronische Infektionen oder Tumore können zu Veränderungen der Rezeptorausstattung der Zellen führen (O'Connor et al., 2007; Stojanovic et al., 2013; Vitale et al., 2014).

1.3.3. Metabolismus von NK-Zellen

Zur Gewährleistung eines sicheren Schutzes vor Infektionen und malignen Veränderungen benötigen die Lymphozyten und die dazugehörigen NK-Zellen nach ihrer

Aktivierung für die anstehende Zellproliferation große Mengen an Energie und damit einen gut funktionierenden Stoffwechsel. Dabei muss beachtet werden, dass metabolische Anstrengungen unter erschwerten Umweltbedingungen, wie limitierte Sauerstoff- und Nährstoffangebote, aufzubringen sind. Vor diesem Hintergrund kommen dem Zellmetabolismus und der Funktion der Mitochondrien in den letzten Jahren immer mehr Bedeutung und Aufmerksamkeit für eine suffiziente Funktion der Immunabwehr zu (Pearce et al., 2013).

Die ATP-Produktion in der Zelle erfolgt über die zwei Hauptstoffwechselwege Glykolyse und oxidative Phosphorylierung. Mithilfe der Mitochondrien kann das Maximum an Energie in Form von ATP aus dem bei der Glykolyse entstandene Pyruvat generiert werden. Da in diesen Zellorganellen außerdem die oxidative Phosphorylierung stattfindet, spielen Mitochondrien eine entscheidende Rolle im Zellstoffwechsel (Martínez-Reyes und Chandel, 2020). Analysen des Stoffwechsels haben gezeigt, dass die Gesamtpopulation von NK-Zellen aus dem peripheren Blut niedrige Raten an Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung besitzen. Diese können durch Stimulation mit Zytokinen deutlich gesteigert werden (Keating et al., 2016). Allerdings führte die chronische Stimulation mit IL-15 zu einem metabolischen Defekt und zur Erschöpfung der NK-Zellen (Felices et al., 2018). Innerhalb der Gruppe der NK-Zellen unterschieden sich CD56^{dim}- und CD56^{bright}-Zellen auch hinsichtlich ihres Metabolismus. CD56^{bright}-NK-Zellen exprimieren nach Stimulation mit IL-2 und IL-12 plus IL-15 höhere Konzentrationen des Glukosetransporters GLUT1 und zeigen auch eine erhöhte Aufnahme von Glukose. Insgesamt werden sie als metabolisch aktiver beschrieben. Der erhöhte Energiebedarf ist möglicherweise mit der größeren Produktion von IFN- γ zu erklären (Keating et al., 2016). Bei der gleichen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte oxidative Phosphorylierung für eine suffiziente Zytotoxizität und IFN- γ -Produktion in NK-Zellen notwendig ist. Andere Autoren haben gezeigt, dass eine verstärkte Glykolyse und erhöhte mTORC1-Aktivität für eine funktionierende IFN- γ -Produktion nötig sind (Donnelly et al., 2014). Eine Hemmung der Glykolyse resultiert außerdem in einer verminderten IFN- γ -Produktion (Chang et al., 2013). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die IFN- γ -Produktion durch den zellulären Stoffwechsel reguliert wird. Da die Glykolyse und oxidative Phosphorylierung relevant für die Produktion von IFN- γ sind, bilden funktionierende Mitochondrien die Voraussetzung für eine suffiziente Produktion von IFN- γ . Für die HIV-Infektion sind bereits Störungen der

Mitochondrien beschrieben worden (Jacotot et al., 2001; Macho et al., 1999). Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Dysfunktionalität von NK-Zellen bei HIV durch mitochondriale Störungen verursacht wird.

1.3.4. NK-Zellen bei HIV-Infektion

NK-Zellen gehören nicht zu den Zellen, die von HIV befallen werden. Obwohl sie teilweise den CD4-Rezeptor und die Korezeptoren besitzen, konnte bisher keine Infektion Ex-vivo nachgewiesen werden. Nur *in vitro* konnten bisher Infektionen erzeugt werden (Bernstein et al., 2009). Trotzdem führt die Infektion mit dem Virus zu einer Beeinträchtigung der NK-Zellen.

Zu Beginn der Infektion nimmt die Gesamtzahl der NK-Zellen zunächst zu (Alter et al., 2005). Im Verlauf der Infektion sinkt die Anzahl der NK-Zellen, während die Frequenz der CD56^{bright}-NK-Zellen zunimmt (Kaczmarek et al., 2017). Außerdem findet sich bei HIV-infizierten Personen eine neue dysfunktionale Population von CD3(-)-, CD56(-)- und CD16(+)-Zellen (Mavilio et al., 2005).

Nicht nur die Expression von CD56 verändert sich in der virämischen Phase der Infektion. Auch viele andere NKR werden beeinflusst. Dabei kommt es zu einer vermehrten Expression von inhibitorischen Rezeptoren, während die Anzahl an aktivierenden NK-Zellrezeptoren abnimmt (Kottlil et al., 2004; Maria et al., 2003; Mavilio et al., 2003). Diese Effekte hemmen die Eindämmung der Infektion und fördern somit ein Fortschreiten der Erkrankung. Unter erfolgreicher Therapie mit cART kommt es zu einer teilweisen Rückbildung der phänotypischen Veränderungen, dennoch kann die NK-Zell-Aktivierung auch noch bei avirämischen Patienten nachgewiesen werden (Leeansyah et al., 2010; Lichtfuss et al., 2012).

Auch funktionell kommt es zu Veränderungen der NK-Zellen. HIV-infizierte CD4-T-Zellen können über die Sekretion des löslichen NKG2D-Liganden die Expression von NKG2D auf NK-Zellen reduzieren (Nolting et al., 2010). Dadurch wird die NKG2D-vermittelte Zytotoxizität reduziert und NK-Zellen können so ihrer Funktion der Immunabwehr nur eingeschränkt nachkommen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen von HIV-Patienten eine gestörte Zytokin-Sekretion aufweisen und besonders eine verminderte INF- γ -Sekretion besitzen (Goeser et al., 2016).

Es wird vermutet, dass die phänotypischen und funktionellen Veränderungen der NK-Zellen aufgrund einer chronischen Dauerstimulation durch die ständige Aktivierung des

Immunsystems erfolgen und nicht auf direkte Einwirkungen von HIV auf die NK-Zellen zurückzuführen sind. Jedoch konnten bisher nicht die genauen Ursachen für die funktionelle Dysfunktion von NK-Zellen bei der HIV-Infektion geklärt werden. Daher sollen mögliche Ursachen mit dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die HIV-Infektion stellt auch nach Jahrzehnten ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Seit der Einführung der antiretroviralen Therapie hat die AIDS-bedingte Mortalität stark abgenommen. Trotzdem besitzen HIV(+)-Menschen eine verkürzte Lebenserwartung. Diese ist auf eine anhaltende Dysfunktion des Immunsystems und daraus resultierenden nicht AIDS-assoziierten Erkrankungen zurückzuführen.

NK-Zellen besitzen bei der primären Abwehr von Infektionen eine entscheidende Funktion. Obwohl sie selbst nicht vom HI-Virus befallen werden, führt eine Infektion des Körpers zu einer Beeinträchtigung der NK-Zell-Funktion. Es konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen von HIV-Patienten eine gestörte Zytokinsekretion aufweisen (Goeser et al., 2016). Bisher ist aber nicht bekannt, welche Auslöser und Umstände zu dieser Störung der NK-Zellen führen. Daher soll in dieser Arbeit anhand folgender Fragestellungen näher untersucht werden, welche zugrundeliegenden Ursachen die Dysfunktionalität von NK-Zellen bei der HIV-Infektion hervorrufen:

- 1) Können Subpopulationen von NK-Zellen mit ausgeprägter funktioneller Störung charakterisiert werden und anhand des Phänotyps Rückschlüsse auf die Ursache der Schädigung gezogen werden?
- 2) Sind mitochondriale Störungen ursächlich an der Dysfunktionalität von NK-Zellen bei HIV(+) beteiligt?
- 3) Gibt es einen Zusammenhang der Dysfunktionalität von NK-Zellen mit bakterieller Translokation und wenn ja, welche Mechanismen führen dazu?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

| | |
|---|------------------------------------|
| Autoklav | Tuttnauer, Wesel |
| CO ₂ -Inkubator | Forma Scientific, Frankfurt a.M. |
| Durchflusszytometer FacsCanto II | BD, Heidelberg |
| Durchflusszytometer Fortessa | BD, Heidelberg |
| Heizblock TCR100 | Roth, Karlsruhe |
| Inverses Lichtmikroskop Typ DMI | Leitz, Köln |
| Invitrogen Qubit-3-Fluorometer | Fisher Scientific, Carlsbad (USA) |
| Kühlzentrifuge 5810R | Eppendorf, Hamburg |
| Lichtmikroskop | Leitz, Köln |
| LightCycler™-Instrument | Roche, Mannheim |
| MACS-Separator | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Mikrozentrifuge | Hettich, Tuttlingen |
| Multipette plus | Eppendorf, Hamburg |
| Neubauer-Zählkammer | Brand, Wertheim |
| Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Pipetus | Hirschmann, Eberstadt |
| Plattenschüttler Typ MTS 2 | IKA-Labortechnik, Staufen |
| Sterilbank BSB4A | Flow Laboratories, Meckenheim |
| Vortexer Vibrofix VF1 | IKA-Labortechnik, Staufen |
| Zellsorter FACSAria III | BD, Heidelberg |
| Zentrifuge AvantiJ-15 | Beckmann, Krefeld |

2.1.2. Verbrauchsmaterial

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Auslaufpipetten (5, 10, 25 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Einweg-Handschuhe | Ansell, Brussel, Belgien |
| Kryoröhrchen (2 ml) | Sarstedt, Numbrecht |
| Light-Cycler™ Platten | Roche, Mannheim |
| MACS-Säulen | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Mikrotiterplatte 96-Well | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Pasteurpipetten | Brand, Wertheim |
| Pipettenspitzen | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Polypropylen-Röhrchen (15, 50 ml) | Greiner-Bio One, Frickenhausen |
| Polystyren-FACS-Röhrchen | Sarstedt, Numbrecht |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| S-Monovette für Heparinblut (9 ml) | Sarstedt, Numbrecht |
| Zellkulturplatten (24, 48, 96-Well) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellsieb (100 µm) | BD, Heidelberg |

2.1.3. Reagenzien

| | |
|--|-----------------------------|
| Ampuwa (steriles Aqua dest.) | Fresenius, Bad Homburg |
| ARC reaction Beads | Invitrogen, Carlsbad (USA) |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Brefeldin A (BFA) | Enzo, Lörrach |
| Chloroform | Roth, Karlsruhe |
| Comp Beads blank | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS) | Pan-Biotech, Aidenbach |
| Ethanol, absolut | Merck, Darmstadt |
| FcR-Block Reagent | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Biochrom, Berlin |
| HS-Nuclease | BioSite, Täby |
| Ispopropanol | AppliChem, Darmstadt |
| Lipopolysaccharid (LPS) | Innaxon, Tewkesbury |

| | |
|--|---|
| Mito Tracker Green (MTG) | Invitrogen, Carlsbad (USA) |
| Oligomycin A | Cayman Chemical, Michigan |
| Pancoll human | Pan-Biotech, Aidenbach |
| Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung | PAA, Cölbe |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4 | Apotheke des Universitätsklinikums Bonn |
| RPMI 1640 Medium | Fisher Scientific, Carlsbad (USA) |
| TMRE | Cayman, Michigan |
| Trypanblau | Merck, Darmstadt |
| Ultra Comp eBeads | Invitrogen, Carlsbad (USA) |
| Zombie Aqua | BioLegend, San Diego |

2.1.4. Primer

| Gen Name | Sequenz vorwärts (5' → 3') | Sequenz rückwärts (5' → 3') |
|----------|----------------------------|-----------------------------|
| AMPK | TTGAAACCTGAAAATGTCCTGCT | GGTGAGCCACAACCTTGTTCCTT |
| ATP5D | GACGGCACCACCTCCAAATA | GGTACGCACCGCCTACTC |
| ATP5J | GGACTGAGTGCAAGAATCAGC | GCCTGGGGTTTTTCGATGAC |
| ATP5J2 | AAAATGGCGTCAGTTGGTGAG | GGTAATCCCCGAGATGCTCC |
| ATP5PO | AACCCAAAGTGGCTGCTTCT | CAAGGTACCTCTCCGCGATG |
| COX6A1 | GACCCGAGTTCATCGCCTAC | GCAAAGGGATGGGAGACCAG |
| COX7A2L | TCCAGAAAGCTGATGGTGTGC | CCAGTCCTCTGCAGCCTAAC |
| COXB5 | ATGGGTCCAGTCCCTTCTTT | GCTCCATGGCATCTGGA |
| CPT1A | TTCAGTTCACGGTCACTCCG | TGACCACGTTCTTCGTCTGG |
| CYCS | ATGGTCTCTTTGGGCGGAAG | GGCAGTGGCCAATTATTACTION |
| EEF1A1 | CTTTGGGTGCGCTTTGCTGTT | CCGTTCTTCCACCACTGATT |
| FASN | AAGGACCTGTCTAGGTTTGATGC | TGGCTTCATAGGTGACTTCCA |
| FIS1 | CCAAGAGCACGCAGTTTGAG | GACGTAATCCCGCTGTTCCCT |
| GAPDH | GAAGGTGGTGAAGCAGGC | CTCCTTGGAGGCCATGTG |
| MRPS11 | ACACCAAGTTCAGCACACAGA | GTGGGATTGGGGTGTTGTCT |
| mTOR | AGAAGCACGATTTCTAGCCAGT | AGTAGACCTCGCCTTATTTCCA |

| | | |
|---------|------------------------|------------------------|
| NDUFA12 | TTTGGCATCGTTGGCTTCAC | ATTGTTCTGGGGTGCCAGTC |
| NDUFA6 | AAGCTACTTCTACCGCCAGC | GAAATCCTTTGGCCTTGGCG |
| PDH1 | TGGTAGCATCCCGTAATTTTGC | ATTCGGCGTACAGTCTGCATC |
| PFK L | GCTGGGGCGGCACTATCATT | TCAGGTGCGAGTAGGTCCG |
| PHB2 | TACGAGGAACGAGTGTTGCC | GCACAATTTTCTGCCGCTGT |
| PKM1/2 | ATGTCGAAGCCCCATAGTGAA | TGGGTGGTGAATCAATGTCCA |
| SIRT3 | GACATTCGGGCTGACGTGAT | ACCACATGCAGCAAGAACCTC |
| SLC25A5 | GGCCACATCCCTGTGTTTTG | TAGGCGGCTCGGTAGATGAT |
| SLC2A1 | GGAATCGTCGTTGGCATCCT | CGAAGCTTCTTCAGCACACTC |
| TFAM | CTTATAGGGCGGAGTGGCAG | CAGCTTTTCTGCGGTGAAT |
| TIMM23 | AGAACATGGCCTGGTCCAAA | TATCCCTCGAAGACCACCTGT |
| TOX | CCCCATGAACCATAATGG CCT | CCCAGCATATTGGAGACTGTGA |
| UQCRC1 | TGATGTTGGCAGCCGTTTTG | GGTCAAGTCTGCACGAGACA |

2.1.5. Antikörper

| Antikörper | Klon | Isotyp | Hersteller |
|--------------------|--------|---|-----------------------------|
| Anti-CD127 BV605 | A01905 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-CD14 Biotin | TÜK4 | Maus, IgG _{2ak} | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-CD14 FITC | M5E2 | Maus, IgG _{2ak} | BioLegend, San Diego |
| Anti-CD14 VioGreen | REA599 | rekombinantes menschliches IgG ₁ | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-CD16 APC H7 | B73.1 | Maus, IgG _{1k} | BD, Heidelberg |
| Anti-CD16 FITC | 3G8 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-CD16 PerCP | 3G8 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-CD19 VioGreen | REA675 | rekombinantes menschliches IgG ₁ | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-CD20 VioGreen | LT20 | Maus, IgG _{1k} | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-CD27 PE | 0323 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-CD3 APCfire | SK7 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |

| | | | |
|-----------------------------|----------------|--|--------------------------------------|
| Anti-CD3 VioGreen | REA613 | rekombinantes menschliches IgG ₁ | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-CD34 VioGreen | AC136 | Maus, IgG _{2a} | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-CD38 PE-Cy7 | HIT2 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-CD45 BUV 395 | HI30 | Maus, IgG _{1k} | BD, Heidelberg |
| Anti-CD45RA APCCy7 (Vio) | REA562 | rekombinantes menschliches IgG ₁ | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-CD56 APC | HCD56 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-CD56 BUV563 | NCAM16.2 | Maus, IgG _{2B,k} | BD, Heidelberg |
| Anti-CD57 FITC | HCD57 | Maus, IgM | BioLegend, San Diego |
| Anti-CD69 AF700 | FN50 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-CD94 AF700 | MM0181-5F26 | Maus, IgG ₁ | Novus, Wiesbaden |
| Anti-CD95 BV711 | DX2 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-IFN-γ BV421 | 4S.B3 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-IFN-γ PE | 25723 | Maus, IgG _{2B} | R&D, Wiesbaden |
| Anti-KIR3DL1/DL2 APC | REA970 | rekombinantes menschliches IgG ₁ | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-KLRG1 PE/Dazzle 594 | 14C2A07 | Maus, IgG _{2ak} | BioLegend, San Diego |
| Anti-NKG2A PE | REA110 | rekombinantes menschliches IgG ₁ | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-NKG2C AF488 | 134591 | Maus, IgG ₁ | R&D, Wiesbaden |
| Anti-NKG2D BV711 | 1D11 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-NKp44 BV786 | p44-8 | Maus, IgG _{1k} | BD, Heidelberg |
| Anti-NKp46 APC | 9E2 | Maus, IgG _{1k} | BioLegend, San Diego |
| Anti-NKp46 BV786 | 9E2/Nkp46 | Maus, IgG _{1k} | BD, Heidelberg |
| Anti-PD1 PE-Cy7 | eBioJ105(J105) | Maus, IgG _{1k} | Fisher Scientific, Carlsbad (USA) |

| | | | |
|-------------------------------------|--------|--|--------------------------------|
| Anti-TCR α/β VioGreen | REA652 | rekombinantes menschliches IgG ₁ | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| Anti-TLR4 PE | HTA125 | Maus, IgG _{2ak} | BioLegend, San Diego |
| Anti-TRAIL BV605 | RIK-2 | Maus, IgG ₁ | BD, Heidelberg |

2.1.6. Zytokine

| Zytokin | Hersteller | Dosierung |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------|
| Rekombinantes humanes IL-2 | ImmunoTools, Friesoythe | 125 U/ml |
| Rekombinantes humanes IL-12 | ImmunoTools, Friesoythe | 20 ng/ml 10 ng/ml |
| Rekombinantes humanes IL-15 | ImmunoTools, Friesoythe | 50 ng/ml 25 ng/ml |

2.1.7. Kits

| | |
|--|-----------------------------|
| DuoSet ELISA (I-FABP und LBP) | R&D, Wiesbaden |
| Fixation/Permeabilization Solution Kit | BD, San Jose |
| LEGENDPlex Human Inflammation Panel 1 | BioLegend, San Diego |
| Mojo Streptavidin Nanobeads | BioLegend, San Diego |
| NK Cell Isolation Kit | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| QuantiTec Reverse Transcription Kit | Qiagen, Hilden |
| SPLIT RNA Extraction Kit | LEXOGEN, Wien |

2.1.8. Puffer und Medien

| <u>RPMIc</u> | <u>MACS-Puffer</u> | <u>Einfrriermedium</u> |
|----------------------------|--------------------|------------------------|
| RPMI Medium | PBS | 10 % FCS |
| 10 % FCS | 0,5 % BSA | 10 % DMSO |
| 10 U/ml Penicillin | 2 mM EDTA | 80 % RPMI |
| 10 μ g/ml Streptomycin | | |

2.1.9. Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen peripherer NK-Zellen wurden pro Proband 30-40 ml heparinisieretes Vollblut durch die Immunologische Ambulanz der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Bonn oder von Gesunden zu Kontrollzwecken vom Blutspendedienst des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt.

Alle Patienten wurden über die Verwendung des Blutes zu wissenschaftlichen Zwecken aufgeklärt und haben eine Einverständniserklärung unterschrieben. Die Untersuchungen sind auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt worden. Die Studien sind von der Ethikkommission der Universität Bonn bewilligt worden (Ethikvotum 04/16). Detaillierte Patientencharakteristika für die verschiedenen Experimente sind in den Tabellen 1-3 aufgeführt.

Tab. 1: Patientencharakteristik für die IFN- γ -Produktion.

Für die Untersuchung der INF- γ -Produktion wurden Gesunde (n=9) und HIV(+)-Patienten (n=18) verwendet. Die Gruppe der HIV(+) wurde unterteilt in die Gruppe mit CD4-Zellzahl >400/ μ l (n=9) und CD4-Zellzahl <400/ μ l (n=9).

| | HIV(+) CD4 >400/ μ l | HIV(+) CD4 <400/ μ l | Gesunde |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Anzahl | 9 | 9 | 9 |
| Männliches Geschlecht ^{a)} | 7 (77,8 %) | 7 (77,8 %) | 7 (77,8 %) |
| Alter (Jahre) ^{b)} | 47,4 (33-59) | 51,8 (33-64) | 27,6 (21-41) |
| HIV-Status | | | |
| HIV-Last (Kopien/ml) ^{d)} | <40 (100 %) | <40 (100 %) | - |
| CD4-Zellen/ μ l ^{b)} | 1001,3 (452-1563) | 269,6 (182-387) | n.a. ^{c)} |
| cART ^{a)} | 9 (100 %) | 9 (100 %) | - |
| Infektionsdauer (Jahre) ^{b)} | 9,1 (2-19) | 7,75 (1-16) | - |

^{a)} Anzahl der Fälle (Anzahl / Gesamtmenge in %) ^{b)} Mittelwert (Wertebereich) ^{c)} n.a. – nicht analysiert ^{d)} Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze von 40 Kopien/ml (% von Gesamtmenge)

Tab. 2: Patientencharakteristik für die Genanalyse.

Für die Genanalyse wurden Gesunde (n=11) und HIV(+)-Patienten mit einer CD4-Zellzahl >400/µl (n=13) und CD4-Zellzahl <400/µl (n=10) einbezogen.

| | HIV(+) CD4 >400/µl | HIV(+) CD4 <400/µl | Gesunde |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Anzahl | 13 | 10 | 11 |
| Männliches Geschlecht ^{a)} | 11 (84,6 %) | 9 (90 %) | 8 (72 %) |
| Alter (Jahre) ^{b)} | 48,8 (29-67) | 47,2 (28-64) | 31 (21-49) |
| HIV-Status | | | |
| HIV-Last (Kopien/ml) ^{d)} | <40 (100 %) | <40 (100 %) | - |
| CD4-Zellen/µl ^{b)} | 711,5 (413-1191) | 288,7 (140-381) | n.a. ^{c)} |
| cART ^{a)} | 13 (100 %) | 10 (100 %) | - |
| Infektionsdauer (Jahre) ^{b)} | 13 (4-27) | 5,5 (0,5-11) | - |

^{a)} Anzahl der Fälle (Anzahl / Gesamtmenge in %) ^{b)} Mittelwert (Wertebereich) ^{c)} n.a. – nicht analysiert ^{d)} Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze von 40 Kopien/ml (% von Gesamtmenge)

Tab. 3: Patientencharakteristik für den Verlauf der HIV-Infektion.

Für die Experimente der phänotypischen Charakterisierung, der IFN-γ-Produktion im Verlauf der Infektion und der Messung mitochondrialer Marker wurden die gleichen Proben verwendet. Dabei handelte es sich um Gesunde (n=14) und HIV(+)-Patienten (n=12), die zu den Zeitpunkten 0, 12 und 48 Wochen nach Bekanntwerden der Infektion Blut zur Verfügung gestellt haben. Aufgrund unzureichender Zellmengen wurden die Experimente der phänotypischen Charakterisierung und die Messung der IFN-γ-Produktion im Verlauf der Infektion nur mit n=8 Patienten und n=8 Gesunden durchgeführt.

| | HIV(+) | Gesunde |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Anzahl | 12 | 14 |
| Männliches Geschlecht ^{a)} | 12 (100 %) | 10 (71,4 %) |
| Alter (Jahre) ^{b)} | 35,1 (24-56) | 35,1 (21-52) |
| HIV-Status Woche 0 | | |
| HIV-Last (Kopien/ml) ^{b)} | 4447731,3 (9740-10000000) | - |
| CD4-Zellen/µl ^{b)} | 500,9 (184-1124) | n.a. ^{c)} |
| cART ^{a)} | 0 (0 %) | - |
| HIV-Status Woche 12 | | |
| HIV-Last (Kopien/ml) ^{b)} | 909108,8 (<40-10000000) | - |
| CD4-Zellen/µl ^{b)} | 795,8 (184-1356) | - |
| cART ^{a)} | 12 (100 %) | - |
| HIV-Status Woche 48 | | |
| HIV-Last (Kopien/ml) ^{d)} | <40 (100 %) | - |
| CD4-Zellen/µl ^{b)} | 872,5 (454-1539) | - |
| cART ^{a)} | 12 (100 %) | - |

^{a)} Anzahl der Fälle (Anzahl / Gesamtmenge in %) ^{b)} Mittelwert (Wertebereich) ^{c)} n.a. – nicht analysiert ^{d)} Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze von 40 Kopien/ml (% von Gesamtmenge)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur und zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zellsuspension mit einer Trypanblau-Lösung (0,25 % in destilliertem Wasser) angefärbt. Der Farbstoff kann nur bei einer nicht mehr intakten Zellmembran in das Zytoplasma der Zelle eindringen und dieses blau färben. Anhand dieser Färbung können tote Zellen erkannt und ausgeschlossen werden. Die Zählung erfolgt lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dabei handelt es sich um einen Objektträger, auf den vier Großquadrate, unterteilt in jeweils 16 Kleinquadrate, eingraviert sind. Ein Großquadrat besitzt eine Fläche von 1 mm² und eine Kammertiefe von 0,1 mm und hat somit ein Kammervolumen von 0,1 µl. Anhand der Zellzahl eines Großquadrates und der Verwendung eines Verdünnungsfaktors kann mit folgender Formel die Zellkonzentration errechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4.$$

2.2.1.2. LPS-Kultur

Für die Untersuchung der Auswirkungen von bakterieller Translokation auf die Funktionalität von NK-Zellen wurde eine *in vitro* Kultur mit der Zugabe von LPS durchgeführt. Dafür wurden PBMC oder NK-Zellen über drei Tage bei 37 °C in RPMI-Medium oder mit der Zugabe von 1 ng/ml oder 100 ng/ml hochreinem LPS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 6 h mit IL-12 (10 ng/ml) und IL-15 (25 ng/ml) stimuliert und durchflusszytometrisch die Funktionalität gemessen. Die Überstände der Kulturen wurden eingefroren und für weitere Experimente verwendet.

2.2.2. Immunologische Methoden

2.2.2.1. Zellisolation

2.2.2.1.1. Isolation peripherer Blutlymphozyten

Zur Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus heparinisiertem Blut wurde das von Böyum etablierte Verfahren angewendet (Böyum, 1968). Dabei erfolgt eine Trennung der Blutbestandteile mittels Dichtegradientenzentrifugation. Das synthetische Polysaccharid Ficoll dient dabei als Trennschicht. Durch die höhere Dichte von

Erythrozyten und Granulozyten sammeln sich diese nach der Zentrifugation am Boden des Gefäßes. Darüber befindet sich eine Schicht mit der Ficoll-Lösung. Oberhalb davon befindet sich das Serum mit den Thrombozyten, während die Lymphozyten und Monozyten in der trüben Grenzschicht zwischen Ficoll-Lösung und Serum vorkommen.

Durchführung:

- heparinisiertes Blut 1:2 mit PBS verdünnen
- 15 ml Ficoll-Lösung in 50 ml Falcon geben
- vorsichtig mit verdünntem Blut überschichten
- Zentrifugation bei 1000 g für 15 min ohne Bremse
- PBMC enthaltende Phase mit Pasteurpipette abnehmen und in neues 50 ml Falcon überführen
- Falcon mit PBS auffüllen
- Zentrifugation bei 500 g für 10 min
- Überstand verwerfen und Pellet in PBS resuspendieren, auf 50 ml auffüllen
- Zentrifugation bei 350 g für 10 min
- Überstand verwerfen, Pellet resuspendieren, Zellzahl bestimmen

2.2.2.1.2. Immunmagnetische Isolation von NK-Zellen

NK-Zellen wurden aus PBMC durch immunmagnetische Separation isoliert (MACS). Bei diesem Verfahren werden bestimmte Zellen über Oberflächenrezeptoren mit einem Primärantikörper, der an Biotin gekoppelt ist, markiert. An den Primärantikörper bindet ein magnetisch aktiver Sekundärantikörper. Anschließend durchläuft die Zellsuspension eine Säule in einem starken Magnetfeld und die markierten Zellen verbleiben in diesem Magnetfeld, während die nicht markierten Zellen ungehindert hindurchfließen und aufgefangen werden. So können zwei Arten der Separation unterschieden werden. Bei der Positiv-Isolation wird die zu isolierende Zellpopulation mit spezifischen Antikörpern markiert und somit von den unmarkierten Zellen getrennt. Bei der Negativ-Selektion werden alle Zellen, die nicht zur Zielpopulation gehören, mit einem Antikörpergemisch markiert. Dadurch durchlaufen nur die gesuchten Zellen das Magnetfeld, während alle anderen darin verbleiben. Für diese Arbeit wurden zur Isolation von NK-Zellen Negativ-Selektionen mit Kits der Firma Miltenyi durchgeführt. Für die Positiv-Isolationen zur

Entfernung von Monozyten aus PBMC wurden an Biotin gekoppelte CD14-Antikörper und Mojo-Streptavidin Nanobeads verwendet.

2.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Damit für die Experimente Zellen von genügend Probanden zeitgleich vorhanden waren, wurden die Zellen isoliert und anschließend eingefroren. Dafür wurden PBMC oder isolierte NK-Zellen in 500 µl Einfriermedium resuspendiert und in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde bei -80 °C eingefroren und nach 2 Tagen bei -150 °C gelagert. Die eingefrorenen Zellen in den Kryoröhrchen wurden an den entsprechenden Versuchstagen für 1 Minute in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Der Inhalt der Kryoröhrchen wurde in ein mit 9,5 ml angewärmten RPMI Medium, versetzt mit 1 µl Benzoyl-L-glutamin, vorbereitetes Gefäß mit 15 ml Volumen überführt. Anschließend wurden die Zellen für zehn Minuten bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert und danach für sieben Minuten bei 350 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml RPMIc Medium gelöst, die Zellen gezählt und anschließend für die jeweiligen Experimente verwendet.

2.2.2.3. Ko-Inkubations-Assay

Die funktionellen Untersuchungen von NK-Zellen wurden anhand der Sekretion von IFN- γ nach sechsstündiger Ko-Inkubation mit den Zytokinen IL-12 (20 ng/ml) und IL-15 (50 ng/ml) durchgeführt.

IFN- γ ist ein intrazellulär produziertes Zytokin. Um dieses nachzuweisen, muss die Sekretion verhindert werden. Aus diesem Grund erfolgt die Zugabe von Brefeldin A (BFA), wodurch der sekretorische Proteintransport gehemmt wird und das produzierte IFN- γ in der Zelle akkumuliert.

Durchführung:

- Übertragung der NK-Zellen in Zellkulturplatte (96-well)
- Zugabe von IL-2 (125 U/ml)
- Inkubation über Nacht
- Zugabe der Zytokine
- nach 1 h: Zugabe BFA (5 µg/ml)
- nach 6 h: Färbung für Durchflusszytometrie

2.2.2.4. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse vieler Zellen in kurzer Zeit bezüglich Größe, Granularität und markierter Antigene. Dafür werden die Zellen durch einen Flüssigkeitsstrom vereinzelt und passieren so nacheinander einen oder mehrere Laser. Abhängig von den Eigenschaften der Zelle wird das Licht des auf die Zelle treffenden Lasers unterschiedlich stark gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *engl.* Forward Scatter) ist dabei proportional zur Größe und das Seitwärtsstreulicht (SSC, *engl.* Side Scatter) proportional zur Granularität der Zelle. Außerdem ist die Detektion oberflächlicher Antigene oder intrazellulärer Proteine möglich. Dafür werden an Fluorochrom gekoppelte Antikörper verwendet. Das Fluorochrom wird durch den Laser angeregt, absorbiert Licht und emittiert dieses direkt wieder. Das für jedes Fluorochrom spezifisch emittierte Licht wird von Detektoren gemessen, die das Signal verstärken und in elektronische Signale umwandeln. Umso stärker das markierte Molekül exprimiert wird, desto mehr Licht wird von der Zelle emittiert.

Für diese Arbeit wurde für die durchflusszytometrischen Analysen das FCAS Canto II (bis zu 8 Fluorochrome) und das FACS Fortessa (bis zu 18 Fluorochrome) genutzt. Durchflusszytometrische Messungen, bei denen die Zellen zusätzlich voneinander getrennt und gesammelt werden können, werden als „Sorten“ bezeichnet (Fluorescent Activated Cell Sorting). Zum Sorten der Zellen wurde für diese Arbeit der Cell Sorter Aria III verwendet. Für die Auswertung und grafische Aufarbeitung der Messdaten wurde die Software FlowJo 10 genutzt. Die Auswertung erfolgte durch das Setzen von „Gates“ auf Populationen, die ein bestimmtes Molekül exprimieren, angegeben als Prozent positiver Zellen. Außerdem wurde für die Auswertung der mitochondrialen Marker die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) berechnet und diese mit einer Negativkontrolle zur relativen Fluoreszenzintensität (RFI) nach folgender Formel standardisiert:

$$\text{RFI} = \text{MFI (Rezeptor)} - \text{MFI (Negativkontrolle)} / \text{MFI (Negativkontrolle)}.$$

2.2.2.4.1. Färbung lebender Zellen

Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen beim FACS, wurden die Zellen vor der Oberflächenfärbung mit „Zombie Aqua“ gefärbt. Dieser Farbstoff reichert sich nicht in lebenden, dafür aber in toten Zellen an, sodass die positiv gefärbten Zellen ausgeschlossen werden können. Für die Färbung wurde 1 µl „Zombie Aqua“ in 500 µl

PBS gelöst und anschließend 50 µl pro 200 µl Medium zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Schüttler gefärbt, mit PBS gewaschen und bei 350 g sieben Minuten lang zentrifugiert.

2.2.2.4.2.Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Dafür wurden Antikörperlösungen von 1-8 µl je nach Antikörper in ein Volumen von 100 µl und einer Zellkonzentration von maximal 10^7 Zellen/ml verwendet. Anschließend erfolgte die Färbung in Zellkulturplatten oder Polystyren-FACS-Röhrchen 15 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Schüttler.

Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Proben mit PBS gewaschen, bei 350 g für sieben Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert.

2.2.2.4.3.Färbung intrazellulärer Zytokine

Für die intrazelluläre Färbung von IFN-γ ist die Zugabe von BFA zur Ko-Kultur wichtig, damit sich das synthetisierte IFN-γ in der Zelle akkumuliert. Damit die Antikörper gegen IFN-γ in das Zellinnere gelangen können, muss die Zellmembran permeabilisiert werden. Dafür wurde das Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilisation Kit benutzt.

Durchführung:

- Lebend/Tot-Färbung
- Oberflächenfärbung
- Zugabe von 100 µl PermFix pro Well
- Inkubation für 30 min, 4 °C
- Zellen mit 100 µl BD WashBuffer 1:10 waschen
- zentrifugieren 600 g, 4 °C
- 1,5 µl IFN-γ PE AK pro Well in WashBuffer färben
- Inkubation 25 min, 4 °C
- Zellen mit 150 µl PBS waschen
- zentrifugieren bei 500 g, 4 °C
- Überstand abwerfen, Zellen in 100 µl PBS resuspendieren und in FACS Tubes überführen

2.2.2.5. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Die Untersuchung von Plasma auf Marker für bakterielle Translokation wurde in dieser Arbeit mittels ELISA durchgeführt. Dabei wird ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) für das zu untersuchende Protein auf einer Mikrotiterplatte fixiert. Das gesuchte Protein bindet an den Primärantikörper und ein an Biotin gekoppelter Sekundärantikörper, der ebenfalls spezifisch für das Protein ist, bildet einen Komplex mit dem Primärantikörper und dem Protein. Mithilfe des Enzyms Peroxidase erfolgt der Nachweis des ausgebildeten Antigen-Antikörper-Komplexes. Peroxidase ist dafür an Streptavidin gekoppelt, das an Biotin bindet. Anschließend erfolgt durch Zugabe des Enzymsubstrates eine enzymatische Reaktion, die zu einem Farbumschlag führt. Dieser wird photometrisch bei 450 nm gemessen und korreliert mit der Menge des gebundenen Proteins. Anhand einer gleichzeitig durchgeführten Verdünnungsreihe wird eine Standardkurve erstellt, mit der die Proteinkonzentration bestimmt werden kann.

In dieser Arbeit wurden DuoSet ELISA für I-FABP und LBP der Firma R&D verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.6. LEGENDplex-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer „Sandwich“-Immunassay benutzt, um den gewonnenen Überstand der LPS-Kulturen auf die darin enthaltenen sekretierten Zytokine zu untersuchen. Dazu wird ein Mix aus verschiedenen Antikörpern, gebunden an kleine Kügelchen (Beads), für die zu untersuchenden Proteine zu einer Probe gegeben. Die spezifischen Antikörper binden ihr Protein und ein zweiter, Biotin-gekoppelter Antikörper wird hinzugegeben. Dieser ist ebenfalls spezifisch für das Antigen und bildet zusammen mit dem ersten Antikörper und dem Protein eine Art Sandwich aus. Biotin wird nun von Streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) gebunden, das als Farbstoff für die durchflusszytometrische Messung dient. Die Bindung von SA-PE an den Sandwich-Komplex führt dazu, dass die Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Proteinmenge steht. Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Messung werden die Beads nach ihrer Größe und interner Fluoreszenz differenziert. Dadurch können spezifische Populationen für die zu untersuchenden Proteine unterschieden und deren Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Gleichzeitig zum Probenansatz wird eine Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration des Proteins (Standard) durchgeführt. Anhand der Intensität der Standardreihe kann die Konzentration des Proteins in der Probe bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde das LEGENDplex Kit „Human Inflammation Panel 1“ von BioLegend verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Vorgaben des Herstellers und für die Auswertung wurde die „LEGENDplex Data Analysis Software 8.0“ verwendet.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA-Extraktion

Die Isolation von RNA aus NK-Zellen erfolgte mit dem „SPLIT RNA Extraction Kit“ der Firma Lexogen. Dieses kombiniert die Trennung von DNA und RNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und die selektive Bindung von RNA an mit Silica beschichteten Oberflächen. Hierbei werden die Zellen zuerst in Isolationspuffer (IB) lysiert. Anschließend wird die wässrige Lösung mit dem Zelllysat in ein Gefäß mit einem Phasengel überführt. Hier erfolgt weiter die Zugabe von saurem Phenol, Chloroform und saurem Puffer (AB) nach Anleitung des Herstellers. Durch Zentrifugieren bei 12000 g werden durch das Phasengel die organische und die wässrige Phase voneinander getrennt. In der unteren, der organischen Phase, befinden sich nun die DNA, Proteine und Salze, während sich in der oberen, der wässrigen Phase, die RNA befindet. Die obere Phase wird nun in ein neues Gefäß überführt, die RNA wird mit Isopropanol ausgefällt und über eine mit Silica beschichtete Säule laufen gelassen. Dabei bindet die RNA selektiv an die mit Silica beschichtete Oberfläche. Zum Abschluss wird die RNA mit 30 µl Aufbewahrungspuffer (SB) von der Säule eluiert.

2.2.3.2. Quantifizierung von RNA

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem Qubit-Fluorometer von ThermoFisher. Hierbei werden 1 µl der Probe mit Fluoreszenzfarbstoffen gemischt. Diese sind spezifisch für RNA und emittieren nur, wenn sie an RNA gebunden haben. Anhand der Fluoreszenz und des Volumens errechnet das Qubit-Fluorometer die RNA-Konzentration.

2.2.3.3. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die isolierte RNA mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese ist deutlich stabiler als RNA und ist außerdem Voraussetzung für die Durchführung einer Echtzeit-PCR. Die reverse

Transkription wurde mit dem „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ nach Anleitung des Herstellers Qiagen vorgenommen.

2.2.3.4. Echtzeit-PCR

Zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Sie gliedert sich in drei Abschnitte, die mehrfach wiederholt werden. Zuerst wird die DNA erhitzt und so die doppelsträngige DNA in Einzelstränge getrennt. Anschließend erfolgt eine Abkühlung auf die spezifische Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer. Zum Schluss synthetisiert die DNA-Polymerase vom Primer beginnend den komplementären DNA-Strang.

In dieser Arbeit wurde die quantitative Echtzeit-PCR mit dem LightCycler 2.0 System der Firma Roche Diagnostics genutzt. Für die Untersuchung wurden spezifische Primer verwendet, deren Wirksamkeit mittels Gelelektrophorese getestet wurde. Es wurde cDNA verwendet, da diese das Expressionsprofil der Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion widerspiegelt und sich somit zur Expressionsanalyse von Genen eignet. Die Echtzeit-PCR ermöglicht bereits während der Amplifikation sowohl eine Detektierung als auch eine Quantifizierung des Produkts. Dies gelingt durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der in die doppelsträngigen DNA-Produkte eingebaut wird. Kontinuierlich wird während der Reaktion in Echtzeit photometrisch die Fluoreszenzintensität gemessen. Infolge einer hohen Anzahl an Templates führen stärker exprimierte Gene zu einem schnelleren Anstieg der Fluoreszenzintensität. Zum Vergleich der Proben wird der Beginn der exponentiell ansteigenden Amplifikation der PCR-Produkte genutzt.

Durchführung:

Reaktionsansatz bei 4 °C:

- 5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x)
- 1 µl Primermix (0,5 µM)
- 1 µl Template cDNA
- 3 µl destilliertes Wasser

PCR-Programm:

| | |
|----------------------------|--|
| Initiale Denaturierung: | 95 °C für 10 min |
| 50 Zyklen: | 95 °C für 15 s, 55 °C für 30 s, 72 °C für 30 s |
| Detektion der Fluoreszenz: | am Ende des 72 °C Schritts |

Schmelzkurvenanalyse:

Denaturierung: 95 °C für 10 s

Anlagerung der Sonden: 35 °C für 15 s

Schmelzkurve: 40 °C – 80 °C (Heizrate 0,2 °C/s) bei kontinuierlicher
Messung der Fluoreszenz

2.2.4. Statistische Methoden

Die statistischen Analysen in dieser Arbeit wurden mit der Software GraphPad Prism 8.4.2 durchgeführt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse sind in Balkendiagrammen dargestellt, aus denen sich die Einzelwerte, der Mittelwert und der Standardfehler ablesen lassen.

Für die statistische Analyse von mehr als zwei Stichproben wurden folgende Tests verwendet:

- Vergleich von ungepaarten Werten, die normalverteilt sind: Brown-Forsythe und Welch-ANOVA Test
- Vergleich von ungepaarten Werten, die nicht normalverteilt sind: Kruskal-Wallis Test
- Vergleich von gepaarten Werten, die normalverteilt sind: ANOVA Test

Die statistischen Berechnungen wurden jeweils für multiples Testen durch Kontrolle der Falschentdeckungsrate mit dem zweistufigen Test nach Benjamini, Krieger und Yekutieli korrigiert.

Für die Untersuchung von Korrelationen wurde lineare Regression verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Funktionalität von NK-Zellen

Einen Hauptmechanismus von NK-Zellen zur frühen Aktivierung des Immunsystems und Eliminierung virusinfizierter Zellen stellt die Sekretion von IFN- γ dar (Ikeda et al., 2002). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Funktionalität von NK-Zellen anhand der Sekretion von IFN- γ gemessen.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits ein Defekt der IFN- γ -Produktion von IL-2 stimulierten NK-Zellen bei HIV(+)-Patienten mit chronischer HIV-Infektion nachgewiesen werden (Goeser et al., 2016). Um zu untersuchen, ob es sich dabei um einen globalen, Stimulus-unabhängigen Defekt handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit mit IL-12/ IL-15 ein anderer Stimulus verwendet.

Für die Untersuchung der Funktionalität wurde zunächst eine Kinetik der IFN- γ -Produktion bestimmt. Dafür wurden isolierte NK-Zellen von gesunden Kontrollen und chronischen HIV(+) mit CD4-Zellzahl $>400/\mu\text{l}$ und $<400/\mu\text{l}$ für 0, 2, 4 und 6 h mit IL-12 (10 ng/ml) und IL-15 (25 ng/ml) stimuliert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und am FACS hinsichtlich ihrer INF- γ -Produktion untersucht. Für die Messung der INF- γ -Produktion wurde das Gating-Schema, wie exemplarisch in Abb. 1 gezeigt, verwendet.

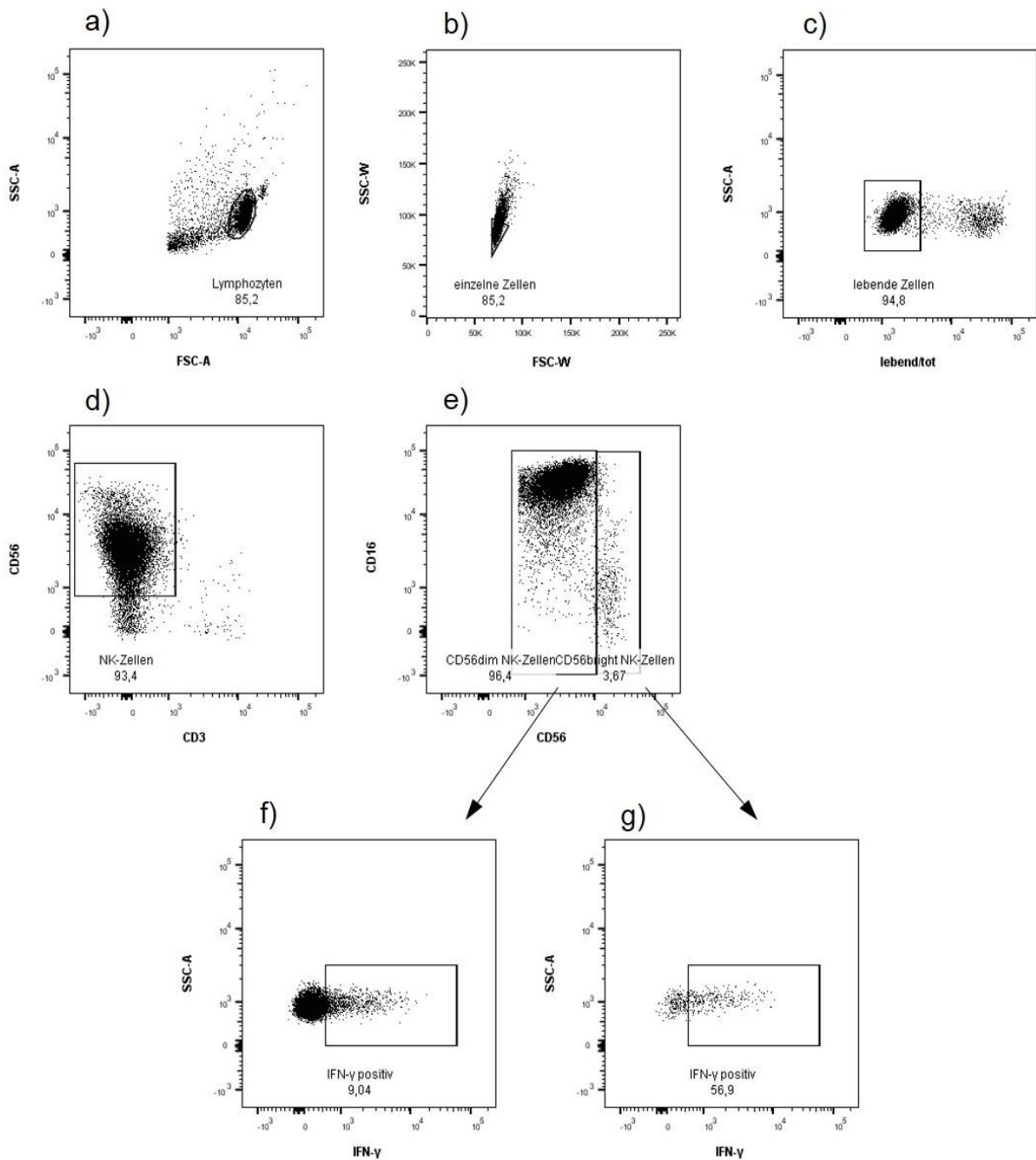


Abb. 1: Gating-Strategie zur Analyse der IFN- γ -Produktion.

Vorgereinigte NK-Zellen wurden mit Zombie Aqua und Antikörpern gegen CD56, CD3, CD16 und IFN- γ gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Dotplots zeigen repräsentativ die Gating-Strategie. a) Identifikation der Lymphozyten mit SSC-A und FSC-A. b) Bestimmung der einzelnen Zellen mittels FSC-W und SSC-W. c) Bestimmung der lebenden Zellen mit Zombie gegen SSC-A. d) Identifizierung von NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻) mittels CD3 und CD56. e) Differenzierung von CD56^{bright}- und CD56^{dim}-NK-Zellen mit CD56 gegen CD16. f) & g) Bestimmung der IFN- γ -Produktion mit IFN- γ gegen SSC-A in CD56^{dim}- und CD56^{bright}-Populationen.

In diesen Untersuchungen war schon nach 2 h eine deutliche Produktion von IFN- γ zu sehen, die sich quantitativ bis zum Messpunkt nach 6 h nicht mehr relevant änderte (Abb. 2). Nach 6 h zeigt sich bei weiterhin hoher IFN- γ -Produktion die geringste Standardabweichung und damit die beste Voraussetzung, um Unterschiede festzustellen. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche die Zeit von 6 h für die Messung der IFN- γ -Produktion genutzt.

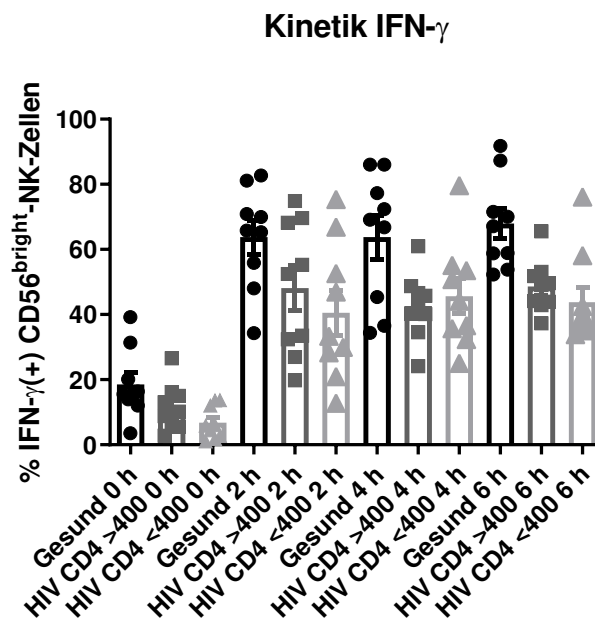


Abb. 2: Kinetik der INF- γ -Produktion der CD56^{bright}-NK-Zellen.

Für die Evaluierung für den besten Messpunkt der IFN- γ -Produktion wurden vorgereinigte NK-Zellen von Gesunden (n=9), Patienten mit HIV mit CD4 >400/ μ l (n=9) und CD4 <400/ μ l (n=9) über Nacht mit IL-2 vorstimuliert und dann für 0, 2, 4 oder 6 h mit IL-12 und IL-15 stimuliert. Anschließend wurde in Doppelbestimmung durchflusszytometrisch die IFN- γ -Produktion der CD56^{bright}-NK-Zellen gemessen.

Anschließend wurde die NK-Zell-IFN- γ -Produktion bei Patienten mit einer chronischen HIV-Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht. Hierbei fand sich bei CD56^{bright}-NK-Zellen von HIV-Patienten unter wirksamer Therapie eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant gestörte IFN- γ -Produktion. Dies war sowohl bei HIV-Patienten mit CD4-Zellzahl >400/ μ l (arithmetisches Mittel \pm Standardfehler 67,93 % \pm 4,7 % vs. 48,59 % \pm 2,7 %; p=0,003) als auch <400/ μ l (67,93 % \pm 4,7 % vs. 43,76 % \pm 4,7 %; p=0,006) zu beobachten. Die Abnahme zeigte sich auch bei den CD56^{dim}-NK-Zellen

zwischen Gesund und HIV >400/ μ l (29,53 % \pm 6,8 % vs. 10,77% \pm 2,0 %; p=0,025) sowie zwischen Gesund und HIV <400/ μ l (29,53 % \pm 6,8 % vs. 7,02 % \pm 1,7 %; p=0,01). In der Gesamtbetrachtung aller NK-Zellen ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen Gesund und HIV >400/ μ l (31,96 % \pm 6,6 % vs. 12,99 % \pm 2,0 %; p=0,022) und zwischen Gesund und HIV <400/ μ l (31,96 % \pm 6,6 % vs. 11,04 % \pm 2,3 %; p=0,014).

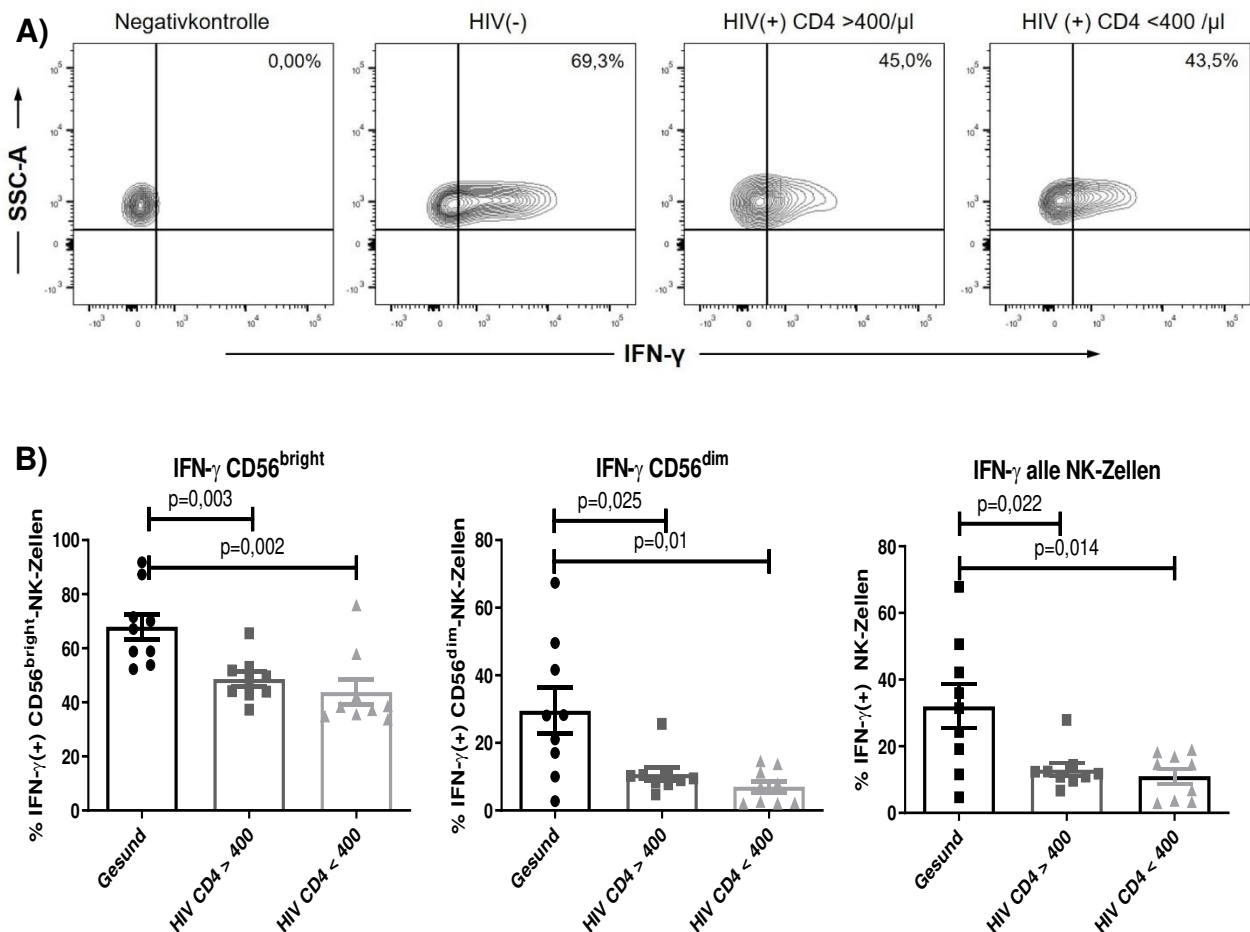


Abb. 3: IFN- γ -Produktion von NK-Zellen.

A) Gezeigt ist exemplarisch die durchflusszytometrische Auswertung der IFN- γ -Produktion von HIV(-) und HIV(+) mit CD4 >400/ μ l und <400/ μ l von CD56^{bright}-NK-Zellen. B) Die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen von Gesunden (n=9), HIV mit CD4 >400/ μ l (n=9) und CD4 <400/ μ l (n=9) wurden nach Stimulation mit IL-2 über Nacht und anschließender sechsständiger Stimulation mit IL-12 und IL-15 in Doppelbestimmung durchflusszytometrisch ermittelt. Zu sehen ist die prozentuale Anzahl positiver NK-Zellen. Die Ergebnisse wurden für ungepaarte und normalverteilte Werte berechnet.

Die Experimente wurden alle mit Zellen durchgeführt, die mit IL-2 voraktiviert wurden. Zur Überprüfung, ob der Effekt der verminderten INF- γ -Produktion nur bei Zellen auftritt, die mit IL-2 vorstimuliert wurden, wurden die gleichen Experimente auch ohne Stimulation mit IL-2 durchgeführt. Auch hier fand sich eine verminderte Funktionalität bei HIV(+)-Patienten (Abb. 4). Dabei zeigte sich bei den CD56^{bright}-NK-Zellen ebenfalls eine signifikante Abnahme zwischen Gesund und HIV >400/ μ l (44,63 % \pm 6,7 % vs. 19,41 % \pm 1,9 %; p=0,007) sowie Gesund und HIV <400/ μ l (44,63 % \pm 6,7 % vs. 17,60 % \pm 3,9 %; p=0,005). Die Ergebnisse der CD56^{dim}-NK-Zellen wiesen bei zwischen Gesund und HIV >400/ μ l mit p=0,06 kein signifikantes Ergebnis auf, während sich zwischen Gesund und HIV <400/ μ l ein Unterschied zeigte (10,93 % \pm 3,7 % vs. 1,62 % \pm 0,4 %; p=0,04). Auch in der Betrachtung der Gesamt-NK-Zellen fand sich ein Unterschied zwischen Gesund und HIV >400/ μ l (13,91 % \pm 3,8 % vs. 3,64 % \pm 0,7 %; p=0,032) und ebenfalls zwischen Gesund und HIV <400/ μ l (13,91 % \pm 3,8 % vs. 3,41 % \pm 1,0 %; p=0,029).

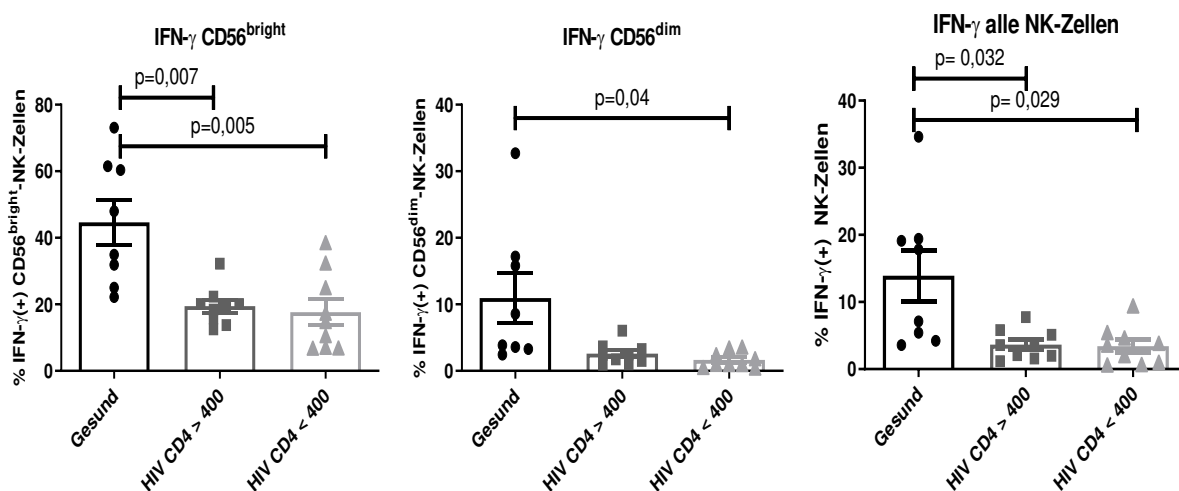


Abb. 4: IFN- γ -Produktion von NK-Zellen ohne IL-2-Stimulation.

Die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen von Gesunden (n=8), HIV mit CD4 >400/ μ l (n=9) und CD4 <400/ μ l (n=9) wurden nach sechsständiger Stimulation mit IL-12 und IL-15 durchflusszytometrisch bestimmt. Zu sehen ist die prozentuale Anzahl IFN- γ -positiver NK-Zellen.

Die Ergebnisse wurden für ungepaarte und normalverteilte Werte berechnet.

3.2. IFN- γ -Produktion im Verlauf der Infektion

Um mehr Erkenntnisse über die Störung der NK-Zellfunktion zu erhalten, und hierbei insbesondere zu klären, ob sich eine NK-Zell-Dysfunktion schon in der frühen Phase der HIV-Infektion findet, wurden Proben von HIV-Patienten über den Verlauf von 48 Wochen nach Bekanntwerden der Infektionen zu den Zeitpunkten Woche 0, Woche 12 und Woche 48 gesammelt. Die Patienten waren zum ersten Zeitpunkt therapienaiv und wurden anschließend mittels cART behandelt.

Von diesen Proben wurde ebenfalls die Produktion von IFN- γ bestimmt. Dabei zeigte sich eine Abnahme der IFN- γ -Produktion bei den HIV(+) im Vergleich zu Gesund. Dieser Unterschied fand sich in allen untersuchten NK-Zell-Populationen. Bereits direkt nach Bekanntwerden der Infektion ab Woche 0 konnte die Dysfunktionalität in der Gruppe der CD56^{bright} (Gesund vs. HIV, Woche 0: 64,8 % \pm 4,9 % vs. 47,8 % \pm 3,9 %; p=0,018), der CD56^{dim} (Gesund vs. HIV, Woche 0: 28,3 % \pm 4,2 % vs. 15,7 % \pm 4,0 %; p=0,05) und auch für alle NK-Zellen (Gesund vs. HIV, Woche 0: 30,8 % \pm 4,0 % vs. 17,2 % \pm 3,9 %; p=0,028) nachgewiesen werden. Diese Verminderung der INF- γ -Produktion fand sich in Woche 12 ebenfalls für die CD56^{bright} (Gesund vs. HIV, Woche 12: 64,8 % \pm 4,9 % vs. 44,0 % \pm 5,9 %; p= 0,019), CD56^{dim} (Gesund vs. HIV, Woche 12: 28,3 % \pm 4,2 % vs. 14,2 % \pm 2,4 %; p=0,015) und für alle NK-Zellen (Gesund vs. Woche 12: 30,8 % \pm 4,0 % vs. 15,1 % \pm 2,4 %; p=0,006). Auch unter effektiver Therapie nach 48 Wochen zeigte sich keine Erholung der Funktionalität. Für die CD56^{bright} (Gesund vs. HIV, Woche 48: 64,8 % \pm 4,9 % vs. 37,9 % \pm 3,4 %; p=0,0006), CD56^{dim} (Gesund vs. HIV, Woche 48: 28,3 % \pm 4,2 % vs. 11,4 % \pm 2,4 %; p=0,005) sowie für alle NK-Zellen (Gesund vs. HIV, Woche 48: 30,8 % \pm 4,0 % vs. 12,4 % \pm 2,5 %; p=0,002) wurden signifikant verminderte Mengen von IFN- γ bei HIV(+) gemessen (Abb. 5).

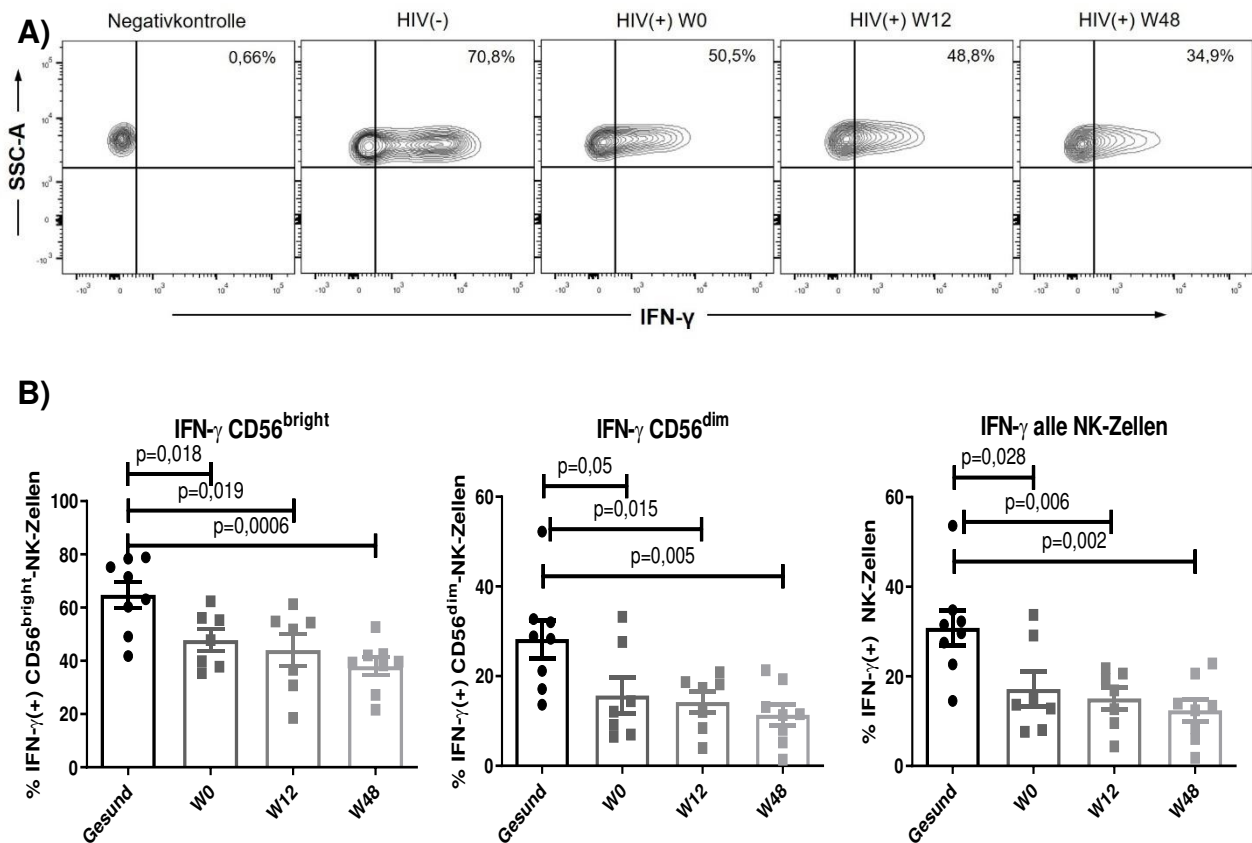


Abb. 5: IFN- γ -Produktion im Verlauf der HIV-Infektion.

A) Gezeigt ist exemplarisch die durchflusszytometrische Auswertung der IFN- γ -Produktion von HIV(-) und HIV(+) zu den Zeitpunkten Woche 0 (W0), Woche 12 (W12) und Woche 48 (W48) nach Bekanntwerden der Infektion von CD56^{bright}-NK-Zellen.

B) Isolierte NK-Zellen von Gesunden (n=8) und HIV-Patienten (n=8) an den Wochen 0, 12, 48 nach Bekanntwerden der Infektion wurden über Nacht mit IL-2 stimuliert und anschließend 6 h mit IL-12 und IL-15 stimuliert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die IFN- γ -Produktion gemessen. Dargestellt ist die prozentuale Anzahl positiver NK-Zellen.

Die Ergebnisse wurden für ungepaarte und normalverteilte Werte berechnet.

3.3. Phänotypische Charakterisierung funktionell divergenter NK-Zellen

Anschließend wurde untersucht, ob spezifische NK-Zell-Subpopulationen mit einer besonders ausgeprägten funktionellen Störung zwischen HIV(+) und Gesund zu identifizieren sind, und wodurch diese Zellen phänotypisch charakterisiert sind. Hierfür wurden mittels Multiparameter-Durchflusszytometrie verschiedene NK-Zell-Rezeptoren hinsichtlich ihrer Expression auf CD56^{bright}-NK-Zellen und die IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit IL-2 über Nacht und anschließend mit IL-12 und IL-15 untersucht.

Bei den Rezeptoren handelte es sich um typische Reifungs- und Differenzierungsmarker (CD27, CD57, CD127, KLRG1, CD45, CD45RA), Aktivierungsmarker (CD69, CD38, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKp44, NKp46) und Erschöpfungsmarker (PD1). Weiterhin wurden folgende andere Marker untersucht: KIR, TRAIL, CD94, CD95.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass die Populationen von CD56^{dim}- und CD56^{bright}-NK-Zellen beide von der funktionellen Störung betroffen sind (siehe Abb. 5). Des Weiteren konnten keine Subpopulationen mit besonders stark ausgeprägten funktionellen Störungen anhand der untersuchten Rezeptoren identifiziert werden. Auch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Rezeptoren zwischen den Gruppen der IFN- γ -negativen und IFN- γ -positiven Zellpopulationen. Exemplarisch werden im Folgenden die Ergebnisse für CD27, CD57, PD1 und KLRG1 gezeigt (Abb. 6).

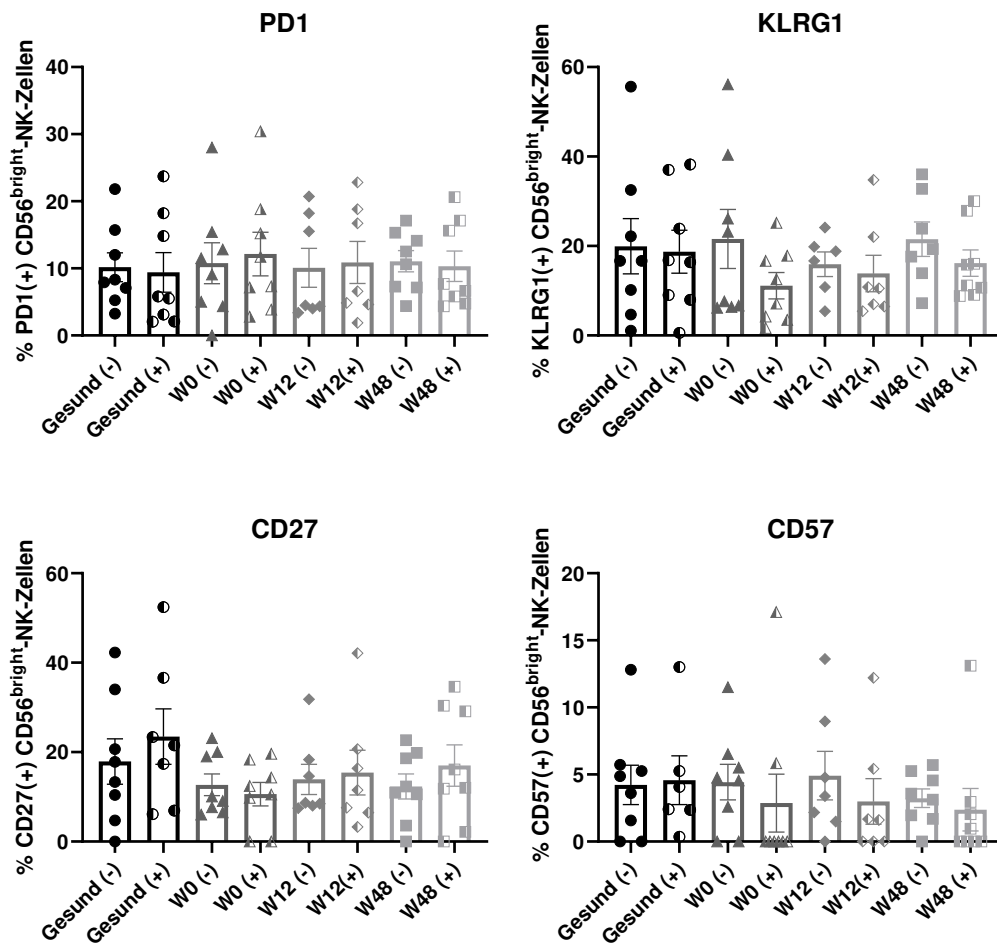


Abb. 6: Phänotypische Charakterisierung von NK-Zell-Populationen.

In den Abbildungen sind exemplarisch die Analysen der Expression von NK-Zell-Markern auf IFN- γ (+)- (mit (+) dargestellt) und IFN- γ (-)-Populationen (mit (-) dargestellt) der CD56^{bright}-NK-Zellen gezeigt. Dafür wurden Gesunde (n=8) und HIV(+), (n=8) im Verlauf von Woche 0 (W0) über Woche 12 (W12) bis Woche 48 (W48) auf Unterschiede der Rezeptorexpression in den genannten Populationen untersucht.

3.4. Mitochondriale und metabolische Genexpressionsanalyse

Arbeiten der vergangenen Jahre belegen die Wichtigkeit des Metabolismus für die Funktion der Zelle und zeigen, dass eine Störung des Zellmetabolismus auch eine Einschränkung der Zellfunktion zur Folge hat (Pearce et al., 2013). Der Prozess der IFN- γ -Produktion ist mit einem hohen Energiebedarf verbunden. Da diese benötigte Energie über metabolische und mitochondriale Stoffwechselwege erzeugt wird, wurden nun wichtige mitochondriale und metabolische Gene hinsichtlich ihrer Expression in Gesunden sowie chronischen HIV(+) unter effektiver Therapie mit CD4-Zellzahl $>400/\mu\text{l}$ und $<400/\mu\text{l}$ untersucht.

Dabei zeigte sich, dass mitochondriale und Metabolismus-assoziierte Gene in der Gruppe der HIV(+) im Verhältnis zu den HIV(-) verändert sind (Abb. 7). Diese Veränderungen äußern sich als Dysregulationen, die als verstärkte oder verminderte Expression der Gene auftreten. Die Unterschiede finden sich sowohl in der Gruppe der CD56^{bright}- als auch bei den CD56^{dim}-NK-Zellen.

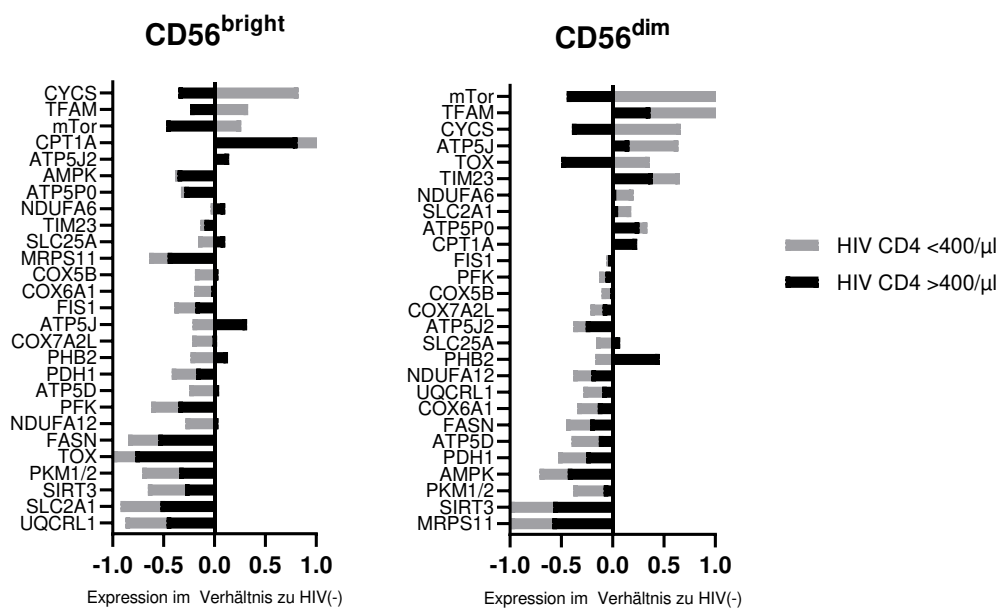


Abb. 7: Genexpressionsanalyse wichtiger Stoffwechsel-Gene.

Für die Analyse wurden NK-Zellen von Gesunden (n=11) und HIV(+) mit CD4 $>400/\mu\text{l}$ (n=12) und $<400/\mu\text{l}$ (n=10) in die CD56^{bright}- und CD56^{dim}-Population gesortet und anschließend die Genexpression der dargestellten Gene in Doppelbestimmung im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen *EEF1A1* und *GAPDH* mittels qPCR gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse der HIV(+) mit CD4 $>400/\mu\text{l}$ und $<400/\mu\text{l}$ im Verhältnis zu den HIV(-) aufgetrennt in CD56^{bright} und CD56^{dim}.

3.5. Mitochondriale Masse und Membranpotenzial im Krankheitsverlauf

Durch die Ergebnisse der Genanalyse wurde die Hypothese, dass eine mitochondriale Schädigung als Ursache für die Störung der IFN- γ -Produktion eine Rolle spielt, verstärkt. Zur weiteren Untersuchung dieser Annahme wurden wichtige Parameter der Mitochondrien gemessen.

Bei der Messung der mitochondrialen Masse wurde der Farbstoff MitoTracker Green verwendet. Bei den Experimenten zeigte sich eine Abnahme der mitochondrialen Masse der CD56^{bright}-NK-Zellen bereits zu Beginn der Infektion und eine weitere Abnahme in den folgenden Wochen (Gesund vs. HIV, Woche 0: $1511 \pm 170,7$ vs. $899,4 \pm 155,8$; $p=0,014$, Gesund vs. HIV, Woche 12: $1511 \pm 170,7$ vs. $581,4 \pm 62,9$; $p=<0,0001$ und Gesund vs. HIV, Woche 48: $1511 \pm 170,7$ vs. $534,9 \pm 67,35$; $p=<0,0001$) (Abb. 8). Bei den CD56^{dim}-NK-Zellen und in der Gruppe aller NK-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der mitochondrialen Masse festgestellt werden.

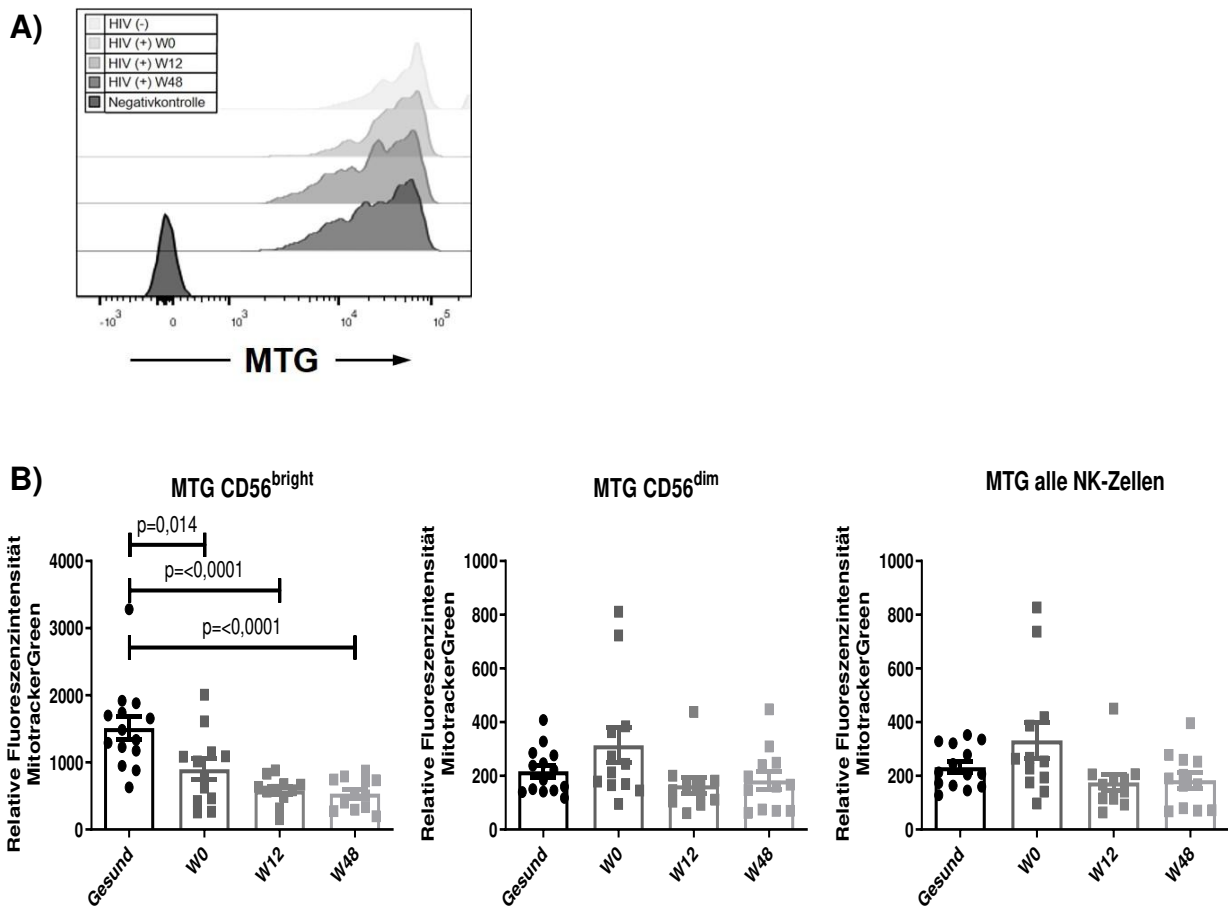


Abb. 8: Mitochondriale Masse im Verlauf der Infektion.

A) Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse der MTG-Expression als Histogramm. B) Isolierte NK-Zellen von Gesunden ($n=14$) und HIV-Patienten ($n=12$) in den Wochen 0,12 und 48 (W0, W12 und W48) nach klinischem Bekanntwerden der Infektion wurden nach Stimulation mit IL-2 über Nacht mit MitoTracker Green gefärbt und die relative Fluoreszenzintensität (RFI) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse wurden für ungepaarte und normalverteilte Werte berechnet.

Für die Messung des Membranpotenzials der Mitochondrien wurden die Zellen mit dem Farbstoff TMRE angefärbt. Hierbei zeigte sich ebenfalls im Verlauf der ersten 48 Wochen nach Bekanntwerden der Infektion eine Abnahme in der Population der CD56^{bright}-NK-Zellen. Bei den CD56^{bright}-NK-Zellen fand sich kein signifikanter Unterschied des mitochondrialen Membranpotenzials zwischen Gesund und Woche 0. Ab Woche 12 zeigte sich bei den NK-Zellen von HIV(+) jedoch ein signifikant reduziertes Membranpotenzial der Mitochondrien (Gesund vs. HIV, Woche 12: $7,3 \pm 0,8$ vs. $4,3 \pm 0,5$; $p=0,003$ und Gesund vs. HIV, Woche 48: $7,3 \pm 0,8$ vs. $3,9 \pm 0,4$; $p=0,0009$). In der Population der

CD56^{dim}-NK-Zellen und der gesamten NK-Zellen fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 9).

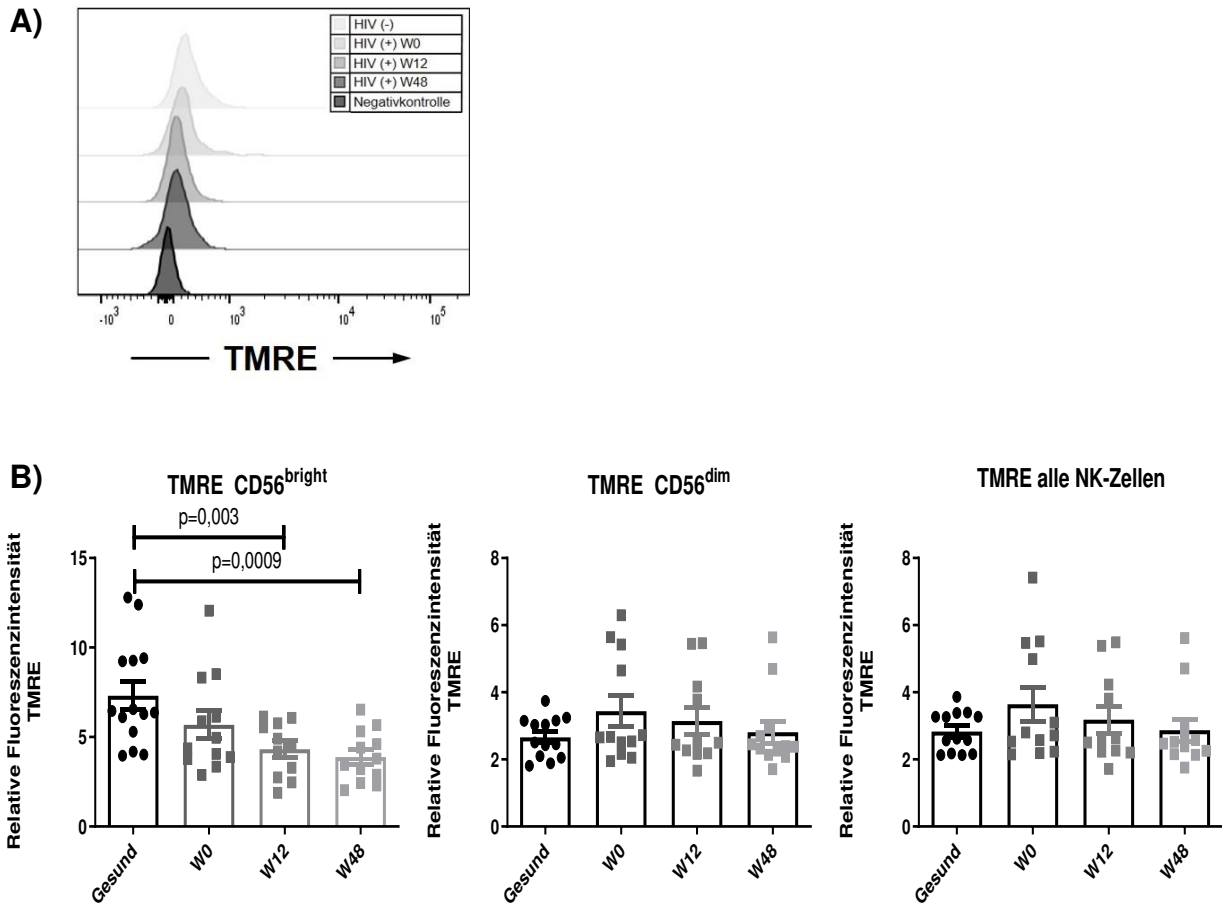


Abb. 9: Mitochondriales Membranpotenzial im Verlauf der Infektion.

A) Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse der TMRE-Expression als Histogramm.

B) Isolierte NK-Zellen von Gesunden ($n=14$) und HIV-Patienten ($n=12$) in den Wochen 0, 12 und 48 (W0, W12 und W48) nach klinischem Bekanntwerden wurden nach Stimulation mit IL-2 über Nacht mit Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester (TMRE) gefärbt und die relative Fluoreszenzintensität (RFI) durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Ergebnisse wurden für die CD56^{bright}-NK-Zellen für ungepaarte und normalverteilte Werte berechnet. Für die Gruppe der CD56^{dim}- und alle NK-Zellen wurden die Ergebnisse für ungepaarte und nicht normalverteilte Werte berechnet.

Um zu überprüfen, ob es Zusammenhänge zwischen der Abnahme der mitochondrialen Masse und des mitochondrialen Membranpotenzials gibt, wurden die Ergebnisse miteinander korreliert. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen diesen beiden

mitochondrialen Markern (Abb. 10). Des Weiteren wurden die Ergebnisse der mitochondrialen Marker mit den Ergebnissen der IFN- γ -Produktion der gleichen Zellen korreliert, um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Mitochondrien und der NK-Zell-Funktion besteht. Dabei zeigte sich für beide Marker eine positive Korrelation, sodass von einem Zusammenhang zwischen Abnahme der mitochondrialen Marker und der Abnahme der IFN- γ -Produktion auszugehen ist.

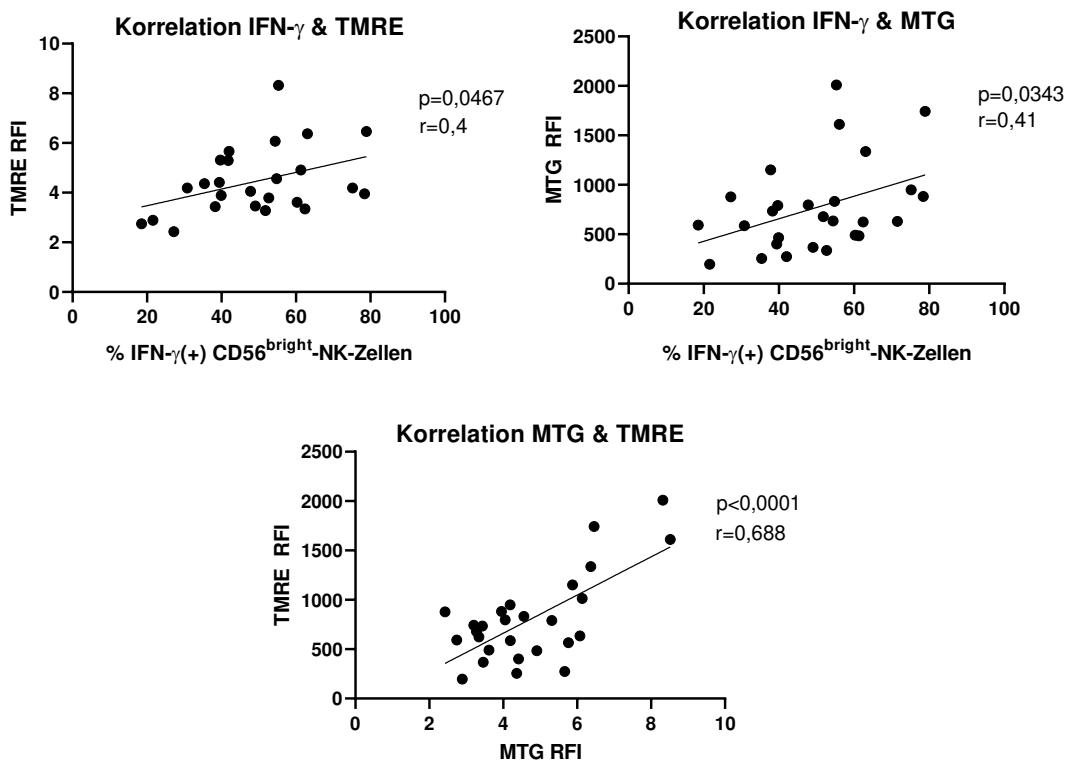


Abb. 10: Korrelation mitochondrialer Marker mit der IFN- γ -Sekretion. Die IFN- γ -Sekretion aus den vorherigen Experimenten wurden mit der mitochondrialen Masse und dem mitochondrialen Membranpotenzial korreliert. Diese korrelieren positiv miteinander, ebenso die mitochondriale Masse mit dem Membranpotenzial. Die Ergebnisse wurden mit linearer Regression erzielt.

3.6. Bakterielle Translokation bei der HIV-Infektion

An den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 48 wurde auch Plasma der Patienten gesammelt und anschließend analysiert. Dafür wurden in Kooperation mit Christoph Hoffmeister mittels ELISA I-FABP (*engl.* intestinal fatty acid binding protein) als Marker für eine gestörte epitheliale Barriere und LBP (*engl.* lipopolysaccharide binding protein) als Marker der bakteriellen Translokation untersucht. Dabei fand sich eine erhöhte Konzentration von I-FABP und LBP im Serum von HIV(+), wobei die Ergebnisse aufgrund einer kleinen Anzahl an Proben nicht signifikant sind. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

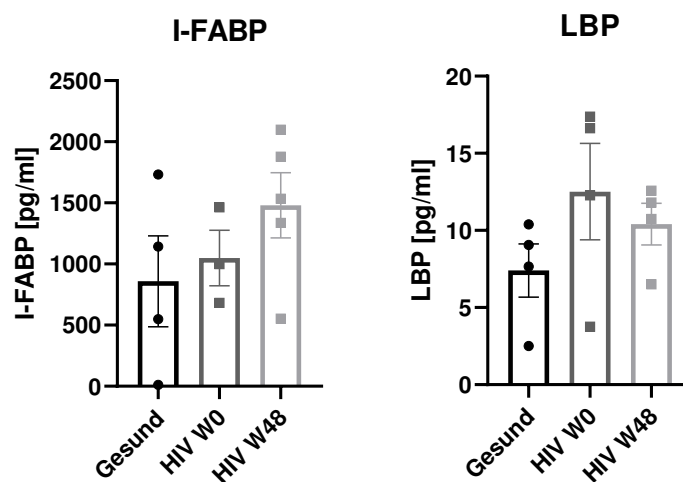


Abb. 11: Marker für bakterielle Translokation im Serum.

Dargestellt sind die Serumkonzentrationen für I-FABP (Gesund (n=4), HIV Woche 0 (n=3) und HIV Woche 48 (n=5)) sowie LBP (Gesund (n=4), HIV Woche 0 (n=4) und HIV Woche 48 (n=4)) in pg/ml im Plasma.

Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Abnahme der Funktionalität und den Markern für bakterielle Translokation gibt, wurden diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der IFN- γ -Produktion im Verlauf korreliert. Dabei zeigte sich eine negative Korrelation für I-FABP und LBP (Abb. 12).

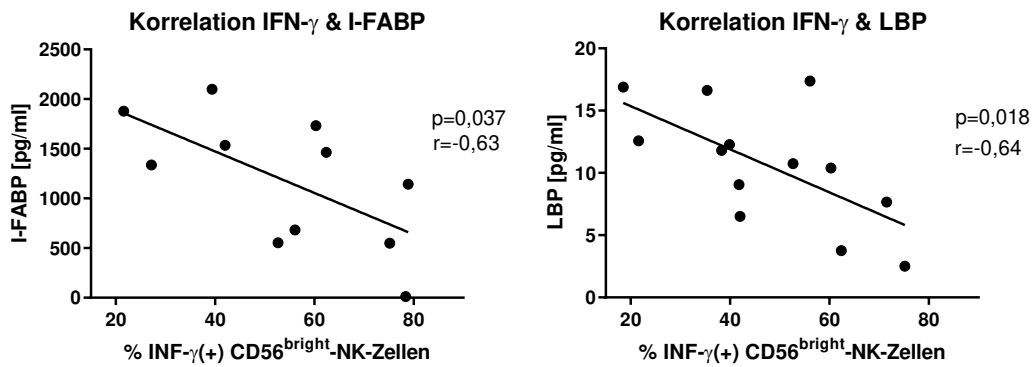


Abb. 12: Korrelation von INF- γ mit I-FABP und LBP.

Die in vorherigen Experimenten gemessene INF- γ -Produktion wurde mit Markern für bakterielle Translokation, I-FABP (n=11) und LBP (n=13), aus dem Plasma der gleichen Probanden korreliert.

Die Ergebnisse wurden mit linearer Regression erzielt.

3.7. *In vitro* Kultur für bakterielle Translokation

Um den Zusammenhang der bakteriellen Translokation mit der Abnahme der Funktionalität der NK-Zellen zu untersuchen und mehr über den Mechanismus der Schädigung zu erfahren, wurde ein *in vitro* Modell für die bakterielle Translokation verwendet. Dafür wurden Zellen für drei Tage entweder in normalem Medium oder Medium, das mit 1 ng/ml oder 100 ng/ml LPS versetzt wurde, bei 37 °C kultiviert und anschließend die Funktionalität der Zellen untersucht.

3.7.1. Einfluss von LPS auf die Funktion nicht-aufgereinigter NK Zellen

Zunächst wurden in der LPS-Kultur vollständige PBMC kultiviert. Nach drei Tagen und anschließender Stimulation mit IL-12 und IL-15 fand sich eine dosisabhängige Verminderung der INF- γ -Produktion der Population der CD56^{bright}-NK-Zellen durch Kultivierung in Anwesenheit von LPS, die bei 100 ng/ml LPS signifikant war (Medium vs. 100 ng/ml LPS: 15,1 % \pm 1,2 % vs. 11,87 % \pm 1,3 %; p=0,0017). Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.

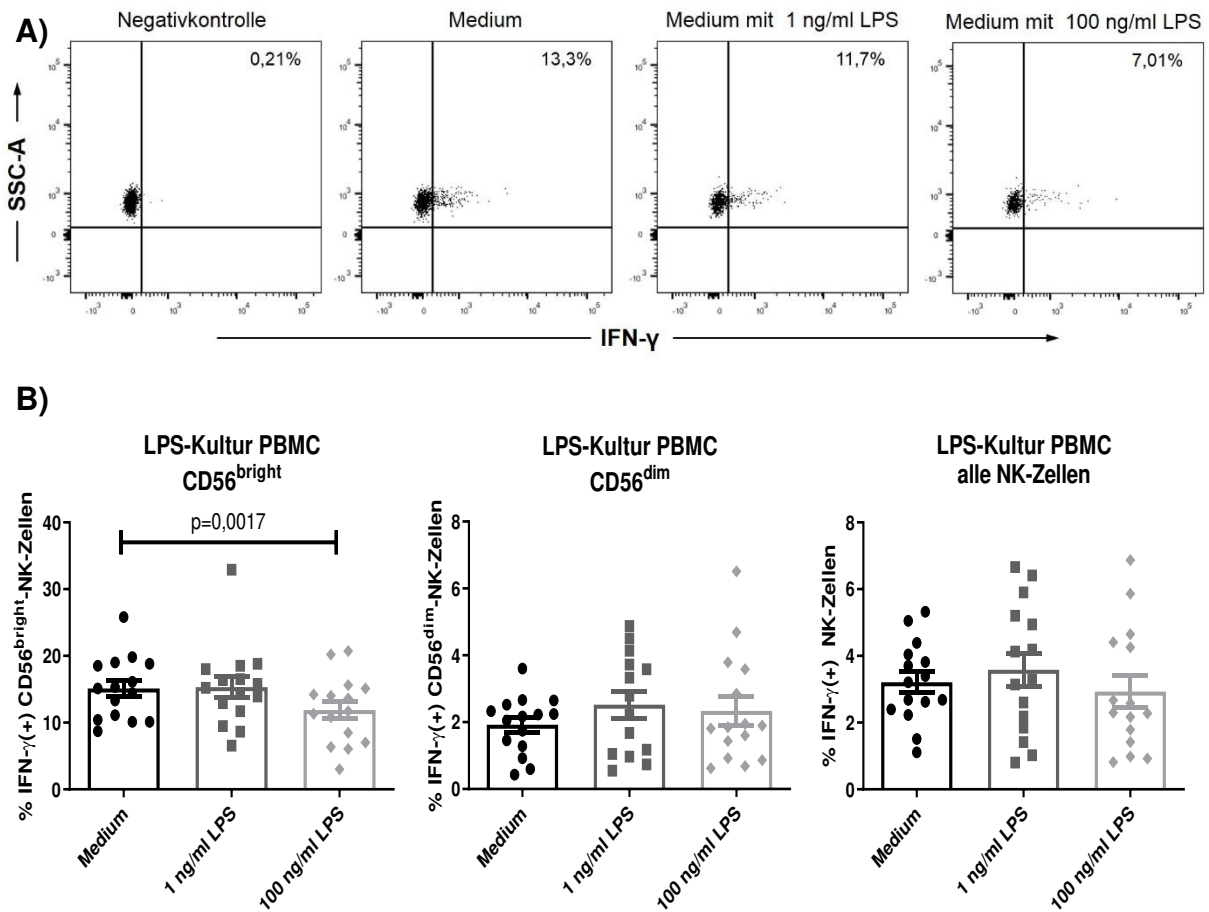


Abb. 13: IFN- γ -Produktion nach LPS-Kultur mit PBMC.

A) Gezeigt ist exemplarisch die durchflusszytometrische Auswertung der IFN- γ -Produktion von CD56^{bright}-NK-Zellen nach dreitägiger LPS-Kultur.

B) PBMC (n=15) wurden drei Tage in Medium, Medium mit 1 ng/ml LPS oder Medium mit 100 ng/ml LPS kultiviert. Anschließend 6 h mit IL-12 und IL-15 stimuliert und danach durchflusszytometrisch die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen gemessen.

Die Ergebnisse wurden für gepaarte und normalverteilte Werte berechnet.

Da die Kultivierung von kompletten PBMC in LPS-haltigem Medium zu einer Hemmung der IFN- γ -Produktion von CD56^{bright}-NK-Zellen führte, sollte in den nächsten Experimenten untersucht werden, ob dieser Effekt auf einer direkten Wirkung von LPS auf die NK-Zellen beruhte.

3.7.2. Expression des LPS-Rezeptors TLR4 auf NK-Zellen

Zellen mit einem TLR4-Rezeptor erkennen LPS und können darauf reagieren. Die Expression von TLR4 auf NK-Zellen wird jedoch kontrovers diskutiert (Kanevskiy et al.,

2013; O'Connor et al., 2006). Um die Expression dieses Rezeptors auf verschiedenen Zellen zu untersuchen, wurden PBMC angefärbt und verschiedene Populationen hinsichtlich ihrer TLR4-Rezeptor-Expression betrachtet. Dabei zeigte sich, dass nur sehr wenige NK-Zellen ($4,8 \% \pm 1,1 \%$), dafür aber ein Großteil der Monozyten ($54,9 \% \pm 5,5 \%$) den Rezeptor besitzen (Abb. 14).

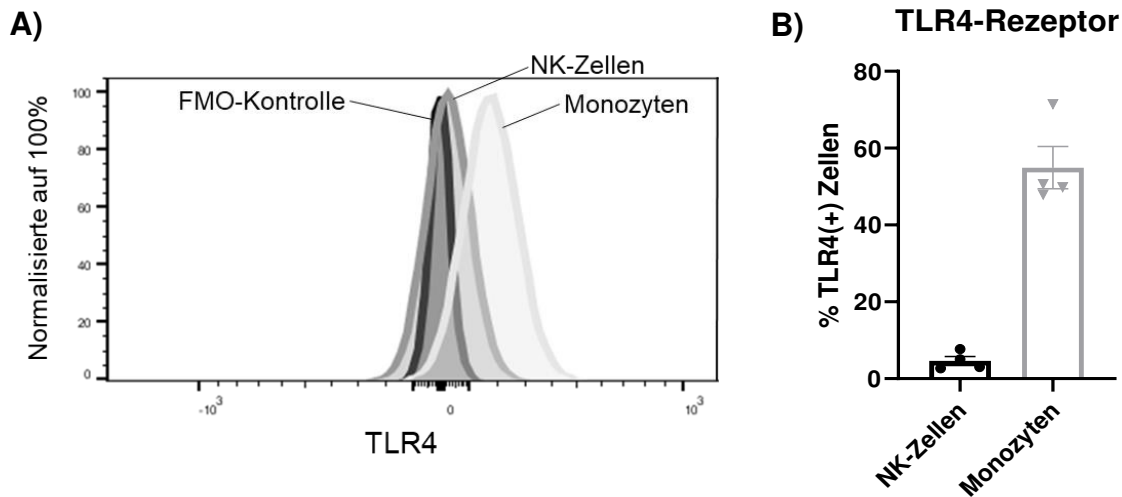


Abb. 14: TLR4-Rezeptor-Expression auf Monozyten und NK-Zellen.

A) Gezeigt ist exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse der TLR4-Expression auf NK-Zellen und Monozyten.

B) Von Probanden ($n=4$) wurden PBMC angefärbt und die Expression vom TLR4-Rezeptor auf NK-Zellen und Monozyten bestimmt. Dargestellt ist der Prozentsatz TLR4-positiver Zellen.

3.7.3. Einfluss von LPS auf die Funktion aufgereinigter NK-Zellen

Durch die vorhandene Expression von TLR4 auf NK-Zellen scheint eine direkte Wirkung von LPS auf NK-Zellen möglich. Um dies weiter abzuklären, wurden NK-Zellen vorgereinigt und anschließend für drei Tage in der LPS-Kultur kultiviert. Abb. 15 zeigt, dass es hier nicht zu einer Hemmung, sondern nach Kultivierung mit 100 ng/ml LPS zu einem Anstieg der IFN- γ -Produktion bei den CD56^{bright}-NK-Zellen kam (Medium vs. 100 ng/ml LPS: $9,12 \% \pm 1,9 \%$ vs. $15,54 \% \pm 2,4 \%$; $p=0,003$). Auch in der Gruppe der CD56^{dim}-NK-Zellen zeigte sich eine vermehrte IFN- γ -Produktion bei 100 ng/ml LPS (Medium vs. 100 ng/ml LPS: $2,32 \% \pm 0,7 \%$ vs. $3,24 \% \pm 0,7 \%$; $p=0,038$) und ebenso in

der Gesamtgruppe aller NK-Zellen (Medium vs. 100 ng/ml LPS: 2,6 % ± 0,7 % vs. 4,7 % ± 0,96 %; p=0,01).

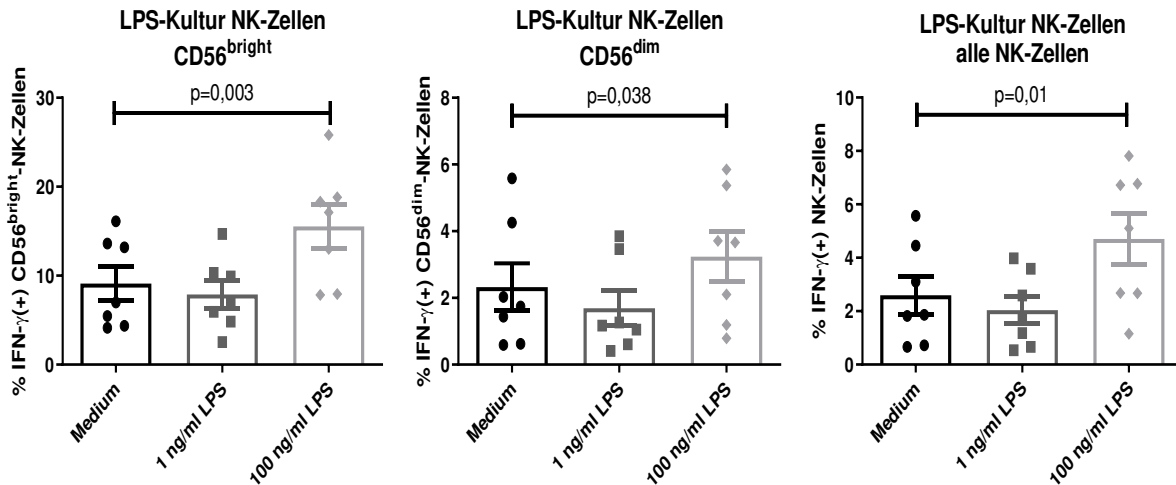


Abb. 15: IFN-γ-Produktion nach LPS-Kultur mit NK-Zellen.

NK-Zellen (n=7) wurden mit Hilfe von MACS-Isolation aus PBMC isoliert und für drei Tage in Medium, Medium mit 1 ng/ml LPS oder 100 ng/ml LPS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit IL-12 und IL-15 stimuliert und durchflusszytometrisch die IFN-γ-Produktion gemessen.

Die Ergebnisse wurden für gepaarte Werte und normalverteilte Werte berechnet.

Aus diesen Befunden schlussfolgerten wir, dass die initial beobachtete LPS-induzierte Hemmung der NK-Zell-Funktion nicht auf einen direkten Mechanismus beruhte, sondern eine weitere Zellpopulation in die Inhibierung der NK-Zellen nach Stimulation mit LPS involviert war.

3.7.4. Einfluss einer Monozyten-Depletion auf die LPS-induzierte Hemmung der NK-Zell-Funktion

Um zu untersuchen, ob Monozyten aufgrund ihrer starken TLR4-Expression ursächlich für die Abnahme der IFN-γ-Produktion der NK-Zellen sind, wurden diese bei den nächsten Experimenten mittels MACS vor Beginn der LPS-Kultur entfernt. Nach dreitägiger Kultur und Stimulation zeigte sich in den Kulturen mit vollständigen PBMC bei den CD56^{bright}-NK-Zellen eine Abnahme der IFN-γ-Produktion bei 100 ng/ml LPS, während dieser Effekt bei den Monozyten-depletierten Kulturen nicht auftrat. Vielmehr zeigte sich hier, ähnlich wie bei den Versuchen mit aufgereinigten NK Zellen, eine Zunahme der IFN-γ-Produktion

der CD56^{bright}-NK-Zellen bei 100 ng/ml LPS (Medium vs. 100ng/ml LPS: 20,2 % ± 3,4 % vs. 25,3 % ± 2,4 %; p=0,005) (Abb. 16). Außerdem zeigte sich eine insgesamt erhöhte IFN- γ -Produktion in den Kulturen nach Monozyten-Entfernung (Medium mit Monozyten vs. Medium ohne Monozyten: 15,3 % ± 1,4 % vs. 20,2 % ± 3,4 %).

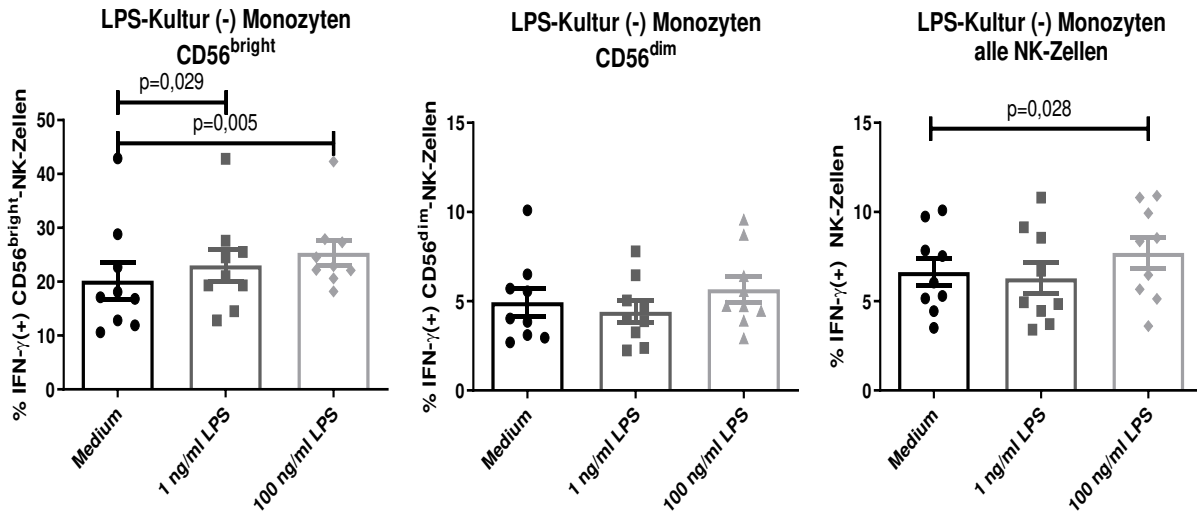


Abb. 16: IFN- γ -Produktion nach LPS-Kultur und Monozyten-Depletion.

Aus PBMC (n=9) wurden mit Hilfe von MACS-Isolation CD14(+)-Zellen entfernt. Die restlichen PBMC wurden drei Tage in Medium, Medium mit 1 ng/ml LPS oder Medium mit 100 ng/ml LPS kultiviert. Danach wurden sie 6 h mit IL-12 und IL-15 stimuliert und durchflusszytometrisch die IFN- γ -Produktion gemessen. Dabei wurde auf NK-Zellen gated.

Die Ergebnisse wurden für gepaarte und normalverteilte Werte berechnet.

3.7.5. Analyse der Überstände der LPS-Kultur

Um weitere Informationen über den Mechanismus der LPS-induzierten NK-Zell-Störung zu erhalten, wurden die Überstände der LPS-Kulturen mittels Legendplex analysiert. Dabei wurde untersucht, ob sich Unterschiede in der Zytokin-Konzentration zwischen den Kulturen mit bzw. ohne LPS sowie vor bzw. nach Monozyten-Depletion finden. Hierbei zeigte sich in den Ansätzen ohne vorherige Entfernung der Monozyten ein dosisabhängiger Anstieg der Konzentrationen von IL-1 β (Medium vs. 1 ng/ml LPS [pg/ml]: 6,6 ± 1,8 vs. 974,6 ± 236,2; p=0,0011, Medium vs. 100 ng/ml: 6,6 ± 1,8 vs. 1680 ± 284,3; p=<0,0001 und 1 ng/ml LPS vs. 100 ng/ml LPS: 974,6 ± 236,2 vs. 1680 ± 284,3; p=0,0057) und IL-10 (Medium vs. 1 ng/ml LPS [pg/ml]: 208,0 ± 122,1 vs. 3117,0 ± 648,9; p=0,0006,

Medium vs. 100 ng/ml: $208,0 \pm 122,1$ vs. $6031,0 \pm 1018$; $p < 0,0001$ und 1 ng/ml vs. 100 ng/ml: $3117,0 \pm 648,9$ vs. $6031,0 \pm 1018$; $p = 0,008$) nach Stimulation mit LPS (Abb. 17). Zudem war bereits bei 1 ng/ml LPS eine signifikante Erhöhung der TGF- β Konzentrationen nachweisbar (Medium vs. 1 ng/ml LPS [pg/ml]: $12,8 \pm 1,7$ vs. $29,9 \pm 3,9$; $p = 0,0002$, Medium vs. 100 ng/ml LPS: $12,8 \pm 1,7$ vs. $28,7 \pm 2,9$; $p = 0,0001$).

Im Gegensatz dazu unterschieden sich jedoch in den Kulturen mit vorheriger Entfernung der Monozyten die Konzentrationen von IL-1 β , IL-10 und TGF- β nicht zwischen den Ansätzen mit und ohne LPS. Insgesamt zeigten sich in den Überständen nach Monozyten-Depletion eine deutlich verminderte Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-10 und TGF- β .

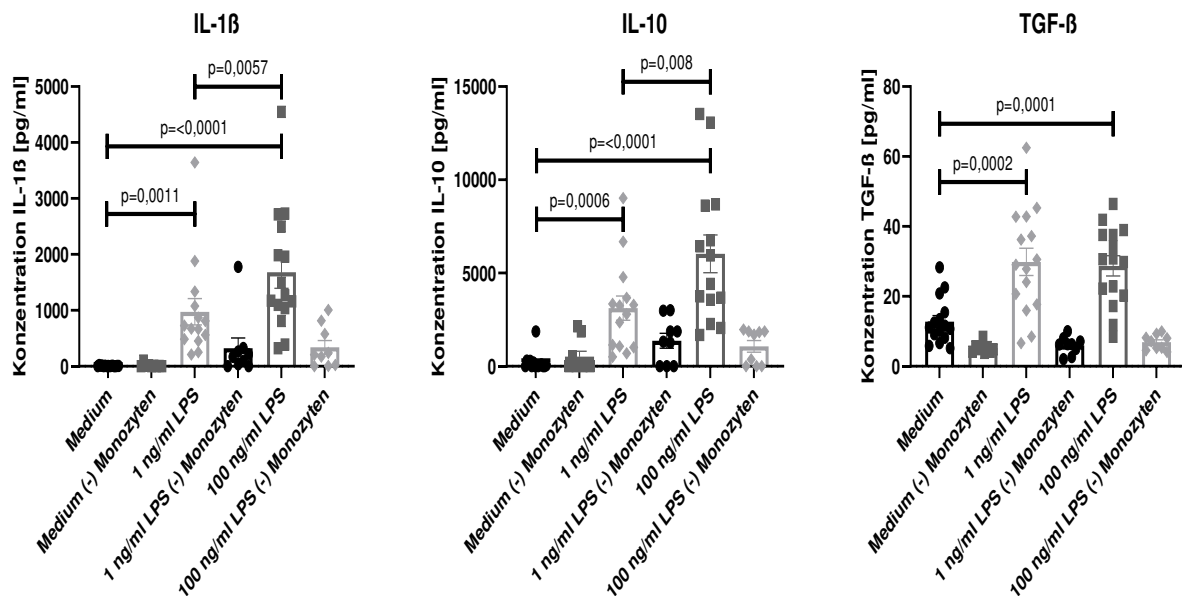


Abb. 17: Messung der Zytokinkonzentrationen in den Überständen.

Nach dreitägiger Kultur von vollständigen PBMC (n=15) und PBMC ohne Monozyten (n=9) wurden die Überstände des Mediums eingefroren und später mit Legendplex die Konzentration verschiedener Zytokine gemessen.

Die Ergebnisse wurden für gepaarte und normalverteilte Werte berechnet.

Um einen Zusammenhang der Zytokinkonzentrationen in den Überständen mit der IFN- γ -Produktion zu untersuchen, wurden diese Werte miteinander korreliert. Dabei zeigte sich eine negative Korrelation für IL-1 β und TGF- β (Abb. 18).

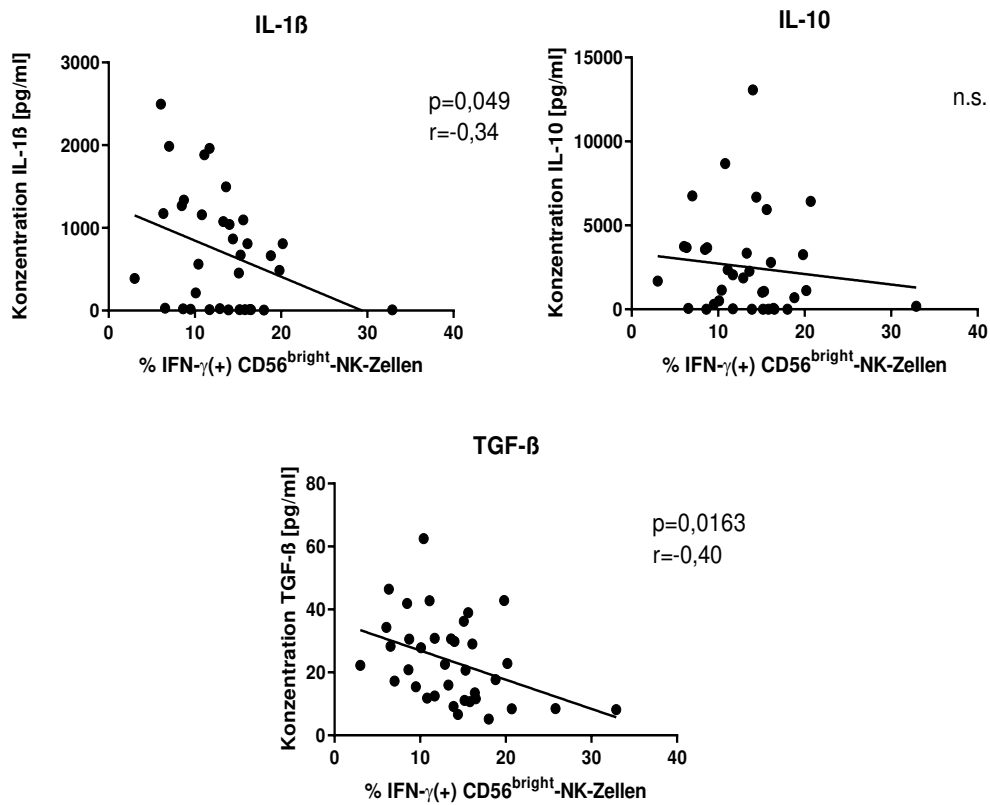


Abb. 18: Korrelation Zytokine mit IFN- γ .

Die IFN- γ -Produktion der CD56^{bright}-NK-Zellen für die verschiedenen Konditionen nach der LPS-Kultur (n=36) wurde mit den jeweils gemessenen Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , IL-10 und TGF- β in den Überständen der LPS-Kultur korreliert. Die Ergebnisse wurden mit linearer Regression erzielt.

4. Diskussion

HIV(+) Patienten besitzen trotz effektiver Therapie eine verringerte Lebenserwartung (Lohse et al., 2007; The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2008). Obwohl NK-Zellen selbst nicht von den HI-Viren befallen werden, konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die Infektion zu einer chronischen Aktivierung und Abnahme der Funktionalität von NK-Zellen führt. Da NK-Zellen virusinfizierte und maligne veränderte Zellen direkt abtöten können, führt ihre reduzierte Funktionalität zu einem erhöhten Risiko an anderen Infektionen oder Tumoren zu erkranken. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verminderte Funktionalität von NK-Zellen bei HIV(+) mit einer Störung der Mitochondrien assoziiert ist. Außerdem wurde ein Zusammenhang der Dysfunktionalität von NK-Zellen mit bakterieller Translokation gezeigt und für die Schädigung potenziell ursächliche Zytokine identifiziert.

4.1. NK-Zell-Funktionalität bei HIV

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine verminderte Funktionalität von NK-Zellen bei HIV(+). Dieser Defekt wurde bei NK-Zellen mit IL-2 Vorstimulation und anschließender Stimulation mit IL-12 und IL-15 nachgewiesen. Die Vorstimulation mit IL-2 diente dabei der Steigerung der Aktivität von NK-Zellen (Domzig et al., 1983). Auch andere Autoren haben bereits gezeigt, dass eine Stimulation mit IL-2 den Defekt der NK-Zellfunktion nicht wiederherstellen kann und decken sich damit mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Bonavida et al., 1986; Sirianni et al., 1994). Für T-Zellen konnte sowohl eine verminderte Expression des IL-2 Rezeptors, als auch von STAT5, einem wichtigen Protein im IL-2 Signalweg, nachgewiesen werden (David et al., 1998; Pericle et al., 1998). Damit scheint ein Defekt der IL-2 Antwort eine wichtige Rolle bei der HIV-induzierten Zelldysfunktionalität von T-Zellen zu spielen. Ein ähnlicher Mechanismus für die verminderte Funktionalität von NK-Zellen ist unwahrscheinlich, da der Defekt auch ohne IL-2 Stimulation für NK-Zellen in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte.

Da die NK-Zellen mit IL-12 und IL-15 stimuliert wurden, kommen auch Störungen der Signalwege dieser Zytokine als mögliche Ursachen der Dysfunktionalität in Betracht. Vingerhoets et al. (1998) konnten eine verminderte IL-12 Rezeptorexpression bei der HIV-Infektion beschreiben. Auch die Expression von im IL-15 Signalweg wichtigen Proteinen wie STAT3 und STAT5 ist im Rahmen einer HIV-Infektion verändert (Kuchipudi, 2015;

Pericle et al., 1998). Da eine verminderte Funktionalität von NK-Zellen bei HIV aber auch mit anderen Stimuli wie PMA/Ionomycin, Ko-Kultur mit HuH7_{A2}HCVreplicon-Zellen oder K562-Zellen und damit unabhängig von IL-12 und IL-15 nachgewiesen werden konnte, ist ein alleiniger Defekt der IL-12 und IL-15 Antwort auszuschließen (Azzoni et al., 2002; Goeser et al., 2016; Kared et al., 2018). Generell ist ein einzelner Defekt in Anbetracht der verschiedenen Stimuli fraglich, wohingegen eine allgemeine Dysfunktion von NK-Zellen wahrscheinlicher erscheint.

Die Dysfunktion war sowohl bei unbehandelten Patienten direkt nach Diagnose der Infektion (W0), in den folgenden Wochen unter Therapie (W12 und W48) und auch in der chronischen Phase der Infektion unter Therapie nachweisbar. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von Azzoni et al. (2002), die ebenfalls zeigen konnten, dass sich der Defekt auch unter effektiver Therapie nicht zurückbildet. Andere Untersuchungen, die eine verminderte Funktionalität von NK-Zellen bei HIV nachweisen konnten, haben dafür nur einzelne Zeitpunkte analysiert (Alter et al., 2005; Goeser et al., 2016; Mavilio et al., 2005). Neu ist, dass in dieser Arbeit über den Zeitraum der ersten 48 Wochen nach Bekanntwerden der Infektion an drei Zeitpunkten Material von den gleichen Patienten gesammelt und analysiert wurde.

Für die Experimente von chronisch HIV(+) wurden NK-Zellen von RNA(-)-Patienten verwendet und diese nach der Anzahl vorhandener T-Helferzellen in eine Gruppe mit hoher CD4-Zellzahl (>400/ μ l) und niedriger CD4-Zellzahl (<400/ μ l) eingeteilt. Beide Gruppen wiesen eine verminderte IFN- γ -Sekretion auf, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Gruppen festgestellt werden konnten. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von Draenert et al. (2004), die keinen Zusammenhang zwischen der absoluten CD4-Zellzahl und der HIV-spezifischen Immunantwort finden konnten. Dabei scheint die effektive Therapie einen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen IFN- γ -Produktion von NK-Zellen und CD4-Zellzahl zu haben. Während für HIV(+) ohne Therapie von Goeser et al. (2016) Unterschiede der INF- γ -Produktion von NK-Zellen in Abhängigkeit der CD4-Zellzahl beschrieben wurden, konnten auch in deren Untersuchungen für HIV(+) mit effektiver Therapie keine Unterschiede der IFN- γ -Produktion zwischen Gruppen mit hoher und niedriger CD4-Zellzahl festgestellt werden.

Die Einteilung erfolgte anhand der T-Zellzahl, da diese als Marker für den Verlauf der Infektion genutzt wird (Fahey et al., 1990). Für die Prognose der Infektion dagegen ist eine Orientierung am Peak der Viruslast aussagekräftiger, wie bereits mehrfach gezeigt werden konnte (Estill et al., 2012; Mellors et al., 1996). Da sich die Patienten aber unter wirksamer cART befinden und die Viruslast damit unter der Nachweisgrenze ist, kann anhand der T-Zellzahl die immunologische Rekonstitution überprüft und damit das Infektionsgeschehen abgeschätzt werden. Eine geringe CD4-Zellzahl bedeutet dabei einen verminderten Immunstatus und damit ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen (Ford et al., 2017). Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde ein Grenzwert für die CD4-Zellzahl von 400/ μ l verwendet. Dieser Wert wurde gewählt, da es sich dabei um einen häufig verwendeten Grenzwert handelt (Knobel et al., 2008; Re et al., 2000; Stöhr et al., 2007).

4.2. Phänotypische Charakterisierung

Die Gruppe der NK-Zellen ist sehr heterogen und besteht aus funktionell und phänotypisch unterschiedlichen Subpopulationen. Durch die HIV-Infektion wird die Zusammensetzung dieser Gruppe beeinflusst und verändert. Auftretende Veränderungen der Rezeptorausstattung von NK-Zellen bei der HIV-Infektion sind bereits vielfach beschrieben worden (Maria et al., 2003; Wong et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Subpopulationen unterschiedlich von der Dysfunktion betroffen sind und somit Subpopulationen bei HIV(+) identifiziert werden können, die eine besonders geringe INF- γ -Produktion besitzen und durch welche Rezeptoren diese charakterisiert sind.

Bisher wurde in verschiedenen Studien festgestellt, dass die HIV-Infektion zu einem reiferen NK-Zell-Phänotyp führt (Hong et al., 2010; Kaczmarek et al., 2017). Dieser HIV-typische Phänotyp ist verbunden mit einer Zunahme von CD57 und einer Abnahme der Expression von CD27, CD127, NKG2A, NKG2D, NKp44 und NKp46 (Bisio et al., 2013; Kaczmarek et al., 2017; Maria et al., 2003; Parsons et al., 2014). Dieser Phänotyp ähnelt dem der CD56^{dim}-NK-Zellen, die als die reiferen NK-Zellen beschrieben werden und generell weniger INF- γ produzieren (Freud et al., 2006). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass die genannten Rezeptoren auch bei einer besonders

dysfunktionalen Subpopulation von NK-Zellen Veränderungen zu Gesunden aufweisen. Außerdem besitzen NK-Zellen von HIV(+) eine erhöhte Expression von CD69 und CD38, wodurch eine chronische Aktivierung gezeigt wird (Fogli et al., 2004; Kuri-Cervantes et al., 2014). Da Brenchley et al. (2006) belegen konnten, dass die chronische Aktivierung mit einer Dysfunktion von Immunzellen assoziiert ist, erscheinen auch diese Rezeptoren interessant für die Untersuchung von Dysfunktionalität. Für den Erschöpfungsmarker PD1 wurde eine verstärkte Expression sowohl bei virämischen als auch avirämischen Patienten beschrieben (Norris et al., 2012). Alvarez et al. (2010) haben gezeigt, dass verstärkte Expression von PD1 zu einer verminderten Produktion von IFN- γ führt. Das in der vorliegenden Arbeit keine HIV-typischen Veränderungen beobachtet werden konnten, ist mit der breiten Streuung der Ergebnisse bei gleichzeitig geringer Probenzahl zu begründen. Die Ergebnisse stehen damit nicht im Gegensatz zur Literatur, da aufgrund der vielfältigen Beschreibungen zu phänotypischen Veränderungen während der HIV-Infektion davon auszugehen ist, dass bei Erhöhung der Probenzahl diese Veränderungen ebenfalls nachweisbar wären.

In der Literatur wurde bereits das Vorkommen einer stark vermehrten und dysfunktionalen Population von CD3(-)-, CD56(-)- und CD16(+)-Zellen bei virämischen HIV(+) beschrieben (Mavilio et al., 2005). Während die Autoren diskutieren, dass diese Subpopulation für die beeinträchtigte Funktion der gesamten NK-Zellpopulation verantwortlich sein kann, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch andere Populationen wie die CD56^{bright}- und CD56^{dim}-NK-Zellen eine verminderte Produktion von IFN- γ bei HIV(+) aufweisen und damit von der Störung betroffen sind.

Bei den untersuchten Rezeptoren auf NK-Zellen von HIV(+) konnte keine Assoziation zur Abnahme der Sekretion von INF- γ festgestellt werden. Damit konnte in dieser Arbeit keine Subpopulation mit ausgeprägter funktioneller Störung identifiziert und charakterisiert werden. Aus diesem Grund deuten die Ergebnisse eher auf eine globale Schädigung als Ursache für die Dysfunktionalität der NK-Zellen bei HIV(+) hin. Hierbei muss bedacht werden, dass nur ein geringer Anteil der Rezeptoren und möglichen Subpopulationen untersucht werden konnte. Wie Horowitz et al. (2013) gezeigt haben, entstehen durch die verschiedenen Kombinationen von NK-Zell-Rezeptoren bis zu 30000 phänotypische Populationen pro Individuum, sodass viele Subpopulationen bei den Untersuchungen der

vorliegenden Arbeit nicht erfasst werden konnten. Aufgrund der Vielzahl von Rezeptoren und möglichen Subpopulationen ist eine Verwendung von speziellen Analyseprogrammen zur Identifizierung von Subpopulationen, wie zum Beispiel von Pohlmeier et al. (2019) verwendet, für weitere Untersuchungen zu erwägen.

4.3. Mitochondriale Veränderungen von NK-Zellen

In dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, ob die Dysfunktionalität von NK-Zellen bei HIV(+) durch mitochondriale oder metabolische Störungen verursacht sein kann. Die Ergebnisse zeigen bei NK-Zellen von HIV(+) Patienten veränderte Expressionen von verschiedenen mitochondrialen und Metabolismus-assoziierten Genen. Die Dysregulationen fanden sich dabei bei Genen, die an unterschiedlichen metabolischen und mitochondrialen Prozessen der Zelle beteiligt sind. Ein einzelner, gestörter Signalweg ließ sich nicht identifizieren und somit ist ein globaler Defekt wahrscheinlich. Diese Erkenntnisse ähneln Ergebnissen von Fiscaro et al. (2017), die für erschöpfte Hepatitis-B-spezifische CD8-T-Zellen eine starke Expressionsveränderung wichtiger mitochondrialer und Metabolismus-assoziiierter Gene zeigen konnten und diese auf Einschränkungen verschiedener zellulärer Prozesse zurückführen.

Nachdem eine veränderte Expression von Stoffwechselgenen bei HIV-Patienten nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Eigenschaften der Mitochondrien untersucht. Ein entscheidendes Merkmal von Mitochondrien besteht in der Fähigkeit einen Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran zu erzeugen. Das dadurch entstehende Transmembranpotenzial wird anschließend für die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) genutzt (Divakaruni und Brand, 2011; Rich und Maréchal, 2010). Damit ist ein funktionierendes mitochondriales Membranpotenzial entscheidend an der Energiegewinnung der Zelle beteiligt. Da es unter physiologischen Bedingungen relativ konstant gehalten wird und ein Absinken unter pathologischen Bedingungen beschrieben wurde, kann eine Veränderung Hinweis auf eine Schädigung der Mitochondrien sein (Popkov et al., 2015; Zorova et al., 2018). Ein weiterer Marker für die Eigenschaften von Mitochondrien ist die mitochondriale Masse. Damit lässt sich nicht untersuchen, wie viele Mitochondrien vorhanden sind oder wie groß die einzelnen Mitochondrien sind, aber es gibt eine Aussage über die gesamte Masse an Mitochondrien, die der Zelle zur Energiegewinnung zur Verfügung steht.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wurden für die Untersuchungen die mitochondriale Masse sowie das mitochondriale Membranpotenzial ausgewählt. Für die Messung der mitochondrialen Masse wurde früher beschrieben, dass die Färbung mit MTG vom Membranpotenzial abhängt (Keij et al., 2000). In einer neueren Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass sich MTG unabhängig vom Membranpotenzial in den Mitochondrien anreichert und sich damit gut als unabhängiger Farbstoff für die mitochondriale Masse eignet (Doherty und Perl, 2017).

Bei HIV und anderen Infektionen konnten bereits mitochondriale Störungen nachgewiesen werden (Jacotot et al., 2001; Macho et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls Unterschiede in mitochondrialer Masse und mitochondrialem Membranpotenzial bei HIV(+) gezeigt werden. Für beide Marker wurde eine Abnahme in der Population der CD56^{bright}-NK-Zellen nachgewiesen. Dabei muss bedacht werden, dass die CD56^{bright}-NK-Zellen den Großteil der energieaufwendigen Zytokinproduktion ausführen. Das deckt sich mit der Beobachtung von Keating et al. (2016), die einen erhöhten Energiebedarf für diese Population beschreiben. Dieser erhöhte Energiebedarf könnte zu einer früheren Schädigung bei diesen Zellen führen.

Eine Abnahme der mitochondrialen Masse und des mitochondrialen Membranpotenzials ist dabei mit einer verringerten Fähigkeit der Zelle für Energieproduktion assoziiert, was die Zelle in ihrem ganzen Stoffwechsel beeinflusst. Für Tumore konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der Mitochondrien zu einer verminderten Funktionalität von NK-Zellen führt (Zheng et al., 2019). Auch andere Autoren beschreiben den Zusammenhang eines gestörten Metabolismus mit einer Störung der Funktion von NK-Zellen. In einer Studie bei Adipositas konnte gezeigt werden, dass ein gestörter metabolischer Signalweg zu einer Dysfunktion von NK-Zellen führt, indem er die Bildung von zytotoxischen Synapsen hemmt (Michelet et al., 2018). Mah et al. (2017) haben nachgewiesen, dass der Glukosestoffwechsel von NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Infektionsabwehr spielt. Bei Mäusen resultierte die Hemmung der Glykolyse in einer verminderten Clearance von MCMV-infizierten Zellen und beeinflusste die Kontrolle der Virämie und damit das Überleben der Tiere. Diese Studien zeigen, dass metabolische Einschränkungen einer Zelle zu einer verminderten Funktionalität führen können und damit einen möglichen Mechanismus für die Dysfunktionalität von NK-Zellen bei Infektionen mit HIV darstellen. Bei einer *in vitro* Studie konnte nachgewiesen werden,

dass eine mitochondriale Störung ursächlich für eine verminderte IFN- γ -Sekretion sein kann (Miranda et al., 2016). Dabei wurde gezeigt, dass verminderte Expression von PGC-1 α , einem entscheidenden Protein der mitochondrialen Biogenese, bei NK-Zellen zu einer verringerten mitochondrialen Masse, einem reduziertem mitochondrialen Membranpotenzial sowie zu einer verringerten IFN- γ -Produktion führt. Diese Ergebnisse belegen den Zusammenhang zwischen der Funktion der Mitochondrien und der Produktion von IFN- γ . Diese Assoziation konnte auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Dabei korrelierte die Abnahme der mitochondrialen Masse und des mitochondrialen Membranpotenzials mit der Abnahme der IFN- γ -Produktion der NK-Zellen.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass eine HIV-assoziierte Dysregulation metabolischer und mitochondrialer Prozesse maßgeblich in die beobachtete Störung der NK-Zell-Funktion bei HIV-Patienten involviert ist.

4.4. Bakterielle Translokation und LPS-Kultur

Im weiteren Abschnitt der Arbeit wurden mögliche Ursachen für die Schädigung der Mitochondrien und die Dysfunktionalität der NK-Zellen untersucht. Dabei sind als Ursache für eine Schädigung der Mitochondrien auch die antiviralen Medikamente zur Behandlung der HIV-Infektion zu bedenken. Bei den ersten antiviralen Medikamenten konnten Schäden von Mitochondrien nachgewiesen werden (Arnaudo et al., 1991; Pinti et al., 2006; White, 2001). Aber auch bei neueren antiviralen Medikamenten ist diese unerwünschte Nebenwirkung nicht auszuschließen. Jedoch konnte Subashini et al. (2016) bei Untersuchungen von Mitochondrien von HIV(+) Schäden sowohl bei Patienten mit und ohne Therapie feststellen. Auch bei Untersuchungen des Einflusses von typischen cART-Medikamenten auf die Funktionalität von NK-Zellen in *in vitro* Experimenten konnte kein Einfluss nachgewiesen werden (ToVinh et al., 2022). Außerdem war der Defekt auch bei Patienten ohne Therapie (Woche 0) nachweisbar, sodass eine mögliche Schädigung der Mitochondrien durch die Therapie als Ursache für die Dysfunktionalität keine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

Eine weitere mögliche Ursache für die Dysfunktionalität der NK-Zellen stellt die bakterielle Translokation mit daraus resultierender und persistierender Immunaktivierung dar. Die

bakterielle Translokation im Rahmen der HIV-Infektion wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben (Chege et al., 2011; Dinh et al., 2015; d'Ettorre et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der Abnahme der NK-Zell-Funktionalität und der Zunahme der bakteriellen Translokation anhand der Marker LBP und I-FABP gezeigt werden. Ein ähnlicher Zusammenhang von Dysfunktionalität und bakterieller Translokation wurde auch für B-Zellen beschrieben (Jiang, 2012). Um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen und die Auswirkungen der bakteriellen Translokation auf die NK-Zellen besser zu verstehen, wurde ein *in vitro* Modell für bakterielle Translokation verwendet. Dafür wurde LPS eingesetzt, da es als Bestandteil der Zellwand von Gram-negativen Bakterien als Haupttreiber der Immunaktivierung durch bakterielle Translokation gilt und im Blut von HIV(+) deutlich erhöht ist (Brenchley et al., 2006; Gregson et al., 2009). Aus diesen Gründen wird LPS als Modell für bakterielle Translokation auch von anderen Autoren wie Pandrea et al. (2008) verwendet.

Zellen wurden für drei Tage in reinem Medium, Medium versetzt mit 1 ng/ml LPS oder 100 ng/ml LPS kultiviert und anschließend auf ihre INF- γ -Produktion untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei der Kultivierung von PBMC mit 100 ng/ml LPS eine Abnahme der IFN- γ -Produktion von CD56^{bright}-NK-Zellen stattfindet. Daraufhin wurden NK-Zellen auf das Vorhandensein des TLR4-Rezeptors zur Wahrnehmung von LPS untersucht. Es fand sich eine geringe Expression und bei der Kultivierung von reinen NK-Zellen fand sich eher eine Aktivierung, jedoch keine Abnahme der Funktionalität. Aus diesem Grund wurden Monozyten als Zellen mit hoher TLR4-Rezeptor-Expression als mögliche Ursache identifiziert und bei Experimenten mit PBMC und Depletion von Monozyten konnte ebenfalls kein Defekt mehr nachgewiesen werden. Damit legen diese Ergebnisse eine indirekte Hemmung von Monozyten auf NK-Zellen als Ursache für die Dysfunktion von NK-Zellen nahe.

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass LPS zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt (Goodier und Londei, 2000; Varma et al., 2002). Dabei werden verschiedene Wege der LPS-induzierten Aktivierung von NK-Zellen diskutiert. Beim indirekten Weg reagieren dendritische Zellen oder Makrophagen auf LPS und aktivieren über Zytokine die NK-Zellen (Gerosa et al., 2002). Beim direkten Weg wird von TLR4-Expression auf NK-Zellen ausgegangen, sodass eine direkte Reaktion stattfinden kann. Dafür konnte sowohl die

Oberflächenexpression von TLR4 auf NK-Zellen (O'Connor et al., 2006), als auch die intrazelluläre Expression (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012) und die funktionelle Aktivität (Mian et al., 2010) gezeigt werden. Da LPS als Ligand hauptsächlich seine Wirkung über TLR4 entfaltet, wird die Expression von TLR4 auf NK-Zellen von verschiedenen Autoren als Voraussetzung für die direkte Wirkung von LPS auf die Zellen angenommen (Lu et al., 2008; Pålsson-McDermott und O'Neill, 2004). Es gibt jedoch auch Autoren, die davon ausgehen, dass NK-Zellen kein TLR4 exprimieren und trotzdem direkt auf LPS über einen anderen als den TLR4-Weg reagieren können (Kanevskiy et al., 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass ein geringer Prozentsatz der NK-Zellen TLR4 besitzen und somit auch eine direkte Reaktion auf LPS möglich ist. Jedoch besitzen NK-Zellen eine viel geringe Expression als zum Beispiel Monozyten, die auch deutlich stärker darauf reagieren können. Ob die vermehrte IFN- γ -Produktion der vorgereinigten NK-Zellen bei 100 ng/ml LPS auf den direkten Weg über die geringe Expression von TLR4, indirekt durch Verunreinigungen mit anderen Zellen oder auf beide Mechanismen zurückzuführen ist, ist damit nicht sicher zu klären.

In den LPS-Kulturen mit Monozyten fanden sich weniger INF- γ -(+)-NK-Zellen, als in den Kulturen nach Monozyten-Depletion oder reinen NK-Zellen. Die verstärkte IFN- γ -Produktion in Abwesenheit von Monozyten deckt sich mit Beobachtungen von Goodier und Londei (2000), die ebenfalls feststellten, dass die Anwesenheit von CD14(+)-Zellen die NK-Zell-Proliferation und IFN- γ -Produktion hemmt und eine Depletion von CD14(+)-Zellen in LPS-Kulturen zu einer deutlichen Steigerung der IFN- γ -Produktion führt. Damit ist davon auszugehen, dass die Aktivierung von Monozyten durch LPS eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der NK-Zell-Dysfunktion spielt.

Während die verminderte INF- γ -Produktion bei den ex-vivo-Experimenten bei CD56^{bright}- und CD56^{dim}-NK-Zellen nachweisbar war, fand sich für die mitochondriale Masse und das mitochondriale Membranpotenzial sowie die Dysfunktionalität nach der LPS-Kultur der Defekt nur in der Population der CD56^{bright}-NK-Zellen. Diese Unterschiede können für die LPS-Kultur mit dem erhöhten Energiebedarf der CD56^{bright}-NK-Zellen und der damit verbundenen früheren Schädigung erklärt werden (Keating et al., 2016). Eine andere Möglichkeit ist ein durch die verschiedenen Funktionen der Zellpopulationen bedingter unterschiedlicher Mechanismus der Zellschädigung.

Als Limitierung ist zu nennen, dass aufgrund von begrenztem Vorhandensein von Probenmaterial nur wenige Messpunkte für die Marker der bakteriellen Translokation erhoben wurden. Da aber bakterielle Translokation durch HIV bereits vielfach beschrieben wurde, ist trotzdem von validen Ergebnissen auszugehen. Außerdem sind die verwendeten Konzentrationen von LPS als Marker für bakterielle Translokation unphysiologisch hoch. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass bei HIV-Patienten die Konzentration von LPS im Plasma nur im Pikogramm-Bereich pro ml liegt (Brenchley et al., 2006; Funderburg et al., 2012). Für die Umsetzbarkeit mussten jedoch diese deutlich erhöhten Konzentrationen verwendet werden. Von Nedvetzki et al. (2007) wurden ebenfalls Konzentrationen von 50 ng/ml bis 200 ng/ml verwendet und Goodier und Londei (2000) verwendeten sogar Konzentrationen von 1 µg/ml. Damit werden diese erhöhten Konzentrationen auch von anderen Autoren für *in vitro* Modelle mit LPS eingesetzt. Weiterhin muss bedacht werden, dass diese Kultur nur eine kurze Dauer von drei Tagen hatte. Damit kann nur in Ansätzen eine chronische Dauerstimulation dargestellt werden. Dieser Faktor wird jedoch wieder durch die kurzfristig sehr hohe Konzentration von LPS etwas ausgewogen.

Anhand der vorherigen Ergebnisse wurde anschließend untersucht, welche Zytokine der Monozyten ursächlich für die Schädigung der NK-Zellen sind. Bei der Untersuchung auf typische inflammatorische Zytokine in den Überständen der LPS-Kulturen konnten IL-10, IL-1β und TGF-β bei 100 ng/ml LPS mit einer signifikant höheren Konzentration als in reinem Medium nachgewiesen werden. Erhöhungen der Konzentrationen von IL-10, IL-1β und TGF-β finden sich dabei nicht nur nach der LPS-Kultur, sondern konnten bereits von verschiedenen Autoren im Serum von HIV(+) nachgewiesen werden (Dinh et al., 2015; Lotz und Seth, 1993; Parato et al., 2002; Stylianou et al., 1999). Während im Blut von HIV(+) die Zytokine von verschiedenen Zellen stammen können, zeigten sich in den Experimenten dieser Arbeit die Spiegel der Zytokine nach Monozyten-Depletion deutlich vermindert, sodass Monozyten nach LPS-Stimulation hauptverantwortlich für die Sekretion von IL-10, IL-1β und TGF-β sind.

Für das Zytokin IL-10 wird zwar einerseits eine stimulierende Wirkung auf B-Zellen beschrieben, aber hauptsächlich hat es eine antiinflammatorische Wirkung (Iyer und Cheng, 2012; Rousset et al., 1992). Die Hemmung der T-Zell-Funktion und auch deren INF-γ-Produktion durch IL-10 wurden schon mehrfach festgestellt (Mocellin et al., 2004a;

Waal Malefyt et al., 1991). Während IL-10 auf T-Zellen eine eindeutig hemmende Wirkung besitzt, gibt es unterschiedliche Wirkungen auf NK-Zellen. Auf der einen Seite wird eine erhöhte Zytotoxizität durch Stimulation mit IL-10 beobachtet, während andererseits eine Abnahme der Produktion von TNF- α und IFN- γ bei *in vitro* Experimenten gezeigt werden konnte (Mocellin et al., 2004b). Auch von Jiang et al. (2018) wurde eine hemmende Wirkung von IL10 auf die IFN- γ -Produktion beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich IL-10 negativ auf die IFN- γ -Produktion von T-Zellen und NK-Zellen auswirkt und dieses Zytokin damit eine mögliche Ursache für die Dysfunktionalität von NK-Zellen bei HIV darstellt.

Auch TGF- β gehört zu den antiinflammatorischen Zytokinen (Sanjabi et al., 2009) und auch für dieses Zytokin konnte nachgewiesen werden, dass es die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen hemmen kann (Jiang et al., 2018). Interessanterweise wurde von Komai et al. (2018) ein synergistisch-hemmender Effekt von TGF- β in Kombination mit IL-10 beschrieben. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Zytokine durch Beeinflussung metabolischer Stoffwechselwege die Immunantwort von B-Zellen hemmen können. Auch für den NK-Zell-Metabolismus wurde für TGF- β bereits eine hemmende Wirkung auf mTORC1 beschrieben (Zaiatz-Bittencourt et al., 2018). Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit, dass sowohl eine erhöhte TGF- β Konzentration, als auch mitochondriale Störungen mit einer NK-Zell-Dysfunktion assoziiert sind.

IL-1 β hingegen ist in der Literatur vorrangig als proinflammatorisches Zytokin bekannt (Lopez-Castejon und Brough, 2011). Aber trotz dieser Wirkung konnte für IL-1 β eine zellschädigende Wirkung auf CD4-T-Zellen bei der HIV-Infektion nachgewiesen werden (Freeman et al., 2016). Daher erscheint es möglich, dass IL-1 β bei der HIV-Infektion auch auf NK-Zellen schädigend wirken kann. Diese Vermutung wurde durch die Korrelation der Zytokinkonzentrationen mit der INF- γ -Produktion von NK-Zellen in dieser Arbeit bestätigt. Dabei konnte eine negative Korrelation für IL-1 β und TGF- β nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass mit steigender Zytokinkonzentration die INF- γ -Produktion der NK-Zellen abgenommen hat. Diese Ergebnisse verstärken die Hypothese, dass die Zytokine an der Dysfunktionalität von NK-Zellen beteiligt sind.

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Zytokine die Expression von Rezeptoren auf NK-Zellen beeinflussen und damit ihre Funktion beeinträchtigen

können. So kann TGF- β den Rezeptor NKp-30 herunterregulieren, während IL-10 zu einer verstärkten Expression verschiedener inhibitorischer NKR führt (Castriconi et al., 2003; Parato et al., 2002). Diese phänotypischen Veränderungen sind in Übereinstimmung mit dem HIV-typischen NK-Zell-Phänotyp und zeigen den Einfluss von Zytokinen auf die Genregulation von NK-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zytokine IL-10, IL-1 β und TGF- β beeinflussend und schädigend auf Immunzellen und insbesondere NK-Zellen wirken können. Dabei ist bisher nicht geklärt, ob der Effekt auf ein einzelnes Zytokin oder das Zusammenwirken verschiedener Zytokine zurückzuführen ist.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen zur bakteriellen Translokation einen Zusammenhang dieser mit der Abnahme der Funktionalität von NK-Zellen. In den *in vitro* Experimenten der LPS-Kultur konnte gezeigt werden, dass keine direkte Schädigung der NK-Zellen stattfindet. Stattdessen konnten Hinweise auf den Mechanismus einer indirekten Hemmung von NK-Zellen durch Monozyten, die Zytokin vermittelt erfolgt, dargelegt werden. Um diese Ergebnisse zu validieren, sind weitere Versuche nötig. Dazu sollte überprüft werden, ob die Überstände aus den LPS-Kulturen hemmend auf isolierte NK-Zellen wirken. Außerdem sollte mit Blockierungsexperimenten überprüft werden, welche Zytokine die Hauptrolle bei der Schädigung spielen. Auch mit rekombinanten Zytokinen sollte weiter getestet werden, welche Zytokine ursächlich sind. Zudem ist bisher nicht geklärt, ob der NK-Zellschädigung in der LPS-Kultur der gleiche Mechanismus zugrunde liegt, wie bei den *ex-vivo* untersuchten NK-Zellen. Dafür sind im Anschluss an die LPS-Kultur mitochondriale Marker wie Masse und Membranpotenzial zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Seit der Einführung der cART hat die AIDS-bedingte Mortalität bei HIV-positiven Personen deutlich abgenommen. Trotzdem besitzen HIV(+)-Patienten auch unter effektiver Therapie eine kürzere Lebenserwartung als HIV(-)-Personen. Als Grund dafür wird neben unerwünschten Wirkungen der Therapie eine fortbestehende Immundefizienz und Immundysregulation durch eine chronische Aktivierung des Immunsystems angenommen. NK-Zellen spielen bei der anti-viralen Immunantwort eine wichtige Rolle, da sie virusinfizierte Zellen erkennen und lysieren können. Bisherige Studien konnten zeigen, dass NK-Zellen von HIV(+)-Personen eine gestörte Zytokin-Sekretion aufweisen. Allerdings konnte bisher nicht die Ursache für diese Störung geklärt werden, sodass das Ziel dieser Arbeit in einem besseren Verständnis der HIV-assoziierten Störung der NK-Zell-Funktion bestand.

Zunächst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die gestörte Zytokin-Sekretion mit einem Stimulus mit IL-12 und IL-15 bereits direkt nach Bekanntwerden der Infektion sowie in den darauffolgenden 48 Wochen und in der chronischen Phase der Infektion nachweisbar ist. Dabei war diese Störung unabhängig von der Aktivierung mit IL-2 und bildete sich auch unter wirksamer Therapie nicht zurück.

Durch die HIV-Infektion verändert sich die Rezeptorausstattung von NK-Zellen. Durch eine phänotypische Charakterisierung wurde untersucht, ob Subpopulationen mit ausgeprägter funktioneller Störung identifiziert und über den Phänotyp Rückschlüsse auf die Ursache der Dysfunktion gezogen werden können. Bei den untersuchten Rezeptoren für Erschöpfung, chronische Aktivierung, Reifung und Differenzierung fanden sich aber keine Unterschiede und es konnten keine Subpopulationen charakterisiert werden.

Eine Störung des Zellmetabolismus kann Einschränkungen der Zellfunktion zur Folge haben. Verschiedene Ergebnisse aus anderen Studien konnten darlegen, dass der Zellmetabolismus die IFN- γ -Produktion aktiv beeinflussen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Gene für mitochondriale und metabolische Schlüsselenzyme in der Population der CD56^{bright}- und CD56^{dim}-NK-Zellen dysreguliert sind. Dabei scheint der Defekt global zu sein. Außerdem konnte durchflusszytometrisch gezeigt werden, dass die mitochondriale Masse und das mitochondriale Membranpotenzial bei HIV-Patienten verringert sind. Dabei korrelierte die Abnahme der mitochondrialen Marker mit der Funktionalität der NK-Zellen. Aus diesen

Gründen ist eine mitochondriale Schädigung als Ursache für die verminderte Zytokinsekretion anzunehmen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, wie es zu der Störung der NK-Zellen kommen kann. Bakterielle Translokation wird als wichtige Ursache für die chronische Aktivierung des Immunsystems bei der HIV-Infektion angenommen. Auch bei NK-Zellen scheint der Reiz der bakteriellen Proteine zu einer Erschöpfung zu führen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine negative Korrelation von Markern der bakteriellen Translokation und der Funktionalität von NK-Zellen. Um den Mechanismus zu verstehen, wurde ein *in vitro* Modell für bakterielle Translokation entwickelt. Durch Kultivierung von Zellen über drei Tage in LPS-haltigem Medium wurde der Einfluss von LPS auf die Zellen untersucht. Dabei konnte eine Abnahme der IFN- γ -Produktion von CD56^{bright}-NK-Zellen bei der Kultivierung von vollständigen PBMC gezeigt werden. Da bei der Kultivierung von gereinigten NK-Zellen und von PBMC ohne Monozyten dieser Effekt nicht auftrat, ist von einem indirekten Mechanismus der Schädigung durch aktivierte Monozyten auszugehen. In den Überständen der Kulturen mit PBMC konnten anschließend stark erhöhte Konzentrationen von IL-1 β , IL-10 und TGF- β nachgewiesen werden, während diese nach Monozyten-Depletion deutlich vermindert waren. Für diese Zytokine konnten bereits schädigende Wirkungen auf Immunzellen nachgewiesen werden, sodass sie als Ursache für die Schädigung von NK-Zellen wahrscheinlich sind.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die verminderte Funktionalität von NK-Zellen bei HIV(+) mit einer Störung der Mitochondrien assoziiert ist. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang der Dysfunktionalität von NK-Zellen mit bakterieller Translokation gezeigt sowie ein möglicher indirekter Schädigungsmechanismus vermittelt durch Zytokinsekretion aktivierter Monozyten aufgezeigt.

6. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|--------|
| Abb. 1: Gating-Strategie zur Analyse der INF- γ -Produktion..... | - 36 - |
| Abb. 2: Kinetik der INF- γ -Produktion der CD56 ^{bright} -NK-Zellen. | - 37 - |
| Abb. 3: IFN- γ -Produktion von NK-Zellen. | - 38 - |
| Abb. 4: IFN- γ -Produktion von NK-Zellen ohne IL-2-Stimulation. | - 39 - |
| Abb. 5: IFN- γ -Produktion im Verlauf der HIV-Infektion..... | - 41 - |
| Abb. 6: Phänotypische Charakterisierung von NK-Zell-Populationen. | - 43 - |
| Abb. 7: Genexpressionsanalyse wichtiger Stoffwechsel-Gene. | - 44 - |
| Abb. 8: Mitochondriale Masse im Verlauf der Infektion. | - 46 - |
| Abb. 9: Mitochondriales Membranpotenzial im Verlauf der Infektion..... | - 47 - |
| Abb. 10: Korrelation mitochondrialer Marker mit der IFN- γ -Sekretion..... | - 48 - |
| Abb. 11: Marker für bakterielle Translokation im Serum. | - 49 - |
| Abb. 12: Korrelation von INF- γ mit I-FABP und LBP..... | - 50 - |
| Abb. 13: IFN- γ -Produktion nach LPS-Kultur mit PBMC..... | - 52 - |
| Abb. 14: TLR4-Rezeptor-Expression auf Monozyten und NK-Zellen. | - 53 - |
| Abb. 15: IFN- γ -Produktion nach LPS-Kultur mit NK-Zellen. | - 54 - |
| Abb. 16: IFN- γ -Produktion nach LPS-Kultur und Monozyten-Depletion..... | - 55 - |
| Abb. 17: Messung der Zytokinkonzentrationen in den Überständen. | - 56 - |
| Abb. 18: Korrelation Zytokine mit IFN- γ | - 57 - |

7. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|--------|
| Tab. 1: Patientencharakteristik für die IFN- γ -Produktion..... | - 24 - |
| Tab. 2: Patientencharakteristik für die Genanalyse..... | - 25 - |
| Tab. 3: Patientencharakteristik für den Verlauf der HIV-Infektion. | - 25 - |

8. Literaturverzeichnis

Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in immunology* 2018; 9: 1869

Alter G, Teigen N, Davis BT, Addo MM, Suscovich TJ, Waring MT, Streeck H, Johnston MN, Staller KD, Zaman MT, Yu XG, Lichterfeld M, Basgoz N, Rosenberg ES, Altfeld M. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 2005; 106: 3366–3369

Alvarez IB, Pasquinelli V, Jurado JO, Abbate E, Musella RM, La Barrera SS de, García VE. Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 2010; 202: 524–532

Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim E-Y, Autissier P, Wurcel A, Zaman T, Stone D, Mefford M, Morgello S, Singer EJ, Wolinsky SM, Gabuzda D. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PloS one* 2008; 3: e2516

Arnaudo E, Shanske S, DiMauro S, Schon EA, Moraes CT, Dalakas M. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *The Lancet* 1991; 337: 508–510

Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012; 2: a007161

Azzoni L, Papasavvas E, Chehimi J, Kostman JR, Mounzer K, Ondercin J, Perussia B, Montaner LJ. Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J. Immunol.* 2002; 168: 5764–5770

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)* 1983; 220: 868–871

Bernstein HB, Wang G, Plasterer MC, Zack JA, Ramasastry P, Mumenthaler SM, Kitchen CMR. CD4+ NK cells can be productively infected with HIV, leading to downregulation of CD4 expression and changes in function. *Virology* 2009; 387: 59–66

Betтели E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453: 1051–1057

Bi J, Tian Z. NK Cell Exhaustion. *Frontiers in immunology* 2017; 8: 760

Bisio F, Bozzano F, Marras F, Di Biagio A, Moretta L, Maria A de. Successfully treated HIV-infected patients have differential expression of NK cell receptors (NKp46 and NKp30) according to AIDS status at presentation. *Immunol. Lett.* 2013: 16–24

Björkström NK, Ljunggren H-G, Michaëlsson J. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 16: 310–320

Bonavida B, Katz J, Gottlieb M. Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. I. Defective trigger on NK cells for NKCF production by target cells, and partial restoration by IL 2. *J. Immunol.* 1986; 137: 1157–1163

Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 1968; 97: 77–89

Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391: 795–799

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine* 2006; 12: 1365–1371

Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100: 4120–4125

Chang C-H, Curtis JD, Maggi LB, Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, Huang SC-C, van der Windt GJW, Blagih J, Qiu J, Weber JD, Pearce EJ, Jones RG, Pearce EL. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 2013; 153: 1239–1251

Chege D, Sheth PM, Kain T, Kim CJ, Kovacs C, Loutfy M, Halpenny R, Kandel G, Chun T-W, Ostrowski M, Kaul R. Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)* 2011; 25: 741–749

Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (New York, N.Y.)* 1986; 233: 343–346

Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *The New England journal of medicine* 2004; 350: 1023–1035

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* 2001; 22: 633–640

Cuturi MC, Anegón I, Sherman F, Loudon R, Clark SC, Perussia B, Trinchieri G. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 1989; 169: 569–583

Davey RT, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, Natarajan V, Lempicki RA, Adelsberger JW, Miller KD, Kovacs JA, Polis MA, Walker RE, Falloon J, Masur H, Gee D, Baseler M, Dimitrov DS, Fauci AS, Lane HC. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 15109–15114

David D, Bani L, Moreau JL, Treilhou MP, Nakarai T, Joussemet M, Ritz J, Dupont B, Pialoux G, Thèze J. Regulatory dysfunction of the interleukin-2 receptor during HIV infection and the impact of triple combination therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95: 11348–11353

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science (New York, N.Y.)* 1996; 273: 1856–1862

Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nature reviews. Disease primers* 2015; 1: 15035

Degli-Esposti M. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *Journal of leukocyte biology* 1999; 65: 535–542

d'Ettorre G, Paiardini M, Zaffiri L, Andreotti M, Ceccarelli G, Rizza C, Indinnimeo M, Vella S, Mastroianni CM, Silvestri G, Vullo V. HIV persistence in the gut mucosa of HIV-infected subjects undergoing antiretroviral therapy correlates with immune activation and increased levels of LPS. *Current HIV research* 2011; 9: 148–153

Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C, Bhalchandra S, Tai AK, Kane AV, Wanke CA, Ward HD. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J. Infect. Dis.* 2015; 211: 19–27

Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26: 192–205

Doherty E, Perl A. Measurement of Mitochondrial Mass by Flow Cytometry during Oxidative Stress. *React. Oxyg. Species (Apex)* 2017: 275–283

Domzig W, Stadler BM, Herberman RB. Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) cell activity. *J. Immunol.* 1983; 130: 1970–1973

Donnelly RP, Loftus RM, Keating SE, Liou KT, Biron CA, Gardiner CM, Finlay DK. mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function. *J. Immunol.* 2014; 193: 4477–4484

Draenert R, Verrill CL, Tang Y, Allen TM, Wurcel AG, Boczanowski M, Lechner A, Kim AY, Suscovich T, Brown NV, Addo MM, Walker BD. Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 2004; 78: 630–641

El-Sadr WM, Lundgren JD, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, Arduino RC, Babiker A, Burman W, Clumeck N, Cohen CJ, Cohn D, Cooper D, Darbyshire J, Emery S, Fätkenheuer G, Gazzard B, Grund B, Hoy J, Klingman K, Losso M, Markowitz N, Neuhaus J, Phillips A, Rappoport C. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *The New England journal of medicine* 2006; 355: 2283–2296

Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews. Microbiology* 2012; 10: 279–290

Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, Barclay GR, Smedley J, Pung R, Oliveira KM, Hirsch VM, Silvestri G, Douek DC, Miller CJ, Haase AT, Lifson J, Brenchley JM. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS pathogens* 2010; 6: e1001052

Estill J, Aubrière C, Egger M, Johnson L, Wood R, Garone D, Gsponer T, Wandeler G, Boule A, Davies M-A, Hallett TB, Keiser O. Viral load monitoring of antiretroviral therapy, cohort viral load and HIV transmission in Southern Africa: a mathematical modelling analysis. *AIDS (London, England)* 2012; 26: 1403–1413

Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, Giorgi JV. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *The New England journal of medicine* 1990; 322: 166–172

Felices M, Lenvik AJ, McElmurry R, Chu S, Hinderlie P, Bendzick L, Geller MA, Tolar J, Blazar BR, Miller JS. Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect. *JCI insight* 2018; 3

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)* 1996; 272: 872–877

Fisicaro P, Barili V, Montanini B, Acerbi G, Ferracin M, Guerrieri F, Salerno D, Boni C, Massari M, Cavallo MC, Grossi G, Giuberti T, Lampertico P, Missale G, Levrero M, Ottonello S, Ferrari C. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nature medicine* 2017; 23: 327–336

Fogli M, Costa P, Murdaca G, Setti M, Mingari MC, Moretta L, Moretta A, Maria A de. Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 2313–2321

Ford N, Meintjes G, Vitoria M, Greene G, Chiller T. The evolving role of CD4 cell counts in HIV care. *Curr. Opin. HIV AIDS* 2017; 12: 123–128

Freed EO, Martin MA. HIVs and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields' virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2107–2186

Freeman ML, Shive CL, Nguyen TP, Younes S-A, Panigrahi S, Lederman MM. Cytokines and T-Cell Homeostasis in HIV Infection. *The Journal of infectious diseases* 2016; 214 Suppl 2: 51-57

Freud AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketich AK, Caligiuri MA. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2006; 203: 1033–1043

Funderburg NT, Zidar DA, Shive C, Lioi A, Mudd J, Musselwhite LW, Simon DI, Costa MA, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM. Shared monocyte subset phenotypes in HIV-1 infection and in uninfected subjects with acute coronary syndrome. *Blood* 2012; 120: 4599–4608

Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS (London, England)* 1991; 5: 617–637

German Advisory Committee Blood. Human Immunodeficiency Virus (HIV). Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie 2016; 43: 203–222

Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. The Journal of experimental medicine 2002; 195: 327–333

Gilbert PB, McKeague IW, Eisen G, Mullins C, Guéye-NDiaye A, Mboup S, Kanki PJ. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. Statistics in medicine 2003; 22: 573–593

Goeser F, Glässner A, Kokordelis P, Wolter F, Lutz P, Kaczmarek DJ, Schwarze-Zander C, Boesecke C, Strassburg CP, Rockstroh JK, Spengler U, Krämer B, Nattermann J. HIV mono-infection is associated with an impaired anti-hepatitis C virus activity of natural killer cells. AIDS (London, England) 2016; 30: 355–363

Goodier MR, Londei M. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56+CD3- NK cells: a regulatory role of monocytes and IL-10. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 2000; 165: 139–147

Gordon SN, Cervasi B, Odorizzi P, Silverman R, Aberra F, Ginsberg G, Estes JD, Paiardini M, Frank I, Silvestri G. Disruption of intestinal CD4+ T cell homeostasis is a key marker of systemic CD4+ T cell activation in HIV-infected individuals. J. Immunol. 2010; 185: 5169–5179

Gregson JN, Steel A, Bower M, Gazzard BG, Gotch FM, Goodier MR. Elevated plasma lipopolysaccharide is not sufficient to drive natural killer cell activation in HIV-1-infected individuals. AIDS 2009; 23: 29–34

Heise C, Dandekar S, Kumar P, Duplantier R, Donovan RM, Halsted CH. Human immunodeficiency virus infection of enterocytes and mononuclear cells in human jejunal mucosa. Gastroenterology 1991; 100: 1521–1527

Hong HS, Eberhard JM, Keudel P, Bollmann BA, Ballmaier M, Bhatnagar N, Zielinska-Skowronek M, Schmidt RE, Meyer-Olson D. HIV infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56dim CD16+ NK cells. *J. Virol.* 2010; 1183–1188

Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, Kubo J, Nemat-Gorgani N, Dogan OC, Dekker CL, Mackey S, Maecker H, Swan GE, Davis MM, Norman PJ, Guethlein LA, Desai M, Parham P, Blish CA. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5: 208ra145

Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13: 95–109

Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* 2012; 32: 23–63

Jacotot E, Ferri KF, El Hamel C, Brenner C, Druillennec S, Hoebeke J, Rustin P, Métivier D, Lenoir C, Geuskens M, Vieira HL, Loeffler M, Belzacq AS, Briand JP, Zamzami N, Edelman L, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *The Journal of experimental medicine* 2001; 193: 509–519

Jamil KM, Khakoo SI. KIR/HLA interactions and pathogen immunity. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011; 2011: 298348

Jiang W. Microbial Translocation and B Cell Dysfunction in Human Immunodeficiency Virus Disease. *Am. J. Immunol.* 2012; 8: 44–51

Jiang Y, Yang M, Sun X, Chen X, Ma M, Yin X, Qian S, Zhang Z, Fu Y, Liu J, Han X, Xu J, Shang H. IL-10+ NK and TGF- β + NK cells play negative regulatory roles in HIV infection. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18: 80

Kaczmarek DJ, Kokordelis P, Krämer B, Glässner A, Wolter F, Goeser F, Lutz P, Schwarze-Zander C, Boesecke C, Strassburg CP, Rockstroh JK, Spengler U, Nattermann J. Alterations of the NK cell pool in HIV/HCV co-infection. *PloS one* 2017; 12: e0174465

Kanevskiy LM, Telford WG, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. Lipopolysaccharide induces IFN- γ production in human NK cells. *Frontiers in immunology* 2013; 4: 11

Kared H, Martelli S, Tan SW, Simoni Y, Chong ML, Yap SH, Newell EW, Pender SLF, Kamarulzaman A, Rajasuriar R, Larbi A. Adaptive NKG2C+CD57+ Natural Killer Cell and Tim-3 Expression During Viral Infections. *Front. Immunol.* 2018; 9: 686

Keating SE, Zaiatz-Bittencourt V, Loftus RM, Keane C, Brennan K, Finlay DK, Gardiner CM. Metabolic Reprogramming Supports IFN- γ Production by CD56bright NK Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2016; 196: 2552–2560

Keij JF, Bell-Prince C, Steinkamp JA. Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry* 2000; 39: 203–210

Kelley CF, Barbour JD, Hecht FM. The relation between symptoms, viral load, and viral load set point in primary HIV infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 2007; 45: 445–448

Kelley CF, Kitchen CMR, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, Crane HM, Willig J, Mugavero M, Saag M, Martin JN, Deeks SG. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009; 48: 787–794

Kelly CJ, Colgan SP, Frank DN. Of microbes and meals: the health consequences of dietary endotoxemia. *Nutr. Clin. Pract.* 2012; 27: 215–225

Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013; 21: 6–13

Knobel H, Guelar A, Montero M, Carmona A, Luque S, Berenguer N, González A. Risk of side effects associated with the use of nevirapine in treatment-naïve patients, with respect to gender and CD4 cell count. *HIV Med.* 2008; 9: 14–18

Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, Scolnick EM, Sigal IS. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85: 4686–4690

Komai T, Inoue M, Okamura T, Morita K, Iwasaki Y, Sumitomo S, Shoda H, Yamamoto K, Fujio K. Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1364

Kotler DP, Gaetz HP, Lange M, Klein EB, Holt PR. Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* 1984; 101: 421–428

Kottlilil S, Shin K, Planta M, McLaughlin M, Hallahan CW, Ghany M, Chun T-W, Sneller MC, Fauci AS. Expression of chemokine and inhibitory receptors on natural killer cells: effect of immune activation and HIV viremia. *The Journal of infectious diseases* 2004; 189: 1193–1198

Kramski M, Gaeguta AJ, Lichtfuss GF, Rajasuriar R, Crowe SM, French MA, Lewin SR, Center RJ, Purcell DFJ. Novel sensitive real-time PCR for quantification of bacterial 16S rRNA genes in plasma of HIV-infected patients as a marker for microbial translocation. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 3691–3693

Kuchipudi SV. The Complex Role of STAT3 in Viral Infections. *J. Immunol. Res.* 2015; 2015: 272359

Kuri-Cervantes L, Oca GS-M de, Avila-Ríos S, Hernández-Juan R, Reyes-Terán G. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. *J. Leukoc. Biol.* 2014; 96: 7–16

Leeansyah E, Zhou J, Paukovics G, Lewin SR, Crowe SM, Jaworowski A. Decreased NK Cell FcR γ in HIV-1 infected individuals receiving combination antiretroviral therapy: a cross sectional study. *PloS one* 2010; 5: e9643

Lichtfuss GF, Cheng W-J, Farsakoglu Y, Paukovics G, Rajasuriar R, Velayudham P, Kramski M, Hearps AC, Cameron PU, Lewin SR, Crowe SM, Jaworowski A. Virologically suppressed HIV patients show activation of NK cells and persistent innate immune activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2012; 189: 1491–1499

Ljunggren HG, Kärre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *The Journal of experimental medicine* 1985; 162: 1745–1759

Lohse N, Hansen A-BE, Pedersen G, Kronborg G, Gerstoft J, Sørensen HT, Vaeth M, Obel N. Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995-2005. *Annals of internal medicine* 2007; 146: 87–95

Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22: 189–195

Lotz M, Seth P. TGF beta and HIV infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993; 685: 501–511

Lowin B, Peitsch MC, Tschopp J. Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Current topics in microbiology and immunology* 1995; 198: 1–24

Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42: 145–151

Macho A, Calzado MA, Jiménez-Reina L, Ceballos E, León J, Muñoz E. Susceptibility of HIV-1-TAT transfected cells to undergo apoptosis. *Biochemical mechanisms. Oncogene* 1999; 18: 7543–7551

Mah AY, Rashidi A, Keppel MP, Saucier N, Moore EK, Alinger JB, Tripathy SK, Agarwal SK, Jeng EK, Wong HC, Miller JS, Fehniger TA, Mace EM, French AR, Cooper MA. Glycolytic requirement for NK cell cytotoxicity and cytomegalovirus control. *JCI Insight* 2017; 2

Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26: 2–18

Maria A de, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, Moretta A, Moretta L. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *European journal of immunology* 2003; 33: 2410–2418

Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.* 2020; 11: 102

Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, Lombardo G, Kottlil S, Planta MA, Marcenaro E, Bottino C, Moretta L, Moretta A, Fauci AS. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 15011–15016

Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, O'Shea MA, Kinter A, Kovacs C, Moretta A, Fauci AS. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102: 2886–2891

Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science (New York, N.Y.)* 1996; 272: 1167–1170

Mian MF, Lauzon NM, Andrews DW, Lichty BD, Ashkar AA. FimH can directly activate human and murine natural killer cells via TLR4. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010; 18: 1379–1388

Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Zimmer J. Human CD56bright NK Cells: An Update. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2016; 196: 2923–2931

Michelet X, Dyck L, Hogan A, Loftus RM, Duquette D, Wei K, Beyaz S, Tavakkoli A, Foley C, Donnelly R, O'Farrelly C, Raverdeau M, Vernon A, Pettee W, O'Shea D, Nikolajczyk BS, Mills KHG, Brenner MB, Finlay D, Lynch L. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat. Immunol.* 2018: 1330–1340

Miranda D, Jara C, Ibañez J, Ahumada V, Acuña-Castillo C, Martin A, Córdova A, Montoya M. PGC-1 α -Dependent Mitochondrial Adaptation Is Necessary to Sustain IL-2-Induced Activities in Human NK Cells. *Mediators of inflammation* 2016; 2016: 9605253

Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004a; 15: 61–76

Mocellin S, Panelli M, Wang E, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Lise M, Marincola FM. IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes Immun.* 2004b; 5: 621–630

Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today* 2000; 21: 228–234

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* 2001; 19: 197–223

Muñoz A, Wang MC, Bass S, Taylor JM, Kingsley LA, Chmiel JS, Polk BF. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *American journal of epidemiology* 1989; 130: 530–539

Murphy K, Weaver C. Das Versagen der Immunantwort. In: Murphy K, Weaver C, Hrsg. *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2018: 695–781

Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, Arsenault AL, Kaushic C. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS pathogens* 2010; 6: e1000852

Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Vély F, Pende D, Trowsdale J, Vivier E, Gordon S, Davis DM. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 2007; 109: 3776–3785

Nockher WA, Bergmann L, Scherberich JE. Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* 1994; 98: 369–374

Nolting A, Dugast A-S, Rihn S, Luteijn R, Carrington MF, Kane K, Jost S, Toth I, Nagami E, Faetkenheuer G, Hartmann P, Altfeld M, Alter G. MHC class I chain-related protein A shedding in chronic HIV-1 infection is associated with profound NK cell dysfunction. *Virology* 2010; 406: 12–20

Norris S, Coleman A, Kuri-Cervantes L, Bower M, Nelson M, Goodier MR. PD-1 expression on natural killer cells and CD8(+) T cells during chronic HIV-1 infection. *Viral Immunol.* 2012; 25: 329–332

O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 2006; 117: 1–10

O'Connor GM, Holmes A, Mulcahy F, Gardiner CM. Natural Killer cells from long-term non-progressor HIV patients are characterized by altered phenotype and function. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 2007; 124: 277–283

Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1996; 157: 2909–2915

Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; 113: 153–162

Pandrea I, Gaufin T, Brenchley JM, Gautam R, Monjure C, Gautam A, Coleman C, Lackner AA, Ribeiro RM, Douek DC, Apetrei C. Cutting edge: Experimentally induced immune activation in natural hosts of simian immunodeficiency virus induces significant increases in viral replication and CD4+ T cell depletion. *J. Immunol.* 2008; 181: 6687–6691

Parato KG, Kumar A, Badley AD, Sanchez-Dardon JL, Chambers KA, Young CD, Lim WT, Kravcik S, Cameron DW, Angel JB. Normalization of natural killer cell function and phenotype with effective anti-HIV therapy and the role of IL-10. *AIDS* 2002; 16: 1251–1256

Parsons MS, Tang C-C, Jegaskanda S, Center RJ, Brooks AG, Stratov I, Kent SJ. Anti-HIV antibody-dependent activation of NK cells impairs NKp46 expression. *J. Immunol.* 2014: 308–315

Pastor Rojo O, López San Román A, Albéniz Arbizu E, La Hera Martínez A de, Ripoll Sevillano E, Albillos Martínez A. Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007; 13: 269–277

Pearce EL, Poffenberger MC, Chang C-H, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science (New York, N.Y.)* 2013; 342: 1242454

Pericle F, Pinto LA, Hicks S, Kirken RA, Sconocchia G, Rusnak J, Dolan MJ, Shearer GM, Segal DM. HIV-1 infection induces a selective reduction in STAT5 protein expression. *J. Immunol.* 1998; 160: 28–31

Pinti M, Salomoni P, Cossarizza A. Anti-HIV drugs and the mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 2006; 1757: 700–707

Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science (New York, N.Y.)* 1998; 280: 248–253

Pohlmeyer CW, Gonzalez VD, Irrinki A, Ramirez RN, Li L, Mulato A, Murry JP, Arvey A, Hoh R, Deeks SG, Kukulj G, Cihlar T, Pflanz S, Nolan GP, Min-Oo G. Identification of NK Cell Subpopulations That Differentiate HIV-Infected Subject Cohorts with Diverse Levels of Virus Control. *J. Virol.* 2019

Popkov VA, Plotnikov EY, Lyamzaev KG, Silachev DN, Zorova LD, Pevzner IB, Jankauskas SS, Zorov SD, Babenko VA, Zorov DB. Mitodiversity. *Biochemistry (Mosc)* 2015; 80: 532–541

Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 1999; 189: 1093–1100

Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *The Journal of experimental medicine* 2005; 201: 1025–1029

Re MC, Ramazzotti E, Manfredi R, Furlini G, Vignoli M, Maldini C, Borderi M, La Placa M. Viral load trend in HIV-1 seropositive patients with different CD4 cell counts before starting HAART. *J. Clin. Virol.* 2000; 17: 5–11

Rich PR, Maréchal A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 2010; 47: 1–23

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* (New York, N.Y.) 2000; 288: 55–56

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76: 2421–2438

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992; 89: 1890–1893

Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012; 10: 655–666

Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, Demino M, Kleiner DE, Deeks SG, Liang TJ, Heller T, Douek DC. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* 2011a; 141: 1220-30, 1230.e1-3

Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, Pedersen C, Ruxrungtham K, Lewin SR, Emery S, Neaton JD, Brenchley JM, Deeks SG, Sereti I, Douek DC. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *The Journal of infectious diseases* 2011b; 203: 780–790

Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9: 447–453

Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, Dandekar S. Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *J. Virol.* 2008; 82: 538–545

Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012; 2

Sirianni MC, Mezzaroma I, Aiuti F, Moretta A. Analysis of the cytolytic activity mediated by natural killer cells from acquired immunodeficiency syndrome patients in response to phytohemagglutinin or anti-CD16 monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 1874–1878

Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SLH, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology* 2005; 42: 501–510

Souza-Fonseca-Guimaraes F, Parlato M, Philippart F, Misset B, Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Toll-like receptors expression and interferon- γ production by NK cells in human sepsis. *Critical care (London, England)* 2012; 16: R206

Stöhr W, Dunn D, Porter K, Hill T, Gazzard B, Walsh J, Gilson R, Easterbrook P, Fisher M, Johnson M, Delpech V, Phillips A, Sabin C. CD4 cell count and initiation of antiretroviral therapy: trends in seven UK centres, 1997-2003. *HIV Med.* 2007; 8: 135–141

Stojanovic A, Correia MP, Cerwenka A. Shaping of NK cell responses by the tumor microenvironment. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 2013; 6: 135–146

Stylianou E, Aukrust P, Kvale D, Müller F, Frøland SS. IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 116: 115–120

Subashini D, Dinesha TR, Gomathi S, Boobalan J, Swathirajan C, Samuel L, Poongulali S, Chitra D, Srirama R, Mothi S, Solomon SS, Solomon S, Saravanan S, Balakrishnan P. Mitochondrial dysfunction among HIV-1 infected patients of South India and evaluation of mitochondrial DNA as a biomarker of mitochondrial toxicity. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 45: 270–271

The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *The Lancet* 2008; 372: 293–299

ToVinh M, Hörr G, Dobrikova K, Gotter C, Rommel C, Hoffmeister C, Raabe J, Kaiser KM, Finnemann C, Bischoff J, Rieke GJ, Wilhelm C, Schmitt V, Möhl C, Aghabeig M, Schwarze-Zander C, Boesecke C, van Bremen K, Wasmuth J-C, Strassburg CP, Rockstroh JK, Spengler U, Krämer B, Nattermann J. Mitochondrial dysfunction contributes to impaired cytokine production of CD56 bright NK cells from HIV(+) individuals under effective antiviral therapy. *J. Infect. Dis.* 2022

Varma TK, Lin CY, Toliver-Kinsky TE, Sherwood ER. Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2002; 9: 530–543

Vingerhoets J, Bisalinkumi E, Penne G, Colebunders R, Bosmans E, Kestens L, Vanham G. Altered receptor expression and decreased sensitivity of T-cells to the stimulatory cytokines IL-2, IL-7 and IL-12 in HIV infection. *Immunol. Lett.* 1998; 61: 53–61

Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *European journal of immunology* 2014; 44: 1582–1592

Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (New York, N.Y.)* 2011; 331: 44–49

Waal Malefyt R de, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, Vries JE de. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 1991; 174: 915–924

Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* 2015; 6: 368

White AJ. Mitochondrial toxicity and HIV therapy. *Sexually transmitted infections* 2001; 77: 158–173

Whiteside TL, Herberman RB. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 1994; 1: 125–133

WHO. 2020. HIV/Aids. Verfügbar unter <https://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids/GHO/hiv-aids> (Zugriffsdatum: 03.05.2020)

Winnock M, Salmon-Céron D, Dabis F, Chêne G. Interaction between HIV-1 and HCV infections: towards a new entity? *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2004; 53: 936–946

Wong AHW, Williams K, Reddy S, Wilson D, Giddy J, Alter G, Ghebremichael M, Carrington MN, Ndung'u T, Walker BD, Altfeld M, Carr WH. Alterations in natural killer cell receptor profiles during HIV type 1 disease progression among chronically infected South African adults. *AIDS research and human retroviruses* 2010; 26: 459–469

Zaiatz-Bittencourt V, Finlay DK, Gardiner CM. Canonical TGF- β Signaling Pathway Represses Human NK Cell Metabolism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2018; 200: 3934–3941

Zheng X, Qian Y, Fu B, Jiao D, Jiang Y, Chen P, Shen Y, Zhang H, Sun R, Tian Z, Wei H. Mitochondrial fragmentation limits NK cell-based tumor immunosurveillance. *Nature immunology* 2019; 20: 1656–1667

Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva AV, Juhaszova M, Sollott SJ, Zorov DB. Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* 2018: 50–59

9. Danksagung

Für die große Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich bei allen bedanken, die auf verschiedenste Art und Weise zum Gelingen ebendieser beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jacob Nattermann. Ich bedanke mich für die Überlassung des Themas, den regelmäßigen Austausch und die hervorragende Betreuung. Die Gespräche über den Fortgang der Experimente mit stets konstruktiven Vorschlägen und Ideen haben mich sehr gefördert und immer wieder motiviert.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Michael. Deine gründliche Einführung in die Laborarbeit und deine Unterstützung haben mir sehr geholfen. Deine offene und unterhaltsame Art hat die vielen Stunden im Labor sehr bereichert. Auch bei den weiteren Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor, Claudia, Benjamin, Jan, Christoph und Kim bedanke ich mich für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Das nette Miteinander sowie die gute Atmosphäre haben die Arbeit sehr erleichtert.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums und der Erstellung dieser Arbeit. Eure enorme Unterstützung, die motivierenden Gespräche und das große Vertrauen in mich haben mir während des gesamten Studiums sehr geholfen.

Ein besonderer Dank geht an meine Freundin Maria, die immer an mich geglaubt und mich in jeder Situation unterstützt hat.

Danke!

10. Veröffentlichungen

ToVinh, M., **Hörr, G.**, Dobrikova, K., Gotter, C., Rommel, C., Hoffmeister, C., Raabe, J., Kaiser, K. M., Finnemann, C., Bischoff, J., Rieke, G. J., Wilhelm, C., Schmitt, V., Möhl, C., Aghabeig, M., Schwarze-Zander, C., Boesecke, C., van Bremen, K., Wasmuth, J. C., Strassburg, C. P., ... Nattermann, J. (2022). **Mitochondrial Dysfunction Contributes to Impaired Cytokine Production of CD56bright Natural Killer Cells From Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Under Effective Antiretroviral Therapy.** *The Journal of infectious diseases*, vol. 226,5 (2022): 901-906. doi:10.1093/infdis/jiac103

ToVinh, M.*, **Hörr, G.***, Hoffmeister, C., Dobrikova, K., Gotter, C., Raabe, J., Kaiser, K. M., Ahmad, S., Finnemann, C., Matejec, E., Hack, G., Bischoff, J., Rieke, G. J., Schwarze-Zander, C., Boesecke, C., van Bremen, K., Wasmuth, J. C., Eis-Hübinger, A. M., Streeck, H., Verhasselt, H. L., ... Nattermann, J. (2023). **HIV-Associated Microbial Translocation May Affect Cytokine Production of CD56bright NK Cells via Stimulation of Monocytes.** *The Journal of infectious diseases*, vol. 227,4 (2023): 577-582. doi:10.1093/infdis/jiac485

* gleichberechtigte Erstautoren