

# **Auswirkungen der HCMV-Infektion auf die Entwicklung und Funktion von Natürlichen Killerzellen: Entwicklung eines *in vitro* Modells**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Ricarda Ising**  
aus Ratingen

Düsseldorf, Oktober 2016

aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Markus Uhrberg

Korreferent: Prof. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2016

*Augen zu und tanzen*

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	VII
Summary .....	IX
1. Einleitung .....	11
1.1 Immunbiologische Grundlagen .....	11
1.1.1 HLA - Aufbau, Struktur & Funktion .....	14
1.1.2 Natürliche Killerzellen .....	16
1.1.2.1 Phänotyp, Entwicklung und Funktion .....	18
1.1.2.2 NK-Zell-Rezeptoren .....	20
1.1.2.2.1 NCR-Familie .....	23
1.1.2.2.2 LIR-Familie .....	24
1.1.2.2.3 NKG2-Familie .....	24
1.1.2.2.4 KIR-Familie .....	26
1.1.2.2.5 Lizenzierung .....	28
1.1.2.3 Effektormechanismen .....	29
1.1.2.3.1 Sekretorische Lyse .....	29
1.1.2.3.2 Nicht-sekretorische Lyse .....	30
1.1.2.3.3 ADCC .....	31
1.1.2.3.4 Zytokinexpression .....	31
1.1.2.4 Pathophysiologische Relevanz .....	32
1.1.2.4.1 Stammzelltransplantation .....	33
1.1.2.4.2 NK-Zellen als Therapeutika .....	33
1.1.2.5 NK-Zellgenerierung <i>in vitro</i> .....	34
1.2 Virologische Grundlagen .....	35
1.2.1 Das humane Zytomegalievirus .....	35
1.2.1.1 Pathologie .....	37
1.2.1.1.1 Therapie .....	38
1.2.1.2 Aufbau und Struktur .....	39
1.2.1.3 Wachstumszyklus und Genregulation .....	40
1.2.1.4 Immunabwehr, Immunevasion und Effektormechanismen .....	42
1.2.1.4.1 Zellvermittelte Immunität .....	42
1.2.1.4.2 Humorale Immunität .....	43
1.2.1.4.3 Immunevasionsstrategien .....	43
1.2.1.5 HCMV und NK-Zellen .....	46
1.2.1.5.1 HCMV <i>in vitro</i> .....	49

1.3 Ziel dieser Arbeit .....	51
2. Material und Methoden .....	52
2.1 Material.....	52
2.1.1 Antikörper .....	52
2.1.2 Chemikalien, Medien und Puffer .....	54
2.1.2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	54
2.1.2.2 Medien.....	55
2.1.2.2.1 Standardmedium .....	55
2.1.2.2.2 Einfriermedium.....	55
2.1.2.2.3 MSC-Medium.....	55
2.1.2.2.4 NK-Medium.....	56
2.1.2.2.5 NK-Generierungsmedium .....	56
2.1.2.3 Puffer .....	57
2.1.2.3.1 Färbepuffer .....	57
2.1.2.3.2 MACS-Puffer.....	58
2.1.2.3.3 TBE-Puffer .....	58
2.1.3 Geräte .....	58
2.1.4 Kits.....	58
2.1.5 Plastik.....	59
2.1.6 Primer.....	59
2.1.7 Software .....	60
2.1.8 Viren .....	60
2.1.9 Zellen .....	61
2.1.9.1 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen .....	61
2.1.9.2 K562.....	62
2.1.9.3 Lymphoide Tumorzelllinie 721.221-HLA-E-Transfektante .....	62
2.1.9.4 Mesenchymale Stammzellen.....	62
2.1.9.5 MRC-5 Lungenfibroblasten .....	63
2.2 Methoden .....	63
2.2.1 Antikörpermarkierung von Zellen .....	63
2.2.2 DNA-Isolation aus Vollblut.....	64
2.2.3 Durchflusszytometrie .....	64
2.2.4 Gelelektrophorese .....	65
2.2.5 Infektion von MSC/MRC-5 mit HCMV .....	65
2.2.6 Isolation von HSPC aus Nabelschnurblut.....	66

2.2.7 Kokultur/Generierungskultur .....	66
2.2.7.1 NK-Zellgenerierung im <i>Transwells</i> system .....	67
2.2.7.2 NK-Zellgenerierung nach durchflusszytometrischer Zellsortierung.....	68
2.2.7.3 Kokultur von generierten NK-Zellen auf MRC-5 oder 721.221-HLA-E- Transfektanten .....	68
2.2.8 Polymerasekettenreaktion - KIR/HLA-C-Typisierung.....	69
2.2.9 Statistik .....	72
2.2.10 Zellkultur.....	72
2.2.10.1 Zellen auftauen und in Kultur nehmen.....	72
2.2.10.2 Zellen füttern, Medium wechseln.....	72
2.2.10.3 Zellen passagieren .....	72
2.2.10.4 Zellen einfrieren .....	73
2.2.11 Funktionsassays .....	73
2.2.11.1 Der CD107-Degranulationsassay .....	73
2.2.11.2 Der CFSE-Zytotoxizitätsassay .....	74
3. Ergebnisse .....	76
3.1 Etablierung einer HCMV-infizierten Stammzellnische für ein humanes NK- Zellgenerierungsmodell .....	76
3.1.1 HLA-C-Expression im Fall einer HCMV-Infektion.....	79
3.2 Die <i>in vitro</i> NK-Zelldifferenzierung in einer HCMV-infizierten Stammzellnische .....	83
3.2.1 Einfluss der HCMV-Infektion auf die Effektivität der NK-Zellgenerierung auf MSC.....	83
3.2.2 Die Erneuerung der MSC während der Generierung hat sowohl positive als auch negative Effekte .....	86
3.2.3 Die HCMV-Infektion der MSC führt zu einer Steigerung der Expression des inhibitorischen Rezeptors NKG2A .....	87
3.2.3.1 Welchen Einfluss hat die Viruskonzentration auf die NKG2A-Expansion? ....	88
3.2.3.2 Die HCMV-Infektion stimuliert die NKG2A-Expansion bereits zu Beginn der NK-Zelldifferenzierung.....	89
3.2.4 HCMV beeinflusst die Expression weiterer NK-Zellrezeptoren .....	93
3.2.5 Eine direkte Infektion der HSPC und NK-Zellen mit AD169 ist nicht möglich. ....	97
3.2.6 Die Veränderungen des NK-Zellrezeptorrepertoires werden sowohl durch Zell-Zell- Kontakt als auch durch lösliche Faktoren beeinflusst.....	98
3.2.7 Reifegrad der <i>in vitro</i> differenzierten NK-Zellen .....	100
3.2.8 Funktionalität der <i>in vitro</i> generierten NK-Zellen .....	101
3.2.9 Zelluläre Zusammensetzung der Generierungskultur .....	103
3.2.10 NKG2A-expandede NK-Zellen sind funktional aktiver.....	106

3.3 Späte NK-Zellentwicklung .....	110
4. Diskussion .....	114
4.1 Analyse eines <i>in vitro</i> Generierungsmodells für die frühe NK-Zellentwicklung.....	114
4.1.1 HCMV-infizierte MSC stellen ein geeignetes <i>in vitro</i> Modell für die frühe, nicht aber für die terminale NK-Zelldifferenzierung dar .....	116
4.1.2 Transition von NKG2A- zu NKG2C-exprimierenden NK-Zellen: Welche Schlüsse lässt das <i>in vitro</i> Modell zu? .....	116
4.2 Immunsystem versus HCMV – Studie eines evolutionären Wettrüstens.....	118
4.3 <i>In vitro</i> generierte NK-Zellen aus einer HCMV-infizierten Stammzellnische und NK- Zellen aus HCMV-seropositiven Kindern im Vergleich .....	121
4.4 NK-Gedächtniszellen – Konkurrenz für NKG2C! Welche Rolle spielen die aktivierenden Rezeptoren CD16, NKp46 und NKG2D .....	123
4.4.1 CD16.....	123
4.4.2 NKp46.....	124
4.4.3 NKG2D .....	125
4.5 Kontrolle des HLA-Klasse I-Profiles – Ein Virus auf der Flucht. ....	127
4.6 Lizenzierung – Wie gut sind die <i>in vitro</i> generierten NK-Zellen „geschult“? .....	127
4.7 Einsatz der <i>in vitro</i> generierten NK-Zellen als Immuntherapeutika.....	129
4.8 Das humane Zytomegalievirus – Freund oder Feind? .....	130
4.9 Ausblick.....	134
Abkürzungsverzeichnis .....	136
Literaturverzeichnis.....	144
Danksagung.....	171
Eidesstattliche Erklärung.....	173

## Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Sie bilden eine Untergruppe der Lymphozyten und sind an der Immunabwehr von Virusinfektionen und Tumoren beteiligt. Zirka 15% der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten sind NK-Zellen. Darüber hinaus sind sie auch in sekundären lymphatischen Geweben angesiedelt. Ihre zytotoxische Aktivität wird über die Balance der Signale ihrer stimulierenden Rezeptoren, welche Liganden auf infizierten oder entarteten Zellen erkennen und inhibierenden Rezeptoren, die die Humanen Leukozyten Antigene-(HLA) Klasse I-Moleküle spezifisch binden, vermittelt. Überdies beeinflussen die NK-Zellen das adaptive Immunsystem indem sie Zytokine sezernieren.

Das humane Zytomegalievirus (*human cytomegalovirus*; HCMV) ist ein  $\beta$ -Herpesvirus, das ein Leben lang in seinem Wirt persistiert. Dieses weit verbreitete Pathogen infiziert je nach geographischer Lage und sozioökonomischem Umfeld 30-100% der Bevölkerung. Für Gesunde ist eine Infektion in der Regel asymptomatisch, aber sie ist die häufigste infektiöse Ursache für Geburtsfehler und ein wichtiger Faktor für die Morbidität und Sterblichkeitsrate nach einer Knochenmarktransplantation. HCMV repliziert in verschiedenen Zelltypen und wird über Körperflüssigkeiten verbreitet.

Um sich vor der T-Zell vermittelten Immunantwort zu schützen reduzieren mit dem HCMV infizierte Zellen die Expression der HLA-Klasse I-Moleküle. Diese Strategie macht die infizierten Zellen jedoch angreifbar gegenüber NK-Zellen. Diese detektieren das Fehlen der HLA-Klasse I-Moleküle über Vertreter zweier Rezeptorfamilien, die konservierten Killerzell-лектinähnlichen Rezeptoren (*killer cell group antigen 2*; NKG2) und die hochgradig polymorphen Killerzell-immunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIR). Beide werden klonal exprimiert und kreieren ein diversifiziertes NK-Zell-Rezeptorrepertoire. Jüngste Studien belegen, dass dieses Repertoire durch eine HCMV-Infektion verändert werden kann. Einige infizierte Individuen zeigen eine klonale Expansion von NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen mit gleichzeitiger Expression inhibierender KIR die spezifisch die eigenen HLA-Klasse I-Liganden binden. Darüber hinaus scheinen diese NK-Zellen einen reiferen Phänotyp zu besitzen und werden zu den NK-Gedächtniszellen (“*memory*” NK-Zellen) gerechnet.

Während dieses Projekts lag das Interesse darin, neue Erkenntnisse über die Interaktion der NK-Zellen mit diesem klinisch höchst relevanten Pathogen zu gewinnen. Dafür wurde ein *in vitro* Modell etabliert um die Interaktion von sich entwickelnden NK-Zellen mit einer HCMV-infizierten Stammzellnische zu erforschen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*; MSC) aus puerilem Knochenmark eine Stammzellnische bilden, die die Zelldifferenzierung zu reifen NK-Zellen unterstützt (Brands, 2014). In dieser Arbeit wurden hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (*hematopoietic stem and progenitor cells*; HSPC) aus Nabelschnurblut isoliert, magnetisch angereichert und anschließend auf *in vitro* mit dem HCMV-Stamm AD169 infizierten MSC kokultiviert. Die Kokultur mit HCMV-infizierten MSC führte zu einer signifikant beschleunigten NK-Zelldifferenzierung. Diese zeichnete sich durch einen hohen Prozentsatz NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt der Generierung aus. Außerdem konnten höhere Frequenzen CD16<sup>+</sup>-NK-Zellen sowie eine gesteigerte NKG2D-Expression festgestellt werden, die ebenfalls für eine beschleunigte Reifung sprechen.

Umplattierungsexperimente zeigten, dass ein HCMV-infiziertes Milieu bereits in der ersten Woche der Differenzierung ausschlaggebend ist um eine gesteigerte NKG2A-Expression zwischen der zweiten bis vierten Woche auszulösen. Des Weiteren wurden drei verschiedene NK-Zellentwicklungsstadien durchflusszytometrisch sortiert und gleichfalls auf infizierten und nicht-infizierten MSC kokultiviert. Auch hier zeigte sich, dass nur HSPC, die dem Einfluss des HCMV ausgesetzt waren, eine beschleunigte Entwicklung durchliefen. Eine HCMV-Infektion scheint also vor allem für die frühe NK-Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle zu spielen.

Es wurde außerdem untersucht, in wie weit direkter Zell-Zell-Kontakt für die beobachteten Veränderungen nötig ist. Mit *Transwelleinsätzen* wurden die HSPC räumlich von den infizierten MSC getrennt, während lösliche Faktoren wie Typ-I-Interferone (IFN), weiterhin ungehindert ausgetauscht werden konnten. Das Ergebnis zeigt, dass sowohl lösliche Faktoren als auch der direkte Zell-Zell-Kontakt die NKG2A-Expansion nach einer HCMV-Infektion fördern.

Funktionale Assays zeigten zudem eine höhere Zytokinproduktion (IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) sowie eine gesteigerte zytotoxische Aktivität wenn die generierten NK-Zellen sich in der Anwesenheit des HCMV entwickelten.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein *in vitro* Modell für die Interaktion von sich entwickelnden NK-Zellen mit einer HCMV-infizierten Stammzellnische etabliert werden, mit dem neue Erkenntnisse über den Einfluss des HCMV auf die NK-Zellentwicklung gewonnen wurden.

## Summary

Natural killer (NK) cells are innate immune cells, a subpopulation of lymphocytes, defending virus infections and tumors. They comprise up to 15% of peripheral blood lymphocytes and are found in secondary lymphoid tissues as well. The NK cell cytotoxicity is mediated by a balance between signals transmitted by activating receptors, which recognize ligands on tumors and virus-infected cells and inhibitory receptors specific for human leukocyte antigens (HLA) class I molecules. Furthermore, NK cells are involved in shaping adaptive immune responses through their production of cytokines.

The Human cytomegalovirus (HCMV) is a  $\beta$ -herpes virus that establishes a lifelong persistent infection. It is a widespread pathogen and depending on geographical location and socioeconomic factors, 50 to 100% of all humans are infected. In healthy hosts, an infection is usually asymptomatic but it represents the major infectious cause of birth defects and is an important cause of morbidity and mortality following bone marrow transplantation. HCMV replicates in different cell types and is commonly transmitted by secretion.

To protect itself from T cell immune response, HCMV-infected cells downregulate classical HLA class I molecules. However, this immune evasion strategy makes the infected cells susceptible to lysis by NK cells, which recognize missing HLA class I molecules via specific cell surface receptors of two families, the conserved killer cell lectin-like receptors (killer cell group antigen 2, NKG2) and the highly polymorphic killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). Of note, both KIR and NKG2 receptors are clonally expressed and together constitute a highly variable NK cell repertoire. Recent studies show that indeed the composition of this repertoire can be altered by HCMV infection. Some infected individuals show clonal expansions of NKG2C<sup>+</sup> NK cells co-expressing inhibitory KIR for self-HLA class I ligands. Furthermore it seems that these NK cells present a more mature phenotype, sometimes referred to as “memory” NK cells.

During this project, gaining novel insights into the interaction of NK cells and this clinically highly relevant pathogen was the main interest. Therefore an *in vitro* model to investigate the interaction between developing NK cells and an HCMV-infected stem cell niche was established.

It was previously elaborated that mesenchymal stem cells (MSC) from puerile bone marrow constitute a suitable human stem cells niche to promote NK cell differentiation towards mature NK cells (Brands, 2014). To this end, hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) from cord blood were isolated, magnetically enriched and subsequently co-cultivated on MSC that

were *in vitro* infected with the HCMV strain AD169. Co-culture with HCMV-infected MSC led to significantly accelerated NK cell differentiation, characterized by a high percentage of NKG2A<sup>+</sup> NK cells at early time points. Furthermore we observed a higher frequency of CD16<sup>+</sup> NK cells and enhanced NKG2D expression again suggestive of an accelerated NK cell differentiation process.

Interestingly, in replating experiments an HCMV-infected environment was primarily important during the first week of differentiation, which was sufficient to cause considerable alterations in the NK cell repertoire of the emerging mature NK cells during weeks 2-4. Furthermore three different NK cell developmental stages were isolated by flow cytometric cell sorting and likewise co-cultured with infected and uninfected MSC, respectively. Again, only hematopoietic progenitors exposed to HCMV at the earliest stage were able to trigger accelerated NK cell differentiation, pointing towards an important role of HCMV especially at early time points of NK cell development.

Moreover, we analyzed whether a direct cell-cell contact between MSC and HSPC is necessary to induce the observed developmental changes. Therefore we used transwell plates preventing direct cell contact but enabling exchange of soluble factors such as type I interferons. The result determined that soluble factors are sufficient to promote the NKG2A expansion but for a greater yield, additional cell-cell-contact is necessary.

Besides, functional assays demonstrated a higher cytokine production (interferon- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and cytotoxicity of NK cells developing *in vitro* within the presence of HCMV.

In conclusion, a co-culture system for the interaction of developing NK cells and HCMV infected MSC was established and used to gain novel insight in how HCMV influences NK cell differentiation.

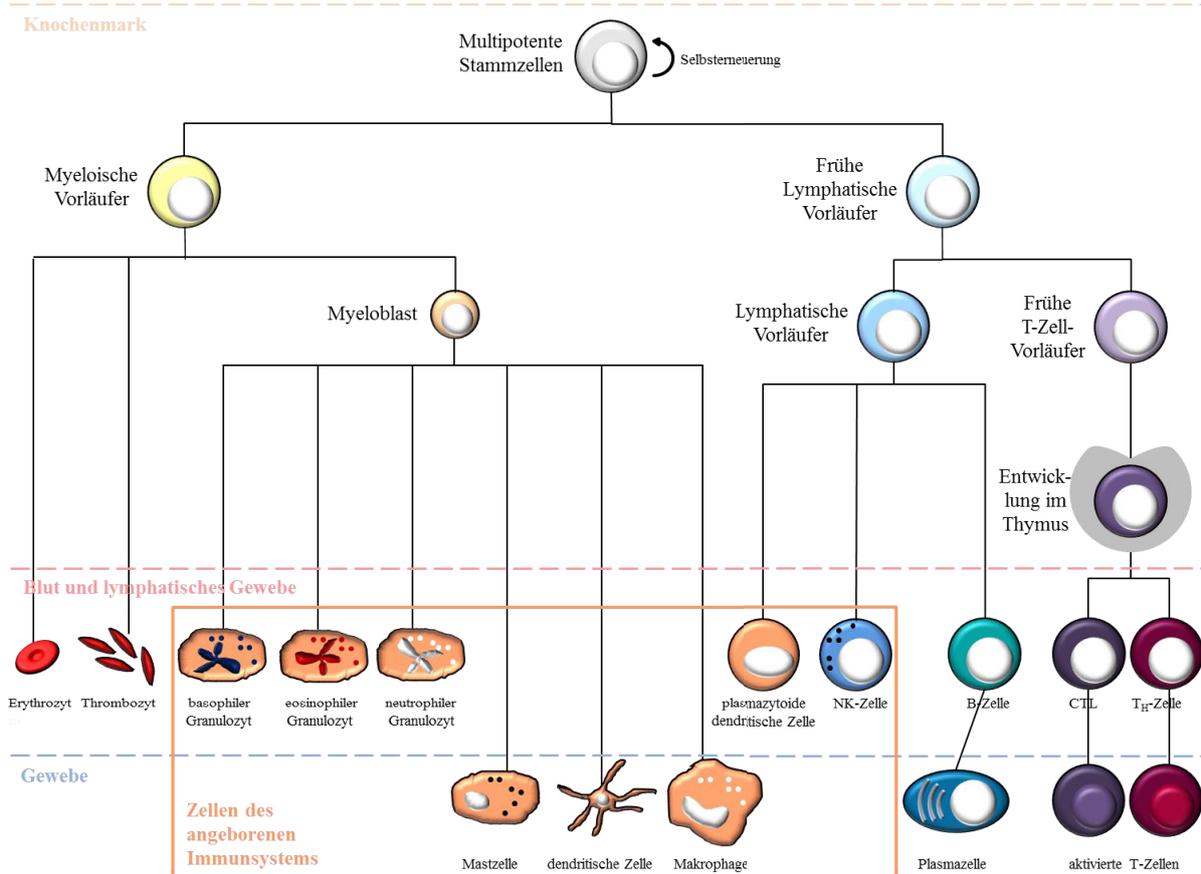
# 1. Einleitung

## 1.1 Immunbiologische Grundlagen

Das menschliche Immunsystem lässt sich in zwei, miteinander interagierende Komponenten gliedern: das angeborene und das adaptive Immunsystem. Beide bestehen aus verschiedenen, hochspezialisierten Zellen und Botenstoffen, die im Falle einer Infektion die Erreger bekämpfen und die Krankheit eindämmen können. Das angeborene Immunsystem ist unspezifisch, reagiert sofort und hat im Allgemeinen kein „Gedächtnis“. Es setzt sich aus verschiedenen Zellen und einer Reihe löslicher Bestandteile zusammen. Dazu gehören u. a. Granulozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie Lysozyme, Defensine, Interferone und das Komplementsystem (Abb. 1) (Murphy et al., 2009; Rink et al., 2012).

Im Gegensatz dazu reagiert das adaptive Immunsystem verzögert, aber spezifisch. Darüber hinaus ist es dazu fähig sich an bestimmte Pathogene zu „erinnern“ und bei einer neuerlichen Infektion schneller und gezielt auf sie zu reagieren und somit den Ausbruch der Krankheit zu verhindern. Diese „Gedächtnisleistung“ ist die Grundlage für das Prinzip der Vakzination. Bei einer Impfung wird das Immunsystem absichtlich mit einem modifizierten Erreger in Kontakt gebracht, um bei einer natürlichen Infektion mit Selbigem vorbereitet zu sein und eine Erkrankung zu verhindern. Zu diesem System zählen T- und B-Zellen, sowie Antikörper (Abb. 1) (Murphy et al., 2009; Rink et al., 2012).

Immunzellen entstehen im lymphatischen System, welches unterteilt wird in zentrale (primäre) und periphere (sekundäre) lymphatische Organe. Zu Ersteren zählen das Knochenmark und der Thymus. Während die Entwicklung und Reifung der Immunzellen im Knochenmark beginnt, wandern die Vorläufer der T-Zellen in den Thymus, um dort zu immunkompetenten Zellen zu reifen. Über die Blutbahn gelangen die Zellen des Immunsystems zum Ort einer Infektion oder in die peripheren lymphatischen Organe (u. a. Lymphknoten und Milz). Während die Vertreter des angeborenen Immunsystems direkt am Ort der Infektion eingreifen, wandern die naiven T- und B-Lymphozyten in die peripheren lymphatischen Organe ein und lösen, nach einer entsprechenden Stimulation mit Fremdanitgenen, die adaptive Immunantwort aus (Rink et al., 2012).



**Abb. 1 Die Hämatopoese.** Die meisten Zellen des Blutes haben nur eine kurze Halbwertszeit und müssen ständig erneuert werden. Daher werden täglich mehrere Milliarden Blutzellen neu gebildet. Damit ist das blutbildende System eines der sich am schnellsten regenerierenden Organe des menschlichen Körpers. Der Ursprung jeder Blutzelle ist eine hämatopoetische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*; HSC). Diese HSC befinden sich im Knochenmark, in der sog. Knochenmarknische. In dieser Nische wird die Zellteilung und -differenzierung der HSC penibel reguliert. Dabei ist der Zell-Zell-Kontakt über Adhäsionsmoleküle, aber auch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren und Botenstoffen entscheidend. Aufgrund der Umgebungssignale in der Knochenmarknische teilen sich die HSC entweder symmetrisch und halten somit die Gesamtmenge der HSC konstant, oder sie polarisieren und teilen sich asymmetrisch. Dabei behält eine der beiden Tochterzellen ihre Stammzeleigenschaften während die andere den Weg der Blutzellbildung beginnt. Zunächst entsteht entweder eine myeloische (*common myeloid progenitor*; CMP) oder eine lymphatische (*common lymphoid progenitor*; CLP) Vorläuferzelle. Über verschiedene Entwicklungsstufen bilden die CMP die sauerstofftransportierenden Erythrozyten, die an der Blutgerinnung beteiligten Thrombozyten, aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems wie Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und Makrophagen. Mit jedem weiteren Entwicklungsschritt nimmt das Differenzierungspotenzial weiter ab. Dies gilt auch für die Reifung der CLP. Sie bilden die, dem adaptiven Immunsystem zugehörigen, B- und T-Zellen sowie die, der angeborenen Immunität zugeordneten, NK-Zellen. CTL: zytotoxische T-Zelle; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; T<sub>H</sub>-Zelle: T-Helfer-Zelle. Verändert nach Rink et al., 2012 (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 2001; Kondo et al., 1997).

„Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie des Körpers“ (Rink et al., 2012 S.5, Z. 30ff). Sobald Pathogene die äußeren Barrieren (Haut, Schleimhaut etc.) des Menschen überwunden haben und körpereigene Zellen verletzt werden, bzw. Tumorzellen intaktes Gewebe verdrängen, werden lokale Immunzellen aktiviert. Die betroffene Region wird stärker durchblutet und die Blutgefäße werden durchlässiger, damit weitere Immunzellen einwandern können (Munk, 2010). Die ersten immunologischen Zellen am Ort der Infektion sind Phagozyten (z.B. neutrophile Granulozyten). Sie werden von Monozyten, die zu Makrophagen

reifen, unterstützt. Dendritische Zellen nehmen, durch Pinozytose größere Mengen Flüssigkeit und somit darin enthaltene Toxine, Viren etc. auf, die sie so unschädlich machen. Diese Zellen vermitteln außerdem Informationen, wie Art und Ursprung der Infektion, zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Die vierte Zellpopulation des angeborenen Immunsystems sind die **natürlichen Killerzellen**. Sie bekämpfen intrazellulär lebende Parasiten, vornehmlich Viren, aber auch Tumorzellen durch zytotoxische Mechanismen. Des Weiteren unterstützen lösliche Faktoren die Immunabwehr (Munk, 2010; Murphy et al., 2009). Können Krankheitserreger nicht in erster Instanz abgewehrt werden schreitet das adaptive Immunsystem ein (Mackay, 1970; Rink et al., 2012). Parallel zu der angeborenen Immunantwort werden Fragmente der oder ganze Pathogene z.B. von dendritischen Zellen in das nächstgelegene lymphatische Gewebe überführt. Über den Blutstrom gelangen auch die Zellen des adaptiven Immunsystems, T- und B-Zellen (zählen zu den Lymphozyten), dorthin. Die dendritischen Zellen präsentieren im Folgenden die Antigene der Pathogene, welche von den Lymphozyten mit Hilfe ihrer spezifischen Rezeptoren identifiziert werden können. B-Zellen exprimieren antigenspezifische Rezeptoren, sogenannte (sog.) Immunglobuline, und sezernieren Antikörper, die die dreidimensionale Struktur von Antigenen erkennen. T-Zellen hingegen identifizieren Antigene, welche von Haupthistokompatibilitätskomplex- (*major histocompatibility complex*; MHC) Molekülen auf der Zielzelloberfläche präsentiert werden. Beim Vorhandensein additiver Stimulanzen werden die Lymphozyten aktiviert, proliferieren und differenzieren. Die so entstandenen Effektorzellen gelangen zurück in den Blutkreislauf und erreichen, geleitet von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen das infizierte Gewebe, wo sie die Abwehr unterstützen (z.B. durch zellvermittelte Zytotoxizität) (Rink et al., 2012). Dieser sog. primären Immunantwort steht ein weiterer Mechanismus gegenüber. Um im Falle einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger vorbereitet zu sein, wandelt sich ein gewisses Kontingent der antigenspezifischen Lymphozyten in Gedächtniszellen um. Ein zweiter Ausbruch der Erkrankung wird somit verhindert, oder der Verlauf zumindest erheblich gemildert, da die Immunreaktion schneller stattfindet und die Pathogene bereits am Eintrittsort eliminiert werden können. Dieser Vorgang wird als sekundäre Immunantwort bezeichnet (Munk, 2010; Murphy et al., 2009).

Die Immunologie, als eigenständige Wissenschaft, ist noch recht jung. Dennoch hat sie die medizinische und naturwissenschaftliche Grundlagenforschung maßgeblich vorangebracht. Um Erkrankungen vollends verstehen und behandeln zu können, muss auch das Immunsystem in die Forschung mit einbezogen werden. Schon heute gibt es etablierte immunologische Therapien beispielsweise für chronisch-entzündliche, oder Tumorerkrankungen. Daneben sind

immunologische Testverfahren ein wichtiges diagnostisches Instrument. Sein wohl populärster Vertreter ist der Schwangerschaftstest (Rink et al., 2012).

In vielen medizinischen Disziplinen spielt die Immunologie eine wichtige Rolle, zum Beispiel in der Krebsforschung, bei Autoimmun- und Infektionserkrankungen, oder in der Transplantationsmedizin. Und häufig sind die Zusammenhänge so eng verknüpft, dass es Überschneidungen zwischen verschiedenen Fachbereichen gibt. Mit der Impfung gegen humane Papillomviren gelingt es beispielsweise die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Gebärmutterhalskrebs zu senken. Hier überschneiden sich die Virologie, Onkologie und Immunologie (Rink et al., 2012). Neu erworbenes Wissen wird genutzt, um Therapeutika, Diagnostika und Impfstoffe herzustellen. In Zukunft könnte es möglich sein, Krankheiten, die heute noch unheilbar sind, durch die gezielte Manipulation des Immunsystems zu behandeln. So könnte, das Immunsystem dazu angeregt werden, Tumore abzustößt, tolerant gegenüber Autoantigenen und Allergenen, oder gegenüber Transplantaten zu sein.

### 1.1.1 HLA - Aufbau, Struktur & Funktion

Für das Immunsystem ist es essentiell zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden zu können. Spezielle Glykoproteine, die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), die auf der Oberfläche nahezu aller Körperzellen zu finden sind, helfen dabei. Bei Menschen liegt der MHC auf Chromosom 6. Er ist ungefähr 3,6 Megabasen lang und wird in drei Abschnitte unterteilt. Die Regionen I und II kodieren für eine wichtige Gruppe antigenpräsentierender Proteine, die MHC-Moleküle. Entsprechend ihrer Regionen werden zwei Arten unterschieden, die MHC-Klasse I- und die MHC-Klasse II-Moleküle, welche beide zur Immunglobulinsuperfamilie gehören (Rink et al., 2012). Erstere werden auf allen kernhaltigen Körperzellen und Thrombozyten exprimiert. Sie präsentieren Fragmente körpereigener und körperfremder Proteine (z.B. von Viren, Bakterien oder Tumoren) endogener Herkunft. Zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL; CD8<sup>+</sup>-T-Zellen; *cluster of differentiation*; CD) registrieren ausschließlich den Komplex aus MHC-Klasse I-Molekül und Peptidfragment, nicht jedoch das alleinige Peptid, und lösen im Gefahrenfall eine Immunreaktion aus. MHC-Klasse II-Moleküle werden hingegen ausschließlich von antigenpräsentierenden Zellen (z.B. Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen) exprimiert und präsentieren exogene Antigene an T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen), welche eine Immunreaktion über Zytokine koordinieren. Die dritte Region des MHC enthält Gene, deren Proteine sowohl an der Antigenprozessierung und -präsentation beteiligt sind, als auch andere

immunologisch bedeutende Aufgaben übernehmen, wie der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), der Fieber auslöst und verschiedene Immunzellen anregt (Munk, 2010; Murphy et al., 2009).

Im humanen System heißen die MHC-Moleküle humane Leukozytenantigene (HLA). Der Mensch besitzt Gene für acht verschiedene HLA-Klasse I-Proteine (Polygenie), die sich durch einen hohen Polymorphismus auszeichnen. Die drei klassischen HLA-Klasse I-Moleküle sind HLA-A, HLA-B und HLA-C. Diese sind wichtige Faktoren für die Antigenpräsentation bei Infektionen und Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen. Außerdem gibt es die nicht-klassischen Vertreter der HLA-Klasse-I-Moleküle HLA-E, -F und -G. Zu ihnen zählen darüber hinaus auch die MHC-Klasse I-Kette-ähnlichen-Proteine (*MHC class I chain related*; MIC) A und B (Munk, 2010; Murphy et al., 2009; Rink et al., 2012). Diese Vielfalt durch Polygenie und Polymorphismen bietet den Vorteil, dass bei Epidemien nie alle Menschen gleich anfällig für einen Erreger sind und somit der Fortbestand der Spezies gesichert ist (Rink et al., 2012).

HLA-Klasse I-Moleküle bestehen aus einer dreigliedrigen  $\alpha$ -Kette ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ), die in der Plasmamembran verankert ist. Daran assoziiert ein  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ). In der Bindungsgrube zwischen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  werden Peptidfragmente von 8-9 Aminosäuren Länge präsentiert und somit der immunologische Status der Zelle angezeigt. Die neu gebildeten  $\alpha$ -Ketten durchlaufen eine Reihe wichtiger Prozessionsschritte ehe sie ein Repertoire endogener Peptide auf der Zelloberfläche präsentieren können. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) binden sie an das Chaperonprotein Calnexin, welches für die korrekte Faltung, die Ausbildung von Disulfidbrücken und die Bindung von  $\beta_2m$  Sorge trägt. Im Anschluss stabilisiert das Glykoprotein Tapasin die Bindungsgrube des HLA-Klasse I-Moleküls und unterstützt die Bindung an den TAP-Komplex. Der TAP-Komplex ist ein Heterodimer, bestehend aus TAP-1 und TAP-2. Beide Proteine (TAP-1/2) besitzen jeweils eine Transmembrandomäne, die gemeinsam eine Pore in der ER-Membran formen, durch die Peptide zur Beladung des HLA-Klasse I-Moleküls transportiert werden können (Munk, 2010; Murphy et al., 2009).

Proteine die im Zytosol der Zelle vorliegen (endogen, innerhalb der Zelle), sowohl körpereigene, als auch solche, die von Pathogenen gebildet, oder durch Entartung ungewöhnlicher Weise exprimiert werden, können durch Ubiquitinierung in Proteasomen abgebaut werden. Die so entstandenen Peptide werden mit Hilfe des TAP-Komplexes in das ER transportiert. Dort gelangen sie zu den bereitgestellten (klassischen) HLA-Klasse I-Molekülen. Bei ausreichender Affinität besetzt ein Peptid die HLA-Klasse I-Bindungsgrube und stabilisiert nun ihrerseits das HLA-Klasse I-Molekül, welches von seinem Chaperon dissoziiert und über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche gelangt (Munk, 2010; Murphy et al., 2009).

HLA-E präsentiert seinerseits die Signalpeptide der klassischen HLA-Moleküle und offenbart so indirekt, ob die HLA-Klasse I-Expression normal verläuft (Finton & Strong, 2012; N. Lee et al., 1998). In Stresssituationen kann HLA-E aber auch Peptide von Hitzeschockproteinen, oder Pathogenen tragen (Finton & Strong, 2012; van Hall et al., 2010). HLA-F wird mit verschiedenen Krankheitsstadien in Verbindung gebracht und gilt als Marker für aktivierte Lymphozyten (Finton & Strong, 2012; N. Lee et al., 2010). Auf Trophoblasten findet sich eine große Anzahl von HLA-G-Molekülen. Sie spielen eine zentrale Rolle für die immunologische Toleranz von Mutter und Fötus (Finton & Strong, 2012; Rouas-Freiss et al., 1997).

Das von den HLA-Klasse I-Molekülen präsentierte Peptidspektrum kann sich durch virale Infektionen, oder maligne Entartung, verändern. Zytotoxische T-Zellen sind darauf spezialisiert, diese Veränderungen zu erkennen und entsprechende Zellen unschädlich zu machen. Darüber hinaus sind HLA-Klasse I-Moleküle auch ein wichtiger Signalgeber für die, dem angeborenen Immunsystem zugeordneten, Natürlichen Killerzellen (Rink et al., 2012).

### 1.1.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie verhindern die Ausbreitung intrazellulär lebender Parasiten, wie Bakterien, Viren und Protozoen, aber auch von entarteten Zellen (Tumoren), in dem sie erkrankte Zellen identifizieren und eliminieren. Wie die T- und B-Zellen gehören auch NK-Zellen zu den Lymphozyten, einer Untergruppe der Leukozyten. Ihre Entwicklung startet im Knochenmark und wird im sekundären/peripheren lymphatischen Gewebe fortgesetzt, wo sie zu großen (~15µm), granulären Lymphozyten heranreifen (Freud et al., 2006; Modrow et al., 2010). Im peripheren Blut zirkulieren ca. zwei Milliarden NK-Zellen, die sich anhand ihrer Oberflächenproteine (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> und CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) in zwei verschiedene Populationen einteilen lassen (Blum & Pabst, 2007; Cooper et al., 2001a; Lanier et al., 1986). Dieses Phänomen lässt sich aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine zweistufige Ausreifung der NK-Zellen zurückführen. IL-15 induziert über den IL-15-Rezeptor (IL-15R) die Reifung zu CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, also NK-Zellen die große Mengen CD56 exprimieren. Die Entstehung der CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen (exprimieren im Vergleich zu CD56<sup>bright</sup> wenig CD56) ist noch nicht hinreichend geklärt, man geht jedoch davon aus, dass es sich um eine höhere Differenzierungsstufe der CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen handeln muss (Caligiuri, 2008; Chan et al., 2007; Cooper et al., 2001a; Lanier et al., 1986; Romagnani et al., 2007).

NK-Zellen exprimieren neben CD56 eine Vielzahl aktivierender und inhibierender Oberflächenrezeptoren, mit deren Hilfe sie körpereigene und körperfremde Zellen

unterscheiden können. Für die Lyse etwaiger Zielzellen enthalten sie zytotoxische Granula. Außerdem bilden NK-Zellen ein Reservoir für immunregulatorische Zytokine. Letztere dienen der Rekrutierung von weiteren Immunzellen und sind ein Kommunikationsmittel zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. In einem gesunden Menschen sind durchschnittlich 5-15% der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten NK-Zellen (Cooper et al., 2001a; Modrow et al., 2010; Robertson & Ritz, 1990).

NK-Zellen wurden ursprünglich wegen ihrer Fähigkeit Tumorzellen zu eliminieren entdeckt. 1975 beobachteten Kiessling und seine Kollegen, natürlich vorkommende Killerlymphozyten aus der Maus, die, *in vitro*, Moloney-Leukämie-Zellen töteten. Aufgrund ihrer Verteilung in verschiedenen Organen und anhand ihrer Oberflächenmarker konnten sie eindeutig von Monozyten, T- und B-Zellen abgegrenzt werden (Kiessling et al., 1975b). Diese neu entdeckte Lymphozytenpopulation zeichnete sich durch ihre spontane und selektive zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen aus (Kiessling et al., 1975a).

Welcher Mechanismus es den NK-Zellen erlaubt, entartete von gesunden Zellen zu unterscheiden blieb vorerst ein Rätsel, bis Klas Kärre 1981 in seiner Doktorarbeit eine bahnbrechende Hypothese formulierte. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde angenommen, dass NK-Zellen nach einem ähnlichen Prinzip wie T-Zellen agieren, dass sie also Fremddantigene auf der Zielzelle detektieren. Kärre zog jedoch in Betracht, dass es sich möglicherweise genau andersherum verhält, dass nämlich NK-Zellen das Fehlen bestimmter Informationen auf der Oberfläche ihrer Zielzellen feststellen können. Er ging davon aus, dass die Abwesenheit bzw. die unvollständige Expression von MHC-Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche der Wirtszellen selbige für NK-Zellen anfällig macht. Diese Theorie ist nunmehr bekannt als „*missing self*“-Hypothese (Kärre, 1985, 2002).

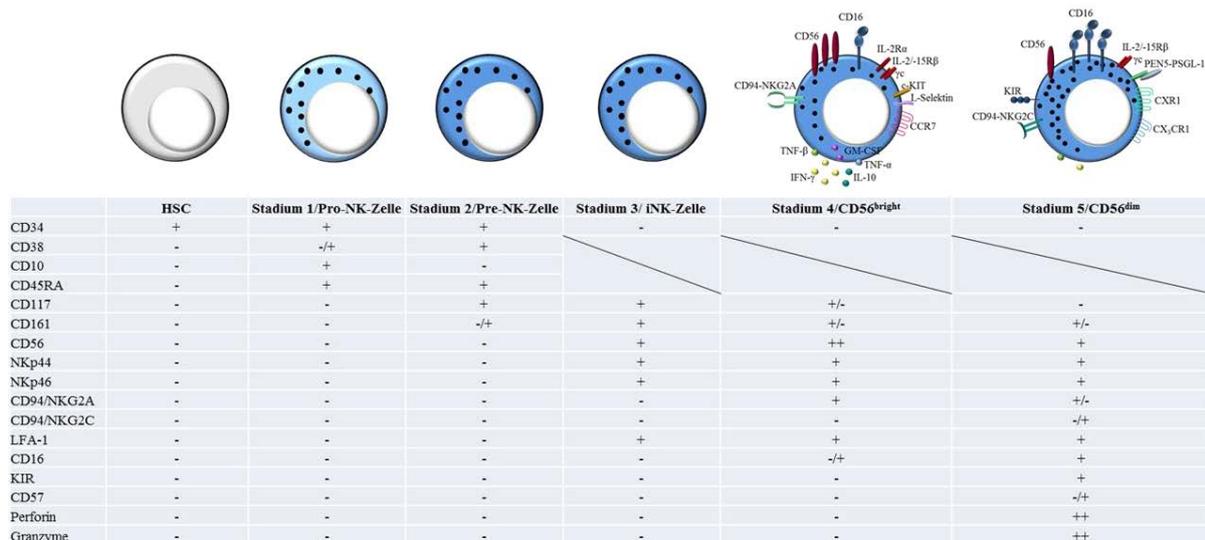
Viele Jahre intensiver Forschung ergaben immer detailliertere Einblicke in die Beschaffenheit der NK-Zellen und ihre Funktion. So stellte sich heraus, dass eine Vielzahl von Rezeptoren auf der NK-Zelloberfläche ein hochsensibles Signalgeflecht erzeugen, dessen Zusammensetzung darüber entscheidet, welche Zielzelle eliminiert wird (Lanier & Phillips, 1996; Ljunggren & Karre, 1990; Storkus et al., 1987; Uhrberg et al., 1997; Yokoyama, 1993).

Ende der 1990er Jahre führte die Beobachtung, dass NK-Zellen autologe Zellen mit einer normalen MHC-Klasse I-Expression verschonen zu der Erkenntnis, dass jede NK-Zelle, mindestens einen Rezeptor haben muss, der spezifisch das eigene MHC-Klasse I-Molekül erkennt und somit die Zelllyse inhibiert. Nicholas Valiante und Markus Uhrberg postulierten dieses Phänomen als „*at least one*“ Hypothese (Valiante et al., 1997).

### 1.1.2.1 Phänotyp, Entwicklung und Funktion

Reife NK-Zellen, sind große granuläre Lymphozyten, die sowohl in der peripheren Blutbahn als auch in den Sinusoiden der Leber und der roten Milzpulpa zu finden sind. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt eine Woche bis zehn Tage (Pezzutto, 2007). Da sie keine spezifizierenden Oberflächenmarker besitzen, die sie eindeutig von den nahe verwandten T-Zellen unterscheiden, werden sie über das Vorhandensein von CD56 und CD16 sowie die Abwesenheit von CD3 definiert (Cooper et al., 2001a).

NK-Zellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC; *hematopoietic stem cell*) (Abb. 1). Bereits während der Embryonalentwicklung sind NK-Zellvorläufer in der Leber, der Milz und dem Thymus nachweisbar. Ihre Entwicklung startet in der sog. Knochenmarknische (Schofield 1978). Die dort vorherrschenden Osteoblasten, Adipozyten, Endothelzellen und mesenchymalen Stammzellen sezernieren eine Reihe, die Hämatopoese stimulierende Faktoren (Frenette et al., 2013). Unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren Ikaros und PU-1 und der Zytokine FMS-ähnlicher Tyrosinkinase 3 Ligand (*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*; FLT-3-Ligand, ein Wachstumsfaktor und als solcher wichtig für das Überleben und die Proliferation der Zelle), c-KIT-Ligand (auch bekannt als Stammzellfaktor, *stem cell factor*; SCF), Interleukin-(IL)7 und IL-15 entstehen aus HSC lymphoide Progenitorzellen (*common lymphoide progenitor cells*; CLP). Aus den CLPs können sowohl T- und B-Zellen, als auch NK-Zellen hervor gehen. Ausschlaggebend für die Differenzierung der verschiedenen Lymphozyten sind sog. Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren. Binden sie an die DNA entstehen, je nach Transkriptionsfaktor entweder T- (NOTCH-1) oder B-Zellen (PAX-5). Verhindert Id2, ein DNA bindendes Protein, die Bindung eines entsprechenden Transkriptionsfaktors entstehen im weiteren Verlauf NK-Zellen mit gesteigerter IL-15-Rezeptor-Komplex-Expression (Pezzutto, 2007). IL-15 ist für das Überleben, die Proliferation und die Funktion der NK-Zellen unerlässlich. Darüber hinaus stimulieren IL-12, IL-18 und TNF- $\alpha$  die weitere Entwicklung, die sich anhand der Oberflächenproteinexpression der sich differenzierenden NK-Zellen in mehrere Stadien unterteilen lässt (Abb. 2) (Caligiuri, 2008; Freud et al., 2006; Montaldo et al., 2013a; Pezzutto, 2007).



**Abb. 2 NK-Zell-Entwicklung.** Die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu reifen, funktionalen NK-Zellen lässt sich in fünf Stadien unterteilen. Jedes Stadium zeichnet sich durch eine spezifische Rezeptorexpression aus. Die Pro-NK-Zellen präsentieren neben dem Stammzellmarker CD34 nur drei weitere Proteine auf ihrer Oberfläche. Die Pre-NK-Zellen zeigen bereits das für NK-Zellen charakteristische CD56 und die iNK-Zellen exprimieren auch schon die ersten immunologisch wichtigen Rezeptoren. Darauf folgt der Entwicklungsschritt zur CD56<sup>bright</sup>-NK-Zelle, die mit ihrer Zytokinexpression einen wichtigen Kommunikator zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem darstellt. Die ausgereiften CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen sind zytotoxisch aktiv. iNK: *immature/unreife* NK-Zelle. Verändert nach Caligiuri (Caligiuri, 2008; Cooper et al., 2001c; Farag & Caligiuri, 2006; Freud et al., 2006; Freud et al., 2014; Montaldo et al., 2013b; Yu et al., 2013)

Aus den HSC des Knochenmarks entwickeln sich pro-NK-Zellen, die CD34, CD45RA und CD10 exprimieren und für CD117 und CD161 negativ sind. CD34 ist ein Phosphoglykoprotein, das vornehmlich auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Sidney et al., 2014). CD45RA ist ein Marker für naive lymphatische Vorläuferzellen und CD10 eine Zinkmetalloendopeptidase, die verbreitet auf lymphoiden Geweben vorkommt. CD117, auch c-KIT genannt, ist eine Tyrosinkinase und der Rezeptor für den Stammzellfaktor (SCF). Er ist wichtig für die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen. CD161 ist ein Mitglied der C-Typ-лектinähnlichen Superfamilie und reguliert die NK-Zell-Funktion (Caligiuri, 2008; Freud et al., 2006; Miller et al., 1994). Diese Zellpopulation findet sich überwiegend in sekundären lymphoiden Geweben, wie Lymphknoten und Tonsillen, in die sie vorab über die Blutbahn migrieren müssen (Caligiuri, 2008; Fehniger et al., 2003; Freud et al., 2014). Hier gibt es auch eine Fülle von dendritischen und anderen antigenpräsentierenden Zellen, welche bekanntermaßen IL-15 sekretieren, welches für die NK-Zell-Reifung benötigt wird. Aus den pro-NK-Zellen entwickeln sich pre-NK-Zellen, die neben CD34 und CD45RA auch CD117 und CD161 exprimieren (Caligiuri, 2008; Freud et al., 2005). Die daraus hervorgehenden iNK- (unreife (*immature*)) Zellen tragen nunmehr CD117 und CD161 auf ihrer Oberfläche. CD34 und CD45RA werden hingegen herunterreguliert. Im weiteren Verlauf der Reifung entstehen NK-Zellen die größere Mengen CD56 exprimieren und dementsprechend als

CD56<sup>bright</sup> (engl. *bright* = hell strahlend) bezeichnet werden (Caligiuri, 2008; Freud et al., 2006; Pezzutto, 2007). Außerdem etablieren sich die ersten funktional charakteristischen NK-Zellrezeptoren wie NKp46 (gehört zur Familie der natürlichen zytotoxischen Rezeptoren, s. Kapitel 1.1.2.2.1) als aktivierender und CD94/NKG2A (*natural killer cell group antigen 2*; s. Kapitel 1.1.2.2.3) als inhibierender Vertreter einer stetig wachsenden Anzahl dieser gegensätzlichen Signaltransduktoren (Freud et al., 2006; Montaldo et al., 2013a; Montaldo et al., 2013b, 2014; Pezzutto, 2007). Darüber hinaus bilden sich im Zytosol der NK-Zellen zytotoxische Granula. Dabei handelt es sich um spezialisierte Lysosomen, in denen die Enzyme Granzym B und Perforin angereichert sind. Diese beiden Enzyme erlauben den Eintritt in die Zielzelle und leiten dort die Zelllyse ein.

CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen produzieren außerdem große Mengen Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ; immunstimulierendes Gewebshormon mit antiviraler/-tumoraler Wirkung) und regulieren hiermit andere Immunzellen (Freud et al., 2006; Pezzutto, 2007). Je weiter die Differenzierung fortschreitet, umso vielfältiger wird das Repertoire der NK-Zellrezeptoren. Der IgG-Fc-Rezeptor CD16 und die bedeutsamen Killerzell-immunglobulinähnlichen (*Killer cell immunoglobulin like receptor*; KIR) Rezeptoren und weitere Vertreter der NKG2-Familie ergänzen die bisherigen Rezeptoren (Caligiuri, 2008; Cooper et al., 2001a; Pezzutto, 2007). Die Frequenz der CD56-Moleküle auf der NK-Zelloberfläche nimmt hingegen ab. Die ausgereiften NK-Zellen werden demzufolge als CD56<sup>dim</sup> (engl. *dim* = verdunkeln) bezeichnet (Caligiuri, 2008; Chan et al., 2007; Lanier et al., 1986; Romagnani et al., 2007).

Etwa 90% der im peripheren Blut angesiedelten NK-Zellen sind vom Typ CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>. Diese NK-Zellen wirken als zytotoxische Effektorzellen und können ohne vorherige Aktivierung ihre Zielzellen eliminieren. CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>-NK-Zellen produzieren hingegen größere Mengen Zytokine und dienen somit vornehmlich der Rekrutierung anderer Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Carson et al., 1994a; Fehniger et al., 1999; Murphy et al., 2009).

### 1.1.2.2 NK-Zell-Rezeptoren

Der erste Kontakt der NK-Zelle mit einer Zielzelle erfolgt über die Bindung von Adhäsionsmolekülen. Erst danach kommt es zu einer Interaktion von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren mit ihren entsprechenden Liganden (Della Chiesa et al., 2014b; Finton & Strong, 2012). Das Verhältnis von aktivierenden und inhibierenden Impulsen entscheidet letztlich darüber, ob die Zielzelle eliminiert wird, oder nicht. Entscheidend hierbei ist, dass die inhibierenden Signale die aktivierenden dominieren können. In der Regel erfordert

die tatsächliche Aktivierung einer NK-Zelle immer die Stimulation durch ein Minimum von 2 Rezeptoren oder einem Rezeptor und Zytokinen (Bryceson et al., 2009; Finton & Strong, 2012; Horng et al., 2007).

NK-Zellen exprimieren eine Fülle von Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen, die je nach Reifegrad variieren kann. Sie tragen zur Koordination des angeborenen und adaptiven Immunsystems genauso bei, wie zur zytotoxischen Eliminierung infizierter oder entarteter Zielzellen (Cooper et al., 2001a; Finton & Strong, 2012).

Der erste Zell-Zell-Kontakt erfolgt über das funktional assoziierte Lymphozytenantigen 1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*; LFA-1; Komplex aus CD11a und CD18) der NK-Zelle und dem intrazellulären Adhäsionsmolekül 1, -2, -3, -4 (*Intercellular adhesion molecule 1-4*; ICAM-1-4) der Zielzelle (Abb. 3). Erst dann binden die aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren ihre Liganden auf der Zielzelloberfläche. Werden genügend inhibierende Rezeptoren aktiviert, löst sich die NK-Zelle von der Zielzelle und widmet sich der Überprüfung der nächsten. Überwiegen die aktivierenden Signale wird die Zielzelle eliminiert. Darüber hinaus werden die NK-Zellen über Zytokine, wie beispielsweise IL-2, IL-12 und IL-15, und Chemokine aus ihrer Umgebung stimuliert (Abb. 3) (Montaldo et al., 2013a).

NK-Zellen exprimieren funktionale, heterodimere IL-2-Rezeptoren (IL-2R $\beta\gamma$ ), welche eine mittlere Affinität zu IL-2 haben. CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen sind hingegen die einzigen Lymphozyten die hochaffine IL-2R $\alpha\beta\gamma$  produzieren und bereits bei Zugabe geringer Dosen IL-2 stark proliferieren und IFN- $\gamma$  bilden (*in vitro*) (Caligiuri, 2008; Fehniger et al., 2003). Eine weitere Stimulation ist nicht nötig. Dies steht in starkem Kontrast zu dem Proliferationsverhalten anderer Lymphozyten (B- und T-Zellen), entspricht aber der Tatsache, dass NK-Zellen eine frühe Rolle in der Immunantwort spielen. CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen haben hingegen, *in vitro*, eine sehr geringe Proliferationskapazität (Carson et al., 1994a; Cooper et al., 2001a). IL-2 wird normalerweise nur von T-Zellen produziert. Dass NK-Zellen seinen Rezeptor exprimieren, lässt darauf schließen, dass über Zytokine die Kommunikation von NK- und T-Zellen in den sekundären Lymphorganen begünstigt wird (Caligiuri et al., 1990; Cooper et al., 2001a; Nagler et al., 1990). CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen exprimieren außerdem den c-kit-Rezeptor, welcher die IL-2-induzierte Proliferation verstärkt und durch die Erhöhung der B-Zelllymphom-2-Expression (*B-cell lymphoma 2*; Bcl-2; konserviertes antiapoptotisches Protein, bildet homo- oder heterodimere mit anderen Vertretern der Bcl-2-Familie) die Überlebensrate der NK-Zellen steigert (Carson et al., 1994b; Cooper et al., 2001a).

Alle NK-Zellen produzieren permanent Rezeptoren für Monokine (Zytokine aus Monozyten, wie beispielsweise IL-1, IL-10, IL-12, IL-15 und IL-18), sowie IFN- $\gamma$  und andere Zytokine

(z.B. TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-13). Bei CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen werden einige Rezeptoren für Monokine, wie beispielsweise IL-1RI (Cooper et al., 2001a; Cooper et al., 2001b) und IL-18R in höherer Frequenz exprimiert als in CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen, was darauf schließen lässt, dass frühe Aktivierungssignale für NK-Zellen von Monozyten ausgesendet werden (Carson et al., 1994a; Carson et al., 1995; Cooper et al., 2001a; Cooper et al., 2001b; Fehniger et al., 1999; Innngjerdigen et al., 2001; Kunikata et al., 1998; K. S. Wang et al., 2000). Eine der Hauptfunktionen von CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen ist die Rekrutierung von Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen mittels IFN- $\gamma$  und weiterer Zytokine, was zu einem positiven Zytokinfeedback führt und so eine effiziente Kontrolle der Infektion ermöglicht (Cooper et al., 2001a).

Außerdem produzieren NK-Zellen Chemokinrezeptoren und eine Reihe von Adhäsionsmolekülen (Campbell et al., 2001; Cooper et al., 2001a). Der funktionale CC-Chemokinrezeptor 7 (CCR7, bekannt durch seine Funktion als Leitrezeptor der T-Zellen, der die Passage in sekundäre lymphoide Gewebe ermöglicht) und CXC-Chemokinrezeptor 3 werden vornehmlich auf CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen exprimiert. CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen bilden hingegen verstärkt CXCR1 und CX<sub>3</sub>CR1, Rezeptoren, die IL-8 und Fraktalkin binden (Campbell et al., 2001; Cooper et al., 2001a).

CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen exprimieren das Adhäsionsmolekül CD62L (L-Selektin), welches die Interaktion mit dem vaskulären Endothelium vermittelt. Durch CCR7 und CD62L haben CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen die Möglichkeit in sekundäre lymphoide Gewebe einzuwandern, eine Eigenschaft die eher unreifen NK-Zellen zu Gute kommt. CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen haben dieses Potential nicht mehr (Cooper et al., 2001a; Frey et al., 1998).

Darüber hinaus exprimieren NK-Zellen weitere Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise CD2 (Typ I Transmembranprotein, vermittelt Zell-Zell-Kontakt) CD49e (Typ I integrales Membranglykoprotein, exprimiert auf aktivierten Lymphozyten, bildet Heterodimere mit Integrin $\beta$ -1, reguliert u.a. das Überleben der Zelle und die Apoptose) oder ICAM-1 (Typ I Transmembranprotein, wichtig für Zelladhäsion und Leukozytenmobilisierung (Entzündungsreaktionen)). Reife sowie terminal differenzierte NK-Zellen exprimieren außerdem CD57, ein Enzym der Glukuronyltransferasegenfamilie, das für die Zell-Matrix-Interaktion mitverantwortlich ist, und CD69, ein Typ II Transmembranprotein der C-Typ-Lektin Familie, welches über Disulfidbrücken Homodimere bildet, transient auf aktivierten NK-Zellen exprimiert wird und in die Zielzellyse involviert ist (Cooper et al., 2001a; Isaji et al., 2006; Kared et al., 2016; Moingeon et al., 1989; Testi et al., 1994; Voraberger et al., 1991).

Anstelle spezialisierter Rezeptoren gegen Antigene, wie es bei den T-Zellen der Fall ist, besitzen NK-Zellen aktivierende und inhibierende Rezeptoren, die sowohl zur Erkennung von Zielzellen als auch zur Regulation ihrer zytotoxischen Eigenschaften dienen (Cooper et al., 2001a; Finton & Strong, 2012; Lanier, 2001). Aktivierende Rezeptoren besitzen meist intrazelluläre, tyrosinbasierte, aktivierende Immunrezeptormotive- (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; ITAM) Sequenzen wohingegen inhibierende Rezeptoren über tyrosinbasierte, inhibierende Immunrezeptormotive- (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*; ITIM) Sequenzen verfügen. ITAM-Sequenzen lösen über Adaptermoleküle Signale aus, die zur Degranulierung, der Ausschüttung von Zytotoxinen in die immunologische Synapse (Raum zwischen Immunzelle und Zielzelle) führen. ITIM-Sequenzen hingegen rekrutieren Phosphatasen, die die aktivierenden Signale durch Dephosphorylierung abfangen (Abb. 3) (Lanier et al., 1998a; Lanier et al., 1998b).

Zu den wichtigsten Vertretern der NK-Zellrezeptoren gehören die Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*; NCR), die inhibitorischen Leukozytenrezeptoren (*leukocyte inhibitory receptors*; LIR), die Killerzell-immunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIR) und die NKG2-Rezeptoren (Finton & Strong, 2012).

#### 1.1.2.2.1 NCR-Familie

Die NCR sind HLA-unabhängige aktivierende Rezeptoren, deren Expression auf NK-Zellen beschränkt ist und deren Aktivierung zur Degranulation (Zytotoxizität) der NK-Zelle führt. Derzeit sind drei verschiedene Vertreter bekannt: NKp30, NKp44 und NKp46. Die ersten beiden sind auf Chromosom 6p21.3, NKp46 auf Chromosom 19q13.42 (Leukozyten Rezeptor Komplex; *leukocyte receptor complex*; LRC) lokalisiert. Es handelt sich um Typ I Transmembranproteine, die zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie zählen. Strukturell ähneln sie den KIR und LIR (s.u.). NKp30 und NKp46 werden sowohl von ruhenden als auch von aktivierten NK-Zellen exprimiert. NKp44 findet sich hingegen nur auf, mit IL-2 stimulierten, NK-Zellen. Alle drei Rezeptoren besitzen einen positiv geladenen Bereich innerhalb der Transmembrandomäne, der ihnen die Interaktion mit den Adaptermolekülen DAP12, CD3 $\zeta$  und Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  ermöglicht (Details s. Kapitel 1.1.2.3) (Cantoni et al., 1999; Finton & Strong, 2012; A. Moretta et al., 2000; Pende et al., 1999; Pessino et al., 1998). Die Liganden der NCRs sind in der Regel viralen Ursprungs, wie beispielsweise das Tegumentprotein pp65 (pp = Phosphoprotein; Molmasse 65 kDa) des humanen Zytomegalievirus (*human cytomegalovirus*; HCMV), welches den NKp30 Rezeptor inaktiviert (Arnon et al., 2005; Finton & Strong, 2012).

#### 1.1.2.2.2 LIR-Familie

Die Gene der inhibitorischen Leukozyten Rezeptoren liegen im LCR auf Chromosom 19q13.4. Sie sind Typ I Transmembranproteine mit zwei oder vier extrazellulären Ig-Tandemdomänen. Sie werden sowohl von lymphoiden als auch von myeloiden Zellen exprimiert und können inhibierende oder aktivierende Signale weiterleiten. Die Signaltransduktion erfolgt mittels ITIM- (inhibitorische Signale) Sequenzen oder ITAM- (aktivierende Signale) Sequenzen, die mit Hilfe ihres positiv geladenen Arginins in der Transmembrandomäne an das Adaptermolekül FcεRIγ assoziieren (Brown et al., 2004; Cosman et al., 1997; Finton & Strong, 2012; Volz et al., 2001). Es sind elf funktionale LIR bekannt, von denen fünf HLA-Klasse I-Moleküle als Liganden besitzen (die Liganden der übrigen LIR sind noch nicht einwandfrei identifiziert). Hervorzuheben sind LIR-1 und LIR-2, welche auch die nicht klassischen HLA-Klasse I-Moleküle HLA-E, -F und -G binden können. Neben ihrer Rolle als HLA-Klasse I-Sensor erfüllen sie weitere Funktionen in der Immunabwehr von Virusinfektionen. So konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische LIR-1 an das UL18 Protein des HCMV bindet. UL18 ist ein HLA-Klasse I-Homolog, welches von infizierten Zellen exprimiert wird, um die Infektion zu maskieren und sich vor dem Immunsystem zu schützen. LIR-1 bindet UL18 mit einer tausendfach höheren Affinität als die eigentlichen HLA-Klasse I-Moleküle. Untersuchungen zeigen jedoch, dass unter verschiedenen Bedingungen die UL18 Produktion die NK-Zellaktivität sowohl drosseln als auch steigern kann. Im Lauf der Evolution hat das HCMV zahlreiche Strategien entwickelt, um dem Immunsystem zu entgehen. Im Gegenzug reagiert auch das Immunsystem und verbessert seine Abwehrmechanismen. Das führt dazu, dass der Einfluss einer einzelnen Protein-Rezeptor-Interaktion wie UL18 mit LIR-1, auf die NK-Zellaktivität nur schwer eingeschätzt werden kann (Chapman et al., 2000; Chapman et al., 1999; Finton & Strong, 2012; C. S. Wagner et al., 2008; Yang & Bjorkman, 2008).

#### 1.1.2.2.3 NKG2-Familie

Mitglieder der NKG2 Familie, die zu den Typ II Transmembran, C-Typ-lectinähnlichen Rezeptoren gehören, werden von NK- und CD8<sup>+</sup>T-Zellen exprimiert. Ihre Gene liegen auf Chromosom 12p13 (Finton & Strong, 2012; Suto et al., 1997). Zu Ihren Produkten zählen NKG2A, -B, -C, -E, und -H, welche sämtlich mit CD94, das ebenfalls eine C-Typ-lectinähnliche Faltung besitzt, dimerisieren (Brostjan et al., 2002; Finton & Strong, 2012; Kaiser et al., 2005; Lazetic et al., 1996; Sullivan et al., 2007). Ausnahmen bilden NKG2D und NKG2F. NKG2D, das vom KLRK1 (*killer cell lectin like receptor K1*) Gen auf Chromosom 12p12-13 codiert wird, bildet Homodimere (Bauer et al., 1999; Finton & Strong, 2012;

Houchins et al., 1991). NKG2A/B sind inhibierende Rezeptoren, die ITIM-Sequenzen an Ihrem zytoplasmatischen Fortsatz besitzen (Finton & Strong, 2012; Houchins et al., 1991). NKG2C/D/E/H sind hingegen aktivierend und interagieren über die Adaptermoleküle DAP10 oder DAP12 (Diefenbach et al., 2002; Finton & Strong, 2012; Gilfillan et al., 2002; Lanier et al., 1998a; Lanier et al., 1998b; Revilleza et al., 2011; Upshaw et al., 2006). NKG2D bindet an die Stressproteine MICA/B und an ULBP1-6 (UL16 Bindeprotein-1). Die Aktivierung der NK-Zellen über die Interaktion von NKG2D mit einem seiner Liganden benötigt, im Vergleich zu den meisten anderen Rezeptoren, kein zusätzliches stimulatorisches Signal. CD94/NKG2A/C/E-Heterodimere binden an das nicht klassische HLA-E Molekül, welches wiederum die Signalpeptide der klassischen HLA-A/B/C und des nicht klassischen HLA-G Moleküls präsentiert. Durch diese Verbindung können beispielsweise NK-Zellen die HLA-Expression einer Zielzelle überprüfen (Braud et al., 1998a; Braud et al., 1998b; Finton & Strong, 2012).

HLA-E-Moleküle erreichen nur durch die Bindung dieser Signalpeptide ihre charakteristische Faltung, durch die es ihnen möglich ist auf die Zelloberfläche zu gelangen. Wird, wie im Fall einer Kuhpockeninfektion, die HLA-E-Expression reduziert, so kann CD94/NKG2A aufgrund der fehlenden Bindung kein inhibierendes Signal mehr weiterleiten. Als Folge wird die infizierte Zielzelle lysiert (Brooks et al., 2006; Finton & Strong, 2012). Im Gegensatz dazu führt eine Infektion mit dem HCMV oder Hantaviren zu einer verstärkten HLA-E-Expression auf den infizierten Zellen. NKG2A-Rezeptoren leiten dieses (falsche) inhibierende Signal weiter. Durch diesen Trick werden die infizierten Zellen von den NK-Zellen nicht erkannt und die Zelllyse wird verhindert. Als vermeintlicher Ausgleich kann in einigen infizierten Personen allerdings die Expansion und Persistenz von aktivierenden NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen während einer entsprechenden Infektion beobachtet werden (Beziat et al., 2012; de Rham et al., 2014; Della Chiesa et al., 2013a; Della Chiesa et al., 2013b; Djaoud et al., 2013; Finton & Strong, 2012; Foley et al., 2012a; Foley et al., 2012b; Guma et al., 2004; Lopez-Botet et al., 2004). Auffällig ist, dass die NK-Zell-Subtypen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> unterschiedliche Rezeptorrepertoires exprimieren. So produzieren CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen viel CD94/NKG2A und kaum bis kein CD94/NKG2C. Bei den CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen nimmt der CD94/NKG2A-Spiegel hingegen ab und es wird mehr CD94/NKG2C exprimiert. Diese Unterschiede hängen mit der Reife der verschiedenen NK-Zellen zusammen (Cooper et al., 2001a; Freud et al., 2005; Freud et al., 2006).

#### 1.1.2.2.4 KIR-Familie

Die wichtigsten inhibierenden Rezeptoren der CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen sind die Killerzell-immunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIR). Die polymorphe KIR-Familie ist auf Chromosom 19q13.4 im bereits erwähnten LRC kodiert. Mitglieder dieser Rezeptorfamilie werden sowohl von NK-Zellen als auch von T-Zellen exprimiert (Finton & Strong, 2012; Marsh et al., 2003). Neben 15 funktionalen *KIR*-Genen gibt es zwei Pseudogene (*KIR2DP1*, *KIR3DP1*), die durch ein vorgezogenes Stopcodon Nonsensprodukte liefern. Jede NK-Zelle bildet ihr individuelles KIR-Repertoire aus. Dieses reicht von nur einem einzigen KIR pro Zelle bis hin zu neun verschiedenen. Im Schnitt werden jedoch drei bis fünf KIR pro Zelle exprimiert (Uhrberg et al., 1997).

KIR gehören zur Gruppe der Typ I Transmembranproteine. Ihr extrazellulärer Teil besitzt entweder zwei (KIR2D) oder drei (KIR3D) immunglobulinähnliche Domänen. Durch die Bindung ihres spezifischen Liganden können KIR entweder aktivierende, oder inhibierende Signale weiterleiten (Finton & Strong, 2012; Marsh et al., 2003). Inhibierende KIR werden mit einem „L“ (engl. *long* = lang) in der Nomenklatur gekennzeichnet (z. B.: KIR3DL). Sie haben einen langen zytoplasmatischen Fortsatz mit zwei ITIM-Sequenzen, mit deren Signalkaskade sie die Immunreaktion unterbinden. Aktivierende KIR besitzen hingegen nur eine kurze intrazelluläre Region (Kennzeichnung „S“; engl. *short* = kurz), mit einer in der Transmembranregion lokalisierten positiv geladenen Aminosäure (AS) (Arg oder Lys). Das Adaptermolekül DAP12 bindet diese AS und reagiert mit einem gegensätzlich geladenen Bereich einer ebenfalls in der Transmembran ansässigen ITAM-Sequenz um aktivierende Signale weiterzuleiten (Finton & Strong, 2012; Lanier et al., 1998b).

Die meisten KIR binden an HLA-Klasse I-Moleküle und sind somit unerlässlich für die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen. Inhibierende KIR binden HLA-A, -B und -C, wohingegen die Liganden der aktivierenden KIR weitestgehend unbekannt sind. HLA-Proteine besitzen verschiedene Motive, die von den KIR erkannt werden können. Die HLA-C-Epitope C1 und C2 beispielsweise definieren sich durch einen Sequenzdimorphismus (Lys/Asn) an Position 80. Dieser befindet sich auf der  $\alpha$ 1-Helix in der Nähe des C-terminalen Endes der peptidbindenden Spalte. Er wird von einem korrespondierenden Dimorphismus (Met/Lys) an Position 44 der KIR2D-Isoformen komplementiert. KIR2D erkennen dementsprechend C1 und C2 Epitope, KIR3DL1 das Bw4 Epitop (Finton & Strong, 2012; Mandelboim et al., 1996; Winter & Long, 1997).

KIR2DL4 hat sowohl stimulierende als auch inhibierende Merkmale und wird als einziger KIR von allen NK-Zellen exprimiert. KIR3DL2 liegt als Einziger als Homodimer vor (Pende et al., 1996; Rajagopalan & Long, 1999; Uhrberg et al., 1997).

Anhand der An- bzw. Abwesenheit der *KIR*-Gene definieren sich verschiedene *KIR*-Haplotypen. Vier Gene, die sog. Rahmengene, sind dabei allen gemeinsam: *KIR3DL3*, *KIR3DL2*, *KIR2DL4*, *KIR3DPI* (Wilson et al., 2000). Je nach Art und Anzahl der *KIR*-Gene unterscheidet man zwischen Haplotypgruppe *A* und *B*. Haplotypgruppe *A* vereinigt neben den Rahmengenen vier weitere Gene: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, und *KIR2DS4*. Alle außer *KIR2DS4* kodieren für inhibierende Rezeptoren. Alle anderen Genvariationen bilden die *B*-Haplotypgruppe. Im diploiden Organismus setzen sich zwei Haplotypen zu einem Genotyp zusammen, der entweder homozygot *AA* oder *BB* oder heterozygot *AB* ist. Der *KIR*-Genotyp *AA* besitzt alle und ausschließlich die Gene der Haplotypgruppe *A*. *AB* besitzt alle Gene der Haplotypgruppe *A* und mindestens ein Gen der Haplotypgruppe *B* und beim *KIR*-Genotyp *BB* fehlt mindestens ein Gen der Haplotypgruppe *A* (Uhrberg et al., 1997).

Das *KIR*-Repertoire entwickelt sich scheinbar in einer festen Reihenfolge. KIR2DL3 ist nachweislich der erste KIR, der auf der Zelloberfläche in Erscheinung tritt (Fischer et al., 2007; Miller & McCullar, 2001; Schönberg et al., 2011).

Die auftretenden HLA-Klasse I-Moleküle, *KIR* und *KIR*/HLA-Kombinationen korrelieren mit der Anfälligkeit und dem Ausbruch verschiedener Krankheiten (Finton & Strong, 2012; Parham, 2005). Es konnte beobachtet werden, dass *KIR* bei der Immunantwort auf unterschiedliche Virusinfektionen wie HIV, Hepatitis B und C, HSV-1, EBV und HCMV eine Rolle spielen. Dabei können sie sich sowohl positiv, als auch negativ auf den Verlauf von Viruserkrankungen auswirken (Estefania et al., 2007; Finton & Strong, 2012; Lopez-Botet et al., 2004; Romero et al., 2008; Singh et al., 2007; Stewart et al., 2005). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich die Expression von *KIR3DS1* in Kombination mit HLA-Bw-480I positiv auf den Verlauf einer HIV-Infektion auswirkt, da entsprechende NK-Zellen bevorzugt aktiviert werden und HIV-1-infizierte Zellen lysieren (Finton & Strong, 2012; Martin et al., 2002).

Nach einer Knochenmarktransplantation eines Spenders mit mehr als einem aktivierenden *KIR* verringert sich das Risiko einer symptomatischen HCMV-Infektion, die zu einer Abstoßung des Transplantates führen kann (Boyton & Altmann, 2007). Außerdem besteht bei Müttern mit der Haplotypgruppe *A* ein höheres Risiko zur Präeklampsie, wenn der Fötus positiv für HLA-C2 ist (Hiby et al., 2010; Hiby et al., 2004). Diese Zusammenhänge zwischen *KIR*/HLA und den verschiedenen Erkrankungen sind jedoch noch nicht umfassend verstanden.

#### 1.1.2.2.5 Lizenzierung

NK-Zellen erkennen körpereigene Zellen durch die Anwesenheit von HLA-Klasse I-Molekülen, die mittels KIR kontrolliert wird. Ist die Anzahl der HLA-Klasse I-Moleküle stark reduziert oder fehlen sie vollständig, erhält die NK-Zelle kein inhibierendes Signal über die entsprechenden HLA-Klasse I-spezifischen KIR und leitet, bei gleichzeitigem Vorhandensein eines stimulierenden Signals, die Zellyse ein. NK-Zellen müssten dementsprechend alle mindestens einen KIR für eigene HLA-Klasse I-Moleküle exprimieren, um nicht autoreaktiv zu sein („*at least one*“-Hypothese) (Uhrberg et al., 1997; Valiante et al., 1997). Allerdings wurde festgestellt, dass NK-Zellen ohne inhibierende KIR durchaus existieren, jedoch weniger zytotoxisch und somit nur eingeschränkt funktionstüchtig sind (Anfossi et al., 2006; Cooley et al., 2007). Aus diesem Sachverhalt ergab sich die Hypothese, dass NK-Zellen einen Prozess der Erziehung (*education*) oder auch Lizenzierung durchlaufen müssen, um die funktionale Reife zu erlangen. Lizenzierte NK-Zellen sind funktional, also tolerant für körpereigene HLA-Moleküle und zytotoxisch. Unlizenzierte sind hingegen hyporeaktiv. Lizenzierung bedeutet also für die NK-Zelle den Erwerb eines inhibierenden KIR (bzw. eines anderen inhibierenden Rezeptors, z.B. CD94/NKG2A), um zur vollen Funktionalität zu reifen. Solange dieser Reifungsprozess nicht vollzogen ist, bleibt die NK-Zelle inaktiv (Kim et al., 2005; Yokoyama & Kim, 2006). Orr et al. haben allerdings bereits Ausnahmen von dieser These beschrieben, in denen die Hyporeaktivität überwunden werden konnte (Orr et al., 2010). Wie diese Prozesse jedoch im Einzelnen ablaufen ist noch unklar.



Granzym B und Perforin angereichert sind. Das saure Milieu innerhalb der Granula inaktiviert sie. Erst nach der Entlassung in die immunologische Synapse entfalten sie ihre zytotoxischen Eigenschaften (Abb. 4) (Rink et al., 2012).

Auf der Innenseite der Granula sind lysosomale Proteine, wie CD107 lokalisiert (vergl. Kapitel 2.2.11.1). Durch den exozytotischen Mechanismus der Degranulation gelangen diese auf die Zelloberfläche und schützen die NK-Zelle so vor dem Eindringen der eigenen zytotoxischen Moleküle. Des Weiteren verhindern Cathepsin B und Serpin, welche Perforin spalten bzw. Granzym B inaktivieren, die Selbstzerstörung der NK-Zelle (Chavez-Galan et al., 2009; Lieberman, 2003).

Das Perforin ermöglicht Granzym B den Eintritt in die Zielzelle. Auf welche Weise dies im Detail geschieht ist noch nicht vollständig geklärt: Früher wurde angenommen, dass Perforin entweder die Zellmembran permeabilisiert, wodurch Granzym B in die Zielzelle gelangen kann oder Perforin und Granzym B endozytotisch von der Zielzelle aufgenommen werden und Perforin Poren in der Endosomenmembran bildet, durch die Granzym B ins Zytosol entlassen wird (Cullen & Martin, 2008; Voskoboinik et al., 2010). Es scheint jedoch wahrscheinlicher, dass Perforin Poren in der Zellmembran der Zielzelle bildet durch die Kalziumionen in die Zelle einströmen. Granzym B lagert sich daraufhin an die gegensätzlich geladene Zellmembran an und wird endozytotisch aufgenommen. Granzym B ist eine Serinprotease und initiiert den Caspase-Signalweg, der wiederum die Apoptose einleitet (Krzewski & Strominger, 2008; Lieberman, 2003).

Die Degranulation kann über verschiedene aktivierende Rezeptoren ausgelöst werden. NKG2C oder KIR2DS/KIR3DS übermitteln ihr stimulatorisches Signal über die DAP12-ITAM-Interaktion, wohingegen NKp44 und NKp46 es über die CD3 $\zeta$ -Kette vermitteln. Alle diese Rezeptoren initiieren die Zytotoxizität über den ZAP70/Syk-Signalweg. NKG2D interagiert mit DAP10 und nutzt den Rac/MEK-Signalweg, um die Degranulation auszulösen (Lopez-Larrea et al., 2008; Pezzutto, 2007).

#### 1.1.2.3.2 Nicht-sekretorische Lyse

Die Eliminierung der Zielzelle kann noch über weitere Mechanismen ausgelöst werden, z.B. indem bestimmte Liganden der NK-Zellen an ihre Rezeptoren auf der Zielzelle binden und auf diese Weise direkt die Apoptose in der Zielzellen einleiten. Zwei bekannte Vertreter dieser Liganden gehören zur TNF-Superfamilie. Die Fas-Rezeptoren (= CD95) der Zielzelle binden an die Fas-Liganden (engl.: *death factor* = Todesfaktor) der NK-Zelle und lösen somit den Caspase-Signalweg aus, welcher zur Apoptose führt (Abb. 4). Außerdem besitzen NK-Zellen

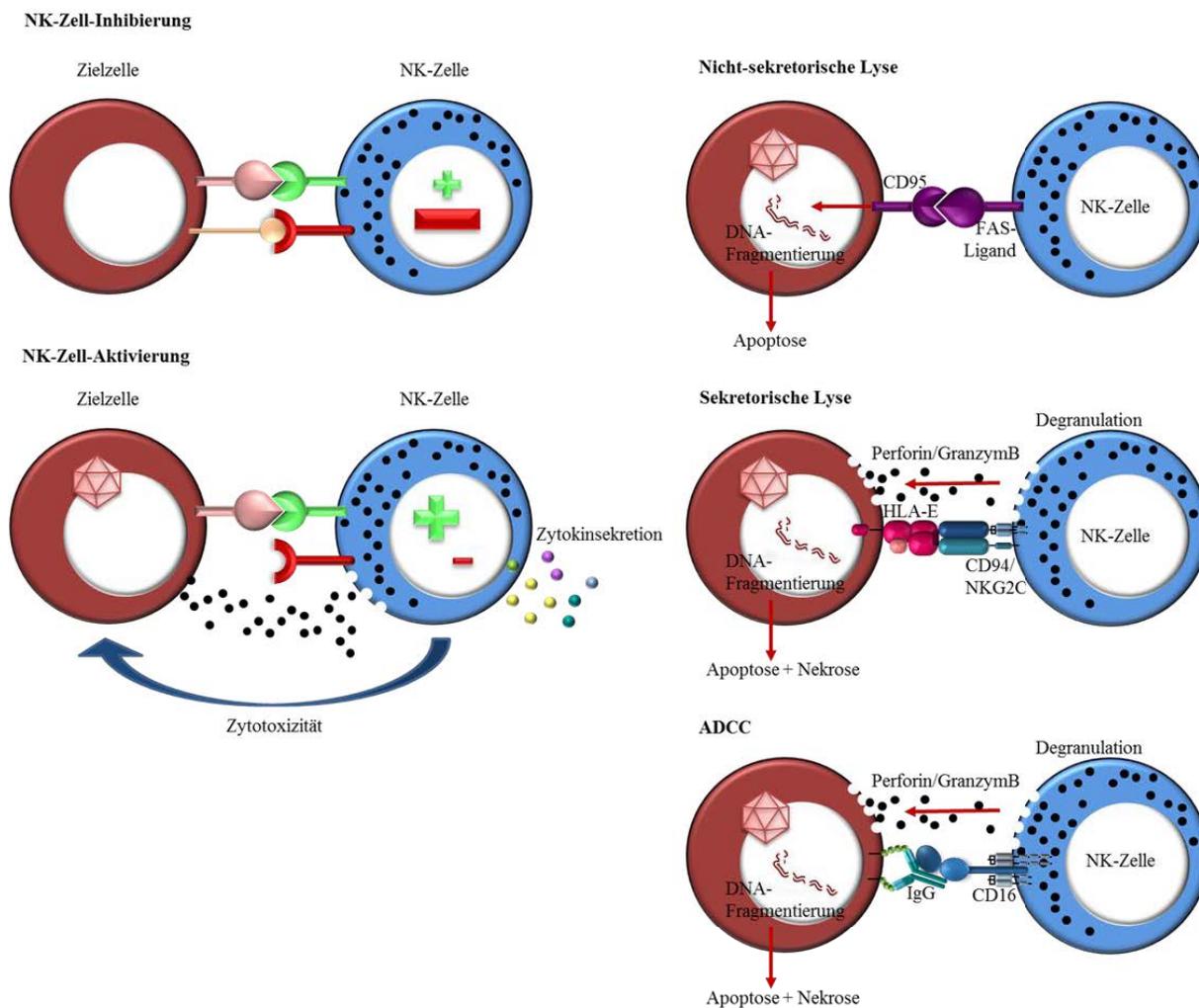
den TNF-verwandten, Apoptose auslösenden Liganden (*TNF-related apoptosis inducing ligand*; TRAIL), der, wenn er gebunden wird, ebenfalls die Apoptose in der Zielzelle auslöst (Pezzutto, 2007; Rink et al., 2012).

#### 1.1.2.3.3 ADCC

NK-Zellen exprimieren CD16, einen niedrigaffinen Fc-Rezeptor (Fc $\gamma$ RIIIa) für IgG, der von den *FCGR3A*-Genen auf Chromosom 1 kodiert wird und zur Ig-Superfamilie gehört. Wenn eine infizierte Zelle erregerspezifische Antigene auf ihrer Oberfläche präsentiert, können diese Antigene von spezifischen Antikörpern des Immunsystems gebunden werden. CD16 bindet wiederum an den Fc-Teil dieser Antikörper. Über die CD3 $\zeta$ - oder die Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ -Kette, die intrazellulär mit dem CD16-Molekül assoziiert sind, wird eine Signalkaskade angestoßen, die, ohne die Transduktion eines weiteren aktivierenden Signals, zur Degranulierung der zytotoxischen Granula in die immunologische Synapse und zur Lyse der Zielzelle führt (Abb. 4). Dieser Vorgang wird als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) bezeichnet (Mandelboim et al., 1999; Murphy et al., 2009; Pezzutto, 2007).

#### 1.1.2.3.4 Zytokinexpression

CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>-NK-Zellen sind hingegen in der Lage mit anderen Immunzellen zu kommunizieren und prägen so über Zytokine das spezifische Immunsystem (Cooper et al., 2001a; Finton & Strong, 2012). Virusinfizierte Zellen produzieren beispielsweise IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ , welche die CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>-NK-Zellen dazu veranlassen ihrerseits Zytokine, wie IL-3, IL-10 und IL-13 auszuschütten. Binden NK-Zellen darüber hinaus IL-12, das u.a. von dendritischen Zellen produziert wird und bekommen sie einen zweiten Stimulus, beispielsweise durch IL-2, das von aktivierten T-Zellen sekretiert wird, so produzieren die NK-Zellen große Mengen IFN- $\gamma$ . Darüber werden wiederum andere Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, wie zum Beispiel Makrophagen, aktiviert. Des Weiteren stimuliert IFN- $\gamma$  die Expression von HLA-Klasse I-Molekülen und somit die Antigenpräsentation, was wiederum die Erkennung infizierter Zellen durch T- und B-Zellen begünstigt. Außerdem hemmt IFN- $\gamma$  die Proliferation von, mit Viren infizierten Zellen sowie Tumorzellen (Caligiuri, 2008; Cooper et al., 2001b; Maher et al., 2007; Mocikat et al., 2003; Wallach et al., 1982).



**Abb. 4 NK-Zelleffektormechanismen.** Die Funktionalität der NK-Zellen wird durch die Balance der empfangenen inhibierenden und stimulierenden Signale reguliert. Inhibierende Signale dominieren, bis auf wenige Ausnahmen die stimulierenden. Außerdem wird normalerweise ein Minimum von zwei stimulierenden Signalen benötigt um einen Effektormechanismus auszulösen. Es wird zwischen der Nicht-sekretorischen und sekretorischen Lyse sowie der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) unterschieden. Schema verändert nach Pezzutto, 2007.

#### 1.1.2.4 Pathophysiologische Relevanz

NK-Zellen gehören im Fall einer Infektion zur ersten „Eingreiftruppe“ des Immunsystems. Gerade bei Neugeborenen, bei denen das adaptive Immunsystem noch nicht voll entwickelt ist, sind sie von besonderer Wichtigkeit. Die NK-Zellen, die aus Nabelschnurblut isoliert wurden unterscheiden sich allem Anschein nach nur geringfügig von denen aus peripherem Blut (Schonberg et al., 2011).

Das Verhältnis der NK-Zellpopulationen verändert sich im Laufe des Lebens. Während die Anzahl der CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen weitestgehend gleich bleibt nimmt die der CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen zu (Borrego et al., 1999; Cooper et al., 2001a; Manser et al., 2015). Auch das Verhältnis von NKG2A- und KIR-exprimierenden NK-Zellen ist altersbedingten Veränderungen

unterworfen. So nimmt die Frequenz von NKG2A ab, während die der KIR zunimmt (Le Garff-Tavernier et al., 2010; Schonberg et al., 2011).

#### 1.1.2.4.1 Stammzelltransplantation

NK-Zellen sind die ersten Lymphozyten, die nach einer Knochenmarktransplantation das periphere Blut neu besiedeln. Zu Beginn liegt das Verhältnis CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen zu CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen bei 70% zu 30%. Nach vier Monaten hat es sich meist normalisiert (10% zu 90%). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass sich CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen schneller entwickeln als andere Lymphozyten und CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen entweder aus CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen hervorgehen, oder den Wachstumsfaktoren länger ausgesetzt sein müssen, um optimal proliferieren zu können (vergl. Kapitel 1.1.2.1) (Cooper et al., 2001a; Gottschalk et al., 1990; R. Jacobs et al., 1992).

Aufgrund ihrer immunregulatorischen Eigenschaften sind NK-Zellen interessante Kandidaten für Immuntherapien zur Behandlung von Krebs- oder Immundefizienzerkrankungen (Caligiuri et al., 1993; Cooper et al., 2001a; Shah et al., 2000). Es konnte beobachtet werden, dass NK-Zellen des Knochenmarkspenders, die keine inhibierenden KIR für die Empfänger HLA-Klasse I-Moleküle besitzen, sensibler für die Erkennung von Leukämiezellen sind und diese effektiv bekämpfen (*Graft versus leukemia*-Effekt). Entsprechende Patienten erleiden seltener einen Rückfall (Cooper et al., 2001a; Giebel et al., 2003; Miller et al., 2007; Ruggeri et al., 1999). Die NK-Alloreaktivität, die durch ein KIR/KIR-Liganden-, „*mismatch*“ zwischen Spender und Empfänger hervorgerufen wird, begünstigt außerdem die Eliminierung der T-Zellen des Empfängers. Das fördert die Akzeptanz des Transplantats durch den Wirt. Neben T-Zellen werden ganz allgemein antigenpräsentierende Zellen durch alloreaktive NK-Zellen dezimiert, was eine *Graft versus Host*-Reaktion unterbindet (Giebel et al., 2003; Schellekens et al., 2008). Eine KIR-Typisierung im Vorfeld einer Transplantation kann helfen, potentiell alloreaktive Spenderzellen zu ermitteln und somit den Behandlungserfolg zu verbessern (Schellekens et al., 2008).

#### 1.1.2.4.2 NK-Zellen als Therapeutika

Die Zugabe geringer Mengen IL-2 steigert die Anzahl der CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, die CD16 exprimieren und erwirkt so effizient ADCC. Dies macht man sich bereits in der HIV und Krebstherapie zu Nutze. Die IL-2-induzierte Expansion ist wohl auf eine beschleunigte Differenzierung und ein besseres Überleben der Zellen zurückzuführen. Die additive Zugabe des FLT3-Liganden und des c-KIT-Liganden könnte zusätzlich die Proliferation steigern

(Kombipräparat). Außerdem werden auch Zytokine, die die Zytokinproduktion und Zytotoxizität der NK-Zellen steigern, therapeutisch eingesetzt (Cooper et al., 2001a).

Des Weiteren wird angenommen, dass NK-Zellen die Therapie von B-Zell-Lymphomen und Brustkrebs mit monoklonalen Antikörpern unterstützen können (Clynes et al., 2000; Cooper et al., 2001a).

#### 1.1.2.5 NK-Zellgenerierung *in vitro*

Bereits Ende der 1990er Jahre wurde ein *in vitro*-System entwickelt, welches es ermöglichte, die NK-Zellentwicklung unter kontrollierten Bedingungen zu beobachten. Die hämatopoetischen Vorläufer (*hematopoietic stem and progenitor cells*; HSPC) (CD34<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup>/CD38<sup>-</sup>) wurden aus Knochenmark isoliert und mit AFT024, einer murinen fötalen Leberzelllinie kokultiviert (Miller et al., 1999).

Vor kurzem wurde im ITZ eine modifizierte Variante dieses ursprünglichen Systems entwickelt, bei dem die HSPC (aus Nabelschnurblut) nicht wie bisher mit murinen Zellen, sondern mit humanen mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem cell*; MSC) kokultiviert werden. Dies ermöglicht die Analyse der NK-Zellentwicklung *in vitro* unter Bedingungen die denen in der humanen Stammzellnische des Knochenmarks ähneln (Brands, 2014). Die NK-Zellen entwickeln sich in diesem System, vergleichbar wie *in vivo*, über definierte Stadien, von proNK-Zellen bis zu CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen (Caligiuri, 2008; Freud et al., 2006) und exprimieren u.a. die, für die NK-Zelle relevanten Proteine, CD56, CD16, CD94/NKG2A/C, NKG2D und KIR. Mit Hilfe dieses *in vitro* Modells konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Expression der HLA Klasse I-spezifischen KIR unabhängig vom HLA-Typ (HLA-C1 oder HLA-C2) der MSC entwickelt und unter verschiedenen Bedingungen immer KIR2DL3 als erster KIR auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Zhao, unveröffentlichte Daten). Dieses Phänomen lässt sich auch bei Knochenmarktransplantationen beobachten. Es scheint also ein festes, vom HLA-Typ unabhängiges Expressionsprogramm für KIR-Proteine während der NK-Zellentwicklung zu geben (Fischer et al., 2007; Miller & McCullar, 2001; Shilling et al., 2003).

Die MSC sind eigentlich für ihre immunsuppressive Wirkung auf T- und NK-Zellen bekannt (Meisel et al., 2004). Die Experimente der Mitarbeiter des ITZ zeigen aber eindeutig, dass dies nur für reife NK-Zellen, nicht aber für die verschiedenen Stadien der NK-Zellentwicklung gilt. Für die vorliegende Arbeit ist vor allem wichtig, dass dieses *in vitro* Modell eine Möglichkeit bietet, die NK-Zellentwicklung erstmals unter dem Einfluss einer HCMV-Infektion zu analysieren. So ist bereits bekannt, dass sich MSC leicht mit dem HCMV infizieren lassen und

sie als adäquate Wirtszelle für das Virus fungieren können (Heseler et al., 2013; Meisel et al., 2014; Meisel et al., 2004). Da das HCMV sehr wirtsspezifisch ist, sind die bisher für die NK-Zelldifferenzierung verwendeten murinen Zelllinien AFT024 oder EL08 für ein HCMV-Infektionsmodell nicht geeignet.

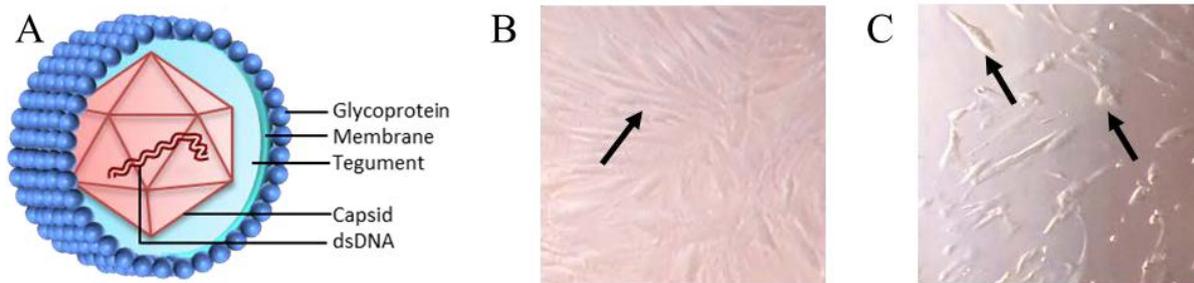
## 1.2 Virologische Grundlagen

### 1.2.1 Das humane Zytomegalievirus

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zur Familie der Herpesviren (Humanes Herpesvirus 5, HHV5), welche mit einem Durchmesser von 120 bis 200 Nanometern zu den größten und komplexesten Viren zählen. Ihr Erbgut besteht aus linearer doppelsträngiger (ds) DNA und ist umgeben von einem ikosaedrischen Kapsid welches wiederum von einer Lipidmembran eingehüllt wird (Abb. 5 A) (Doerr & Gerlich, 2010; Miksits & Hahn, 2007; Modrow et al., 2010). Herpesviren sind streng wirtsspezifisch und replizieren vorwiegend in Nervenzellen, epidermalen Zellen und Lymphozyten. Zu ihren Besonderheiten gehört die Fähigkeit zur Persistenz, das heißt, dass sie nach der Erstinfektion in den latenten Zustand übergehen und so im Organismus verweilen können (lysogener Zyklus). Das Zytomegalievirus zählt zur Subfamilie der  $\beta$ -Herpesviren. Diese zeichnen sich durch einen auffällig langsamen Replikationszyklus aus (Doerr & Gerlich, 2010; Landolfo et al., 2003; Miksits & Hahn, 2007; Modrow et al., 2010). Das HCMV ist weitverbreitet und die Durchseuchung beträgt je nach geographischer Lage und in Abhängigkeit der sozioökonomischen Faktoren zwischen 30% (z.B. Deutschland) und 100% (z.B. Entwicklungsländer auf dem afrikanischen Kontinent) (P. Griffiths et al., 2015). Eine Infektion erfolgt über Körperflüssigkeiten, vornehmlich Urin und Speichel.

Eine Infektion verläuft für immunkompetente Menschen in der Regel harmlos und ohne nennenswerte Symptome. Allerdings ist sie die häufigste Ursache für Missbildungen bei Neugeborenen und verursacht z. T. lebensbedrohliche Komplikationen bei immunsupprimierten Personen (Griffiths, 2000; Landolfo et al., 2003; Pass, 2001). In den Fokus der Forschung geriet das HCMV, weil sich herausstellte, dass es eine der Hauptursachen für Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen (*solid organ transplantation*; SOT) und Knochenmarktransplantationen (KMT) ist. Andererseits zeigte sich, dass eine HCMV-Reaktivierung nach einer KMT in Leukämiepatienten mit einem geringeren Rückfall-Risiko einhergeht (Cichocki et al., 2016; Della Chiesa et al., 2013a; Della Chiesa et al., 2013b; Elmaagacli et al., 2011). Außerdem beeinflusst und verändert das HCMV einzelne Komponenten des Immunsystems. So wurden beispielsweise Veränderungen des

Rezeptorrepertoires von Natürlichen Killerzellen beobachtet (Beziat et al., 2012; Beziat et al., 2013; de Rham et al., 2014; Della Chiesa et al., 2013a; Djaoud et al., 2013; Foley et al., 2012a; Guma et al., 2004; Lopez-Botet et al., 2004). Diese Modifikationen werden bis heute nicht hinreichend verstanden. Weder ihre Entstehung noch ihre Funktion können zufriedenstellend erklärt werden. Daher war ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit, sich eingehender mit dem Wechselspiel von NK-Zellen und dem HCMV zu befassen.



D

Syndrom	kongenital	KMT	Organtransplantation	AIDS
pränatal verzögertes Wachstum	+	-	-	-
mentale Retardierung	+	-	-	-
Mikrozephalie	+	-	-	-
Enzephalopathie/Enzephalitis	+	-	-	+
Polyradikulopathie	k.a.	-	-	+
Thrombozytopenie	+	k.a.	k.a.	k.a.
Petechie	+	k.a.	k.a.	k.a.
Hypotonie	+	k.a.	k.a.	k.a.
Surditas	+	k.a.	k.a.	k.a.
Retinitis	+	+	+	++
Pneumonitis	-	++	+	-/+
Ösophagitis	+	+	+	+
Gastritis	+	+	+	+
Enterokolitis	+	+	+	+
Pankreatitis	+	-	++	-
Hepatitis	+	+	++	+
Hepatosplenomegalie	+	k.a.	k.a.	k.a.

**Abb. 5 Das humane Zytomegalievirus.** **A** Schematische Darstellung des HCMV. Die dsDNA ist von dem ikosaedrischen Kapsid umgeben und zusätzlich von einer Lipidmembran umhüllt. **B** Aufnahme von gesunden MSC (100-fache Vergrößerung). **C** Aufnahme von, mit dem HCMV-Stamm AD169 infizierten MSC. Die Zellen verändern ihre Morphologie, sind rund und geschwollen, statt langgestreckt. **D** Tabellarische Übersicht der durch HCMV ausgelösten Syndrome in immunsupprimierten Patienten. KMT: Knochenmarktransplantation; k.a.: keine Angaben. Verändert nach Landolfo et al., 2003

### 1.2.1.1 Pathologie

Das HCMV ist einer der erfolgreichsten und am besten angepassten Humanpathogenen. Es ist in allen Gesellschaftsschichten und Ethnien zu finden. Die weltweite Durchseuchung beträgt bis zu 100% (Griffiths, 2000; Landolfo et al., 2003; Miksits & Hahn, 2007; Pass, 2001).

Eine Infektion mit dem HCMV erfolgt über engen Kontakt mit bereits infizierten Personen. Mangelnde Hygiene kann die Ausbreitung begünstigen. Populationen, die in ärmlichen Verhältnissen leben sind stärker betroffen (Griffiths, 2000; Landolfo et al., 2003; Pass, 2001). 99% der Erstinfektionen bleiben unbemerkt, da sie entweder völlig symptomfrei sind oder nur mit geringen Symptomen einhergehen (Miksits & Hahn, 2007; Modrow et al., 2010).

Die klinisch manifestierte Zytomegalie kann durch eine Erstinfektion, Reinfektion oder Reaktivierung ausgelöst werden und vereint viele verschiedene Symptome und Syndrome (Abb. 5 D), welche in Patienten mit eingeschränkter Immunfunktion (z.B. Frühgeborene, Patienten nach einer nach immunsuppressiven Therapie, AIDS-Kranke) studiert werden konnten. Eines dieser Syndrome ist die HCMV-Mononukleose. Sie ähnelt symptomatisch dem Pfeifferschen Drüsenfieber und tritt nach einer Inkubationszeit von 20 bis 60 Tagen auf (Gerok, 2007). Die Betroffenen haben hohes Fieber und zeigen eine verstärkte Proliferation zytotoxischer T-Lymphozyten. Das Virus befällt mononukleäre Blutzellen und wird so im ganzen Organismus verteilt (lymphohämatogene Verbreitung) (Landolfo et al., 2003; Nesmith & Pass, 1995). Durch die starke Beanspruchung schwellen die Lymphknoten an und die Milz kann sich vergrößern. Eine begleitende Angina tritt nur selten auf. Die Symptome klingen nach zwei bis drei Wochen wieder ab. Ein Sonderfall der HCMV-Mononukleose, mit zum Teil schwerem Verlauf ist die Hepatitis. Der Patient hat ebenfalls Fieber, aber die Leberzellen können massiv geschädigt werden. Dadurch werden die Stoffwechselfunktionen der Leber gestört, es kann zur Gelbsucht kommen. Das Blut wird nicht mehr zuverlässig entgiftet, was wiederum eine Enzephalitis verursachen kann die im schlimmsten Fall im Koma gipfelt. Das Lebergewebe vernarbt, es kommt zur Fibrose und im weiteren Verlauf möglicherweise zur Leberzirrhose. Weitere Folgen einer Infektion mit dem Zytomegalievirus können eine Myokarditis oder eine Enterokolitis sein. Bei letzterem handelt es sich um eine entzündliche Darmerkrankung, mit blutiger Diarrhoe, starkem Gewichtsverlust, Koliken und Fieber. Im schlimmsten Fall wird die Darmwand durch mangelnde Durchblutung dermaßen geschädigt, dass es zu Infektionen und Fäulnis und darüber hinaus zu einer Sepsis kommen kann. Ein weiteres Krankheitsbild ist die Nephritis mit hohem Fieber und Atherosklerose der Nierenarterien (Miksits & Hahn, 2007). Darüber hinaus ist das HCMV ein substanzielles Posttransplantationspathogen. Dies gilt sowohl für Bluttransfusionen, solide Organtransplan-

tationen als auch Knochenmarktransplantationen. Nach einer KMT tritt bei 32% bis 70% der Patienten eine HCMV-Infektion auf und zwar unabhängig vom serologischen Status der Beteiligten. Die bedrohlichste Manifestation des Virus ist in diesem Fall die Pneumonie, die in zehn bis 15% der Fälle auftritt und in schweren Fällen zum Tode führen kann. (Landolfo et al., 2003; Rubie et al., 1993; Ruutu et al., 1990; Winston et al., 1993).

Außerdem ist die HCMV-Infektion derzeit die häufigste infektiöse Ursache einer Embryopathie, die mit Teils schweren Verläufen ebenfalls tödlich enden kann.

Normalerweise wird eine HCMV-Infektion vom Immunsystem kontrolliert und unterdrückt. Eine vollständige Tilgung des Virus ist jedoch selten, in der Regel wird nur die Persistenz erreicht. Zytotoxische T-Zellen sind eine wichtige Komponente im Kampf gegen das HCMV, aber auch NK-Zellen bieten Schutz, vor allem vor einer Reinfektion (Hengel et al., 1998; Landolfo et al., 2003). Während der Erstinfektion wird anti-HCMV-Immunglobulin (Ig) M produziert, welches noch 3-4 Monate nach der akuten Infektion im Körper nachweisbar ist. Darüber hinaus werden lebenslänglich IgG Antikörper produziert (Landolfo et al., 2003).

Einmal infiziert ist man ein Leben lang Träger des HCMV. Latente virale DNA findet sich vor allem in Makrophagengranulozyten-Vorläuferzellen im Knochenmark und in peripheren Monozyten. Diese Reservoirzellen exprimieren nur die frühen E-Gene des Virus (s. Kapitel 1.2.1.2). Das HCMV nutzt die Monozyten als mobilen Speicher der das Virus über das Blut im ganzen Körper verteilt. Sobald sie sich differenzieren und zu Makrophagen werden wird das HCMV reaktiviert und erlangt den produktiven Status zurück (Landolfo et al., 2003; Pass, 2001).

#### 1.2.1.1.1 Therapie

Häufig werden nur die Symptome einer HCMV-Infektion behandelt, da der Erreger gar nicht ermittelt wird (besonders bei leichtem Verlauf). Obwohl erfolgsversprechende Impfstoffe in früher Phase entwickelt wurden gibt es keinen kommerziellen Impfstoff (Elek & Stern, 1974; Landolfo et al., 2003; Plotkin et al., 1994).

Zur Medikation einer akuten Infektion werden Nukleosidanaloga verabreicht. Eines davon ist Ganciclovir, ein Guanosinanalogen, welches durch Phosphorylierung selektiv aktiviert, sodann in die HCMV-DNA integriert wird und die Replikation hemmt. Es kommt zum Kettenabbruch und zur Immobilisierung der Viruspolymerase (Landolfo et al., 2003; Miksits & Hahn, 2007).

Um eine Infektion mit HCMV zu vermeiden, ist Hygiene ein wichtiger Faktor, da das Virus über Körperflüssigkeiten ausgeschieden wird. Gerade der Kontakt zu Kleinkindern kann

kritisch sein, da sie im Fall einer Infektion besonders viel des Krankheitserregers produzieren. Immunschwachen Menschen kann eine prophylaktische Behandlung mit antiviralen Agenzien helfen, eine akute Infektion zu vermeiden. Allgemein würde die Verwendung seronegativer Bluttransfusionen bzw. Transplantate (kaum zu realisieren durch einen akuten Mangel an Spenderorganen und -blut) helfen eine Ausbreitung zu verhindern (G. L. Gilbert et al., 1989; Landolfo et al., 2003; Sayers et al., 1992; Stratta et al., 1990).

### 1.2.1.2 Aufbau und Struktur

Das HCMV ist ein sog. behülltes Virus. Das Virion, also der infektiöse Teil, besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid, welches die 230kbp lange, lineare dsDNA beinhaltet und einen Durchmesser von ca. 100 Nanometern hat. Dieses ist von einer amorphen, (Tegument-) Proteine enthaltenden Matrix und einer Lipiddoppelschicht umgeben. Insgesamt kommt das Virus so auf eine Größe von 150 bis 200 Nanometern (Landolfo et al., 2003).

Das HCMV-Genom ist das Größte aller Herpesviren und hat einen charakteristisch hohen G-C-Gehalt. Es wird in eine lange (UL = *unique long*) und eine kurze (US = *unique short*) Sequenz und in Wiederholungssequenzen unterteilt. Es gibt ca. 200 offene Leserahmen (*open reading frame*; ORF; der HCMV-Laborstamm AD169 hat 225 ORFs), wovon mehr als 50, zumindest *in vitro*, entbehrlich scheinen (Chee et al., 1990a; Landolfo et al., 2003; Mocarski & Courcelle, 2001; Novotny et al., 2001). Die UL ORFs kodieren Proteine, die für die DNA-Replikation und -Reparatur sowie die Virionstruktur wichtig sind. Sie sind in sieben Abschnitten konserviert, die in dieser Form auch im Herpes simplex- und Epstein-Barr Virus zu finden sind (Chee et al., 1990a). Die US ORFs sind weniger stark konserviert. Während der produktiven Phase der Infektion werden die HCMV-Proteine zeitlich koordiniert exprimiert. Zuerst entstehen die sehr frühen (*immediate early*; IE), im Anschluss die frühen (*early*; E) und zu Letzt die späten (*late*; L) Proteine. Sie beeinflussen sich wechselseitig und sorgen für einen koordinierten Aufbau neuer infektiöser Virionen. Die Proteine der US-Region werden überwiegend den E-Proteinen zugeordnet. Einige dieser Vertreter dienen der Immunevasion (Fortunato & Spector, 1999; Landolfo et al., 2003; Mocarski & Courcelle, 2001).

Im infektiösen Virion finden sich über 30 verschiedene Proteine. Vier davon bilden das Kapsid, welches aus 162 Kapsomeren, Untereinheiten die sich aus hexameren und pentameren Hauptkapsidproteinkomplexen zusammensetzen, aufgebaut wird. Benachbarte Kapsomere werden über Oberflächenstrukturen miteinander verbunden (Britt & Mach, 1996; Landolfo et al., 2003).

Die Lipidhülle beinhaltet sechs Virusglykoproteine, welche mit drei Komplexen, gCI, gCII und gCIII, assoziiert sind. Diese sind in der Familie der Herpesviren hoch konserviert und entscheidende Komponenten für den Zelleintritt, die Verbreitung und Reifung der Viren (Gretch et al., 1988), ohne die keine infektiösen Nachkommen gebildet werden können. Für den Zelleintritt werden die Komplexe gCI und gCIII benötigt. Letzterer führt eine pH-unabhängige Fusion von Virushülle und Zellmembran herbei (Hobom et al., 2000; Landolfo et al., 2003).

Das Tegument zwischen Kapsid und Virushülle besteht aus ca. 20-25 verschiedenen Proteinen, deren Aufgaben weniger gut charakterisiert sind (Baldick & Shenk, 1996). Es wird angenommen, dass sie eine Rolle, in der frühen Phase der Infektion spielen, beispielsweise bei der Freisetzung der Virus-DNA. Die meisten Tegumentproteine sind phosphoryliert und lösen Immunreaktionen aus. Ein prominenter Vertreter ist das pp65, welches aufgrund seines großen Vorkommens als Marker in der Diagnostik verwendet wird. Generell scheinen die Tegumentproteine für die Genexpression sowohl des Virus als auch der Wirtszelle von entscheidender Bedeutung zu sein (Fortunato & Spector, 1999; Landolfo et al., 2003; Mocarski & Courcelle, 2001).

### 1.2.1.3 Wachstumszyklus und Genregulation

Die Infektion erfolgt in der Regel über den Kontakt mit Urin oder Speichel. Das HCMV befällt häufig zuerst die Speicheldrüsen und verteilt sich von dort im ganzen Körper (Griffiths, 2000; Landolfo et al., 2003). Die Adaption und Penetration erfolgen schnell und präzise. Eine entscheidende Rolle hierbei spielt das gB-Glykoprotein, ein Heparansulfatproteoglykan (Matrixprotein) bindendes Glykoprotein, des HCMV, das die Bindung und den Eintritt in die Zielzelle erlaubt. Der gCIII-Komplex wiederum initiiert die pH-unabhängige Fusion der viralen Lipidhülle mit der Zielzellmembran (Gonczol & Plotkin, 2001; Huber & Compton, 1998; Landolfo et al., 2003).

Nach der Fusion gelangt das Nukleokapsid (Kapsid + DNA) schnellstmöglich in den Zellkern. Die Tegumentproteine scheinen mit dem wirtszelleigenen Mikrotubulinnetzwerk zu interagieren und auf diese Weise den Transport des Nukleokapsids in den Nukleus zu ermöglichen. Gleichzeitig werden weitere Tegumentproteine an verschiedenen Stellen der Zelle lokalisiert, um die virale Genexpression zu regulieren und eine unweigerlich folgende erste Immunreaktion zu unterbinden (Gibson, 2008; Jean Beltran & Cristea, 2014; Kalejta, 2008; Landolfo et al., 2003; Ogawa-Goto et al., 2003).

Die Interaktion der HCMV-Glykoproteine mit ihren wirtszelleigenen Rezeptoren genügt, um eine Signalkaskade in Gang zu setzen, die die zelluläre Genexpression verändert (Browne et al., 2001; Landolfo et al., 2003; Zhu et al., 1998; Zhu et al., 1997).

Das HCMV infiziert vielfältige epitheliale Gewebe. Während einer natürlichen Infektion repliziert es in Epithelzellen, Endothelzellen, „*Smooth Muscle*“-Zellen, Mesenchymzellen, Hepatozyten, Granulozyten und Makrophagen mit monozytischem Ursprung. *In vitro* repliziert es am besten in menschlichen Haut- und Lungenfibroblasten (Bissinger et al., 2002; Kahl et al., 2000; Landolfo et al., 2003; Plachter et al., 1996; Sinzger & Jahn, 1996; Sinzger et al., 1996). Der Vermehrungszyklus ist mit 72-96 Stunden (je nach Virusstamm) vergleichsweise langsam. Sowohl bei einer natürlichen Infektion, als auch *in vitro* werden für das HCMV klassische zytopathische Effekte induziert. Bei natürlichen Infektionen kommt es zu einer charakteristischen Veränderung des Zellkerns infizierter Zellen, welche als Eulenaug (engl.: *owl-eye*) bezeichnet wird. Dieses Phänomen entsteht, weil sich am Ort der Virusreplikation, im Zellkern, kleine zytoplasmatische und große intranukleäre Einschlusskörperchen bilden (Ablagerung von Virusproteinen und -Partikeln). Außerdem kommt es zum Zusammenschluss von benachbarten Zellen. Diese Synzytien, die aus vier bis acht Zellen gebildet werden, waren auch namensgebend für das Zytomegalie- (griech.: Zyto = Zelle, mega = groß; Riesenzell-) Virus (Bissinger et al., 2002; Gerok, 2007). *In vitro* zeigt sich ein weiterer typischer zytopathischer Effekt: Das HCMV-Protein UL37x1/vMIA (*viral mitochondrion-localized inhibitor of apoptosis*) induziert die Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol, wodurch die infizierten Zellen stark anschwellen und sich abrunden (Abb. 5 B/C) (Brune, 2011; Landolfo et al., 2003; Miksits & Hahn, 2007; Sharon-Friling et al., 2006; Sinzger et al., 2000). Außerdem kommt es zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Bei den Laborstämmen AD169 und Towne ist dieser zytopathische Effekt besonders ausgeprägt (Landolfo et al., 2003).

Nach einer Infektion wird das Virus noch Monate bis Jahre später in Körperflüssigkeiten wie Urin, Speichel, Tränen, Spermasekret, Zervix- und Vaginalsekret sowie Muttermilch ausgeschüttet. Während einer akuten Infektion kann das HCMV auch aus, mittels *Buffy coat*-präparierten, Leukozyten isoliert werden, nicht aber aus Serum. Virale Antigene finden sich überwiegend in Neutrophilen und Monozyten (Landolfo et al., 2003; Pass, 1985; Sinzger & Jahn, 1996; Stagno et al., 1986).

#### 1.2.1.4 Immunabwehr, Immunevasion und Effektormechanismen

Bei immunkompetenten Personen, hält das Immunsystem eine HCMV-Infektion normalerweise unter Kontrolle, wenngleich es nur äußerst selten zu einer vollständigen Beseitigung des Virus kommt (Reddehase et al., 1994). Die wichtigste Komponente im Kampf gegen das HCMV ist die zellvermittelte Immunität, aber auch die humorale Immunität leistet einen nicht zu unterschätzenden Beitrag (Landolfo et al., 2003). Das HCMV wäre jedoch nicht halb so erfolgreich, wenn es nicht seinerseits diverse Strategien entwickelt hätte, um sich dem Immunsystem seines Wirts zu entziehen.

Die denkbar einfachste Strategie einen intrazellulären Parasiten zu eliminieren ist die Einleitung des programmierten Zelltods (*programmed cell death*, PCD). Viren sind auf ihre Wirtszelle angewiesen, wird diese zerstört, bzw. zerstört sie sich selbst, kann keine infektiöse Nachkommenschaft des Virus erzeugt werden. Außerdem werden Fragmente der toten Zelle, die virale Proteine enthalten können von antikörperpräsentierenden Zellen aufgenommen und dazu genutzt die adaptive Immunantwort zu sensibilisieren (Albert et al., 1998; Brune, 2011). Der PCD kann sowohl durch Apoptose oder Nekrose, als auch durch Autophagie herbeigeführt werden. Das HCMV exprimiert eine Vielzahl an, den Zelltod unterdrückenden, Proteinen, damit sein Wirt überlebt und metabolisch aktiv bleibt (Brune, 2011). vMIA beispielsweise kopiert die dreidimensionale Struktur der Bcl-2-Familie. Bcl-2 wirkt antiapoptotisch und verhindert die Aktivierung von Kaspasen, indem es die Integrität der Mitochondrien bewahrt (Brune, 2011; Youle & Strasser, 2008). Darüber hinaus unterbindet das HCMV-Protein UL36 die Weiterleitung von Signalen, die über sog. Todesrezeptoren (*death receptors*), wie beispielsweise Fas-Ligand oder TNF- $\alpha$  übertragen werden, indem es an die Prokaspase-8 bindet und diese blockiert (Brune, 2011; Thorburn, 2004). Um die metabolische Aktivität der Wirtszelle unter Stress zu erhalten, exprimiert HCMV das Protein UL38. Es verhindert die Aktivierung des *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1), welcher in Stresssituationen die Proteinbiosynthese und das Zellwachstum drosseln würde (Brune, 2011; Moorman et al., 2008; Terhune et al., 2007).

##### 1.2.1.4.1 Zellvermittelte Immunität

NK-Zellen und zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CTL) sind die entscheidenden Faktoren bei der Kontrolle einer HCMV-Infektion. Sind diese Zellen, aufgrund einer AIDS-Erkrankung oder im Zuge einer KMT, nicht vorhanden oder nur eingeschränkt funktionstüchtig, nehmen HCMV-Infektionen einen schwerwiegenden Verlauf (Hengel et al., 1998; Jonjic et al., 1990; Landolfo et al., 2003; Pass et al., 1983; Polic et al., 1996; Zanghellini et al., 1999). NK-Zellen sind im

Fall einer Virusinfektion die erste zelluläre Instanz des Immunsystems. Mit Hilfe ihrer verschiedensten Oberflächenrezeptoren sind sie in der Lage infektionstypische Veränderungen der Zielzelle wahrzunehmen (z.B. die Herabregulation der HLA-Klasse I-Moleküle, was mittels NK-Zell-eigener KIR-Rezeptoren registriert wird; vergl. Kapitel 1.1.2.2.4 und 1.1.2.3). Im Anschluss an die NK-Zellen reagieren die HCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Verschiedene Studien identifizierten das Tegumentprotein pp65 und das 72-kDa IE1-Protein als Hauptziele der CTL-Aktivität (Landolfo et al., 2003; Pass, 2001). Darüber hinaus konnte auch ein Anstieg der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Proliferation als Reaktion auf die HCMV-Infektion festgestellt werden. Sie unterstützen mit Zytokinen die CTL-vermittelte Immunreaktion (Beninga et al., 1995; Davignon et al., 1995; He et al., 1995; Landolfo et al., 2003; Y. N. Liu et al., 1993). Der Transfer von HCMV-spezifischen T-Zellklonen in KMT-Patienten ohne vorausgegangene HCMV-Infektion (seronegativ) konnte den Ausbruch eines Zytomegaliesyndroms verhindern (Walter et al., 1995).

#### 1.2.1.4.2 Humorale Immunität

Während der Erstinfektion mit dem HCMV bilden die B-Zellen der Betroffenen Immunglobulin M (IgM). Diese Antikörper sind zwischen drei und vier Monaten im Blut nachweisbar. Entsprechende IgG Antikörper werden bereits wenige Wochen nach der Erstinfektion und von da an ein Leben lang produziert (Landolfo et al., 2003). Das Hauptziel dieser Antikörper sind die Hüllproteine des HCMV. In trächtigen Meerschweinchen konnte gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit Antikörpern gegen das Hüllglykoprotein gB den Fötus vor CMV bedingten Missbildungen schützt (Harrison et al., 1995). Daneben werden auch Antikörper gegen Tegumentproteine produziert. Diese erlauben jedoch keine Interaktion mit der Virionenoberfläche oder der Oberfläche infizierter Zellen und haben somit nur einen geringen Anteil an der schützenden Immunreaktion (Landolfo et al., 2003).

#### 1.2.1.4.3 Immunevasionsstrategien

Das HCMV hat eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um sich der Immunreaktion seines Wirtes zu entziehen (Abb. 6). Zum einen bevorzugt es für die Replikation Zelltypen, mit einer geringen immunologischen Präsenz (z. B. besitzen die Epithelzellen der Speicheldrüsen nur geringe Mengen der HLA-Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Die Antigenpräsentation für CTL ist somit unzureichend.), zum anderen hat das HCMV die Möglichkeit zur Persistenz, die über viele Jahre andauern kann. Darüber hinaus besitzt das HCMV zahlreiche Gene, deren Expressionsprodukte die Immunreaktion modifizieren (Hengel et al., 1998; Landolfo et al., 2003; Machold et al., 1997; Mocarski & Courcelle, 2001). Zum Schutz vor CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-

T-Zellen unterdrückt das HCMV die Expression zahlreicher HLA-Klasse I- und II-Moleküle (Abb. 6). Die Virusproteine unterbinden entweder die Zusammensetzung der Moleküle oder verhindern ihren Transport an die Zelloberfläche (Halenius et al., 2015; Landolfo et al., 2003; Rossini et al., 2012).

US2 verhindert die Antigenpräsentation durch HLA-Klasse II-Moleküle durch Degradierung, wodurch die CD4<sup>+</sup>-Zell-Immunreaktion verhindert wird. Außerdem befördern US2 und US11 die HLA-Klasse I-schweren Ketten vom ER ins Zytosol, wo sie von Proteasomen abgebaut werden. Somit wird ihre Halbwertszeit verkürzt und der Transport an die Zelloberfläche verhindert. Folglich können keine Antigene für die CTL präsentiert werden und eine T-Zellvermittelte Immunreaktion bleibt aus (Landolfo et al., 2003; Machold et al., 1997). US3 verhindert den Austritt von HLA-Klasse I-Molekülen aus dem ER und US6 inhibiert die Transporter für Antigenprozessierung (*transporter associated with antigen processing*; TAP)-vermittelte Translokation selbiger. In beiden Fällen gelangen die HLA-Klasse I-Moleküle nicht auf die Zelloberfläche (Landolfo et al., 2003; Sadasivan et al., 1996). pp65 verhindert durch die Phosphorylierung des 72 kDa-IE-1-Proteins dessen Antigenprozessierung und somit dessen Präsentation für CTL auf der Zelloberfläche (M. J. Gilbert et al., 1996; Jones & Sun, 1997; Landolfo et al., 2003; Wiertz et al., 1996).

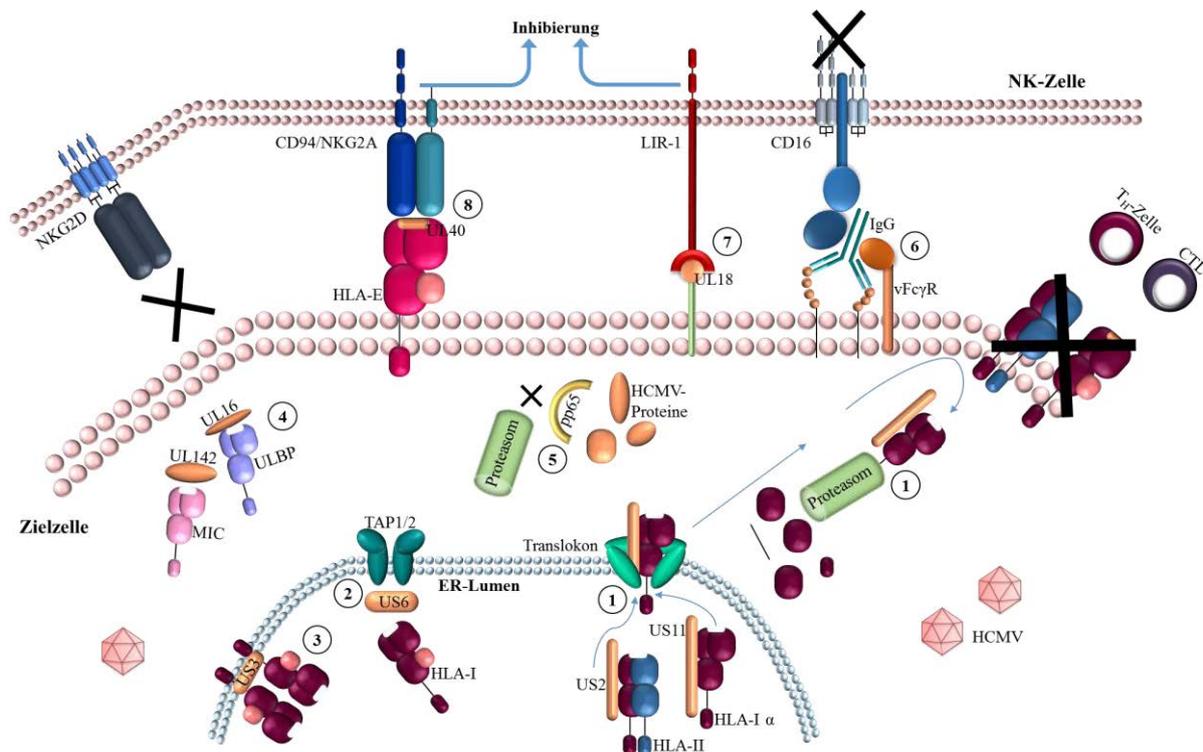
Der massive Verlust von HLA-Klasse I auf der Zelloberfläche macht die mit dem HCMV infizierten Zellen jedoch auch angreifbar für die nach dem „missing self“ Prinzip agierenden NK-Zellen. Die NK-Zellen binden mit ihren meist inhibitorischen Rezeptoren an die HLA-Klasse I-Moleküle ihrer Zielzelle. In Abwesenheit des HLA-Liganden bleibt das inhibierende Signal aus und führt bei einem gleichzeitig auftretenden, stimulierenden Signal, z.B. durch Stressliganden, zur NK-Zellaktivierung. Um sich vor der NK-Zell-Reaktion zu schützen, steigert HCMV über sein UL40-Protein die HLA-E Expression auf der Oberfläche infizierter Zellen. UL40 ist ein Glykoprotein, welches eine neun Aminosäuren lange, zur HLA-Klasse I-Signalsequenz homologe Sequenz besitzt. Diese wird von HLA-E gebunden und gelangt so auf die Zelloberfläche. Der inhibierende NKG2A-Rezeptor der NK-Zellen bindet an HLA-E und verhindert gleichfalls eine Immunreaktion (Landolfo et al., 2003; Tomasec et al., 2000). Allerdings bindet auch der stimulierende Rezeptor NKG2C an HLA-E, dessen Signaltransduktion zur Zellyse führt. LIR-1 ist ebenfalls ein inhibierender Rezeptor der NK-Zellen, welcher das HCMV-Protein pUL18, ein HLA-Klasse-I-Homolog, bindet und zwar mit 1000-fach höherer Affinität als normale HLA-Klasse-I-Liganden (Chapman et al., 2000; Chapman et al., 1999; Cosman et al., 1997; Finton & Strong, 2012; Revilleza et al., 2011; Yang & Bjorkman, 2008). Dieser Kontakt verhindert die Granulierung HCMV-infizierter Zellen.

Jedoch fungiert pUL18 auch wieder als Ligand für NKG2C (Finton & Strong, 2012; Kaiser et al., 2008; Revilleza et al., 2011; C. S. Wagner et al., 2008). Daher ist es nicht verwunderlich, dass in jüngerer Zeit die Beobachtung gemacht wurde, dass es HCMV-seropositive Menschen gibt die eine spezielle NK-Zellpopulation entwickelt haben, in der die NKG2C-Expression verstärkt ist (Beziat et al., 2012; de Rham et al., 2014; Della Chiesa et al., 2013a; Della Chiesa et al., 2013b; Djaoud et al., 2013; Guma et al., 2004; Guma et al., 2006a; Lopez-Botet et al., 2004; Lopez-Verges et al., 2011).

Die Proteine UL16, UL141 und UL142 sowie die microRNA UL112-1 verhindern die Präsentation der Stressmoleküle MICA (UL142), ULBP (UL16 und microRNA UL112-1) und CD155 (UL141). Somit können die NK-Zellrezeptoren NKG2D (MICA und ULBP) und CD96 (CD155) weder an ihre Zielzelle binden noch die Zelllyse einleiten (P. Griffiths et al., 2015).

Das HCMV schützt sich auch vor Chemokinen, indem es Homologe zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren einsetzt. Diese binden verschiedene  $\beta$ -Chemokine und verhindern deren Signaltransduktion (Bodaghi et al., 1998; Chee et al., 1990b).

Während einer akuten HCMV-Infektion werden HCMV-spezifische IgG-Antikörper in großer Zahl produziert. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass das HCMV auch einen Mechanismus entwickelt hat, um der humoralen Immunantwort zu entkommen. Tatsächlich bilden infizierte Zellen virusspezifische Fc $\gamma$ R-Moleküle (vFc $\gamma$ R) und bringen sie auf die Zelloberfläche. Dort bilden sie einen Komplex mit den bereits gebundenen IgG-Antikörpern und verhindern auf diese Weise die Aktivierung der wirtseigenen Fc $\gamma$ R, wie CD16/Fc $\gamma$ RIIIA. Dieser Vorgang wird auch als bipolare Antikörperbrückenbildung (*antibody bipolar bridging*) bezeichnet (Corrales-Aguilar et al., 2014a; Corrales-Aguilar et al., 2014b; Frank & Friedman, 1989; Sprague et al., 2006).



**Abb. 6 Immunevasionsstrategien des HCMV.** 1 Das Virusprotein US2 degradiert die HLA-Klasse II-Moleküle und verhindert so die Antigenpräsentation für die T-Helferzellen. US2 und US11 binden an die HLA-Klasse I  $\alpha$ -Kette und exportieren sie aus dem ER in das Zytosol. Dort eskortiert US2 HLA-Klasse I- $\alpha$ -Kette zu den Proteasomen. Durch den Abbau der HLA-Klasse I- $\alpha$ -Kette, verkürzt sich deren Halbwertszeit und die Antigenpräsentation für CTL wird unterbunden. 2 US6 blockiert den TAP-Komplex und verhindert so den Export von antigenpräsentierenden HLA-Klasse I-Molekülen. 3 HLA-Klasse I-Moleküle werden darüber hinaus auch von US3 im ER einbehalten. 4 UL16 und UL141 verhindern den Transport der Stressproteine ULBP und MIC an die Zelloberfläche und die entsprechende Signalweiterleitung über NKG2D. 5 Das Virusprotein pp65 verhindert den proteasomalen Abbau anderer Virusproteine, wodurch diese nicht als Antigene präsentiert werden können. 6 Der viruseigene vFcyR bindet an die spezifischen IgG-Antikörper des Wirtes und verhindert so die Signalweiterleitung über CD16. 7 Das Virusprotein UL18 bindet mit 1000-fach höherer Affinität, als die eigentlichen HLA-Klasse I-Liganden, an den inhibierenden LIR-1. 8 UL40, ein Homolog zur Signalpeptidsequenz der HLA-Klasse I-Moleküle, stabilisiert die HLA-E-Moleküle und sorgt für eine gesteigerte Oberflächenexpression selbiger. HLA-E+UL40 wird von den inhibierenden CD94/NKG2A-Komplexen gebunden und inhibiert so die NK-Zelle (Corrales-Aguilar et al., 2014a; Corrales-Aguilar et al., 2014b; P. Griffiths et al., 2015; Landolfo et al., 2003; Noriega et al., 2012).

### 1.2.1.5 HCMV und NK-Zellen

Wie bereits erwähnt sind NK-Zellen eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems und von entscheidender Bedeutung bei der Abwehr der HCMV-Infektion. Die mannigfaltigen Mechanismen die das HCMV etabliert hat, um der Kontrolle durch die NK-Zellen seines Wirtes zu entgehen, zeigen eindrucksvoll welche zentrale Rolle die NK-Zell-vermittelte Immunität für dieses Virus spielt. Die jüngsten Forschungen sprechen vor allem dem NKG2C-Rezeptor der NK-Zellen eine bedeutende Rolle in der Erkennung und Kontrolle einer HCMV-Infektion zu. Hinweise darauf geben die Beobachtungen, dass einige latent mit HCMV infizierte Personen eine erhebliche Expansion von NKG2C-positiven NK-Zellen erfahren, dass sich NKG2C-positive NK-Zellen nach einer hämatopoetischen Stammzelltrans-

plantation schneller entwickeln, wenn der Patient zeitgleich an einer akuten HCMV-Infektion leidet und, dass unter bestimmten Umständen NKG2C-positive NK-Zellen in Kokultur mit, mit HCMV-infizierten Fibroblasten, expandieren ((Della Chiesa et al., 2013b; Guma et al., 2006a; Rölle et al., 2014); eigene unveröffentlichte Daten)

HCMV remodelliert das NK-Zellrezeptorrepertoire. Neben der NKG2C-Expansion zeichnen sich diese NK-Zellen auch durch einen besonders ausgereiften Phänotyp aus, der für KIR positiv und für NKG2A negativ ist (NKG2A<sup>-</sup>KIR<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>). Die exprimierten KIR sind in der Regel selbstspezifisch, das heißt sie sind durch das eigene HLA-C lizenziert (KIR2DL3 für HLA-C1 und KIR2DL1 für HLA-C2) (Della Chiesa et al., 2014a; Guma et al., 2004; Guma et al., 2006a). Wie diese Veränderung des NK-Zellrezeptorrepertoires abläuft ist noch nicht hinreichend geklärt. Es wäre jedoch denkbar, dass die, durch das HCMV induzierte, HLA-E-Überexpression auf den infizierten Zellen, und die damit einhergehende Interaktion mit NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen, die Expansion bzw. die Proliferation dieser Zellen begünstigt (Della Chiesa et al., 2014a; Della Chiesa et al., 2014b). Da die stimulierenden NKG2C-Moleküle mit den inhibierenden NKG2A-Molekülen um die CD94-Moleküle auf der NK-Zelloberfläche konkurrieren, könnte NKG2C die Präsenz von NKG2A auf der NK-Zelloberfläche weitestgehend unterbinden. Eine entsprechend starke virusbedingte NKG2C-Expression könnte die niedrigere Affinität zu HLA-E, im Vergleich zu NKG2A, mehr als ausgleichen (Lauterbach et al., 2015). Dies würde wiederum dazu führen, dass einer der Immunevasionsmechanismen der HCMV-infizierten Zelle, nämlich die Inhibierung der NK-Zelle durch die NKG2A-HLA-E-Interaktion außer Kraft gesetzt wird. Die verstärkte Expression der HLA-C-selbstspezifischen KIR könnte wiederum in der Tatsache begründet liegen, dass die HLA-A und HLA-B Moleküle durch HCMV herunterreguliert werden, nicht aber die HLA-C Moleküle ((Ameres et al., 2013; Llano et al., 2003) eigene unveröffentlichte Daten). Dieses Phänomen käme wiederum dem HCMV zu Gute, da es sich bei KIR2DL3 und KIR2DL1 um inhibitorische KIR handelt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass noch andere Faktoren Einfluss auf die NKG2C-Expression der NK-Zellen nehmen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass UL18, der Ligand für den inhibierenden LIR-1-Rezeptor auch ein potenzieller Ligand für NKG2C ist (Kaiser et al., 2008). Weiterhin bleibt die Frage zu klären, warum nur ein geringer Prozentsatz (26,3% bei einer Kohorte von 137 seropositiven Spender, eigene unveröffentlichte Daten) von HCMV seropositiven Personen überhaupt eine NKG2C-Expansion zeigt.

Die durch das HCMV herbeigeführten Veränderungen des NK-Zellrezeptorrepertoires erlangen größere Bedeutung, wenn die T-Zell-vermittelte Immunität, beispielsweise nach einer KMT,

gestört ist. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass nach einer Nabelschnurbluttransplantation Patienten, die zu diesem Zeitpunkt eine HCMV-Infektion oder -Reaktivierung hatten, sehr schnell ausgereifte NK-Zellen mit dem Phänotyp  $\text{NKG2A}^- \text{KIR}^+ \text{NKG2C}^+ \text{CD57}^+ \text{CD16}^+ \text{Siglec-7}^-$  bilden konnten. Diese Zellen sind zytotoxisch und produzieren Zytokine. Ein großer Anteil dieser NK-Zellpopulation scheint auch ein Jahr nach der Stammzelltransplantation noch vorhanden zu sein (Della Chiesa et al., 2012; Foley et al., 2012b). Der Vergleich mit einer ähnlichen NK-Zellpopulation in der Maus erbrachte erstmals die Theorie einer „*memory*“-NK-Zelle (Della Chiesa et al., 2014b; Sun et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass, in den Patienten mit HCMV-Reaktivierung, die Transplantation von  $\text{NKG2C}^+$ -NK-Zellen ebenfalls eine Expansion dieser NK-Zellen zur Folge hatte und sie zusätzlich größere Mengen  $\text{IFN-}\gamma$  exprimieren konnten. Dieses Phänomen bestärkte die Vermutung eines NK-Zell-Gedächtnisses, da diese  $\text{NKG2C}^+$ -NK-Zellen einen scheinbar stärkeren antiviralen Effekt haben (Foley et al., 2012a). Allerdings ist diese Theorie,  $\text{NKG2C}^+$ -NK-Zellen seien NK-Gedächtniszellen doch etwas vage und zu viele Fragen bleiben bislang unbeantwortet. Es ist durchaus möglich, dass andere NK-Zellrezeptoren, wie beispielsweise die KIR eine größere Rolle bei den durch das HCMV verursachten Änderungen spielen, als bisher angenommen (Della Chiesa et al., 2014a; Della Chiesa et al., 2014b). Und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die vermeintlichen Gedächtniszellen stetig neu produziert werden, anstatt einen längeren Zeitraum zu überdauern (Della Chiesa et al., 2013a).

Obwohl eine HCMV-Infektion eine der häufigsten Ursachen für die Abstoßung eines Transplantates, sowohl eines soliden Organs als auch einer Stammzellspende, ist, zeigen neuere Studien, dass es einen Zusammenhang zwischen einer frühen HCMV-Reaktivierung und einem geringeren Leukämierückfallrisiko zu geben scheint (Elmaagacli et al., 2011; Manjappa et al., 2014). Eine Möglichkeit wäre, dass der schnelle Anstieg von funktionalen, ausgereiften NK-Zellen mit einem *KIR-Mismatch*, ausgelöst durch die HCMV-Reaktivierung, eine hohe antileukämische Aktivität zur Folge hätte (Ruggeri et al., 2006). Es ist aber genauso gut möglich, dass die HCMV-Infektion selbst zur Zellyse der leukämischen Blasten führt. Ein weiteres Szenario wäre, dass die Herunterregulation der HLA-Klasse I-Moleküle auf den, mit dem HCMV infizierten Blasten, diese für die NK-Zellen angreifbar macht.  $\text{NKG2C}^+$ -NK-Zellen könnten ihrerseits diejenigen Blasten abtöten, die aufgrund einer HCMV-Infektion HLA-E auf der Oberfläche exprimieren (Della Chiesa et al., 2014b). Im Widerspruch dazu zeigt eine neue Studie von Björklund et al. aus dem Jahr 2016, dass gerade die Transplantation von naiven NK-Zellen ( $\text{NKG2A}^+ \text{CD57}^- \text{NKG2C}^-$ ), die auch nach neun bis zwölf Monaten noch naiv sind, mit besseren (langfristigen) Überlebenschancen nach einer hämatopoetischen

Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation*; HSCT) einhergehen (Bjorklund et al., 2016). Alle diese Hypothesen müssen jedoch noch eingehender überprüft werden.

#### 1.2.1.5.1 HCMV *in vitro*

Für die Propagation des HCMV *in vitro* eignen sich besonders gut Haut- oder Lungenfibroblasten (z.B. MRC-5 Lungenfibroblasten). Eine erfolgreiche Infektion der Fibroblasten kann leicht anhand der zytopathischen Effekte (Zellen sind vergrößert und abgerundet, außerdem kommt es zur Bildung von Synzytien) erkannt werden. Die Laborstämme AD169 und Towne, beispielsweise, lysieren die Fibroblasten ca. 72 Stunden nach der Infektion und setzen große Mengen infektiöser Virionen frei. Patientenisolat (vornehmlich aus Urin von Kindern) verbreiten sich durch Zell-Zell-Kontakt innerhalb der Fibroblasten. Die Ausbeute an neuen Virionen ist eher gering (Pass, 2001).

In den vergangenen zehn Jahren haben viele Arbeitsgruppen an *in vitro* Modellen gearbeitet, um die Expansion der NKG2C<sup>+</sup>-NK-Gedächtniszellen zu verstehen. Als Grundlage dienten in der Regel, mit dem HCMV (z.B. AD169) infizierte Fibroblasten (z.B. MRC-5). Mit diesen infizierten Zellen wurden des Weiteren NK-Zellen aller Art (aus seropositiven/seronegativen Spendern, aufgereinigt oder in einem Gemisch mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMC), mit und ohne zusätzliche Zytokine) kokultiviert (Beziat et al., 2013; Charoudeh et al., 2013; Guma et al., 2006a; Rölle et al., 2014).

Die Arbeitsgruppe um Herrn Lopez-Botet konnte erstmals eine HCMV-induzierte Expansion der NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen bestätigen (Guma et al., 2006a). Sie infizierten Fibroblasten mit dem HCMV-Laborstamm AD169 und beobachteten, dass darauf kultivierte, aus HCMV-seropositiven Spendern stammende, PBMC eine deutliche Expansion der NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen verzeichneten. Dieser Effekt trat allerdings nur in speziellen Fällen auf, nämlich wenn: erstens die NK-Zellen direkten Kontakt zu den infizierten Fibroblasten hatten; zweitens sie in einem Zellgemisch z.B. PBMC vorlagen; drittens die NK-Zellen während der Kokultur die T-Zellpopulation verdrängen konnten; und viertens die NKG2C-Expression im Ausgangsmaterial bereits nachweisbar war. Eine reproduzierbare Veränderung des KIR-Repertoires konnten sie nicht feststellen, jedoch scheint die Zugabe von IL-15 die NKG2C-Expansion zu begünstigen. Charoudeh et al. beobachteten mit dem gleichen Protokoll im Gegensatz zu Guma et al. eine Veränderung des KIR-Repertoires (Charoudeh et al., 2013; Guma et al., 2006a). Sie verzeichneten eine gesteigerte Expression der inhibierenden KIR2DL1 und KIR2DL3 sowie des aktivierenden KIR3DS1. Erstere expandierten nur, wenn der entsprechende HLA-Klasse I-

Ligand anwesend war (Charoudeh et al., 2013). Überraschenderweise beobachteten Della Chiesa et al., dass *in vivo*, nach einer KMT mit anschließender HCMV-Reaktivierung bevorzugt die aktivierenden KIR2DS1, KIR3DS1 und KIR2DS2 exprimiert wurden (Della Chiesa et al., 2014a). Béziat et al., fanden in ihrer Studie bei 38% der HCMV-seropositiven Probanden eine Expansion inhibierender KIR wovon wiederum 83% auch eine NKG2C-Expansion aufwiesen. Sie zeigten außerdem, dass nicht der Zell-Kontakt zu den mit HCMV-infizierten Fibroblasten entscheidend für diese Veränderungen ist, sondern nur der Kontakt zu dem NKG2C-Liganden HLA-E. Sie verwendeten für die Kokultur eine lymphoide Tumorzelllinie (721.211), die sie mit einem HLA-E-Konstrukt transfizierten, um HLA-E stabil auf der Zelloberfläche exprimieren zu lassen. Als zusätzlichen Stimulus benutzten sie, wie in der Studie von Guma et al., IL-15. Sie beobachteten eine starke Proliferation/Expansion von NKG2C<sup>+</sup>-Zellen, die im Gegensatz zu den Studien von Guma und Charoudeh unabhängig vom HCMV-Serostatus des Spenders war. Außerdem identifizierten sie noch eine weitere NK-Zellpopulation, die NKG2C negativ ist und stimulatorische KIR exprimiert (Beziat et al., 2013; Charoudeh et al., 2013; Guma et al., 2006a). Kürzlich veröffentlichte Daten von Rölle et al. zeigen eine Expansion von NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen auf HCMV-infizierten Fibroblasten unabhängig vom serologischen Status der Proben, ähnlich wie von Béziat bereits gezeigt, und untermauern die Relevanz der gesteigerten HCMV-induzierten HLA-E Expression für die NKG2C-Expansion. Als wichtigen Stimulus identifizierte Rölle et al., allerdings IL-12 statt IL-15. Diese Experimente bestätigen, dass aufgereinigte NK-Zellen alleine, trotz des Kontaktes zu HCMV-infizierten Fibroblasten keine Expansion von NKG2C zeigen, dass aber lösliche Faktoren, die von PBMC ausgeschüttet werden ausreichend sind (*Transwell*experimente). Er bestätigt außerdem die Annahme, dass bereits die Ausgangszellen NKG2C exprimieren müssen, um diesen Rezeptor expandieren zu können (Beziat et al., 2013; Rölle et al., 2014).

Lee et al. untersuchten im Jahr 2015, ebenfalls in einem Kokultursystem, die Auswirkungen von HCMV-spezifischen Antikörpern auf die Entwicklung von NK-Gedächtniszellen. Sie verwendeten für die Kultivierung von PBMCs und aufgereinigten NK-Zellen mit HCMV infizierte MRC-5 Fibroblasten und gaben neben IL-2 noch autologes, hitzeinaktiviertes Serum der Probanden hinzu. Dabei entdeckten sie eine weitere NK-Zellpopulation, welche für FcR $\gamma$  negativ ist. Diese Zellen expandieren nach dem Kontakt zu infizierten MRC-5 und Zugabe des Serums, nicht aber ohne Serum und zeichnen sich durch eine gesteigerte CD16 Reaktivität aus. Lee et al. nehmen diese Studie zum Anlass, um die Wichtigkeit von HCMV-spezifischen Antikörpern, die sich im Serum befinden und die er für den beobachteten Effekt verantwortlich zeichnet, für die Entwicklung von NK-Gedächtniszellen zu betonen (J. Lee et al., 2015). In der

vorliegenden Arbeit sollte ein *in vitro* Modell entwickelt werden, mit dem die frühe Entwicklung von NK-Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen unter dem Einfluss einer HCMV-Infektion eingehend untersucht werden kann.

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

In den letzten Jahren ist der Einfluss des humanen Zytomegalievirus (HCMV) auf die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Das Virus, das für gesunde Menschen nur marginale Bedeutung zu haben scheint, stellt für immunschwache Personen eine ernstzunehmende Bedrohung dar. Es ist die häufigste Ursache infektionsbedingter Embryopathien und kann in der Transplantationsmedizin den Therapieerfolg erheblich schmälern.

Als erstes Etappenziel während dieses Promotionsprojektes wurde in enger Zusammenarbeit des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika mit dem Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf ein humanes *in vitro* Modell zur Generierung von NK-Zellen unter dem Einfluss einer akuten HCMV-Infektion etabliert.

Ein solches *in vitro* Modell sollte die Untersuchung der Interaktionen zwischen sich entwickelnden NK-Zellen und HCMV-infizierten Zellen unter kontrollierten Bedingungen ermöglichen. Das Hauptziel dieser Arbeit war, die vom HCMV induzierten Veränderungen der NK-Zelldifferenzierung während der frühen Entwicklungsphasen zu beobachten, zu dokumentieren und hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung zu analysieren. Dazu sollten zum einen die Oberflächenproteine der sich entwickelnden NK-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt, zum anderen aber auch funktionale Analysen durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss des HCMV unter zeitlichen und räumlichen Gesichtspunkten untersucht werden. Weiterhin sollten die für NK-Zellen relevanten Veränderungen der HLA Klasse I-Expression auf der Seite der infizierten Zellen näher untersucht werden. Ein durch dieses Projekt vermittelt verbessertes Verständnis der Entstehung HCMV-spezifischer NK-Zellen könnte letztendlich die Grundlage für einen gezielten immuntherapeutischen Einsatz von NK-Zellen bei systemischer Reaktivierung des HCMV nach Knochenmarktransplantationen ermöglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

Die Analyse der Oberflächenproteine der infizierten MSC und der sich entwickelnden NK-Zellen sowie die funktionalen Analysen erfolgen mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie. Die zu untersuchenden Proteine werden mit Antikörpern, welche mit Fluorochromen gekoppelt sind markiert.

Antikörper	Konjugat	Firma	Isotyp	Klon	Katalog #
<b>CD3</b>	APC-Cy7	Biolegend	IgG1	UCHT1	300426
	BUV395	BD	IgG1	UCHT1	563546
	Bv510	Biolegend	IgG1	UCHT1	300448
	FITC	Biolegend	IgG1	UCHT1	300406
	Pacific Blue	Biolegend	IgG1	UCHT1	300431
	PE-Cy5	Biolegend	IgG1	UCHT1	300410
	PE-Cy7	Biolegend	IgG1	UCHT1	300420
<b>CD14</b>	BUV395	BD	IgG2b	MφP9	563561
	FITC	Biolegend	IgG1	HCD14	325604
	PE	Biolegend	IgG1	HCD14	325606
<b>CD16</b>	APC-Cy7	Biolegend	IgG1	3G8	302018
	FITC	Biolegend	IgG1	3G8	302006
	PE	Coulter	IgG1	3G8	A07766
	PE-Cy5	Biolegend	IgG1	3G8	302010
<b>CD19</b>	BUV395	BD	IgG1	SJ25C1	563549
	FITC	Biolegend	IgG1	HIB19	302206
	PE	Biolegend	IgG1	HIB19	302208
<b>CD34</b>	Bv510	Biolegend	IgG1	581	343528
	PE	Biolegend	IgG1	581	343506
<b>CD38</b>	PE-Cy5	Biolegend	IgG1	HIT2	303508
<b>CD56</b>	APC	Biolegend	IgG1	HCD56	318309
	APC-Cy7	Biolegend	IgG1	HCD56	318332
	Bv421	Biolegend	IgG1	HCD56	318328
	Horizon V450	BD	IgG1	B159	BDB560361
	PE	Coulter	IgG1	N901	IM2073U
	PE-Cy5	Biolegend	IgG1	HCD56	318308
	PE-Cy7	Biolegend	IgG1	HCD56	318318
	PE-Dazzle594	Biolegend	IgG1	HCD56	318348
<b>CD57</b>	Pacific Blue	Biolegend	IgM	HCD57	322316
<b>CD62L</b>	PE-Cy7	Biolegend	IgG1	DREG-56	304822
<b>CD69</b>	PE-Dazzle594	Biolegend	IgG1	FN50	310942
<b>CD94</b>	APC	Biolegend	IgG1	DX22	305508

<b>Antikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Firma</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Katalog #</b>
	FITC	Biolegend	IgG1	DX22	305504
	PE	Biolegend	IgG1	DX22	305506
<b>CD107</b>	APC-Cy7	Biolegend	IgG1	H4A3	328630
<b>CD117 (c-kit)</b>	Bv421	Biolegend	IgG1	104D2	313216
<b>CD127</b>	PE-Dazzle594	Biolegend	IgG1	A019D5	351336
<b>CD158a,h (KIR2DL1/S1)</b>	FITC	Biolegend	IgG2b	HP-MA4	339504
<b>CD158b1,b2,j (KIR2DL2/3/S2)</b>	FITC	Biolegend	IgG2a	DX27	312604
	PE-Cy5.5	Coulter	IgG1	GL183	A66900
	PE-Cy7	Coulter	IgG1	GL183	A66901
<b>CD158e1 (KIR3DL1)</b>	FITC	Biolegend	IgG1	DX9	312706
<b>CD159a (NKG2A)</b>	APC	Coulter	IgG2b	Z199	IM3291U
	PE	Miltenyi Biotec	IgG1	REA110	130-098- 814
	PE-Cy7	Coulter	IgG2b	Z199	B10246
<b>CD159c (NKG2C)</b>	APC	R&D	IgG1	134591	FAB138A
	PE	R&D	IgG1	134591	FAB138P
<b>CD314 (NKG2D)</b>	PE	Biolegend	IgG1	1D11	320805
<b>CD335 (NKp46)</b>	Bv510	Biolegend	IgG1	9E2	331924
<b>CD336 (NKp44)</b>	PE-Cy5	Coulter		Z231	A66903
<b>Bcl2</b>	AlexaFluor488	Biolegend	IgG1	100	658704
<b>Granzyme B</b>	FITC	Biolegend	IgG1	GB11	515403
	FITC	BD	IgG	GB11	560211
	Pacific Blue	Biolegend	IgG1	GB11	515408
<b>HLA A,B,C</b>	PE	Biolegend	IgG2b	W6/32	311406
	purified	Biolegend	IgG1	W6/32	311402
<b>HLA-C</b>	purified	Carrington	IgG1	DT9	
<b>HLA-C</b>	purified	Mulder	IgM	WK4C11	
<b>HLA-E</b>	PE	Biolegend	IgG1	3D12	342604
	purified	Biolegend	IgG1	3D12	342602
<b>IEpp72</b>	AlexaFluor488	Millipore	IgG2	8B1.2	MAB810X
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	FITC	Biolegend	IgG1	B27	506504
	PE-Cy7	Biolegend	IgG1	B27	506524
<b>lin-1</b>	FITC	BD	IgG		340546
<b>Perforin</b>	PE	Biolegend	IgG2b	dG9	308106
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	APC-Cy7	Biolegend	IgG1	MAB11	502944
<b><i>Sekundäre Antikörper</i></b>					
<b>Goat anti mouse IgG</b>	FITC	Biolegend			405305
<b>Rabbit anti human IgM</b>	FITC	Dako			F0317
<b>Rabbit anti human IgG</b>	FITC	Dako			F0315

## 2.1.2 Chemikalien, Medien und Puffer

### 2.1.2.1 Chemikalien und Reagenzien

#### Produktliste

<b>Produktgruppe</b>	<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>	
<b>DNA-Isolation, PCR &amp; Gelelektrophorese</b>	Agarose	Peqlab	
	Aqua dest.	fischar/Braun	
	Borsäure	ROTH	
	dNTPs	Peqlab	
	EDTA	ROTH	
	Ethanol 70%	Roth	
	Ethidiumbromid	ROTH	
	HotstarTaq DNA-Polymerase	Qiagen	
	HLA-C-Primer (Frohn et al., 1998)	Biomers	
	KIR-Primer (Uhrberg et al., 2002)	Biomers	
	10x Loading Buffer (Ladepuffer für Gelelektrophoresen)	invitrogen	
	Polymerase-Puffer (10x)	Qiagen	
	Tris-Base	ROTH	
	1kb DNA-Leiter	roboklon	
	<b>Antikörpermarkierung</b>	Albumin Fraktion V, proteasefrei	ROTH
DPBS		Lonza	
Fixation Solution		Biolegend	
human Albumin		octapharma	
Intracellular Staining Perm Wash (10x)		Biolegend	
PFA 4%		USB	
<b>Medien und Zusätze</b>	Ascorbinsäure (20mg/ml)	Sigma-Aldrich	
	DMEM(1x) 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine, Pyruvate	gibco	
	Ethanolamin (50µM)	Sigma-Aldrich	
	Fötale Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG	
	HAM's F12	Biochrom AG	
	humanes AB Serum "off the clot"	Biochrom AG	
	L-Glutamin	gibco	
	Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml/10.000µg/ml)	gibco	
	RPMI 1640	Lonza	
	Sodium-Selenit (50µg/l)	Sigma-Aldrich	
	β-Mercaptoethanol (24µM)	gibco	
	<b>Zellkultur</b>	DMSO	Santa Cruz Biotechnology
		0,5% Trypsin	gibco
Biocoll Separating Solution		Biochrom AG	
BD GolgiStop (Monensin)		BD	

Produktgruppe	Produkt	Firma
Zytokine	Lyse-Puffer pH 7,4 (isotone Ammoniumchlorid-Lösung)	UKD
	Trizol Reagent	life technologies
	Flt-3	Miltenyi Biotec
	IL-2	Novartis
	IL-3	Miltenyi Biotec
	IL-7	Miltenyi Biotec
	IL-12	Miltenyi Biotec
	IL-15	Miltenyi Biotec
	IL-18	R&D
	SCF	Miltenyi Biotec

### 2.1.2.2 Medien

#### 2.1.2.2.1 Standardmedium

Standardmedium bildet die Grundlage für viele andere Medien.

Menge	Produkt	Firma
500 ml	RPMI 1640	Lonza
10%	FBS	Biochrom AG
1%	Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml/10.000µg/ml)	gibco

#### 2.1.2.2.2 Einfriermedium

Es ist häufig nötig Zellen für einen späteren Zeitpunkt einzufrieren. Dabei ist es wichtig, dass das Einfriermedium mit Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt wird. DMSO verhindert die Kristallbildung in der gefrierenden Zelle und bewahrt sie vor Schäden.

Menge	Produkt	Firma
45%	Standardmedium	
45%	FBS	Biochrom AG
10%	DMSO	Santa Cruz Biotechnology

#### 2.1.2.2.3 MSC-Medium

Das Medium für die anspruchsvollen MSC ist ein nährstoffreiches Vollmedium, das auch die Infektion mit dem HCMV ermöglicht.

Menge	Produkt	Firma
500ml	DMEM (1x) 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine, Pyruvate	gibco
10%	Hitzeinaktiviertes FBS (30 Min., 56°C)	Biochrom AG
1%	Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml/10.000µg/ml)	gibco

#### 2.1.2.2.4 NK-Medium

NK-Medium begünstigt die Proliferation von NK-Zellen und stimuliert ihre zytotoxische Aktivität. Es wird für funktionale Assays verwendet.

Menge	Produkt	Firma
95%	Standardmedium	
5%	Hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum (30 Min., 56°C)	Biochrom AG
1000U/ml	IL-2	Novartis

#### 2.1.2.2.5 NK-Generierungsmedium

Um die Entwicklung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu reifen, funktionalen NK-Zellen zu induzieren, benötigen die Zellen eine entsprechende Umgebung. Die MSC, mit denen sie kokultiviert werden, tragen genauso dazu bei, wie die mit dem Medium zugegebenen Zytokine und Nährstoffe. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, wird das Medium nach einer ersten Reifungsphase von einer Woche ausgetauscht. Die veränderte Zusammensetzung des NK-2-Mediums begünstigt die Differenzierung zu reifen NK-Zellen mit ihren charakteristischen Rezeptoren und Eigenschaften.

#### NK-1-Medium (bis Tag 7)

Menge	Produkt	Firma
2/3	DMEM (1x) 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine, Pyruvate	gibco
1/3	HAM's F12	Biochrom AG
20%	Hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum (30 Min., 56°C)	Biochrom AG
1%	Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml/10.000µg/ml)	gibco
1%	L-Glutamin	gibco
1000U/ml	IL-2	Novartis
25µl	Ascorbinsäure (20mg/ml)	Sigma-Alsrich
25µl	Ethanolamin (50µM)	Sigma-Aldrich
25µl	Sodium-Selenit (50µg/l)	Sigma-Aldrich
24µl	β-Mercaptoethanol (24µM)	gibco
20µl	IL-7 (20ng/ml)	Miltenyi Biotec
20µl	SCF	Miltenyi Biotec
10µl	FIt-3-lig (10ng/ml)	Miltenyi Biotec
5µl	IL-3 (5ng/ml)	Miltenyi Biotec

NK-2-Medium (ab Tag 7)

Menge	Produkt	Firma
2/3	DMEM (1x) 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine, Pyruvate	gibco
1/3	HAM's F12	Biochrom AG
10%	Hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum (30 Min., 56°C)	Biochrom AG
1%	Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml/10.000µg/ml)	gibco
1%	L-Glutamin	gibco
1%	IL-2 (1000U/ml)	Novartis
25µl	Ascorbinsäure (20mg/ml)	Sigma-Aldrich
25µl	Ethanolamin (50µM)	Sigma-Aldrich
25µl	Sodium-Selenit (50µg/l)	Sigma-Aldrich
24µl	β-Mercaptoethanol (24µM)	gibco
20µl	IL-7 (20ng/ml)	Miltenyi Biotec
20µl	SCF	Miltenyi Biotec
10µl	FIt-3-lig (10ng/ml)	Miltenyi Biotec
10µl	IL-15 (10ng/ml)	Miltenyi Biotec

NK-3-Medium (für die Generierung auf einer 721.221-HLA-E-Transfektante)

Menge	Produkt	Firma
2/3	DMEM (1x) 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine, Pyruvate	gibco
1/3	HAM's F12	Biochrom AG
10%	Hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum (30 Min., 56°C)	Biochrom AG
1%	Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml/10.000µg/ml)	gibco
1%	L-Glutamin	gibco
1%	IL-2 (1000U/ml)	Novartis
25µl	Ascorbinsäure (20mg/ml)	Sigma-Aldrich
25µl	Ethanolamin (50µM)	Sigma-Aldrich
25µl	Sodium-Selenit (50µg/l)	Sigma-Aldrich
24µl	β-Mercaptoethanol (24µM)	gibco
10µl	IL-15 (10ng/ml)	Miltenyi Biotec

Optional werden 10ng/ml IL-12 hinzugefügt.

## 2.1.2.3 Puffer

## 2.1.2.3.1 Färbepuffer

Ein Färbepuffer optimiert das Ergebnis der Antikörperbindung und verbessert somit das Messergebnis der Durchflusszytometrie. Der Chelatbildner Ethylendiamintetraacetat (EDTA) verhindert das Verklumpen der Zellen und das Bovine Serum Albumin (BSA) sättigt freie Bindestellen auf den Zellen, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu minimieren.

Menge	Produkt	Firma
500 ml	DPBS, ohne Ca & Mg	Lonza
2 ml	EDTA (0,5 M)	ROTH
0,5% w/v	BSA (Albumin Fraktion V proteasefrei)	ROTH

#### 2.1.2.3.2 MACS-Puffer

Der MACS-Puffer verhindert aufgrund des EDTAs das Verklumpen der Zellen während der magnetischen Zellseparation. Das humane Albumin sättigt freie Bindungsstellen auf den zu behandelnden Zellen und minimiert auf diese Weise unspezifische Bindungen.

Menge	Produkt	Firma
500 ml	DPBS, ohne Ca & Mg	Lonza
2 ml	EDTA (0,5 M)	ROTH
5 ml	human Albumin	octapharma

#### 2.1.2.3.3 TBE-Puffer

TBE-Puffer dient zur Herstellung von Agarosegelen für die gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten.

Menge (10x)	Produkt	Firma
107,8g	Tris-Base	ROTH
55g	Borsäure	ROTH
8,2g	EDTA	ROTH
auf 1000ml	Aqua dest.	fischar

### 2.1.3 Geräte

Produktklasse	Produkt	Firma
Durchflusszytometer	CantoII	BD
	CyAn ADP	Beckman Coulter
	Cytoflex	Beckman Coulter
	MoFlo XDP	Beckman Coulter
PCR und Elektrophorese	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
	Laufkammer	Peqlab
Thermomixer	Thermomixer comfort	eppendorf
Zentrifuge	MIKRO 20	Hettich Zentrifugen
	Rotina 46 R	Hettich Zentrifugen

#### 2.1.4 Kits

Die kommerziellen Kits enthalten exakt aufeinander abgestimmte Reagenzien die beispielsweise für die magnetische Zellseparation, oder die DNA-Extraktion benötigt werden.

Produkt	Firma
CD3 MicroBeads, human	MACS, Miltenyi Biotec
CD14 MicroBeads, human	MACS, Miltenyi Biotec

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
CD19 MicroBeads, human	MACS, Miltenyi Biotec
CD34 MicroBead Kit, human	MACS, Miltenyi Biotec
Lineage Cell Depletion Kit, human	MACS, Miltenyi Biotec
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen

### 2.1.5 Plastik

Bei den im Folgenden aufgelisteten Produkten handelt es sich vornehmlich um Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur.

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
24 Loch Platte ( <i>Transwell</i> )	costar
24 Loch Platte TC	SARSTEDT
5 ml Polypropylen Round-Bottom Tube	BD Falcon
6 Loch Platte TC	SARSTEDT
96 Loch Platte Rundboden	SARSTEDT
96 Loch PCR Platten + Folien	4titude
Zellfilter CellTrics 30µm (Filter)	PARTEC
CRYO.S 2ml, PP, Round Bottom	greiner bio-one
FiltropurS 0.45	SARSTEDT
Handschuhe Latex/Nitril	Sempercare/Ansell
MACS Separation Columns, LS	MACS Miltenyi Biotec
MACS Separation Columns, MS	MACS Miltenyi Biotec
MACS Separator	MACS Miltenyi Biotec
Original Perfusor Syringe 50ml	BRAUN
Pipettenspitzen	SARSTEDT/greiner bio-one
Röhre 15 ml/ 50 ml	SARSTEDT
Safe Seal Gefäß 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	SARSTEDT
Stripetten	costar
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> )	SARSTEDT

### 2.1.6 Primer

Die Primer für die KIR- und HLA-C-Typisierung sind in den Publikationen von Uhrberg et al., 2002 bzw. Frohn et al., 1998 beschrieben.

<b>KIR</b>	<b>Sense</b>	<b>Antisense</b>	<b>Länge (bp)</b>
<b>KIR2DL1</b>	ACT CAC TCC CCC TAT CAG G	AGG GCC CAG AGG AAA GTC A AGG GCC CAG AGG AAA GTT	1750
<b>KIR2DL2</b>	CCA TGA TGG GGT CTC CAA A	GCC CTG CAG AGA ACC TAC A	1800
<b>KIR2DL3</b>	CCT TCA TCG CTG GTG CTG	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA	798
<b>KIR2DL5</b>	TGC CTC GAG GAG GAC AT	GGT CTG ACC ACT CAT AGG GT	1600
<b>KIR3DL1</b>	TAC AAA GAA GAC AGA ATC CAC A TCC CAT CTT CCA TGG CAG AT	TAG GTC CCT GCA AGG GCA A	1600
<b>KIR3DL2</b>	CGG TCC CTT GAT GCC TGT	GAC CAC ACG CAG GGC AG	1900

<b>KIR</b>	<b>Sense</b>	<b>Antisense</b>	<b>Länge (bp)</b>
<b>KIR2DS1</b>	TCT CCA TCA GTC GCA TGA A/G	AGG GCC CAG AGG AAA GTT	1800
<b>KIR2DS2</b>	TGC ACA GAGAGG GGA AGT A	CAC GCT CTC TCC TGC CAA	1750
<b>KIR2DS3</b>	TCA CTC CCC CTA TCA GTT T	GCA TCT GTA GGT TCC TCC T	1800
<b>KIR2DS4</b>	CTG GCC CTC CCA GGT CA	GGA ATG TTC CGT TGA TGC	1950
<b>KIR2DS5</b>	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	TCC GTG GGT GGC AGG GT	1950
<b>KIR3DS1</b>	GGC AGA ATA TTC CAG GAG G	AGG GGT CCT TAG AGA TCC A	1750

<b>HLA-C</b>	<b>Sense</b>	<b>Antisense</b>	<b>Länge (bp)</b>
<b>HLA-Cw</b>	CGC CGC GAG TCC RAG AGG		142
<b>NK1 (C2)</b>		GTT GTA GTA GCC GCG CAG G	142
<b>NK2 (C1)</b>		GTT GTA GTA GCC GCG CAG T	142

### 2.1.7 Software

Für die Analyse der erhobenen Daten werden sowohl Graphik- als auch statistische Programme herangezogen.

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
FACSDiva	BD
GraphPad Prism5	GraphPad
Kaluza Analysis 1.3	Beckman Coulter
MS Office	Microsoft
Summit	Beckman Coulter

### 2.1.8 Viren

Während des Promotionsprojektes kamen verschiedene HCMV-Stämme zum Einsatz. Der Großteil der Versuche wurde mit dem Laborstamm AD169 durchgeführt, aber auch der Laborstamm TB40/E sowie das Patientenisolat UL1271 wurden verwendet. Alle HCMV-Stämme wurden freundlicherweise vom Institut für Virologie des UKD, unter der Leitung von Herrn Prof. Timm, vormals Herrn Prof. Drexler und in enger Zusammenarbeit mit Herrn PD Zimmermann zur Verfügung gestellt.

<b>Stamm</b>	<b>Eigenschaften</b>
<b>AD169</b>	Stammt ursprünglich aus dem Nasenpolypen einer 7-Jährigen; Wirtstropismus ist stark eingeschränkt; Endo- und Epithelzellen können nicht mehr infiziert werden; kein Virustransfer auf Leukozyten; avirulent für den gesunden Menschen; Deletion von 15kb im UL-Bereich, umfasst Leserahmen 133-151; IRL ( <i>internal repeat long</i> ) zwischen UL- und US-Region (Duplikation des Leserahmens 1-14); Punktmutation in Gen 131; (ATCC; BVL, 2007; Cha et al., 1996; Gerna et al., 2002; Gerna et al., 2000; Gerna et al., 2003; Hahn et al., 2004; Revello et al., 1998; Rowe et al., 1956)
<b>TB40/E</b>	Isoliert mittels Rachenspülung eines Knochenmarktransplantationspatienten; Vermehrung durch Plaqueaufreinigung in Endothelzellkultur; Endotheliotrop; Hat seinen ausgedehnten Zelltropismus, trotz zahlreicher Passagen, erhalten

<b>Stamm</b>	<b>Eigenschaften</b>
<b>TB40/E</b>	können; Endo- und Epithelzellen können nach wie vor infiziert werden; Der Virusstamm ist genetisch heterogen (Sinzger et al., 2008; Sinzger & Jahn, 1996; Sinzger et al., 2000)
<b>UL1271</b>	Niedrig passagiertes Patientenisolat; Isoliert 1997 aus dem Urin eines Kindes; Herkunftsort Ulm (UL); (Atalay et al., 2002)

## 2.1.9 Zellen

### 2.1.9.1 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen

Die, die hämatopoetischen Vorläuferzellen (R-CB-X = Ricardas *cord blood* „fortlaufende Nummer“) enthaltenden mononukleären Zellen werden aus Nabelschnurblut (José Carreras Stammzellbank) gewonnen (Dichtegradientenzentrifugation) und anschließend mit der magnetische Zellseparation (*magnetic cell separation*; MACS)-Technologie von Miltenyi Biotec (magnetische Zellseparation in zwei Schritten) isoliert. Das Nabelschnurblut ist idealerweise nicht älter als 24 Stunden.

Außerdem wird aus dem Vollblut DNA gewonnen (QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen) und für die KIR- und HLA-C-Typisierung genutzt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>HLA-C Genotyp</b>	<b>KIR-Genotyp</b>
R-CB-01	C1C2	3
R-CB-02	C1C2	3
R-CB-03	C1C1	7
R-CB-04	C1C2	1
R-CB-05	C2C2	1
R-CB-06	C1C1	4
R-CB-07	C2C2	2
R-CB-08	C1C1	47
R-CB-09	C1C1	2
R-CB-10	C1C1	1
R-CB-12	C1C1	3
R-CB-13	C1C2	4
R-CB-14	C1C2	9
R-CB-16	C1C2	1
R-CB-17	C1C2	1
R-CB-18	C1C1	2
R-CB-19	C1C2	3
R-CB-20	C1C1	1
R-CB-21	C1C2	10
R-CB-22	C1C2	1
R-CB-23	C1C1	3

### 2.1.9.2 K562

Die K562-Zelllinie entstammt ursprünglich den Zellen einer 53-jährigen Frau mit chronischer myeloider Leukämie. Es handelt sich um die erste, humane Zelllinie dieser Art. Weil sie keine HLA-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert, ist sie eine beliebte Zielzelle für NK-Zellen, die aufgrund des „missing self“ die Zelllyse einleiten. Somit eignen sich die K562 besonders gut für funktionale Assays (vergl. Kapitel 2.2.11). Die Suspensionszellen sind rund und werden in MSC-Medium kultiviert. Die ideale Konzentration liegt bei  $1-2 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter. Die K562 werden je nach Bedarf ein bis zwei Mal pro Woche gefüttert (L. C. Andersson et al., 1979; B. B. Lozzio & Lozzio, 1979; C. B. Lozzio & Lozzio, 1975).

### 2.1.9.3 Lymphoide Tumorzelllinie 721.221-HLA-E-Transfektante

Die ursprüngliche B-lymphoblastoide-Tumorzelllinie (*B-lymphoblastoid cell line*; B-LCL) 721 hat aufgrund einer  $\gamma$ -Strahlen-Behandlung eine Mutation im HLA-Komplex, die die Expression von HLA-A und -B, nicht aber von -C verhindert. Durch anschließende physikalische Deletionen und mutagene Verfahren entstanden zahlreiche 721-Mutanten. Die 721.221 zeichnet sich dadurch aus, dass sie weder HLA-A/B/C-mRNA-Transkripte, noch entsprechende HLA- $\alpha$ -Ketten besitzt. Außerdem exprimiert sie zwei nicht-klassische HLA-Klasse I- $\alpha$ -Ketten mit einer Häufigkeit von unter 1% im Vergleich zu unbehandelten B-LCL. Somit ist diese Zelllinie sehr gut für die Transfektion mit HLA-Klasse I-Genen geeignet und erlaubt die gezielte Untersuchung einzelner HLA-Klasse I-Moleküle. Die Expressionsstärke der transfizierten HLA-Gene entspricht weitestgehend der, die in wildtypischen B-LCL gemessen werden kann (Kavathas et al., 1980; Shimizu & DeMars, 1989). Béziat et al. nutzten eine .221-HLA-E-Transfektante, um die NKG2C-Expansion auf NK-Zellen zu induzieren (Beziat et al., 2013). Für das, in dieser Arbeit, vorgestellte Projekt wurde eine vergleichbare .221-HLA-E-Transfektante, von Herrn Prof. Khakoo von der Universität Southampton, UK, zur Verfügung gestellt. Die 721.221 werden in Standardmedium kultiviert.

### 2.1.9.4 Mesenchymale Stammzellen

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurden in der Kinderklinik, Düsseldorf, aus puerilem Knochenmark gewonnen. Es handelt sich bei ihnen um Vorläuferzellen des Bindegewebes, die ein starkes Proliferations- und Differenzierungspotential besitzen. Die MSC können sich sowohl zu Fettgewebe, als auch zu Knorpel und Knochen sowie Bändern und Sehnen differenzieren. Außerdem unterstützen sie die Hämatopoese (Devine & Hoffman, 2000; Dexter et al., 1988; Dexter & Spooncer, 1987; Kemp et al., 2005; Pittenger et al., 1999). Diese adhären

wachsende Zellen werden in MSC-Medium kultiviert und nach Bedarf (je nach Wachstumsgeschwindigkeit alle drei bis fünf Tage) geteilt. Das Medium wird ebenfalls nach Bedarf erneuert.

<b>MSC-Linie</b>	<b>HLA-C-Typ</b>
9	C1C1
16	C2C2
20	C1C2
39	C1C1

### 2.1.9.5 MRC-5 Lungenfibroblasten

Bei der MRC-5-Zelllinie handelt es sich um menschliche fötale Lungenfibroblasten. Sie sind diploid, männlich (XY), kaukasoid und entstammen einem 14 Wochen alten Fötus, isoliert im September 1966 von J. P. Jacobs. Es sind ca. 42-46 Verdoppelungen möglich, bevor die Seneszenz einsetzt. MRC-5-Zellen lassen sich vergleichsweise leicht mit HCMV infizieren und unterstützen die Replikation des Virus. Darüber hinaus exprimieren sie, die für KIR relevanten Liganden, HLA-C1, C2 und Bw4. Als Kulturmedium dient MSC-Medium. Die MRC-5-Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Hengel des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums Freiburg zur Verfügung gestellt (ATCC; Charoudeh et al., 2013; J. P. Jacobs et al., 1970).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Antikörpermarkierung von Zellen

Für die Analyse von Oberflächenproteinen und intrazellulär vorliegenden Proteinen, werden die zu untersuchenden Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert. Dabei macht man sich eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu Nutze, bei der Oberflächenantigene der Zellen von Antikörpern gebunden werden können, die spezifisch gegen dieses Antigen gerichtet sind. Diese Antikörper sind in der Regel direkt an ein Fluorochrom gekoppelt, oder können nachträglich von einem sekundären Antikörper, der seinerseits ein fluoreszierendes Konjugat trägt, gebunden werden. Die auf diese Weise präparierten Zellen können durchflusszytometrisch analysiert werden.

Die zu untersuchenden Zellen werden entweder frisch aus der Zellkultur geerntet oder aufgetaut. Die Zellzahl wird bestimmt und im Anschluss werden sie einmal mit Färbepuffer gewaschen (Zellen werden in einem Volumen von 1 bis 2 ml Färbepuffer aufgenommen und nachfolgend 7 Min. bei 4°C und 370g zentrifugiert). Der Überstand wird abgenommen. Das Zellpellet wird in 100-200µl Färbepuffer resuspendiert und in ein 5 ml Polypropylen-

Rundbodenröhrchen überführt. Die Antikörper für die Oberflächenproteine werden hinzugegeben und die Proben für maximal 30 Min. bei 4°C (abweichende Herstellerangaben beachten) lichtgeschützt inkubiert. Anschließend werden die markierten Zellen erneut mit Färbepuffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen und falsch positive Ergebnisse zu verhindern. Optional können nachfolgend noch intrazelluläre Proteine markiert werden. Dafür werden die *Fixation Solution* und der *Intracellular Staining Perm Wash* (1x; mit destilliertem Wasser verdünnt) von Biolegend nach Herstellerangaben verwendet. Zellproben, die nicht intrazellulär mit Antikörpern markiert werden, können nach dem letzten Waschen mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Dies verhindert die Zersetzung der Zellen und konserviert sie für einen Zeitraum von maximal 7 Tagen.

### 2.2.2 DNA-Isolation aus Vollblut

Die Isolation von DNA aus Vollblut erfolgt mit dem *QIAamp DNA Blood Mini Kit* von Qiagen und wird entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Beschaffenheit verschiedenster Zellen bestimmt werden. Dafür werden die Zellen innerhalb eines Zytometers durch eine Kapillare gesaugt, mit Laserlicht angeregt und mittels Detektoren vermessen. Verschiedene Parameter helfen dabei ihre charakteristischen Eigenschaften zu ermitteln. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*; FSC) gibt dabei Aufschluss über die Größe einer Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*; SSC) die Granularität der Zelle bestimmt. Beide Parameter zusammen geben so Auskunft über die morphologischen Unterschiede der untersuchten Zellen.

Darüber hinaus kann die Zellprobe vorausgehend mit Antikörpern inkubiert werden, die mit verschiedenen Fluorochromen markiert sind (vergl. Kapitel 2.2.1). Trifft ein entsprechender Laser auf eine Zelle, die mit einem Antikörper-Fluorochrom-Konjugat markiert wurde, werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt und erreichen ein höheres Energieniveau. Wenn die Elektronen anschließend auf ein niedrigeres Niveau zurückfallen kommt es unter der Abgabe von Wärme zur Emission von Photonen, die als Fluoreszenz vom Durchflusszytometer detektiert werden können. Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur der Frequenz der vorhandenen Proteine auf bzw. in den Zellen.

Neben der reinen Analyse von verschiedenen Zellen, ist es mit sog. Zellsortierern auch möglich Zellen, die bestimmten Kriterien entsprechen, aus einem Zellgemisch durchflusszytometrisch zu isolieren.

### 2.2.4 Gelelektrophorese

DNA-Moleküle können mittels Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend voneinander separiert werden. Dies wird beispielsweise dann nötig, wenn eine partielle Genomtypisierung, wie eine KIR- oder HLA-C-Typisierung, durchgeführt werden soll. Die Produkte der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) werden bei diesem Verfahren auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, in ein elektrisches Feld (Elektrische-Laufkammer mit TBE-Puffer als Laufpuffer) eingespeist und entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Da DNA-Moleküle negativ geladen sind, wandern sie in Richtung des positiven Pols, der Anode. Ihre Laufgeschwindigkeit richtet sich dabei nach ihrer Größe, was bedeutet, dass kleinere Moleküle die Anode schneller erreichen werden als größere. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt bei einer konstanten Spannung von 200V für ca. 60 Min. bei Raumtemperatur (RT). Um die Ergebnisse interpretieren zu können wird ein Größenstandard (1kb-Leiter) bei jeder Gelelektrophorese mitgeführt.

Zur Herstellung des Agarosegels werden entsprechende Mengen pulverförmiger Agarose in TBE-Puffer aufgeköcht, diese Lösung, nach einer kurzen Abkühlungsphase, mit Ethidiumbromid (0,04%) versetzt und in Form gegossen. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht diese unter UV-Licht sichtbar. Die PCR-Produkte werden vor dem Auftragen mit Ladepuffer versetzt. Dieser stabilisiert den pH-Wert der Probe, erleichtert durch einen Farbzusatz deren Handhabung und bedingt das Herabsinken der Probe in die Ladetasche des Gels (der Inhaltsstoff Glycerin „beschwert“ die Probe aufgrund seiner höheren Dichte).

### 2.2.5 Infektion von MSC/MRC-5 mit HCMV

Die adhärennten Zellen werden mind. 48 Std. vor der geplanten Infektion in die ausgewählten Loch-Platten ausgesät. Die Konfluenz der Zellen sollte zum Zeitpunkt der Infektion zwischen 80-100% betragen. Die Infektion erfolgt mittels der gewünschten Virusmenge pro Zielzelle (*molecules of infection*; MOI), indem das entsprechende Virusvolumen in das Medium der Zellkultur pipettiert wird. Um die Adsorption der Viren zu unterstützen, werden die infizierten Zellen für 2x15 Min. bei 870g zentrifugiert. Zwischen den beiden Durchgängen werden die Zellkulturplatten in der Zentrifuge gedreht, um die nicht 100%ige Aufrichtung der Platten während der Zentrifugation auszugleichen und eine gleichmäßige Infektion des gesamten Zellrasens zu gewährleisten. Im Anschluss werden die infizierten Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.2.6 Isolation von HSPC aus Nabelschnurblut

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation ist es möglich verschiedene Zellpopulationen aufgrund ihrer Dichte aus Vollblut zu isolieren. Die verschiedenen Bestandteile des Blutes werden gemäß ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt. Zu diesem Zweck wird die *Biocoll Separating Solution* genutzt. Dabei handelt es sich um eine Sucroselösung, deren Dichte höher ist als die von Blut. Das Nabelschnurblut wird, um ein Verklumpen der zellulären Bestandteile zu vermeiden, mit DPBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. Das so vorbereitete Blut wird vorsichtig über die *Biocoll Separating Solution* geschichtet (Verhältnis 3:1). Durch die Zentrifugalkräfte (20 Min. bei 870g, RT ohne Bremse) sammeln sich die Lymphozyten und Monozyten (mononukleäre Zellen, *mononuclear cells*; MNC) in der Interphase über der *Biocoll Separating Solution*, unter dem Überstand (Serum/Plasma/Thrombozyten). Erythrozyten und Granulozyten bilden aufgrund ihrer höheren Dichte das Zellsediment. Die Interphase wird abgenommen und mehrfach mit DPBS gewaschen (Zentrifugation bei 370g, 4°C für 7 Min.). Optional kann eine Erythrozyten-Lyse mit Ammoniumchlorid-Lösung durchgeführt werden. Aus den aufgereinigten MNC werden anschließend die HSPC isoliert. Hierfür wird das magnetische Zellseparationssystem (*magnetic cell separation*; MACS) von Miltenyi Biotec verwendet. Mit Hilfe spezifischer, an magnetische Mikrokugeln (*Micro Beads*) gekoppelter, Antikörper werden in einem ersten Schritt alle sog. *Lineage*-positiven (reife Zellen, die die Oberflächenproteine CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, oder CD235a tragen) Zellen depletiert. In einem zweiten Schritt werden nun die HSPC, die den Oberflächenmarker CD34 tragen angereichert. Die Durchführung der MACS erfolgt nach Herstellerangaben.

### 2.2.7 Kokultur/Generierungskultur

Die Generierung von NK-Zellen aus HSPC *in vitro* erfordert die Kreation einer Stammzellnische, ähnlich derer im Knochenmark, in welcher sich NK-Zellen natürlicherweise entwickeln. Diese Knochenmarknische (Schofield, 1978) besteht überwiegend aus Osteoblasten, Adipozyten, Endothelzellen und MSC (Frenette et al., 2013). Dr. Brands konnte während seiner Promotion am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf (ITZ des UKD) ein NK-Zellgenerierungsmodell etablieren, welches sich der MSC als Nährzellen für die HSPC bedient. Durch die Kultivierung in einem anspruchsvollen Medium, dem zahlreiche Zytokine, wie beispielsweise der Stammzellfaktor (*stem cell factor*; SCF), die normalerweise von den Zellen der Knochenmarknische sezerniert werden, zugesetzt wurden, ist es möglich KIR-exprimierende NK-Zellen entstehen zu lassen

(Cumano & Godin, 2007; Frenette et al., 2013; Mendez-Ferrer et al., 2010; Miller et al., 1999; Shestopalov & Zon, 2012).

Für dieses Projekt wurden die Nährzellen, die MSC, zusätzlich mit dem HCMV infiziert, um die NK-Zellentwicklung unter den Bedingungen einer akuten HCMV-Infektion bzw. Reaktivierung, wie sie nach KMT häufig auftritt, beobachten zu können. Die Etablierung dieses erweiterten Generierungsmodells hat aufgrund des geschlossenen humanen Systems den Vorteil, dass sich die entwickelten NK-Zellen auch für die Applikation in klinischen Studien eignen würden.

Mindestens 48 Std. vor dem Beginn der Generierungskultur werden die MSC in 24 Loch-Platten ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Infektion eine Konfluenz zwischen 80-100% erreichen. Die MSC werden 24 Std. vor dem Beginn der Generierungskultur mit dem HCMV infiziert. Nach Ablauf dieser Frist, die eine optimale Infektion und erste Adaption der MSC an das Virus gestattet, wird das alte Medium von den Zellen abgenommen und die frisch isolierten HSPC in NK-1-Medium (2000 HSPC/ml/Loch) auf die MSC gesetzt. Als Kontrolle dienen Ansätze mit nicht-infizierten MSC. Die Generierungskulturen werden fortan für 28-35 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 7 Tagen werden 80-90% des alten NK-1-Mediums abgenommen und durch frisches NK-2-Medium ersetzt. Die Proliferation, der sich entwickelnden NK-Zellen, steigt nun sprunghaft an. Das Medium wird nach Bedarf um jeweils 50% aufgefrischt. Die Zellen werden zu festgelegten Zeitpunkten geerntet, durchflusszytometrisch analysiert, für funktionale Assays verwendet, oder für spätere Analysen eingefroren.

### 2.2.7.1 NK-Zellgenerierung im *Transwell*system

Eine Variation der Generierungskultur wird durch den Einsatz eines *Transwell*systems geschaffen. In diesen Platten werden die Nährzellen, die puren bzw. infizierten MSC, räumlich von den zu generierenden HSPC getrennt. Ein siebartiger *Transwelleinsatz* hält die HSPC in einer höheren Ebene über den MSC. Ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen HSPC und MSC ist nicht möglich, jedoch erlauben die *Transwelleinsätze* mit ihrer Porengröße von 4µm den ungehinderten Austausch von löslichen Faktoren, wie Zytokinen bis hin zu ganzen Viruspartikeln. Aufgrund der kleineren Grundfläche der Einsätze werden nur 1000 HSPC pro Vertiefung als Ausgangsmenge in die Generierung eingesetzt. Darüber hinaus erfolgt die Generierung wie unter 2.2.7 beschrieben.

### 2.2.7.2 NK-Zellgenerierung nach durchflusszytometrischer Zellsortierung

Anstelle der magnetischen Zellseparation können NK-Zellvorläufer auch mittels durchflusszytometrischer Sortierung aus Nabelschnurblut isoliert werden. Dafür wird nach der Isolation der MNC eine Depletion der CD3 (T-Zellen), CD14 (Monozyten) und CD19 (B-Zellen) positiven Zellen durchgeführt (MACS-Technologie von Miltenyi Biotec unter Verwendung spezieller *Micro Beads* nach Herstellerangaben). Die verbliebenen Lymphozyten beinhalten die HSPC und NK-Zellvorläufer. Sie werden mit entsprechenden fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert und die CD3, CD14 und CD19 negativen NK-Zellentwicklungsstadien **2** ( $CD34^+CD117^+CD56^-CD94^-$ ), **3** ( $CD34^-CD117^+CD56^{-/+}CD94^-$ ) und **4** ( $CD34^-CD117^{dim/-}CD56^{bright}CD94^+$ ) aussortiert. Da das Proliferationspotenzial mit fortschreitender Differenzierung abnimmt werden von Stadium 3 und 4 statt 2000, 5000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die weitere Generierungskultur erfolgt wie in 2.2.7 beschrieben.

### 2.2.7.3 Kokultur von generierten NK-Zellen auf MRC-5 oder 721.221-HLA-E-Transfektanten

Viele Arbeitsgruppen nutzen Fibroblasten (MRC-5) als Nährzellen für die Kokultur mit PBMC und adulten NK-Zellen. Zudem können auch generierte NK-Zellen unterschiedlicher Reifegrade auf MRC-5 kokultiviert werden. Die Fibroblasten werden in 24-Loch-Platten zur Konfluenz gebracht und nach Bedarf 24 Stunden vor dem Beginn der Kokultur mit dem HCMV (AD169; MOI: 0,5) infiziert. Die NK-Zellen verlassen während ihrer Differenzierung die Knochenmarknische und setzen sie an anderer Stelle (z.B. in lymphatischen Geweben) fort. Um eine solche Emigration *in vitro* zu simulieren werden die, sich entwickelnden NK-Zellen zu definierten Zeitpunkten (Tag 14 und 21) geerntet und auf (nicht-) infizierte MRC-5 umgesetzt. Das verwendete NK-2-Medium wird alle 2 bis 3 Tage aufgefrischt (1:2).

Des Weiteren können die NK-Zellen auf einer lymphoiden Tumorzelllinie (721.221-HLA-E-Transfektante) kultiviert werden. Die 721.221-HLA-E-Transfektanten simulieren eine HCMV-Infektion, bei der die Wirtszellen die HLA-E-Expression erhöhen. Laut Béziat et al., genügt die verstärkte HLA-E-Expression, als Stimulus für ein verändertes NK-Zellrezeptorrepertoire (Beziat et al., 2013). Die Transfektanten werden vorab mit einer Dosis von 40 Gray bestrahlt ( $\gamma$ -Strahlung), damit sie die NK-Zellpopulation nicht überwachsen (Die Strahlung verursacht genetische Veränderungen die das Proliferationsvermögen erheblich einschränken). Die eigentliche Kokultur wird in 96-Loch-Flachboden-Platten mit NK-3-Medium durchgeführt. Das Verhältnis von Transfektanten zu NK-Zellen beträgt 1:10. Das Medium wird nach Bedarf aufgefrischt (1:2).

### 2.2.8 Polymerasekettenreaktion - KIR/HLA-C-Typisierung

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro*. Der Ablauf lässt sich grob in drei Schritte unterteilen: (1) die DNA-Denaturierung, bei der temperaturabhängig der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgebrochen wird, (2) die Primer-Anlagerung, also die spezifische Bindung von Oligonukleotiden von ca. 20 Nukleotiden Länge, an die zu amplifizierende DNA-Sequenz, die wiederum die Bindung einer DNA-Polymerase erlaubt die (3) die Primersequenz verlängert, was auch als Elongation bezeichnet wird. Entwickelt wurde diese Methode von Kary B. Mullis in den 1980er Jahren, der hierfür mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Die Funktion der DNA-Polymerase ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Sie bindet an den DNA-Einzelstrang und katalysiert die Verknüpfung neuer, komplementärer Nukleosidtriphosphate (dNTP) und repliziert auf diese Weise die DNA. Durch den Einsatz spezifischer Primer werden nur die zu untersuchenden DNA-Sequenzen vervielfältigt. Der Einsatz von Primer-Paaren, die sowohl an den Leitstrang (*Sense*) als auch an den Gegenstrang (*Antisense*) binden, verdoppelt den Durchsatz pro Durchgang. Ein PCR-Durchgang/Zyklus besteht immer aus den drei Schritten Denaturierung, Anlagerung, Elongation. Da bei dem nächsten Zyklus auch die neu synthetisierten DNA-Stränge als Ausgangsmatrizen zur Verfügung stehen ermöglicht eine PCR eine exponentielle Amplifikation der DNA.

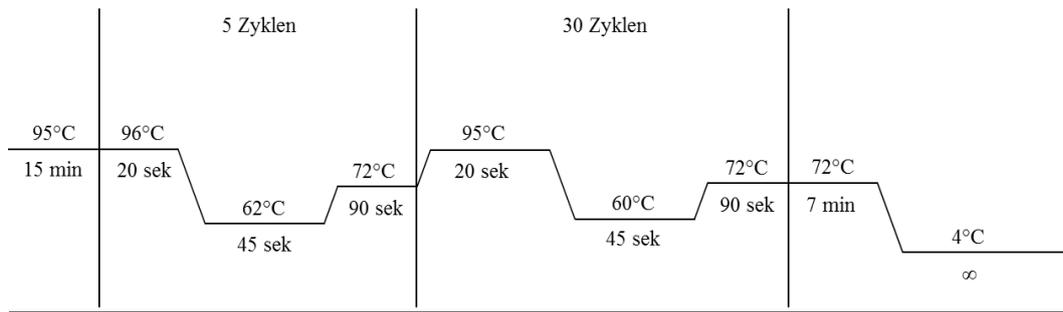
Damit die PCR automatisch und kontinuierlich erfolgen kann werden hitzestabile DNA-Polymerasen, wie die Taq-Polymerase (Polymerase des thermophilen Eubakteriums *Thermus aquaticus*) verwendet. Die verwendete HotstarTaq bietet darüber hinaus den Vorteil, dass sie erst nach einer Initiation bei 95°C aktiviert wird. Die Denaturierung der DNA findet im Folgenden bei Temperaturen zwischen 94-96°C statt. Die Temperatur der Anlagerung der spezifischen Primer ist abhängig von deren Schmelztemperatur, die wiederum vom GC-Gehalt bestimmt wird. Die Elongation schließt sich bei 72°C an.

Alle PCR-Reaktionen werden in dafür vorgesehenen, dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Reaktionsansatz beträgt durchschnittlich 20µl.

#### PCR-Ansatz für 1 KIR-Typisierung

DNA	<b>50ng</b>
Dest. Wasser	18,7µl
dNTP	0,6µl
Primer	1-1,5µM
HotstarTaq	0,12µl

PCR-Zyklus KIR-Typisierung



Die 40 häufigsten *KIR*-Genotypen der kaukasoiden Population sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Der Genotyp 1 ist homozygot für Haplotyp A, während alle anderen mindestens heterozygot für Haplotyp B sind (Uhrberg et al., 2002).

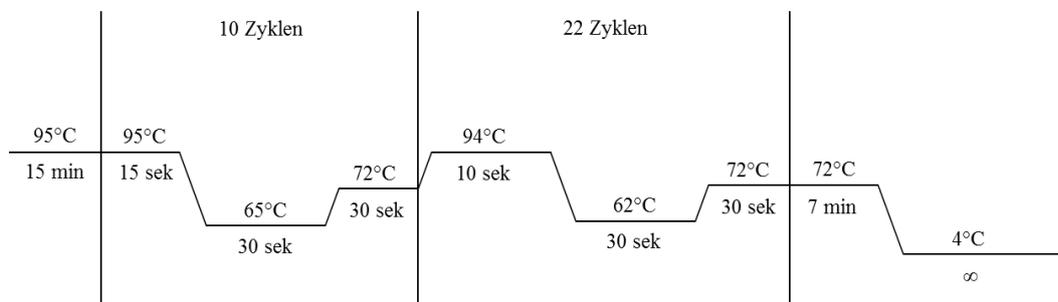
<b>Genotyp</b>	<b>2DL1</b>	<b>2DL2</b>	<b>2DL3</b>	<b>2DL5</b>	<b>3DL1</b>	<b>3DL2</b>	<b>2DS1</b>	<b>2DS2</b>	<b>2DS3</b>	<b>2DS4</b>	<b>2DS5</b>	<b>3DS1</b>
<b>1</b>	X		X		X	X				X		
<b>2</b>	X	X	X		X	X		X		X		
<b>3</b>	X	X	X	X	X	X		X	X	X		
<b>4</b>	X		X	X	X	X	X			X	X	X
<b>5</b>	X	X		X	X	X		X	X	X		
<b>6</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>7</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
<b>8</b>	X	X	X	X	X	X		X		X		
<b>9</b>	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>10</b>		X			X	X		X		X		
<b>11</b>	X		X	X	X	X	X		X	X		X
<b>12</b>	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
<b>13</b>	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X
<b>14</b>	X		X	X	X	X	X			X		X
<b>15</b>	X	X	X		X	X				X		
<b>16</b>		X	X		X	X		X		X		
<b>17</b>	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X
<b>18</b>	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X
<b>19</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
<b>20</b>	X		X		X	X	X			X		
<b>21</b>	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X
<b>22</b>	X	X	X	X	X	X	X	X		X		
<b>23</b>		X		X	X	X	X	X		X	X	X
<b>24</b>	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X
<b>25</b>	X	X		X		X	X	X	X		X	X
<b>26</b>	X		X	X	X	X	X			X	X	
<b>27</b>	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
<b>28</b>	X	X		X	X	X		X		X		
<b>29</b>	X		X	X	X	X	X	X		X		X
<b>30</b>	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X
<b>31</b>	X		X	X	X	X		X	X	X		

Genotyp	2DL1	2DL2	2DL3	2DL5	3DL1	3DL2	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1
<b>32</b>	X	X		X	X	X		X	X	X	X	
<b>33</b>		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
<b>34</b>	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	
<b>35</b>	X	X	X	X		X	X	X	X			X
<b>36</b>	X		X	X	X	X				X		
<b>37</b>	X		X	X	X	X			X	X		
<b>38</b>	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
<b>39</b>	X	X	X		X	X	X	X	X		X	
<b>40</b>		X	X		X	X	X	X		X		

PCR-Ansatz 1 HLA-C-Typisierung

DNA	<b>50ng</b>
Dest. Wasser	Ad 25µl
dNTP	1µl
Primer	1-1,5µM
HotstarTaq	0,125µl

PCR-Zyklus HLA-C-Typisierung



Um eine automatisierte und ununterbrochene Durchführung der PCR zu ermöglichen, sind alle heutzutage eingesetzten DNA-Polymerasen hitzestabil. Für die hier vorliegende Arbeit wurde ausschließlich die sog. Taq-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Sie besitzt ein Temperaturoptimum von 75°C und eine Halbwertszeit von 5 Min. bei 100°C. Dieser DNA-Polymerase fehlt eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität. Die Taq-Polymerase hängt ein überstehendes Adenosin an das 3'-Ende der Produktstränge an, sodass die entstehenden PCR-Produkte effektiv in TA- oder UA-Vektoren kloniert werden können.

## 2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit GraphPad Prism5 durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwert inkl. Standardabweichung dargestellt. Die Prüfung auf Signifikanz der Proteinexpressionsfrequenz zwischen NK-Zellen aus nicht-infizierten und infizierten Generierungskulturen wurde mit Hilfe des paarigen studentischen t-Tests ermittelt. Als statistisch signifikant verschieden (ein Sternchen, \*) gilt der Vergleich zwischen zwei Datensätzen wenn der p-Wert kleiner als 0,05 ist. Ist der p-Wert kleiner als 0,01 gilt er als statistisch sehr signifikant (zwei Sternchen, \*\*) und ist ein p-Wert kleiner als 0,001 wird er als statistisch hochsignifikant (drei Sternchen, \*\*\*) angesehen.

## 2.2.10 Zellkultur

### 2.2.10.1 Zellen auftauen und in Kultur nehmen

Die Zellen werden in ihrem Kryokonservierungsröhrchen angetaut und unter sterilen Bedingungen in ein 15 ml Röhrchen mit 10 ml zellspezifischem Medium überführt. Im Anschluss werden die Zellen ihrer Beschaffenheit entsprechend zentrifugiert (MSC/MRC-5 bei 172g und 3 Min., K562, PBMC, MNC, HSPC und NK-Zellen bei 370g und 7 Min., RT). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in einer ausreichenden Menge frischen Mediums resuspendiert. Die Zellen werden in eine Viel-Loch-Platte, oder Zellkulturflaschen überführt und entsprechend ihrer Menge mit Medium aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgt im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.10.2 Zellen füttern, Medium wechseln

Je nach Bedarf werden die kultivierten Zellen regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Manchmal reicht die Zugabe einer probaten Menge frischen Mediums zu dem bereits Vorhandenen. Bei einem starken Verbrauch der dargebotenen Nährstoffe empfiehlt sich ein partieller Austausch des alten Mediums um 50%. Die vollständige Abnahme des konditionierten Mediums kann je nach Zelltyp zum Schock führen und ist nicht zu empfehlen.

### 2.2.10.3 Zellen passagieren

Suspensionszellen können nach Belieben aufgeteilt, oder niedriger konzentriert werden, indem eine bestimmte Zellmenge aus einem Kulturgefäß abgenommen, in ein neues überführt und mit frischem Medium aufgefüllt wird.

Bei adhärennten Zellen wird das alte Medium abgenommen und der Zellrasen 1x mit einer probaten Menge DPBS abgespült, ohne ihn zu beschädigen. Um die Zellen vom Boden der

Zellkulturgefäße zu lösen wird eine kleine Menge Trypsin auf den Zellen verteilt. Nach einer kurzen Einwirkzeit wird das Trypsin wieder abgenommen und die Zellen werden für 2 bis 5 (je nach Zellart) Min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Trypsin ist ein Gemisch aus proteinspaltenden Enzymen des Dünndarms. Durch die Behandlung verlieren die Zellen die Bodenhaftung und können durch festes Klopfen gelöst werden. Durch die Zugabe von frischem Medium wird die enzymatische Reaktion gestoppt und der vollständige Abbau der Zellen verhindert. Die Zellen können nun gezählt, auf neue Kulturgefäße verteilt, oder portionsweise eingefroren werden.

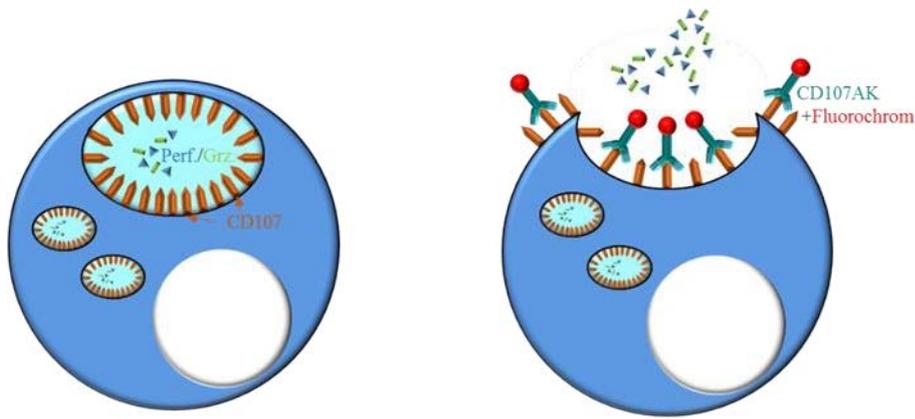
### 2.2.10.4 Zellen einfrieren

Die Zellen, die eingefroren werden sollen, werden geerntet (vergl. Kapitel 2.2.10.3) und Ihrer Morphologie entsprechend zentrifugiert (vergl. Kapitel 2.2.10.1). Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt (max.  $10 \times 10^6$  Zellen/ml/Röhrchen) und auf Eis gestellt. Die Zellen werden anschließen bei -80°C tiefgefroren. Zellen, die längerfristig konserviert werden sollen, werden nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

## 2.2.11 Funktionsassays

### 2.2.11.1 Der CD107-Degranulationsassay

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Funktionalität von NK-Zellen experimentell zu bestimmen. Mit dem sog. CD107-Degranulationsassay wird das Degranulationsvermögen der NK-Zellen ermittelt. Die zytotoxischen Granula der NK-Zelle enthalten Perforin und Granzym B. Auf der Innenseite der Granula befinden sich CD107-Moleküle, welche die NK-Zelle vor der Wirkung der eingeschlossenen Enzyme schützt. Sobald die NK-Zelle eine Zielzelle als infiziert, oder entartet identifiziert (z.B. aufgrund des Fehlens von HLA-Klasse I-Molekülen), werden die zytotoxischen Enzyme der Granula durch Endozytose in die immunologische Synapse entlassen. Durch die Verschmelzung der Granula mit der NK-Zellmembran gelangen die CD107-Moleküle auf die NK-Zelloberfläche (Abb. 7). Mit Hilfe spezifischer Antikörper können die CD107-Moleküle markiert und durchflusszytometrisch gemessen werden.



**Abb. 7 Schematische Darstellung der NK-Zelldegranulation.** NK-Zellen besitzen zytotoxische Granula deren Innenseiten mit CD107-Molekülen besetzt sind (links). Nach der Degranulation durch Endozytose gelangen die CD107-Moleküle auf die NK-Zelloberfläche und können dort von spezifischen Antikörpern gebunden werden (rechts). Die Bindung fluorochromgekoppelter Antikörper kann durchflusszytometrisch analysiert werden. Perf.: Perforin; Grz.: Granzym B. Verändert nach Uhrberg, 2005.

Für einen CD107-Assay werden die NK-Zellen vorab (mind. 16 Stunden) mit IL-2 (1000U/ml) stimuliert werden. Als Zielzelle dienen die HLA-Klasse I negativen K562-Zellen. Die generierten NK-Zellen werden geerntet und ihre Zellzahl wird bestimmt. Gleiches gilt für die K562. Im Anschluss werden die Zellen zentrifugiert (370g und 7 Min., RT). Die Zellpellets werden mit einer Endkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in NK-Medium aufgenommen. Die NK-Zellen werden mit den K562 in einem Verhältnis von 10:1 ( $1 \times 10^6$  NK-Zellen und  $1 \times 10^5$  K562) in einem Endvolumen von 200  $\mu$ l in einer 96 Lochplatte mit Rundboden kultiviert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Zu Beginn wird der Antikörper gegen CD107 hinzugefügt. Nach einer Stunde wird Monensin (entsprechend der Herstellerangaben; verhindert den intrazellulären Proteintransport, und somit, dass die CD107-Moleküle wieder internalisiert werden) zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden nach weiteren fünf Stunden Inkubation geerntet und mit weiteren Antikörpern extra- und/oder intrazellulär markiert. Darauf folgt die Analyse im Durchflusszytometer. Als Referenz dienen Proben die ohne Zielzellen für sechs Stunden inkubiert wurden (spontane Degranulation).

#### 2.2.11.2 Der CFSE-Zytotoxizitätsassay

Mit dem CFSE-Zytotoxizitätsassay wird die zytotoxische Effizienz der NK-Zellen ermittelt, indem Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, die es ermöglichen tote von lebendigen Zellen zu unterscheiden. Als Zielzellen, für die NK-Zellen, werden die HLA-Klasse I-negativen K562 verwendet. Vor dem Beginn des Assays müssen die NK-Zellen mind. 16 Stunden mit IL-2 (1000U/ml) stimuliert werden. Die Zellen (NK-Zellen und K562) werden geerntet und gezählt. Im Anschluss werden die K562 mit der Chemikalie CFDA-SE (*Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester*) für 10 Min. bei 37°C inkubiert. CFDA-SE wird leicht von den Zellen

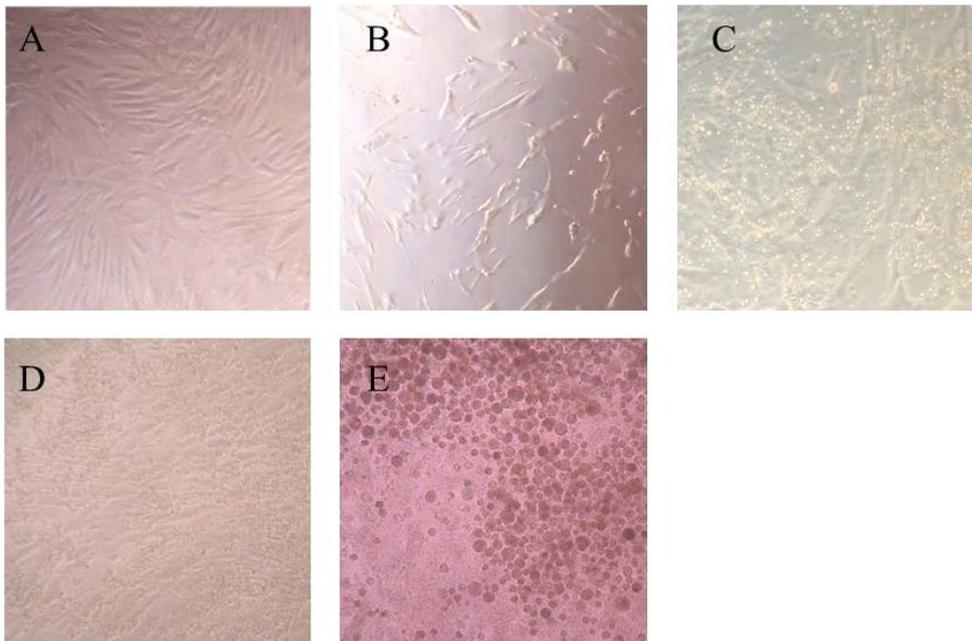
aufgenommen und bindet dort über den Succinimidyl-Ester vornehmlich an die Lysinreste intrazellulärer Proteine. Durch die, von intrazellulären Esterasen, durchgeführte Abspaltung des Diacetats fluoresziert das entstandene CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*). Die, auf diese Weise markierten K562 werden zweimal gewaschen (DPBS+20% FBS; 370g und 7 Min., RT) und das Zellpellet in NK-Medium resuspendiert (Endkonzentration  $1 \times 10^7$  Zellen/ml). Die NK-Zellen werden, ebenfalls in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml, in NK-Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:1 ( $1 \times 10^5$  NK-Zellen +  $1 \times 10^5$  K562) mit den K562 in 96 Lochplatten (Rundboden) für fünf Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nachfolgend werden die Zellen geerntet, mit DPBS gewaschen (370g und 7 Min., RT) und mit Propidium Iodid (PI) versetzt. PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der die perforierte Membran toter Zellen durchdringt mit den dortigen Nukleinsäuren interkaliert. Im Durchflusszytometer können nun diejenigen Zellen identifiziert werden, die während des Assays gestorben sind bzw. getötet wurden. Diese Zellen sind doppelt positiv für CFSE und PI. Als Referenzen dienen K562, die ohne NK-Zellen inkubiert wurden (spontane Todesrate). Darüber hinaus werden auch ungefärbte und nur mit CFDA-SE gefärbte K562 als Kontrolle mitgeführt

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung einer HCMV-infizierten Stammzellnische für ein humanes NK-Zellgenerierungsmodell

Ein Generierungsmodell, das humane mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark nutzt, um NK-Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (HSPC) zu differenzieren, wurde bereits in einem vorausgegangen Projekt am ITZ entwickelt (Brands, 2014) (vergl. Kapitel 1.1.2.5). Die MSC sind eine wichtige Komponente der natürlichen Entwicklungsnische der NK-Zellen, deren Differenzierung im Knochenmark beginnt. Darüber hinaus, ist bekannt, dass sich die MSC mit dem HCMV infizieren lassen (Meisel et al., 2014). Somit bieten sie die Möglichkeit, die Auswirkungen einer HCMV-Infektion auf die NK-Zellentwicklung in einem *in vitro* Modell untersuchen zu können. Das erste Ziel musste also sein, einen Virusstamm auszuwählen, der die verwendeten MSC effektiv infiziert, sie aber in ihrer unterstützenden Funktion möglichst wenig einschränkt. Zudem sollte er in seiner pathologischen Effizienz einem wildtypischen HCMV-Stamm weitestgehend entsprechen. In Absprache mit Herrn PD Dr. Zimmermann (Institut für Virologie, UKD) kamen die, in der Literatur viel zitierten Virusstämme AD169 sowie TB40/E in die engere Auswahl. Trotz seiner höheren Passage und einiger Gendeletionen bietet AD169 den Vorteil, leicht in großen Mengen produziert werden zu können, was für die Arbeit mit Generierungskulturen nicht zu unterschätzen ist.

Humane Fibroblasten, insbesondere MRC-5, eignen sich am besten für die Virusstockproduktion. Als Wirtszelle unterstützen sie die Virusreplikation optimal und eine erfolgreiche Infektion lässt sich leicht anhand des zytopathischen Effekts erkennen (vergl. Kapitel 1.2.1). Damit die erfolgreiche MSC-Infektion auch als solche verifiziert werden konnte, wurden gleichzeitig auch MRC-5 Zellen mit AD169 infiziert. Dabei wurden Konzentrationen von einer MOI zwischen 1 und 5 eingesetzt.

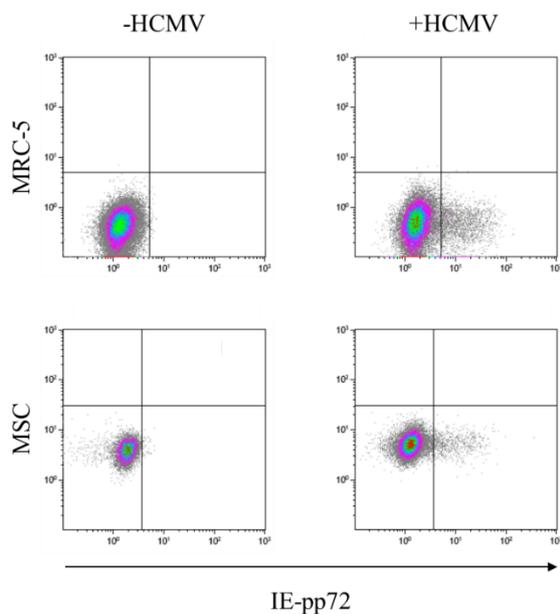


**Abb. 8 Zytopathischer Effekt der HCMV-Infektion.** **A** Die nicht-infizierten MSC liegen in einem dichten Zellrasen, langgestreckt am Kulturgefäßboden. **B** 24 Stunden nach der Infektion mit dem HCMV-Stamm AD169 sind die Zellen rund und geschwollen. **C** Nach 48 Stunden strecken sich die infizierten Zellen wieder, allerdings bleibt eine geschwollene Kontur erhalten und der Zellrasen schließt sich nicht vollständig (Kokultur mit Lymphozyten). **D** Die puren MSC im Vergleich mit **E** den infizierten MSC nach 21 Tagen. Die Zellen sind stark vergrößert und haben ihre Adhärenz weitestgehend verloren (A/B/C: 100-fache Vergrößerung; D/E: 40-fache Vergrößerung).

Die Infektion der MSC verursacht die charakteristischen phänotypischen Veränderungen wie das Anschwellen und die Abrundung, der normalerweise langgezogenen Zellen (wie es auch bei den MRC-5 zu beobachten ist), was u.a. auf die Wirkung des HCMV-Proteins vMIA zurückzuführen ist (Abb. 8 A/B). Der vormals geschlossene Zellrasen wird aufgebrochen. Nach ca. zwei Tagen strecken sich die Zellen wieder ein wenig, erscheinen unter dem Mikroskop aber dauerhaft fülliger und größer (Abb. 8 C). Je höher die Ausgangs-MOI desto mehr Zellen sind infiziert. Bei der Beobachtung der infizierten MSC über einen längeren Zeitraum lässt sich feststellen, dass auch nach 21 Tagen noch scheinbar intakte, infizierte Zellen in der Kultur vorhanden sind. Allerdings haben diese Zellen sich phänotypisch stark verändert. Darüber hinaus lösen sie sich vom Kulturgefäßboden, verlieren also ihre Adhärenz, was wiederum auf einen seneszenten Zustand schließen lässt (Abb. 8 D/E). Insgesamt scheinen die MSC eine HCMV-Infektion gut tolerieren zu können und eine NK-Zellgenerierung auf infizierten MSC sollte dementsprechend möglich sein.

Eine erfolgreiche HCMV-Infektion lässt sich neben der phänotypischen Analyse auch durchflusszytometrisch bestätigen. Die zu untersuchenden Zellen werden während des ersten Infektionszyklus geerntet und intrazellulär mit einem Antikörper gegen das IE-pp72-Protein markiert. Dieser Antikörper ist an das Fluorochrom Alexa Fluor 488 gekoppelt, welches unter

entsprechender Laserlichtanregung ein Fluoreszenzsignal aussendet. Die Messungen zeigen deutlich, dass sowohl bei den MRC-5 als auch bei den MSC eine IE-pp72-positive Zellpopulation vorhanden ist (Abb. 9). Die geringe Größe dieser Population (MRC-5: 8,02%; MSC 20: 3,86%) ergibt sich dadurch, dass bereits bei der Infektionsstärke darauf geachtet wurde, nicht alle Zellen einer Kultur zeitgleich zu infizieren. Dadurch kann die Unterstützung der MSC innerhalb einer Generierungskultur länger andauern. In diesem Fall würden die im ersten Infektionszyklus infizierten MSC, nach der Virusfreisetzung (nach ca. 72 Stunden) die bis dato noch nicht infizierten Zellen ihrerseits infizieren und einen weiteren Infektionszyklus auslösen. Das führt wiederum dazu, dass die sich entwickelnden NK-Zellen in der Generierungskultur für einen längeren Zeitraum mit den Signalen einer infizierten Knochenmarknische versorgt werden.



**Abb. 9 Nachweis der HCMV-Infektion mittels des Proteins IE-pp72.** Die durchflusszytometrische Analyse belegt die erfolgreiche Infektion der MSC. Nach einer Infektion mit dem HCMV-Stamm AD169 können sowohl in MRC-5 (oben rechts) als auch in MSC (unten rechts) die bereits sehr früh exprimierte IE-pp72-Moleküle detektiert werden. Die nicht-infizierten Zellen sind erwartungsgemäß negativ für IE-pp72 (oben/unten links).

Dass die HCMV in den MSC auch reproduktiv sind und nicht nur eine persistierende Infektion auslösen, konnte dadurch gezeigt werden, dass es möglich war, frische, nicht-infizierte MSC mit dem Überstand einer viertägigen HCMV-infizierten MSC-Kultur zu infizieren. Nach ca. 72 Stunden wurden demnach reproduzierte HCMV von den Wirtszellen in das Medium freigesetzt (Zellyse). Es kann sich nicht um einen Virenüberschuss der Erstinfektion handeln, da die zu infizierenden Zellen, nach einer Adaptionsphase von max. 24 Stunden gewaschen wurden und frisches Medium erhielten.

Während einer HCMV-Infektion *in vivo* kommt es zu zahlreichen immunologisch relevanten Veränderungen in der HLA-Expression der Wirtszellen. Es wird vermutet, dass die Interaktion der NK-Zellrezeptoren für verschiedene HLA-Klasse I-Moleküle mit den verändert exprimierten HLA-Klasse I-Molekülen der infizierten Zellen, zu einer Modifikation des NK-Zellrezeptorrepertoires führen kann. Daher scheint die Zell-Zell-Interaktion der sich entwickelnden NK-Zellen mit den MSC und ihren präsentierten Oberflächenmolekülen nicht unerheblich. Somit ist es von besonderem Interesse, dass der verwendete HCMV-Stamm die HLA-Expression möglichst wildtypisch beeinflusst. *In vivo* lässt sich beobachten, dass, im Falle einer HCMV-Infektion, die Oberflächenexpression der klassischen HLA-Klasse I-Moleküle reduziert wird, während das nicht klassische HLA-E-Molekül verstärkt auf der Zelloberfläche in Erscheinung tritt. Dieser Aspekt der HCMV-Infektion lässt sich ebenfalls durchflusszytometrisch erfassen. Die infizierten MSC und MRC-5 wurden je einen, zwei und drei Tage nach der Infektion geerntet und mit verschiedenen HLA-Klasse I-spezifischen (HLA-A/B/C (W6/32), HLA-C (DT9; WK4C11), HLA-E (3D12)) Antikörpern behandelt. Diese Antikörper wurden in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom markiert und die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die Messwerte zeigen eine eindeutig reduzierte Expression der HLA-A/B-Moleküle und einen Anstieg des HLA-E. Überraschenderweise konnte keine Reduktion der HLA-C-Moleküle nachgewiesen werden. Vielmehr scheinen sie entweder gleichbleibend, oder sogar verstärkt auf der Oberfläche exprimiert zu werden (Abb. 10/Abb. 11).

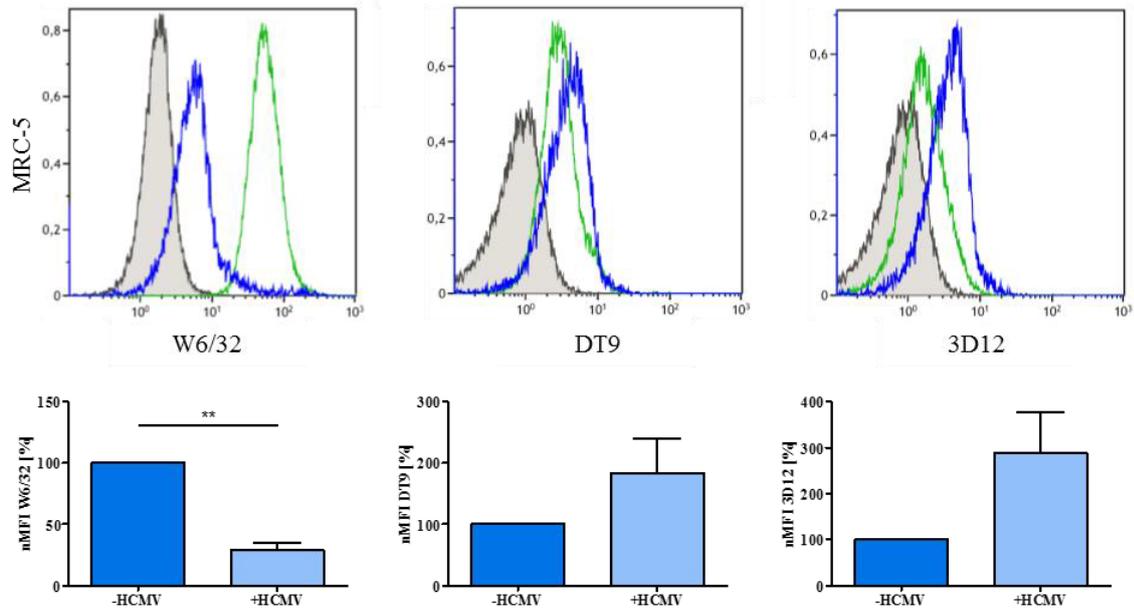
Die MSC lassen sich ohne Schwierigkeiten mit dem HCMV-Stamm AD169 infizieren, was sich sowohl phänotypisch als auch durchflusszytometrisch erfassen lässt. Zudem ist die Infektion reproduktiv und es können die typischen immunologischen Modifikationen der HLA-Klasse I-Moleküle beobachtet werden. Die HCMV-infizierten MSC können demnach in ein NK-Zellgenerierungsmodell integriert werden.

### 3.1.1 HLA-C-Expression im Fall einer HCMV-Infektion

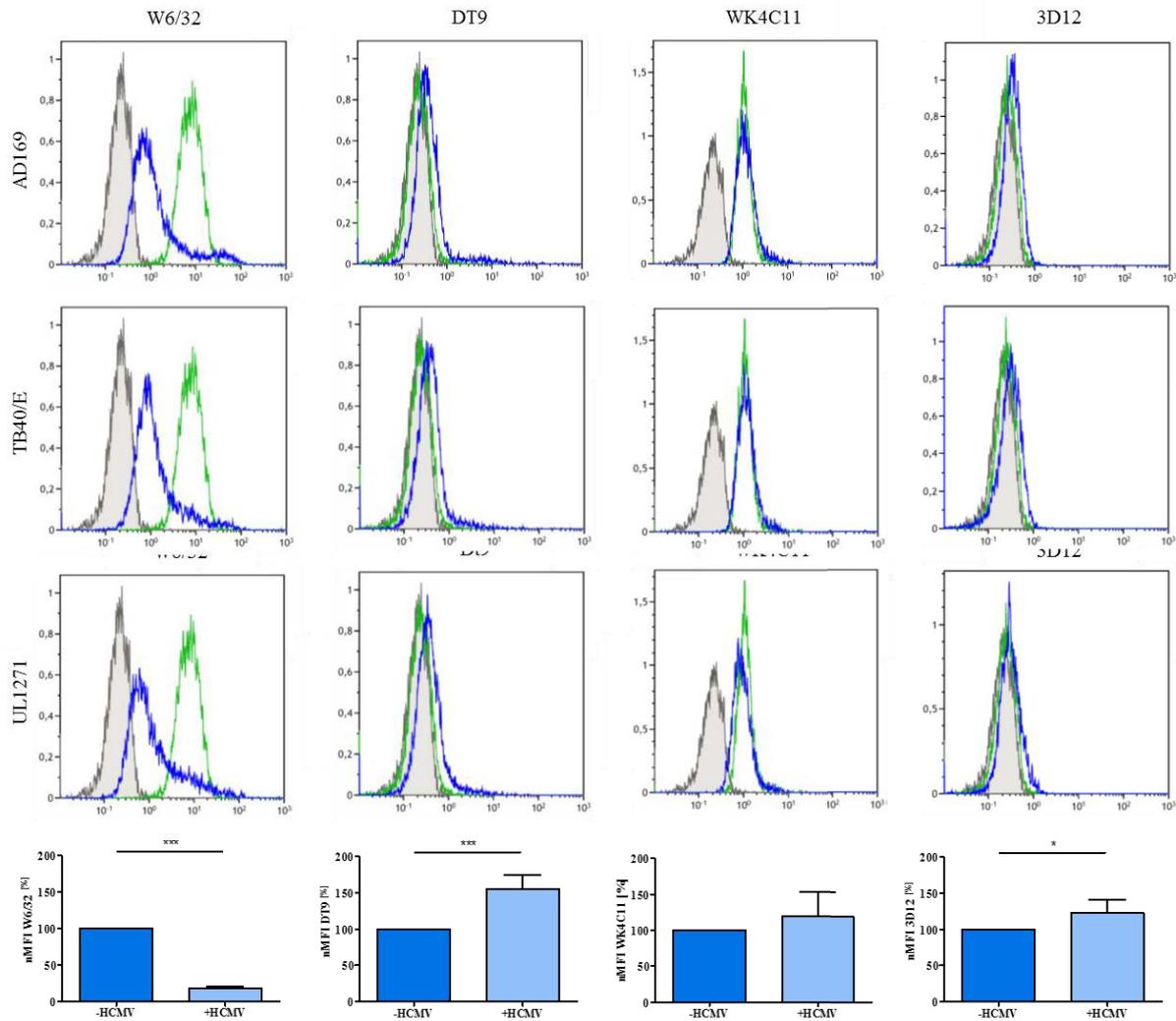
In der Literatur wird allgemein von einer Reduktion der klassischen HLA-Klasse I-Moleküle im Zuge einer HCMV-Infektion berichtet. Nur wenige Ausnahmen differenzieren dabei zwischen der Reduktion der klassischen HLA-A/B-Moleküle und einer gleichbleibenden HLA-C-Expression (Ameres et al., 2013; Llano et al., 2003; Schust et al., 1998). Da die HLA-C-Expression für die Lizenzierung KIR-positiver NK-Zellen von entscheidender Bedeutung ist und aufgrund der Beobachtung, dass es, als Folge einer HCMV-Infektion, *in vivo* zu einer

präferentiellen Expansion HLA-C spezifischer KIR kommen kann, wurde die HLA-C-Expression in HCMV-infizierten MSC eingehender untersucht.

MRC-5-Fibroblasten dienen häufig als Nährzellen, für Kokulturen in denen der Einfluss des HCMV auf NK-Zellen untersucht wird (vergl. Kapitel 1.2.1.5.1). Sie eignen sich hervorragend als Wirt für das HCMV und es konnte bereits gezeigt werden, dass die Infektion mit dem HCMV-Stamm AD169 zu einer Reduktion der klassischen HLA-Klasse I-Moleküle sowie zu einem Anstieg der HLA-E-Expression führt (Guma et al., 2006a; Rölle et al., 2014). Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden MRC-5 Zellen ebenfalls mit dem AD169 infiziert und neben der HLA-A/B- und HLA-E-Expression auch die von HLA-C untersucht. Hierbei zeigte sich, dass es neben einer Reduktion der HLA-A/B-Moleküle und dem Anstieg des HLA-E auch zu einer erhöhten HLA-C-Expression kommt (Abb. 10). Darüber hinaus wurden verschiedene MSC-Linien (MSC9/16/20/39) mit unterschiedlichen HCMV-Stämmen (AD169, TB40/E) und einem Patientenisolat (UL1271) infiziert und im Anschluss nach 24, 48 und 72 Stunden die HLA-Oberflächenexpression bestimmt. Um die HLA-C-Expression zu untersuchen wurden zwei verschiedene HLA-C-spezifische Antikörper verwendet. Der Klon DT9 wurde freundlicherweise von Frau Dr. Carrington (Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, MD, USA) und der Klon WK4C11 von Herrn Dr. Mulder (Leids Universitair Medisch Centrum, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die Analyse bestätigte in allen Fällen eine signifikante Reduktion der HLA-A/B-Moleküle (81% geringeres HLA-A/B-Signal 72 Std. nach einer HCMV-Infektion;  $p$  (W6/32) < 0,0001), eine Expansion von HLA-E (um 23% erhöhtes HLA-E-Signal 72 Std. nach der HCMV-Infektion;  $p$  (3D12) = 0,0223) und eine zumindest gleichbleibende, zum Teil auch deutlich erhöhte HLA-C-Expression (im Durchschnitt ein 37% höheres HLA-C-Signal 72 Std. nach einer HCMV-Infektion;  $p$  (DT9) = 0,0007,  $p$  (WK4C11) = 0,2360) (Abb. 11). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um einen virusstammspezifischen Effekt handelt, da die Ergebnisse sowohl für AD169 als auch für TB40/E vergleichbar sind. Der Einsatz des Patientenisolates UL1271 zeigt außerdem, dass die veränderte HLA-Klasse I-Expression durch die Virusstämme (AD169/TB40/E), der durch den Wildtyp entspricht. Außerdem waren die Beobachtungen in allen verwendeten MSC und auch in MRC-5 konstant. Somit handelt es sich auch nicht um ein wirtszellspezifisches Phänomen.



**Abb. 10** Das HCMV führt in Fibroblasten zu einer Reduktion der HLA-A/B-Moleküle auf der Zelloberfläche und zu einem leichten Anstieg der HLA-C bzw. -E-Expression. Die Infektion der MRC-5 mit dem HCMV-Stamm AD169 führt zu Veränderungen in der HLA-Expression. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*; MFI) wurde anhand der Messwerte der nicht-infizierten Kontrolle normalisiert. Das HLA-A/B-Signal (W6/32) nimmt bei einer HCMV-Infektion ab, während die HLA-C (DT9 & WK4C11) und -E (3D12)-Signale zunehmen. Die MRC-5-Histogramme zeigen die Resultate nach einer Infektion mit AD169 nach 72 Std.. Die Histogramme stehen exemplarisch für alle erhobenen Daten (grau: ungefärbte Kontrolle, grün: nicht-infizierte Zellen, blau: infizierte Zellen). Die Balkendiagramme zeigen die durchschnittliche Expressionsreduktion bzw. -steigerung nach einer HCMV-Infektion.  $n = 3$ ,  $p$  (W6/32) = 0,0017,  $p$  (DT9) = 0,1260,  $p$  (3D12) = 0,0660). nMFI = normalisierte Fluoreszenzintensität.

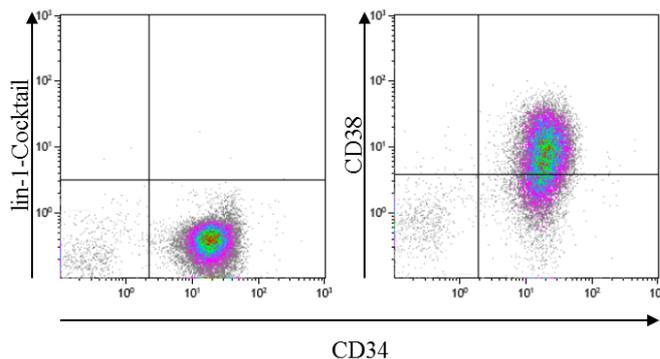


**Abb. 11** Veränderte HLA-Expression auf MSC nach einer HCMV-Infektion. Die Infektion der MSC mit den HCMV-Stämmen AD169, TB40/E und dem Patientenisolat UL1271 führt zu Veränderungen in der HLA-Expression. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*; MFI) wurde anhand der Messwerte der nicht-infizierten Kontrolle normalisiert. Das HLA-A/B-Signal (W6/32) nimmt bei einer HCMV-Infektion ab, während die HLA-C (DT9 & WK4C11) und -E (3D12)-Signale zunehmen. Die MSC-Histogramme zeigen repräsentativ die HLA-Expression von MSC9 nach 72 Stunden (grau: ungefärbte Kontrolle, grün: nicht-infizierte Zellen, blau: infizierte Zellen). Die jeweiligen Diagramme zeigen die durchschnittliche Expressionsreduktion bzw. -steigerung nach einer HCMV-Infektion.  $n = 6$ ,  $p$  (W6/32)  $< 0,0001$ ,  $p$  (DT9) = 0,0007,  $p$  (WK4C11) = 0,2360,  $p$  (3D12) = 0,0223; nMFI = normalisierte Fluoreszenzintensität.

Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass die Modifikation der NK-Zellen durch das HCMV mittels der Interaktion der NK-Zellen mit den infizierten Zielzellen ausgelöst wird. HLA-E ist in diesem Fall der Ligand für die expandierten NKG2C-Moleküle wohingegen HLA-C als Ligand für die expandierten inhibitorischen KIR2DL-Moleküle fungiert. Diese wechselseitige Beeinflussung scheint ein beständiges Aufrüsten im Kampf um die Immunkontrolle widerzuspiegeln.

### 3.2 Die *in vitro* NK-Zelldifferenzierung in einer HCMV-infizierten Stammzellnische

Für das Generierungsmodell werden immer zwei Ansätze parallel analysiert. Bei einem Ansatz sind die MSC unbehandelt, also pur und bei dem zweiten werden sie mit AD169 (MOI zwischen 0,1 und 5) infiziert. Die HSPC werden aus Nabelschnurblut, das nicht älter als 24 Stunden ist, isoliert. Die Reinheit ( $\text{Lin}(\text{CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56})^- \text{CD34}^+$ ) der HSPC wird durchflusszytometrisch überprüft und liegt durchschnittlich bei 95% (Abb. 12).



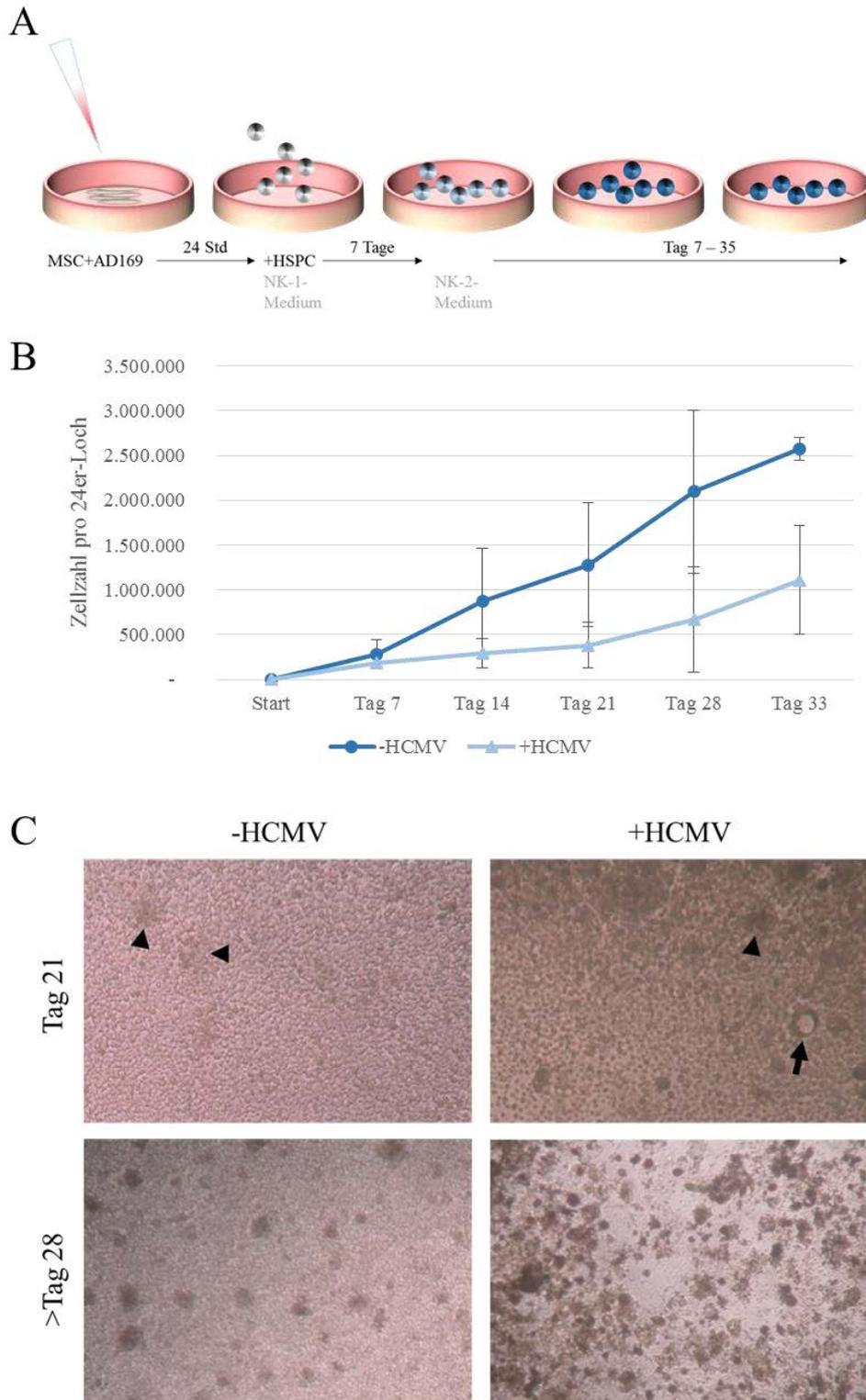
**Abb. 12 Reinheit der aus Nabelschnurblut isolierten HSPC.** Die frisch isolierten HSPC werden mit einem Lineage-Antikörper-Cocktail (lin-1) sowie Antikörpern gegen CD34 und CD38 markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Durchschnittlich sind 95% der isolierten HSPC für CD34 positiv; die Mehrheit davon ist auch CD38 positiv (Der lin-1 Cocktail enthält Antikörper gegen CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56).

Die Generierung erfolgt in 24-Loch-Platten. In jeder Vertiefung befinden sich ca. 140.000 MSC. 24 Stunden nach der Infektion werden 1000-5000 HSPC hinzugegeben und bis zu fünf Wochen kokultiviert. Nach einer Initiationsphase von sieben Tagen wird die Zusammensetzung des Mediums leicht variiert (NK-1-Medium bis Tag 7; NK-2-Medium ab Tag 7), um die NK-Zelldifferenzierung optimal zu unterstützen. Zu festgelegten Zeitpunkten werden Stichproben der generierten Zellen geerntet und untersucht (Abb. 13 A).

#### 3.2.1 Einfluss der HCMV-Infektion auf die Effektivität der NK-Zellgenerierung auf MSC.

Bei der mikroskopischen Beobachtung der sich entwickelnden Zellen lassen sich, während der ersten Woche, kaum Unterschiede zwischen den reinen und den infizierten Ansätzen feststellen. Die HSPC proliferieren in etwa gleich stark und haben sich durchschnittlich ver Hundertfacht (Abb. 13 B). Der MSC-Zellrasen ist in den unbehandelten Ansätzen intakt wohingegen er aufgrund der Infektion in den Parallelansätzen weniger geschlossen ist. Das Medium zeigt in beiden Ansätzen keinen Farbumschlag. Nach 14 Tagen wird deutlich, dass die HSPC und

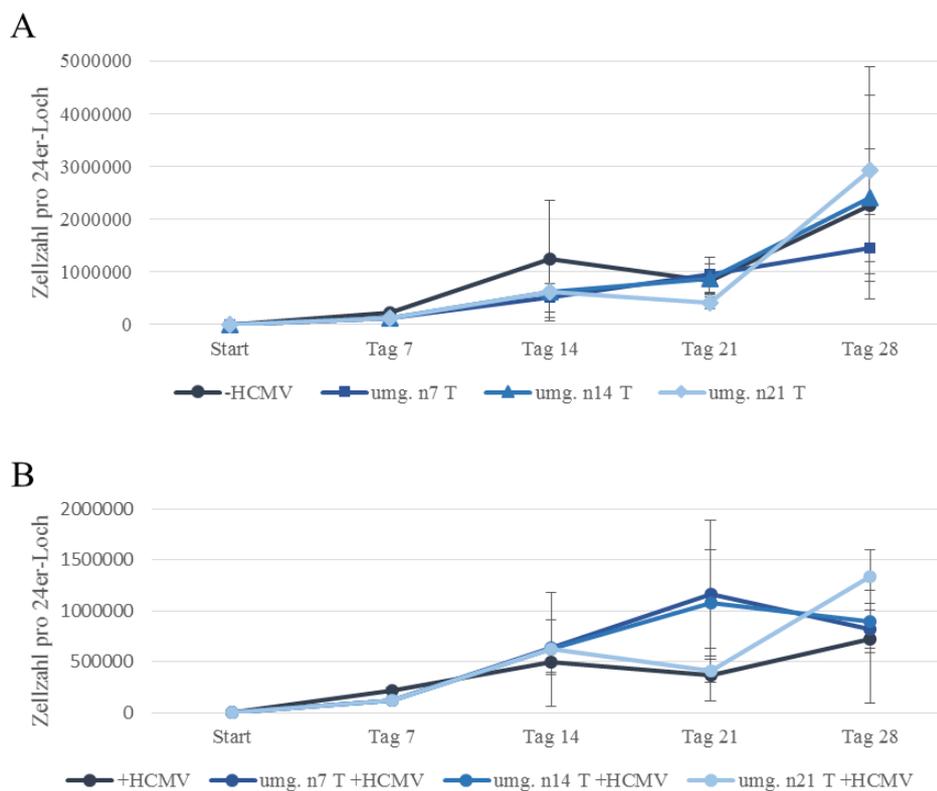
frühen NK-Zellen, die auf infizierten MSC wachsen nicht mehr so stark proliferieren wie die auf nicht-infizierten MSC (-HCMV  $\emptyset$   $1,3 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung; +HCMV  $\emptyset$   $3,8 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung). Allerdings bilden sie schon erste Zellcluster, also Ansammlungen von NK-Zellvorläufern, die typisch für die NK-Zellentwicklung *in vitro* sind. Diese Cluster sieht man in den reinen Ansätzen nur vereinzelt. Zwischen Tag 14 und 21 der Kokultur kommt es in den reinen Proben häufiger zu einem Farbumschlag des Mediums, was auf eine höhere Stoffwechselaktivität schließen lässt. Nach 21 Tagen zeigen sich z.T. große Unterschiede zwischen den Zellen von verschiedenen Spendern. Während die sich entwickelnden NK-Zellen des einen Spenders weiterhin stark proliferieren, immer größer werdende Cluster bilden und die MSC in der Kultur verdrängen, stagnieren andere, oder reduzieren sogar ihre Zellzahl, während der MSC-Rasen bereits vorhandene Löcher wieder füllen kann. Dies gilt sowohl für die reinen als auch für die infizierten Ansätze. Durchschnittlich sehen die NK-Zellen in den reinen Ansätzen ab der dritten Woche vitaler aus (die Zellen sind prall und rund, was durch die Lichtbrechung des Mikroskops hervorgehoben wird). Bei den infizierten Kulturen bilden sich große, dunkle Zellcluster von sterbenden Zellen (Abb. 13 C). Dieser Effekt verstärkt sich in den nächsten Wochen. Nichtsdestotrotz nimmt die Zellzahl der sich entwickelnden NK-Zellen in der Gesamtheit weiter zu. Nach 28 Tagen sind in den meisten Ansätzen (pur und infiziert) keine MSC mehr zu sehen. In den infizierten Kulturen befinden sich mehr tote Zellen als lebendige.



**Abb. 13 *In vitro* NK-Zelldifferenzierung mit und ohne HCMV.** **A** Schematische Darstellung der NK-Zellgenerierungskultur. **B** Wachstumskurve der sich entwickelnden NK-Zellen während der Differenzierungskultur mit und ohne HCMV ( $n = 2-13$ ). **C** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Generierungskultur zu verschiedenen Zeitpunkten. Nach 21 Tagen (oben) ist der Zellkulturboden mit NK-Zellen bedeckt. Die Zellen bilden Cluster, der MSC-Rasen ist größtenteils verschwunden. Wenn die Zellen länger als vier Wochen kultiviert werden, sterben sie sukzessive ab. Bei Kokulturen mit infizierten MSC tritt die Seneszenz schneller und heftiger ein (unten rechts). Pfeilköpfe zeigen auf NK-Zellcluster, Pfeile auf infizierte MSC.

### 3.2.2 Die Erneuerung der MSC während der Generierung hat sowohl positive als auch negative Effekte

Die Beobachtungen der infizierten MSC ergaben, dass sie zwar auch nach 21 Tagen noch intakt in der Kultur vorlagen, aber ihre phänotypischen Veränderungen lassen Zweifel daran aufkommen, ob sie nach dieser langen Zeitspanne die NK-Zelldifferenzierung noch adäquat unterstützen können. Deshalb wurde ein Teil der sich entwickelnden NK-Zellen nach 7, 14 oder 21 Tagen auf frisch infizierte MSC umgesetzt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden auch Zellen aus den puren Ansätzen zu den gleichen Zeitpunkten auf frische nicht-infizierte MSC umplattiert. Die Zellzahlbestimmung ergab, dass die Umsetzung der puren Ansätze keinen positiven Effekt auf die Zellproliferation hatte. Die Gesamtzellzahl ging im Gegenteil in einigen Fällen nach der Umsetzung sogar zurück (Abb. 14 A). Wenn die sich entwickelnden Zellen bereits Cluster gebildet hatten, schien die Zerstörung ihres Umweltgefüges die Proliferation zu hemmen und in einigen Fällen sogar zur Apoptose zu führen.



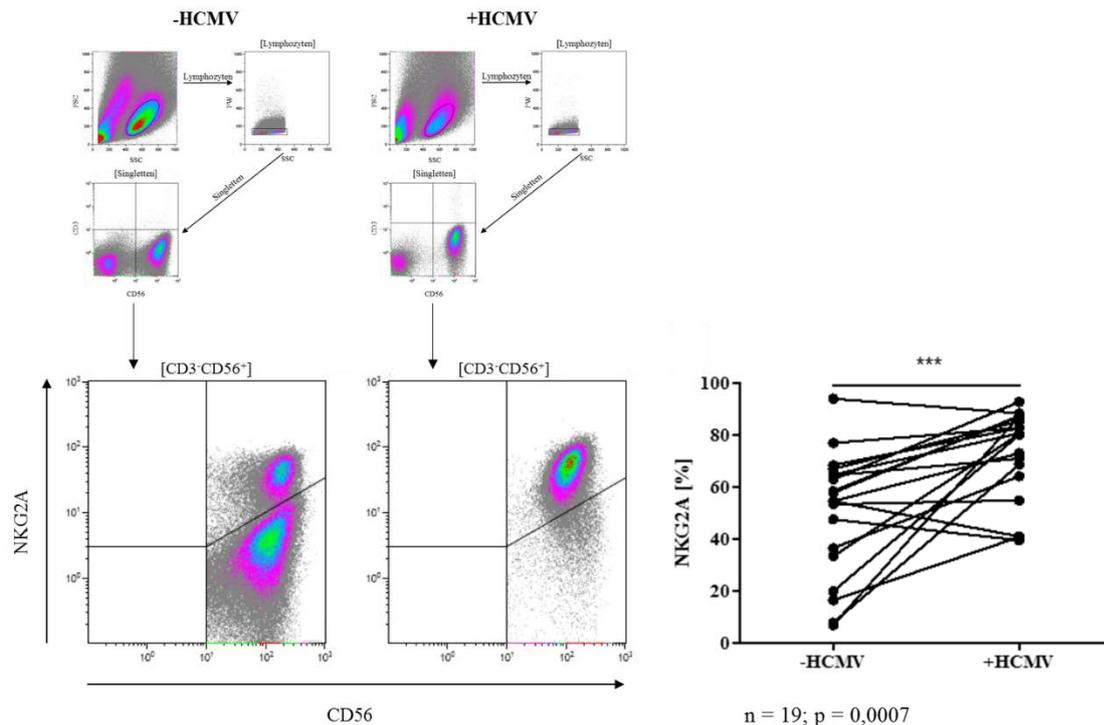
**Abb. 14 Proliferation nach dem Austausch der MSC.** **A** Wenn die HSPC nach 7 Tagen auf frische, nicht-infizierte MSC umgesetzt werden, hemmt das die Proliferation. Ein Umsetzen nach 14 Tagen hat keinen Einfluss auf das Wachstum und nach 21 Tagen wachsen sie durchschnittlich etwas besser ( $n = 3$ ). **B** Werden die Zellen während der Generierung hingegen auf frisch infizierte MSC umgesetzt proliferieren die Zellen durchschnittlich mehr ( $n = 3$ ). umg. n7 T = umgesetzt nach 7 Tagen.

Bei den infizierten Ansätzen ließ sich hingegen nach jeder Umplattierung ein, wenn auch geringer, Proliferationsschub verzeichnen (Abb. 14 B).

Letzteres könnte damit zusammenhängen, dass die HCMV-Infektion eine partielle Zelllyse der MSC zur Folge hat. Dabei werden Lysosomen freigesetzt deren Enzyme weitere Zellen in der Kultur schädigen können. Eine Umplattierung entfernt tote und sterbende Zellen aus der Kultur und verhindert die durch sie ausgelöste Wachstumshemmung.

### 3.2.3 Die HCMV-Infektion der MSC führt zu einer Steigerung der Expression des inhibitorischen Rezeptors NKG2A

Jede Woche wurden Stichproben der Generierungen durchflusszytometrisch analysiert. Die wichtigsten Parameter waren hierbei CD56 und CD3, um die sich entwickelnden NK-Zellen zu definieren (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), NKG2A als einer der ersten NK-Zellrezeptoren, ein KIR-MIX bestehend aus KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/S2 und KIR3DL1 als Marker für die fortgeschrittenere Entwicklung der NK-Zellen und NKG2C, der in der Literatur, aufgrund seiner, von HCMV verursachten, Expansion *in vivo*, sehr viel Beachtung findet. Die durchflusszytometrische Analyse der CD56 positiven NK-Zellen der Generierung ergab einen dramatischen Anstieg der NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen, wenn die MSC mit dem HCMV infiziert waren (-HCMV: 47% NKG2A<sup>+</sup>; +HCMV: 71% NKG2A<sup>+</sup>; p = 0,0007) (Abb. 15). NKG2A gelangt nur als Heterodimer mit CD94 auf die NK-Zelloberfläche, welches das Erreichen der vierten Entwicklungsstufe der NK-Zellen markiert (vergl. Kapitel 1.1.2.1). Die vermehrte NKG2A-Expression deutet sich bereits nach 14 Tagen der Generierungskultur an (Daten nicht gezeigt). Nach drei Wochen ist der prozentuale Anteil NKG2A-exprimierender NK-Zellen in den infizierten Kokulturen bereits anderthalbmal so groß wie in den nicht-infizierten Kontrollen. Dass die sich entwickelnden NK-Zellen mit HCMV-Kontakt bereits so früh, nach 14 bis 21 Tagen, in großer Anzahl das 4. Entwicklungsstadium erreicht haben lässt den Eindruck entstehen, als ob sich die NK-Zellen unter dem Einfluss des HCMV schneller entwickeln würden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass unter dem Einfluss des HCMV NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen selektiv besser überleben.

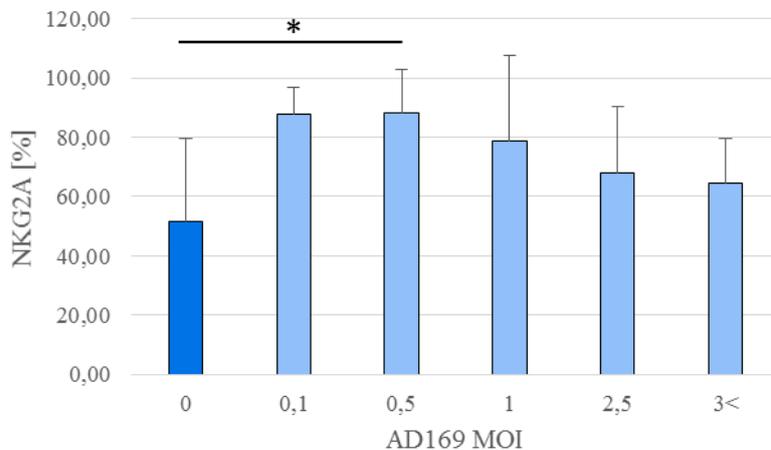


**Abb. 15 NKG2A-Expansion unter dem Einfluss von HCMV.** HSPC, die ihre Differenzierung auf infizierten MSC durchlaufen, bringen prozentual deutlich mehr NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen hervor. Die durchflusszytometrische Analyse der generierten NK-Zellen wird immer nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Anhand der Zellgröße (FSC) und -granularität (SSC) werden die Lymphozyten in der Kultur identifiziert. Über den SSC und die Pulsbreite (pulse width; PW) werden Doubletten, die das Ergebnis verfälschen könnten ausgeschlossen. Über die Parameter CD3 und CD56 werden dann die CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen definiert. Alle weiteren Analysen beziehen sich ausschließlich auf die NK-Zellen. Die *Dot Plots* stehen repräsentativ für die durchschnittlichen Messergebnisse. Die Daten wurden nach 21 Tagen Kokultur erhoben.

### 3.2.3.1 Welchen Einfluss hat die Viruskonzentration auf die NKG2A-Expansion?

Die Expansion der NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen, die durch die HCMV-Infektion verursacht wird, kann verschiedene Ursprünge haben. Die Höhe der Viruskonzentration könnte ein entscheidender Faktor sein. Daher wurden die MSC mit unterschiedlichen Virusmengen (MOI 0,1-3<) infiziert und die nachfolgend generierten Zellen wiederum nach 21 Tagen durchflusszytometrisch untersucht. Eine NKG2A-Expansion ließ sich bereits bei einer Ausgangs-MOI von 0,1 (rechnerisch wird nur jede zehnte Zelle einer Kultur infiziert) feststellen (-HCMV: 51% NKG2A<sup>+</sup>; +HCMV: 88% NKG2A<sup>+</sup>). Bei einer MOI von 0,5 war die Frequenz NKG2A-exprimierender NK-Zellen durchschnittlich sogar noch etwas und vor allem signifikant ( $p = 0,0208$ ) größer (Abb. 16). Bei einer höheren MOI sanken die Durchschnittswerte wieder leicht ab, wobei die Messwerte zwischen den einzelnen Spendern stark variierten. Eine hohe Ausgangsinfektionsrate bedeutet einen früheren Verfall der MSC und somit eine schlechtere Unterstützung der NK-Zellgenerierung über den gesamten Zeitraum der Entwicklung. Das Optimum liegt bei einer MOI von 0,5 (jede zweite MSC ist infiziert; - HCMV: 51% NKG2A<sup>+</sup>;

+HCMV: 88,4% NKG2A<sup>+</sup>; p = 0,0208). Alle weiteren Generierungen wurden mit dieser Ausgangskonzentration durchgeführt.

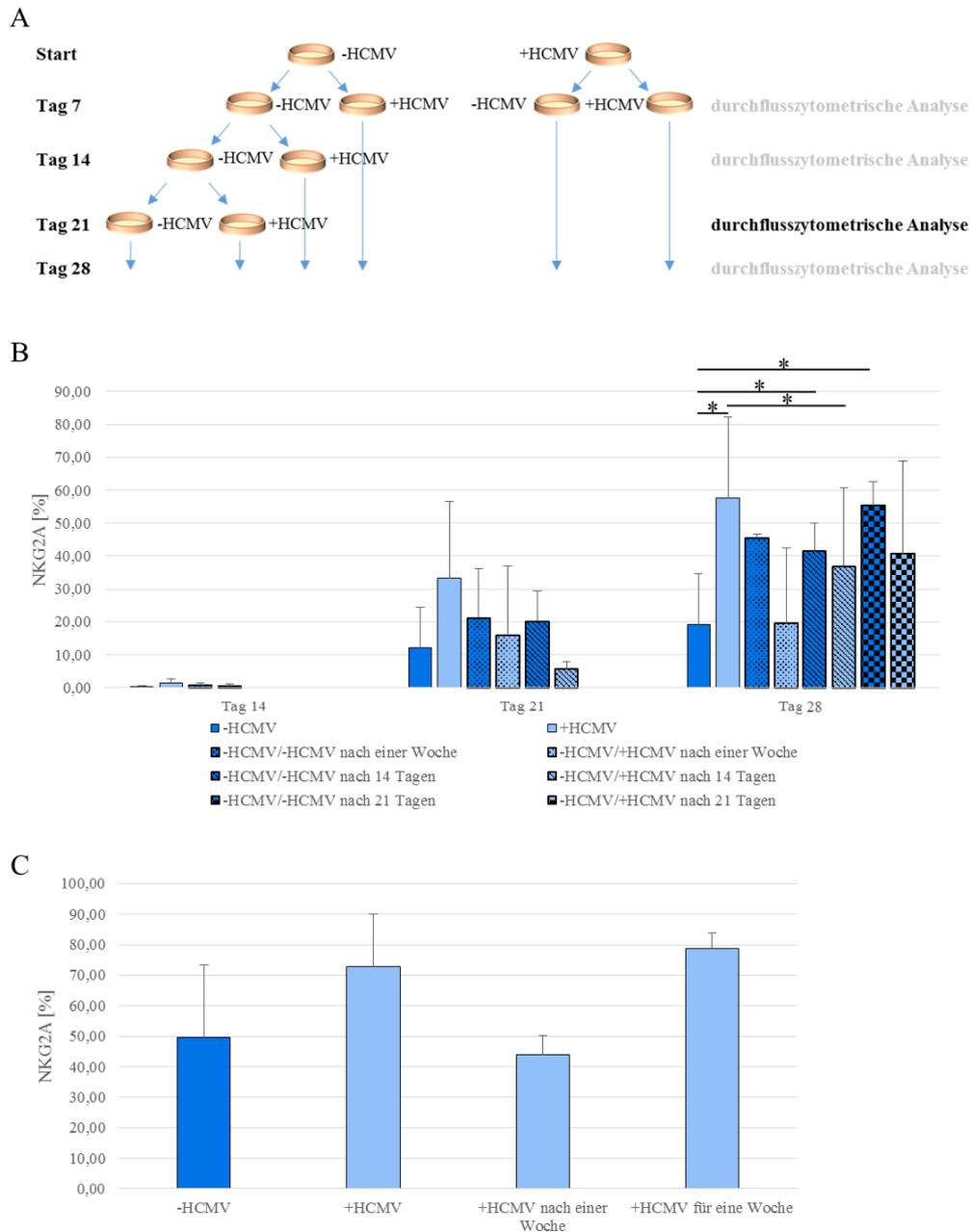


**Abb. 16 Die Infektion mit einer MOI von 0,1 ist ausreichend, um die Frequenz NKG2A-exprimierender NK-Zellen zu steigern.** Bereits die Infektion jeder zehnten MSC (MOI 0,1) erhöht die NKG2A-Expression der generierten NK-Zellen. Die höchste NKG2A-Frequenz wird bei einer MOI von 0,5 (jede zweite MSC ist infiziert) erreicht. Der Einsatz einer höheren MOI führt zu heterogeneren Ergebnissen, die im Durchschnitt geringer ausfallen. Die Daten wurden nach 21 Tagen Kokultur erhoben. n = 4; p (MOI 0,5) = 0,0208.

### 3.2.3.2 Die HCMV-Infektion stimuliert die NKG2A-Expansion bereits zu Beginn der NK-Zelldifferenzierung

Bei der Zelldifferenzierung ist der Zeitpunkt, an dem ein Signal die Zelle erreicht, nicht selten ausschlaggebend für die weitere Entwicklung. Ein prominentes Beispiel hierfür ist der NOTCH-Signalweg. Die NOTCH-Proteine sind an der Bildung verschiedener Organe beteiligt. Werden beispielsweise bei der Angiogenese des Zebrafisches, die Angioblasten, durch ein Notch-Signal stimuliert, ist damit ihr weiterer Entwicklungsweg vorgezeichnet; es entstehen Aortenzellen. Ohne dieses Notch-Signal werden die Angioblasten zu Zellen der Kardinalvene (S. F. Gilbert, 2010).

Es ist durchaus vorstellbar, dass auch bei der NK-Zellentwicklung, ein frühes HCMV-vermitteltes Signal die Differenzierung in eine bestimmte Richtung lenkt, deren Resultat die NKG2A-Expansion ist. Aufgrund dieser Überlegung wurden HSPC verschiedener Spender für je 7, 14 oder 21 Tage auf nichtinfizierten MSC kultiviert, bevor sie auf infizierte MSC umgesetzt wurden. Außerdem wurden reziprok HSPC für 7 Tage auf infizierten MSC generiert und im Anschluss auf pure MSC transferiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich durchgängige Generierungen auf puren oder infizierten MSC durchgeführt (Abb. 17 A).



**Abb. 17 Die HCMV-Infektion stimuliert die NKG2A-Expansion innerhalb der ersten Generierungswoche.** **A** Es werden HSPC sowohl auf infizierten, als auch auf nicht-infizierten MSC für 28 Tage generiert. Parallel werden nach 7, 14 und 21 Tagen, sich entwickelnde NK-Zellen von den nicht-infizierten MSC geerntet und auf infizierte MSC bzw. frische nicht-infizierte MSC umgesetzt. Außerdem werden NK-Zellvorläufer nach 7 Tagen aus einer infizierten Kokultur geerntet und auf frische, nicht-infizierte MSC transferiert. **B** Das Balkendiagramm verdeutlicht, dass die NKG2A-Expression der NK-Zellen zunimmt, die von nicht-infizierten auf frische nicht-infizierte MSC umgesetzt wurden. Die HCMV-bedingte NKG2A-Expansion wie sie in den konstanten Generierungen, ohne Umplattierung beobachtet werden kann (Balkendiagramme ohne Muster) bleibt aus. Die NKG2A-Expression zwischen NK-Zellen von nicht-infizierten und infizierten MSC ist nach 28 Tagen signifikant verschieden ( $n = 3$ ;  $p = 0,0381$  (Balken ohne Muster)). Außerdem unterscheidet sich die NKG2A-Expression zwischen konstant auf nicht-infizierten MSC kultivierten und nach 14 bzw. 21 Tagen umgesetzten Zellen auf nicht-infizierte MSC signifikant ( $n = 3$ ;  $p$  (-HCMV gegen -HCMV/-HCMV nach 14 Tagen) = 0,0316;  $p$  (-HCMV gegen -HCMV/-HCMV nach 21 Tagen) = 0,0413). Zudem gibt es signifikante Unterschiede in der NKG2A-Expression der konstant auf infizierten MSC kultivierten Zellen gegenüber den nach 14 Tagen auf infizierte MSC umgesetzten Zellen an Tag 28 ( $n = 3$ ;  $p$  (+HCMV gegen -HCMV/+HCMV nach 14 Tagen) = 0,0118) **C** Bei den Umplattierungsexperimenten zeigt sich, dass eine HCMV-Infektion nur dann zu einer NKG2A-Expansion führt, wenn die HSPC in den ersten sieben Tagen ihrer Entwicklung mit infizierten MSC in Kontakt kommen ( $n = 2-5$ ; Messung erfolgt an Tag 21).

Das Umsetzen der sich entwickelnden NK-Zellen von nicht-infizierten auf nicht-infizierte MSC führt zu einer Verschiebung der Frequenz NKG2A-Expimierender Zellen. Die an Tag 14 und 21 umgesetzten NK-Zellen tragen an Tag 28 signifikant häufiger NKG2A auf ihrer Oberfläche (Abb. 17 B). Eine NKG2A-Expansion bleibt nach dem Umsetzen auf infizierte MSC nach den ersten sieben Entwicklungstagen hingegen aus.

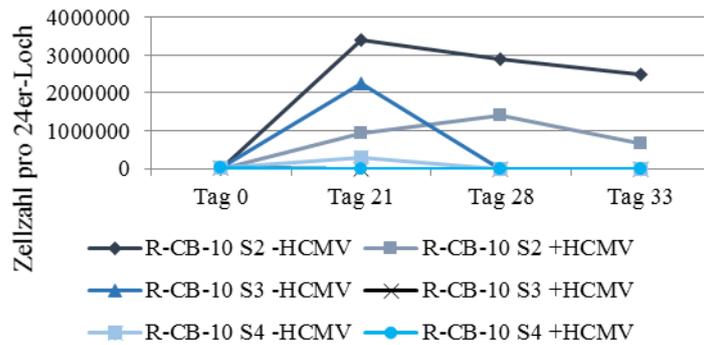
Die Analyse der NKG2A-Expression nach einer Umplattierung von infizierten MSC nach sieben Tagen auf nicht-infizierte MSC bestätigte, dass der Kontakt zu den infizierten MSC in den ersten sieben Entwicklungstagen ausreichend ist, um während der späteren NK-Zellentwicklung zu einer verstärkten NKG2A-Expression zu führen (Tag 21: -HCMV: 50% NKG2A<sup>+</sup>; +HCMV für 1 Woche: 79% NKG2A<sup>+</sup>). Die Einwirkung des HCMV nach der ersten Woche hat keine NKG2A-Expansion mehr zur Folge (Tag 21: +HCMV nach der 1. Woche: 44% NKG2A<sup>+</sup>) (Abb. 17 C). Es gibt also ein kleines Zeitfenster zu Beginn der NK-Zelldifferenzierung, während dessen der Grundstein für die weitere Entwicklung gelegt wird und das HCMV maßgeblich Einfluss nehmen kann.

Für eine weitere Generierung wurden hämatopoetische Zellen verschiedener Entwicklungsstadien direkt aus dem Nabelschnurblut eines Spenders mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert. Die CD3, CD14 und CD19 negativen NK-Zellentwicklungsstadien **2** (CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD94<sup>-</sup>), **3** (CD34<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup>CD56<sup>-/+</sup>CD94<sup>-</sup>) und **4** (CD34<sup>-</sup>CD117<sup>dim/-</sup>CD56<sup>bright</sup>CD94<sup>+</sup>) wurden wiederum parallel auf puren und infizierten MSC abgelegt und kokultiviert. Nach 14 Tagen auf infizierten MSC waren die Zellen, die den Stadien drei und vier entstammten überwiegend tot oder seneszent. Bei den überlebenden Zellen konnte keine NKG2A-Expansion festgestellt werden (Abb. 18 A/B). Nach 21 Tagen waren keine lebenden Zellen mehr zu detektieren. Die gleichen Zellen, die auf nicht-infizierten MSC generiert wurden proliferierten in den ersten zwei Wochen leicht (Stadium 4) bis mäßig (Stadium 3) (Abb. 18 A). Die NKG2A Expression der Zellen aus Stadium 3 lag bei einem, dem Entwicklungszeitpunkt angemessenen Wert von 49,5%. Der NKG2A-Wert der Zellen aus Stadium 4 war hingegen ungewöhnlich hoch (95,8%) (Abb. 18 B). Dieser Wert erklärt sich dadurch, dass im Zuge der Zellsortierung nur diejenigen Zellen isoliert wurden, die bereits CD94 auf der Oberfläche trugen. CD94 bildet im NK-Zellentwicklungsstadium 4 bereits Heterodimere mit NKG2A. Die sortierten Zellen waren also bereits zu Beginn der Kokultur annähernd alle für NKG2A positiv.

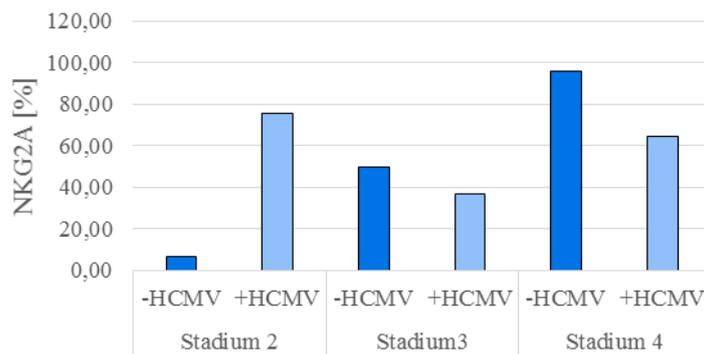
Die NK-Zellvorläufer des zweiten Stadiums hatten selbstverständlich das größte Proliferationspotenzial, da dieses mit zunehmender Differenzierung abnimmt. Beide Ansätze

(pur und infiziert) entwickelten sich über einen Zeitraum von 33 Tagen. Diejenigen Zellen, die auf den infizierten MSC kultiviert wurden exprimierten deutlich häufiger NKG2A (Abb. 18 C). Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass das HCMV die NK-Zellentwicklung bereits auf der Ebene der HSPC und frühen NK-Zellvorläufer modifiziert.

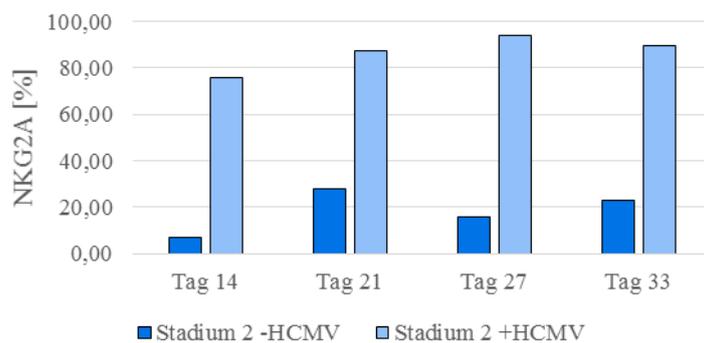
A



B



C



**Abb. 18 Nur die NK-Zellen, die bereits im 2. Entwicklungsstadium HCMV-Kontakt hatten entwickeln eine NKG2A-Expansion.** A Wachstumskurven der durchflusszytometrisch sortierten NK-Zellentwicklungsstadien auf (nicht-) infizierten MSC. B NKG2A-Expression der kokultivierten NK-Zellentwicklungsstadien nach 14 Tagen. C NKG2A-Expression der Zellen des 2. NK-Zellentwicklungsstadiums während einer fünfwöchigen Kokultur. n = 1.

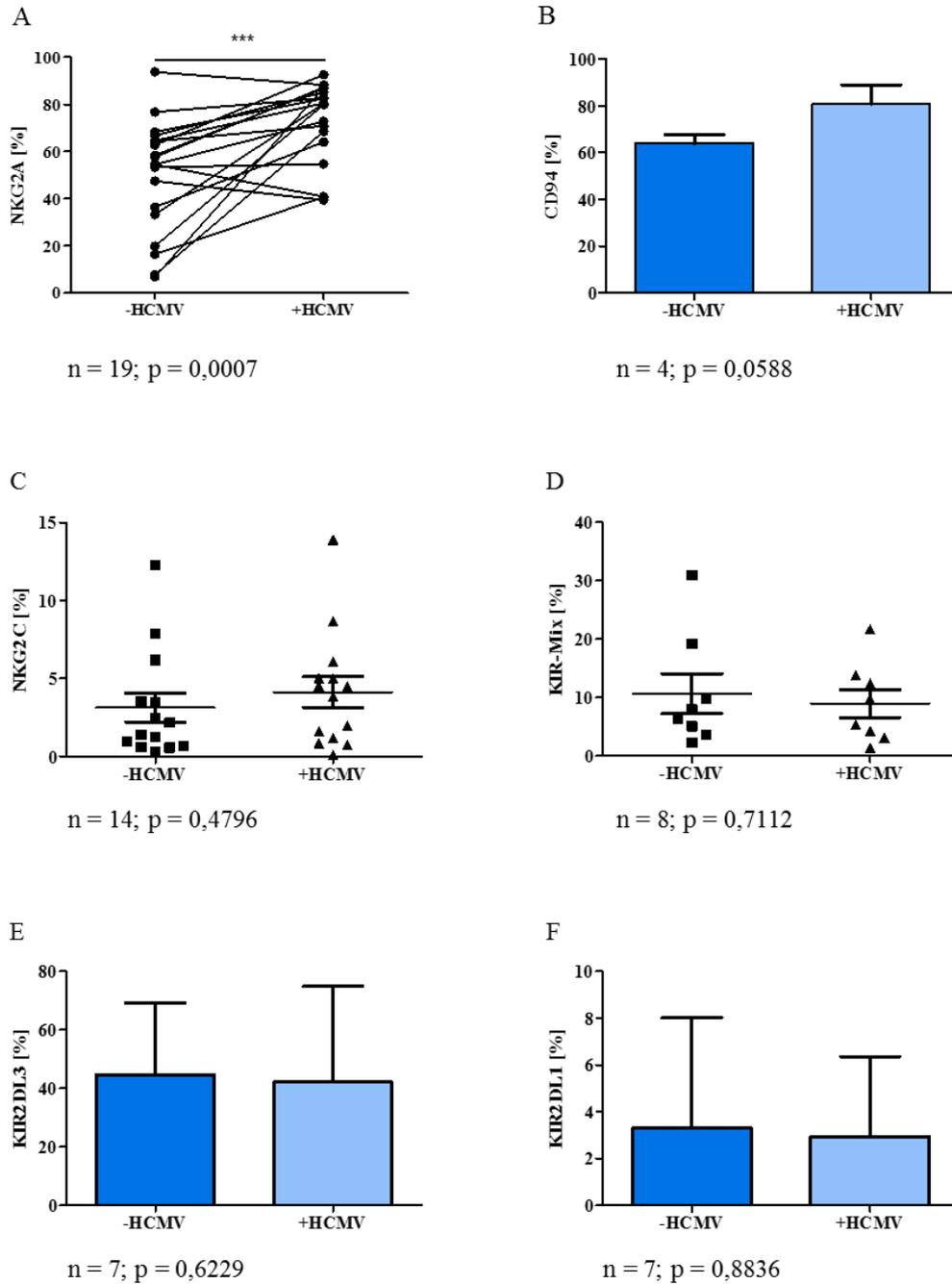
### 3.2.4 HCMV beeinflusst die Expression weiterer NK-Zellrezeptoren

Der NKG2A-Rezeptor ist ein potenzieller Angriffspunkt für die Immunevasion des HCMV. Das Virus verursacht eine erhöhte Expression von HLA-E (vergl. Kapitel 1.2.1.4.3 und Kapitel 3.1), welches nachgewiesenermaßen der Ligand von NKG2A ist. Da NKG2A ein inhibierendes Signal an die NK-Zelle weiterleitet, wenn es seinen Liganden bindet, schützt seine Interaktion die mit HCMV-infizierte Zelle vor der zytotoxischen Lyse. Das HCMV hat darüber hinaus noch weitere Mechanismen entwickelt, die es vor einer Immunreaktion seines Wirtes schützen sollen (vergl. Kapitel 1.2.1.4.3). Daher wurde überprüft, ob die Expression noch weiterer, evtl. mit der HCMV-spezifischen Immunevasion in Verbindung stehender, Oberflächenmoleküle der NK-Zelle ebenfalls durch eine Generierung auf infizierten MSC verändert wird. Im Folgenden wurde die Expression von CD94, das Heterodimere mit NKG2A und NKG2C bildet, auf generierten CD56 positiven NK-Zellen untersucht. Außerdem wurde die Expression des stimulatorischen NKG2C-Rezeptors, welcher der Gegenspieler von NKG2A ist und ebenfalls an HLA-E bindet, ermittelt. Des Weiteren wurde die KIR-Expression im Allgemeinen und die von KIR2DL1 (bindet HLA-C2) und KIR2DL3 (Rezeptor von HLA-C1) im Besondern erfasst (Abb. 19). Zudem wurde auch die Expression von NKG2D (bindet die Stressmoleküle MIC und ULBP) und von CD16 (Fc $\gamma$ RIIIA, bindet IgG-Antikörper und vermittelt ADCC) sowie die Expression der stimulatorischen Rezeptoren NKp44 und NKp46 (ihre Liganden sind meist viralen Ursprungs) durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 20).

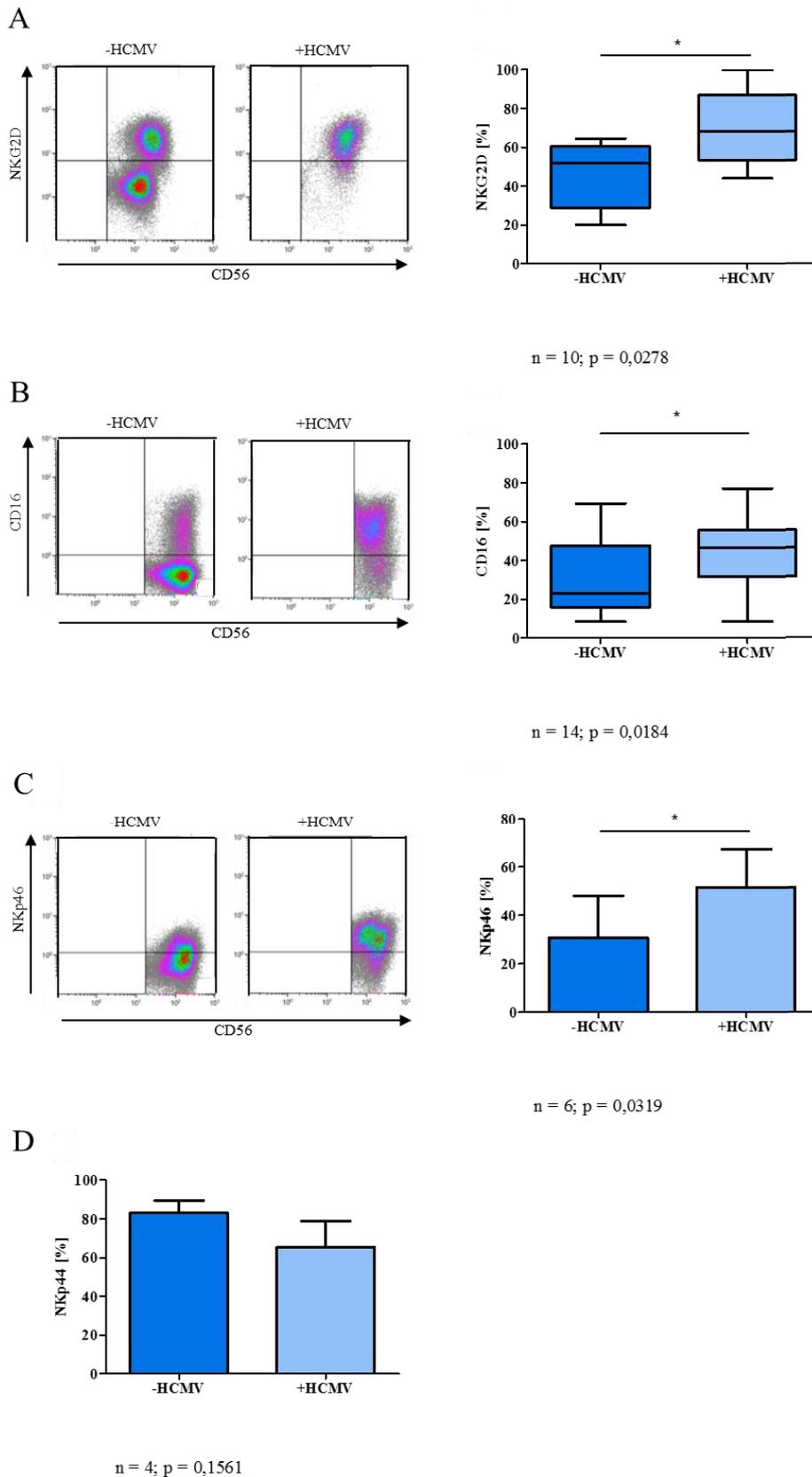
Neben der Expansion NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen (-HCMV: 47% NKG2A<sup>+</sup>; +HCMV: 71% NKG2A<sup>+</sup>; p = 0,0007) (Abb. 19 A) ist, unter dem Einfluss des HCMV, auch die Anzahl CD94<sup>+</sup>-NK-Zellen tendenziell (p = 0,0588) erhöht (-HCMV: 64% CD94<sup>+</sup>; +HCMV: 81% CD94<sup>+</sup>) (Abb. 19 B). Die Menge NKG2D (-HCMV: 47% NKG2D<sup>+</sup>; +HCMV: 71% NKG2D<sup>+</sup>) und CD16 (-HCMV: 31% CD16<sup>+</sup>; +HCMV: 43% CD16<sup>+</sup>) exprimierender Zellen (Abb. 20 A/B), zwei Moleküle die ebenfalls in die Immunevasion des HCMV integriert sind (vergl. Kapitel 1.2.1.4.3), hat sich sogar signifikant gesteigert (p (NKG2D) = 0,0278; p (CD16) = 0,0184). Außerdem ist die Frequenz NKp46-exprimierender NK-Zellen signifikant erhöht (-HCMV: 31% NKp46<sup>+</sup>; +HCMV: 52% NKp46<sup>+</sup>; p = 0,0319) (Abb. 20 C). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*; MFI) der Proteine, deren Frequenz erhöht ist (NKG2A, NKG2D, CD16) wird durch den Einfluss des HCMV nicht verändert, mit Ausnahme von NKp46 (Abb. 21). In letzterem Fall ist nicht nur die Anzahl der NKp46-exprimierenden Zellen gesteigert, sondern es wird auch mehr NKp46 pro Zelle exprimiert.

Die KIR-Expression ist sowohl unter puren als auch infizierten Generierungsbedingungen vergleichbar (Abb. 19 D/E/F), wobei festgehalten werden kann, dass die KIR2DL3-Expression

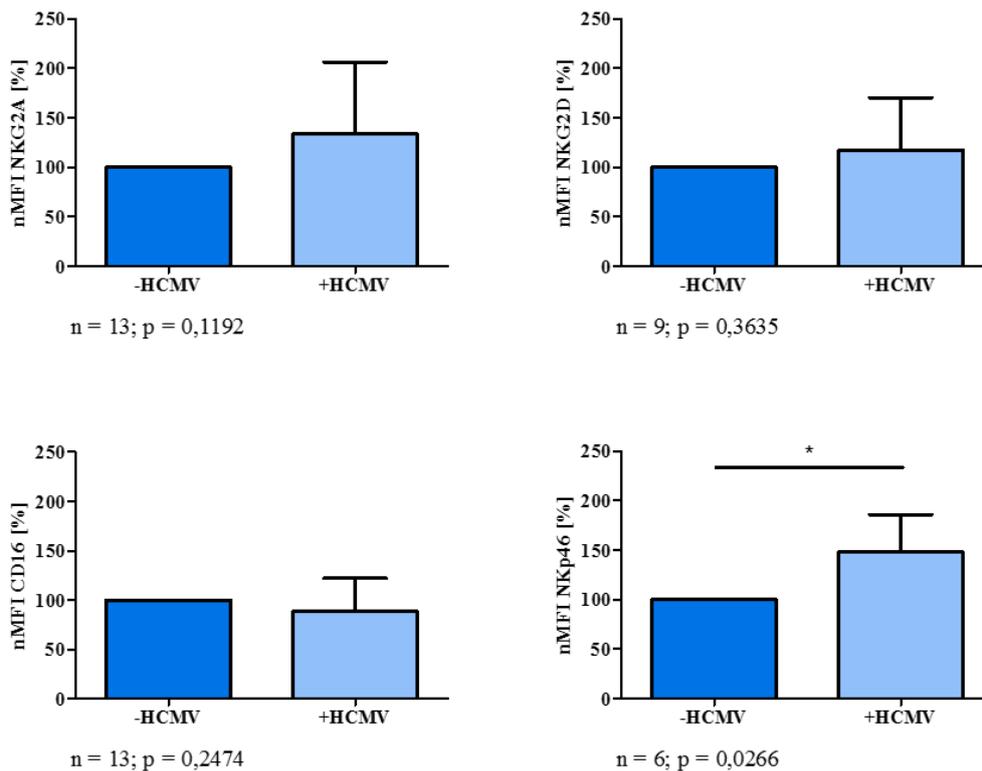
mit durchschnittlich 40% wesentlich höher liegt, als die KIR2DL1-Expression mit 3%. Während der Differenzierung von NK-Zellen werden die KIR in einer festgelegten Reihenfolge exprimiert. Die beobachtete, höhere KIR2DL3 Präsenz auf den sich entwickelnden NK-Zellen lässt sich damit erklären, dass KIR2DL3 der erste inhibierende KIR auf der NK-Zelloberfläche ist, also zeitlich vor KIR2DL1 exprimiert wird. Diese sog. sequenzielle Expression wurde *in vitro* bereits beschrieben (Fischer et al., 2007; Miller & McCullar, 2001; Schönberg et al., 2011). Auch die NKG2C-Expression, deren Expansion auf NK-Zellen durch eine HCMV-Infektion *in vivo* seit Jahren dokumentiert wird, bleibt in diesem Generierungsmodell unverändert (Abb. 19 C). Zusammengefasst verursacht das HCMV während der NK-Zellgenerierung eine signifikante höhere Anzahl NKG2A-, NKG2D-, NKp46- und CD16-exprimierender Zellen.



**Abb. 19 Oberflächenexpression verschiedener Proteine auf NK-Zellen während der Generierung in einer HCMV-infizierten Stammzellnische.** Die Expression der Oberflächenproteine der NK-Zellen wird nach 21 Tagen durchflusszytometrisch bestimmt. **A** Unter dem Einfluss von HCMV kommt es in 84% der Generierungen zu einer Expansion NKG2A<sup>+</sup>-Zellen. **B** Die Frequenz der CD94<sup>+</sup>-Zellen ist in der infizierten Generierungskultur tendenziell etwas erhöht. **C** Die NKG2C-Expression der NK-Zellen aus reinen und infizierten Generierungskulturen ist vergleichbar. **D/E/F** Die KIR-Expression wird von einer HCMV-Infektion nicht verändert.



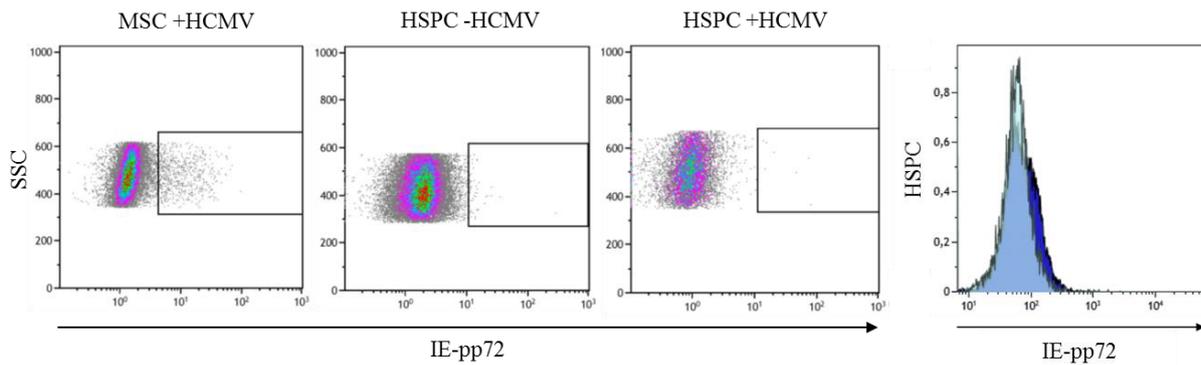
**Abb. 20 Die NK-Zellentwicklung in einer HCMV-infizierten Stammzellnische führt zu einem Anstieg NKG2D-, CD16- und NKp46-positiver Zellen. A/B** Unter dem Einfluss des HCMV exprimieren signifikant mehr NK-Zellen NKG2D und CD16 auf ihrer Oberfläche. **C** Die Anzahl NKp46<sup>+</sup>-NK-Zellen ist in infizierten Kulturen ebenfalls signifikant erhöht. **D** NKp44 wird sowohl von NK-Zellen aus puren als auch aus infizierten Kulturen gleichermaßen exprimiert. Die *Dot Plots* sind exemplarisch für die durchschnittlichen Messergebnisse nach 21 Tagen.



**Abb. 21 HCMV erhöht die NKp46-Expressionsstärke pro NK-Zelle.** Während der Entwicklung von NK-Zellen entstehen unter dem Einfluss des HCMV größere Mengen NKG2A, NKG2D, CD16 und NKp46 exprimierender Zellen. Die Expressionsstärke pro Zelle bleibt jedoch, mit Ausnahme von NKp46, gleich. nMFI: normalisierte Fluoreszenzintensität. Daten wurden nach 21-tägiger Kokultur erhoben.

### 3.2.5 Eine direkte Infektion der HSPC und NK-Zellen mit AD169 ist nicht möglich.

Eine zentrale Frage ist nun, wie das HCMV die NK-Zellentwicklung beeinflussen kann. Das Virus ist dafür bekannt mononukleäre Zellen und Monozyten infizieren zu können. Allerdings hat der HCMV-Stamm AD169 eine Punktmutation im Gen 131 welches unerlässlich für die Übertragung des Virus auf Leukozyten ist (Gerna et al., 2003; Hahn et al., 2004; Revello et al., 1998). Somit sollte eine direkte Infektion der sich entwickelnden NK-Zellen ausgeschlossen sein. Goodrum et al., ist es gelungen primitive HSPC ( $CD34^+CD38^-$ ) mit dem niedrig passagierten HCMV-Stamm Toledo zu infizieren (Goodrum et al., 2004). Um zu überprüfen, ob die HSPC und NK-Zellvorläufer mit AD169 infiziert werden können, wurden die Zellen während der Generierung (Tag 7) geerntet und mit Hilfe des Antikörpers gegen das Virusprotein IE-pp72 durchflusszytometrisch analysiert. Das Ergebnis war eindeutig. Weder die  $CD34^+CD38^-$ , noch andere in der Kultur befindliche Entwicklungsstufen zeigten ein positives IE-pp72-Signal (Abb. 22). Eine direkte HCMV-Infektion der zu generierenden Zellen kann als Ursache für die Veränderungen des NK-Zellrezeptorrepertoires ausgeschlossen werden.



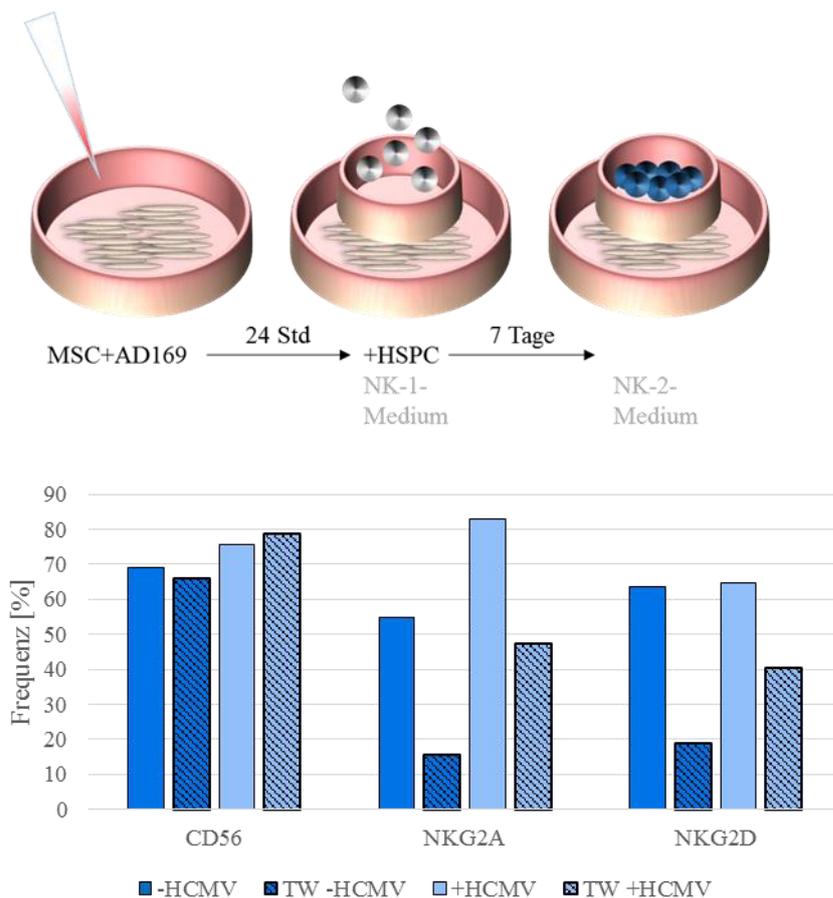
**Abb. 22 Die direkte Infektion der HSPC und generierten Lymphozyten mit dem HCMV-Stamm AD169 ist nicht möglich.** Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen von drei verschiedenen Spendern nach sieben-tägiger Kokultur mit infizierten MSC (links) zeigt, dass weder die unreifen HSPC noch die bereits in der Entwicklung fortgeschrittenen NK-Zellen IE-pp72 exprimieren und folglich nicht infiziert sind. Hellblau: infizierte Kokultur, dunkelblau: pure Kokultur. Die *Dot Plots* sind exemplarisch für die durchschnittlichen Messergebnisse nach 7 Tagen.

### 3.2.6 Die Veränderungen des NK-Zellrezeptorrepertoires werden sowohl durch Zell-Zell-Kontakt als auch durch lösliche Faktoren beeinflusst

Zellen kommunizieren auf verschiedenen Wegen miteinander. Der direkte Zell-Zell-Kontakt vermittelt über Liganden-Rezeptorinteraktionen den aktuellen Status einer Zelle. So erkennen beispielsweise die Immunzellen kranke, alte oder entartete Zellen. Dieser Kontakt gibt darüber hinaus auch Aufschluss über die räumlichen Verhältnisse innerhalb eines Gewebes (dichteabhängige Hemmung der Zellteilung). Zudem spielen lösliche Faktoren, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Botenstoffe eine wichtige, zellkontaktunabhängige Rolle für die interzelluläre Kommunikation (Alberts et al., 2004). Während der NK-Zellgenerierung haben die HSPC direkten Kontakt zu den (nicht-) infizierten MSC. Da das HCMV eine Reihe von Oberflächenmolekülen seiner Wirtszelle beeinflusst, z.B. reduziert es die HLA-A/B-Moleküle und steigert die HLA-E Expression (vergl. Kapitel 3.1), ist es naheliegend anzunehmen, dass der Zell-Zell-Kontakt ein wichtiger Faktor für die Veränderungen bezüglich des Rezeptorrepertoires der NK-Zellen ist. Darüber hinaus produzieren mit dem HCMV infizierte Zellen IL-6, IL-8 und eine HCMV eigene Variante des IL-10 (cmvIL-10) sowie TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha/\beta$  (Amsler et al., 2013; Kotenko et al., 2000; Lun et al., 1986; Penfold et al., 1999; Zheng et al., 2012). Diese löslichen Faktoren können ebenfalls eine entscheidende Rolle in Bezug auf die NK-Zelldifferenzierung spielen.

Mit Hilfe eines *Transwell*systems ist es möglich die HSPC räumlich von den MSC zu trennen. Die siebartigen *Transwelleinsätze* werden in das Medium eingelassen, dass die MSC bedeckt, so dass ein direkter Zellkontakt zwar nicht mehr möglich ist, löslichen Faktoren, wie Zytokine bis hin zu ganzen Viruspartikeln, jedoch durch die Siebporen ausgetauscht werden können

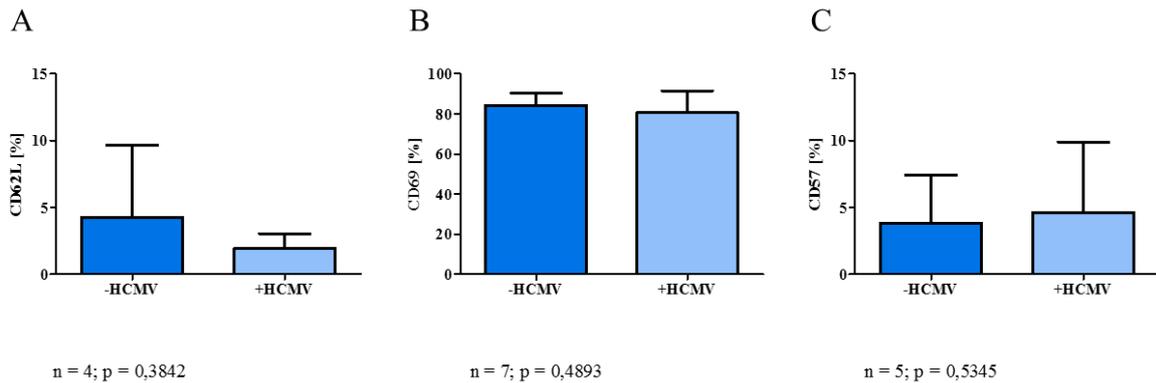
(Abb. 23). Diese Einsätze werden sowohl für eine Generierung auf puren als auch auf infizierten MSC verwendet. Parallel erfolgte eine Generierung mit HSPC des gleichen Spenders ohne *Transwelleinsätze*. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenproteine der NK-Zellen ergab, dass die NKG2A- und NKG2D-Expression unter dem HCMV-Einfluss im *Transwell* zwar geringer ausfällt als bei direktem Zell-Zell-Kontakt, im Vergleich zu puren Ansätzen aber dennoch erhöht ist (Abb. 23). Somit scheint ein Zusammenspiel von direkten Zell-Zell-Kontakten und löslichen Faktoren die NK-Zellproteinexpression zu verändern. Da die Expression des CD56-Proteins in allen Fällen (mit/ohne HCMV, mit/ohne *Transwell*) annähernd gleich ist, und Herr Dr. Brands während seiner Promotion zeigen konnte, dass die Expression von CD56 auch ohne Nährzellen herbeigeführt werden kann (Brands, 2014), ist dessen Expression offenbar von den MSC und dem HCMV unabhängig (Abb. 23).



**Abb. 23 Zell-Zell-Kontakte und lösliche Faktoren bedingen die Veränderungen des NK-Zellrezeptorrepertoires.** Durch sog. *Transwelleinsätze* werden die HSPC räumlich von den MSC getrennt (oberes Schema). Lösliche Faktoren können jedoch durch die Poren des Einsatzes frei diffundieren. Für die Expansion der Oberflächenproteine wie NKG2A und NKG2D sind lösliche Faktoren ausreichend, mit Zell-Zell-Kontakt ist der Effekt aber deutlich größer. Die CD56-Expression ist vom Zell-Zell-Kontakt unabhängig. Daten wurden an Tag 21 erhoben. Für die Analyse wurden CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen betrachtet. TW: *Transwell*.

### 3.2.7 Reifegrad der *in vitro* differenzierten NK-Zellen

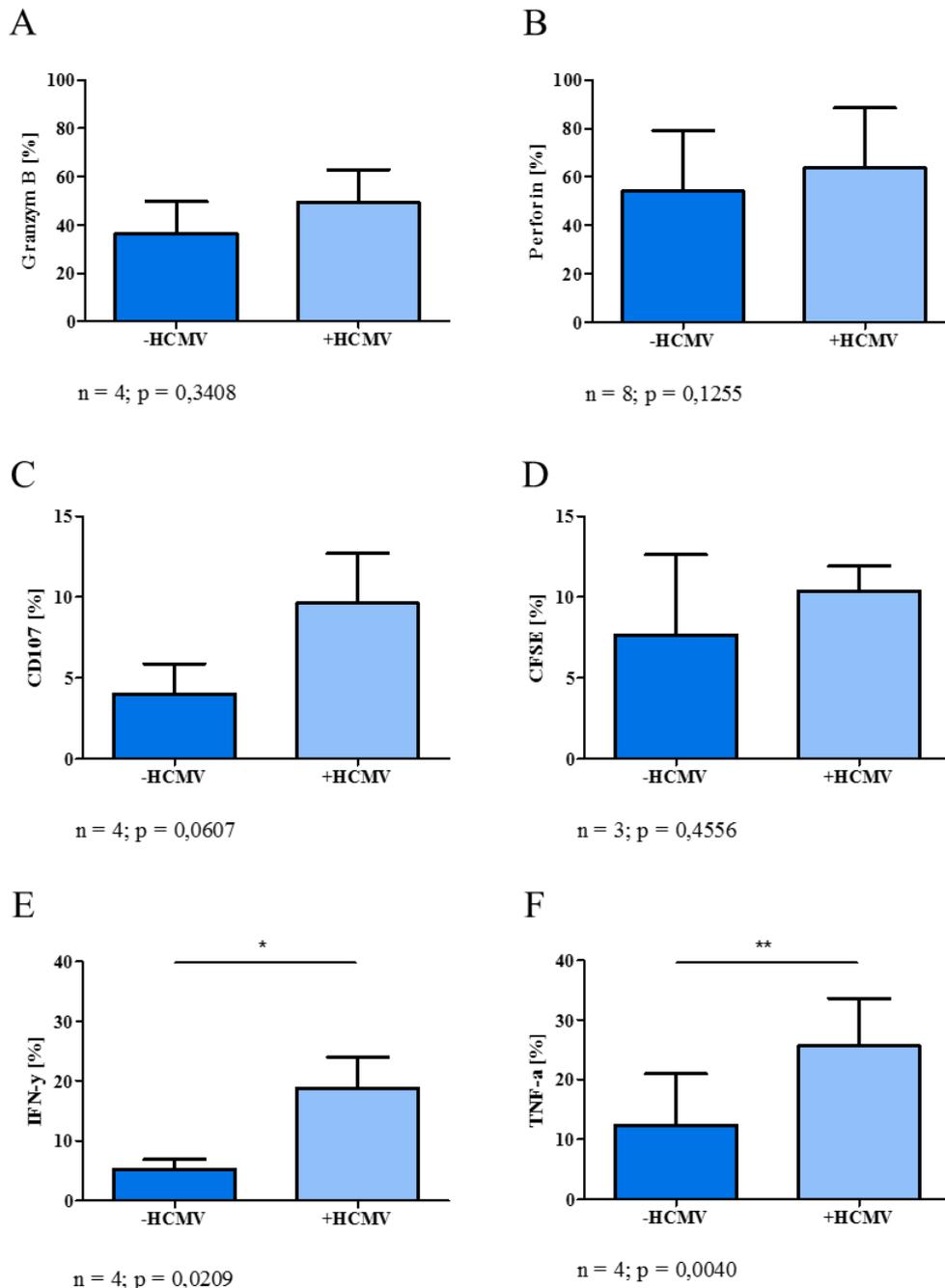
Die NK-Zellen im menschlichen Körper werden in zwei Untergruppen gegliedert. Es gibt die CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, deren Hauptaufgabe während einer Infektion die Zytokinproduktion und -sezernierung ist. Die Zytokine modifizieren daraufhin die adaptive Immunantwort. Aus den CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen gehen die reiferen, zytotoxisch aktiven CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen hervor, die ihre Zielzellen direkt eliminieren können. Die Unterscheidung der NK-Zellen anhand ihrer CD56-Expression ist *in vitro* einigen Schwierigkeiten unterworfen. Bei der Kultivierung adulter NK-Zellen aus peripherem Blut ließ sich beobachten, dass nach einigen Tagen alle NK-Zellen CD56<sup>bright</sup> waren (eigene unveröffentlichte Daten). CD56 ist also kein verlässlicher Marker für den Reifegrad der *in vitro* differenzierten NK-Zellen. Um dennoch eine Aussage bezüglich der Reife tätigen zu können wurden drei andere Parameter untersucht: CD62L ist ein Oberflächenprotein, das der NK-Zelle den Eintritt in sekundäre lymphoide Gewebe ermöglicht. Die Konzentration der nicht ausgereiften CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen ist in diesen Geweben wesentlich höher, als die der CD56<sup>dim</sup>; CD62L wird also bevorzugt auf unreiferen NK-Zellen exprimiert. Das Molekül CD69 ist ein Aktivierungsmarker und eher auf reifen NK-Zellen zu finden. Außerdem exprimieren ausdifferenzierte NK-Zellen CD57, ein Enzym der Glucuronyltransferasegenfamilie, das für die Zell-Matrix-Interaktion mitverantwortlich ist. Die generierten NK-Zellen aus (nicht-) infizierten Kokulturen wurden nach 21 Tagen geerntet und durchflusszytometrisch untersucht. Die Messergebnisse zeigen, dass die NK-Zellen aus der HCMV-infizierten Differenzierungskultur durchschnittlich seltener CD62L exprimieren, also weniger unreif sind (Abb. 24 A). Allerdings sind diese Werte nicht signifikant. CD69 wird von den NK-Zellen mit und ohne HCMV-Kontakt annähernd gleich stark exprimiert (Abb. 24 B). Auch die CD57-Expression unterscheidet sich zwischen den NK-Zellen mit und ohne HCMV-Kontakt nur marginal (Abb. 24 C). Die *in vitro* generierten NK-Zellen sind durch einen aktivierten Phänotyp gekennzeichnet, was u.a. mit der Zytokinzusammensetzung des Generierungsmediums vereinbar ist. Außerdem gibt es nur wenige naive NK-Zellen (geringe CD62L-Expression) bzw. voll ausgereifte NK-Zellen (niedrige CD57-Expression). Die untersuchten NK-Zellen befinden sich also noch in ihrem Reifungsprozess.



**Abb. 24 Reifegrad der generierten NK-Zellen.** Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen von verschiedenen Spendern erfolgte nach 21 Tagen. **A** CD62L wird nur in geringen Mengen exprimiert, eindeutige Tendenzen sind statistisch nicht festzustellen. Die Ergebnisse scheinen jedoch unter dem Einfluss von HCMV eine geringere CD62L-Präsenz zu zeigen. **B** Die meisten der *in vitro* generierten NK-Zellen exprimieren CD69. Dabei macht es keinen Unterschied, ob die MSC mit dem HCMV infiziert waren oder nicht. **C** Die CD57-Expression ist sowohl auf NK-Zellen aus einer infizierten Stammzellnische als auch auf solchen, aus einer reinen Kokultur, sehr gering.

### 3.2.8 Funktionalität der *in vitro* generierten NK-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine HCMV-Infektion das Rezeptorrepertoire während der NK-Zellentwicklung *in vitro* verändern kann, wäre es denkbar, dass sich auch die Funktionalität dieser Zellen verändert. Die NK-Zellen sind große, granuläre Lymphozyten, die entweder, durch die Sezernierung von Zytokinen, die adaptive Immunantwort prägen (CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen) oder, als zytotoxische Effektorzelle (CD56<sup>dim</sup>-NK-Zelle), virusinfizierte oder entartete Zellen eliminieren. Die Durchflusszytometrie ermöglicht auch die Messung der intrazellulären, zytotoxischen Moleküle Granzym B und Perforin sowie der Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . IFN- $\gamma$  hat eine antivirale Wirkung und dient der Rekrutierung von Makrophagen. TNF- $\alpha$  ist an Entzündungsprozessen beteiligt, rekrutiert Phagozyten, beeinflusst Apoptose-, Proliferation- und Differenzierungsprozesse und unterdrückt die virale Replikation. Da IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nach vorausgegangener Stimulation besser detektiert werden können, wurden die Kokulturen über Nacht mit IL-12 und IL-18 (5ng/ml; 50ng/ml) versetzt, bevor sie am nächsten Morgen geerntet, mit Antikörpern behandelt und durchflusszytometrisch analysiert wurden. Die Untersuchung der für drei Wochen *in vitro* generierten NK-Zellen ergab vergleichbare Messwerte für Granzym B und Perforin zwischen den NK-Zellen, die mit und ohne HCMV-Kontakt differenzierten (Abb. 25 A/B).



**Abb. 25 Funktionalität der generierten NK-Zellen.** Die Messung der zytotoxischen Moleküle und Zytokine sowie die funktionalen Assays wurden zwischen der dritten und vierten Woche der Generierung durchgeführt. **A/B** Es gibt keine Unterschiede bezüglich der Expression von Perforin und Granzym B. **C/D** Die Zytotoxischen-Assays geben Hinweise auf eine effizientere Funktionalität der NK-Zellen, die sich auf infizierten MSC entwickelt haben. **E/F** Die Zytokinproduktion ist unter dem Einfluss des HCMV deutlich erhöht.

Im Gegensatz dazu exprimierten die NK-Zellen aus der infizierten Kokultur signifikant größere Mengen IFN- $\gamma$  (-HCMV: 6%; +HCMV: 19%; p = 0,0209) und TNF- $\alpha$  (-HCMV: 12%; +HCMV: 26%; p = 0,0040) als ihre puren Vergleichszellen (Abb. 25 E/F).

Die zytotoxische Aktivität der generierten NK-Zellen wird mittels zweier spezialisierter Testverfahren ermittelt. Der CD107-Assay gibt Aufschluss darüber ob, und wie stark die NK-

Zellen in Gegenwart ihrer Zielzellen degranulieren, also ihre zytotoxischen Moleküle Perforin und Granzym B ausschütten. Ein sog. CFSE-Zytotoxizitätsassay zeigt darüber hinaus, wie viele Zielzellen unter dem Einfluss der NK-Zellen tatsächlich getötet werden. Als Zielzellen werden in beiden Fällen die HLA-Klasse I-negativen K562-Tumorzellen verwendet, die, aufgrund des *missing self*-Effekts, von NK-Zellen eliminiert werden. Die NK-Zellen werden mit den Zielzellen für 5 Stunden inkubiert, anschließend geerntet und durchflusszytometrisch analysiert.

Der CD107-Assay ergab, dass diejenigen NK-Zellen, die sich unter dem Einfluss des HCMV entwickelten, in Gegenwart ihrer Zielzellen tendenziell ( $p = 0,06$ ) stärker degranulieren als die ohne vorherigen Kontakt zu HCMV (Abb. 25 C). Die NK-Zellen die aus der infizierten Kokultur stammen töten durchschnittlich auch mehr Zielzellen (-HCMV: 7,65%; +HCMV: 10,40%), wie der CFSE- Zytotoxizitätsassay zeigt, allerdings sind die Werte sehr heterogen, sowohl bei den aus den infizierten als auch bei den aus den nicht-infizierten Kulturen stammenden NK-Zellen, sodass die Ergebnisse nicht signifikant sind (Abb. 25 D). Neben der veränderten NK-Zellrezeptorexpression gibt es also auch funktionale Unterschiede die von dem HCMV ausgelöst werden. Die verstärkte Zytokinproduktion weist demnach daraufhin, dass sich in dem HCMV-infizierten *in vitro* Modell in kurzer Zeit NK-Zellen des Entwicklungsstadiums 4 entwickeln, die funktional den CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen *in vivo* entsprechen.

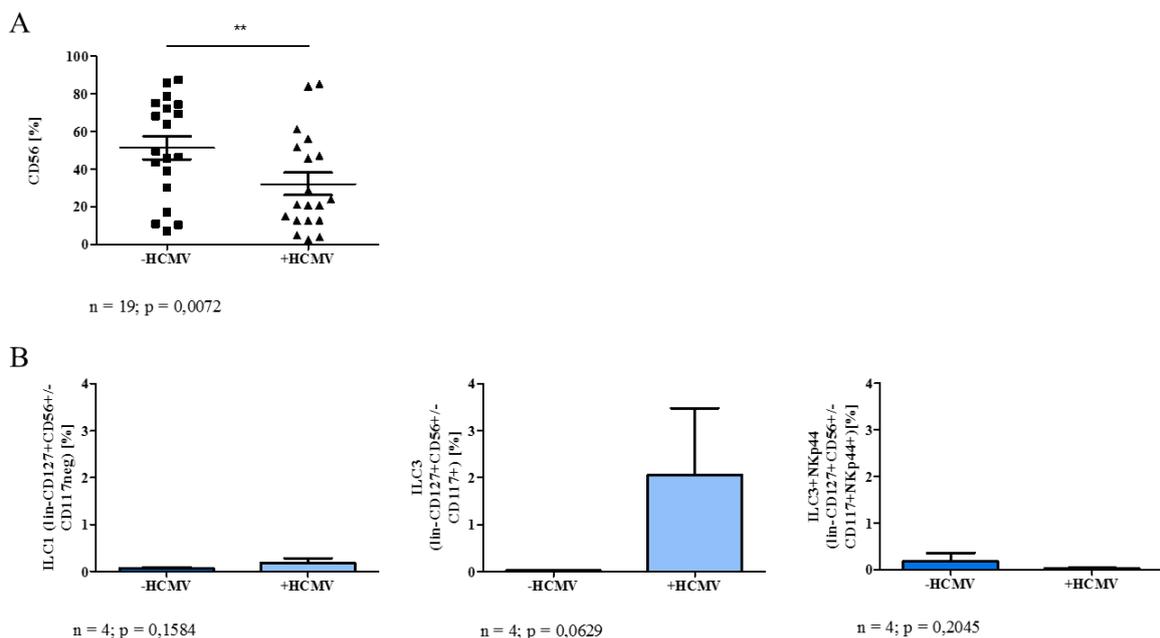
### 3.2.9 Zelluläre Zusammensetzung der Generierungskultur

Wie eingangs bereits erwähnt proliferieren die HSPC und NK-Zellvorläufer unter dem Einfluss des HCMV weniger, sie machen nur etwa zwei Fünftel der Zellmenge der NK-Zellvorläufer der puren Kokultur aus (Abb. 13 B). Außerdem gibt es in der Gesamtheit mehr tote Zellen, wenn die Kokultur infiziert ist. Dies liegt vermutlich an der schlechteren Physis der infizierten MSC, die die Proliferation nicht optimal unterstützen können, was zum Absterben eines Teils der zu generierenden Zellen führt.

Die Analyse der CD56-Expression offenbart zudem, dass sich prozentual weniger CD56<sup>+</sup>-Zellen entwickeln (Abb. 26 A). Diese Beobachtung führt zu der Überlegung, ob sich neben den NK-Zellen noch andere lymphoide Zellen in der Generierungskultur entwickeln könnten.

Zu den angeborenen lymphoiden Zellen (*innate lymphoid cells*; ILC) zählen, neben den NK-Zellen, noch weitere Zelltypen. Diese werden aufgrund der von ihnen produzierten Zytokine und der Tatsache, dass sie nicht zytotoxisch aktiv sind, als T-Helferzell-ähnliche ILCs bezeichnet. Sie exprimieren u.a. IFN- $\gamma$ , IL-17, oder IL-22 und modulieren damit, ähnlich wie

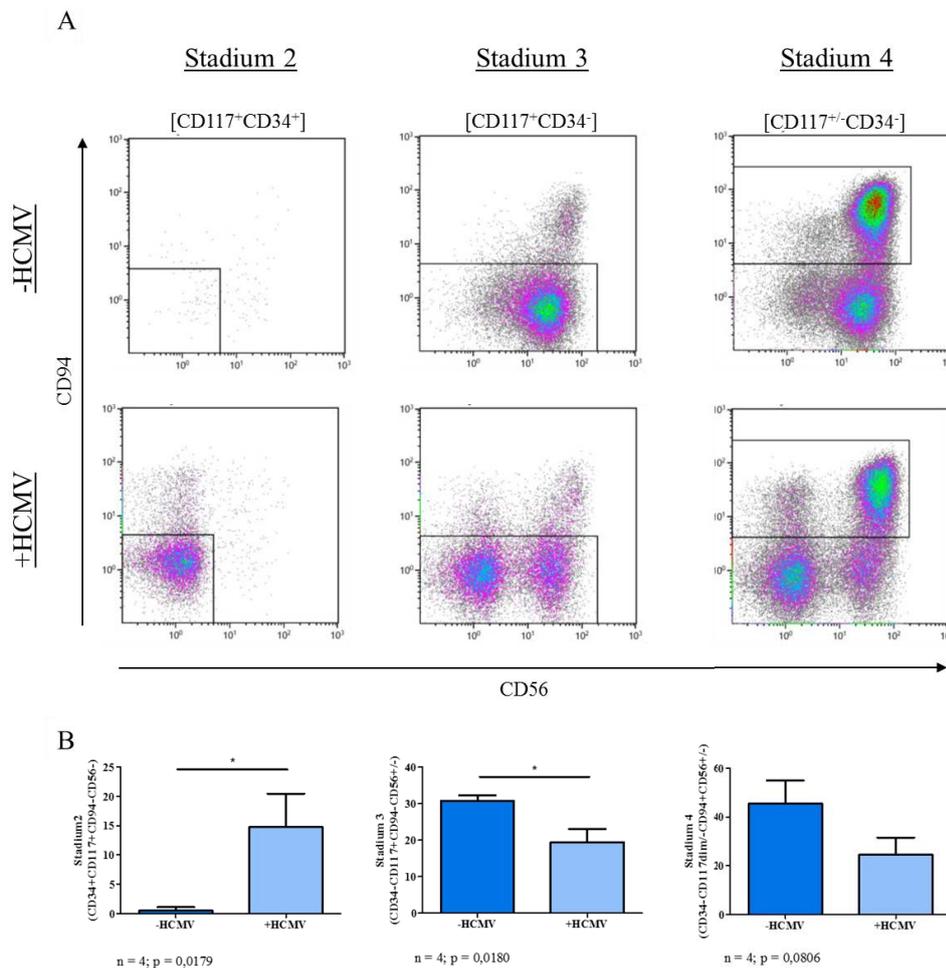
die NK-Zellen das adaptive Immunsystem. Sie sind vor allem für die Immunregulation von invasiv lebenden Mikroben nützlich (z.B. Helminthen), aber sie sind auch in Reparaturmechanismen involviert, die Gewebeschäden nach einer Infektion beseitigen. Die ILC werden anhand ihrer Oberflächenproteine und ihrer Fähigkeit IFN- $\gamma$  zu produzieren in vier verschiedene Klassen eingeteilt. Alle ILC sind für die *lineage*-Proteine (CD1a<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD94<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>-</sup>BDCA2<sup>-</sup>Fc $\epsilon$ R1<sup>-</sup>) negativ (lin<sup>-</sup>). Es gibt die **ILC1** (lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-CD117<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), **ILC2** (lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>CRTH2<sup>+</sup>), **ILC3** (lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-CD117<sup>+</sup>) und **ILC3+NKp44** (lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-CD117<sup>+</sup>NKp44<sup>+</sup>) (Bernink et al., 2013; J. Mjosberg et al., 2012; J. M. Mjosberg et al., 2011; Moro et al., 2010; Sawa et al., 2010; Spits & Cupedo, 2012). Eine Analyse der Zellen der verschiedenen Generierungskulturen ergab, dass die sich entwickelnden lymphoiden Zellen der nicht-infizierten Generierung zu ca. 0,27% aus ILC1/3 und ILC3+NKp44 bestehen während es bei den infizierten Kokulturen 2,27% (Abb. 26 B) sind. Diese Mengen sind so gering, dass die Hypothese, dass sich unter dem HCMV-Einfluss weniger NK-Zellen entwickeln, weil sich andere ILC bevorzugt differenzieren, verworfen werden kann.



**Abb. 26 Zelluläre Zusammensetzung der Generierungskultur.** A Generierungskulturen auf puren MSC bringen mehr CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen hervor. B Neben den NK-Zellen entwickeln sich in den Generierungskulturen auch geringe Mengen anderer lymphoider Zellen wie ILC1, 3 & 3+NKp44. Zeitpunkt der Messung war Tag 21 der Kokultur.

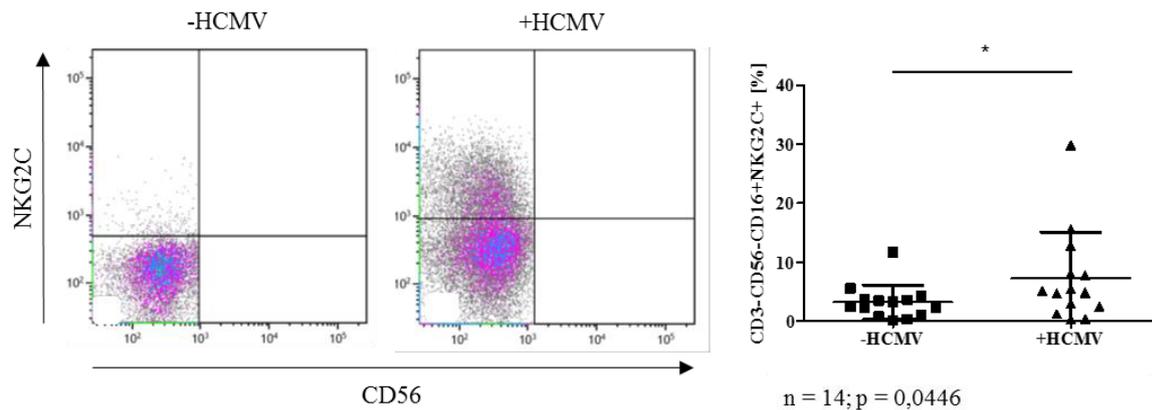
Wenn man sich die Zusammensetzung der sich entwickelnden NK-Zellen *in vitro* genauer anschaut stellt man fest, dass die Zellen mit Viruskontakt die 30-fache Menge naiver Zellen des Stadiums 2 (-HCMV: 0,5%; +HCMV 15%), ein Drittel weniger Zellen des 3. Stadiums

(-HCMV: 31%; +HCMV 19%) und fast 50% weniger der Zellen des 4. Stadiums (-HCMV: 45%; +HCMV 24%) hervorbringen (Abb. 27).



**Abb. 27** Unter dem Einfluss des HCMV proliferieren frühe NK-Zellvorläufer. In den infizierten Differenzierungskulturen gibt es größere Mengen naiver NK-Zellvorläufer (Stadium 2). Auf nicht-infizierten MSC entwickeln sich mehr Zellen des 3. NK-Zellentwicklungsstadiums. Die Unterschiede in der Menge des 4. Stadiums sind zwischen infizierten und nicht-infizierten Kokulturen nicht signifikant. **A** exemplarische *Dot Plots* für zwei unabhängige Experimente (n = 4). **B** Graphische Darstellung der untersuchten NK-Zellentwicklungsstadien. Zeitpunkt der Messung: Tag 21.

Interessanterweise gibt es eine weitere NK-Zellpopulation mit dem Phänotyp CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>, deren Frequenz unter dem Einfluss des HCMV signifikant zunimmt (Abb. 28). Eine ähnliche NK-Zellpopulation konnte in HCMV-infizierten Kindern nachgewiesen werden (Monsivais-Urenda et al., 2010). Diese CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>-NK-Zellen stehen in der Entwicklungshierarchie vermutlich auf der Höhe der CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen und sind weniger ausgereift als die CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen (Lutz et al., 2011).



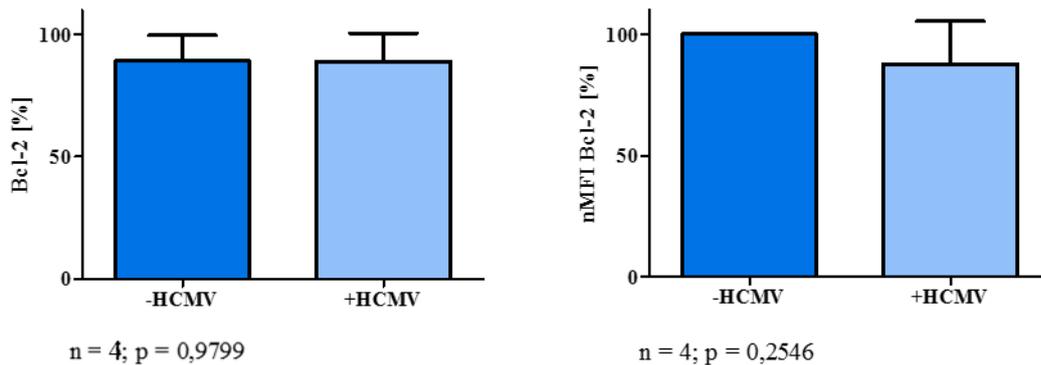
**Abb. 28** Unter dem Einfluss des HCMV exprimiert eine CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>-NK-Zellpopulation verstärkt NKG2C. Während der NK-Zelldifferenzierung auf infizierten MSC, entwickelt sich eine CD56<sup>-</sup>-NK-Zellpopulation die den Rezeptor NKG2C verstärkt exprimiert. *Dot Plots* sind repräsentativ für die erhobenen Daten nach 21 Tagen Kokultur es wurden ausschließlich CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>-NK-Zellen betrachtet.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sich unter dem Einfluss des HCMV weniger CD56 positive NK-Zellen entwickeln, aber diejenigen, die sich entwickeln werden schneller zu funktionalen NKG2A-exprimierenden NK-Zellen des vierten Stadiums. Außerdem scheint die Proliferation der Zellen des zweiten Entwicklungsstadiums durch das HCMV erhöht zu werden. Die HCMV-Infektion führt also zur Entwicklung einer geringeren absoluten Anzahl von NK-Zellen. Damit gehen jedoch eine beschleunigte Reifung und eine erhöhte Funktionalität einher.

### 3.2.10 NKG2A-expandede NK-Zellen sind funktional aktiver

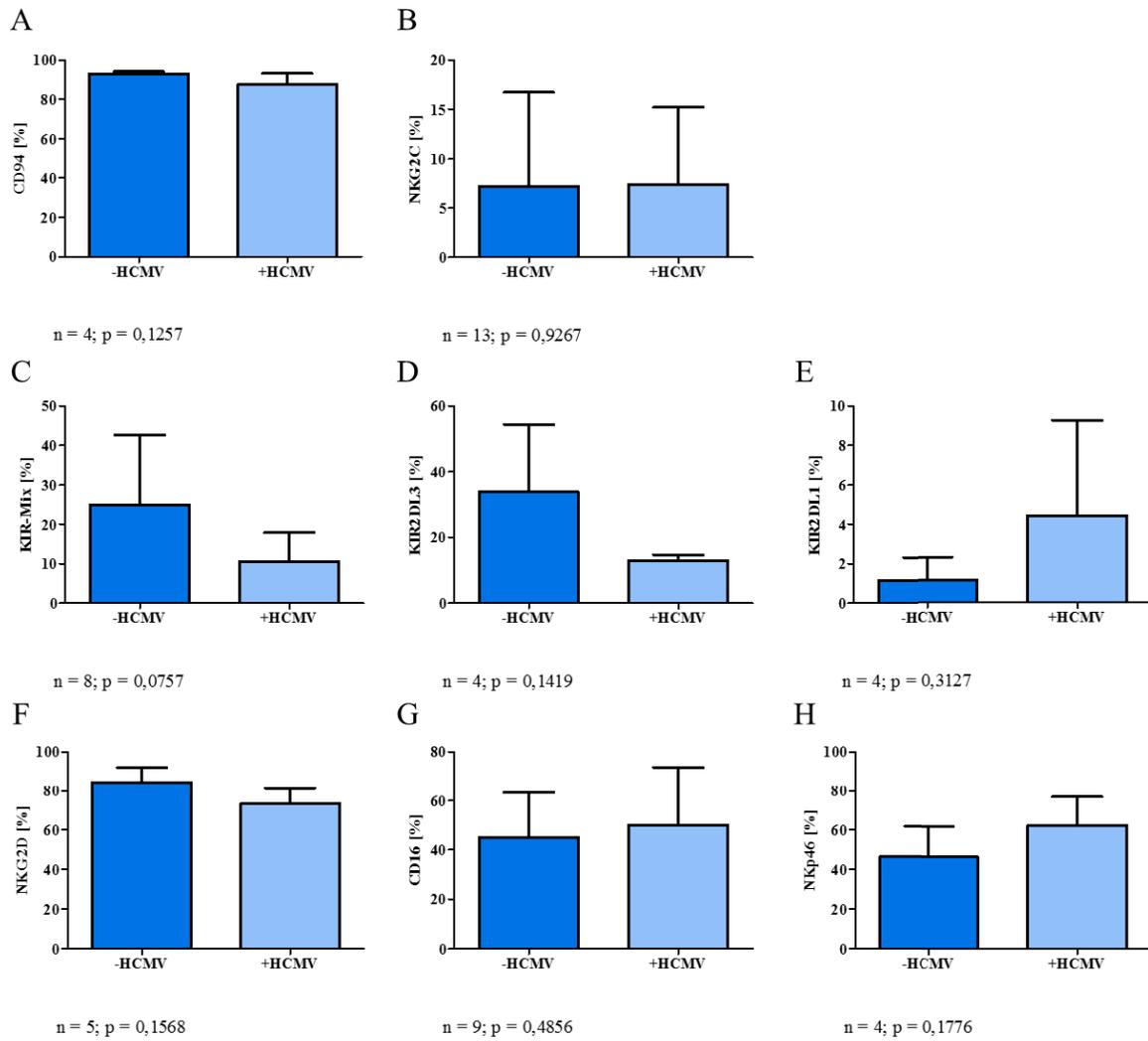
Die CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen aus den, mit dem HCMV infizierten, Differenzierungskulturen sind überwiegend NKG2A positiv. Es stellt sich also die Frage, ob sich im Falle einer HCMV-Infektion die NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen schneller entwickeln oder ob sie auf eine besondere Weise vor dem Zelltod geschützt sind und länger überdauern, als die NKG2A<sup>-</sup>-NK-Zellen.

Das Molekül Bcl-2 wirkt antiapoptotisch und könnte somit den NKG2A-expandeden-NK-Zellen der infizierten Generierungskulturen einen entscheidenden Vorteil verschaffen. Die Untersuchung des Bcl-2 im Durchflusszytometer ergab jedoch, dass die NK-Zellen beider Generierungsansätze dieses Molekül gleichstark exprimieren (Abb. 29). Einen Überlebensvorteil gibt es demnach also nicht.

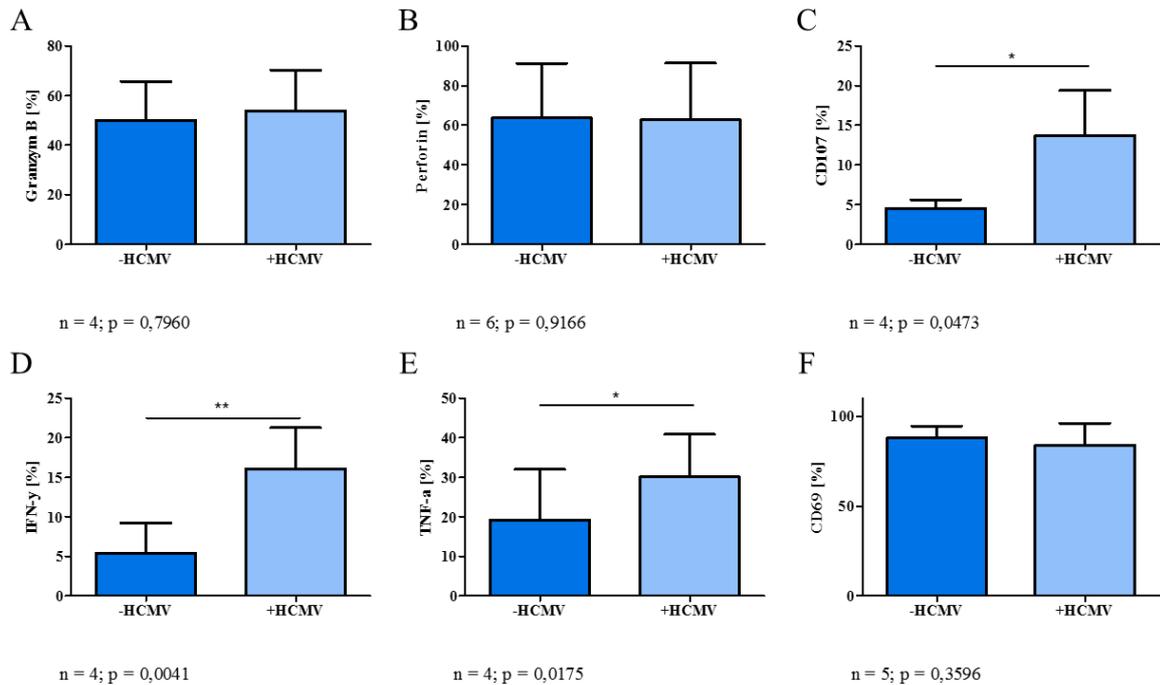


**Abb. 29 Bcl-2-Expression der generierten NK-Zellen.** Die Anzahl Bcl-2-exprimierender Zellen sowie die Bcl-2-Expression sind sowohl in puren als auch infizierten Generierungskulturen vergleichbar. Zellen beider Kulturen sind somit durch Bcl-2 vor der Apoptose geschützt. nMFI: normalisierte Fluoreszenzintensität.

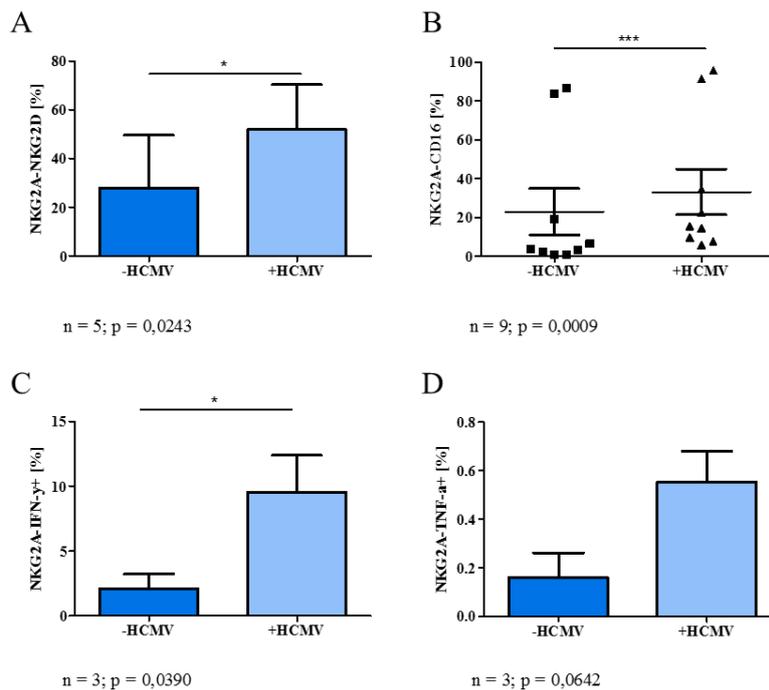
Die Differenzierung zu NKG2A-exprimierenden NK-Zellen scheint unter dem Einfluss einer HCMV-Infektion einen besonderen Stellenwert zu haben. Deshalb sollten die  $CD3^+CD56^+NKG2A^+$ -NK-Zellen noch genauer analysiert werden. Die Betrachtung der verschiedenen Oberflächenmoleküle zeigt, dass die  $CD56^+NKG2A^+$ -NK-Zellen zwar insgesamt weniger KIR-Rezeptoren, aber durchschnittlich etwas mehr KIR2DL1 exprimieren (Abb. 30 E). Die Unterschiede bei der Expression von NKG2D, CD16 und NKp46 relativieren sich hingegen (Abb. 30 F/G/H). Die Expression von CD16 und NKG2D auf  $NKG2A^-$ -NK-Zellen mit Viruskontakt unterscheidet sich hingegen signifikant ( $p$  (CD16) = 0,0009);  $p$  (NKG2D) = 0,0243) von den puren (Abb. 32 A/B). Die HCMV-Infektion bewirkt also zum Einen, dass eine  $NKG2A^+$ -NK-Zellpopulation expandiert und zum Anderen, dass eine zweite  $NKG2A^-NKG2D^+CD16^+$ -NK-Zellpopulation entsteht. Beide Populationen sind funktional aktiver, als ihre Vergleichskohorte ohne HCMV-Kontakt. Laut Freud et al., 2014 sind  $CD16^+NKG2A^-$ -NK-Zellen dem fünften Entwicklungsstadium ( $CD56^{dim}$ ) zuzuordnen (Freud et al., 2014). Eine Expansion dieser Zellen würde ebenfalls für eine beschleunigte Reifung unter dem Einfluss von HCMV sprechen.



**Abb. 30 Proteinexpression der NKG2A-expandierten NK-Zellen.** Übersicht über die Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren auf CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NGK2A<sup>+</sup>-NK-Zellen nach 21 Tagen Kokultur.



**Abb. 31 Funktionalität der NKG2A-explandierten NK-Zellen.** Die NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen der infizierten Kokultur produzieren signifikant größere Mengen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und zeigen eine größere Degranulierungs-bereitschaft (CD107).



**Abb. 32 Oberflächenprotein- und Zytokinexpression der NKG2A-NK-Zellen.** Die NKG2A-negativen NK-Zellen aus infizierten Differenzierungskulturen exprimieren signifikant mehr NKG2D, CD16 und IFN- $\gamma$  und tendenziell mehr TNF- $\alpha$ .

Funktionale Unterschiede gibt es bei der Expression von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und der Degranulierungsbereitschaft (CD107). Sowohl die NKG2A-positiven als auch die NKG2A-negativen Zellen der infizierten Generierung produzieren mehr IFN- $\gamma$  ( $p(\text{NKG2A}^+\text{IFN-}\gamma^+) =$

0,0041;  $p$  (NKG2A<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) = 0,0390) als die der nicht-infizierten Generierung (Abb. 31 D; Abb. 32 C). TNF- $\alpha$  wird hingegen nur von den NKG2A-positiven Zellen stärker exprimiert ( $p$  = 0,0175) (Abb. 31 E). Die NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen degranulieren signifikant stärker ( $p$  = 0,0473) wenn sie auf HCMV-infizierten MSC generiert wurden (Abb. 31 C). Die Aktivierung (CD69-Expression) der NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen aus puren bzw. infizierten Generierungskulturen ist gleichstark ausgeprägt (Abb. 31 F).

### 3.3 Späte NK-Zellentwicklung

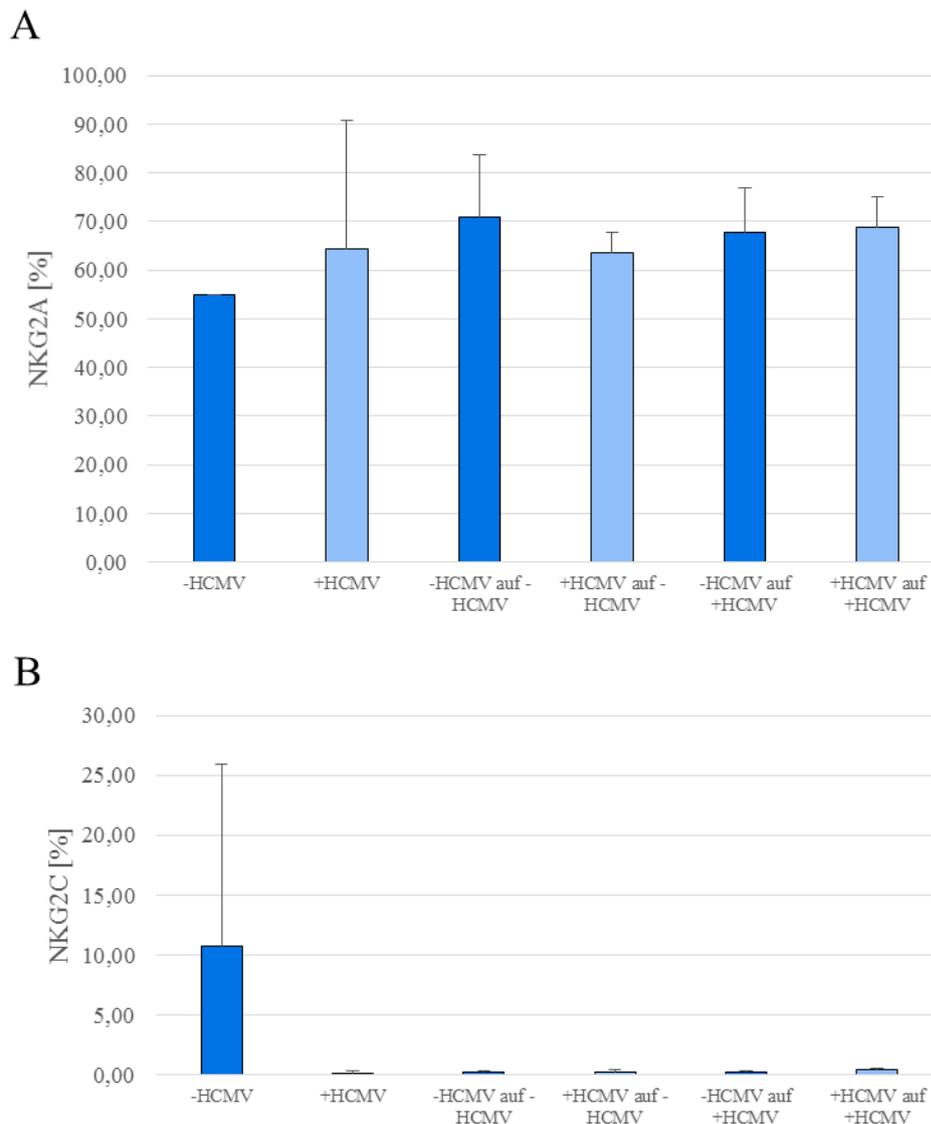
In der Literatur wird die HCMV-abhängige NKG2C-Expansion *in vivo* exzessiv beschrieben. Auch die Kokultur von adulten NK-Zellen kann unter Umständen zu einer NKG2C-Expansion *in vitro* führen (Beziat et al., 2013; Charoudeh et al., 2013; Guma et al., 2006a; Rölle et al., 2014). In dem hier beschriebenen Differenzierungsmodell konnte keine NKG2C-Expansion festgestellt werden. Da NKG2C mit NKG2A um die Dimerisierung mit CD94 konkurriert, NKG2A während der Entwicklung aber zeitlich früher exprimiert wird, wäre es für die NKG2C-Moleküle, selbst wenn sie in großen Mengen intrazellulär vorhanden wären, beinahe unmöglich auf die NK-Zelloberfläche zu gelangen. Ein Austausch von NKG2A-Molekülen gegen NKG2C-Moleküle wird auch deswegen erschwert, weil NKG2A eine höhere Affinität zu CD94 hat, als NKG2C (Vales-Gomez et al., 1999).

Die NK-Zellentwicklung beginnt zwar im Knochenmark, aber die Reifung zur zytotoxischen CD56<sup>dim</sup>-NK-Zelle wird dort nicht vollzogen. Die NK-Zellen emigrieren in die Blutbahn und von dort in andere lymphatische Gewebe, wie Tonsillen und periphere Lymphknoten, aber auch in den Gastrointestinaltrakt oder die Leber, und setzen dort ihre Entwicklung fort (vergl. Kapitel 1.1.2.1) (Freud et al., 2014). Das in dieser Arbeit beschriebene Generierungsmodell ermöglicht eine solche Emigration nicht. Darüber hinaus haben die MSC auf reife Immunzellen einen supprimierenden Einfluss und könnten die späte NK-Zelldifferenzierung blockieren (Meisel et al., 2004).

Um eine Auswanderung in ein anderes Milieu zu simulieren, könnten die sich entwickelnden NK-Zellen nach einer Frühentwicklungsphase von 14 bis 21 Tagen geerntet und mit anderen Zellen, z.B. Fibroblasten kokultiviert werden.

Die HSPC von zwei verschiedenen Spendern wurden für je 14 bzw. 21 Tage auf puren oder infizierten MSC kultiviert bevor sie geerntet und auf frische pure oder infizierte MRC-5 umgesetzt wurden (Abb. 33 A/B). Im Anschluss wurden sie für drei bis sieben Tage weiter kultiviert.

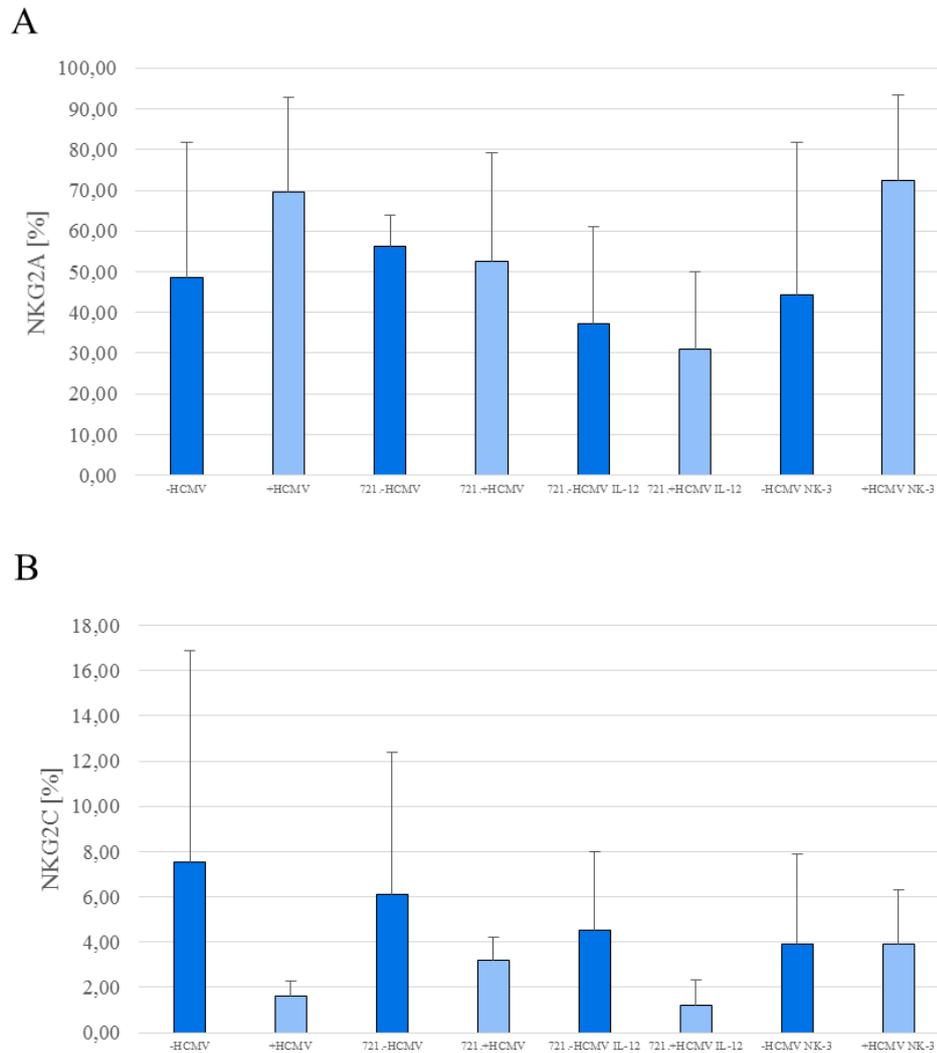
Das Umsetzen der sich entwickelnden NK-Zellen auf infizierte Fibroblasten hatte das abrupte und massenhafte Absterben der NK-Zellen zur Folge. Die CD56-Expression blieb allerdings konstant (Daten nicht gezeigt), während die erhoffte NK-Zellreifung und somit gesteigerte NKG2C-Expression zu keinem Zeitpunkt eingeleitet, geschweige denn beobachtet werden konnte.



**Abb. 33 Ein Nischenwechsel von MSC auf MRC-5 führt nicht zu einer gesteigerten NKG2C-Expression.** Die *in vitro* generierten NK-Zellen wurden nach 21 Tagen von puren und infizierten MSC auf pure und infizierte MRC-5-Zellen (und reziprok) umgesetzt und nach drei Tagen geerntet. **A** Die NKG2A-Expansion wird revidiert und **B** eine NKG2C-Expression ist nahezu nicht vorhanden, mit Ausnahme einer Probe, die auf puren MSC kultiviert wurde, ohne umgesetzt worden zu sein (n = 2).

Béziat et al., haben ein Kokultursystem angewendet, bei dem sie statt infizierter Fibroblasten eine lymphoide Tumorzelllinie (721.211), die sie mit einem HLA-E-Konstrukt transfizierten, um HLA-E stabil auf der Zelloberfläche exprimieren zu lassen, zum Einsatz brachten (Beziat et al., 2013). Eine ähnliche Transfektante wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Salim Khakoo aus der medizinischen Fakultät der Universität Southampton, zur Verfügung gestellt. Die generierten Zellen wurden am 18. Tag der Differenzierung geerntet und unter verschiedenen Bedingungen weitere sieben Tage kultiviert. Ein Drittel verblieb in der Generierungskultur mit NK-2-Medium. Das zweite Drittel wurde im Verhältnis 10:1 mit bestrahlten Transfektanten in einer 96-Loch-Platte kokultiviert. Als Medium wurde NK-3-Medium mit und ohne IL-12 (10ng/ml) verwendet. Bei dem dritten Drittel wurde lediglich das Medium durch NK-3-Medium mit und ohne IL-12 (10ng/ml) ersetzt.

Wie in früheren Experimenten bereits beobachtet werden konnte ist das Umsetzen während der Generierung eine erhebliche Belastung für die Zellen und erhöht die Apoptoserate. Ein Teil der Proben konnte deshalb nicht ausgewertet werden, da die Gesamtmenge der NK-Zellen zu gering war. Die Zellen, die nicht umgesetzt wurden entwickelten sich wie erwartet. Es waren vergleichbare Mengen CD56<sup>+</sup>-Zellen zu detektieren (Daten nicht gezeigt), die infizierten Kokulturen brachten größere Mengen NKG2A (-HCMV: 48%; +HCMV: 69%) und geringere Mengen NKG2C (-HCMV: 8%; +HCMV: 2%) hervor (Abb. 34). Die Variabilität zwischen den Werten der drei Spender war wie gewohnt hoch. Das Umsetzen der generierten Zellen aus den infizierten Generierungskulturen führte zu einem Abfall der NKG2A-Frequenz (+HCMV: 69%; umgesetzt auf 721.221-HLA-E-Transfektanten in NK-3-Medium: 53%; umgesetzt auf 721.221-HLA-E-Transfektanten in NK-3-Medium + IL-12: 31%), wobei die Differenz größer war, wenn dem NK-3-Medium zusätzlich IL-12 zugesetzt wurde. Die Zellen aus reinen Generierungskulturen, die auf die 721.221-HLA-E-Transfektanten umgesetzt wurden weisen eine leichte Steigerung der NKG2A-Expression auf (-HCMV: 48%; 721.221-HLA-E-Transfektanten in NK-3-Medium: 56%) (Abb. 34 A). Die NKG2C-Expression ist unter allen Bedingungen bei den NK-Zellen aus infizierten Generierungskulturen niedriger als bei denen aus reinen Kokulturen (Abb. 34 B). Weder das Umsetzen auf die 721.221-HLA-E-Transfektanten, noch der Mediumwechsel konnte eine NKG2C-Expansion auslösen.



**Abb. 34 Keine gesteigerte NKG2C-Expression der *in vitro* generierten NK-Zellen nach einem Nischenwechsel.** Ein Teil der generierten NK-Zellen wird nach 18 Tagen auf bestrahlte 721.221-HLA-E-Transfektanten (721.) umgesetzt und in NK-3-Medium für sieben Tage weiter kultiviert. Ein zweiter Teil bekommt nur NK-3-Medium und ein Drittel wird auf die klassische Weise weiter generiert. Die durchflusszytometrische Analyse offenbart, **A** dass die NKG2A-Expression nach dem Umsetzen der, aus infizierter Kokultur stammenden, NK-Zellen reduziert wird und **B** die NKG2C-Expression sehr gering bleibt (n = 3).

## 4. Diskussion

### 4.1 Analyse eines *in vitro* Generierungsmodells für die frühe NK-Zellentwicklung

Ziel dieser Arbeit war, das Verständnis, wie eine HCMV-Infektion die NK-Zellentwicklung beeinflussen kann, zu verbessern. Im Vorfeld im ITZ durchgeführte Generierungsexperimente sowie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Verwendung eines murinen oder humanen Korrelats der Stammzellnische zwingend erforderlich ist, da die NK-Zelldifferenzierung andernfalls bereits vor dem Erreichen der KIR<sup>+</sup>-NK-Zellentwicklungsstadien abbricht. Dies bedeutet, dass nur in diesem Kontext *in vitro* phänotypisch und funktional ausgereifte NK-Zellen entstehen können (Dezell et al., 2012). Da das HCMV streng wirtsspezifisch ist, wird für eine Infektion mit dem Virus eine humane Wirtszelle benötigt. Nur in einem vollständig humanen System kann daher die Interaktion der HCMV-infizierten Zellen mit den HSPC beobachtet werden. Der Einsatz von humanen MSC als Stammzellnische der Hämatopoese ermöglichte in der vorliegenden Arbeit erstmals die Etablierung eines *in vitro* Modells, mit dem der Einfluss einer HCMV-Infektion auf die NK-Zelldifferenzierung untersucht werden konnte.

Die sorgfältige Auswahl eines geeigneten HCMV-Stammes, AD169, gewährleistete eine reproduzierbare und wildtypisch verlaufende Infektion der MSC mit einem charakteristischen Phänotyp (angeschwollene, runde Zellmorphologie) und einer veränderten HLA-Klasse I-Expression. Die HSPC differenzieren sich in diesem *in vitro* Modell zu reifen, funktionalen NK-Zellen, die die entsprechenden Oberflächenproteine bis zum terminalen fünften Entwicklungsstadium (Abb. 2) (Freud et al., 2014) exprimieren.

Die gängigen Generierungsmodelle verwendeten bisher nur murine Nährzellen wie EL08 oder AFT024 (McCullar et al., 2008; Miller et al., 1999; Oostendorp et al., 2002). Diese Protokolle können jedoch nicht als Grundlage für die Generierung von NK-Zellen genutzt werden, die als Immuntherapeutika Verwendung finden sollen. Bei xenogenen Modellen ist das Risiko einer Übertragung von murinen Krankheitserregern zu groß, als dass diese Zellprodukte klinisch zugelassen würden. Das hier entwickelte Protokoll erlaubt theoretisch die medizinische Anwendung der *in vitro* generierten NK-Zellen im Menschen, da die verwendeten MSC in der Kinderklinik des UKD unter GMP-Bedingungen und in Abwesenheit tierischer Komponenten etabliert und expandiert wurden. Außerdem kann die Verwendung des AD169-Stammes als unbedenklich eingestuft werden, da er die NK-Zellen aufgrund einer Gendeletion nicht direkt

infizieren (Hahn et al., 2004) und eine Übertragung des Virus auf den Empfänger somit ausgeschlossen werden kann.

Es scheint auf den ersten Blick erstaunlich, dass die MSC die NK-Zelldifferenzierung so gut unterstützen, sind sie doch allgemein für ihre immunsuppressive Wirkung bekannt. Sie hemmen nachweislich die Proliferation und Funktionalität der T-Zellen (Tse et al., 2003) und werden dementsprechend für die Inhibition von Immunreaktionen, z.B. bei Stammzelltransplantationen, erfolgreich als Immuntherapeutikum eingesetzt. Die verwendeten MSC entstammen der Knochenmarknische und sind somit natürlicher Bestandteil des Milieus, in dem sich hämatopoetische Zellen entwickeln (Frenette et al., 2013). Jedoch kommen sie nur bis zu einem gewissen Differenzierungsgrad mit den sich entwickelnden Lymphozyten in Berührung. Die NK-Zellen verlassen während ihrer Entwicklung das Knochenmark und wandern in lymphatisches Gewebe ein, wo sie phänotypisch und funktional ausreifen (Freud et al., 2014; Rink et al., 2012). Daher ist es keine Überraschung, dass die MSC auf die HSPC einen anderen Einfluss als auf ausgereifte Lymphozyten haben.

*In vivo* kommt es nach einer HCMV-Infektion bei einigen der Betroffenen (26% der Blutspender, bezogen auf Deutschland, eigene unveröffentlichte Daten) zu einer Expansion von NK-Zellen, die den stimulierenden, HLA-E-spezifischen Rezeptor NKG2C exprimieren. Dabei könnte es sich um eine Reaktion des Wirts auf die Immunevasionsmechanismen des Virus handeln, da das HCMV die meisten HLA-Klasse I-Moleküle, mit Ausnahme des HLA-E (und HLA-C, vorliegende Arbeit) herunterreguliert. In dem, in dieser Arbeit beschriebenen, *in vitro* Modell ist allerdings zu beobachten, dass die NKG2C-Expansion (Beziat et al., 2012; Charoudeh et al., 2013; Della Chiesa et al., 2015; Guma et al., 2006a; Rölle, 2015; Rölle et al., 2014; Z. Wu et al., 2013) ausbleibt (Abb. 19 C). Wenn NKG2C in Folge einer HCMV-Infektion entsprechend der *in vivo* Situation expandieren würde, müssten in dieser Arbeit, nach 14 Generierungsexperimenten drei bis vier Proben ebenfalls eine NKG2C-Expansion aufweisen. Stattdessen kommt es überraschenderweise zu einer Expansion von NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen. Dieser Rezeptor besitzt die gleiche Spezifität wie NKG2C, hat aber eine inhibierende Signaltransduktionsdomäne. NKG2A ist einer der ersten NK-Zellrezeptoren, der auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Caligiuri, 2008). Dass unter dem Einfluss des HCMV *in vitro* die Frequenz der NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen um 50% ansteigt, deutet darauf hin, dass die Infektion zu einer beschleunigten Entwicklung der NK-Zellen führt. Zudem zeigen die Versuche dieser Arbeit, dass sich die Anzahl NKG2D- und NKp46-exprimierender NK-Zellen signifikant, gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle, erhöht. In den HCMV-positiven Generierungskulturen entwickeln sich darüber hinaus auch größere Mengen CD16<sup>+</sup>-NK-Zellen. Die CD16-

Expression markiert das Erreichen der fünften, vollständig ausgereiften Entwicklungsstufe (Caligiuri, 2008).

#### **4.1.1 HCMV-infizierte MSC stellen ein geeignetes *in vitro* Modell für die frühe, nicht aber für die terminale NK-Zelldifferenzierung dar**

Die phänotypischen Analysen weisen darauf hin, dass die NK-Zellen, die sich unter dem Einfluss des HCMV entwickeln, schneller einen höheren Reifegrad erlangen, als die Kontrollzellen. Dieser Hypothese widerspricht jedoch, dass in den infizierten Kulturen weder die NKG2C- noch die KIR-Expression ansteigt, obwohl diese auch als Marker für die terminale NK-Zelldifferenzierung gelten. Allerdings könnte dies auch mit der immunsupprimierenden Wirkung der MSC zusammenhängen, welche die Induktion der sehr späten Phase der NK-Zelldifferenzierung hemmt.

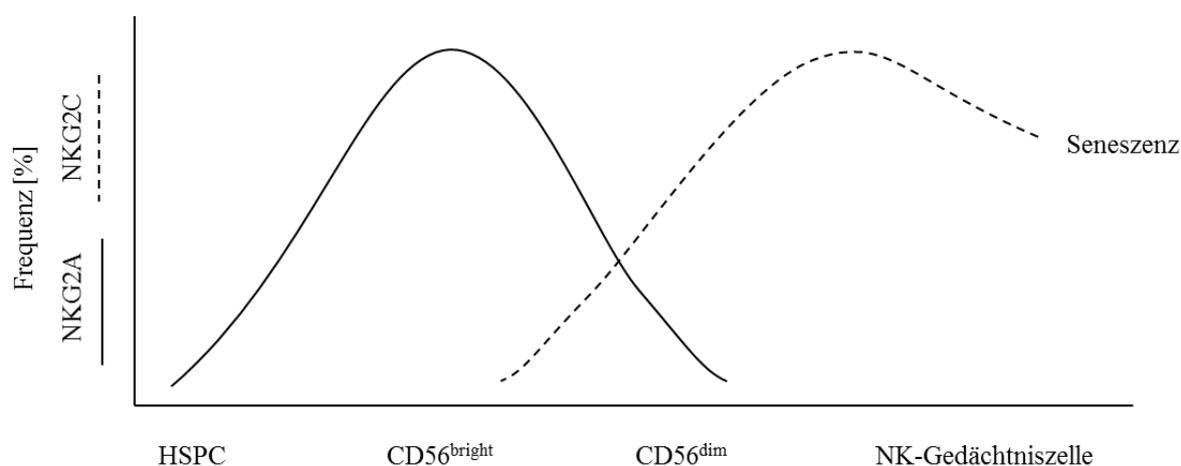
Die Bedeutung der MSC für die frühe NK-Zellentwicklung ergibt sich auch aus der Beobachtung, dass eine Kokultur mit anderen Nährzellen, wie beispielsweise STF5-Fibroblasten, keine effektive NK-Zelldifferenzierung (von HSPC bis CD56<sup>bright</sup>) ermöglicht (Brands, 2014). Die Fibroblastenkokultur wird jedoch genutzt, um die Reifung der bereits entwickelten CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen zu terminal differenzierten CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen voranzutreiben (Chan et al., 2007). Außerdem können HCMV-infizierte Fibroblasten als Nährzellen verwendet werden, um NK-Zellen zu NK-Gedächtniszellen mit dem Phänotyp NKG2C<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>KIR<sup>+</sup> ausreifen zu lassen (Charoudeh et al., 2013; Guma et al., 2006a; Rölle et al., 2014).

Ein Nischenwechsel der generierten NK-Zellen von MSC auf (infizierte) Fibroblasten bzw. 721.221-HLA-E-Transfektanten (Beziat et al., 2013) hätte eventuell das Potenzial die späte NK-Zellreifung und eine damit einhergehende NKG2C-Expansion auf CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen zu begünstigen (vergl. Kapitel 3.3). In den Versuchen führte das Umsetzen allerdings zum Absterben der NK-Zellen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Ernten der Zellen, das Umsetzen inklusive des Mediumwechsels sowie die Zerstörung des ursprünglichen Zellverbundes (NK-Zellcluster) nicht unerhebliche Stressfaktoren darstellen, die die Viabilität der NK-Zellen negativ beeinflusst haben können.

#### **4.1.2 Transition von NKG2A- zu NKG2C-exprimierenden NK-Zellen: Welche Schlüsse lässt das *in vitro* Modell zu?**

In einem weiteren Experiment wurden die generierten NK-Zellen auf eine 721.221-HLA-E-Transfektante umgesetzt, die phänotypisch eine HCMV-infizierte Zelle simuliert, welche

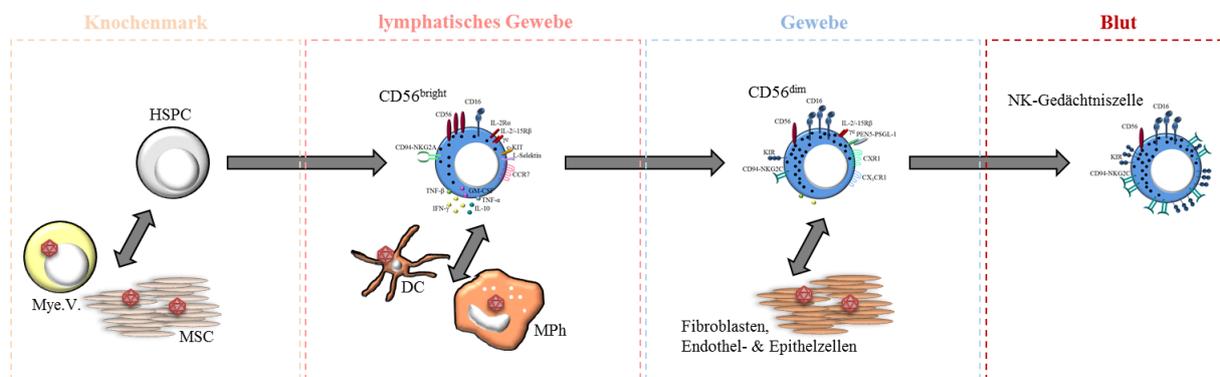
ebenfalls verstärkt HLA-E auf der Zelloberfläche exprimiert. Bei gleichzeitiger Stimulation mit IL-15 konnte, bei den NK-Zellen aus einer infizierten MSC-Kultur ein leichter Rückgang der NKG2A-Expression bei gleichzeitigem Anstieg der NKG2C-Expression beobachtet werden. Obwohl diese relativ geringen Differenzen keine belastbaren Schlussfolgerungen zuzulassen, kann dennoch die Hypothese aufgestellt werden, dass es, während der NK-Zellentwicklung, zu einer Transition von NKG2A- zu NKG2C-exprimierenden NK-Zellen kommt, da beide Rezeptoren um die Bindung zu CD94, mit dem sie Heterodimere bilden, konkurrieren (Abb. 35).



**Abb. 35 NKG2A-/NKG2C-Expression im Laufe der NK-Zellentwicklung (Wechselhypothese).** Weniger reife CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen exprimieren große Mengen NKG2A. Während der Entwicklung zu CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen ist die NKG2A-Expression rückläufig und es gibt höhere Frequenzen NKG2C-exprimierender NK-Zellen. NK-Gedächtniszellen werden überwiegend als NKG2C-expandierend beschrieben. Wie eine HCMV-Infektion, zu der verstärkten Expression des NKG2C-Rezeptors führt ist noch Gegenstand der Diskussion.

Welche Rolle könnte eine HCMV-Infektion dabei spielen? Die NK-Zellentwicklung beginnt *in vivo* im Knochenmark. Dort können die HSPC bereits mit, mit HCMV-infizierten Zellen in Kontakt kommen, denn myeloide Vorläuferzellen dienen als HCMV-Reservoir (Della Chiesa et al., 2013a; La Rosa & Diamond, 2012). Die auf diese Weise beeinflussten jungen CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen verlassen das Knochenmark und gelangen über die Blutbahn in sekundäre lymphatische Gewebe. Dort interagieren sie mit (infizierten) dendritischen Zellen oder Makrophagen, was die Entwicklung zu reifen CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen stimuliert. Diese, nun bereits von bis zu drei verschiedenen, HCMV-infizierten Zelltypen geprägten NK-Zellen zirkulieren mit dem Blutstrom und können nun, in periphere Gewebe eindringen, deren Zellbestandteile wie Fibroblasten, Endothel- oder Epithelzellen ebenfalls mit dem HCMV infiziert sein können (Cooper et al., 2001a; Della Chiesa et al., 2013a; Guma et al., 2006a; La Rosa & Diamond, 2012). Diese erneute Konfrontation mit dem Virus könnte dann die Reifung von CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen zu NK-Gedächtniszelle induzieren (Abb. 36). In diesem Szenario wäre die

kontinuierliche Stimulation mit dem HCMV während jeder Station der NK-Zellentwicklung entscheidend für die Ausbildung der NK-Gedächtniszellen. In dem, in dieser Arbeit verwendeten, Generierungsmodell liegt der Fokus auf dem ersten Entwicklungsschritt, der den Grundstein legt, für die spätere Entstehung der NK-Gedächtniszellen.



**Abb. 36 NK-Zellentwicklung unter dem Einfluss des HCMV.** Die NK-Zellentwicklung startet im Knochenmark, wo die HSPC in Kontakt mit infizierten MSC und/oder myeloiden Vorläufern kommen können. Die frühen NK-Zellen wandern aus und gelangen über die Blutbahn in lymphatisches Gewebe wo sich der Wandel von CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen zu CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen vollzieht. Dabei interagieren sie mit dendritischen Zellen und Makrophagen, die ebenfalls mit dem HCMV infiziert sein können. Die reifen CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen können auch in infiziertes Gewebe eindringen. Dieser kontinuierliche Kontakt zu den HCMV-infizierten Zellen könnte die Entwicklung von NK-Gedächtniszellen begünstigen. Mye.V.: myeloide Vorläuferzellen; MSC: mesenchymale Stammzellen; DC: dendritische Zellen; MPh: Makrophagen

## 4.2 Immunsystem versus HCMV – Studie eines evolutionären Wettrüstens.

Das HCMV hat eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um der Immunreaktion seines Wirtes zu entgehen. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der veränderten Expression der HLA-Klasse I-Moleküle. Während die klassischen HLA-A/B-Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen reduziert werden, wird die Expression des nicht-klassischen HLA-E erhöht (Ameres et al., 2013; Gong et al., 2012; Llano et al., 2003; Tomasec et al., 2000; Ulbrecht et al., 2000; E. C. Wang et al., 2002). Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression des klassischen HLA-C durch eine HCMV-Infektion ebenfalls erhöht wird (Abb. 11). Die HLA-A/B-Moleküle präsentieren Antigene für die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Durch ihre Reduktion wird eine T-Zell-Antwort unterbunden. Der Verlust der HLA-A/B-Moleküle macht die HCMV-infizierten Zellen jedoch angreifbar für die NK-Zellen. Mit ihren spezifischen inhibierenden Rezeptoren binden NK-Zellen an die klassischen HLA-Klasse I-Moleküle. Der durch diese Verbindung vermittelte Schutz vor der NK-Zelllyse geht den infizierten Zellen teilweise verloren. Aber das HCMV, als einer der am besten angepassten Humanpathogene, hat auch hierfür eine Möglichkeit entwickelt der NK-Zellreaktion zu entkommen. Durch die Expression

von UL40, einem Signalpeptidhomolog der klassischen HLA-Klasse I-Moleküle, ist es der infizierten Zelle möglich, HLA-E auf die Zelloberfläche zu bringen, selbst dann wenn der TAP-vermittelte Transport blockiert ist (vergl. Kapitel 1.2.1.4.3). HLA-E ist der Ligand von NKG2A, einem inhibierenden NK-Zellrezeptor. Die Mehrheit der im peripheren Blut zirkulierenden NK-Zellen exprimiert NKG2A (eigene unveröffentlichte Daten). Auf den ersten Blick scheint eine HLA-E-Expression die infizierte Wirtszelle vor den NK-Zellen zu schützen. Nun ist allerdings bekannt, dass es im Rahmen einer HCMV-Infektion zu einem Anstieg NKG2C-exprimierender NK-Zellen kommen kann (Beziat et al., 2012; Foley et al., 2012b; Gong et al., 2012; Guma et al., 2004; Guma et al., 2006a; Lopez-Verges et al., 2011; Monsivais-Urenda et al., 2010). NKG2C, ein aktivierender Rezeptor, der gleichfalls an HLA-E bindet, ist seinerseits der Gegenspieler von NKG2A. Der Kontakt von NKG2C zu seinem, durch die HCMV-Infektion stark exprimierten, Liganden HLA-E steht im Verdacht, eine Expansion der NKG2C-exprimierenden NK-Zellen auszulösen. Zusätzlich gilt IL-12, welches *in vivo* von Monozyten, als Reaktion auf die HCMV-Infektion ausgeschüttet wird, als begünstigender Faktor. Im Fall einer NKG2C-Expansion wird der Schutzmechanismus des HCMV, welcher durch die Inhibierung der NK-Zellen über die HLA-E-NKG2A-Interaktion entsteht, aufgehoben und die aktivierte NK-Zelle könnte die infizierte Zelle eliminieren. Da das HCMV sich koevolutiv mit seinem Wirt entwickelt, könnte man spekulieren, dass die NKG2C-Expansion eine Reaktion auf die Immunevasionsstrategien des HCMV darstellt (Abb. 37).

Interessanterweise exprimieren die NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen fast ohne Ausnahme zusätzlich selbstspezifische KIR (d.h. im Fall einer HCMV-Infektion kommt es zu einer gleichzeitigen Expansion von Zellen mit aktivierenden NKG2C und inhibierenden KIR), deren Liganden die ebenfalls nicht reduzierten HLA-C-Moleküle sind. Möglicherweise ist das HCMV, evolutiv gesehen, bereits einen Schritt weiter und inhibiert über HLA-C die NK-Zellfunktion. So würde der Schutz vor der NK-Zelllyse gesichert, da die Signale der inhibierenden NK-Zellrezeptoren generell die Signale der aktivierenden dominieren (Beziat et al., 2012; Bryceson et al., 2006; Gong et al., 2012; Lanier, 2008). Andererseits, ist die Taktik, sich auf der einen Seite vor dem Immunsystem zu verstecken und es auf der anderen Seite zu stimulieren eventuell auch besonders raffiniert, denn vielleicht bieten gerade diese Gegensätze dem HCMV die Möglichkeit in seinem Wirt zu überdauern, ohne ihn zu töten.

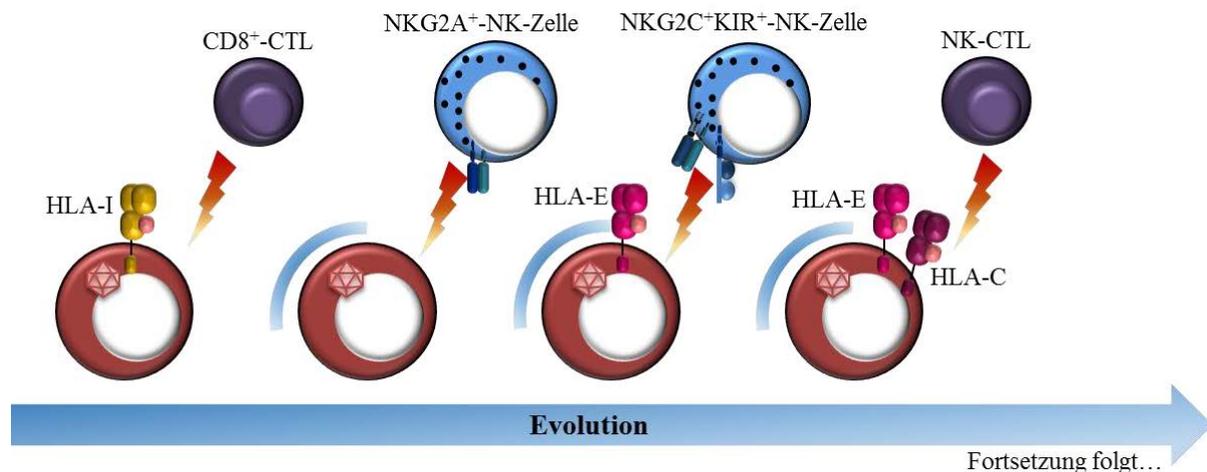
Bei der Kontrolle einer HCMV-Infektion ist das Zusammenspiel von T- und NK-Zellen entscheidend. Dies zeigt sich auch darin, dass eine T-Zellsuppression eine HCMV-Reaktivierung nach einer KMT begünstigt (Della Chiesa et al., 2013a; Farnault et al., 2013; Guma et al., 2006b; Kuijpers et al., 2008). Anfang der 2000er Jahre wurden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

beschrieben, die HLA-E-Moleküle die das UL40-Protein des HCMV gebunden haben, detektieren können. Diese T-Zellen werden wegen ihrer zytotoxischen Eigenschaften gegen Tumorzelllinien auch als NK-zytolytische T-Lymphozyten (*NK cytolytic T lymphocyte*; NK-CTL) bezeichnet (Gong et al., 2012; Guma et al., 2005; Pietra et al., 2003). Diese NK-CTL würden wiederum dem Wirtsorganismus einen Vorteil gegen das HCMV einbringen (Abb. 37).

In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass das HCMV das Verhältnis der sich in der *in vitro* Generierung entwickelnden NK-Zellentwicklungsstadien verschiebt. Während der *in vitro* NK-Zellgenerierung konnte festgestellt werden, dass sich nach 21 Tagen ca. ein Drittel der entwickelten Zellen im dritten NK-Zellentwicklungsstadium befinden (unveröffentlichte Daten). Dieses Entwicklungsstadium wird in jüngster Zeit kontrovers diskutiert, da Zweifel daran aufgekommen sind, ob sich diese Zellen tatsächlich zu NK-Zellen weiterentwickeln, oder ob sie nicht vielmehr einen anderen lymphoiden Zelltyp, ILC3, beschreiben (Hughes et al., 2014). Die Abgrenzung von NK-Zellen und ILC ist aufgrund ihres ähnlichen Phänotyps und ihrer Funktion, sowie ihres gemeinsamen Entwicklungsweges nicht eindeutig. Montaldo et al. haben durch eingehende Studien ein Modell entwickelt, das prognostiziert, dass sich die Wege von NK-Zellen und ILC schon sehr früh trennen müssen (Montaldo et al., 2015). Die Schwierigkeiten während einer *in vitro* Zellgenerierung, Entwicklungsstadien und Zelltypen eindeutig zu bestimmen, liegen immer darin begründet, dass nur ein Ausschnitt der *in vivo* Situation betrachtet werden kann und dass die Zugabe von Botenstoffen, wie Zytokinen recht starr und somit von der *in vivo* Situation abweichend verläuft. So haben Beobachtungen von Herrn Prof. Miller (Universität von Minnesota, USA) ergeben, dass die Zugabe von IL-7 in die Generierungskultur die CD127-Oberflächenexpression (IL-7-Rezeptor) herunterreguliert (mündliche Mitteilung). Aktuell werden ILC und NK-Zellen vornehmlich über die CD127-Expression bzw. Nicht-Expression definiert. Das bedeutet, dass es während einer Generierungskultur leicht zu falsch-negativen Frequenzen kommen kann (dies gilt auch für die Messwerte in der vorliegenden Arbeit). Eine Studie von Moretta et al. konnte zeigen, dass sich aus HSPC aus Nabelschnurblut normalerweise NK-Zellen und ILC3 im gleichen Verhältnis entwickeln (F. Moretta et al., 2016). Wenn also, hypothetisch, aus dem NK-Zellentwicklungsstadium drei keine NK-Zellen sondern beispielsweise ILC3 hervorgehen würden, dann wäre es sehr bemerkenswert, dass, wenn die Generierungskultur mit dem HCMV infiziert ist, signifikant weniger Zellen dieses Entwicklungsstadiums entstehen und es gleichzeitig zu einem 30-fachen Anstieg des Entwicklungsstadiums zwei kommt. Dies könnte nämlich bedeuten, dass im Fall einer HCMV-Infektion die ILC-Differenzierung signifikant

reduziert wird (Abb. 26; Abb. 27). Was dies wiederum für den infizierten Organismus bedeutet, bedarf weiterer Klärung.

Inwiefern der Erfolg, oder Misserfolg einer HCMV-Infektion einem evolutionären Wettrüsten geschuldet ist und wie das genaue Zusammenspiel von ILC, NK-, T- und infizierten Zellen sowie der Einfluss weiterer Blutbestandteile wie Monozyten und dendritischen Zellen funktioniert, ist noch nicht zufriedenstellend verstanden.



**Abb. 37 Hypothese zur Entwicklung der Immunevasionsstrategien des HCMV während der Evolution.** Die Strategien des HCMV um sich vor dem Immunsystems seines Wirtes zu schützen, erwecken den Eindruck als wären sie jeweils Reaktionen auf antivirale Entwicklungen des Wirtsimmunsystems. Das HCMV reguliert die HLA-Klasse I-Moleküle seiner Wirtszelle stark herab, um sich vor den CTL zu schützen. Dadurch sind die infizierten Zellen aber anfällig für NK-Zellen. Um den inhibierenden NKG2A-Rezeptor der NK-Zellen zu stimulieren bringen HCMV-infizierte Zellen den NKG2A-Ligand HLA-E auf ihre Oberfläche. KIR-exprimierende NK-Zellen können die infizierten Zellen allerdings immer noch abtöten. Also exprimieren die HCMV<sup>+</sup>-Zellen auch HLA-C, den Liganden für die inhibierenden KIR KIR2DL1 und KIR2DL3. Die Bindung zu HLA-C aktiviert jedoch die NK-CTL. CTL: zytotoxische T-Zelle.

### 4.3 *In vitro* generierte NK-Zellen aus einer HCMV-infizierten Stammzellnische und NK-Zellen aus HCMV-seropositiven Kindern im Vergleich

Eine zurückliegende HCMV-Infektion führt in einigen „gesunden“ Erwachsenen zu einer Expansion NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen, die gleichzeitig einen inhibierenden, selbstspezifischen KIR expandieren können (Guma et al., 2004; Guma et al., 2006a). Monsivàis-Urenda et al. haben 2010 eine Studie mit 41 Kindern zwischen neun Monaten und 11 Jahren vorgestellt, die den Einfluss einer HCMV-Infektion auf das kindliche Immunsystem untersucht. Da die HSPC mit denen die Generierungen dieses Promotionprojektes durchgeführt wurden, aus Nabelschnurblut stammen erscheint es sinnvoll, sie auch mit den NK-Zellen von Kindern zu vergleichen. Ähnlich wie in Erwachsenen detektierten Monsivàis-Urenda et al. einen signifikanten Anstieg der NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen, wenn der HCMV-Serostatus positiv war. Allerdings beschränkt sich

die Signifikanz auf die Messwerte der Kinder die zum Zeitpunkt der Studie schon älter als zwei Jahre alt waren (Monsivais-Urenda et al., 2010). Eine gesteigerte Expression inhibierender KIR (KIR2DL1/S1 und KIR3DL1) konnte hingegen nicht beobachtet werden. Während der *in vitro* Generierung ließen sich weder signifikante Unterschiede in der NKG2C- noch in der KIR-Expression feststellen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Blutuntersuchungen der Kinder unter zwei Jahren (das verwendete Nabelschnurblut wäre in diese Altersklasse einzuordnen). Interessanterweise zeigte sich bei den seropositiven Probanden auch ein Anstieg einer CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>NKG2C<sup>+</sup>-Zellpopulation. CD56<sup>-</sup>-NK-Zellen wurden erstmalig in AIDS-Patienten entdeckt (Mavilio et al., 2005). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um sterbende CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen, die während der Apoptose ihr CD56 auf der Zelloberfläche verlieren (Lutz et al., 2011; Philippe et al., 1997). CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>-NK-Zellen konnten allerdings auch im Nabelschnurblut nachgewiesen werden. *In vitro* ließen sich diese Zellen zu reifen CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen differenzieren (Lu et al., 2008; McCullar et al., 2008). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei diesem NK-Zellsubtyp um eine unreife Population handelt, die zufällig einige phänotypischen Merkmale aufweist, die auch auf den seneszenten NK-Zellen der AIDS-Patienten zu finden sind. Eine ähnliche NK-Zellpopulation (CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>p75/AIRM1<sup>-</sup>KIR<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup>) konnte auch in Patienten nach einer Nabelschnurbluttransplantation identifiziert werden. Für deren Entstehung scheint HCMV eine Rolle zu spielen (Della Chiesa et al., 2012; Lu et al., 2008; Phillips et al., 1992).

Während der *in vitro* Generierung ließ sich ebenfalls ein signifikant höherer Prozentsatz CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen finden, wenn die MSC mit dem HCMV infiziert waren (Abb. 28). Diese hyporeaktiven CD56<sup>-</sup>-NK-Zellen scheinen bevorzugt dann zu entstehen, wenn die T-Zellimmunität gestört ist (Generierung ohne T-Zellen, sehr junge Kinder, Nabelschnurblut) (Della Chiesa et al., 2013a; Monsivais-Urenda et al., 2010). Es ist bisher nicht geklärt, ob die CD56<sup>-</sup>-NK-Zellen von Beginn an kein CD56 exprimieren, oder ob sie aus CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen hervorgehen, die die Expression maximal reduziert haben. Vermutlich befinden sich die CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>-NK-Zellen in der Entwicklungshierarchie auf der Höhe der CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen und sind weniger ausgereift als die CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen (Lutz et al., 2011).

In Kindern war die Population der NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen größer, wenn sie noch HCMV sekretierten. Diese Beobachtung würde die Hypothese unterstützen, dass während einer akuten HCMV-Infektion die NKG2C-Expression generell gesteigert wird, um die infizierten Zellen besser kontrollieren zu können, aber bei der Mehrheit der infizierten mit dem Erreichen der Persistenz wieder auf einen normalen Level absinkt. Nur bei etwa 26% bleibt der NKG2C-Spiegel ein lebenslang erhöht. Sind die NKG2C-expandeden Zellen dieser Minorität

tatsächlich NK-Gedächtniszellen und wenn ja, bieten sie seinem Besitzer Vorteile? Und was ist mit denjenigen, die aufgrund einer Gendeletion gar kein NKG2C exprimieren können? Haben diese Menschen dann auch keine NK-Gedächtniszellen?

## 4.4 NK-Gedächtniszellen – Konkurrenz für NKG2C! Welche Rolle spielen die aktivierenden Rezeptoren CD16, NKp46 und NKG2D

### 4.4.1 CD16

Der Oberflächenrezeptor CD16 ist ein FC $\gamma$ -Rezeptor (FC $\gamma$ RIIIA), der an die FC-Region von IgG-Antikörpern bindet und dadurch ADCC auslöst. CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen exprimieren nur sehr geringe Mengen CD16, wohingegen die CD16-Expression auf CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen hoch ist. Aktivierte NK-Zellen drosseln ihre CD16-Expression über ADAM17 (Romee et al., 2013). Die Bindung von CD16 an seinen Liganden benötigt keine weitere Kostimulation, um eine zytotoxische Reaktion auszulösen. Eine Reduktion der CD16-Expression nach der Aktivierung der NK-Zelle verhindert somit eine mögliche Autoimmunreaktion. Während der NK-Zellgenerierung entstehen in infizierten Kokulturen signifikant mehr NK-Zellen, die CD16 exprimieren. Die stärkere CD16-Expression lässt auf einen höheren Reifegrad der NK-Zellen schließen (s.o.).

Schon seit einigen Jahren wird über die Bildung HCMV-spezifischer NKG2C<sup>+</sup>-NK-Gedächtniszellen spekuliert (Della Chiesa et al., 2015; Foley et al., 2012a; Muccio et al., 2016; Romee et al., 2012). Dabei schien die NKG2C-Expansion immer eine zentrale Rolle zu spielen. Liu et al., haben hingegen kürzlich gezeigt, dass auch die Menschen, die eine genetische NKG2C-Defizienz aufweisen, NK-Zellen mit adaptiven Eigenschaften generieren können. Diese Zellen zeichnen sich durch die Rezeptorkombination CD2/CD16 aus, deren Stimulation eine erhöhte INF- $\gamma$  und TNF-Produktion zur Folge hat. Auch die generierten NK-Zellen produzieren unter dem Einfluss des HCMV signifikant größere Mengen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Abb. 25, Abb. 31, Abb. 32) (L. L. Liu et al., 2016).

Die adaptiven Eigenschaften sind laut Liu et al., sowohl bei NKG2C<sup>+</sup>- als auch bei NKG2C<sup>-/-</sup>-NK-Zellen vergleichbar: Sie exprimieren KIR, zeigen eine geringe zytokinvermittelte Aktivierung, eine reduzierte Aktivität gegenüber Tumorzellen und die bereits genannte verstärkte CD2/CD16-stimulierte INF- $\gamma$  und TNF-Produktion (L. L. Liu et al., 2016). Auch Wu et al., beschrieben, dass NKG2C<sup>hi</sup>CD57<sup>hi</sup>-NK-Zellen eine erhöhte Reaktionsbereitschaft auf die antikörpervermittelte Stimulation zeigen (Z. Wu et al., 2013). Die Frage, die sich Liu et al., stellten war die, ob NKG2C für die Entstehung von adaptiven NK-Zellen nötig ist, oder ob es

nicht viel mehr nur ein Marker für adaptive NK-Zellen sein kann. Da laut Liu, sowohl in NKG2C<sup>+</sup>- als auch NKG2C<sup>-/-</sup>-NK-Gedächtniszellen, nur die CD2/CD16-Kombination eine funktionale adaptive Immunantwort erzeugen kann (L. L. Liu et al., 2016), kommen Zweifel an der Sonderstellung des NKG2C auf. Dazu kommt die Tatsache, dass nur ca. 26% der HCMV-seropositiven Blutspender NKG2C-expandede NK-Gedächtniszelle aufweisen (eigene unveröffentlichte Daten). Die NKG2C Interaktion mit HLA-E (wird von HCMV-infizierten Zellen stark exprimiert) scheint nach den neuesten Erkenntnissen für die Entwicklung von NK-Gedächtniszellen entbehrlich zu sein. Vielleicht ist die Entstehung der adaptiven NK-Zellen vielmehr das Resultat einer andauernden NK-Zellaktivierung über die Stimulation von CD16 mit HCMV-spezifischen Antikörpern. Damit in Einklang wäre auch die Beobachtung, dass Kinder, die das HCMV noch aktiv ausscheiden (über Urin und Speichel), mehr vermeintliche NK-Gedächtniszellen besitzen. Diese Hypothese würde die Heterogenität der NKG2C-Expression in HCMV-seropositiven Personen erklären. Die Frage nach dem Vorteil der adaptiven NK-Zellen ist hingegen nach wie vor unbeantwortet. Es ist jedoch bekannt, dass die NK-Gedächtniszellen, schlechter in der Tumorbekämpfung agieren und im Fall einer Entzündung schlechter von Zytokinen aktiviert werden können (Berrien-Elliott et al., 2015; L. L. Liu et al., 2016; Min-Oo et al., 2013; Petersen et al., 2009; J. A. Wagner & Fehniger, 2016).

#### 4.4.2 NKp46

Ursprünglich wurde der aktivierende Rezeptor NKp46 wegen seiner Interaktion mit dem Influenza Hämagglutinin bekannt. Zusammen mit dem NKG2D-Rezeptor steuert er die NK-Zell-Immunantwort gegen die, mit dem Influenzavirus infizierten, aus Monozyten hervorgehenden, dendritischen Zellen (*monocyte derived dendritic cells*; moDC) (Groh et al., 2002; Magri et al., 2011; Nguyen et al., 2002). Eine Untersuchung von Magri et al. widmete sich der Wechselbeziehung von NK-Zellen und, mit dem HCMV infizierten, moDC (Magri et al., 2011). Es stellte sich heraus, dass die NK-Zellen aus HCMV-seronegativen Spendern nach einer Kokultur mit den infizierten moDC, größere Mengen IFN- $\gamma$  sekretierten, als die Kontrollzellen. Außerdem zeigten sie eine stärkere Resonanz während eines CD107-Assays. Diese Phänomene lassen sich auch in der Generierungskultur von HSPC mit infizierten MSC beobachten. Die IFN- $\gamma$ -Produktion und die Degranulierungsbereitschaft spielen allgemein eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Virusinfektionen und scheinen von dem HCMV nicht verhindert werden zu können. Durch die gezielte Inhibierung des NKp46-Rezeptors mittels monoklonaler Antikörper (*monoclonal antibody*; mAb), wurden die gemessenen IFN- $\gamma$ - und

CD107-Mengen deutlich reduziert (Magri et al., 2011). Daraus lässt sich Schlussfolgern, dass NKp46 direkt verantwortlich für die NK-Zellantwort auf HCMV-infizierte moDC ist. Während der Generierung von NK-Zellen auf, mit dem HCMV infizierten MSC kommt es zu einer verstärkten NKp46-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Augenscheinlich hat NKp46 eine bisher noch nicht aufgeklärte, aber wichtige Funktion für die Interaktion von HCMV-infizierten Zellen und NK-Zellen. Während der Kultivierung der moDC nahm die Oberflächenexpression der NKp46-Liganden 72 Stunden nach der Infektion mit dem HCMV deutlich ab. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nach dieser Zeit die Immunflucht durch spezifische HCMV-Proteine eingeleitet wird. Für die generierten Zellen, die überwiegend für NKG2A positiv sind (infizierte Kokultur) wäre ein aktivierender Rezeptor, der, zumindest temporär, HCMV-infizierte Zellen erkennt, ein großer Vorteil in der Verteidigung gegen das Virus. NKG2C<sup>-dim</sup>-NK-Zellen exprimieren nachweislich mehr NKp46 als NKG2C<sup>bright</sup>-NK-Zellen (NK-Gedächtniszellen) (Muntasell et al., 2013). Vielleicht überbrücken die NKp46<sup>+</sup>-NK-Zellen, als Effektorzellen die Zeitspanne, bis eine NKG2C-Expansion eintritt. Es könnte sich aber auch um eine alternative reaktive NK-Zellpopulation handeln, denn bekanntlich expandieren NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen nur in ca. 26% der HCMV-seropositiven Probanden. NKp46 könnte auch bloß ein weiterer Puzzlestein im Wettstreit um die Kontrolle während der HCMV-Infektion sein. Um eine definitive Aussage treffen zu können, weiß man über die Expression von NKp46 *in vivo* vor, während und nach einer HCMV-Infektion noch zu wenig. Hier wären noch weitere Studien nötig, um die Bedeutung dieses aktivierenden Rezeptors besser einordnen zu können.

#### 4.4.3 NKG2D

NKG2D ist einer der wichtigsten aktivierenden NK-Zellrezeptoren. Annähernd alle NK-Zellen besitzen ihn auf ihrer Oberfläche. Er bindet an die Stressmoleküle MICA/B und ULBP1-6. Nach einem Hitzeschock, durch die Entartung oder eine Virusinfektion exprimieren Zellen diese NKG2D-Liganden. Natürlich hat das HCMV auch gegen NKG2D präventive Strategien entwickelt. Das Virus reguliert die Expression der NKG2D-Liganden auf mannigfaltige Weise (Proteine und microRNA; vergl. Kapitel 1.2.1.4.3). Das Bestreben des Virus eine NK-Zellaktivierung durch die Interaktion von NKG2D mit seinen Liganden zu verhindern könnte darin begründet liegen, dass das aktivierende NKG2D-Signal entgegen der allgemein gültigen Regel (Bryceson et al., 2006; Lanier, 2008; Romee et al., 2013) ein inhibierendes NK-Zellsignal dominieren kann (Crouse et al., 2015; Long & Rajagopalan, 2002). Der wichtigste NKG2D-Ligand ist MICA. Von ihm gibt es über 80 verschiedene Allele (Fernandez-Messina et al., 2012;

Seidel et al., 2015). Das am häufigsten exprimierte Allel ist *MICA\*008*. In den untersuchten Populationen liegt seine Expressionsrate bei 53% (Petersdorf et al., 1999; Seidel et al., 2015; Zhang et al., 2001). Interessanter Weise ist dieses Allel resistent gegen das UL142-Protein des HCMV (Ashiru et al., 2009; Chalupny et al., 2006). Aufgrund der globalen Verbreitung des HCMV liegt die Vermutung nahe, dass dieses Allel wegen seiner Resistenz einen Selektionsvorteil bietet und sich durch den positiven Selektionsdruck derart ausbreiten konnte (Slavuljica et al., 2011; Wilkinson et al., 2008). Neueste Studien zeigen hingegen, dass das HCMV-Protein US9 selektiv die Oberflächenexpression des *MICA\*008*-Moleküls verhindert. Diese Entwicklung verdeutlicht auf beeindruckende Weise die Dynamik der Koevolution des HCMV und seines Wirts (Seidel et al., 2015). Zudem bestärkt es einmal mehr die besondere Bedeutung der NKG2D-vermittelten NK-Zellzytotoxizität für das HCMV.

Muntasell et al., konnten 2010 zeigen, dass während einer Kokultur von, mit dem HCMV-Stamm TB40/E infizierten, MRC-5 und PBMC die NKG2D-Expression auf der NK-Zelloberfläche deutlich reduziert wurde. Dieser Effekt war transient, mit einem NKG2D-Minimum nach 48 Stunden. Nach sieben Tagen war die NKG2D-Expression wieder auf einem normalen Level. Diesen Effekt führten sie auf die, während einer HCMV-Infektion ausgeschütteten, Zytokine IL-12 und Typ I-Interferone zurück (Muntasell et al., 2010).

Neben den NK-Zellen können auch T-Zellen NKG2D exprimieren. HCMV spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen eine erhöhte NKG2D-Expression. Diese Zellen haben einen reiferen Phänotyp, als NKG2D<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Jensen et al., 2012). Die Zugabe verschiedener Zytokine wie IL-2, IL-7 und IL-15 steigert die NKG2D-Expression wohingegen IL-21 und der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ; TGF $\beta$ ) das Gegenteil bewirken (Burgess et al., 2006; Castriconi et al., 2003; Raulet, 2003; Zwirner et al., 2007).

Während der NK-Zellentwicklung soll NKG2D neben seiner immunologischen Bedeutung auch eine regulatorische Rolle (Kontrolle der Proliferation und Schutz vor Apoptose) spielen (Zafirova et al., 2011).

Nach einer dreiwöchigen Generierungsphase exprimieren die NK-Zellen, die auf HCMV-infizierten MSC gewachsen sind signifikant größere Mengen NKG2D auf der Oberfläche als die Kontrollzellen. Diese NK-Zellen sind vielfach NKG2A<sup>-</sup> (Abb. 31 B) was einem reiferen Phänotyp entspricht. Wie bereits aufgrund der Expansion der NKG2A-exprimierenden NK-Zellen angenommen, scheinen die NK-Zellen unter dem Einfluss des HCMV schneller zu reifen. Reifere Zellen könnten *in vivo* auch schneller die Knochenmarknische verlassen und ihre Differenzierung zu adulten, HCMV-spezifischen NK-Zellen vollziehen. Dadurch stünden

sie früher bereit, um eine HCMV-Reaktivierung kontrollieren zu können. Diese Überlegung unterstützt die Hypothese der Entwicklung von HCMV-spezifischen (NKG2C<sup>+</sup>)-NK-Gedächtniszellen.

#### 4.5 Kontrolle des HLA-Klasse I-Profiles – Ein Virus auf der Flucht.

Das HCMV besitzt viele verschiedene Gene, deren Proteine mit der HLA-Expression des Wirts interagieren. Eine Studie von Llano et al. konnte zeigen, dass US2, US6 und US11 die HLA-Expression selektiv beeinflussen (Llano et al., 2003). US6 unterdrückt die Expression aller HLA-Klasse I-Moleküle, wodurch eine HCMV-infizierte Zelle zu einer leichten Beute für die NKG2A<sup>+</sup>KIR2DL<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup>-NK-Zellen wird. US11 reduziert hingegen nur die Expression der klassischen HLA-Klasse I-Moleküle, verschont aber die Expression des nicht-klassischen HLA-E-Moleküls. Somit sind die infizierten Zellen gegen NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen geschützt, aber angreifbar für NKG2C<sup>+</sup>KIR<sup>+</sup>-NK-Zellen. US2 scheint neben der HLA-E- auch die HLA-B7-Expression unverändert zu lassen. Dies schützt die infizierten Zellen vor NKG2A<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup>-NK-Zellen. Ameres et al. postulieren hingegen, dass der HLA-C-Allotyp C\*0702 gegen die Wirkung von US2 und US11 resistent ist, wodurch NK-Zellen mit HLA-C-spezifischen KIR inaktiviert bleiben, aber C\*0702-restrikte T-Zellklone die infizierten Zellen effektiv lysieren können (Ameres et al., 2013).

Die unterschiedlichen Effekte der US-Proteine auf die HLA-Regulation sind ein Indiz für die evolutionäre Adaption des HCMV an die NK-Zellimmunität. Auch die *in vitro* Infektion der MSC und MRC-5 mit verschiedenen HCMV-Stämmen bzw. einem Patientenisolat demonstrieren, dass die HLA-C-Expression von den Regulationsmechanismen des Virus unangetastet bleibt, was die erfolgreiche Anpassung dieses Virus an seinen Wirt unterstreicht. Der Verbleib der HLA-C-Moleküle auf der Oberfläche HCMV-infizierter Zellen würde auch eine mögliche Erklärung dafür liefern, dass *in vivo* NK-Gedächtniszellen HLA-C-spezifische KIR expandieren (vergl. Kapitel 4.6).

#### 4.6 Lizenzierung – Wie gut sind die *in vitro* generierten NK-Zellen „geschult“?

Es wird davon ausgegangen, dass die HLA-Klasse I-Moleküle das KIR-Repertoire beeinflussen können. Schließlich sind sie die Liganden der KIR. Andererseits liegen die HLA-Gene und die KIR-Gene auf unterschiedlichen Chromosomen und werden dementsprechend unabhängig voneinander vererbt. Damit die NK-Zellen im vollen Maße funktionstüchtig werden können müssen sie einen Prozess der „Erziehung“ durchlaufen, der als Lizenzierung bekannt ist. Es

wird vermutet, dass ein Selektionsprozess stattfindet, bei dem NK-Zellen, die einen inhibierenden KIR für „Selbst“-HLA besitzen funktional und selbsttolerant, also lizenziert sind. Im Umkehrschluss sind NK-Zellen ohne selbstspezifischen KIR hyporeaktiv und bleiben inaktiv (Kim et al., 2005; Yokoyama & Kim, 2006). Orr et al. konnten 2010 allerdings zeigen dass auch unlizenzierte NK-Zellen eine Virusinfektion regulieren können (Orr et al., 2010). Außerdem ist der genaue Mechanismus der Lizenzierung nicht bekannt. Es gibt zwei gegensätzliche Hypothesen. Die eine besagt, dass NK-Zellen ursprünglich inaktiv sind und erst durch den Erhalt des richtigen Rezeptors funktional werden. Die zweite Überlegung geht davon aus, dass alle NK-Zellen reaktiv sind und diejenigen ohne einen inhibierenden KIR durch eine permanente Stimulation anergisch und somit inaktiviert werden (Raulet & Vance, 2006; M. F. Wu & Raulet, 1997). Darüber hinaus wurde in Mäusen gezeigt, dass die Lizenzierung reversibel ist, wenn sich das MHC-Klasse I-Milieu verändert (Elliott et al., 2010; Joncker et al., 2010). Im Jahr 2006 publizierten Yawata et al., dass die Anwesenheit eines HLA-Klasse I-Liganden die Frequenz der NK-Zellen, die den dazu spezifischen KIR exprimieren, erhöht (Yawata et al., 2006). Drei Jahre später wurde diesen Ergebnissen von Andersson et al., bereits widersprochen (S. Andersson et al., 2009). Heute wird angenommen, dass einer Anpassung des KIR-Repertoires an die entsprechenden HLA-Moleküle eine HCMV-Infektion vorausgehen muss (Beziat et al., 2012; Beziat et al., 2013). Die Mehrheit der HCMV-seropositiven Blutspender mit einer selbstspezifischen KIR-Repertoire-Verschiebung expandieren inhibierende KIR für HLA-C. Nur ein Bruchteil exprimiert verstärkt den KIR für HLA-Bw4, oder aktivierende KIR (Della Chiesa et al., 2015). Zudem konnte festgestellt werden, dass NK-Zellen mit einem inhibierenden, selbstspezifischen KIR eine höhere funktionale Aktivität aufweisen, als NK-Zellen denen ein entsprechender KIR fehlt (Anfossi et al., 2006; Fernandez et al., 2005; Kim et al., 2005).

Es wäre also denkbar, dass die NK-Zelldifferenzierung auf, mit dem HCMV infizierten MSC, zu einer selektiven Expansion der selbstspezifischen KIR führen könnte, so wie es teils *in vivo* beobachtet werden kann (Beziat et al., 2013; Charoudeh et al., 2013; Guma et al., 2004). Der Vergleich aus nicht-infizierten und infizierten Generierungsansätzen ergibt hingegen, dass unabhängig vom Infektionsstatus, dem HLA-C-Typ der MSC und vom KIR-Genotyp/HLA-C-Typ der HSPC immer größere Mengen KIR2DL3 (Ligand HLA-C1) als KIR2DL1 (Ligand HLA-C2) exprimiert werden (Abb. 19 E/F). Es findet keine KIR-Anpassung an den HLA-C-Typ statt.

#### 4.7 Einsatz der *in vitro* generierten NK-Zellen als Immuntherapeutika

Das größte Risiko einer HCMV-Reaktivierung nach einer KMT besteht, wenn der Empfänger HCMV-seropositiv und der Spender HCMV-seronegativ ist. Das Immunsystem des Empfängers ist depletiert und das latente oder aktive HCMV kann nicht mehr von ihm reguliert werden. Die Spenderzellen hatten hingegen noch nie Kontakt zu dem Virus, entsprechend gibt es keine HCMV-spezifischen T-Zellen, die die Infektion kontrollieren könnten (Hanley & Bollard, 2014). Eine Möglichkeit den Patienten vor einer schwerwiegenden HCMV-Reaktivierung zu schützen ist die Verabreichung von Virustatika, wie Ganciclovir, Valganciclovir, Foscarnet und Cidofovir. Diese Medikamente haben allerdings, teils heftige Nebenwirkungen. *Late onset*-Erkrankungen (Erkrankungen, die erst spät, bezogen auf das Lebensalter, ausbrechen) können die Folge sein. Die Medikamente sind darüber hinaus häufig nephrotoxisch, myelosuppressiv und können eine unvollständige Immunrekonstitution bewirken. Letzteres führt zu einem Anstieg invasiven Pilzbefalls und bakterieller Sepsis (Battiwalla et al., 2007; Boeckh & Ljungman, 2009; Broers et al., 2000; Fujita et al., 2008a; Fujita et al., 2008b). Zudem können die Präparate aufgrund von Resistenzen wirkungslos sein (Einsele et al., 2000; Fuji et al., 2011; Mori et al., 2000).

Derzeit wird deshalb der Einsatz immuntherapeutischer T-Zellen bevorzugt. Es gibt verschiedene Methoden, um HCMV-spezifische T-Zellen zu produzieren (Hanley & Bollard, 2014), die nicht selten kostenintensiv und zeitaufwändig sind. Auch die Infusion selektierter Lymphozyten (*donor lymphocyte infusion*; DLI) des Knochenmarkspenders werden genutzt, um Viruserkrankungen des Empfängers zu bekämpfen. Die DLI hat z.T. erhebliche Nebenwirkungen, wie die „*Graft versus Host Disease*“ (GvHD), mit teils chronischem Verlauf (Eiz-Vesper et al., 2012; Hanley & Bollard, 2014). Eine jüngst entwickelte Alternative bietet der Einsatz von sog. *third-party-T-cells*, also T-Zellen aus einer weiteren, einer dritten Person (Spender und Empfänger sind die Parteien eins und zwei). Diese „*third-party*“-T-Zellen stammen aus einem HCMV-seropositiven Spender und sind zytotoxische Effektorzellen. Sie können sehr schnell eine antivirale Immunität erzeugen und schützen somit vor der klinischen Manifestation des Virus. Dabei zeigen sie keine nennenswerte Toxizität oder ein erhöhtes GvHD-Risiko. Die „*third-party*“-T-Zellen sind partiell HLA-*matched*, kurzlebig, schnell verfügbar, es reichen kleine Mengen und sie sind effektiv (Eiz-Vesper et al., 2012; Hanley & Bollard, 2014). Sie können direkt selektiert werden, ohne eine lange *ex vivo* Stimulation zu benötigen. Dabei kommen vor allem zwei Methoden zum Einsatz. Entweder werden die Zellen anhand ihrer IFN-Expression selektiert (Eiz-Vesper et al., 2012; Feuchtinger et al., 2008; Mackinnon et al., 2008; Peggs et al., 2011; Rauser et al., 2004), oder mittels Peptid-MHC

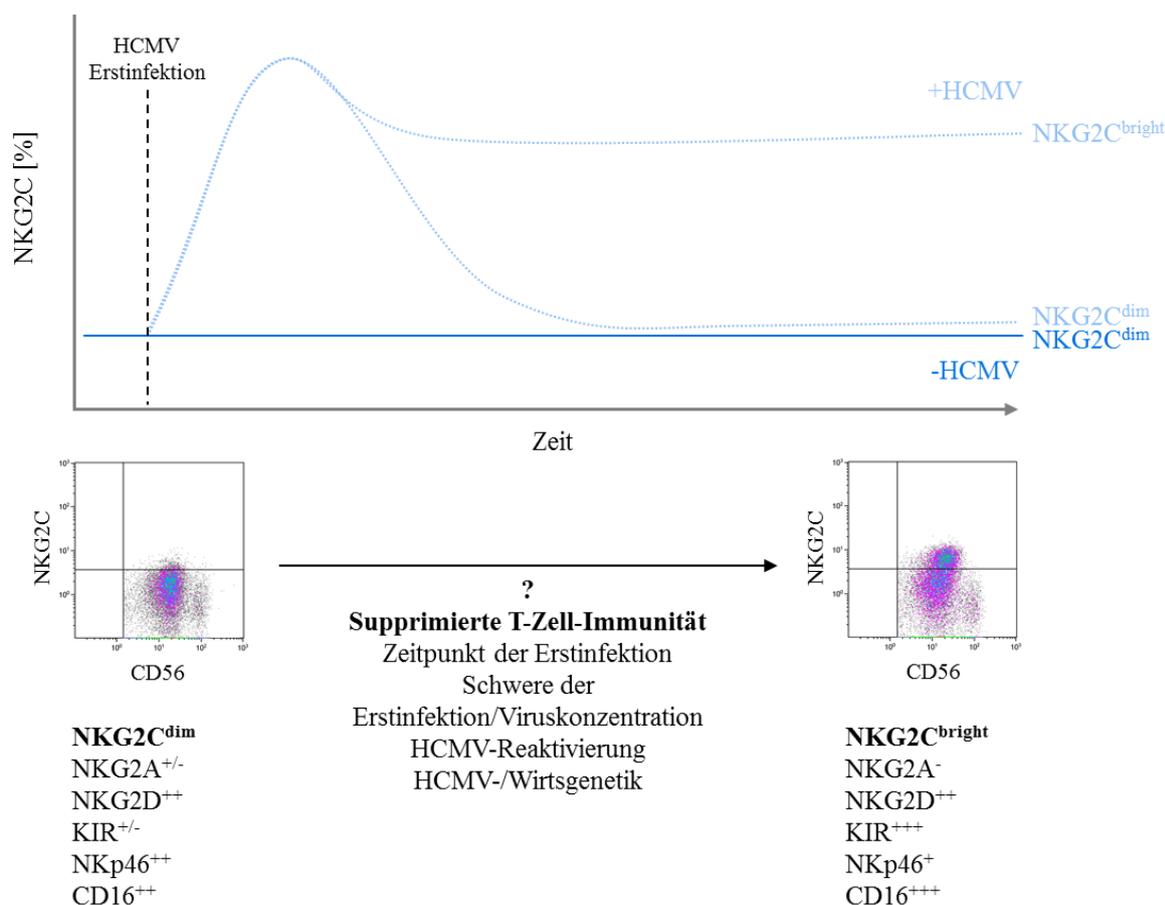
(pMHC) Multimer-Isolation (Casalegno-Garduno et al., 2010; Cobbold et al., 2005; Schmitt et al., 2011).

Die *in vitro* Generation von reifen NK-Zellen ist sehr zeitaufwändig (durchschnittlich acht Wochen) und außerdem ist die Kultur aus Nährzellen, HSPC, HCMV und verschiedenen Medien, sehr komplex und pflegeintensiv. Zudem ist die Ausbeute relativ gering. Wie der immuntherapeutische Ansatz der „*third-party*“-T-Zellen zeigt gibt es bessere, im Kosten-Nutzen-Verhältnis erfolgreichere Methoden, um eine HCMV-Reaktivierung nach einer Stammzellspende zu kontrollieren. Hinzu kommt, dass die generierten NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen gegenüber HCMV-infizierten Zellen nutzlos wären. Oder könnte dieses Defizit an anderer Stelle vielleicht von Vorteil sein? Die zytotoxischen Untersuchungen in dieser Arbeit (vergl. Kapitel 3.2.10) haben gezeigt, dass die NKG2A<sup>+</sup>-NK-Zellen aus den infizierten Kokulturen reaktiver gegenüber HLA-defizienten Tumorzellen (K562) sind. Auch *in vivo* Studien belegen, dass eine akute HCMV-Infektion nach einer Stammzelltransplantation (*stem cell transplantation*; SCT) mit einem geringeren Rückfallrisiko einhergeht (Della Chiesa et al., 2013a; Elmaagacli et al., 2011), vor allem, wenn ein KIR-*mismatch* der Spenderzellen vorliegt. Die NKG2A-expandierten NK-Zellen sind hypersensitiv für den Verlust von HLA-E (wenn sie zeitgleich KIR-exprimieren auch für HLA-C). Reusing et al., konnten zeigen, dass bei pädiatrischen akuten lymphatischen Leukämien (ALL) die HLA-C und -E Moleküle auf den entarteten Blasten selektiv herab reguliert sind (Reusing et al., 2015). Die *in vitro* generierten NKG2A-expandierten NK-Zellen wären der ideale Effektor gegen diese Tumorzellen, da sie nur die Blasten töten würden, nicht aber die gesunden Lymphozyten, die HLA-C/E normal exprimieren.

NK-Zellen können sowohl in der Blutbahn zirkulieren, als auch in Gewebe eindringen. Sollten solide Tumore ebenfalls HLA-C/E herunterregulieren, wären die generierten NK-Zellen auch hier von potenziellem Nutzen.

#### 4.8 Das humane Zytomegalievirus – Freund oder Feind?

In wie weit der Verbleib der NKG2C-expandierten NK-Zellen in einigen HCMV-seropositiven Probanden einem kumulativen Prozess, sekundär zu einer höheren Infektionsrate (Hinweise darauf liefern Studien von HIV-Patienten) zuzuschreiben ist, oder ob andere Faktoren, wie beispielsweise der Zeitpunkt der Erstinfektion oder die T-Zellimmunität, eine Rolle spielen ist noch völlig unklar (Abb. 38) (Guma et al., 2004; Guma et al., 2006b; Monsivais-Urenda et al., 2010).



**Abb. 38 Entstehung der NKG2C<sup>+</sup>-NK-Gedächtniszellen.** Es wird vermutet, dass eine HCMV-Erstinfektion immer mit einer erhöhten NKG2C-Expression einhergeht. Bei der Mehrheit der Betroffenen sinkt der NKG2C-Level nach der akuten Phase der Infektion jedoch wieder ab; nur bei ca. 26% bleibt die NKG2C-Expression dauerhaft erhöht. Welche Faktoren die NKG2C-Expansion beeinflussen wird noch nicht hinreichend verstanden. Es scheint allerdings sicher, dass eine supprimierte T-Zell-Immunität die Entstehung von NKG2C<sup>bright</sup>-NK-Zellen begünstigt. Die Funktion dieser Zellen und, ob sie für ihren Besitzer von Vor- oder Nachteil sind ist Gegenstand aktueller Forschung. Verändert nach Muntasell et al., 2013.

Menschen mit einer dauerhaften NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zell-Expansion büßen einen Teil ihrer immunologischen Flexibilität ein. Ihr NK-Zellrezeptorrepertoire ist erheblich eingeschränkt und erschwert möglicherweise die Reaktion auf verschiedene Virusinfektionen oder maligne Entartung. Es gibt Erhebungen die nahe legen, dass HCMV-seropositive Menschen eine kürzere Lebenserwartung haben als seronegative (Hanley & Bollard, 2014; Olsson et al., 2000; Simpson et al., 2012; Spielmann et al., 2014). Außerdem scheint das HCMV nicht nur vor der Immunreaktion seines Wirtes zu „flüchten“, sondern es auch gezielt zu supprimieren (Andrews et al., 2001; Hanley & Bollard, 2014; Jackson et al., 2011; Lehner & Wilkinson, 2001; Noriega et al., 2012). Infizierte Zellen sezernieren beispielsweise eine cmv-Version des IL-10 Zytokins, welches antiinflammatorisch ist und sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort limitiert (Amsler et al., 2013; Chang & Barry, 2010; Kotenko et al., 2000; Pestka et al., 2004).

Die NKG2C<sup>+</sup>KIR<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>-NK-Zellen die man in einigen HCMV-seropositiven Probanden finden kann werden auch als NK-Gedächtniszellen propagiert. Doch statt eines positiven Effekts, wie man ihn von T-Gedächtniszellen kennt, gehen die Meinungen über die NK-Gedächtniszellen auseinander. Die NKG2C<sup>+</sup>KIR<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>-NK-Zellen wären höchstwahrscheinlich gegenüber HCMV-infizierten Zellen inaktiv, weil ihre inhibierenden KIR-vermittelten Signale das aktivierende Signal des NKG2C-Rezeptors dominieren würden. Djaoud et al., konnte beobachten, dass die Degranulationsbereitschaft verschiedener NK-Zellpopulationen aus HCMV-seropositiven Spendern, in Anwesenheit von K562 unabhängig von der NKG2C/KIR-Expression ist. Auf infizierte, unreife DC reagierten die NKG2C<sup>-</sup>KIR2D<sup>+</sup>-NK-Zellen stärker, als die NKG2C<sup>+</sup>KIR2D<sup>+</sup>-NK-Zellen (Djaoud et al., 2013). Es wäre theoretisch möglich, dass das stimulierende NKG2C-Signal das inhibierende KIR-Signal übertrifft, ähnlich wie bei NKG2D. (Crouse et al., 2015; Long & Rajagopalan, 2002). Nur diejenigen Zellen, die sowohl stimulierende, als auch inhibierende Signale erhalten können theoretisch einen längeren Zeitraum überdauern. Generell wird vermutet, dass stimulatorische Signale zu einer gesteigerten Proliferation führen. Ohne ein parallel eingehendes inhibierendes Signal würden die aktivierten Zellen ihre Zielzellen abtöten und selbst absterben (*activation induced cell death*; AICD). Das inhibierende Signal, dass von lizenzierten NK-Zellen über die HLA-C spezifischen KIR weitergeleitet wird, erhöht die Bcl-2-Produktion, wodurch die NK-Zellen vor apoptotischen Vorgängen geschützt werden (Felices et al., 2014). Die gleichzeitige Expansion von NKG2C und HLA-C spezifischen KIR würde dementsprechend zur Proliferation (Aktivierung durch NKG2C) der NK-Gedächtniszellen führen und sie gleichzeitig vor dem AICD schützen (Bcl-2-Anstieg durch KIR). Sollten diese NK-Gedächtniszellen einen Sonderfall darstellen und wäre das NKG2C-Signal tatsächlich das dominante, dann würden HLA-E-positive Zellen eliminiert, also überwiegend HCMV-infizierte Zellen. Auf Tumorzellen, die HLA-E herabregulieren können diese NK-Gedächtniszellen jedoch nicht mehr adäquat reagieren und da sie den Großteil der NK-Zellgesamtpopulation ausmachen, wäre dies für den Betroffenen mit Sicherheit ein Selektionsnachteil. Eine Einzelfallstudie beleuchtet den Fall eines Jungen, mit überwiegend KIR2DL1<sup>+</sup>-NK-Zellen (neben einer NKG2C-Expansion kommt es in Folge einer HCMV-Infektion auch zu Expansionen inhibierender KIR, durch die das NK-Zellrezeptorrepertoire stark eingeschränkt wird), der seit seiner frühesten Kindheit immer wieder von schwerwiegenden Infektionskrankheiten heimgesucht wird, die auf eine unzureichende NK-Zellimmunität zurückzuführen sind (Gazit et al., 2004). Wenn Zellen des natürlichen Immunsystems Eigenschaften des adaptiven Immunsystems entwickeln, wie es im Fall der NK-Gedächtniszellen der Fall zu sein scheint, können schwerwiegende Probleme

entstehen. Die Expansion eines einzelnen, hoch spezialisierten NK-Zellklons, z.B. eine NKG2C<sup>+</sup>-NK-Gedächtniszelle, führt unweigerlich zu einem verminderten Reaktionspotential der NK-Zellgesamtpopulation. Wenn die Mehrheit der NK-Zellpopulation einer Person aus HCMV-spezifischen NK-Gedächtniszellen besteht, ist die Grundmenge der übrigen NK-Zellen mit einem vielfältigeren Rezeptorrepertoire stark reduziert. Im Fall einer Erkrankung, dauert es unverhältnismäßig lang, bis die benötigten NK-Zellen ihre Grundgesamtheit soweit erhöht haben, dass sie adäquat reagieren können. Da das angeborene Immunsystem aber gerade deshalb so wichtig ist, weil es normalerweise schnell reagieren kann, ist die Expansion HCMV-spezifischer NK-Gedächtniszellen kritisch zu bewerten (Manser & Uhrberg, 2016). Hinzu kommt die Tatsache, dass die zytokinvermittelte Aktivierung der NK-Gedächtniszellen gehemmt ist (L. L. Liu et al., 2016). Bei einer Expansion der NK-Gedächtniszellen um 60% würde das bedeuten, dass über die Hälfte der NK-Zellen der betroffenen Person für die Abwehr von Infektionskrankheiten, die keine HCMV-Infektion sind, ungeeignet wären.

Von den im ITZ untersuchten HCMV-seropositiven Blutspendern zeigen 26% eine NKG2C-Expansion. Bezogen auf die gesamte Kohorte (seronegative und seropositive) ergibt das einen Anteil von ca. 14%. Die Durchseuchung mit HCMV liegt in Deutschland bei ungefähr 50%. Wären die NKG2C-Expandierten NK-Zellen tatsächlich ein Selektionsvorteil, würde vermutlich eine höhere Gesamtzahl Träger dieser NK-Gedächtniszellen sein. Betrachtet man die Koexistenz der Sichelzellanämie und des Malariaerregers zeigt sich, dass in Malariagefährdeten Regionen bis zu 33% der Bevölkerung heterozygot für die Sichelzellanämie sind. In Gebieten ohne Malaria kommt die Sichelzellanämie hingegen so gut wie gar nicht vor. Vielleicht ist aber auch, bezogen auf HCMV, der Selektionsdruck in Deutschland nicht groß genug. Es wäre interessant zu wissen, wie die Verteilungen in anderen geographischen Gebieten aussehen, wo die Durchseuchung größer ist.

Es ist darüber hinaus denkbar, dass eine HCMV-Infektion zeitgeschichtlich gewisse Selektionsvorteile hatte, zu einem Zeitpunkt, als Infektionskrankheiten noch die häufigste Todesursache waren (in vielen Ländern ist dies heute noch der Fall). Ein Mausmodell konnte zeigen, dass, mit dem murinen CMV infizierte Mäuse, bei einer Zweitinfektion mit einem anderen Erreger, wegen einer höheren IFN- $\gamma$  Produktion (als Folge der MCMV-Infektion), eine höhere Makrophagenaktivität besaßen und dadurch die bessere Überlebensrate aufwiesen (Barton et al., 2007; Pawelec, 2014).

White et al., vertreten die Hypothese, dass Kinder, die sich bereits früh mit dem HCMV infizieren im späteren Leben seltener an Allergien leiden (White et al., 2012).

Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass eine HCMV-Infektion das Immunsystem stresst und es schneller altern lässt (Hanley & Bollard, 2014; Pawelec, 2014). Die HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulation steigt im Alter sukzessiv an. Das liegt möglicherweise daran, dass die Zellen seneszent werden (verkürzte Telomere) und ihre Funktionalität einbüßen, was durch eine größere Zellpopulation ausgeglichen werden soll (Pawelec, 2014). Ältere Menschen erkranken häufiger an tödlichen Lungenentzündungen. Diese könnten theoretisch durch eine HCMV-Reaktivierung ausgelöst werden. In diesem Fall wäre HCMV direkt für den Tod dieser Menschen verantwortlich. Allerdings gibt es diesbezüglich keine belastbaren Daten, da in diesen Fällen in der Regel keine detaillierte Diagnose gestellt wird (Hadrup et al., 2006; Pawelec, 2014). Eine fünf Jahre andauernde Studie mit Frauen zwischen 70 und 79 Jahren bestätigte jedoch eine dreifach höhere Mortalität, in der HCMV-seropositiven Kohorte (G. C. Wang et al., 2010).

Während der Generierungskultur entsteht der Eindruck, dass die sich entwickelnden NK-Zellen unter dem Einfluss des HCMV schneller reifen (signifikant größere Mengen NKG2A, CD16 und NKG2D im Vergleich zu der puren Kontrollkohorte). Dieses Phänomen wird auch nach Stammzelltransplantationen beobachtet (Della Chiesa et al., 2014a; Della Chiesa et al., 2012; Della Chiesa et al., 2013b). Hier kommt es zu einer rapiden NK-Zelldifferenzierung deren Produkte entweder NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen, oder im Fall einer *NKG2C*-Gendefizienz, CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>-</sup>KIR<sup>+</sup>-NK-Zellen sind. Eine beschleunigte Reifung könnte auch mit einer ebenfalls beschleunigten Alterung einhergehen, ähnlich wie in der *in vivo* Situation oben beschrieben. In diesem Fall wäre eine HCMV-Infektion, vor allem im höheren Lebensalter eine größere Gefährdung für den allgemeinen Gesundheitszustand als bisher angenommen. In diesem Fall wären nicht mehr nur die Immunsupprimierten oder Schwangeren von möglichen Konsequenzen einer HCMV-Infektion betroffen, sondern weit mehr (in Deutschland ca. jeder Zweite). Die Entwicklung und der Einsatz eines Impfstoffes wären eine sinnvolle, prophylaktische Maßnahme, die Missbildungen bei Neugeborenen reduzieren, die Therapie von Krebspatienten und nach Organtransplantationen vereinfachen und das durchschnittliche Lebensalter erhöhen würde.

## 4.9 Ausblick

In Zukunft wäre es wünschenswert, ein geeignetes *in vitro* Modell auch für die späte NK-Zelldifferenzierung zu etablieren. Allerdings gibt es für die Differenzierung der NK-Gedächtniszellen *in vitro* derzeit noch viele unbekannt Parameter. Der ideale Zeitpunkt, an dem die NK-Zellen von MSC auf andere Nährzellen umgesetzt werden sollten liegt genauso im

Dunkeln, wie die Antwort auf die Frage danach, wie die ideale sekundäre Nährzelle beschaffen sein sollte und welche Umweltfaktoren, wie Zytokine oder Chemokine, zusätzlich benötigt würden. Außerdem bliebe zu klären, welchen Einfluss andere Blutbestandteile, wie Monozyten (Rölle et al., 2014) oder dendritische Zellen (Andrews et al., 2001; Riegler et al., 2000; Rölle & Olweus, 2009) auf die Entwicklung von NK-Gedächtniszellen hätten. Darüber hinaus wird auch noch nicht verstanden, ob die NKG2C-Expansion durch die Proliferation bereits NKG2C-positiver Zellen (Rölle et al., 2014) oder durch vormals NKG2A-positiver Zellen (Wechselhypothese) entsteht. Ganz entscheidend und bisher unbeantwortet bleibt auch die Frage danach, ob die NKG2C-Expansion überhaupt ein verlässlicher Marker für die NK-Gedächtniszellen ist, oder ob es sich nicht viel mehr nur um einen von mehreren Oberflächenmarkern handelt (J. A. Wagner & Fehniger, 2016). Weiterhin birgt die Verwendung eines HCMV-Laborstamme natürlich auch die Gefahr, dass durch eine genetische Veränderung des Virus just diesem die Möglichkeit zur Stimulation der NKG2C-Expansion verloren gegangen ist.

Während eines Nachfolgeprojektes, könnte dieses, in dieser Arbeit beschriebene *in vitro* Modell erweitert werden, um auch die späteren NK-Zellentwicklungsschritte mit ihren spezifischen Interaktionspartnern untersuchen zu können (vergl. Abb. 36).

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>721.221</b>	humane B-Lymphoblastoide-Tumorzelllinie
<b>+</b>	positiv
<b>-</b>	negativ
<b>&lt;</b>	kleiner
<b>&gt;</b>	größer
<b>%</b>	Prozent
<b>&amp;</b>	und
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>‰</b>	Promille
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AD169</b>	hoch passagierter HCMV-Stamm
<b>ADCC</b>	antibody dependent cellular cytotoxicity
<b>AFT024</b>	immortalisierte murine Stromazelllinie
<b>AICD</b>	activation induced cell death
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>ALL</b>	Akute lymphatische Leukämie
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>APC-Cy7</b>	Allophycocyanin + cyanine dye
<b>Arg</b>	Arginin

<b>AS</b>	Aminosäure
<b>Asn</b>	Asparagin
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>B-LCL</b>	B-lymphoblastoid cell line
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>BUV</b>	Brilliant ultra violet
<b>Bv421/510</b>	Brilliant violet
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	zirka
<b>CCR</b>	CC-Chemokinrezeptor
<b>CD</b>	cluster of differentiation
<b>CFDA-SE</b>	Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
<b>c-KIT-Ligand/SCF</b>	stem cell factor
<b>CLP</b>	common lymphoid progenitor
<b>CMP</b>	common myeloid progenitor
<b>cmv</b>	cytomegalovirus
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CTL</b>	cytotoxic T lymphocyte
<b>CXCR</b>	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
<b>Da</b>	Dalton
<b>DC</b>	dendritic cells
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium

<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid
<b>dNK</b>	dezidualen NK
<b>dNTP</b>	Nukleotidtriphosphate
<b>DPBS</b>	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
<b>ds</b>	Doppelstrang
<b>E</b>	early
<b>EBV</b>	Epstein-Barr-Virus
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EL08</b>	murine embryonale Leberzelllinie
<b>engl.</b>	Englisch
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FasL</b>	Fas Ligand
<b>FBS</b>	Fötales Bovines Serum
<b>FC<math>\gamma</math>RIII</b>	fragment crystallisable gamma receptor 3
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>FLT-3-Ligand</b>	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
<b>FSC</b>	forward scatter
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>gC</b>	glycoprotein complex
<b>GMP</b>	Good Manufacturing Practice
<b>GvHD</b>	Graft versus Host Disease
<b>HAM</b>	Hamster
<b>HCMV</b>	human cytomegalovirus
<b>HHV5</b>	Humanes Herpesvirus 5

<b>HIV</b>	Humanen Immundefizienz-Virus
<b>HLA</b>	humanes Leukozytenantigen
<b>HSC</b>	hematopoietic stem cell
<b>HSCT</b>	Hematopoietic stem cell transplantation
<b>HSPC</b>	hematopoietic stem and progenitor cells
<b>HSV-1</b>	Herpes simplex Virus 1
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecule
<b>Id2</b>	inhibitor of DNA binding 2
<b>IE</b>	immediate early
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ILC</b>	innate lymphoid cells
<b>IL-R</b>	Interleukin-Rezeptor
<b>iNK</b>	immature NK-Zelle
<b>IRL</b>	internal repeat long
<b>ITAM</b>	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<b>ITIM</b>	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
<b>ITZ</b>	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, UKD
<b>k</b>	kilo
<b>k.a.</b>	keine Angaben
<b>K562</b>	humane myeloide Leukämiezellen
<b>kb</b>	kilobasen
<b>KIR</b>	Killer cell immunoglobulin like receptor

<b>KIR2DL</b>	KIR 2 immunglobulinähnliche Domänen long
<b>KIR2DS</b>	KIR 2 immunglobulinähnliche Domänen short
<b>KLRK1</b>	killer cell lectin like receptor K1
<b>KMT</b>	Knochenmarktransplantationen
<b>L</b>	late
<b>l</b>	Liter
<b>LFA-1</b>	Lymphocyte function-associated antigen 1
<b>LIR</b>	leukocyte inhibitory receptors
<b>LRC</b>	leucocyte receptor complex
<b>Lys</b>	Lysin
<b>M</b>	Mol
<b>mAb</b>	monoclonal antibody
<b>MACS</b>	magnetic cell separation
<b>MCMV</b>	murine cytomegalovirus
<b>Met</b>	Methionin
<b>MFI</b>	mean fluorescence intensity
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MHC</b>	major histcompatibility complex
<b>MIC</b>	MHC class I chain related
<b>MIE</b>	major IE
<b>Min.</b>	Minute
<b>mind.</b>	mindestens
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MNC</b>	mononuclear cells
<b>moDC</b>	monocyte derived dendritic cells

---

<b>MOI</b>	molecules of infection
<b>MRC-5</b>	humane Lungenfibroblastenzelllinie
<b>MSC</b>	mesenchymal stem cell
<b>NCAM</b>	neural cell adhesion molecule
<b>NCR</b>	natural cytotoxicity receptors
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NK-CTL</b>	NK cytolytic T lymphocyte
<b>NKG2</b>	natural killer cell group antigen 2
<b>NKT</b>	NK-ähnlichen T-Zellen
<b>NK-Zelle</b>	Natürliche Killerzelle
<b>nMFI</b>	normalized mean fluorescence intensity
<b>Ø</b>	Durchschnitt
<b>ORF</b>	open reading frame
<b>p</b>	Proteine
<b>p</b>	p-Wert
<b>PAMP</b>	pathogen-associated molecular pattern
<b>PAX-5</b>	Paired box protein 5
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononuclear cells
<b>PCD</b>	programmed cell death
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PD</b>	Privatdozent
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PE-Cy5/Cy7</b>	phycoerythrin + cyanine dye
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH</b>	potentia Hydrogenii

<b>PI</b>	Propidium Iodid
<b>pp</b>	Phosphoprotein
<b>pre</b>	vor
<b>pro</b>	vor
<b>Prof.</b>	Professor
<b>PRR</b>	pattern recognition receptor
<b>PVR</b>	Poliovirusrezeptor
<b>R-CB-X</b>	Ricarda cord blood #
<b>RNA</b>	ribonucleic acid
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s.</b>	siehe
<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>s.u.</b>	siehe unten
<b>SCF/c-KIT-Ligand</b>	stem cell factor
<b>SCT</b>	stem cell transplantation
<b>sog.</b>	sogenannt
<b>SOT</b>	solid organ transplantation
<b>SSC</b>	side scatter
<b>Std.</b>	Stunde
<b>TAP</b>	Transporter associated with antigen processing
<b>TB40/E</b>	HCMV-Stamm
<b>TC</b>	tissue coated
<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transforming growth factor $\beta$

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor alpha
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis inducing ligand
<b>U</b>	Unit
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UKD</b>	Universitätsklinikum Düsseldorf
<b>UL</b>	unique long
<b>UL1271</b>	HCMV-Patientenisolat
<b>ULBP</b>	UL16 Bindeprotein
<b>US</b>	unique short
<b>V</b>	Volt
<b>vergl.</b>	vergleiche
<b>vMIA</b>	viral mitochondrion-localized inhibitor of apoptosis
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>z.T.</b>	zum Teil
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem
<b><math>\beta_2m</math></b>	$\beta_2$ -Mikroglobulin

## Literaturverzeichnis

- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, *404*(6774), 193-197. doi:10.1038/35004599
- Albert, M. L., Sauter, B., & Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, *392*(6671), 86-89. doi:10.1038/32183
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle* (Vol. 4): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Ameres, S., Mautner, J., Schlott, F., Neuenhahn, M., Busch, D. H., Plachter, B., & Moosmann, A. (2013). Presentation of an immunodominant immediate-early CD8+ T cell epitope resists human cytomegalovirus immunoevasion. *PLoS Pathog*, *9*(5), e1003383. doi:10.1371/journal.ppat.1003383
- Amsler, L., Verweij, M. C., & DeFilippis, V. R. (2013). The tiers and dimensions of evasion of the type I interferon response by human cytomegalovirus. *J Mol Biol*, *425*(24), 4857-4871. doi:10.1016/j.jmb.2013.08.023
- Andersson, L. C., Nilsson, K., & Gahmberg, C. G. (1979). K562--a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer*, *23*(2), 143-147. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/367973>
- Andersson, S., Fauriat, C., Malmberg, J. A., Ljunggren, H. G., & Malmberg, K. J. (2009). KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood*, *114*(1), 95-104. doi:10.1182/blood-2008-10-184549
- Andrews, D. M., Andoniou, C. E., Granucci, F., Ricciardi-Castagnoli, P., & Degli-Esposti, M. A. (2001). Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat Immunol*, *2*(11), 1077-1084. doi:10.1038/ni724
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., . . . Vivier, E. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, *25*(2), 331-342. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013
- Arnon, T. I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., . . . Mandelboim, O. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol*, *6*(5), 515-523. doi:10.1038/ni1190
- Ashiru, O., Bennett, N. J., Boyle, L. H., Thomas, M., Trowsdale, J., & Wills, M. R. (2009). NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol*, *83*(23), 12345-12354. doi:10.1128/JVI.01175-09
- Atalay, R., Zimmermann, A., Wagner, M., Borst, E., Benz, C., Messerle, M., & Hengel, H. (2002). Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J Virol*, *76*(17), 8596-8608. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163579>
- ATCC. AD169. Retrieved from <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/VR-538.aspx#history>
- ATCC. MRC-5. Retrieved from [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-171.aspx?geo\\_country=de](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-171.aspx?geo_country=de)
- Baldick, C. J., Jr., & Shenk, T. (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol*, *70*(9), 6097-6105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709233>

- Barton, E. S., White, D. W., Cathelyn, J. S., Brett-McClellan, K. A., Engle, M., Diamond, M. S., . . . Virgin, H. W. t. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*, *447*(7142), 326-329. doi:10.1038/nature05762
- Battiwalla, M., Paplham, P., Almyroudis, N. G., McCarthy, A., Abdelhalim, A., Elefante, A., . . . Segal, B. H. (2007). Leflunomide failure to control recurrent cytomegalovirus infection in the setting of renal failure after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*, *9*(1), 28-32. doi:10.1111/j.1399-3062.2006.00170.x
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, *285*(5428), 727-729. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426993>
- Beninga, J., Kropff, B., & Mach, M. (1995). Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J Gen Virol*, *76* ( Pt 1), 153-160. doi:10.1099/0022-1317-76-1-153
- Bernink, J. H., Peters, C. P., Munneke, M., te Velde, A. A., Meijer, S. L., Weijer, K., . . . Spits, H. (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol*, *14*(3), 221-229. doi:10.1038/ni.2534
- Berrien-Elliott, M. M., Wagner, J. A., & Fehniger, T. A. (2015). Human Cytokine-Induced Memory-Like Natural Killer Cells. *J Innate Immun*, *7*(6), 563-571. doi:10.1159/000382019
- Beziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., . . . Vieillard, V. (2012). CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol*, *42*(2), 447-457. doi:10.1002/eji.201141826
- Beziat, V., Liu, L. L., Malmberg, J. A., Ivarsson, M. A., Sohlberg, E., Bjorklund, A. T., . . . Malmberg, K. J. (2013). NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood*, *121*(14), 2678-2688. doi:10.1182/blood-2012-10-459545
- Bissinger, A. L., Sinzger, C., Kaiserling, E., & Jahn, G. (2002). Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *J Med Virol*, *67*(2), 200-206. doi:10.1002/jmv.2208
- Bjorklund, A. T., Clancy, T., Goodridge, J. P., Beziat, V., Schaffer, M., Hovig, E., . . . Malmberg, K. J. (2016). Naive Donor NK Cell Repertoires Associated with Less Leukemia Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunol*, *196*(3), 1400-1411. doi:10.4049/jimmunol.1501434
- Blum, K. S., & Pabst, R. (2007). Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs? *Immunol Lett*, *108*(1), 45-51. doi:10.1016/j.imlet.2006.10.009
- Bodaghi, B., Jones, T. R., Zipeto, D., Vita, C., Sun, L., Laurent, L., . . . Michelson, S. (1998). Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med*, *188*(5), 855-866. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730887>
- Boeckh, M., & Ljungman, P. (2009). How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, *113*(23), 5711-5719. doi:10.1182/blood-2008-10-143560
- Borrego, F., Alonso, M. C., Galiani, M. D., Carracedo, J., Ramirez, R., Ostos, B., . . . Solana, R. (1999). NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol*, *34*(2), 253-265. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363791>

- Boyton, R. J., & Altmann, D. M. (2007). Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol*, 149(1), 1-8. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03424.x
- Brands, J. (2014). *Untersuchungen zur epigenetischen Regulation der KIR-Gene während der Entwicklung von natürlichen Killerzellen*. (Inaugural), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, ULB. Retrieved from <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=34773> Universitäts- und Landesbibliothek Publikationsservice database.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., . . . McMichael, A. J. (1998a). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 391(6669), 795-799. doi:10.1038/35869
- Braud, V. M., Allan, D. S., Wilson, D., & McMichael, A. J. (1998b). TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol*, 8(1), 1-10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427624>
- Britt, W. J., & Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*, 39(5-6), 401-412. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130049>
- Broers, A. E., van Der Holt, R., van Esser, J. W., Gratama, J. W., Henzen-Logmans, S., Kuenen-Boumeester, V., . . . Cornelissen, J. J. (2000). Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*, 95(7), 2240-2245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10733491>
- Brooks, C. R., Elliott, T., Parham, P., & Khakoo, S. I. (2006). The inhibitory receptor NKG2A determines lysis of vaccinia virus-infected autologous targets by NK cells. *J Immunol*, 176(2), 1141-1147. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434388>
- Brostjan, C., Bellon, T., Sobanov, Y., Lopez-Botet, M., & Hofer, E. (2002). Differential expression of inhibitory and activating CD94/NKG2 receptors on NK cell clones. *J Immunol Methods*, 264(1-2), 109-119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191515>
- Brown, D., Trowsdale, J., & Allen, R. (2004). The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens*, 64(3), 215-225. doi:10.1111/j.0001-2815.2004.00290.x
- Browne, E. P., Wing, B., Coleman, D., & Shenk, T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol*, 75(24), 12319-12330. doi:10.1128/JVI.75.24.12319-12330.2001
- Brune, W. (2011). Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus Res*, 157(2), 144-150. doi:10.1016/j.virusres.2010.10.012
- Bryceson, Y. T., Ljunggren, H. G., & Long, E. O. (2009). Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood*, 114(13), 2657-2666. doi:10.1182/blood-2009-01-201632
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., & Long, E. O. (2006). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, 214, 73-91. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x
- Burgess, S. J., Marusina, A. I., Pathmanathan, I., Borrego, F., & Coligan, J. E. (2006). IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *J Immunol*, 176(3), 1490-1497. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424177>

- BVL. (2007). Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung der HCMV-Laborstämme AD169 und Towne Retrieved from [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06\\_Gentechnik/ZKBS/01\\_Allgemeine\\_Stellungnahmen\\_deutsch/09\\_Viren/humane\\_Cytomegalovirus\\_Staemme\\_AD169\\_Towne.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=4](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/09_Viren/humane_Cytomegalovirus_Staemme_AD169_Towne.pdf?__blob=publicationFile&v=4)
- Caligiuri, M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, *112*(3), 461-469. doi:10.1182/blood-2007-09-077438
- Caligiuri, M. A., Murray, C., Robertson, M. J., Wang, E., Cochran, K., Cameron, C., . . . et al. (1993). Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest*, *91*(1), 123-132. doi:10.1172/JCI116161
- Caligiuri, M. A., Zmuidzinas, A., Manley, T. J., Levine, H., Smith, K. A., & Ritz, J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*, *171*(5), 1509-1526. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1692080>
- Campbell, J. J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K. E., Hodge, M. R., . . . Butcher, E. C. (2001). Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol*, *166*(11), 6477-6482. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359797>
- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., . . . Biassoni, R. (1999). Nkp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med*, *189*(5), 787-796. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049942>
- Carson, W. E., Giri, J. G., Lindemann, M. J., Linett, M. L., Ahdieh, M., Paxton, R., . . . Caligiuri, M. A. (1994a). Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med*, *180*(4), 1395-1403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523571>
- Carson, W. E., Haldar, S., Baiocchi, R. A., Croce, C. M., & Caligiuri, M. A. (1994b). The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(16), 7553-7557. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7519782>
- Carson, W. E., Lindemann, M. J., Baiocchi, R., Linett, M., Tan, J. C., Chou, C. C., . . . Caligiuri, M. A. (1995). The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood*, *85*(12), 3577-3585. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540068>
- Casalegno-Garduno, R., Schmitt, A., Yao, J., Wang, X., Xu, X., Freund, M., & Schmitt, M. (2010). Multimer technologies for detection and adoptive transfer of antigen-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother*, *59*(2), 195-202. doi:10.1007/s00262-009-0778-4
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., . . . Moretta, A. (2003). 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*, *100*(7), 4120-4125. doi:10.1073/pnas.0730640100
- Cha, T. A., Tom, E., Kemble, G. W., Duke, G. M., Mocarski, E. S., & Spaete, R. R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol*, *70*(1), 78-83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8523595>

- Chalupny, N. J., Rein-Weston, A., Dosch, S., & Cosman, D. (2006). Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun*, *346*(1), 175-181. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.092
- Chan, A., Hong, D. L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A. D., Buckley, C. D., . . . Bowness, P. (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*, *179*(1), 89-94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579025>
- Chang, W. L., & Barry, P. A. (2010). Attenuation of innate immunity by cytomegalovirus IL-10 establishes a long-term deficit of adaptive antiviral immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(52), 22647-22652. doi:10.1073/pnas.1013794108
- Chapman, T. L., Heikema, A. P., West, A. P., Jr., & Bjorkman, P. J. (2000). Crystal structure and ligand binding properties of the D1D2 region of the inhibitory receptor LIR-1 (ILT2). *Immunity*, *13*(5), 727-736. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114384>
- Chapman, T. L., Heikema, A. P., & Bjorkman, P. J. (1999). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity*, *11*(5), 603-613. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591185>
- Charoudeh, H. N., Terszowski, G., Czaja, K., Gonzalez, A., Schmitter, K., & Stern, M. (2013). Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by cytomegalovirus infection. *Eur J Immunol*, *43*(2), 480-487. doi:10.1002/eji.201242389
- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., & Lascrain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, *6*(1), 15-25. doi:10.1038/cmi.2009.3
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., . . . et al. (1990a). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, *154*, 125-169. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2161319>
- Chee, M. S., Satchwell, S. C., Preddie, E., Weston, K. M., & Barrell, B. G. (1990b). Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature*, *344*(6268), 774-777. doi:10.1038/344774a0
- Cichocki, F., Cooley, S., Davis, Z., DeFor, T. E., Schlums, H., Zhang, B., . . . Miller, J. S. (2016). CD56dimCD57+NKG2C+ NK cell expansion is associated with reduced leukemia relapse after reduced intensity HCT. *Leukemia*, *30*(2), 456-463. doi:10.1038/leu.2015.260
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., & Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, *6*(4), 443-446. doi:10.1038/74704
- Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., . . . Moss, P. A. (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med*, *202*(3), 379-386. doi:10.1084/jem.20040613
- Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T. L., . . . Miller, J. S. (2007). A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*, *110*(2), 578-586. doi:10.1182/blood-2006-07-036228
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001a). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, *22*(11), 633-640. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698225>
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Ponnappan, A., Mehta, V., Wewers, M. D., & Caligiuri, M. A. (2001b). Interleukin-1beta costimulates interferon-gamma production by human

- natural killer cells. *Eur J Immunol*, 31(3), 792-801. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241284>
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaeheri, B. A., Ghayur, T., . . . Caligiuri, M. A. (2001c). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 97(10), 3146-3151. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342442>
- Corrales-Aguilar, E., Hoffmann, K., & Hengel, H. (2014a). CMV-encoded Fcγ receptors: modulators at the interface of innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol*, 36(6), 627-640. doi:10.1007/s00281-014-0448-2
- Corrales-Aguilar, E., Trilling, M., Hunold, K., Fiedler, M., Le, V. T., Reinhard, H., . . . Hengel, H. (2014b). Human cytomegalovirus Fcγ binding proteins gp34 and gp68 antagonize Fcγ receptors I, II and III. *PLoS Pathog*, 10(5), e1004131. doi:10.1371/journal.ppat.1004131
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., & Hsu, M. L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*, 7(2), 273-282. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285411>
- Crouse, J., Xu, H. C., Lang, P. A., & Oxenius, A. (2015). NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends Immunol*, 36(1), 49-58. doi:10.1016/j.it.2014.11.001
- Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*, 15(2), 251-262. doi:10.1038/sj.cdd.4402244
- Cumano, A., & Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*, 25, 745-785. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141538
- Davignon, J. L., Clement, D., Alriquet, J., Michelson, S., & Davrinche, C. (1995). Analysis of the proliferative T cell response to human cytomegalovirus major immediate-early protein (IE1): phenotype, frequency and variability. *Scand J Immunol*, 41(3), 247-255. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7871384>
- de Rham, C., Hadaya, K., Bandelier, C., Ferrari-Lacraz, S., & Villard, J. (2014). Expression of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) by natural killer cells during acute CMV infection after kidney transplantation. *Transpl Immunol*, 31(3), 157-164. doi:10.1016/j.trim.2014.08.002
- Della Chiesa, M., Falco, M., Bertaina, A., Muccio, L., Alicata, C., Frassoni, F., . . . Moretta, A. (2014a). Human cytomegalovirus infection promotes rapid maturation of NK cells expressing activating killer Ig-like receptor in patients transplanted with NKG2C/- umbilical cord blood. *J Immunol*, 192(4), 1471-1479. doi:10.4049/jimmunol.1302053
- Della Chiesa, M., Falco, M., Muccio, L., Bertaina, A., Locatelli, F., & Moretta, A. (2013a). Impact of HCMV Infection on NK Cell Development and Function after HSCT. *Front Immunol*, 4, 458. doi:10.3389/fimmu.2013.00458
- Della Chiesa, M., Falco, M., Podesta, M., Locatelli, F., Moretta, L., Frassoni, F., & Moretta, A. (2012). Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood*, 119(2), 399-410. doi:10.1182/blood-2011-08-372003
- Della Chiesa, M., Marcenaro, E., Sivori, S., Carlomagno, S., Pesce, S., & Moretta, A. (2014b). Human NK cell response to pathogens. *Semin Immunol*, 26(2), 152-160. doi:10.1016/j.smim.2014.02.001
- Della Chiesa, M., Muccio, L., & Moretta, A. (2013b). CMV induces rapid NK cell maturation in HSCT recipients. *Immunol Lett*, 155(1-2), 11-13. doi:10.1016/j.imlet.2013.09.020
- Della Chiesa, M., Sivori, S., Carlomagno, S., Moretta, L., & Moretta, A. (2015). Activating KIRs and NKG2C in Viral Infections: Toward NK Cell Memory? *Front Immunol*, 6, 573. doi:10.3389/fimmu.2015.00573

- Devine, S. M., & Hoffman, R. (2000). Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*, 7(6), 358-363. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11055509>
- Dexter, T. M., Ponting, I. L., Roberts, R. A., Spooncer, E., Heyworth, C., & Gallagher, J. T. (1988). Growth and differentiation of hematopoietic stem cells. *Soc Gen Physiol Ser*, 43, 25-38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3077549>
- Dexter, T. M., & Spooncer, E. (1987). Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu Rev Cell Biol*, 3, 423-441. doi:10.1146/annurev.cb.03.110187.002231
- Dezell, S. A., Ahn, Y. O., Spanholtz, J., Wang, H., Weeres, M., Jackson, S., . . . Verneris, M. R. (2012). Natural killer cell differentiation from hematopoietic stem cells: a comparative analysis of heparin- and stromal cell-supported methods. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18(4), 536-545. doi:10.1016/j.bbmt.2011.11.023
- Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A. M., Hsia, J. K., Vivier, E., & Raulet, D. H. (2002). Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol*, 3(12), 1142-1149. doi:10.1038/ni858
- Djaoud, Z., David, G., Bressollette, C., Willem, C., Rettman, P., Gagne, K., . . . Retiere, C. (2013). Amplified NKG2C+ NK cells in cytomegalovirus (CMV) infection preferentially express killer cell Ig-like receptor 2DL: functional impact in controlling CMV-infected dendritic cells. *J Immunol*, 191(5), 2708-2716. doi:10.4049/jimmunol.1301138
- Doerr, H. W., & Gerlich, W. H. (2010). *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen* (Vol. 2): Thieme Verlag.
- Einsele, H., Hebart, H., Kauffmann-Schneider, C., Sinzger, C., Jahn, G., Bader, P., . . . Kanz, L. (2000). Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant*, 25(7), 757-763. doi:10.1038/sj.bmt.1702226
- Eiz-Vesper, B., Maecker-Kolhoff, B., & Blasczyk, R. (2012). Adoptive T-cell immunotherapy from third-party donors: characterization of donors and set up of a T-cell donor registry. *Front Immunol*, 3, 410. doi:10.3389/fimmu.2012.00410
- Elek, S. D., & Stern, H. (1974). Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet*, 1(7845), 1-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4128996>
- Elliott, J. M., Wahle, J. A., & Yokoyama, W. M. (2010). MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J Exp Med*, 207(10), 2073-2079. doi:10.1084/jem.20100986
- Elmaagacli, A. H., Steckel, N. K., Koldehoff, M., Hegerfeldt, Y., Trenchel, R., Ditschkowski, M., . . . Beelen, D. W. (2011). Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood*, 118(5), 1402-1412. doi:10.1182/blood-2010-08-304121
- Estefania, E., Gomez-Lozano, N., Portero, F., de Pablo, R., Solis, R., Sepulveda, S., . . . Vilches, C. (2007). Influence of KIR gene diversity on the course of HSV-1 infection: resistance to the disease is associated with the absence of KIR2DL2 and KIR2DS2. *Tissue Antigens*, 70(1), 34-41. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00844.x
- Farag, S. S., & Caligiuri, M. A. (2006). Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*, 20(3), 123-137. doi:10.1016/j.blre.2005.10.001
- Farnault, L., Chambost, H., Michel, G., Thuret, I., de Saint Basile, G., Fischer, A., . . . Olive, D. (2013). Persistence of natural killer cells with expansion of a hypofunctional CD56-CD16+KIR+NKG2C+ subset in a patient with atypical Janus kinase 3-deficient

- severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 131(4), 1230-1233, 1233 e1231-1232. doi:10.1016/j.jaci.2012.08.047
- Fehniger, T. A., Cooper, M. A., Nuovo, G. J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., & Caligiuri, M. A. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*, 101(8), 3052-3057. doi:10.1182/blood-2002-09-2876
- Fehniger, T. A., Shah, M. H., Turner, M. J., VanDeusen, J. B., Whitman, S. P., Cooper, M. A., . . . Caligiuri, M. A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol*, 162(8), 4511-4520. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10201989>
- Felices, M., Lenvik, T. R., Ankarlo, D. E., Foley, B., Curtsinger, J., Luo, X., . . . Miller, J. S. (2014). Functional NK cell repertoires are maintained through IL-2Ralpha and Fas ligand. *J Immunol*, 192(8), 3889-3897. doi:10.4049/jimmunol.1302601
- Fernandez-Messina, L., Reyburn, H. T., & Vales-Gomez, M. (2012). Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front Immunol*, 3, 299. doi:10.3389/fimmu.2012.00299
- Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S., & Raulet, D. H. (2005). A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*, 105(11), 4416-4423. doi:10.1182/blood-2004-08-3156
- Feuchtinger, T., Richard, C., Joachim, S., Scheible, M. H., Schumm, M., Hamprecht, K., . . . Lang, P. (2008). Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother*, 31(2), 199-206. doi:10.1097/CJI.0b013e31815ef862
- Finton, K. A., & Strong, R. K. (2012). Structural insights into activation of antiviral NK cell responses. *Immunol Rev*, 250(1), 239-257. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01168.x
- Fischer, J. C., Ottinger, H., Ferencik, S., Sribar, M., Punzel, M., Beelen, D. W., . . . Uhrberg, M. (2007). Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J Immunol*, 178(6), 3918-3923. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339492>
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E. K., . . . Miller, J. S. (2012a). Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. *J Immunol*, 189(10), 5082-5088. doi:10.4049/jimmunol.1201964
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., . . . Miller, J. S. (2012b). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*, 119(11), 2665-2674. doi:10.1182/blood-2011-10-386995
- Fortunato, E. A., & Spector, D. H. (1999). Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res*, 54, 61-128. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547675>
- Frank, I., & Friedman, H. M. (1989). A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *J Virol*, 63(11), 4479-4488. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2552134>
- Frenette, P. S., Pinho, S., Lucas, D., & Scheiermann, C. (2013). Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*, 31, 285-316. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095919

- Freud, A. G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H. C., Ferketich, A. K., Nuovo, G. J., . . . Caligiuri, M. A. (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity*, 22(3), 295-304. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.013
- Freud, A. G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M. T., Mao, H. C., Ferketich, A. K., & Caligiuri, M. A. (2006). Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*, 203(4), 1033-1043. doi:10.1084/jem.20052507
- Freud, A. G., Yu, J., & Caligiuri, M. A. (2014). Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin Immunol*, 26(2), 132-137. doi:10.1016/j.smim.2014.02.008
- Frey, M., Packianathan, N. B., Fehniger, T. A., Ross, M. E., Wang, W. C., Stewart, C. C., . . . Evans, S. S. (1998). Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol*, 161(1), 400-408. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9647249>
- Frohn, C., Schlenke, P., Ebel, B., Dannenberg, C., Bein, G., & Kirchner, H. (1998). DNA typing for natural killer cell inhibiting HLA-Cw groups NK1 and NK2 by PCR-SSP. *J Immunol Methods*, 218(1-2), 155-160. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819132>
- Fuji, S., Kapp, M., Grigoleit, G. U., & Einsele, H. (2011). Adoptive immunotherapy with virus-specific T cells. *Best Pract Res Clin Haematol*, 24(3), 413-419. doi:10.1016/j.beha.2011.06.003
- Fujita, Y., Leen, A. M., Sun, J., Nakazawa, Y., Yvon, E., Heslop, H. E., . . . Rooney, C. M. (2008a). Exploiting cytokine secretion to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother*, 31(7), 665-674. doi:10.1097/CJI.0b013e318181b4bd
- Fujita, Y., Rooney, C. M., & Heslop, H. E. (2008b). Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases. *Bone Marrow Transplant*, 41(2), 193-198. doi:10.1038/sj.bmt.1705906
- Gazit, R., Garty, B. Z., Monselise, Y., Hoffer, V., Finkelstein, Y., Markel, G., . . . Mandelboim, O. (2004). Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood*, 103(5), 1965-1966. doi:10.1182/blood-2003-11-3796
- Gerna, G., Percivalle, E., Baldanti, F., & Revello, M. G. (2002). Lack of transmission to polymorphonuclear leukocytes and human umbilical vein endothelial cells as a marker of attenuation of human cytomegalovirus. *J Med Virol*, 66(3), 335-339. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11793385>
- Gerna, G., Percivalle, E., Baldanti, F., Sozzani, S., Lanzarini, P., Genini, E., . . . Revello, M. G. (2000). Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol*, 74(12), 5629-5638. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823870>
- Gerna, G., Percivalle, E., Sarasini, A., Baldanti, F., Campanini, G., & Revello, M. G. (2003). Rescue of human cytomegalovirus strain AD169 tropism for both leukocytes and human endothelial cells. *J Gen Virol*, 84(Pt 6), 1431-1436. doi:10.1099/vir.0.19055-0
- Gerok, W. (2007). *Die Innere Medizin*
- Referenzwerk für den Facharzt* (Vol. 11): Schattauer
- Gibson, W. (2008). Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325, 187-204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18637507>
- Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., . . . Holowiecki, J. (2003). Survival advantage with KIR ligand incompatibility in

- hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*, 102(3), 814-819. doi:10.1182/blood-2003-01-0091
- Gilbert, G. L., Hayes, K., Hudson, I. L., & James, J. (1989). Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. Neonatal Cytomegalovirus Infection Study Group. *Lancet*, 1(8649), 1228-1231. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2566781>
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Plachter, B., & Greenberg, P. D. (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature*, 383(6602), 720-722. doi:10.1038/383720a0
- Gilbert, S. F. (2010). *Developmental Biology* (Vol. 9): Sinauer.
- Gilfillan, S., Ho, E. L., Cella, M., Yokoyama, W. M., & Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol*, 3(12), 1150-1155. doi:10.1038/ni857
- Gonczol, E., & Plotkin, S. (2001). Development of a cytomegalovirus vaccine: lessons from recent clinical trials. *Expert Opin Biol Ther*, 1(3), 401-412. doi:10.1517/14712598.1.3.401
- Gong, F., Song, S., Lv, G., Pan, Y., Zhang, D., & Jiang, H. (2012). Human leukocyte antigen E in human cytomegalovirus infection: friend or foe? *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 44(7), 551-554. doi:10.1093/abbs/gms032
- Goodrum, F., Jordan, C. T., Terhune, S. S., High, K., & Shenk, T. (2004). Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations. *Blood*, 104(3), 687-695. doi:10.1182/blood-2003-12-4344
- Gottschalk, L. R., Bray, R. A., Kaizer, H., & Gebel, H. M. (1990). Two populations of CD56 (Leu-19)+/CD16+ cells in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*, 5(4), 259-264. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1692496>
- Gretch, D. R., Kari, B., Rasmussen, L., Gehrz, R. C., & Stinski, M. F. (1988). Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. *J Virol*, 62(3), 875-881. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2828682>
- Griffiths. (2000). *Principles and Practice of Clinical Virology (chapter: Cytomegalovirus)* (J. E. B. A. J. Zuckerman, J. R. Pattison Ed.): John Wiley and Sons, London.
- Griffiths, P., Baraniak, I., & Reeves, M. (2015). The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol*, 235(2), 288-297. doi:10.1002/path.4437
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., & Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 419(6908), 734-738. doi:10.1038/nature01112
- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N., & Lopez-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, 104(12), 3664-3671. doi:10.1182/blood-2004-05-2058
- Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., & Lopez-Botet, M. (2006a). Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood*, 107(9), 3624-3631. doi:10.1182/blood-2005-09-3682
- Guma, M., Busch, L. K., Salazar-Fontana, L. I., Bellosillo, B., Morte, C., Garcia, P., & Lopez-Botet, M. (2005). The CD94/NKG2C killer lectin-like receptor constitutes an alternative activation pathway for a subset of CD8+ T cells. *Eur J Immunol*, 35(7), 2071-2080. doi:10.1002/eji.200425843
- Guma, M., Cabrera, C., Erkizia, I., Bofill, M., Clotet, B., Ruiz, L., & Lopez-Botet, M. (2006b). Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of

- NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J Infect Dis*, 194(1), 38-41. doi:10.1086/504719
- Hadrup, S. R., Strindhall, J., Kollgaard, T., Seremet, T., Johansson, B., Pawelec, G., . . . Wikby, A. (2006). Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. *J Immunol*, 176(4), 2645-2653. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456027>
- Hahn, G., Revello, M. G., Patrone, M., Percivalle, E., Campanini, G., Sarasini, A., . . . Gerna, G. (2004). Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol*, 78(18), 10023-10033. doi:10.1128/JVI.78.18.10023-10033.2004
- Halenius, A., Gerke, C., & Hengel, H. (2015). Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus: so many targets-but how many arrows in the quiver? *Cell Mol Immunol*, 12(2), 139-153. doi:10.1038/cmi.2014.105
- Hanley, P. J., & Bollard, C. M. (2014). Controlling cytomegalovirus: helping the immune system take the lead. *Viruses*, 6(6), 2242-2258. doi:10.3390/v6062242
- Harrison, C. J., Britt, W. J., Chapman, N. M., Mullican, J., & Tracy, S. (1995). Reduced congenital cytomegalovirus (CMV) infection after maternal immunization with a guinea pig CMV glycoprotein before gestational primary CMV infection in the guinea pig model. *J Infect Dis*, 172(5), 1212-1220. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7594656>
- He, H., Rinaldo, C. R., Jr., & Morel, P. A. (1995). T cell proliferative responses to five human cytomegalovirus proteins in healthy seropositive individuals: implications for vaccine development. *J Gen Virol*, 76 ( Pt 7), 1603-1610. doi:10.1099/0022-1317-76-7-1603
- Hengel, H., Brune, W., & Koszinowski, U. H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol*, 6(5), 190-197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614343>
- Heseler, K., Schmidt, S. K., Spekker, K., Sinzger, C., Sorg, R. V., Quambusch, M., . . . Daubener, W. (2013). Cytomegalovirus impairs the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antimicrobial and immunoregulatory effects in human fibroblasts. *PLoS One*, 8(5), e64442. doi:10.1371/journal.pone.0064442
- Hiby, S. E., Apps, R., Sharkey, A. M., Farrell, L. E., Gardner, L., Mulder, A., . . . Moffett, A. (2010). Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest*, 120(11), 4102-4110. doi:10.1172/JCI43998
- Hiby, S. E., Walker, J. J., O'Shaughnessy, K. M., Redman, C. W., Carrington, M., Trowsdale, J., & Moffett, A. (2004). Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*, 200(8), 957-965. doi:10.1084/jem.20041214
- Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G., & Koszinowski, U. H. (2000). Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J Virol*, 74(17), 7720-7729. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933677>
- Hornig, T., Bezbradica, J. S., & Medzhitov, R. (2007). NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol*, 8(12), 1345-1352. doi:10.1038/ni1524
- Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., & Bach, F. H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med*, 173(4), 1017-1020. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2007850>
- Huber, M. T., & Compton, T. (1998). The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J*

- Viol*, 72(10), 8191-8197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733861>
- Hughes, T., Briercheck, E. L., Freud, A. G., Trotta, R., McClory, S., Scoville, S. D., . . . Caligiuri, M. A. (2014). The transcription Factor AHR prevents the differentiation of a stage 3 innate lymphoid cell subset to natural killer cells. *Cell Rep*, 8(1), 150-162. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.042
- Inngjerdigen, M., Damaj, B., & Maghazachi, A. A. (2001). Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood*, 97(2), 367-375. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154210>
- Isaji, T., Sato, Y., Zhao, Y., Miyoshi, E., Wada, Y., Taniguchi, N., & Gu, J. (2006). N-glycosylation of the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit is essential for alpha5beta1 heterodimerization, expression on the cell surface, and its biological function. *J Biol Chem*, 281(44), 33258-33267. doi:10.1074/jbc.M607771200
- Jackson, S. E., Mason, G. M., & Wills, M. R. (2011). Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res*, 157(2), 151-160. doi:10.1016/j.virusres.2010.10.031
- Jacobs, J. P., Jones, C. M., & Baille, J. P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, 227(5254), 168-170. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4316953>
- Jacobs, R., Stoll, M., Stratmann, G., Leo, R., Link, H., & Schmidt, R. E. (1992). CD16-CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood*, 79(12), 3239-3244. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375847>
- Jean Beltran, P. M., & Cristea, I. M. (2014). The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 11(6), 697-711. doi:10.1586/14789450.2014.971116
- Jensen, H., Folkersen, L., & Skov, S. (2012). Regulation and gene expression profiling of NKG2D positive human cytomegalovirus-primed CD4+ T-cells. *PLoS One*, 7(8), e41577. doi:10.1371/journal.pone.0041577
- Joncker, N. T., Shifrin, N., Delebecque, F., & Raulet, D. H. (2010). Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J Exp Med*, 207(10), 2065-2072. doi:10.1084/jem.20100570
- Jones, T. R., & Sun, L. (1997). Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol*, 71(4), 2970-2979. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9060656>
- Jonjic, S., Pavic, I., Lucin, P., Rukavina, D., & Koszinowski, U. H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J Virol*, 64(11), 5457-5464. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1976821>
- Kahl, M., Siegel-Axel, D., Stenglein, S., Jahn, G., & Sinzger, C. (2000). Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains. *J Virol*, 74(16), 7628-7635. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906217>
- Kaiser, B. K., Barahmand-Pour, F., Paulsene, W., Medley, S., Geraghty, D. E., & Strong, R. K. (2005). Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol*, 174(5), 2878-2884. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728498>
- Kaiser, B. K., Pizarro, J. C., Kerns, J., & Strong, R. K. (2008). Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(18), 6696-6701. doi:10.1073/pnas.0802736105
- Kalejta, R. F. (2008). Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325, 101-115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18637502>

- Kared, H., Martelli, S., Ng, T. P., Pender, S. L., & Larbi, A. (2016). CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*, *65*(4), 441-452. doi:10.1007/s00262-016-1803-z
- Kärre, K. (1985). Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis. In R. Herberman (Ed.), *Mechanisms of Cytotoxicity by NK Cells* (Vol. 1, pp. 669): Academic Press.
- Kärre, K. (2002). NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol*, *55*(3), 221-228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940227>
- Kavathas, P., Bach, F. H., & DeMars, R. (1980). Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*(7), 4251-4255. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6933474>
- Kemp, K. C., Hows, J., & Donaldson, C. (2005). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Lymphoma*, *46*(11), 1531-1544. doi:10.1080/10428190500215076
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., & Wigzell, H. (1975a). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, *5*(2), 117-121. doi:10.1002/eji.1830050209
- Kiessling, R., Klein, E., & Wigzell, H. (1975b). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, *5*(2), 112-117. doi:10.1002/eji.1830050208
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y. J., Yang, L., . . . Yokoyama, W. M. (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, *436*(7051), 709-713. doi:10.1038/nature03847
- Kondo, M., Scherer, D. C., King, A. G., Manz, M. G., & Weissman, I. L. (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, *11*(5), 520-526. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532393>
- Kondo, M., Weissman, I. L., & Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, *91*(5), 661-672. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393859>
- Kotenko, S. V., Saccani, S., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V., & Pestka, S. (2000). Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(4), 1695-1700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677520>
- Krzewski, K., & Strominger, J. L. (2008). The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol*, *20*(5), 597-605. doi:10.1016/j.ceb.2008.05.006
- Kuijpers, T. W., Baars, P. A., Dantin, C., van den Burg, M., van Lier, R. A., & Roosnek, E. (2008). Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood*, *112*(3), 914-915. doi:10.1182/blood-2008-05-157354
- Kunikata, T., Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Ushio, C., Yamauchi, H., . . . Kurimoto, M. (1998). Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *Cell Immunol*, *189*(2), 135-143. doi:10.1006/cimm.1998.1376
- La Rosa, C., & Diamond, D. J. (2012). The immune response to human CMV. *Future Virol*, *7*(3), 279-293. doi:10.2217/fvl.12.8
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., & Lembo, D. (2003). The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*, *98*(3), 269-297. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782241>
- Lanier, L. L. (2001). On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol*, *2*(1), 23-27. doi:10.1038/83130

- Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*, 9(5), 495-502. doi:10.1038/ni1581
- Lanier, L. L., Corliss, B., Wu, J., & Phillips, J. H. (1998a). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*, 8(6), 693-701. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9655483>
- Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C., & Phillips, J. H. (1998b). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*, 391(6668), 703-707. doi:10.1038/35642
- Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., & Phillips, J. H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 136(12), 4480-4486. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3086432>
- Lanier, L. L., & Phillips, J. H. (1996). Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today*, 17(2), 86-91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808056>
- Lauterbach, N., Wieten, L., Popeijus, H. E., Voorter, C. E., & Tilanus, M. G. (2015). HLA-E regulates NKG2C+ natural killer cell function through presentation of a restricted peptide repertoire. *Hum Immunol*, 76(8), 578-586. doi:10.1016/j.humimm.2015.09.003
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L., & Phillips, J. H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol*, 157(11), 4741-4745. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943374>
- Le Garff-Tavernier, M., Beziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., . . . Vieillard, V. (2010). Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*, 9(4), 527-535. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00584.x
- Lee, J., Zhang, T., Hwang, I., Kim, A., Nitschke, L., Kim, M., . . . Kim, S. (2015). Epigenetic modification and antibody-dependent expansion of memory-like NK cells in human cytomegalovirus-infected individuals. *Immunity*, 42(3), 431-442. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.013
- Lee, N., Goodlett, D. R., Ishitani, A., Marquardt, H., & Geraghty, D. E. (1998). HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol*, 160(10), 4951-4960. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590243>
- Lee, N., Ishitani, A., & Geraghty, D. E. (2010). HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes. *Eur J Immunol*, 40(8), 2308-2318. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20865824>
- Lehner, P. J., & Wilkinson, G. W. (2001). Cytomegalovirus: from evasion to suppression? *Nat Immunol*, 2(11), 993-994. doi:10.1038/ni1101-993
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*, 3(5), 361-370. doi:10.1038/nri1083
- Liu, L. L., Landskron, J., Ask, E. H., Enqvist, M., Sohlberg, E., Traherne, J. A., . . . Beziat, V. (2016). Critical Role of CD2 Co-stimulation in Adaptive Natural Killer Cell Responses Revealed in NKG2C-Deficient Humans. *Cell Rep*, 15(5), 1088-1099. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.005
- Liu, Y. N., Curtsinger, J., Donahue, P. R., Klaus, A., Optiz, G., Cooper, J., . . . Gehrz, R. C. (1993). Molecular analysis of the immune response to human cytomegalovirus glycoprotein B. I. Mapping of HLA-restricted helper T cell epitopes on gp93. *J Gen Virol*, 74 ( Pt 10), 2207-2214. doi:10.1099/0022-1317-74-10-2207

- Ljunggren, H. G., & Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, *11*(7), 237-244. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2201309>
- Llano, M., Guma, M., Ortega, M., Angulo, A., & Lopez-Botet, M. (2003). Differential effects of US2, US6 and US11 human cytomegalovirus proteins on HLA class Ia and HLA-E expression: impact on target susceptibility to NK cell subsets. *Eur J Immunol*, *33*(10), 2744-2754. doi:10.1002/eji.200324182
- Long, E. O., & Rajagopalan, S. (2002). Stress signals activate natural killer cells. *J Exp Med*, *196*(11), 1399-1402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461075>
- Lopez-Botet, M., Angulo, A., & Guma, M. (2004). Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection. *Tissue Antigens*, *63*(3), 195-203. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00210.x
- Lopez-Larrea, C., Suarez-Alvarez, B., Lopez-Soto, A., Lopez-Vazquez, A., & Gonzalez, S. (2008). The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med*, *14*(4), 179-189. doi:10.1016/j.molmed.2008.02.004
- Lopez-Verges, S., Milush, J. M., Schwartz, B. S., Pando, M. J., Jarjoura, J., York, V. A., . . . Lanier, L. L. (2011). Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(36), 14725-14732. doi:10.1073/pnas.1110900108
- Lozzio, B. B., & Lozzio, C. B. (1979). Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res*, *3*(6), 363-370. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/95026>
- Lozzio, C. B., & Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, *45*(3), 321-334. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/163658>
- Lu, X., Kondo, Y., Takamatsu, H., Ohata, K., Yamazaki, H., Takami, A., . . . Nakao, S. (2008). CD16+ CD56- NK cells in the peripheral blood of cord blood transplant recipients: a unique subset of NK cells possibly associated with graft-versus-leukemia effect. *Eur J Haematol*, *81*(1), 18-25. doi:10.1111/j.1600-0609.2008.01073.x
- Lun, M. T., Lorino, G., Gaeta, A., Dessy, P., Cipriani, P., Filadoro, P., . . . Mancini, C. (1986). In vitro interferon production: induction in human leukocytes after exposure to cytomegalovirus antigens. *Microbiologica*, *9*(4), 399-404. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3022110>
- Lutz, C. T., Karapetyan, A., Al-Attar, A., Shelton, B. J., Holt, K. J., Tucker, J. H., & Presnell, S. R. (2011). Human NK cells proliferate and die in vivo more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults. *J Immunol*, *186*(8), 4590-4598. doi:10.4049/jimmunol.1002732
- Machold, R. P., Wiertz, E. J., Jones, T. R., & Ploegh, H. L. (1997). The HCMV gene products US11 and US2 differ in their ability to attack allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains. *J Exp Med*, *185*(2), 363-366. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9016885>
- Mackay, I. R. (1970). Growing points of immunology. *Postgrad Med J*, *46*(534), 182-190. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4191794>
- Mackinnon, S., Thomson, K., Verfuether, S., Peggs, K., & Lowdell, M. (2008). Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus infection following allogeneic stem cell transplantation using virus-specific T cells. *Blood Cells Mol Dis*, *40*(1), 63-67. doi:10.1016/j.bcmd.2007.07.003
- Magri, G., Muntasell, A., Romo, N., Saez-Borderias, A., Pende, D., Geraghty, D. E., . . . Lopez-Botet, M. (2011). NKp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies. *Blood*, *117*(3), 848-856. doi:10.1182/blood-2010-08-301374

- Maher, S. G., Romero-Weaver, A. L., Scarzello, A. J., & Gamero, A. M. (2007). Interferon: cellular executioner or white knight? *Curr Med Chem*, *14*(12), 1279-1289. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504213>
- Mandelboim, O., Malik, P., Davis, D. M., Jo, C. H., Boyson, J. E., & Strominger, J. L. (1999). Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(10), 5640-5644. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10318937>
- Mandelboim, O., Reyburn, H. T., Vales-Gomez, M., Pazmany, L., Colonna, M., Borsellino, G., & Strominger, J. L. (1996). Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med*, *184*(3), 913-922. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9064351>
- Manjappa, S., Bhamidipati, P. K., Stokerl-Goldstein, K. E., DiPersio, J. F., Uy, G. L., Westervelt, P., . . . Romee, R. (2014). Protective effect of cytomegalovirus reactivation on relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia patients is influenced by conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*, *20*(1), 46-52. doi:10.1016/j.bbmt.2013.10.003
- Manser, A. R., & Uhrberg, M. (2016). Age-related changes in natural killer cell repertoires: impact on NK cell function and immune surveillance. *Cancer Immunol Immunother*, *65*(4), 417-426. doi:10.1007/s00262-015-1750-0
- Manser, A. R., Weinhold, S., & Uhrberg, M. (2015). Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol Rev*, *267*(1), 178-196. doi:10.1111/imr.12316
- Marsh, S. G., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D. E., Trowsdale, J., Middleton, D., . . . Wain, H. (2003). Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens*, *62*(1), 79-86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12859599>
- Martin, M. P., Gao, X., Lee, J. H., Nelson, G. W., Detels, R., Goedert, J. J., . . . Carrington, M. (2002). Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*, *31*(4), 429-434. doi:10.1038/ng934
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., . . . Fauci, A. S. (2005). Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(8), 2886-2891. doi:10.1073/pnas.0409872102
- McCullar, V., Oostendorp, R., Panoskaltzis-Mortari, A., Yun, G., Lutz, C. T., Wagner, J. E., & Miller, J. S. (2008). Mouse fetal and embryonic liver cells differentiate human umbilical cord blood progenitors into CD56-negative natural killer cell precursors in the absence of interleukin-15. *Exp Hematol*, *36*(5), 598-608. doi:10.1016/j.exphem.2008.01.001
- Meisel, R., Heseler, K., Nau, J., Schmidt, S. K., Leineweber, M., Pudelko, S., . . . Daubener, W. (2014). Cytomegalovirus infection impairs immunosuppressive and antimicrobial effector functions of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Mediators Inflamm*, *2014*, 898630. doi:10.1155/2014/898630
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., & Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, *103*(12), 4619-4621. doi:10.1182/blood-2003-11-3909
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., . . . Frenette, P. S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, *466*(7308), 829-834. doi:10.1038/nature09262

- Miksits, K., & Hahn, H. (2007). *Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (Vol. 3): Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Miller, J. S., Alley, K. A., & McGlave, P. (1994). Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34<sup>+</sup>7<sup>+</sup> NK progenitor. *Blood*, *83*(9), 2594-2601. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513206>
- Miller, J. S., Cooley, S., Parham, P., Farag, S. S., Verneris, M. R., McQueen, K. L., . . . Weisdorf, D. J. (2007). Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood*, *109*(11), 5058-5061. doi:10.1182/blood-2007-01-065383
- Miller, J. S., & McCullar, V. (2001). Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood*, *98*(3), 705-713. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468170>
- Miller, J. S., McCullar, V., Punzel, M., Lemischka, I. R., & Moore, K. A. (1999). Single adult human CD34<sup>(+)</sup>/Lin<sup>-</sup>/CD38<sup>(-)</sup> progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells. *Blood*, *93*(1), 96-106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864151>
- Min-Oo, G., Kamimura, Y., Hendricks, D. W., Nabekura, T., & Lanier, L. L. (2013). Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends Immunol*, *34*(6), 251-258. doi:10.1016/j.it.2013.02.005
- Mjosberg, J., Bernink, J., Peters, C., & Spits, H. (2012). Transcriptional control of innate lymphoid cells. *Eur J Immunol*, *42*(8), 1916-1923. doi:10.1002/eji.201242639
- Mjosberg, J. M., Trifari, S., Crellin, N. K., Peters, C. P., van Drunen, C. M., Piet, B., . . . Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol*, *12*(11), 1055-1062. doi:10.1038/ni.2104
- Mocarski, E. S., & Courcelle, C. T. (2001). *Fields Virology (chapter: Cytomegalovirus and their replication)* (D. Knipe & P. Howley Eds.): Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Mocikat, R., Braumuller, H., Gummy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., . . . Rocken, M. (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*, *19*(4), 561-569. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563320>
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2010). *Molekulare Virologie* (Vol. 3): Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Moingeon, P., Chang, H. C., Sayre, P. H., Clayton, L. K., Alcover, A., Gardner, P., & Reinherz, E. L. (1989). The structural biology of CD2. *Immunol Rev*, *111*, 111-144. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2576417>
- Monsivais-Urenda, A., Noyola-Cherpitel, D., Hernandez-Salinas, A., Garcia-Sepulveda, C., Romo, N., Baranda, L., . . . Gonzalez-Amaro, R. (2010). Influence of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire in children. *Eur J Immunol*, *40*(5), 1418-1427. doi:10.1002/eji.200939898
- Montaldo, E., Del Zotto, G., Della Chiesa, M., Mingari, M. C., Moretta, A., De Maria, A., & Moretta, L. (2013a). Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*, *83*(8), 702-713. doi:10.1002/cyto.a.22302
- Montaldo, E., Juelke, K., & Romagnani, C. (2015). Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *Eur J Immunol*, *45*(8), 2171-2182. doi:10.1002/eji.201545598

- Montaldo, E., Vacca, P., Moretta, L., & Mingari, M. C. (2013b). Understanding human NK cell differentiation: clues for improving the haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Lett*, *155*(1-2), 2-5. doi:10.1016/j.imlet.2013.09.022
- Montaldo, E., Vacca, P., Moretta, L., & Mingari, M. C. (2014). Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. *Semin Immunol*, *26*(2), 107-113. doi:10.1016/j.smim.2014.01.006
- Moorman, N. J., Cristea, I. M., Terhune, S. S., Rout, M. P., Chait, B. T., & Shenk, T. (2008). Human cytomegalovirus protein UL38 inhibits host cell stress responses by antagonizing the tuberous sclerosis protein complex. *Cell Host Microbe*, *3*(4), 253-262. doi:10.1016/j.chom.2008.03.002
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2000). Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis. *Immunol Today*, *21*(5), 228-234. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782054>
- Moretta, F., Petronelli, F., Lucarelli, B., Pitisci, A., Bertaina, A., Locatelli, F., . . . Montaldo, E. (2016). The generation of human innate lymphoid cells is influenced by the source of hematopoietic stem cells and by the use of G-CSF. *Eur J Immunol*, *46*(5), 1271-1278. doi:10.1002/eji.201546079
- Mori, T., Okamoto, S., Matsuoka, S., Yajima, T., Wakui, M., Watanabe, R., . . . Ikeda, Y. (2000). Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, *25*(7), 765-769. doi:10.1038/sj.bmt.1702227
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., . . . Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*, *463*(7280), 540-544. doi:10.1038/nature08636
- Muccio, L., Bertaina, A., Falco, M., Pende, D., Meazza, R., Lopez-Botet, M., . . . Della Chiesa, M. (2016). Analysis of memory-like natural killer cells in human cytomegalovirus-infected children undergoing alpha-beta+T and B cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Haematologica*, *101*(3), 371-381. doi:10.3324/haematol.2015.134155
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *51 Pt 1*, 263-273. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3472723>
- Munk, K. (2010). *Taschenlehrbuch Biologie Zoologie* (Vol. 1): Thieme.
- Muntasell, A., Magri, G., Pende, D., Angulo, A., & Lopez-Botet, M. (2010). Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. *Blood*, *115*(25), 5170-5179. doi:10.1182/blood-2009-11-256479
- Muntasell, A., Vilches, C., Angulo, A., & Lopez-Botet, M. (2013). Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: a different perspective of the host-pathogen interaction. *Eur J Immunol*, *43*(5), 1133-1141. doi:10.1002/eji.201243117
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie* (Vol. 7. Auflage): Springer Spektrum.
- Nagler, A., Lanier, L. L., & Phillips, J. H. (1990). Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J Exp Med*, *171*(5), 1527-1533. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2139697>
- Nesmith, J. D., & Pass, R. F. (1995). Cytomegalovirus Infection in Adolescents. *Adolesc Med*, *6*(1), 79-90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358303>
- Nguyen, K. B., Salazar-Mather, T. P., Dalod, M. Y., Van Deusen, J. B., Wei, X. Q., Liew, F. Y., . . . Biron, C. A. (2002). Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12,

- and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol*, 169(8), 4279-4287. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370359>
- Noriega, V., Redmann, V., Gardner, T., & Tortorella, D. (2012). Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol Res*, 54(1-3), 140-151. doi:10.1007/s12026-012-8304-8
- Novotny, J., Rigoutsos, I., Coleman, D., & Shenk, T. (2001). In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. *J Mol Biol*, 310(5), 1151-1166. doi:10.1006/jmbi.2001.4798
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., . . . Sata, T. (2003). Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol*, 77(15), 8541-8547. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857923>
- Olsson, J., Wikby, A., Johansson, B., Lofgren, S., Nilsson, B. O., & Ferguson, F. G. (2000). Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mech Ageing Dev*, 121(1-3), 187-201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164473>
- Oostendorp, R. A., Harvey, K. N., Kusadasi, N., de Bruijn, M. F., Saris, C., Ploemacher, R. E., . . . Dzierzak, E. A. (2002). Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood*, 99(4), 1183-1189. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830464>
- Orr, M. T., Murphy, W. J., & Lanier, L. L. (2010). 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol*, 11(4), 321-327. doi:10.1038/ni.1849
- Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 201-214. doi:10.1038/nri1570
- Pass, R. F. (1985). Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis*, 152(2), 243-248. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2993429>
- Pass, R. F. (2001). *Fields Virology (chapter: Cytomegalovirus)* (Knipe, D. Howley, P. ed.): Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Pass, R. F., Stagno, S., Britt, W. J., & Alford, C. A. (1983). Specific cell-mediated immunity and the natural history of congenital infection with cytomegalovirus. *J Infect Dis*, 148(6), 953-961. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6317773>
- Pawelec, G. (2014). Immunosenescence: role of cytomegalovirus. *Exp Gerontol*, 54, 1-5. doi:10.1016/j.exger.2013.11.010
- Peggs, K. S., Thomson, K., Samuel, E., Dyer, G., Armoogum, J., Chakraverty, R., . . . Lowdell, M. W. (2011). Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*, 52(1), 49-57. doi:10.1093/cid/ciq042
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., . . . Moretta, L. (1996). The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med*, 184(2), 505-518. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760804>
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., . . . Moretta, A. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp*

- Med*, 190(10), 1505-1516. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562324>
- Penfold, M. E., Dairaghi, D. J., Duke, G. M., Saederup, N., Mocarski, E. S., Kemble, G. W., & Schall, T. J. (1999). Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17), 9839-9844. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449781>
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., . . . Moretta, A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med*, 188(5), 953-960. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730896>
- Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y., & Fisher, P. B. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*, 22, 929-979. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622
- Petersdorf, E. W., Shuler, K. B., Longton, G. M., Spies, T., & Hansen, J. A. (1999). Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics*, 49(7-8), 605-612. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10369917>
- Petersen, L., Roug, A. S., Skovbo, A., Thyssen, A. H., Eskelund, C. W., & Hokland, M. E. (2009). The CD94/NKG2C-expressing NK cell subset is augmented in chronic lymphocytic leukemia patients with positive human cytomegalovirus serostatus. *Viral Immunol*, 22(5), 333-337. doi:10.1089/vim.2009.0032
- Pezzutto, A. U., T.; Burmester, G.-R. . (2007). *Taschenatlas der Immunologie* (Vol. 2): Georg Thieme Verlag
- Philippe, J., Louagie, H., Thierens, H., Vral, A., Cornelissen, M., & De Ridder, L. (1997). Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens. *Cytometry*, 29(3), 242-249. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9389441>
- Phillips, J. H., Hori, T., Nagler, A., Bhat, N., Spits, H., & Lanier, L. L. (1992). Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon,delta proteins. *J Exp Med*, 175(4), 1055-1066. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372642>
- Pietra, G., Romagnani, C., Mazzarino, P., Falco, M., Millo, E., Moretta, A., . . . Mingari, M. C. (2003). HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19), 10896-10901. doi:10.1073/pnas.1834449100
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814>
- Plachter, B., Sinzger, C., & Jahn, G. (1996). Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res*, 46, 195-261. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824701>
- Plotkin, S. A., Higgins, R., Kurtz, J. B., Morris, P. J., Campbell, D. A., Jr., Shope, T. C., . . . Dankner, W. M. (1994). Multicenter trial of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal transplant recipients. *Transplantation*, 58(11), 1176-1178. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7992358>
- Polic, B., Jonjic, S., Pavic, I., Crnkovic, I., Zorica, I., Hengel, H., . . . Koszinowski, U. H. (1996). Lack of MHC class I complex expression has no effect on spread and control of cytomegalovirus infection in vivo. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 2 ), 217-225. doi:10.1099/0022-1317-77-2-217

- Rajagopalan, S., & Long, E. O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*, *189*(7), 1093-1100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10190900>
- Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, *3*(10), 781-790. doi:10.1038/nri1199
- Raulet, D. H., & Vance, R. E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*, *6*(7), 520-531. doi:10.1038/nri1863
- Rauser, G., Einsele, H., Sinzger, C., Wernet, D., Kuntz, G., Assenmacher, M., . . . Topp, M. S. (2004). Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood*, *103*(9), 3565-3572. doi:10.1182/blood-2003-09-3056
- Reddehase, M. J., Balthesen, M., Rapp, M., Jonjic, S., Pavic, I., & Koszinowski, U. H. (1994). The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J Exp Med*, *179*(1), 185-193. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8270864>
- Reusing, S. B., Manser, A. R., Enczmann, J., Mulder, A., Claas, F. H., Carrington, M., . . . Uhrberg, M. (2015). Selective downregulation of HLA-C and HLA-E in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. doi:10.1111/bjh.13777
- Revello, M. G., Percivalle, E., Arbustini, E., Pardi, R., Sozzani, S., & Gerna, G. (1998). In vitro generation of human cytomegalovirus pp65 antigenemia, viremia, and leukoDNAemia. *J Clin Invest*, *101*(12), 2686-2692. doi:10.1172/JCI1633
- Revilleza, M. J., Wang, R., Mans, J., Hong, M., Natarajan, K., & Margulies, D. H. (2011). How the virus outsmarts the host: function and structure of cytomegalovirus MHC-I-like molecules in the evasion of natural killer cell surveillance. *J Biomed Biotechnol*, *2011*, 724607. doi:10.1155/2011/724607
- Riegler, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G., & Sinzger, C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, *81*(Pt 2), 393-399. doi:10.1099/0022-1317-81-2-393
- Rink, L., Kruse, A., & Haase, H. (2012). *Immunologie für Einsteiger: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*.
- Robertson, M. J., & Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, *76*(12), 2421-2438. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2265240>
- Rölle, A. (2015). Deciphering the biology of NKG2C+ Natural Killer cells. *Oncotarget*, *6*(24), 19930-19931. doi:10.18632/oncotarget.4468
- Rölle, A., & Olweus, J. (2009). Dendritic cells in cytomegalovirus infection: viral evasion and host countermeasures. *Apmis*, *117*(5-6), 413-426. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02449.x
- Rölle, A., Pollmann, J., Ewen, E. M., Le, V. T., Halenius, A., Hengel, H., & Cerwenka, A. (2014). IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J Clin Invest*, *124*(12), 5305-5316. doi:10.1172/JCI77440
- Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., . . . Ferlazzo, G. (2007). CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol*, *178*(8), 4947-4955. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404276>
- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., . . . Miller, J. (2013). NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*, *121*(18), 3599-3608. doi:10.1182/blood-2012-04-425397

- Romee, R., Schneider, S. E., Leong, J. W., Chase, J. M., Keppel, C. R., Sullivan, R. P., . . . Fehniger, T. A. (2012). Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*, *120*(24), 4751-4760. doi:10.1182/blood-2012-04-419283
- Romero, V., Azocar, J., Zuniga, J., Clavijo, O. P., Terreros, D., Gu, X., . . . Yunis, E. J. (2008). Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome. *Mol Immunol*, *45*(9), 2429-2436. doi:10.1016/j.molimm.2008.01.002
- Rossini, G., Cerboni, C., Santoni, A., Landini, M. P., Landolfo, S., Gatti, D., . . . Varani, S. (2012). Interplay between human cytomegalovirus and intrinsic/innate host responses: a complex bidirectional relationship. *Mediators Inflamm*, *2012*, 607276. doi:10.1155/2012/607276
- Rouas-Freiss, N., Goncalves, R. M., Menier, C., Dausset, J., & Carosella, E. D. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(21), 11520-11525. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326642>
- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C., & Huebner, R. J. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med*, *92*(2), 418-424. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13350367>
- Rubie, H., Attal, M., Campardou, A. M., Gayet-Mengelle, C., Payen, C., Sanguignol, F., . . . et al. (1993). Risk factors for cytomegalovirus infection in BMT recipients transfused exclusively with seronegative blood products. *Bone Marrow Transplant*, *11*(3), 209-214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385522>
- Ruggeri, L., Aversa, F., Martelli, M. F., & Velardi, A. (2006). Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev*, *214*, 202-218. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00455.x
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., . . . Velardi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, *94*(1), 333-339. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381530>
- Ruutu, P., Ruutu, T., Volin, L., Tukiainen, P., Ukkonen, P., & Hovi, T. (1990). Cytomegalovirus is frequently isolated in bronchoalveolar lavage fluid of bone marrow transplant recipients without pneumonia. *Ann Intern Med*, *112*(12), 913-916. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2160216>
- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T., & Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*, *5*(2), 103-114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8769474>
- Sawa, S., Cherrier, M., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Fehling, H. J., Langa, F., . . . Eberl, G. (2010). Lineage relationship analysis of RORgammat+ innate lymphoid cells. *Science*, *330*(6004), 665-669. doi:10.1126/science.1194597
- Sayers, M. H., Anderson, K. C., Goodnough, L. T., Kurtz, S. R., Lane, T. A., Pisciotto, P., & Silberstein, L. E. (1992). Reducing the risk for transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Ann Intern Med*, *116*(1), 55-62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1309201>
- Schellekens, J., Rozemuller, E. H., Petersen, E. J., van den Tweel, J. G., Verdonck, L. F., & Tilanus, M. G. (2008). Patients benefit from the addition of KIR repertoire data to the donor selection procedure for unrelated haematopoietic stem cell transplantation. *Mol Immunol*, *45*(4), 981-989. doi:10.1016/j.molimm.2007.07.040
- Schmitt, A., Tonn, T., Busch, D. H., Grigoleit, G. U., Einsele, H., Odendahl, M., . . . Schmitt, M. (2011). Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected

- cytomegalovirus-specific CD8+ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion*, 51(3), 591-599. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02940.x
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1-2), 7-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/747780>
- Schonberg, K., Fischer, J. C., Kogler, G., & Uhrberg, M. (2011). Neonatal NK-cell repertoires are functionally, but not structurally, biased toward recognition of self HLA class I. *Blood*, 117(19), 5152-5156. doi:10.1182/blood-2011-02-334441
- Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J. C., & Uhrberg, M. (2011). Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood*, 117(1), 98-107. doi:10.1182/blood-2010-03-273656
- Schust, D. J., Tortorella, D., Seebach, J., Phan, C., & Ploegh, H. L. (1998). Trophoblast class I major histocompatibility complex (MHC) products are resistant to rapid degradation imposed by the human cytomegalovirus (HCMV) gene products US2 and US11. *J Exp Med*, 188(3), 497-503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687527>
- Seidel, E., Le, V. T., Bar-On, Y., Tsukerman, P., Enk, J., Yamin, R., . . . Mandelboim, O. (2015). Dynamic Co-evolution of Host and Pathogen: HCMV Downregulates the Prevalent Allele MICA \*008 to Escape Elimination by NK Cells. *Cell Rep*. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.029
- Shah, M. H., Baiocchi, R. A., Fehniger, T. A., Khatri, V. P., Gould, M., Poiesz, B., . . . Caligiuri, M. A. (2000). Cytokine replacement in patients with HIV-1 non-Hodgkin's lymphoma: the rationale for low-dose interleukin-2 therapy. *Cancer J Sci Am*, 6 Suppl 1, S45-51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685658>
- Sharon-Friling, R., Goodhouse, J., Colberg-Poley, A. M., & Shenk, T. (2006). Human cytomegalovirus pUL37x1 induces the release of endoplasmic reticulum calcium stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(50), 19117-19122. doi:10.1073/pnas.0609353103
- Shestopalov, I. A., & Zon, L. I. (2012). Stem cells: The right neighbour. *Nature*, 481(7382), 453-455. doi:10.1038/481453a
- Shilling, H. G., McQueen, K. L., Cheng, N. W., Shizuru, J. A., Negrin, R. S., & Parham, P. (2003). Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 101(9), 3730-3740. doi:10.1182/blood-2002-08-2568
- Shimizu, Y., & DeMars, R. (1989). Production of human cells expressing individual transferred HLA-A,-B,-C genes using an HLA-A,-B,-C null human cell line. *J Immunol*, 142(9), 3320-3328. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2785140>
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*, 32(6), 1380-1389. doi:10.1002/stem.1661
- Simpson, R. J., Lowder, T. W., Spielmann, G., Bigley, A. B., LaVoy, E. C., & Kunz, H. (2012). Exercise and the aging immune system. *Ageing Res Rev*, 11(3), 404-420. doi:10.1016/j.arr.2012.03.003
- Singh, R., Kaul, R., Kaul, A., & Khan, K. (2007). A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol*, 13(12), 1770-1787. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17465466>
- Sinzger, C., Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K. L., Messerle, M., . . . Adler, B. (2008). Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain

- derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J Gen Virol*, 89(Pt 2), 359-368. doi:10.1099/vir.0.83286-0
- Sinzger, C., & Jahn, G. (1996). Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology*, 39(5-6), 302-319. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130041>
- Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B., & Jahn, G. (2000). Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol*, 81(Pt 12), 3021-3035. doi:10.1099/0022-1317-81-12-3021
- Sinzger, C., Plachter, B., Grefte, A., The, T. H., & Jahn, G. (1996). Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *J Infect Dis*, 173(1), 240-245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8537667>
- Slavuljica, I., Krmpotic, A., & Jonjic, S. (2011). Manipulation of NKG2D ligands by cytomegaloviruses: impact on innate and adaptive immune response. *Front Immunol*, 2, 85. doi:10.3389/fimmu.2011.00085
- Spielmann, G., Bollard, C. M., Bigley, A. B., Hanley, P. J., Blaney, J. W., LaVoy, E. C., . . . Simpson, R. J. (2014). The effects of age and latent cytomegalovirus infection on the redeployment of CD8+ T cell subsets in response to acute exercise in humans. *Brain Behav Immun*, 39, 142-151. doi:10.1016/j.bbi.2013.05.003
- Spits, H., & Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol*, 30, 647-675. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075053
- Sprague, E. R., Wang, C., Baker, D., & Bjorkman, P. J. (2006). Crystal structure of the HSV-1 Fc receptor bound to Fc reveals a mechanism for antibody bipolar bridging. *PLoS Biol*, 4(6), e148. doi:10.1371/journal.pbio.0040148
- Stagno, S., Pass, R. F., Cloud, G., Britt, W. J., Henderson, R. E., Walton, P. D., . . . Alford, C. A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *Jama*, 256(14), 1904-1908. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3020264>
- Stewart, C. A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., . . . Vivier, E. (2005). Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(37), 13224-13229. doi:10.1073/pnas.0503594102
- Storkus, W. J., Howell, D. N., Salter, R. D., Dawson, J. R., & Cresswell, P. (1987). NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J Immunol*, 138(6), 1657-1659. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3819393>
- Stratta, R. J., Wood, R. P., Langnas, A. N., Duckworth, R. M., Shaefer, M. S., Marujo, W., . . . Shaw, B. W., Jr. (1990). Donor selection for orthotopic liver transplantation: lack of an effect of gender or cytomegalovirus (CMV) status. *Transplant Proc*, 22(2), 410-413. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2158164>
- Sullivan, L. C., Clements, C. S., Beddoe, T., Johnson, D., Hoare, H. L., Lin, J., . . . Brooks, A. G. (2007). The heterodimeric assembly of the CD94-NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen-E recognition. *Immunity*, 27(6), 900-911. doi:10.1016/j.immuni.2007.10.013
- Sun, J. C., Lopez-Verges, S., Kim, C. C., DeRisi, J. L., & Lanier, L. L. (2011). NK cells and immune "memory". *J Immunol*, 186(4), 1891-1897. doi:10.4049/jimmunol.1003035
- Suto, Y., Yabe, T., Maenaka, K., Tokunaga, K., Tadokoro, K., & Juji, T. (1997). The human natural killer gene complex (NKC) is located on chromosome 12p13.1-p13.2. *Immunogenetics*, 46(2), 159-162. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9162104>

- Terhune, S., Torigoi, E., Moorman, N., Silva, M., Qian, Z., Shenk, T., & Yu, D. (2007). Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis. *J Virol*, *81*(7), 3109-3123. doi:10.1128/JVI.02124-06
- Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., & Santoni, A. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*, *15*(10), 479-483. doi:10.1016/0167-5699(94)90193-7
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*, *16*(2), 139-144. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636884>
- Tomasec, P., Braud, V. M., Rickards, C., Powell, M. B., McSharry, B. P., Gadola, S., . . . Wilkinson, G. W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*, *287*(5455), 1031. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669413>
- Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., & Guinan, E. C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, *75*(3), 389-397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9
- Uhrberg, M. (2005). The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia*, *19*(5), 707-709. doi:10.1038/sj.leu.2403705
- Uhrberg, M., Parham, P., & Wernet, P. (2002). Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*, *54*(4), 221-229. doi:10.1007/s00251-002-0463-7
- Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., . . . Parham, P. (1997). Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, *7*(6), 753-763. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430221>
- Ulbrecht, M., Martinozzi, S., Grzeschik, M., Hengel, H., Ellwart, J. W., Pla, M., & Weiss, E. H. (2000). Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol*, *164*(10), 5019-5022. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799855>
- Upshaw, J. L., Arneson, L. N., Schoon, R. A., Dick, C. J., Billadeau, D. D., & Leibson, P. J. (2006). NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol*, *7*(5), 524-532. doi:10.1038/ni1325
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H. T., Erskine, R. A., Lopez-Botet, M., & Strominger, J. L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo j*, *18*(15), 4250-4260. doi:10.1093/emboj/18.15.4250
- Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., . . . Parham, P. (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, *7*(6), 739-751. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430220>
- van Hall, T., Oliveira, C. C., Joosten, S. A., & Ottenhoff, T. H. (2010). The other Janus face of Qa-1 and HLA-E: diverse peptide repertoires in times of stress. *Microbes Infect*, *12*(12-13), 910-918. doi:10.1016/j.micinf.2010.07.011
- Volz, A., Wende, H., Laun, K., & Ziegler, A. (2001). Genesis of the ILT/LIR/MIR clusters within the human leukocyte receptor complex. *Immunol Rev*, *181*, 39-51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11513150>
- Voraberger, G., Schafer, R., & Stratowa, C. (1991). Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by

- cytokines and phorbol ester. *J Immunol*, 147(8), 2777-2786. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1680919>
- Voskoboinik, I., Dunstone, M. A., Baran, K., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2010). Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev*, 235(1), 35-54. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00896.x
- Wagner, C. S., Ljunggren, H. G., & Achour, A. (2008). Immune modulation by the human cytomegalovirus-encoded molecule UL18, a mystery yet to be solved. *J Immunol*, 180(1), 19-24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096997>
- Wagner, J. A., & Fehniger, T. A. (2016). Human Adaptive Natural Killer Cells: Beyond NKG2C. *Trends Immunol*, 37(6), 351-353. doi:10.1016/j.it.2016.05.001
- Wallach, D., Fellous, M., & Revel, M. (1982). Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells. *Nature*, 299(5886), 833-836. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6290893>
- Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., & Riddell, S. R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med*, 333(16), 1038-1044. doi:10.1056/NEJM199510193331603
- Wang, E. C., McSharry, B., Retiere, C., Tomasec, P., Williams, S., Borysiewicz, L. K., . . . Wilkinson, G. W. (2002). UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7570-7575. doi:10.1073/pnas.112680099
- Wang, G. C., Kao, W. H., Murakami, P., Xue, Q. L., Chiou, R. B., Detrick, B., . . . Fried, L. P. (2010). Cytomegalovirus infection and the risk of mortality and frailty in older women: a prospective observational cohort study. *Am J Epidemiol*, 171(10), 1144-1152. doi:10.1093/aje/kwq062
- Wang, K. S., Frank, D. A., & Ritz, J. (2000). Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*, 95(10), 3183-3190. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807786>
- White, D. W., Suzanne Beard, R., & Barton, E. S. (2012). Immune modulation during latent herpesvirus infection. *Immunol Rev*, 245(1), 189-208. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01074.x
- Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogoyo, M., Geuze, H. J., & Ploegh, H. L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*, 84(5), 769-779. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8625414>
- Wilkinson, G. W., Tomasec, P., Stanton, R. J., Armstrong, M., Prod'homme, V., Aichelner, R., . . . Davison, A. J. (2008). Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol*, 41(3), 206-212. doi:10.1016/j.jcv.2007.10.027
- Wilson, M. J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., . . . Trowsdale, J. (2000). Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4778-4783. doi:10.1073/pnas.080588597
- Winston, D. J., Ho, W. G., Bartoni, K., Du Mond, C., Ebeling, D. F., Buhles, W. C., & Champlin, R. E. (1993). Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Results of a placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Intern Med*, 118(3), 179-184. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380243>
- Winter, C. C., & Long, E. O. (1997). A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol*, 158(9), 4026-4028. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126959>

- Wu, M. F., & Raulet, D. H. (1997). Class I-deficient hemopoietic cells and nonhemopoietic cells dominantly induce unresponsiveness of natural killer cells to class I-deficient bone marrow cell grafts. *J Immunol*, *158*(4), 1628-1633. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9029098>
- Wu, Z., Sinzger, C., Frascaroli, G., Reichel, J., Bayer, C., Wang, L., . . . Mertens, T. (2013). Human cytomegalovirus-induced NKG2C(hi) CD57(hi) natural killer cells are effectors dependent on humoral antiviral immunity. *J Virol*, *87*(13), 7717-7725. doi:10.1128/JVI.01096-13
- Yang, Z., & Bjorkman, P. J. (2008). Structure of UL18, a peptide-binding viral MHC mimic, bound to a host inhibitory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(29), 10095-10100. doi:10.1073/pnas.0804551105
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A. M., Partheniou, F., & Parham, P. (2006). Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*, *203*(3), 633-645. doi:10.1084/jem.20051884
- Yokoyama, W. M. (1993). Recognition structures on natural killer cells. *Curr Opin Immunol*, *5*(1), 67-73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8452676>
- Yokoyama, W. M., & Kim, S. (2006). How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity*, *24*(3), 249-257. doi:10.1016/j.immuni.2006.03.006
- Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(1), 47-59. doi:10.1038/nrm2308
- Yu, J., Freud, A. G., & Caligiuri, M. A. (2013). Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*, *34*(12), 573-582. doi:10.1016/j.it.2013.07.005
- Zafirova, B., Wensveen, F. M., Gulin, M., & Polic, B. (2011). Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell Mol Life Sci*, *68*(21), 3519-3529. doi:10.1007/s00018-011-0797-0
- Zanghellini, F., Boppana, S. B., Emery, V. C., Griffiths, P. D., & Pass, R. F. (1999). Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis*, *180*(3), 702-707. doi:10.1086/314939
- Zhang, Y., Lazaro, A. M., Lavingia, B., & Stastny, P. (2001). Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol*, *62*(6), 620-631. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390037>
- Zheng, Q., Tao, R., Gao, H., Xu, J., Shang, S., & Zhao, N. (2012). HCMV-encoded UL128 enhances TNF-alpha and IL-6 expression and promotes PBMC proliferation through the MAPK/ERK pathway in vitro. *Viral Immunol*, *25*(2), 98-105. doi:10.1089/vim.2011.0064
- Zhu, H., Cong, J. P., Mamtora, G., Gingeras, T., & Shenk, T. (1998). Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(24), 14470-14475. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826724>
- Zhu, H., Cong, J. P., & Shenk, T. (1997). Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(25), 13985-13990. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9391139>
- Zwirner, N. W., Fuertes, M. B., Girart, M. V., Domaica, C. I., & Rossi, L. E. (2007). Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev*, *18*(1-2), 159-170. doi:10.1016/j.cytogr.2007.01.013

## Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei allen bedanken, die mich in dieser intensiven, manchmal schwierigen, spannenden, schönen, arbeitsreichen, lustigen und nervenaufreibenden Zeit unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Markus Uhrberg, der mir die Möglichkeit gegeben hat an einem hochinteressanten und interdisziplinären Thema zu forschen. Danke für die Betreuung meiner Promotion und das du mit deiner konstruktiven Kritik meine Arbeit stets vorangebracht hast.

Außerdem möchte mich bei Prof. Dr. Thomas Klein aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät für die Übernahme des Korreferats und der Mentorenschaft bedanken.

Ohne die finanzielle Förderung der Jürgen-Manchot-Stiftung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei unseren Virologen bedanken: Bei Prof. Dr. Hartmut Hengel und seinen Mädels, die mich während meines Praktikums in Freiburg sehr herzlich aufgenommen haben; bei Prof. Dr. Jörg Timm und Prof. Dr. Ingo Drexler die einer Kooperation mit dem ITZ zugestimmt haben; ganz besonders bei PD Dr. Albert Zimmermann der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und bei Tina, Janine und Christine für die netten Plaudereien während der Inkubationszeiten.

Vielen Dank auch an die Manchot Graduiertenschule "Molecules of infection II", die mich als assoziiertes Mitglied aufgenommen hat und von deren vielfältigem Förderprogramm ich sicherlich profitieren werde. Hier möchte ich vor allem die unermüdliche Arbeit von Inge und die wirklich netten Kommilitonen hervorheben.

Ich bedanke mich für die Unterstützung der Mitarbeiter der Kinderklinik, besonders Dr. Özer Degistirici und Prof. Dr. Roland Meisel, die mir ihre MSC zur Verfügung gestellt haben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Gesine Kögler für die vielen Nabelschnurblute, die sie mir überlassen hat.

Vielen Dank an die besten Kolleginnen, die man sich wünschen kann: Angela, Nadine, Katharina, Maryam, Sandra, Sarah und Xiaoyi. Mit diesem Team an meiner Seite konnte ich auch die schlimmsten Arbeitstage (wenn sich beispielsweise der CyAn mal wieder verweigerte; Katharina, was wären wir nur ohne deine heilenden Hände?) verschmerzen. Das schönste aber, was bei der Arbeit passieren kann, ist, wenn aus Kolleginnen Freundinnen werden. Mädels, was hatten wir in den letzten drei Jahren für einen Spaß zusammen! Und was haben wir miteinander gelitten.

Vielen Dank an meine ganze Familie, die dem Ende meiner Studienzeit gespannt endgegengefiebert hat.

Meinen Eltern gilt mein besonderer Dank, weil sie alle meine (beruflichen) Entscheidungen immer respektiert und unterstützt haben. Ihr hattet immer ein Auge darauf, dass ich genug esse und krankenversichert bin, dass mein Auto immer ausreichend Sprit im Tank hat und ich ordentlich angezogen bin. Ihr habt mich immer ermutigt meinen eigenen Weg zu gehen und

mich aufgebaut, wenn es mal nicht so lief. Ich wäre nicht da, wo ich heute bin, ohne euch.  
Danke!

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Tobi. Danke, dass du alle Höhen und Tiefen der letzten 11 Jahre mit mir geteilt hast und dich unerschrocken dazu bereit erklärt hast dies auch weiterhin und bis an unser Lebensende zu tun. Danke für deine Durchhalteparolen, deine Gelassenheit und dein Vertrauen in mich.

Liebe Lisa, danke für deine Freundschaft, danke für die vielen kleinen Auszeiten vom Laborwahnsinn, danke für's Schleppe tragen, danke für deine aufmunternden Worte immer dann, wenn ich sie brauchte, danke für dein Vertrauen. Danke, dass es dich gibt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass diese Dissertation von mir selbständig und unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet worden sind. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich diese Dissertation in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Düsseldorf, den 27.10.2016

Ricarda Ising