

Charakterisierung von CMV-assoziierten NKG2C⁺ NK-Zellen und deren Einfluss auf antivirale Immunität

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Ralf Grutza

aus Langenfeld

Düsseldorf, Oktober 2021

aus dem Institut für Virologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Jörg Timm

2. Prof. Dr. Philipp Lang

Tag der mündlichen Prüfung:

17.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	- 1 -
Summary	- 4 -
1 Einleitung	- 7 -
1.1 Das humane Cytomegalovirus	- 7 -
1.1.1 Prävalenz, Krankheitsverlauf & Therapie	- 7 -
1.1.2 CMV und das Immunsystem	- 8 -
1.1.3 Veränderungen des Immunsystems nach einer CMV-Infektion	- 10 -
1.2 Das Influenzavirus	- 11 -
1.2.1 Influenzatyphen und Impfstämme	- 11 -
1.2.2 Replikationszyklus des Influenza A Virus	- 12 -
1.2.3 Influenza-Pandemien	- 13 -
1.2.4 Impfstoffe gegen das Influenzavirus	- 14 -
1.3 Das humane Immunsystem	- 14 -
1.3.1 Das Humane Leukozytenantigen-System (HLA-System)	- 15 -
1.3.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	- 17 -
1.3.3 NK-Zellaktivierung	- 17 -
1.3.4 NK-Zellrezeptoren	- 19 -
1.3.4.1 CD16	- 19 -
1.3.4.2 KIR-Rezeptoren	- 20 -
1.3.4.3 <i>Natural Cytotoxicity Receptors</i> (NCRs)	- 20 -
1.3.4.4 Die NKG2-Rezeptorfamilie	- 20 -
1.3.5 T-Zellen	- 21 -
1.3.5.1 CD8 T-Zellen	- 21 -
1.3.5.2 CD4 T-Zellen	- 21 -
1.3.6 B-Zellen	- 22 -
1.4 NKG2C ⁺ NK-Zellen und das Cytomegalovirus	- 22 -
1.5 Regulation von T-Zellantworten durch NK-Zellen	- 23 -
1.6 Ziele der Dissertation	- 24 -
2 Material & Methoden	- 26 -
2.1 Material	- 26 -
2.1.1 Geräte und Ausrüstung	- 26 -
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	- 27 -
2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Impfstoffe	- 27 -
2.1.4 Kits	- 29 -

2.1.5 Peptide	- 29 -
2.1.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie und Immunfärbung	- 30 -
2.1.7 Software	- 32 -
2.1.8 Zelllinien	- 32 -
2.1.8.1 Jurkat-Zellen	- 32 -
2.1.8.2 <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> (MDCK)-Zellen	- 33 -
2.1.8.3 <i>Medical Research Council cell strain 5</i> (MRC-5)-Zellen.....	- 33 -
2.2 Methoden.....	- 33 -
2.2.1 Zellkultur.....	- 33 -
2.2.1.1 Ansetzen von Zellkulturmedien	- 33 -
2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen	- 34 -
2.2.1.3 Zelllinienhandhabung	- 34 -
2.2.1.4 HLA-E Peptidstabilisierung und Tracing von Jurkat-Zellen	- 35 -
2.2.1.5 Hochzüchten des Influenzastamms A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (A/PR/8/34)	- 35 -
2.2.1.6 Bestimmung der Infektiosität von Influenzastämmen.....	- 36 -
2.2.2 Experimente mit peripherem Blut als Ausgangsmaterial.....	- 37 -
2.2.2.1 Aufreinigung von PBMCs	- 37 -
2.2.2.2 Expansion von virusspezifischen CD8 T-Zellen.....	- 38 -
2.2.2.3 Caspase 3/7-Aktivitätsassay in Jurkat-Zellen	- 38 -
2.2.2.4 Funktionelle Analysen von NK-Zellen nach Kultur mit Jurkat-Zellen	- 38 -
2.2.2.5 Funktionelle Analysen von NK-Zellen nach Kultur mit Influenza-infizierten MRC-5-Zellen A/PR/8/34 (H1N1).....	- 39 -
2.2.3 Durchflusszytometrie-Analysen	- 40 -
2.3 Hämagglutinations-Hemm-Test (HHT)	- 42 -
2.4 SARS-CoV-2 Antikörpertiterbestimmung & Aufbau der Kohorte	- 43 -
2.5 Statistische Analysen und Abbildungen.....	- 43 -
3 Ergebnisse.....	- 44 -
3.1 Analyse der Zytotoxizität von NKG2C ⁺ NK-Zellen gegen HLA-E ^{high} exprimierende T-Zellen.....	- 44 -
3.1.1 CMV _{pos} Personen haben erhöhte Frequenzen von NKG2A ⁺ /C ⁺ NK-Zellen ...	- 44 -
3.1.2 Die HLA-E Expression auf T-Zellen steigt mit fortschreitender Maturation... -	45 -
3.1.3 Erhöhte Zytotoxizität von NKG2C ⁺ NK-Zellen gegen HLA-E ^{high} exprimierende T-Zellen.....	- 46 -
3.2 Charakterisierung der NKG2C ⁺ NK-Zellen in CMV _{pos} Personen.....	- 51 -
3.2.1 NKG2C ⁺ NK-Zellen haben ein verändertes Rezeptorrepertoire im Vergleich zu anderen NK-Zellpopulationen.....	- 51 -

3.2.2 Bestätigung der Expressionsunterschiede aus dem LEGENDscreen™	- 54 -
3.2.3 Funktionelle Einordnung der untersuchten Oberflächenmoleküle aus dem LEGENDscreen™	- 58 -
3.2.4 t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) Analyse mit NK-Zellen	- 60 -
3.3 Analyse des Immunsystems von CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen nach einer Influenza-Impfung	- 64 -
3.3.1 Aufbau von zwei Kohorten mit Influenza-geimpften Personen	- 64 -
3.3.2 Keine Veränderungen der Frequenz einzelner Lymphozytenpopulationen nach einer Influenza-Impfung	- 66 -
3.3.3 Analyse des Aktivierungsgrads von unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen nach der Influenza-Impfung	- 67 -
3.3.4 Degranulation von NK-Zellen nach Kultivierung mit Influenza-infizierten Zellen	- 69 -
3.4 CD8 T-Zellen nach einer Influenza-Impfung	- 70 -
3.4.1 Frequenzen von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen <i>ex vivo</i>	- 70 -
3.4.2 Epitop-Screening im Hämagglutinin der Influenzastämme aus den Influvac® Tetra Impfstoffen 2019/20 und 2020/21	- 72 -
3.5 Einfluss vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort nach Impfungen - 75 -	- 75 -
3.5.1 Einfluss vom CMV-Serostatus und der Frequenz von NKG2C ⁺ NK-Zellen auf die humorale Antwort nach einer Influenza-Impfung	- 76 -
3.5.2 Einfluss vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung	- 79 -
4 Diskussion	- 81 -
4.1 NKG2C ⁺ NK-Zellen in CMV _{pos} Personen	- 81 -
4.2 Immunregulatorische Funktion von NKG2C ⁺ NK-Zellen gegenüber HLA-E ^{high} exprimierenden T-Zellen	- 81 -
4.3 Phänotypische Charakterisierung von NKG2C ⁺ NK-Zellen	- 83 -
4.4 Zelluläre Immunantworten in Personen nach einer Influenza-Impfung	- 87 -
4.4.1 Aktivierungsgrad von Lymphozytenpopulationen nach einer Influenza- Impfung	- 87 -
4.4.2 Degranulation von NK-Zellen nach Kultivierung mit Influenza-infizierten MRC-5-Zellen und der Einfluss einer Influenza-Impfung	- 88 -
4.4.3 CD8 T-Zellantworten nach einer proteinbasierten Influenza-Impfung	- 89 -
4.5 Humorale Immunantworten in CMV _{pos} und CMV _{neg} Personen nach einer Influenza-Impfung	- 91 -

4.6 Humorale Immunantworten in CMV _{pos} und CMV _{neg} Personen nach einer SARS-CoV-2-Impfung	- 92 -
4.7 Fazit.....	- 93 -
Abkürzungsverzeichnis	- 94 -
Abbildungsverzeichnis	- 96 -
Tabellenverzeichnis.....	- 98 -
Literaturverzeichnis.....	- 99 -
Danksagung	- 116 -
Curriculum Vitae	- 117 -
Erklärung.....	- 118 -

Zusammenfassung

Das Cytomegalovirus (CMV) ist ein persistierendes β -Herpesvirus und hat abhängig von sozioökonomischen Faktoren eine Seroprävalenz zwischen 45% und 100%. Bei einer primären CMV-Infektion zeigen immunkompetente Personen meist keine, seltener milde, grippeähnliche Symptome. Wie alle Herpesviren persistiert auch CMV in einem Stadium der Latenz. Bei immungeschwächten Personen, wie z.B. mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infizierte Personen, Krebspatienten oder Patienten nach einer Organtransplantation, kann CMV reaktivieren und schwere Krankheitssymptome auslösen. Durch die lange Koevolution von CMV und dem humanen Wirt hat sich eine komplexe Virus-Wirt-Interaktion entwickelt, die im humanen Immunsystem als ein phänotypischer CMV „Fußabdruck“ beobachtet werden kann. Beispiele für Veränderungen des Immunsystems nach einer primären CMV-Infektion sind die Expansion von Gedächtnis-T-Zellen (TEMRA; *terminally differentiated effector memory*) und NKG2C⁺ NK-Zellen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CMV-assoziierten Änderungen des Immunsystems auf verschiedene immunologische Mechanismen analysiert. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf die CMV-assoziierten NKG2C⁺ NK-Zellen gelegt. Der Ligand vom aktivierenden NKG2C-Rezeptor ist das nicht-klassische MHC-I-Molekül (MHC; *Major Histocompatibility Complex*) HLA-E. Hier wurde unter anderem der Einfluss von NKG2C⁺ NK-Zellen auf HLA-E^{high} exprimierende T-Zellen untersucht. Mit Hilfe von peptidabhängiger Stabilisierung der HLA-E Expression auf der Jurkat CD4 T-Zelllinie konnte eine erhöhte Zytotoxizität, gemessen an Granzym B, von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen HLA-E^{high} exprimierende T-Zellen beobachtet werden. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten höhere Apoptoseraten, gemessen an aktiver Caspase 3/7, in HLA-E^{high} im Vergleich zu HLA-E^{low} exprimierenden Jurkat-Zellen nach Kultivierung mit peripheren Blutmononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs) mit einer hohen Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen (> 20%) beobachtet werden. Eine niedrigere Frequenz von Gedächtnis-T-Zellen (TEMRA), die bekannt für eine hohe HLA-E Expression sind, in CMV seropositiven (CMV_{pos}) Personen mit hohen Frequenzen von NKG2C⁺ NK-Zellen, unterstützt die Annahme einer immunregulatorischen Funktion von NKG2C⁺ NK-Zellen gegenüber HLA-E^{high} exprimierenden T-Zellen.

Neben dem NKG2C-Rezeptor werden auf CMV-assoziierten NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu anderen NK-Zellpopulationen auch weitere Oberflächenmoleküle stärker oder schwächer exprimiert. Für die Suche nach weiteren immunregulatorischen Funktionen und möglichen Interaktionspartnern von NKG2C⁺ NK-Zellen wurde die Oberflächenexpression von insgesamt 361 Molekülen untersucht. Bei dieser phänotypischen Charakterisierung wurde ein

verändertes Rezeptorrepertoire auf NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu NKG2A⁺ und NKG2A⁻C⁻ NK-Zellen beobachtet. Neben bereits in der Literatur beschriebenen Unterschieden in der Expression von einigen Oberflächenmolekülen auf NKG2C⁺ NK-Zellen, konnten wir zusätzlich höhere Expressionen von CD52, CD44, CD49d, CD18 und niedrigere Expressionen von CD160, CD49f, CD31 und CD119 auf NKG2C⁺ NK-Zellen messen. Erhöhte Frequenzen von Adhäsionsmolekülen und co-Stimulatoren lassen bei NKG2C⁺ NK-Zellen verstärkte Formationen von Effektor-Target Zellkonjugaten und stärkere Aktivierungen über co-Stimulatoren vermuten.

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass in Anwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen eine schwächere Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen *in vitro* messbar ist, stellt sich die Frage, ob es auch *in vivo* eine schwächere Expansion von virusspezifischen CD8 T-Zellen in Probanden mit einer hohen Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen gibt. Obwohl proteinbasierte Impfstoffe generell schwächere CD8 T-Zellantworten hervorrufen, wurden Influenza-spezifische CD8 T-Zellen in Probanden nach einer Impfung mit dem Influenza-Impfstoff Influvac[®] Tetra aufgrund einer verfügbaren, gut definierten Impfkohorte analysiert. Weder in Matrixprotein-spezifischen, noch in Hämagglutinin-spezifischen CD8 T-Zellen konnte eine durch die Impfung ausgelöste Immunantwort gemessen werden.

Eine weitere messbare Immunantwort ist der Antikörpertiter. Da wir auf B-Zellen minimal höhere HLA-E Expressionen als auf CD8 T-Zellen messen konnten, sollte überprüft werden, ob NKG2C⁺ NK-Zellen die Antikörperproduktion nach einer Impfung beeinflussen. Die Antikörpertiter einen Monat nach der Influenza-Impfung, sowie der generelle Anstieg des Antikörpertiters waren unabhängig von der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen und dem CMV-Serostatus. Die Untersuchung der humoralen Antwort bei Mitarbeitern und Bewohnern eines Altenheims nach einer SARS-CoV-2-Impfung ergab ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied im Antikörpertiter in Abhängigkeit des CMV-Serostatus. Dennoch konnte bei über 40-jährigen CMV_{pos} Personen eine Tendenz zu niedrigeren Antikörpertitern nach der zweiten SARS-CoV-2-Impfung beobachtet werden. Gründe dafür könnten eine beschleunigte Alterung des Immunsystems oder höhere Frequenzen von NKG2C⁺ NK-Zellen bei CMV_{pos} Personen sein, jedoch waren in dieser Kohorte keine PBMCs für eine Korrelationsanalyse zwischen der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen und dem Antikörpertiter verfügbar.

In dieser Arbeit konnte die Hypothese der immunregulatorischen Funktion von NKG2C⁺ NK-Zellen gegenüber T-Zellen mit hoher HLA-E Expression unterstützt werden. Für zukünftige Untersuchungen wäre nicht nur der Einfluss von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die Expansion von anderen virusspezifischen T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* interessant, sondern auch die Untersuchung von B-Zellen, die aufgrund der hohen HLA-E Expression ebenfalls von

NKG2C⁺ NK-Zellen beeinflusst werden könnten. Zusätzlich hat das Screening der Oberflächenmoleküle neue Einblicke in das Rezeptorrepertoire von NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu anderen NK-Zellsubpopulationen gegeben. Funktionelle Analysen mit Fokus auf diese Oberflächenmoleküle sind nötig, um die Rolle der NKG2C⁺ NK-Zellen im Kontext von Infektionen besser verstehen zu können. Bezogen auf die humorale Antwort nach einer Impfung konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen beobachtet werden. Dennoch gibt es eine Tendenz zu schwächeren humoralen Immunantworten in älteren CMV_{pos} Personen.

Insgesamt wird das humane Immunsystem deutlich durch eine CMV-Infektion verändert, weshalb es wahrscheinlich ist, dass sich auch die Immunantwort gegen heterologe Infektionen verändert. Daher ist es wichtig, weitere CMV-assoziierte Änderungen mit Hinblick auf die Immunantwort gegen heterologe Infektionen zu untersuchen. Besonders die Expansion von NKG2C⁺ NK-Zellen ist CMV-spezifisch und sollte aufgrund des veränderten Rezeptorrepertoires funktionell genauer untersucht werden.

Summary

Cytomegalovirus (CMV) is a persistent β -herpesvirus and has a fluctuating seroprevalence between 45% and 100%, depending on socioeconomic factors. A primary CMV-infection in immunocompetent individuals is asymptomatic or associated with mild, flu-like symptoms. Like all herpesviruses, CMV persists in a stage of latency. In immunocompromised individuals, such as those infected with human immunodeficiency virus (HIV), cancer patients, or patients after organ transplantation, CMV can reactivate and cause severe symptoms of disease. The long co-evolution of CMV and the human host has resulted in a complex virus-host interaction that can be observed in the human immune system as a phenotypic CMV "footprint". Examples of immune system changes following primary CMV infection include expansion of memory T cells (TEMRA; terminally differentiated effector memory) and NKG2C⁺ NK cells.

In this work, we analyzed the influence of CMV-associated changes in the immune system on various immunological mechanisms. A particular focus was placed on CMV-associated NKG2C⁺ NK cells. The ligand of the activating NKG2C receptor is the non-classical MHC class I molecule (MHC; major histocompatibility complex) HLA-E. Here, we investigated the impact of NKG2C⁺ NK cells on HLA-E^{high} expressing T cells. Through the use of peptide-dependent stabilization of HLA-E expression on the Jurkat CD4 T cell line, we observed increased cytotoxicity of NKG2C⁺ NK cells against HLA-E^{high} expressing T cells, measured by granzyme B. In agreement with these data, higher apoptosis rates, measured by active caspase 3/7, were observed in HLA-E^{high} compared to HLA-E^{low} expressing Jurkat cells after culturing with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with a high frequency of NKG2C⁺ NK cells (> 20%). A lower frequency of terminally differentiated effector memory CD8 T cells (TEMRA), which are known to express high levels of HLA-E, in CMV seropositive (CMV_{pos}) individuals with a high frequency of NKG2C⁺ NK cells supports the assumption of an immunoregulatory function of NKG2C⁺ NK cells over HLA-E^{high} expressing T cells.

Surface molecules other than the NKG2C receptor are also differentially expressed on CMV-associated NKG2C⁺ NK cells compared to other NK cell populations. To search for additional immunoregulatory functions and possible interaction partners of NKG2C⁺ NK cells, the surface expression of a total of 361 molecules was examined. In this phenotypic characterization, an altered receptor repertoire was observed on NKG2C⁺ NK cells compared to NKG2A⁺ and NKG2A⁻ NK cells. In addition to differences in the expression of some surface molecules on NKG2C⁺ NK cells already described in the literature, we also measured higher expressions of CD52, CD44, CD49d, CD18 and lower expressions of CD160, CD49f, CD31, and CD119 on NKG2C⁺ NK cells. Increased frequencies of adhesion molecules and co-stimulators suggest

enhanced formations of effector-target cell conjugates and stronger activations by co-stimulators in NKG2C⁺ NK cells.

After it was shown that a weaker expansion of CMV-specific CD8 T cells is measurable in the presence of NKG2C⁺ NK cells *in vitro*, the question arose whether there is also a weaker expansion of virus-specific CD8 T cells *in vivo* in subjects with a high frequency of NKG2C⁺ NK cells. Although protein-based vaccines generally elicit fewer CD8 T cell responses, influenza-specific CD8 T cells were analyzed in subjects following vaccination with the influenza vaccine Influvac® Tetra based on an available, well-defined vaccination cohort. Neither in matrix protein-specific nor in hemagglutinin-specific CD8 T cells could we measure an immune response triggered by the vaccination.

Another measurable immune response are antibody titers. Since we were able to measure minimally higher HLA-E expressions on B cells compared to CD8 T cells, we aimed to test whether NKG2C⁺ NK cells influence antibody production after vaccination. Antibody titers one month after influenza vaccination, as well as the increase in antibody titers, were independent of CMV serostatus and the frequency of NKG2C⁺ NK cells. Examination of the humoral response in staff and residents of a nursing home after SARS-CoV-2 vaccination also revealed no statistically significant difference in antibody titer as a function of CMV serostatus. Nevertheless, CMV_{pos} individuals over 40 years of age tended to have lower antibody titers after the second SARS-CoV-2 vaccination. Reasons for this could be accelerated aging of the immune system or higher frequencies of NKG2C⁺ NK cells in CMV_{pos} individuals, however no PBMCs were available in this cohort for correlation analysis between frequency of NKG2C⁺ NK cells and antibody titers.

In this work, our hypothesis of an immunoregulatory function of NKG2C⁺ NK cells towards T cells with high HLA-E expression was supported. For future studies, it would not only be interesting to investigate the influence of NKG2C⁺ NK cells on the expansion of other virus-specific T cells both *in vitro* and *in vivo*, but to also investigate B cells, which might be influenced by NKG2C⁺ NK cells due to their high HLA-E expression.

In addition, screening of surface molecules has provided new insights into the receptor repertoire of NKG2C⁺ NK cells compared to other NK cell subpopulations. Functional analyses focusing on these surface molecules are needed to better understand the role of NKG2C⁺ NK cells in the context of infection. With respect to humoral response after vaccination, no statistically significant differences were observed between CMV_{pos} and CMV_{neg} individuals. Nevertheless, there tends to be a weaker humoral immune responses in elderly CMV_{pos} individuals.

Overall, the human immune system is significantly altered by CMV infection, and it is therefore likely that the immune response against heterologous infections is also altered. Hence, it is important to investigate further CMV-associated changes with regard to the immune response against heterologous infections. In particular, the expansion of NKG2C⁺ NK cells is CMV-specific and should be functionally studied in more detail due to the altered receptor repertoire.

1 Einleitung

1.1 Das humane Cytomegalovirus

Das humane Cytomegalovirus (HCMV, im weiteren Verlauf nur als CMV betitelt) gehört zu den β -Herpesviren. Es besitzt mit ca. 235 kbp das größte doppelsträngige DNA-Genom aller bekannten Herpesviren (Crough & Khanna, 2009). Durch die Vielzahl an Virusproteinen, welche unter anderem an unterschiedlichen Immunevasionsmechanismen beteiligt sind, gelingt es dem Virus, ein Leben lang im Körper des Menschen zu persistieren. Das humane CMV ist wirtsspezifisch, weshalb die meisten Untersuchungen in Tiermodellen mit dem Versuchstier-spezifischen CMV durchgeführt werden (Schleiss, 2006).

1.1.1 Prävalenz, Krankheitsverlauf & Therapie

Weltweit gibt es für CMV eine Seroprävalenz zwischen 45 - 100%, abhängig von sozioökonomischen Faktoren und dem Alter (Cannon et al., 2010). In einer Kohorte mit 6.552 Teilnehmern aus der deutschen Bevölkerung im Alter zwischen 18 und 79 Jahren aus dem Jahr 1998 wurde eine Seroprävalenz von 56,7% ermittelt (Lachmann et al., 2018).

Bei einer Primärinfektion mit CMV zeigen immunkompetente Menschen meist keine oder allenfalls leichte Symptome. Die leichten Symptome ähneln dabei einem grippalen Infekt. Gefährlicher ist eine Primärinfektion bei Menschen mit einer Immunsuppression, z.B. ausgelöst durch eine Krebstherapie oder HIV-Infektion. Bei immunsupprimierten Menschen kann eine CMV-Infektion zu Erkrankungen verschiedener Organe, wie z.B. einer Retinitis, Enterokolitis oder Pneumonie führen (Boeckh et al., 2003). Nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) ist eine CMV-Reaktivierung der wahrscheinlichste Grund für eine *non-relapse Mortalität* (NRM) (Stern et al., 2019). Auch bei Säuglingen, die im Uterus infiziert wurden, ist eine primäre CMV-Infektion gefährlich. Es kann zu verschiedenen Fehlbildungen des Säuglings kommen. Typische Krankheitsbilder sind Mikrozephalie, Hörschäden oder geistige Behinderungen. Als Therapie wird bei Risikopatienten das Virostatikum Ganciclovir eingesetzt. Bei Resistenzen gegen Ganciclovir werden andere Virostatika, wie Foscavir oder Cidofovir als Alternativen angewendet (RKI, abgerufen am 08.03.2021).

1.1.2 CMV und das Immunsystem

Die Ansteckung mit CMV geschieht über Kontakt mit infektiösen Körperflüssigkeiten. Unter anderem kann das Virus in Speichel, Urin, Muttermilch, Blut und Sperma nachgewiesen werden (Cannon et al., 2011; Halwachs-Baumann et al., 2002). Der Viruszyklus besteht aus zwei Phasen, der akuten und der latenten Phase. Es wird davon ausgegangen, dass die Menschen das Virus zuerst über Schleimhaut- und Drüsenepithelzellen aufnehmen. Doch auch neuronale Zellen der Retina und des zentralen Nervensystems, sowie Muskel-, Lungenepithel- und Leberzellen können während der akuten Phase infiziert werden. So gelingt es dem Virus, systemisch Zellen in allen wichtigen Organen zu infizieren (Forte et al., 2020).

Bei der latenten Phase ist nur wenig bis keine Virus-DNA messbar. In einer Studie von Slobedman und Mocarski konnte das Virus in der latenten Phase bei Patienten nach einer Organtransplantation in nur 0,004% – 0,01% der mononukleären Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut nachgewiesen werden. In den infizierten Zellen wurden dabei nur zwei bis dreizehn Viruskopien gemessen (Slobedman & Mocarski, 1999). Reeves und Sinclair konnten in einer anderen Studie zeigen, dass lytische Transkripte während der latenten Phase inhibiert werden (Reeves et al., 2005). Ein Wechsel in die lytische Phase (CMV-Reaktivierung) kann durch Immunsuppression bei z.B. HIV-Patienten oder durch Verabreichung von Immunsuppressiva bei Patienten nach einer Transplantation erfolgen. Eine CMV-Reaktivierung bei immunkompetenten Personen wird mit Stress und Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht (Cook & Trgovcich, 2011; Hummel & Abecassis, 2002).

Um dem Immunsystem zu entkommen, kodiert das CMV-Genom für eine Vielzahl von Proteinen und microRNAs. Einige der Genbereiche sind in der latenten Phase aktiv, während andere Genbereiche nur in der lytischen Phase bzw. CMV-Reaktivierung aktiv sind. In beiden Phasen sind Immunevasionsmechanismen gegen verschiedene Lymphozytenpopulationen bekannt (Jackson et al., 2017).

Bei einer Primärinfektion gibt es eine starke Aktivierung des Immunsystems (Picarda & Benedict, 2018). Eine unkontrollierte Virusreplikation ohne eine Gegenreaktion des Immunsystems kann zu schweren Erkrankungen und bei Ausbleiben einer Behandlung zum Tod führen (Carbone, 2016). Auch durch Immunreaktionen von immunkompetenten Personen kann das Virus nicht endgültig beseitigt werden und wechselt in die latente Phase.

Die erste Reaktion des Immunsystems auf Viren kommt vom angeborenen Immunsystem. Darunter fällt auch das Typ-I-Interferon-System, welches unter anderem in der NK-Zell-Aktivierung, T-Zellproliferation und B-Zelldifferenzierung involviert ist. Zusätzlich

werden bei der Typ-I-Interferonantwort vermehrt MHC-Klasse-I-Moleküle gebildet, sodass die Antigenpräsentation auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen hochgefahren wird und infizierte Zellen schneller von T-Zellen erkannt werden (Hervas-Stubbs et al., 2011).

CMV verfügt über eine Vielzahl an Strategien, um dieser Immunantwort zu entgehen. So kann es zum Beispiel die Interferonantwort blockieren, indem die IFN α -vermittelte Phosphorylierung von IFNAR1, Jak1, Tyk2, STAT1 oder STAT2 inhibiert wird (Miller et al., 1999). Weiter kann die Immunantwort durch die Produktion eines CMV eigenen IL-10 Homologes inhibiert werden. Das CMVIL-10 hat eine hohe Bindungsaffinität zum IL-10 Rezeptor und wirkt, ähnlich wie das humane IL-10, anti-inflammatorisch (Chang & Barry, 2010; Kotenko et al., 2000).

Eine Inhibition der NK-Zellaktivität gegen CMV kann durch Imitation von NK-Zellliganden oder deren Rezeptoren erreicht werden. Ein Beispiel dafür ist das CMV-Protein UL18, welches im Vergleich zu humanen MHC-Klasse-I-Molekülen eine über 1000-fach höhere Bindungsaffinität zum inhibierenden NK-Zellrezeptor LIR-1 aufweist (Chapman et al., 1999). Weitere Beispiele für eine Beeinflussung von NK-Zellrezeptoren oder deren Liganden durch CMV-Peptide sind DNAM-1 und TRAIL durch das CMV-Protein UL141 und NKp30 durch UL83 (Phosphoprotein65; pp65) (Arnon et al., 2005; Prod'homme et al., 2010; Smith et al., 2013). Zum Schutz vor der T-Zellantwort kann die Peptidpräsentation über MHC-Klasse-I- und -II- Moleküle mit Hilfe von CMV-Genprodukten der *unique short* (US)2 - US11 Region inhibiert werden, indem die MHC-Moleküle im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten oder im Zytosol degradiert werden. Außerdem kann die Beladung der MHC-Moleküle mit Peptiden behindert werden (Besold et al., 2009; Rehm et al., 2002). Auch die Expression von nicht-klassischen MHC-I-Molekülen kann durch CMV-Peptide beeinflusst werden. Über HLA-E kann auf der Oberfläche von CMV-infizierten Zellen ein Peptid des CMV-Proteins UL40 präsentiert werden. Die damit erhöhte Oberflächenexpression von HLA-E auf der infizierten Zelle führt durch die Bindung an den inhibierenden NK-Zellrezeptor NKG2A zum Schutz vor NKG2A-tragenden NK-Zellen (Ulbrecht et al., 2000). Neben Proteinen werden auch microRNAs (miRNAs) von CMV exprimiert und können unter anderem die Expression von Liganden der NK-Zellrezeptoren beeinflussen (Lau et al., 2016). Aufgrund der Vielzahl an Transkripten, deren Funktionen trotz fortschreitender Erkenntnisse noch unbekannt sind, ist die Forschung an CMV besonders für das Verständnis von Immunevasionsmechanismen wichtig.

1.1.3 Veränderungen des Immunsystems nach einer CMV-Infektion

Eine primäre CMV-Infektion hat CMV-spezifische Veränderungen im humanen Immunsystem zur Folge. Besonders in der T- und NK-Zellpopulation sind in vielen Studien phänotypische Änderungen nach einer CMV-Infektion beschrieben.

Die Frequenz von CMV-spezifischen T-Zellen in CMV_{pos} Personen ist höher als die Frequenz von spezifischen T-Zellen gegen alle anderen Krankheitserreger. Im Durchschnitt sind etwa 10% aller zirkulierenden Gedächtnis-T-Zellen bei CMV_{pos} Personen spezifisch für das Virus, in älteren Populationen kann die Frequenz auf bis zu 40% ansteigen (Sester et al., 2002; Sylwester et al., 2005). Dieses Phänomen wird als Gedächtnis-T-Zell-Inflation bzw. *memory T cell inflation* bezeichnet (Kim et al., 2015).

Eine der am häufigsten beschriebenen CMV-assoziierten Änderung nach einer Infektion ist die Expansion von NKG2C⁺ NK-Zellen. Sogenannte adaptive NK-Zellen wurden zuerst im Mausmodell von CMV beschrieben (MCMV). Ly49H⁺ NK-Zellen, das Äquivalent zu NKG2C⁺ NK-Zellen in Menschen, expandierten nach einer MCMV-Infektion über 100-fach in der Niere und über 1000-fach in der Leber der Mäuse. Nach der MCMV-Infektion konnten über Monate höhere Frequenzen der Ly49H⁺ NK-Zellen nachgewiesen werden. Die nach 40 - 50 Tagen angereicherten Ly49H⁺ NK-Zellen wurden in naive DAP-12 defiziente Mäuse transferiert, welche erneut mit MCMV infiziert wurden. Eine deutlich schnellere Aktivierung von Ly49H⁺ NK-Zellen und eine verbesserte Überlebensrate gegenüber den Kontrollmäusen bewiesen einen Schutz vor MCMV durch eine adaptive Antwort von NK-Zellen (Sun et al., 2009). Bei Menschen werden adaptive oder adaptiv-ähnliche NK-Zellen meist mit der Expression des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKG2C in Verbindung gebracht (siehe 1.4).

Welchen Einfluss die Veränderungen des Immunsystems nach einer CMV-Infektion auf die Immunantwort gegen andere Erkrankungen hat, wird in der Literatur häufig diskutiert. Ein Review von Iain Broadler beschreibt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der CMV-bedingten Expansion von CD4⁺CD28⁻ T-Zellen und erhöhter Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen (Broadley et al., 2017). Während einige Veröffentlichungen den Grund der Gesamtmortalität und Anfälligkeit durch neue Infektionen bei älteren Menschen in der massiven Expansion von CMV-spezifischen T-Zellen und der damit einhergehenden schwächeren T-Zellantwort gegenüber neuen Antigenen vermuten, sehen andere Publikationen den Grund in CMV-unabhängigen Faktoren für diese Beobachtung (Hadrup et al., 2006; Jackson et al., 2017; Lelic et al., 2012; Schulz et al., 2015). Auch im Review von Sara van den Berg werden 17 Studien miteinander verglichen, in denen teils konträre Einflüsse vom CMV-Serostatus auf die humorale Immunantwort nach einer Influenza-Impfung beschrieben werden (van den Berg et al., 2019b).

1.2 Das Influenzavirus

Das Influenzavirus ist ein behülltes, segmentiertes RNA-Virus aus der Familie der *Orthomyxoviridae*. Die durch das Influenzavirus entstandenen respiratorischen Erkrankungen beim Menschen sind im allgemeinen Sprachgebrauch als "echte" Grippe bekannt. Auch andere Säugetiere und Vögel können mit Influenzaviren infiziert werden. Die Benennung eines bestimmten Influenzavirusstamms erfolgt über den Influenzotyp, den primären Isolierungsort, die Isolat-Nummer und das Jahr der primären Isolation (Beispiel: A/Brisbane/02/2018) (WHO, abgerufen am 16.08.2021).

1.2.1 Influenzotypen und Impfstämme

Influenzaviren können in die vier Gattungen Influenzavirus A - D unterteilt werden.

Die Influenza A Viren werden weiter in ihre Hämagglutinin- und Neuraminidase-Typen eingeteilt (Beispiel: H1N1). Bisher sind 18 verschiedene Hämagglutinin und 11 verschiedene Neuraminidase-Typen bekannt (CDC, abgerufen am 28.06.2021). Die H1N1- und H3N2-Stämme machen üblicherweise den größten Teil der zirkulierenden Influenza A Viren aus (WHO, abgerufen am 27.03.2021). Daher sind in den jährlichen Influenza-Impfungen Proteine dieser zwei Influenza A Subtypen enthalten (siehe 1.2.4). Zusätzlich beinhalten die jährlichen Influenza-Impfungen, je nach Impfstoff, Proteine von einem (trivalenter Impfstoff) oder zwei (quadrivalenter Impfstoff) Influenza B Stämmen. Influenza B Viren kommen neben den Influenza A Viren am häufigsten vor und lösen einen ähnlichen Krankheitsverlauf aus. Da die Infektiosität und Schwere der Symptome durch Mutationen von Influenzastamm zu Influenzastamm unterschiedlich sind, kann die Frage, welche Influenza-Gattung gefährlicher ist, nicht sicher beantwortet werden. Eine Studie mit 391 hospitalisierten Kindern beispielsweise konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Schwere der Krankheitsverläufe zwischen Influenza A und Influenza B Infektionen zeigen (Mattila et al., 2020).

Das Genom der Influenza C und D Viren enthält im Gegensatz zu den acht-segmentierten Influenza A und B Viren nur sieben Segmente. Eine Infektion mit dem Influenza C Virus hat eine milde respiratorische Erkrankung zur Folge (Sederdahl & Williams, 2020). Für das Influenza D Virus, welches im Jahre 2011 erstmals aus einem Schwein isoliert wurde, gibt es bisher noch keine bestätigte Infektion beim Menschen (Su et al., 2017).

1.2.2 Replikationszyklus des Influenza A Virus

Die Übertragung von humanen Influenzaviren geschieht meist über Tröpfchen und deren Kontakt mit Schleimhäuten des respiratorischen Trakts (RKI, abgerufen am 07.04.2021). Das Influenzavirus kann anschließend mit Hilfe des Hämagglutinins auf der Virushülle an Sialinsäurereste der humanen Epithelzellen andocken. Nach der Bindung des Hämagglutinins wird das Virion auf eine Clathrin-abhängige Weise oder über Makropinozytose internalisiert (de Vries et al., 2011). Durch eine Konformationsänderung des Hämagglutinins aufgrund von pH-Ansäuerung im Endosom fusioniert die Virushülle mit der Hülle des Endosoms und Virusbestandteile werden freigesetzt. Die viralen Ribonukleoproteine (vRNPs) wandern in den Nukleus ein und werden transkribiert und repliziert. Transkripte des Influenzavirus werden vom Nukleus in das Zytoplasma exportiert und anschließend translatiert. Die neusynthetisierten viralen Polymerasen wandern im späteren Verlauf zurück in den Nukleus, um eine noch höhere RNA-Synthese der viralen Transkripte zu erreichen. Die neusynthetisierten Membranproteine hingegen wandern zur Plasmamembran. In der Spätphase der Infektion binden das Matrixprotein 1 (M1) und das nukleäre Exportprotein (NEP) für den Export aus dem Nukleus in das Cytoplasma an die vRNPs. Anschließend wandern die vRNPs mit Hilfe von Endosomen zur Plasmamembran, lagern sich zusammen und werden während der Knospung durch die Einhüllung in die Plasmamembran, an der auch die Transmembranproteine gebunden sind, zum vollständigen Virion (Abbildung 1.1). Durch die Sialidase-Aktivität der Neuraminidase wird verhindert, dass neu gebildete Virionen in bereits infizierte Zellen eintreten und verbessert so die Effektivität der Virusausbreitung. Das neusynthetisierte Hämagglutinin wird nach der Knospung mit Hilfe von Proteasen des Wirts in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten, um aktiv zu werden (Dou et al., 2018; Krammer et al., 2018).

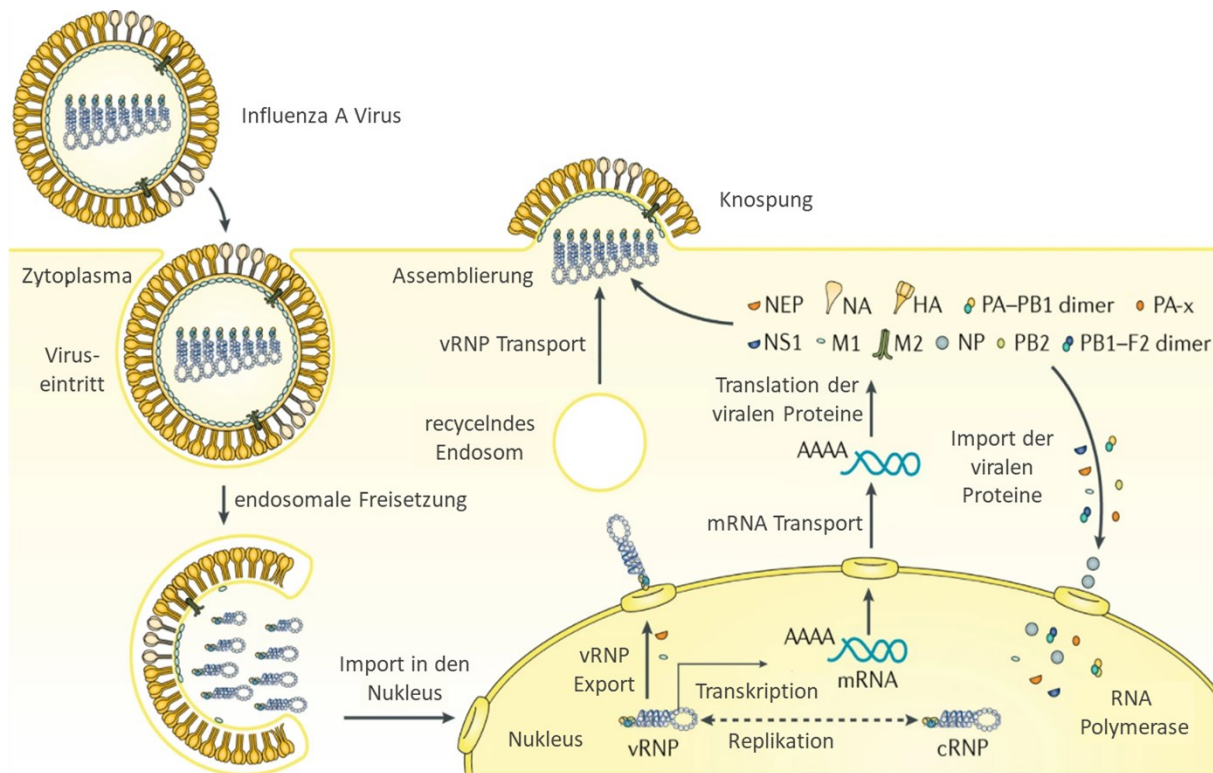


Abbildung 1.1 – Replikationszyklus des Influenza A Virus.

modifizierte Abbildung für die Darstellung des Replikationszyklus der Influenza A Viren von Kramer et al. 2018. Abkürzungen: vRNP = virale Ribonukleoproteine; cRNP = komplementäres Ribonukleoprotein; NEP = Nuklear-Exportprotein; NA = Neuraminidase; HA = Hämagglutinin; PA-PB1 dimer = Saurer Polymeraseprotein-Basisprotein 1 Dimer; PA-x = PA-x Protein; NS1 = Nichtstrukturprotein 1; M1 = Matrixprotein 1; M2 = Matrixprotein 2; NP = Nukleoprotein; PB2 = Polymerase Basisprotein 2; PB1-F2 dimer = PB1-F2 Protein.

1.2.3 Influenza-Pandemien

Die bisher in der Menschheitsgeschichte verheerendste dokumentierte Influenzapandemie war die sogenannte „spanische Grippe“. Sie wurde von einem H1N1-Influenzastamm ausgelöst und forderte laut Schätzungen ungefähr 50 Millionen Todesopfer (Johnson & Müller, 2002). Mit der „spanischen Grippe“ infizierten sich ca. 500 Millionen Menschen, was im Jahre 1918 in etwa ein Drittel der Gesamtbevölkerung ausmachte (CDC, abgerufen am 27.03.2021). Bei weiteren Influenza-Pandemien in den Jahren 1957 und 1968 kamen jeweils ca. eine Million Menschen ums Leben (Bundesärztekammer, abgerufen am 27.03.2021). Die letzte Influenzapandemie, die so genannte „Schweinegrippe“, wurde im Jahre 2009 verzeichnet und forderte in etwa 200.000 Tote. Für die Bestimmung der Mortalität durch Influenzaviren in Deutschland werden Modellrechnungen mit den Monatsdaten der Gesamtmortalität der Bevölkerung und den Daten zum Verlauf der Influenzawelle von der „Arbeitsgemeinschaft Influenza“ des Robert Koch-Instituts (RKI) durchgeführt, da eine Influenza-Infektion nur selten als Todesursache erkannt bzw. labordiagnostisch bestätigt wird (RKI, abgerufen am 06.04.2021).

1.2.4 Impfstoffe gegen das Influenzavirus

Eine jährliche Impfung gegen das Influenzavirus gilt als die beste und wichtigste Präventionsmaßnahme gegen eine Influenzainfektion (CDC, abgerufen am 19.04.2021b). Durch hohe Mutationsraten der Influenzaviren, besonders in den Oberflächenproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase, treten jährlich veränderte Influenzaviren auf, gegen die ein erneuter Immunschutz benötigt wird. Für die Entwicklung des jährlichen Influenza-Impfstoffs werden die zirkulierenden Influenzaviren für die folgende Influenzasaison prognostiziert. Dazu werden ganzjährig Daten der zirkulierenden Influenzastämme von über 100 Influenzazentren in über 100 Ländern gesammelt und ausgewertet (CDC, abgerufen am 19.04.2021a). Dennoch können die Prognosen aufgrund der schwer vorhersagbaren Veränderungen durch Antigendrift und Antigen shift deutlich von den in der folgenden Influenzasaison tatsächlich zirkulierenden Influenzaviren abweichen. Die Effektivität der Influenza-Impfstoffe schwankt bei einer guten Prognose zwischen 40% und 60% (CDC, abgerufen am 19.04.2021b). Trotz dieser, im Vergleich zu anderen Impfstoffen, geringen Effektivität rettet die Influenza-Impfung in Deutschland laut RKI von allen Impfungen (vor Auftreten des SARS-CoV-2) die meisten Menschenleben (RKI, abgerufen am 15.04.2021). Das Ziel derzeitiger Forschungsprojekte an Influenza-Impfstoffen ist die Verbesserung der Kreuzimmunität gegen viele verschiedene Influenzaviren aus der Vergangenheit, aber auch gegen Influenzaviren, die sich in der Zukunft unvermeidlich verändern werden. Dafür braucht es einen Impfstoff, der ein breiteres Spektrum an Immunantworten auslöst und sich gegen verschiedene Epitope von verschiedenen Virusproteinen richtet (Yamayoshi & Kawaoka, 2019).

Weltweit gibt es verschiedene Arten der Influenza-Impfung, die Bestandteile aus zwei Influenza A Stämmen und zusätzlich einem oder zwei Influenza B Stämmen enthalten. Die meist verwendete Art bei Influenza-Impfstoffen ist der Proteinimpfstoff, bei dem das Hämagglutinin und die Neuraminidase der Influenzaviren eine Immunantwort auslöst. Diese Art der Impfstoffe zielt auf eine starke B-Zellantwort und somit eine starke Antikörperantwort ab. Andere Arten von Impfstoffen, wie zum Beispiel Totimpfstoffe, werden beispielsweise bei Kindern ohne vorherige Immunisierung gegen Influenzaviren benutzt (Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, abgerufen am 19.04.2021).

1.3 Das humane Immunsystem

Das humane Immunsystem schützt den Menschen vor Krankheiten und Infektionen. Klassischerweise wird das Immunsystem in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt. Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene. Neben der Haut gehören z.B. auch NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen zum

angeborenen Immunsystem (Biron, 2016; McDonald & Levy, 2019). Die Immunantwort wird schnell und gegen alle Krankheitserreger, sowie fremde Substanzen gebildet. Zum adaptiven Immunsystem gehören B- und T-Zellen, die zu einem späteren Zeitpunkt spezifische Antworten gegen Pathogene bilden (Chaplin, 2010).

1.3.1 Das Humane Leukozytenantigen-System (HLA-System)

Der MHC-Komplex ist ein Komplex von Genen, die Moleküle des HLA-Systems kodieren. Diese Moleküle sind wichtig für die Freund-von-Feind Unterscheidung von Zellen und somit essenziell für das Immunsystem. Über das HLA-System werden unter anderem Eigenpeptide präsentiert. Durch negative Selektion von T-Zellen, die Eigenpeptide erkennen, wird verhindert, dass diese T-Zellen körpereigene Zellen des Immunsystems angreifen (Klein et al., 2014). Zum anderen können über das HLA-System auch Peptide von Pathogenen präsentiert werden. Die infizierte Zelle wird so von T-Zellen als körperfremd erkannt und direkt oder indirekt durch Initiierung von immunstimulierenden Prozessen eliminiert. Die Proteine des HLA-Systems werden in MHC-Klasse-I-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle unterteilt (Janeway et al., 2001).

Die Proteine des MHC-Klasse-I-Komplex können weiter in klassische und nicht-klassische MHC-I-Moleküle unterteilt werden. Zu den klassischen MHC-I-Molekülen gehören HLA-A, -B und -C. Über diese Moleküle werden Eigen- und Fremdpeptide präsentiert, die dann von CD8 T-Zellen mit Hilfe ihrer T-Zellrezeptoren (TCRs) erkannt werden (Cruz-Tapias et al., 2013). Zellen mit präsentierten Fremdpeptiden werden als "Feind" erkannt und von den zytotoxischen CD8 T-Zellen zerstört. Bestimmte NK-Zellrezeptoren wie die *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR-Rezeptoren) können ebenfalls an klassische MHC-I-Moleküle binden und lösen meist inhibitorische Signale aus. So schützt eine normale Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche von gesunden Zellen vor NK-Zellzytotoxizität (siehe 1.3.3). Einige wenige KIR-Rezeptoren mit einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz können jedoch nach Bindung an MHC-I-Moleküle auch aktivierende Signale weiterleiten (Blunt & Khakoo, 2020).

Zu den nicht-klassischen MHC-I-Molekülen gehören neben HLA-E, -F und -G auch Moleküle wie z.B. MICA und MICB (Halenius et al., 2015). Diese Moleküle sind nicht so polymorph wie die klassischen MHC-I-Moleküle und präsentieren auch nur eine beschränkte Anzahl an Peptiden (Janeway et al., 2001). Die nicht-klassischen MHC-I-Moleküle werden auf Zellen meist durch Stressreaktionen hochreguliert und sind oft das Immunevasionsziel von Viren. Der Stressligand MICB beispielsweise wird in Zellen durch oxidativen Stress, genotoxischem Stress oder viralen Infektionen hochreguliert (Stern-Ginossar & Mandelboim, 2010). Es gibt

Rezeptoren von nicht-klassischen MHC-I-Molekülen, die inhibitorische Signale weiterleiten und es gibt Rezeptoren, die aktivierende Signale weiterleiten können (Halenius et al., 2015).

In dieser Dissertation wird ein besonderer Fokus auf das nicht-klassische MHC-I-Molekül HLA-E gelegt, welches als Ligand für NKG2A und NKG2C fungiert und Leader-Peptide von MHC-I-Peptiden präsentiert (Braud et al., 1998; Martoglio & Dobberstein, 1998) (Abbildung 1.2). Daher ist die HLA-E Oberflächenexpression abhängig von der Verfügbarkeit von MHC-I-Leader-Peptiden und benötigt einen funktionstüchtigen Antigenpeptid-Transporter (TAP) (Lee et al., 1998).

Verschiedene Viren und Krebsarten regulieren die Expression von MHC-I-Molekülen auf Zellen herunter, um der T-Zellantwort zu entgehen. Auch CMV verringert die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche der infizierten Zelle durch Inhibition des TAP-Proteinkomplexes, um der T-Zellantwort zu entgehen (Benz et al., 2001). Durch TAP-unabhängige Peptidpräsentation von CMV-Peptiden über HLA-E schützt sich das Virus zusätzlich vor der Zytotoxizität von NK-Zellen, die den inhibierenden Rezeptor für HLA-E, NKG2A exprimieren (Tomasec et al., 2000).

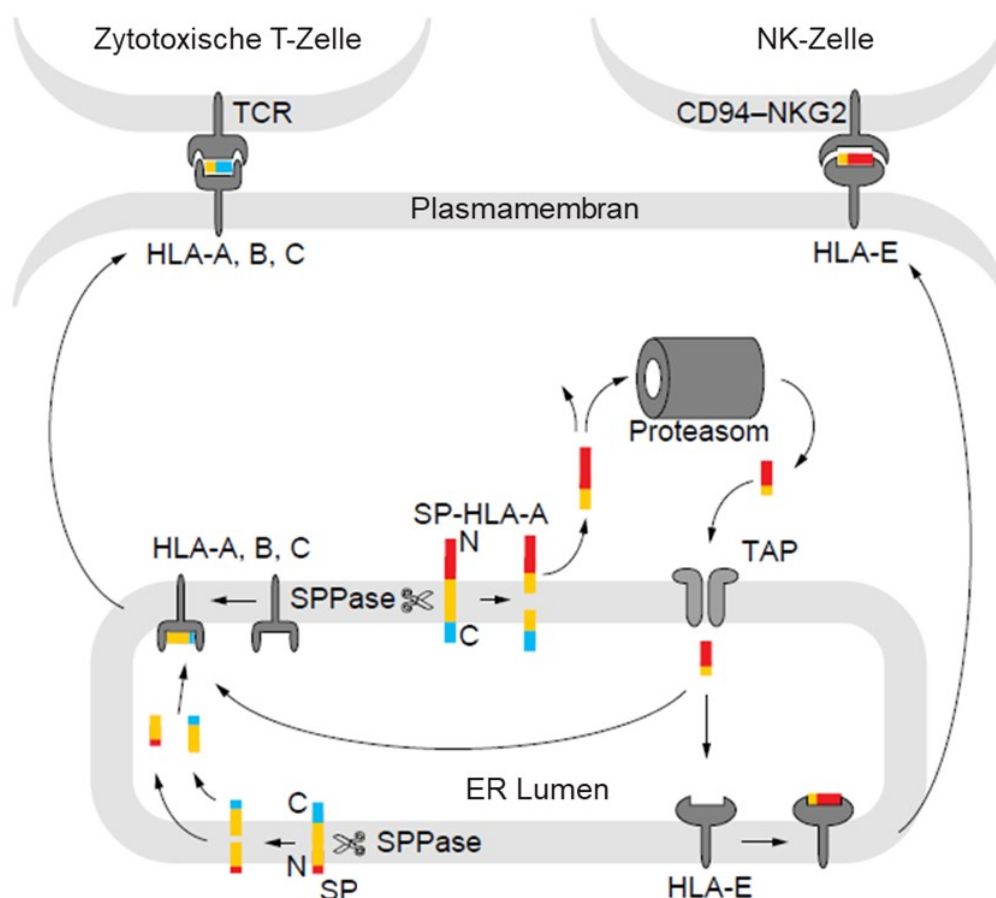


Abbildung 1.2 - Peptidpräsentation über MHC-I-Moleküle.

Modifizierte Abbildung von Martoglio et al. 1998 zur Peptidpräsentation über HLA-A, -B, -C und -E. Abkürzungen: TCR = T-Zellrezeptor; SP = Signalpeptid; SPP = Signalpeptidase; ER = endoplasmatisches Retikulum; TAP = Antigenpeptid-Transporter (*Transporter associated with antigen processing*).

Zur MHC-Klasse-II gehören die Moleküle HLA-DM, -DO, -DP, -DQ, -DR. Die Peptide, die auf diesen HLA-Molekülen präsentiert werden, können von CD4 T-Zellen mit Hilfe ihrer TCRs erkannt werden. MHC-II-Moleküle werden nur von potenziell antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, dendritischen Zellen und T-Zellen exprimiert. Dabei werden Peptide präsentiert, die von den Zellen phagozytiert werden (exogene Peptidpräsentation) (Modrow et al., 2010).

1.3.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen machen in etwa 5 - 20% der zirkulierenden Lymphozyten aus und sind in der Lage Tumor-, Pathogen infizierte und fremde Zellen abzutöten (Verhoeckx et al., 2015). Obwohl keiner der beiden Rezeptoren ausschließlich auf NK-Zellen vorkommt, werden NK-Zellen über die Expression von CD56 und CD16 und die Abwesenheit anderer Lineage Marker definiert (Freud et al., 2017). Klassischerweise werden NK-Zellen in CD56^{bright}CD16⁻ (im Folgenden nur CD56^{bright} genannt) und CD56^{dim}CD16⁺ (im Folgenden nur CD56^{dim} genannt) NK-Zellen unterteilt (Chan et al., 2007). Während den CD56^{bright} NK-Zellen immunmodulatorische Funktionen zugeordnet werden, produzieren CD56^{dim} NK-Zellen besonders Granzyme und Perforin für die zytotoxische Effektorfunktion (Freud et al., 2017; Lanier et al., 1986). In Verbindung mit chronischen Krankheiten, wie z.B. HIV und Hepatitis C, werden auch CD56^{neg}CD16^{pos} NK-Zellen beschrieben. Diese NK-Zellpopulation zeigt bezogen auf die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity*; ADCC), die Lyse von MHC-I-defizienten Zielzellen und die IFN γ -Sekretion weniger Funktionalität als die anderen NK-Zellpopulationen (Muller-Durovic et al., 2019). Da NK-Zellen keine pathogenspezifischen Moleküle, sondern eine veränderte Expression der Oberflächenmoleküle auf abnormalen Zellen erkennen, werden sie dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Trotz dessen setzen neuere Publikationen den Fokus immer öfter auf sogenannte adaptive bzw. gedächtnisähnliche (*memory-like*) NK-Zellen, die nach erneuter Exposition mit einem Pathogen schneller aktiviert werden als bei der primären Exposition (Goodier & Riley, 2021; Pahl et al., 2018).

1.3.3 NK-Zellaktivierung

Für die Unterscheidung zwischen abnormalen und gesunden Zellen besitzt die NK-Zelle eine Vielzahl an Rezeptoren. Ob eine NK-Zelle aktiviert wird oder nicht, hängt von der Summe aller aktivierenden und inhibierenden Signale ab. MHC-Moleküle spielen hierbei eine wichtige Rolle als inhibierendes Signal. Da MHC-Moleküle ubiquitär exprimiert werden, bekommt die NK-Zelle durch inhibierende Rezeptoren, die an die MHC-Moleküle binden, inhibierende

Signale vermittelt, bleibt in gesunder Umgebung im Toleranzstatus und wird nicht aktiviert (Abbildung 1.3A) (Vivier et al., 2012).

Wird eine Zelle mit einem Pathogen infiziert, werden Peptide des Pathogens auf der Oberfläche der Zelle präsentiert, damit T-Zellen die Fremdpeptide erkennen und die infizierte Zelle abtöten. Einige Viren wie zum Beispiel CMV oder Influenza B Viren regulieren die MHC-Expression mit Hilfe von Immunevasionsmechanismen herunter, um der T-Zellantwort zu entgehen (Benz et al., 2001; Koutsakos et al., 2019). Ist die MHC-Expression herunterreguliert, erhält die NK-Zelle weniger inhibierende Signale, wird folglich aktiviert und zerstört die infizierte Zelle. Diese Art der NK-Zellaktivierung wird „*Missing self*“-Aktivierung genannt (Abbildung 1.3B) (Ljunggren & Karre, 1990).

Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit ist die „*Stress-induced self*“-Aktivierung. Hierbei werden Stressliganden auf der Oberfläche der abnormalen Zelle hochreguliert, die über NK-Zellrezeptoren erkannt werden (Abbildung 1.3C). Die aktivierenden Signale überwiegen und die NK-Zelle wird aktiviert (Vivier et al., 2012). Beispiele für stressinduzierte Liganden sind MICA/B oder *unique long binding proteins* (ULBPs), die von dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D erkannt werden (Halenius et al., 2015). Im Folgenden werden die Rezeptorfamilien genauer beschrieben.

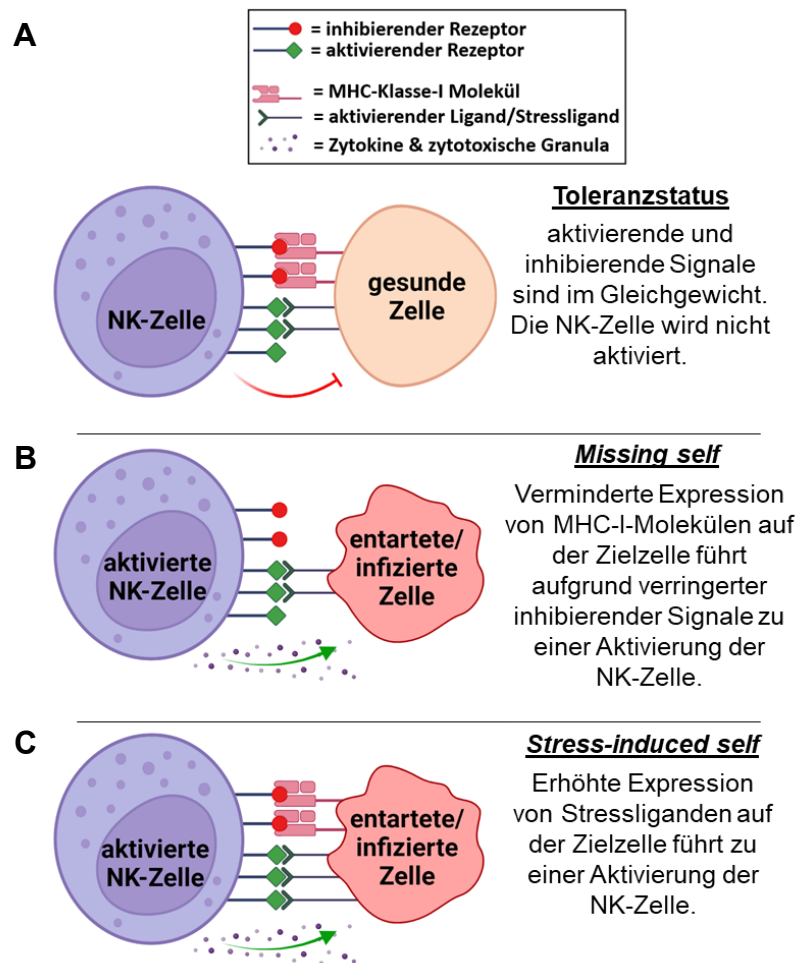


Abbildung 1.3 - NK-Zellaktivierung.

modifizierte Abbildung von Vivier et al. 2012. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender angefertigt (www.biorender.com). (A) Toleranzstatus, bei dem die NK-Zelle aufgrund des Gleichgewichts von aktivierenden und inhibierenden Signalen nicht aktiviert wird. (B) "Missing self" aktiviert die NK-Zelle durch eine verminderte Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zielzelle. (C) "Stress-induced self" aktiviert die NK-Zelle durch stressinduzierte erhöhte Expression von Aktivierungssignalen.

1.3.4 NK-Zellrezeptoren

1.3.4.1 CD16

CD16 ist ein niedrig-Affinitäts Fc-Rezeptor (FcγRIII), welcher an den Fc-Teil von IgG Antikörpern binden kann. Der Rezeptor wird neben NK-Zellen auch auf Makrophagen und Neutrophilen exprimiert und vermittelt dort die Aufnahme und Zerstörung von Antikörpergebundenen Pathogenen. Bei NK-Zellen erkennt CD16 ebenfalls den Fc-Teil von IgG Antikörpern und löst ADCC aus (Janeway et al., 2012). Für die aktivierende Signalweiterleitung ist CD16 an FcεRIγ und/oder CD3ζ gebunden, die jeweils Immunrezeptor-Tyrosin basierende Aktivierungsmotive (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*; ITAMs) besitzen. Während FcεRIγ nur ein ITAM besitzt, verfügt CD3ζ über drei ITAMs (Aicheler et al., 2013).

1.3.4.2 KIR-Rezeptoren

KIR-Rezeptoren werden ab einem späteren Zeitpunkt in der NK-Zelldifferenzierung exprimiert, erkennen MHC-I-Moleküle und sind sehr polymorph (Pende et al., 2019). Man unterscheidet zwischen KIR-Rezeptoren mit zwei (KIR2D) und drei Domänen (KIR3D). Weiter unterscheidet man zwischen KIR-Rezeptoren mit einem kurzen (KIR2/3DS) und einem langen zytoplasmatischen Schwanz (KIR2/3DL). KIR-Rezeptoren mit einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz sind aktivierende und KIR-Rezeptoren mit einem langen zytoplasmatischen Schwanz sind inhibierende Rezeptoren (Campbell & Purdy, 2011). Besonders wichtig sind die inhibierenden KIR-Rezeptoren für die Erkennung von Eigen-MHC-I-Moleküle im Toleranzstatus, bei der *Missing-self*-Aktivierung und der Reifung von NK-Zellen. Die Stärke der inhibierenden Signale während der Reifung bestimmt die Effizienz der Effektorfunktionen einer NK-Zelle (Pende et al., 2019).

1.3.4.3 *Natural Cytotoxicity Receptors (NCRs)*

Zu der NCR-Familie gehören die aktivierenden NK-Zellrezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46, die besonders mit Tumorzytotoxizität in Verbindung gebracht werden. Während NKp30 und NKp46 auch auf ruhenden NK-Zellen vorkommen, wird NKp44 auf aktivierten NK-Zellen exprimiert (Barrow et al., 2019). Ein Beispiel für die Tumorzytotoxizität der NCRs ist die Aktivierung der NK-Zellen durch die Bindung von NKp30 an seinen Liganden B7 H6. Der Ligand B7 H6 wird auf Tumorzellen, nicht aber auf gesunden Zellen exprimiert (Vivier et al., 2012). Genetische Defizienzen von NKp46 zeigten in Mäusen eine eingeschränkte Beseitigung von verschiedenen Tumoren, während die Hochregulation des Rezeptors eine verbesserte Beseitigung von Melanom-Lungenmetastasen zeigte (Glasner et al., 2012; Glasner et al., 2017; Merzoug et al., 2014). NKp46 kann außerdem das Hämagglutinin von Influenzaviren erkennen, wodurch Influenza-infizierte Zellen über die NK-Zellzytotoxizität, ausgelöst durch die aktivierenden Signale von NKp46, lysiert werden können (Mandelboim et al., 2001).

1.3.4.4 Die NKG2-Rezeptorfamilie

Die NKG2-Rezeptorfamilie besteht aus den Rezeptoren NKG2A, C, D, E und F, von denen einige Rezeptoren aktivierend und einige inhibierend sind. Die Rezeptoren NKG2A, C und E bilden ein Dimer mit dem Typ-II-Membranprotein CD94 (Nutt & Huntington, 2019; Pegram et al., 2011). In dieser Dissertation wird der Fokus auf den inhibierenden Rezeptor NKG2A und den aktivierenden Rezeptor NKG2C gelegt. Beide Rezeptoren binden an das nicht-klassische MHC-I-Molekül HLA-E (Braud et al., 1998).

Der inhibierende Rezeptor NKG2A besitzt zwei Immunrezeptor-Tyrosin basierende Hemmmotive (*Immunereceptor tyrosine-based inhibitory motifs*; ITIMs). Durch den großen Einfluss des Rezeptors auf die NK-Zellaktivität ist NKG2A ein Ziel bei vielen immuntherapeutischen Ansätzen gegen Krankheiten, die beispielsweise mit einer Hochregulation von HLA-E assoziiert sind (McWilliams et al., 2016; van Montfoort et al., 2018). NKG2C ist ein aktivierender Rezeptor und ist assoziiert mit einem ITAM-tragenden DAP-12 Molekül.

1.3.5 T-Zellen

T-Zellen gehören zum adaptiven Immunsystem und können mit Hilfe ihres TCRs Fremdpeptide erkennen, die über MHC-Moleküle präsentiert werden. Für eine Aktivierung der T-Zellen wird neben dem TCR-Stimulus ein weiterer Co-Stimulus benötigt. T-Zellen werden durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD8 oder CD4 in zwei Gruppen eingeteilt (Parham, 2014).

1.3.5.1 CD8 T-Zellen

CD8 T-Zellen erkennen Peptide, die über MHC-I-Moleküle präsentiert werden. Dabei unterstützt das CD8-Molekül die Bindung zwischen T-Zelle und MHC-I-Molekül und der TCR erkennt das Peptid. Wird eine naive CD8 T-Zelle über den TCR und einem Co-Stimulator aktiviert, produziert diese IL-2, proliferiert, differenziert zu einer Effektor T-Zelle und zerstört pathogeninfizierte Zellen mit zytotoxischen Molekülen. Nach Beseitigung des Pathogens bleibt nur ein kleiner Teil der pathogenspezifischen CD8 T-Zellen zurück, die langlebigen Gedächtnis T-Zellen. Der Rest der Effektor T-Zellen werden nach Beseitigung des Pathogens durch Apoptose eliminiert (Badovinac et al., 2002; Gourley et al., 2004).

1.3.5.2 CD4 T-Zellen

CD4 T-Zellen werden auch T-Helferzellen genannt und können Fremdpeptide erkennen, die über MHC-II-Moleküle präsentiert werden. Dabei unterstützt das CD4-Molekül die Bindung zwischen T-Zelle und MHC-II-Molekül und der TCR erkennt das Peptid (Tay et al., 2021). Wird ein Fremdpeptid über den TCR erkannt und gibt es ein co-stimulatorisches Signal (z.B. über CD28 oder ICOS), proliferieren die Zellen und schütten immunmodulatorische Moleküle aus. Je nach Zytokinmilieu differenzieren die naiven CD4 T-Zellen zu unterschiedlichen T-Zellsubtypen, wie z.B. zu T-Helferzellen 2 (Th2) in Anwesenheit von IL-2 und IL-4, zu T-Helferzellen 9 (Th9) in Anwesenheit von TGF- β und IL-4 oder zu folliculären T-Helferzellen

(T_{FH}) in Anwesenheit von IL-6 und IL-21 (Luckheeram et al., 2012; Veldhoen et al., 2008; Zhu et al., 2006).

Besonders die T_{FH}-Zellen sind in Bezug auf eine gezielte Antikörperantwort gegen Pathogene durch B-Zellen essentiell. Über co-stimulatorische Rezeptoren wie CD40 und der Produktion von IL-21 und IL-4 werden B-Zellen aktiviert, reifen und proliferieren. Die Abwesenheit von T_{FH}-Zellen führt zu einer abgeschwächten und ungezielten Antikörperproduktion durch B-Zellen (Crotty, 2011, 2014; Swain et al., 2012).

1.3.6 B-Zellen

B-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems und essentiell für die humorale Antwort nach Infektionen mit Pathogenen. Die Antikörperproduktion ist die Hauptaufgabe von Plasmazellen, welche aus B-Zellen differenzieren. Zusätzlich können B-Zellen Zytokine produzieren und übernehmen antigenpräsentierende Funktionen (Cyster & Allen, 2019). Die Wichtigkeit der B-Zellen wird durch Patienten mit B-Zelldefizienzen deutlich. Neben Autoimmunerkrankungen ist auch der größte Anteil der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) auf B-Zellanomalien zurückzuführen (Chaudhari et al., 2019; Hampe, 2012).

Mit Hilfe des B-Zellrezeptors (BCR) kann die naive B-Zelle körperfremde Antigene erkennen, internalisieren und über MHC-II-Moleküle präsentieren. Bindet nun eine T_{FH}-Zelle mit dem TCR an das präsentierte Peptid und gibt es zusätzlich ein co-stimulatorisches Signal durch z.B. CD40L oder ICOS, wird die B-Zelle aktiviert, proliferiert und differenziert zur Plasmazelle. Bei T-Zell-unabhängiger Aktivierung der B-Zelle kommt das co-stimulatorische Signal z.B. über *toll-like*-Rezeptoren (TLRs). Die Plasmazelle ist anschließend in der Lage, Antikörper gegen das Antigen zu produzieren (Akkaya et al., 2020; Cyster & Allen, 2019).

1.4 NKG2C⁺ NK-Zellen und das Cytomegalovirus

Erhöhte Frequenzen von NKG2C⁺ NK-Zellen in CMV_{pos} Personen wurden erstmals im Jahre 2004 beschrieben (Guma et al., 2004). Die *in vivo* Expansion von NKG2C⁺ NK-Zellen nach einer akuten CMV konnte durch longitudinale Studien bei Transplantationspatienten bestätigt werden (Foley et al., 2012; Lopez-Verges et al., 2011). Die expandierten NKG2C⁺ NK-Zellen unterscheiden sich phänotypisch und funktionell von anderen NK-Zellpopulationen. Während auf der Oberfläche niedrigere Expressionen der aktivierenden NCRs messbar sind, können erhöhte Expressionen der inhibierenden KIR und dem CD85j Rezeptor beobachtet werden (Guma et al., 2004). Weitere phänotypische Merkmale von NKG2C⁺ NK-Zellen sind niedrigere Expressionen der Kinase Syk, dem Transkriptionsfaktor PLZF, dem intrazellulären

Adaptorprotein EAT-2 und dem Adaptormolekül FcεRIγ, was die Folge von epigenetischen Änderungen in diesen Zellen ist. Eine genomweite Analyse der DNA-Methylierung zeigt Ähnlichkeiten zwischen NKG2C⁺ NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (Schlums et al., 2015).

Funktionell zeigen NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu konventionellen NK-Zellen eine geringere IFNγ-Antwort nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 (Schlums et al., 2015). In einer anderen Studie zeigten NKG2C⁺ FcεRIγ⁻ NK-Zellen eine stärkere ADCC, aber eine schwächere Zytotoxizität gegen die Tumorzelllinie K562 (Kim et al., 2019). Das Homolog von NKG2C bei Mäusen ist Ly49H. Aufgrund schnellerer und stärkerer Aktivierung von Ly49H⁺ NK-Zellen bei einer Reexposition mit MCMV, wurden Ly49H⁺ NK-Zellen als adaptive NK-Zellen beschrieben (Sun et al., 2009). Auch beim Menschen werden adaptive Funktionen von NKG2C⁺ NK-Zellen diskutiert (Lopez-Botet et al., 2014). Oft werden die adaptiven NK-Zellen zusätzlich zur Expression von NKG2C durch die Expression von CD57 und/oder der fehlenden Expression von FcεRIγ definiert (Kared et al., 2018; Muccio et al., 2018).

In CMV_{neg} Personen gibt es wenig NKG2C exprimierende NK-Zellen. Bei CMV_{pos} Personen kann die NKG2C⁺ NK-Zellpopulation hingegen mehr als 50% aller NK-Zellen ausmachen (Picarda & Benedict, 2018; Wagner & Fehniger, 2016).

1.5 Regulation von T-Zellantworten durch NK-Zellen

Neben den Aufgaben der NK-Zellen, abnormale und infizierte Zellen zu erkennen, wird in der Literatur auch der Einfluss von NK-Zellen auf T-Zellen beschrieben. Ein positiver Effekt von NK-Zellen auf die T-Zellaktivität wird dadurch begründet, dass NK-Zellen IFNγ-Produzenten sind und IFNγ unter anderem die T-Zellproliferation unterstützt (Whitmire et al., 2007). Für limitierende Effekte von NK-Zellen auf die T-Zellimmunität gibt es ebenfalls einige Publikationen (Welsh & Waggoner, 2013). Die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Philipp Lang und Prof. Dr. Karl Lang konnten beispielsweise eine verbesserte T-Zellantwort und eine Prävention gegen einen chronischen Verlauf in NK-Zell defizienten Mäusen nach einer Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV)-Infektion messen. In derselben Publikation konnte mit Hilfe von blockierenden Antikörpern der aktivierende NKG2D-Rezeptor als einen Faktor ausgemacht werden, der die T-Zellantwort limitiert (Lang et al., 2012).

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten ebenfalls Einflüsse von NK-Zellen auf T-Zellantworten beobachten. Bei *in vitro* Expansionen von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen mit IL-2 und einem HLA-A*02:01-spezifischen CMV-Peptid (NLVPMVATV) konnte eine immunregulatorische Funktion von NK-Zellen auf die Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen festgestellt werden. Wurden NK-Zellen bei der T-Zell-expansion mittels

bestrahlten K562-Zellen voraktiviert, konnten weniger CMV-spezifische CD8 T-Zellen expandiert werden. Bei einer Depletion von NK-Zellen konnten hingegen mehr CMV-spezifische CD8 T-Zellen expandiert werden. Die verbesserte Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen wurde ebenfalls beobachtet, wenn nur NKG2C⁺ NK-Zellen depletiert wurden. Dies weist auf eine immunregulatorische Funktion von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen hin. Bei einem Vergleich von CMV-spezifischen und Influenza A-spezifischen (IAV) CD8 T-Zellen wurde eine höhere Basal-Oberflächenexpression des NKG2C-Liganden HLA-E auf CMV-spezifischen CD8 T-Zellen gemessen. Während der *in vitro* Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen konnte ein Anstieg der HLA-E Expression gemessen werden (Grutza et al., 2020). Daher wird die NKG2C/HLA-E-Interaktion als ein Faktor für die immunregulatorische Funktion von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen diskutiert.

1.6 Ziele der Dissertation

CMV-assoziierte NKG2C⁺ NK-Zellen weisen im Vergleich zu anderen NK-Zellpopulationen sowohl phänotypische als auch funktionelle Unterschiede auf. In der Vergangenheit konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen durch NKG2C⁺ NK-Zellen reguliert wird (Grutza et al., 2020). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von NKG2C⁺ NK-Zellen auf T-Zellen in Abhängigkeit ihrer Oberflächenexpression des NKG2C-Liganden HLA-E untersucht. Dazu wurden Jurkat-Zellen benutzt, deren HLA-E Expression peptidspezifisch erhöht werden kann. Da die *in vivo* Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen aufgrund der Schwierigkeit in der Diagnose einer primären CMV-Infektion in gesunden Personen angesichts der Asymptomatik nicht realisierbar war, sollte in dieser Arbeit die *in vivo* CD8 T-Zellantwort nach einer Influenza-Impfung untersucht werden.

Zusätzlich wurde der Einfluss von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die humorale Antwort nach einer Influenza- bzw. einer SARS-CoV-2-Impfung untersucht. Da B-Zellen eine hohe Oberflächenexpression von HLA-E aufweisen, ist auch hier ein Einfluss von NKG2C⁺ NK-Zellen denkbar. Aufgrund der bekannten funktionellen Unterschiede von NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu anderen Zellpopulationen wurden NKG2C⁺ NK-Zellen außerdem detailliert phänotypisch charakterisiert, um Hinweise auf weitere funktionelle Unterschiede zu finden (Liu et al., 2020). Neben einer verbesserten ADCC werden NKG2C⁺ NK-Zellen mit guten antiviralen Eigenschaften in Verbindung gebracht (Kim et al., 2019; Song et al., 2020). Hier wurde die Aktivität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen Influenza-infizierte MRC-5-Zellen untersucht.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CMV-bedingten Änderungen, besonders der Expansion von NKG2C⁺ NK-Zellen, auf die Immunantwort gegen andere Viren untersucht. Dazu wurden unter anderem Immunantworten nach Impfungen charakterisiert. Zusätzlich gibt diese Arbeit mit Hilfe der detaillierten phänotypischen Charakterisierung von NKG2C⁺ NK-Zellen neue Einblicke in das veränderte Oberflächenexpressionsmuster von CMV-assoziierten NKG2C⁺ NK-Zellen gegenüber anderen NK-Zellpopulationen.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Ausrüstung

Gerät	Name	Hersteller
-80 °C Schrank	U725-G Innova®	New Brunswick Scientific
-80 °C Schrank	V86G-830.1	EWALD
-20 °C Schrank	Gefrierschrank	Liebherr
4 °C Kühlschrank	Kühlschrank	Bosch
Durchflusszytometer	FACSCanto II, FACS LSRFortessa™	Becton Dickinson
Durchflusszytometerröhrchen	Polystyrene Round-Bottom FACS tubes 5 mL	Becton Dickinson
Eismaschine	Flockeneisbereiter AF 100	Scotsman
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™ Cryo 1°C	
Immunassaysystem	Architect i2000SR	Abbott Core Laboratory
Inkubator	BBD 6620	Thermo Fisher Scientific
Flüssigstickstofftank	Biosafe® MD	Cryotherm
	HEco Series 800-190	Chart MVE
	Cryo Plus 3	Thermo Fisher Scientific
Laborflaschen (1000 mL)	Duran® Laborgewindeflasche	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop	TS100	Nikon
Multipette	Multipette® plus	Eppendorf
Pipettenhilfe	pipetus®	Hirschmann
Plattenlesegerät	Sunrise™ Absorbance Reader	Tecan Group
Reinstwasseranlage	Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System	Merck
Sterilbänke	Hera Safe	Heraeus
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermostat	ThermoStat plus	Eppendorf
Vortexer	L46 Power Mixer	Labinco

	VV3	VWR
Wasseraufbereitungssystem	Millipore Anlage	Merck Millipore
Wasserbad	GFL 1092	Gesellschaft für Labortechnik
Zellzähler	XP-300 cell counter	Sysmex
Zentrifugen	3K30	Sigma
	Allegra X-15R Centrifuge	Beckman Coulter
	Centrifuge 5415D	Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
C-Chip Einweg-Zählkammer	NanoEnTek
Leucosep™ Röhrchen (50 mL)	Greiner
Spritze (Syringe Omnifix® 20 ml)	Braun
Spritzenfilter (0,8 µm)	Whatman
Stripetten® (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Corning
Reagenzienwanne	VWR
Reaktionsgefäße (1,5 mL & 2 mL)	Eppendorf
Pancoll (human)	PAN-Biotech
Pipettenspitzen (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Starlab
Zellkulturflasche 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² (T-25; T-75; T-175)	Corning
Zellkulturplatte (6-Loch, 12-Loch)	TPP
Zellkulturplatte (48-Loch)	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte (24-Loch)	Corning
Zellkulturplatte (96-U-Loch)	VWR International
Zellkulturplatte (96-V-Loch)	BioLegend
Kryokonservierungsröhrchen (2 mL) (Cryo-Röhrchen)	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen (15 mL & 50 mL)	Greiner Bio-One

2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Impfstoffe

Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Impfstoffe	Hersteller
2-Propanol	VWR International
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substratlösung	Thermo Fisher Scientific

Azeton	Merck
Azetyliertes Trypsin	Sigma-Aldrich
BD FACS™Clean	Becton Dickinson
BD FACS™Flow	Becton Dickinson
BD FACS™Rinse	Becton Dickinson
Comirnaty (BNT162b2) Impfstoff	BioNTech/Pfizer
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich
Cellclean® CL50	Sysmex
Cellpack®	Sysmex
Cytometer Setup & Tracking Beads Kit (CST beads)	Becton Dickinson
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,8%	Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, 1X (DPBS)	Gibco
Ethanol	Merck
Fetales Kälberserum (FCS) Superior	Biochrome
Foxp3/Transkriptionsfaktor-Fixation/Permeabilisierungspuffer	eBioscience
HEPES Puffer (1M)	Gibco
Hühnererythrozyten, 25% Vollblutsuspension	Labor Dr. Merk
Influenza Kontrollserum (Ziege)	International Reagent Ressource
Influvac® Tetra Saison 2019/20	Mylan Healthcare GmbH
Influvac® Tetra Saison 2020/21	Mylan Healthcare GmbH
Intrazellulärer Fixationspuffer	eBioscience
IL-2 (human)	Reprokine
Milchpulver	Sucofin
Pancoll (human)	Pan Biotech
Ionomycin	Calbiochem
Penicillin/Streptomycin (100x) PenStrep	Gibco
Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Rezeptor-zerstörendes Mittel (RDE-Lösung)	Denka Seiken
Rinderserumalbumin (BSA) (7,5%)	Gibco
RPMI Medium 1640 1x + GluraMAX™	Gibco
Schwefelsäure (0,25 M)	Thermo Fisher Scientific

Trypanblau	Gibco
Trypsin-EDTA (0,05%; 1x)	Gibco
Tween®20	Sigma-Aldrich

2.1.4 Kits

Kit	Hersteller
19/20 WHO Influenza Reagenzkit	International Reagent Ressource
20/21 WHO Influenza Reagenzkit	International Reagent Ressource
Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac ELISA	Euroimmun
Architect CMV IgG Reagent Kit	Abbott Core Laboratory
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit	Thermo Fisher Scientific
CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit	Thermo Fisher Scientific
easYmer® Kit	ImmunAware
LEGENDScreen™ Human PE Kit	BioLegend

2.1.5 Peptide

Aminosäuresequenz (5'-3')	Hersteller
VMAPRTLFL (p914)	EMC Custom Peptide
GILGFVFTL (p257)	EMC Custom Peptide
NREESMELMDL (p _{NRE})	ImmunAware
TVLEKNVTV (p00)	peptides & elephants
RLATGLRNV (p01)	peptides & elephants
VLLENERTL (p02)	peptides & elephants
AIDKITNKV (p03)	peptides & elephants
FLDIWTYNA (p04)	peptides & elephants
KMNTQFTAV (p05)	peptides & elephants
FQNVHPVTI (p06)	peptides & elephants
FQNVHPITI (p07)	peptides & elephants
NLYEKVRNQL (p08)	peptides & elephants
TVASSLVLV (p09)	peptides & elephants
KITNKVNSV (p10)	peptides & elephants

YINDKGKEV (p11)	peptides & elephants
TLDYHDSNV (p12)	peptides & elephants
SLYQNADAYV (p13)	peptides & elephants
KLNREKIDGV (p14)	peptides & elephants
HLEKRIENL (p15)	peptides & elephants
VLLYTFTTA (p16)	peptides & elephants
YQNADAYVFFV (p17)	peptides & elephants
KVDDGFLDI (p18)	peptides & elephants
ELREQLSSV (p19)	peptides & elephants
GLFGAIAGFI (p20)	peptides & elephants
NLLEDKHNGKL (p21)	peptides & elephants
KLGGVAPLHL (p22)	peptides & elephants
SLPFQNVHPV (p23)	peptides & elephants
KLCKLGGVAPL (p24)	peptides & elephants
VLWGIHHPPTT (p25)	peptides & elephants
VLWGIHHPPTI (p26)	peptides & elephants

2.1.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie und Immunfärbung

Spezifität	Fluochrom	Klon	$\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Mastermix	Hersteller
CD2	BV711	RPA-2.10	1	BioLegend
CD3	BV650	OKT3	0,5	BioLegend
CD3	eFluor 450	OKT3	2	eBioscience
CD3	eFluor 506	UCHT1	2	eBioscience
CD4	Alexa Fluor 700	RPA-T4	1	eBioscience
CD4	BV786	RPA-T4	0,5	Becton Dickinson
CD4	APC-eFluor 780	RPA-T4	2	eBioscience
CD8	FITC	RPA-T8	1	eBioscience
CD8	PE/Dazzle 594	SK1	0,1	BioLegend
CD14	eFluor 450	61D3	0,5	eBioscience
CD14	eFluor 506	61D3	1	eBioscience
CD16	BV785	3G8	0,125	BioLegend
CD16	PE-Cy5	3G8	0,1	BioLegend

CD18 (Integrin β 2)	APC-Fire750	CBR LFA-1/2	5	BioLegend
CD19	eFluor 450	1D3	0,5	eBioscience
CD19	eFluor 506	1D3	0,5	eBioscience
CD19	eVolve605	1D3	2	eBioscience
CD27	PerCP-eF710	O323	1	eBioscience
CD31 (PECAM-1)	PE/Dazzle 594	WM59	0,2	BioLegend
CD44	BV605	IM7	0,2	BioLegend
CD45RA	APC	HI100	2	eBioscience
CD49d (Integrin β 7)	PE-Cy7	9F10	0,5	BioLegend
CD49f (Integrin α 6)	APC	GoH3	0,5	BioLegend
CD52 (CAMPATH-1)	APC-Fire750	HI186	2	BioLegend
CD56	BV785	5.1H11	0,1	BioLegend
CD56	PerCP-eF710	CMSSB	0,5	eBioscience
CD57	BV605	QA17A04	0,2	BioLegend
CD69	APC	FN-50	2	BioLegend
CD69	PE/Dazzle 594	FN-50	0,5	BioLegend
CD107a (LAMP-1)	AF700	H4A3	2	Becton Dickinson
CD107a (LAMP-1)	PE-Cy7	H4A3	2	Becton Dickinson
CD119 (IFN γ R1)	APC	REA161	2	Miltenyi Biotec
CD158b	APC	NKAT2	2	BioLegend
CD159a (NKG2A)	FITC	REA110	2	Miltenyi Biotec
CD159c (NKG2C)	APC	REA205	2	Miltenyi Biotec
CD159c (NKG2C)	BV421	RUO	0,25	Becton Dickinson
CD159c (NKG2C)	PE	134591	5	R&D Systems
CD160	APC	BY55	2	BioLegend
CD161	BV605	HP-3G10	2	BioLegend
CD197 (CCR7)	BV421	G043H7	1	BioLegend
CD223 (LAG-3)	BV711	11C3C65	2	BioLegend
CD278 (ICOS)	BV711	CD398.4A	1	BioLegend
CD328 (SIGLEC-7)	PerCP-Cy5.5	6-434	0,5	BioLegend
CD335 (NKp46)	PE-Cy7	9E2	1	BioLegend
CD335 (NKp46)	BV650	9E2	2	BioLegend
CD337 (NKp30)	APC-Fire750	P30-15	5	BioLegend

CD366 (TIM-3)	PE-Cy7	F38-2E2	2	eBioscience
HLA-DR	BV711	L243	0,5	BioLegend
HLA-E	PE-Cy7	3D12	2	eBioscience
IFN γ	FITC	4S.B3	1	eBioscience
Granzym B	PE/Dazzle 594	QA16A02	5	BioLegend
Ki-67	Pacific Blue	16A8	0,5	BioLegend
KLRG1	PE	REA261	5	Miltenyi Biotec
Multimer _(NLVPMVATV)	PE	-	1	Immudex
Multimer _(GILGFVFTL)	PE	-	1	Immudex
Nukleoprotein (NP)	-	9C11	1:2000	Invitrogen
Zellviabilität	eFluor 506	-	0,1	eBioscience
Zellviabilität	eFluor 780	-	0,2	eBioscience
Ziegen anti-Maus IgG-HRP-gekoppelt	sekundärer AK	-	1:5000	Invitrogen

2.1.7 Software

Software	Version	Hersteller
FlowJo	V10.7.1	Tree Star, Inc.
Geneious	7.1.9	Biomatters Ltd.
GraphPad PRISM	9.0.0	GraphPad Software, Inc.
Microsoft Office	2016	Microsoft Corporation
LEGENDplex™ Data Analysis	V8.0	Vigenetech, Inc.
R	4.1.0	R Core Team

2.1.8 Zelllinien

2.1.8.1 Jurkat-Zellen

Die Jurkat-Zelllinie ist eine immortalisierte, lymphatische Leukämie Human-CD4 T-Zelllinie und wurde vom peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen abgeleitet, der an akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) erkrankte (Schneider et al., 1977). Besonders für Experimente bei T-Zell immunologischen Fragestellungen werden Jurkat-Zellen häufig als Modellzelllinie genutzt. Mittlerweile gibt es beispielsweise für die Erforschung von Signalkaskaden viele Jurkat-Zelllinien mit Mutationen im TCR-Signalweg (Abraham & Weiss, 2004).

2.1.8.2 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-Zellen

Die MDCK-Zelllinie wurde von Epithelzellen einer gesunden Hundeniere abgeleitet und wird unter anderem aufgrund der schnellen Wachstumsrate als Modellzelllinie in verschiedenen Forschungsbereichen benutzt (Madin & Darby, 1958). Da MDCK-Zellen permissiv für viele verschiedene Influenzaviren sind, ist diese Zelllinie die meist genutzte Modellzelllinie in der Influenza-Forschung und wird auch bei der Herstellung von Influenza-Impfstoffen eingesetzt (Doroshenko & Halperin, 2009; Gregersen et al., 2011; Lugovtsev et al., 2013).

2.1.8.3 Medical Research Council cell strain 5 (MRC-5)-Zellen

Die MRC-5-Zelllinie wurde im Jahre 1966 aus der Lunge eines 14-wöchigen gesunden männlichen Fötus abgeleitet. Die Abtreibung des Fötus erfolgte aufgrund psychiatrischer Ursachen der 27-jährigen Mutter (Jacobs, 1976; Jacobs et al., 1970). MRC-5-Zellen sind permissiv für Herpes-simplex-, Cytomegalo-, Polio-, Influenza- und weitere Viren und sind die meist genutzte fibroblastenähnliche humane diploide Zelllinie für die Produktion von viralen Impfstoffen (de Ona et al., 1995; Smith, 1986; Zhang et al., 2014).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Ansetzen von Zellkulturmedien

Das FCS Superior wurde für mindestens 30 min bei 56°C inaktiviert. Für das Arbeiten mit PBMCs und Jurkat-Zellen wurde R10 Medium benutzt. Für das Arbeiten mit MDCK- und MRC-5-Zellen wurde DMEM benutzt:

Bestandteile des R10 Mediums:

RPMI Medium 1640
10% FCS Superior
100 IU/mL Penicillin
100 µg/mL Streptomycin

Bestandteile des DMEMs:

DMEM
10% FCS Superior
100 IU/mL Penicillin

100 µg/mL Streptomycin

10 mM HEPES

Bestandteile des Infektionsmediums für die Infektion von Zellen mit Influenza A Viren:

DMEM

100 IU/mL Penicillin

100 µg/mL Streptomycin

10 mM HEPES

0,2% BSA

2 µg/mL azetyliertes Trypsin

Zum Einfrieren von PBMCs und Zelllinien wurde ein Einfriermedium (*Freezing Medium*: FCS + 10% DMSO) benutzt.

2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Cryo-Röhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurden aus dem Flüssigstickstofftank herausgenommen und im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt, in denen 9 mL PBS vorgelegt wurde. Die Zellen wurden für 10 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 10 mL PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert (10 min bei 200 x g), der Überstand verworfen und die Zellen wurden mit dem jeweiligen Medium auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 1 mL *Freezing Medium* aufgenommen und in Cryo-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Cryo-Röhrchen in Isopropanol befüllte Gefrierbehälter überführt und für mindestens 120 min im -80°C Schrank gelagert. Danach wurden die Cryo-Röhrchen in den Flüssigstickstofftank eingeräumt.

2.2.1.3 Zelllinienhandhabung

Nach dem Auftauen der Zelllinien (siehe 2.2.1.2) wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit dem entsprechenden Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden je nach Dichte (für nicht-adhärenente Zellen) bzw. Konfluenz (für adhärenente Zellen) passagiert.

Bei nicht-adhärenenten Zellen wurde die Zellsuspension je nach Split-Verhältnis in neue Zellkulturflaschen überführt, in denen vorher neues Medium vorgelegt wurde. Möglicher

Zellschrott wurde, wenn nötig, vorher mittels Zentrifugation (10 min bei 200 x g) und einem Waschschrift entfernt.

Bei adhären Zellen wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen wurden mit 10 mL PBS gewaschen und trypsinisiert. Bei der Trypsinierung wurden 5 mL 0,05% Trypsin-EDTA (1x) zu den Zellen pipettiert und auf dem Zellrasen durch Schwenken verteilt. Nach dem Schwenken wurde das Trypsin-EDTA wieder abgenommen und die Zellkulturflasche wurde 5 - 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde neues Medium hinzugefügt, die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in der gewünschten Konzentration in die neue Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.4 HLA-E Peptidstabilisierung und Tracing von Jurkat-Zellen

Um die HLA-E Expression auf der Oberfläche von Jurkat-Zellen zu stabilisieren, wurde ein HLA-G Leader-Peptid (p914; Aminosäuresequenz: VMAPRTLFL) benutzt, welches an HLA-E binden kann (Strong et al., 2003). Dazu wurden die Jurkat-Zellen bei einer Zelldichte von 1 Mio. Zellen/mL mit 100 µM Peptid in R10 Medium für 16 - 20 h bei 26°C ÜN inkubiert. Als Kontrolle wurden die Jurkat-Zellen ohne Peptid inkubiert. Für das Tracing wurden die Zellen mit dem *CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit* (HLA-E^{low}) oder dem *CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit* (HLA-E^{high}) von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerprotokoll gefärbt.

2.2.1.5 Hochzüchten des Influenzastamms A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (A/PR/8/34)

Ein Aliquot des Influenzastamms A/PR/8/34 (H1N1) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Schwemmler vom Institut für Virologie des Universitätsklinikums Freiburg bereitgestellt. Für das Hochzüchten des Influenzastamms wurden MDCK-Zellen benutzt. Vor dem Tag der Infektion wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 in T-175 Flaschen passagiert (siehe 2.2.1.3). Am Tag der Infektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit 20 mL PBS gewaschen. Anschließend wurde der Virusstock in einem Verhältnis von 1:10 mit Infektionsmedium verdünnt (siehe 2.2.1.1) und 5 mL des Virusinfektionsmediums wurden auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C im Brutschrank auf einem Schüttler infiziert. Anschließend wurde das Virusinfektionsmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit 20 mL PBS gewaschen und anschließend für drei bis vier Tage im Infektionsmedium inkubiert. Für das Ernten des neuen Virusstocks wurde der Virusüberstand nach drei bis vier Tagen aliquotiert.

2.2.1.6 Bestimmung der Infektiosität von Influenzastämmen

Für die Bestimmung der Infektiosität wurde ein *Tissue Culture Infection Dose 50* (TCID₅₀)-Test durchgeführt. Dabei wird beobachtet, bei welcher Viruskonzentration 50% der Löcher einer Platte mit Zellen einen zytopathischen Effekt (ZPE) in den Zellen zeigen. Für genauere Auswertungen der Infektiosität der Influenzaviren wurden hier Löcher mit infizierten Zellen mit Hilfe einer intrazellulären Immunfärbung des Nucleoproteins (NP) vom Influenzavirus gemessen.

Am Tag vor der Infektion wurden je 2.500 MDCK-Zellen in einer Zellkonzentration von 25.000 Zellen/mL pro Loch in eine 96-Lochplatte ausgesät und ÜN bei 37°C inkubiert. Am Tag der Infektion wurde der Überstand verworfen, die Zellen wurden mit 250 µL PBS gewaschen und anschließend für zwei Tage mit 100 µL Virus enthaltenem Infektionsmedium inkubiert. Dabei wurden elf Verdünnungen (zweifach) des Virusstocks in achtfacher Ausführung getestet (Abbildung 2.1).

Nach Tag zwei wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden mit 250 µL PBS gewaschen. Für die Fixierung wurden die Zellen für 15 min mit 100 µL 80%-igem eiskaltem Azeton, gelöst in PBS, auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Fixativ abgenommen und die Platte wurde luftgetrocknet. Danach wurden die Zellen dreimal mit 250 µL Waschpuffer (0,3% Tween®20 in PBS gelöst) gewaschen. Für das Blockieren wurden die Zellen für 30 min mit 100 µL Blockierpuffer (5% Milchpulver in Waschpuffer gelöst) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit 100 µL des monoklonalen anti-Influenza A NP Antikörpers (1 zu 2000 in Blockierpuffer verdünnt) bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 250 µL Waschpuffer gewaschen und für 1 h mit 100 µL Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltem Ziegen-anti-Maus IgG Antikörper (1 zu 5000 in Blockierpuffer verdünnt) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sechsmal mit 250 µL Waschpuffer gewaschen und für 5 min mit 100 µL Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 100 µL 0,25 M Schwefelsäure zu den Zellen pipettiert.

Für die Analyse der Proben wurde die Absorption mit einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nM gemessen. Als Referenzwellenlänge wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 652 nm gemessen. Jede Probe, die eine mindestens zweifach erhöhte optische Dichte (*optical Density*; OD) bei einer Wellenlänge von 450 nM im Gegensatz zu der Zellkontrolle hatte, wurde als positiv für Viruswachstum gewertet. Für die Berechnung der Infektiosität des Virusstamms wurde die Reed-Münch Methode benutzt (Reed & Muench, 1938). Die Infektiosität der Virusstocks wurde in der Einheit TCID₅₀/mL wiedergegeben.

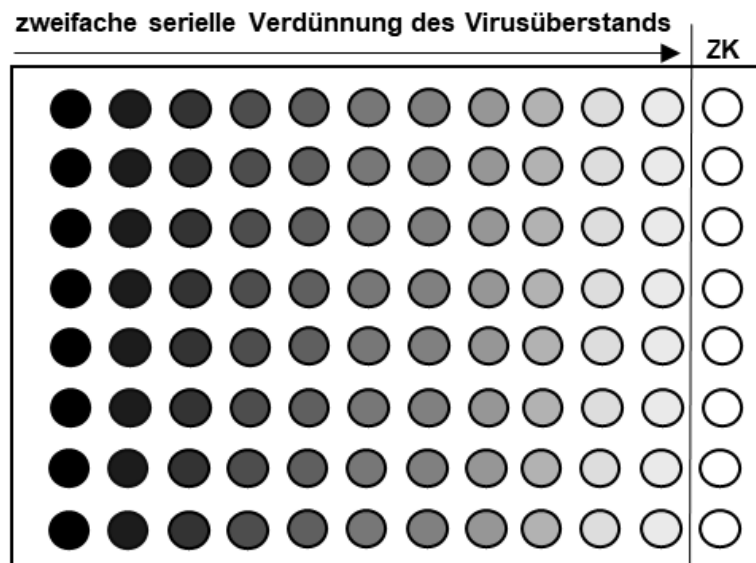


Abbildung 2.1 - Plattenlayout des TCID₅₀-Tests.

Der Virusüberstand wurde in einer zweifachen seriellen Verdünnungsreihe mit dem Infektionsmedium verdünnt. Abkürzung: ZK = Zellkontrolle.

2.2.2 Experimente mit peripherem Blut als Ausgangsmaterial

2.2.2.1 Aufreinigung von PBMCs

Das Vollblut der Probanden der Influenza-Kohorten wurde bei der Blutentnahme mit EDTA-Röhrchen aufgefangen. Das Ausgangsmaterial für die Aufreinigung von PBMCs und Plasmen der Blutspender aus der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf waren *buffy coats*. Die Blutentnahme und Aufreinigung der Blutbestandteile geschah mit Genehmigung der örtlichen Ethikkommission. Das Blut wurde für die Trennung von Lymphozyten und den restlichen Blutbestandteilen in einem Verhältnis von 1:2 mit PBS verdünnt und in einem 50 mL Leucosep™ Röhrchen mittels Dichtezentrifugation für 15 min bei 1100 x g zentrifugiert. Als Dichtegradientlösung wurde 15 mL Pancoll (*human*) von PAN-Biotech (Dichte: 1,077 g/mL) benutzt. Anschließend wurde der Lymphozytenring resuspendiert, der Überstand über dem Filter in ein neues 50 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die PBMCs in *Freezing* Medium (FCS + 10% DMSO) gelöst, auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und in 2 mL Cryo-Röhrchen aliquotiert. Mit Hilfe eines Gefrierbehälters für Cryokonservierung (Mr. Frosty™) wurden die Zellen im -80°C Schrank um 1°C/min abgekühlt und eingefroren. Nach mindestens 120 min wurden die Cryo-Röhrchen in den Flüssigstickstofftank überführt (siehe 2.2.1.2).

2.2.2.2 Expansion von virusspezifischen CD8 T-Zellen

Für die Expansion von virusspezifischen CD8 T-Zellen wurden PBMCs für 10 - 14 Tage bei 37°C in einer Konzentration von 2 Mio. Zellen/mL in R10 Medium mit 25 IU/mL IL-2 und 1 µg/mL Peptid inkubiert. An Tag 7 und 10 (bei einer Expansion über 14 Tage) wurden die Zellen mit neuem R10 Medium (halbes Ausgangsvolumen) mit 25 IU/mL IL-2 gefüttert. Die Expansion wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Multimeren bestimmt (siehe 2.2.3). Waren keine fluoreszenzmarkierten Multimere vorhanden, wurde die Frequenz von IFN γ ⁺ CD8 T-Zellen nach einer Restimulation mit dem Peptid an Tag 10 bzw. Tag 14 gemessen. Bei der Restimulation wurden 250 µL aus der Expansionskultur in 96-Lochplatten überführt. Die Zellen wurden für 3 min bei 750 x g herunterzentrifugiert und mit 250 µL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 h mit 10 µg/mL Peptid und 10 ng/mL Brefeldin A (BFA) in 100 µL R10 Medium restimuliert. Mit Hilfe von BFA werden Vesikeltransportprozesse in der Zelle inhibiert, was folglich die Exozytose von Zytokinen verhindert (Takatsuki, 2002). Die Frequenz der IFN γ ⁺ CD8 T-Zellen wurde dann durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.2.3 Caspase 3/7-Aktivitätsassay in Jurkat-Zellen

Nach dem Auftauen der PBMCs wurden die Zellen in einer Zelldichte von 2 Mio. Zellen/mL mit 1 ng/mL IL-15 ÜN voraktiviert. Bei den Jurkat-Zellen wurde die HLA-E Expression auf der Oberfläche stabilisiert und die Jurkat-Zellen wurden markiert (siehe 2.2.1.4). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Hilfe des Sysmex Zellzählers gezählt und im Effektor/Target-Verhältnis (E:T) von 10:1:1 (PBMCs:Jurkat-HLA-E^{low}:Jurkat-HLA-E^{high}) in die vorgesehene Zellkulturplatte eingesetzt. Als Kontrolle wurden keine PBMCs eingesetzt. Die Zellen wurden für 24 h bei 26°C und einer Zelldichte von 4 Mio. PBMCs/mL co-kultiviert. Anschließend wurden die Jurkat-Zellen mit dem *CellEvent Caspase 3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit* von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerprotokoll gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.2.4 Funktionelle Analysen von NK-Zellen nach Kultur mit Jurkat-Zellen

Das HLA-E Molekül wurde für dieses Experiment auf der Oberfläche der Jurkat-Zellen peptidstabilisiert (siehe 2.2.1.4). Die PBMCs wurden für 5 h bei 37°C mit den Zielzellen in einem E:T-Verhältnis von 10:1 und einer Zellkonzentration von 4 Mio. PBMCs/mL in R10 Medium mit 10 ng/mL BFA co-kultiviert. Anschließend wurden die NK-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.2.5 Funktionelle Analysen von NK-Zellen nach Kultur mit Influenza-infizierten MRC-5-Zellen A/PR/8/34 (H1N1)

Die MRC-5-Zellen wurden zwei Tage vor dem Experiment in 24-Lochplatten ausgesät. Dazu wurde der Überstand der MRC-5-Zellen abgenommen und die Zellen wurden einmal mit 20 mL PBS gewaschen. Zum Ablösen der MRC-5-Zellen wurde 5 mL Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche pipettiert. Das Trypsin/EDTA wurde durch Schwenken verteilt und wieder abgenommen. Nach 5 - 15 min Inkubation bei 37°C wurden die gelösten Zellen mit 10 mL neuem Medium durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Zum Zählen der Zellen wurde die Zellsuspension in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau verdünnt. 10 µL der Zellverdünnung wurden auf eine C-Chip Einweg-Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop analysiert. Alle lebenden Zellen in den Eckquadraten wurden gezählt und die Zellkonzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellkonzentration} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Faktor der Zählkammer} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der Eckquadrate}}$$

Anschließend wurden die Zellen in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 10 min bei 200 x g zentrifugiert, einmal mit 20 mL PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und mit DMEM in einer Zellkonzentration von 200.000 Zellen/mL aufgenommen. Anschließend wurden 500 µL der Zellsuspension in eine 24-Lochplatte ausgesät und ÜN bei 37°C inkubiert (Zellkonzentration: 100.000 MRC-5-Zellen/Loch).

Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden mit 1 mL PBS gewaschen. Für die Infektion wurde der Virusstock des Influenzastamms A/PR/8/34 (H1N1) 1:2 in Infektionsmedium verdünnt und 100 µL des verdünnten Virusstocks wurden zu den Zellen pipettiert (MOI: 0,16). Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C geschwenkt. Danach wurde der Überstand abgenommen, die Zellen wurden mit 1 mL PBS gewaschen, in 500 µL neuem Infektionsmedium aufgenommen und ÜN bei 37°C inkubiert. Am gleichen Tag wurden die PBMCs für das Experiment aufgetaut (siehe 2.2.1.2) und in einer Zellkonzentration von 2 Mio. PBMCs/mL in R10 Medium ÜN bei 37°C inkubiert. Die Zellzahlbestimmung der PBMCs wurde automatisiert mit Hilfe des Sysmex Zellzählers durchgeführt.

Am Tag des Experiments wurde das Medium der MRC-5-Zellen abgenommen, die Zellen wurden mit 1 mL PBS gewaschen und in 250 µL R10 Medium mit einem fluoreszenzmarkiertem CD107a Antikörper aufgenommen, um später die Degranulation der NK-Zellen messen zu können (siehe 2.1.6). Die PBMCs wurden resuspendiert, in 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Danach wurden die

Zellen einmal mit 10 mL PBS gewaschen und in 2 Mio. PBMCs/mL mit R10 Medium aufgenommen. 250 µL der Zellsuspension wurden zu den MRC-5-Zellen pipettiert, um ein E:T-Verhältnis von 5:1 zu erreichen (Endkonzentration der Zellen: 500.000 PBMCs/Loch; 100.000 MRC-5-Zellen/Loch). Die PBMCs und MRC-5-Zellen wurden für 5 h bei 37°C co-kultiviert. Anschließend wurden die PBMCs mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe 2.2.3). Als Kontrollen wurden PBMCs ohne MRC-5-Zellen und mit nicht infizierten MRC-5-Zellen inkubiert.

2.2.3 Durchflusszytometrie-Analysen

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 3 min bei 750 x g. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet kurz gevortext. Bei einem Waschschriff wurde der Überstand nach einer Zentrifugation verworfen, die Zellen wurden in 250 µL PBS gelöst und erneut herunterzentrifugiert. Für Durchflusszytometriefärbungen von Zellen wurden zwischen 0,5 Mio. und 5 Mio. Zellen/Loch in eine 96-Lochplatte pipettiert und anschließend herunterzentrifugiert.

Bei Färbungen von virusspezifischen T-Zellen wurden die Zellen nach einem Waschschriff für 20 min mit je 100 µL des Mastermix mit fluoreszenzmarkiertem Multimer, gelöst in PBS, bei RT inkubiert.

Nach einem Waschschriff wurden die Zellen für die Lebend/Tot-Färbung für 15 min mit je 100 µL des Mastermix mit fixierbarem Vitalitätsfarbstoff, gelöst in PBS, bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff wurden die Oberflächenmoleküle für 15 min mit je 100 µL des Antikörpermastermix, gelöst in PBS, bei RT inkubiert. Die benutzten fluoreszenzmarkierten Antikörper sind in Abschnitt 2.1.6 aufgeführt. Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen gewaschen und für die Fixierung für 10 min mit je 50 µL des intrazellulären Fixierungspuffers bei RT inkubiert. Falls keine intrazellulären Moleküle analysiert werden sollten, wurden die Zellen anschließend gewaschen, in 100 µL PBS gelöst und am Durchflusszytometer gemessen.

Bei intrazellulären Färbungen wurden die Zellen nach der Fixierung zweimal mit je 250 µL 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen und für die Färbung der intrazellulären Moleküle für 15 min mit je 100 µL des Antikörpermastermix, gelöst in 1x Permeabilisierungspuffer, bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend in 100 µL PBS gelöst und am Durchflusszytometer gemessen.

Für die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen zur Färbung des intranukleären Ki-67-Proteins wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung und dem Waschen für 60 min

mit 200 μL Foxp3/Transkriptionsfaktor-Fixations-/Permeabilisierungspuffer bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen und für 30 min mit je 100 μL des Antikörpermastermix, gelöst in 1x Permeabilisierungspuffer, abgedunkelt bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 100 μL PBS gelöst und am Durchflusszytometer gemessen. Die Durchflusszytometriedaten wurden mit Hilfe der *FlowJo_V10*-Software analysiert (Abbildung 2.2 und Abbildung 2.3).

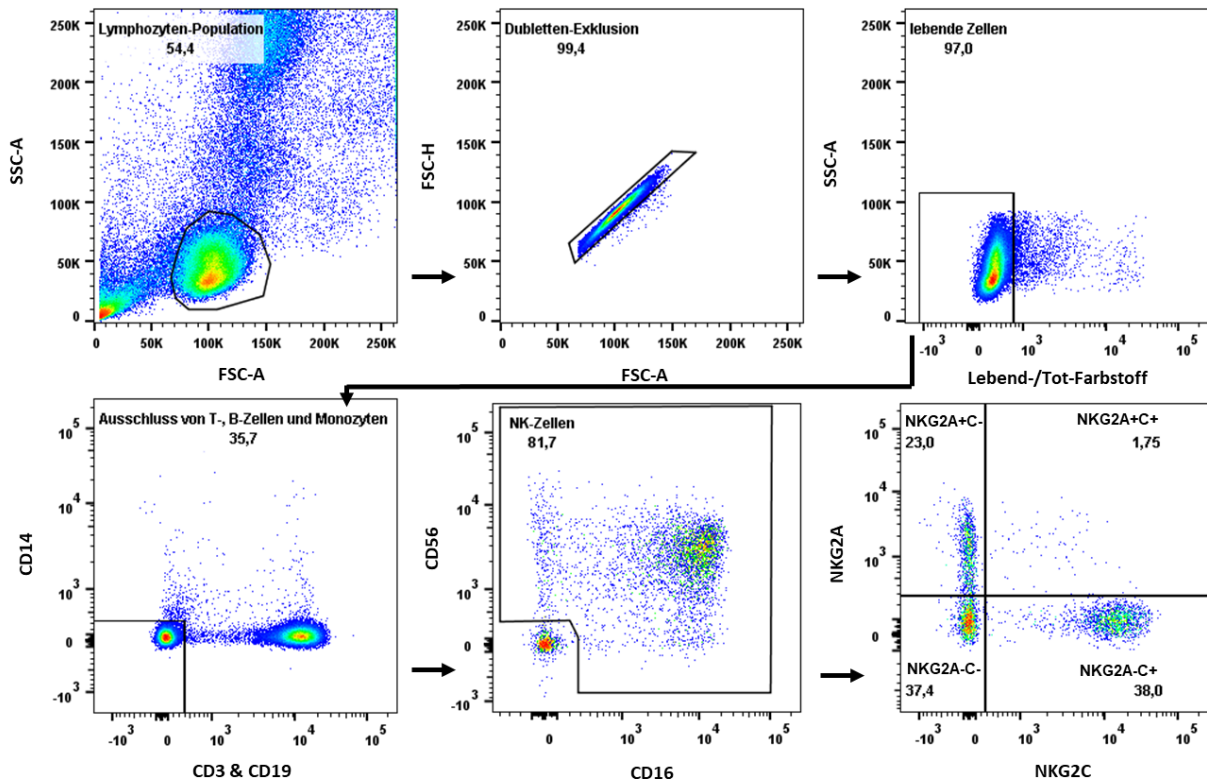


Abbildung 2.2 – Identifikation von NK-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Nach Auswahl der Lymphozytenpopulation wurden Zell-Dubletten mit Hilfe des *Forward-Scatter-Height-* (FSC-H) und *Forward-Scatter-Area-* (FSC-A) Signals exkludiert. Tote Zellen, T-, B-Zellen und Monozyten wurden mit Hilfe von Signalen des Lebend-Tot-Farbstoffs, CD3-Antikörpers (für T-Zellen), CD19-Antikörpers (für B-Zellen) und CD14-Antikörpers (für Monozyten) exkludiert. NK-Zellen wurden über die Expression von CD56 und CD16 definiert und weiter über die Expression von NKG2A und NKG2C eingeteilt. Abkürzung: SSC-A = *Side-Scatter-Area*.

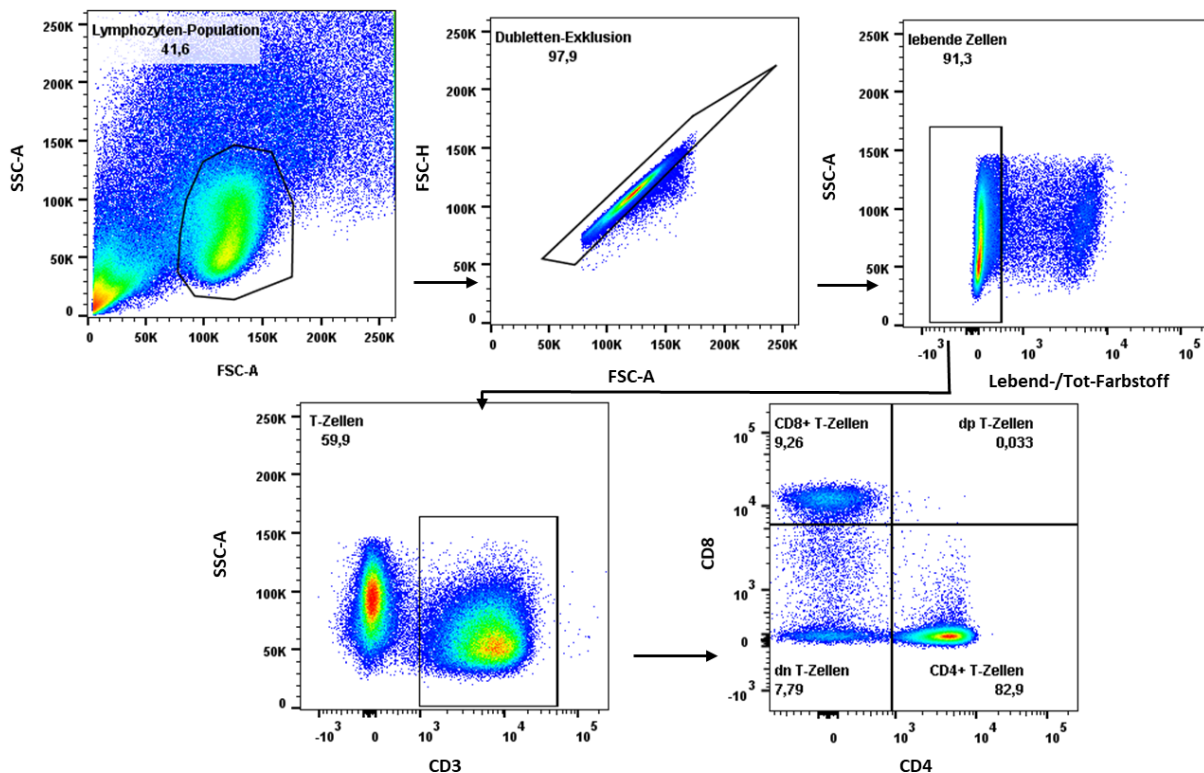


Abbildung 2.3 – Identifikation von T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Nach Auswahl der Lymphozytenpopulation wurden Zell-Dubletten mit Hilfe des *Forward-Scatter-Height-* (FSC-H) und *Forward-Scatter-Area-* (FSC-A) Signals exkludiert. Tote Zellen wurden mit Hilfe des Lebend-Tot-Farbstoffs ausgeschlossen. T-Zellen wurden über die Expression von CD3 definiert und weiter über die Expression von CD4 und CD8 unterteilt. Abkürzungen: dp = doppelpositiv; dn = doppelnegativ; SSC-A = *Side-Scatter-Area*.

2.3 Hämagglutinations-Hemm-Test (HHT)

Für die Analyse der Antikörpertiter gegen Influenza A Viren im Plasma von Probanden vor und nach der Influenza-Impfung wurde ein HHT durchgeführt. Durch die agglutinierenden Eigenschaften des Influenza-Hämagglutinins verklumpen Erythrozyten. Bei dem HHT wird diese Eigenschaft kontrolliert, indem inaktivierte Influenza A Kontrollantigene, in diesem Fall mit Hühnererythrozyten und Plasma der Probanden inkubiert werden. Verklumpen die Erythrozyten, sind im Plasma des Probanden keine oder nicht genügend Antikörper gegen das Hämagglutinin der Influenzaviren vorhanden, um die agglutinierenden Eigenschaften des Hämagglutinins zu inhibieren. Ist keine Verklumpung der Erythrozyten zu beobachten, sind genügend Antikörper vorhanden, um die agglutinierenden Eigenschaften des Hämagglutinins zu inhibieren. Mit Hilfe von seriellen Verdünnungen des Plasmas der Probanden kann der Antikörpertiter schließlich quantifiziert werden. Der HHT wurde nach dem Protokoll von Kaufmann et al. durchgeführt (Kaufmann et al., 2017). Der geometrische mittlere Titer (*Geometric Mean Titer*; GMT) wurde berechnet, indem alle Antikörpertiter miteinander multipliziert wurden und die n -te Wurzel aus dieser Zahl berechnet wurde (Reverberi, 2008).

2.4 SARS-CoV-2 Antikörpertiterbestimmung & Aufbau der Kohorte

Der Aufbau der Kohorte, sowie die Bestimmung der Antikörpertiter wurden von Prof. Dr. Heiner Schaal, Prof. Dr. Ortwin Adams, Lisa Müller und Dr. Marcel Andrée koordiniert und mit Hilfe weiterer Kollegen durchgeführt. 17 - 19 Tage nach der ersten, sowie 17 Tage nach der zweiten Impfdosis *Biontech/Pfizer BNT162b2* wurde Blut von 179 Bewohnern und Mitarbeitern eines Altenheims entnommen. Das Serum wurde abzentrifugiert, aliquotiert und für weitere Analysen bei 4°C gelagert. Der Abstand der zwei Impfdosen betrug drei Wochen. Die Antikörpertiter gegen die Spike-Protein-Untereinheit S1 wurden mit Hilfe des Euroimmun Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA bestimmt. Ein Teil der Seren wurde mir für die Bestimmung des CMV-Serostatus mit Hilfe des Architect i2000SR (Abbott Core Laboratory) zur Verfügung gestellt.

2.5 Statistische Analysen und Abbildungen

Die statistischen Analysen und die dazugehörigen Abbildungen wurden mit der GraphPad PRISM Software 9.0.0 erstellt. Die gewählten statistischen Tests wurden in der Abbildungsunterschrift der jeweiligen Abbildung genannt. Unterschiede wurden dann als statistisch signifikant bewertet, wenn der berechnete p-Wert $< 0,05$ war.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Zytotoxizität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen

HLA-E^{high} exprimierende T-Zellen

3.1.1 CMV_{pos} Personen haben erhöhte Frequenzen von NKG2A⁻/C⁺ NK-Zellen

Eine primäre CMV-Infektion führt zu diversen CMV-assoziierten Veränderungen des humanen Immunsystems, wie beispielsweise zur Expansion von NKG2C⁺ NK-Zellen (Guma et al., 2004; Lopez-Verges et al., 2011). Zur Untersuchung der CMV-assoziierten NKG2C⁺ NK-Zellen in unserer Kohorte wurden die Frequenzen von NKG2A/C NK-Zellpopulationen in PBMCs von CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen aus einer Kohorte mit 36 gesunden Blutspendern durchflusszytometrisch analysiert. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte eine erhöhte Frequenz von NKG2A⁻/C⁺ NK-Zellen in CMV_{pos} Personen gemessen werden (Abbildung 3.1, $p < 0,0001$). Es gab keine CMV_{neg} Person, bei der NKG2C⁺ NK-Zellen mehr als 10% aller NK-Zellen ausmachten. Bei CMV_{pos} Personen hatten zehn von siebzehn Personen eine Frequenz von über 10% an NKG2C⁺ NK-Zellen, jedoch gab es auch sieben Personen, die eine vergleichbare Frequenz wie CMV_{neg} Personen von unter 10% NKG2C⁺ NK-Zellen hatten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen in den anderen NK-Zellpopulationen wurden nicht beobachtet (Abbildung 3.1).

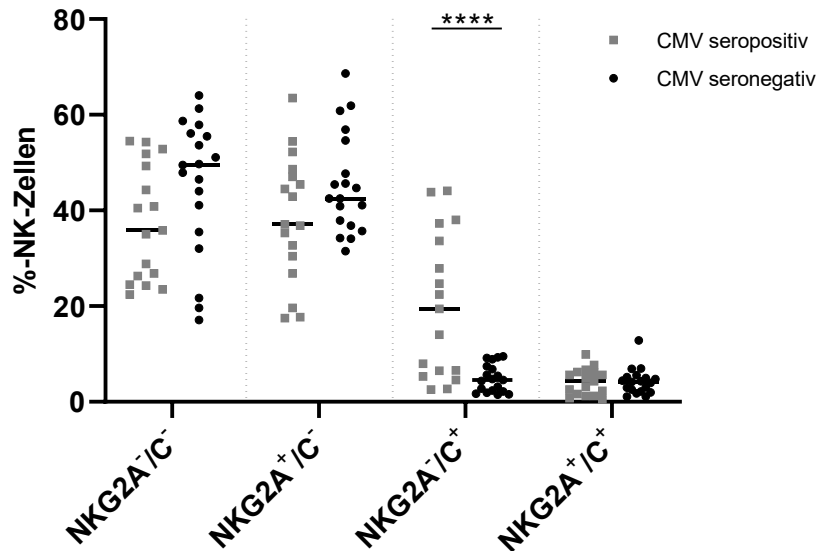


Abbildung 3.1 – Analyse der Frequenzen von NKG2A/C NK-Zellpopulationen in CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen.

NKG2A/C NK-Zellpopulationen wurden von 36 gesunden Blutspendern durchflusszytometrisch analysiert. Zusätzlich wird der jeweilige Mittelwert mit einer Linie gezeigt. Statistische Signifikanzen wurden mittels One-way ANOVA und einer Bonferroni-Korrektur bestimmt (****p < 0,0001).

3.1.2 Die HLA-E Expression auf T-Zellen steigt mit fortschreitender Maturation

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte in Abwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen eine verbesserte *in vitro* Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen beobachtet werden (Grutza et al., 2020). Folglich sollte überprüft werden, ob es auch *in vivo* Unterschiede in der Frequenz von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen gibt. Dazu wurde die Frequenz der CMV-spezifischen CD8 T-Zellen von 28 CMV_{pos} Blutspendern mittels Multimerfärbung bestimmt. Es konnte keine Korrelation zwischen den Frequenzen der NKG2C⁺ NK-Zellen und den CMV-spezifischen CD8 T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.2A; p = 0,9583, R² = 0,0001). Basierend auf der Expression von CCR7, CD45RA, CD27 und KLRG-1 können T-Zellen in unterschiedliche Reifestadien unterteilt werden. Klassischerweise erfolgt die Unterteilung in naïve (CCR7⁺, CD45RA⁺, CD27⁺⁺⁺, KLRG-1⁻), *central memory* (CM; CCR7⁺, CD45RA⁻, CD27⁺⁺, KLRG-1⁻), *effector memory* T-Zellen (EM; CCR7⁻, CD45RA⁻, CD27^{+/-}, KLRG-1^{+/-}) und *effector memory T cells re-expressing CD45RA* (TEMRA; CCR7⁻, CD45RA⁺, CD27⁻, KLRG-1⁺⁺) (Fulop et al., 2013). Vorangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass CMV_{pos} Personen erhöhte Frequenzen von TEMRA-Zellen haben (Kim et al., 2015). Interessanterweise konnten wir geringere Frequenzen von TEMRA-Zellen in Personen zeigen, die eine hohe Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen (≥ 30%) besitzen (Abbildung 3.2B, p = 0,038). Unterschiede in den Frequenzen von T-Zellen anderer Maturationsstadien konnten nicht gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Um die unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen weiter zu charakterisieren, wurde die

Expression von HLA-E, dem Liganden von NKG2C, auf naiven, CM, EM und TEMRA-Zellen bei CMV_{pos} Personen analysiert. Mit fortschreitender Maturation konnten höhere HLA-E Expressionen beobachtet werden (Abbildung 3.2C). Nachfolgend sollte bei denselben Proben analysiert werden, ob die HLA-E Expression der unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen von der Frequenz der NKG2C⁺ NK-Zellen beeinflusst wird. Die HLA-E Expression auf den T-Zellsubpopulationen war dabei nicht abhängig von der Frequenz der NKG2C⁺ NK-Zellen (Abbildung 3.2D).

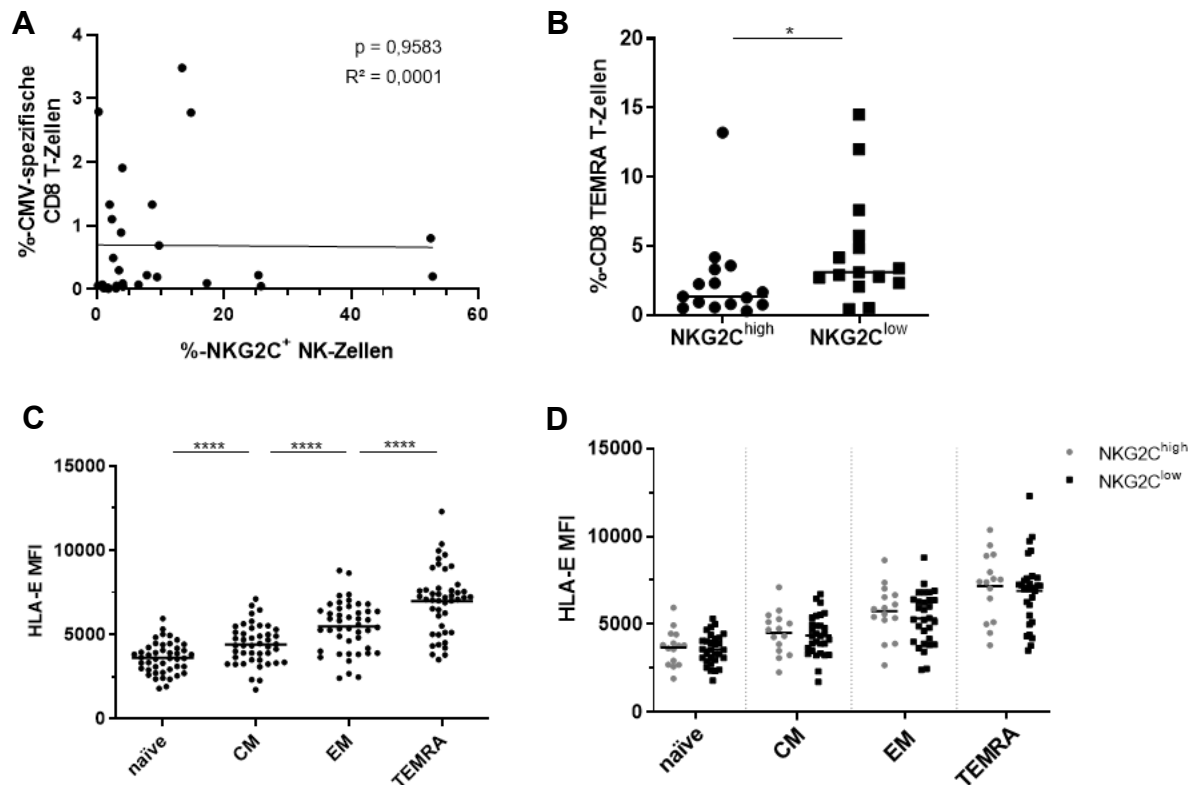


Abbildung 3.2 – Frequenzen von T-Zellpopulationen und die HLA-E Expression in Abhängigkeit der T-Zell-Maturation.

Durchflusszytometrische Analysen von (A) CMV-spezifischen CD8 T-Zellen bei 28 CMV_{pos} gesunden Blutspendern mittels Multimerfärbung gegen das HLA-A*02:01 restringierte CMV-Epitop NLVPMVATV. Der p-Wert und Korrelationskoeffizient R² wurde mit einer Pearson-Korrelationsanalyse bestimmt. (B) Untersuchung der Frequenz von CD8 TEMRA-Zellen in 30 CMV_{pos} gesunden Blutspendern in Abhängigkeit der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen (NKG2C^{high} ≥ 30%; NKG2C^{low} < 18%). Die statistische Signifikanz wurde über einen Mann-Whitney-Test ermittelt (*p < 0,05). (C) HLA-E Expressionsanalyse von T-Zellsubpopulationen in Abhängigkeit ihrer Maturation und (D) in Abhängigkeit der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen (NKG2C^{high} ≥ 30%; NKG2C^{low} < 18%) bei 45 gesunden CMV_{pos} Blutspendern. In (B) - (D) wird zusätzlich der jeweilige Mittelwert mit einer Linie gezeigt. Statistische Signifikanzen wurden mittels One-way ANOVA und einer Tukey-Korrektur bestimmt (****p < 0,0001).

3.1.3 Erhöhte Zytotoxizität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen HLA-E^{high} exprimierende T-Zellen

Eine große Population der CMV-spezifischen CD8 T-Zellen hat einen spät differenzierten T-Zellphänotyp und exprimiert daher auch ein hohes Level an HLA-E (Grutza et al., 2020; van den Berg et al., 2019a). Aufgrund der verbesserten Expansion von CMV-spezifischen

CD8 T-Zellen in Abwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen (siehe 1.5) und der niedrigeren Frequenz von ebenfalls HLA-E^{high} exprimierenden CD8 TEMRA-Zellen bei CMV_{pos} Blutspendern mit hohen Frequenzen von NKG2C⁺ NK-Zellen, wurde die Zytotoxizität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen HLA-E^{high} exprimierende T-Zellen untersucht. Für alle Analysen der Zytotoxizität wurden lediglich CD56^{dim} NK-Zellen untersucht, da NKG2C⁺ NK-Zellen größtenteils CD56^{dim} sind und CD56^{bright} NK-Zellen im Gegensatz zu den zytotoxischen CD56^{dim} NK-Zellen immunmodulatorische Funktionen übernehmen (Jacobs et al., 2001; Kobyzeva et al., 2020; Lanier et al., 1986). Zunächst wurde das zytotoxische Potential von NKG2C⁺ und NKG2C⁻ NK-Zellen verglichen, indem das intrazelluläre Signal von Granzym B gemessen wurde. Über Perforin-vermittelte Löcher in der Zellmembran gelangt das Granzym B in die Zielzelle, in der es durch Aktivierung von Caspasen apoptotisch wirkt (Shresta et al., 1995). In NKG2C⁺ NK-Zellen konnte im Vergleich zu NKG2C⁻ NK-Zellen ein höheres Granzym B Signal gemessen werden, was ein höheres zytotoxisches Potential von NKG2C⁺ NK-Zellen vermuten lässt (Abbildung 3.3A, p = 0,01). Für die Zytotoxizitätsanalysen von NK-Zellen gegen HLA-E^{high} exprimierende T-Zellen wurden Zellen der Jurkat CD4 T-Zelllinie mit einem HLA-E bindenden Peptid (VMAPRTLFL) inkubiert. Unbeladenes HLA-E ist instabil und wird von der Zelle degradiert (O'Callaghan, 2000). Das Beladen der HLA-E Moleküle mit exogenen Peptiden führt zu einer erhöhten Oberflächenexpression von HLA-E auf den Jurkat-Zellen (Abbildung 3.3B). Anschließend wurden PBMCs und Jurkat-Zellen für 5 h bei 37°C mit einem Effektor/Target-Verhältnis von 10:1 co-kultiviert. Wie erwartet, zeigten NKG2C⁺ NK-Zellen in Kultur mit HLA-E^{high} exprimierenden Jurkat-Zellen eine stärkere Degranulation von Granzym B als NKG2C⁻ NK-Zellen (Abbildung 3.3C, p = 0,024). Es gab außerdem eine Tendenz zur stärkeren Degranulation von Granzym B durch NKG2C⁺ NK-Zellen in Kultur mit HLA-E^{high} exprimierenden Jurkat-Zellen im Gegensatz zur Kultur mit HLA-E^{low} exprimierenden Jurkat-Zellen, auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant ist (Abbildung 3.3C, p = 0,335).

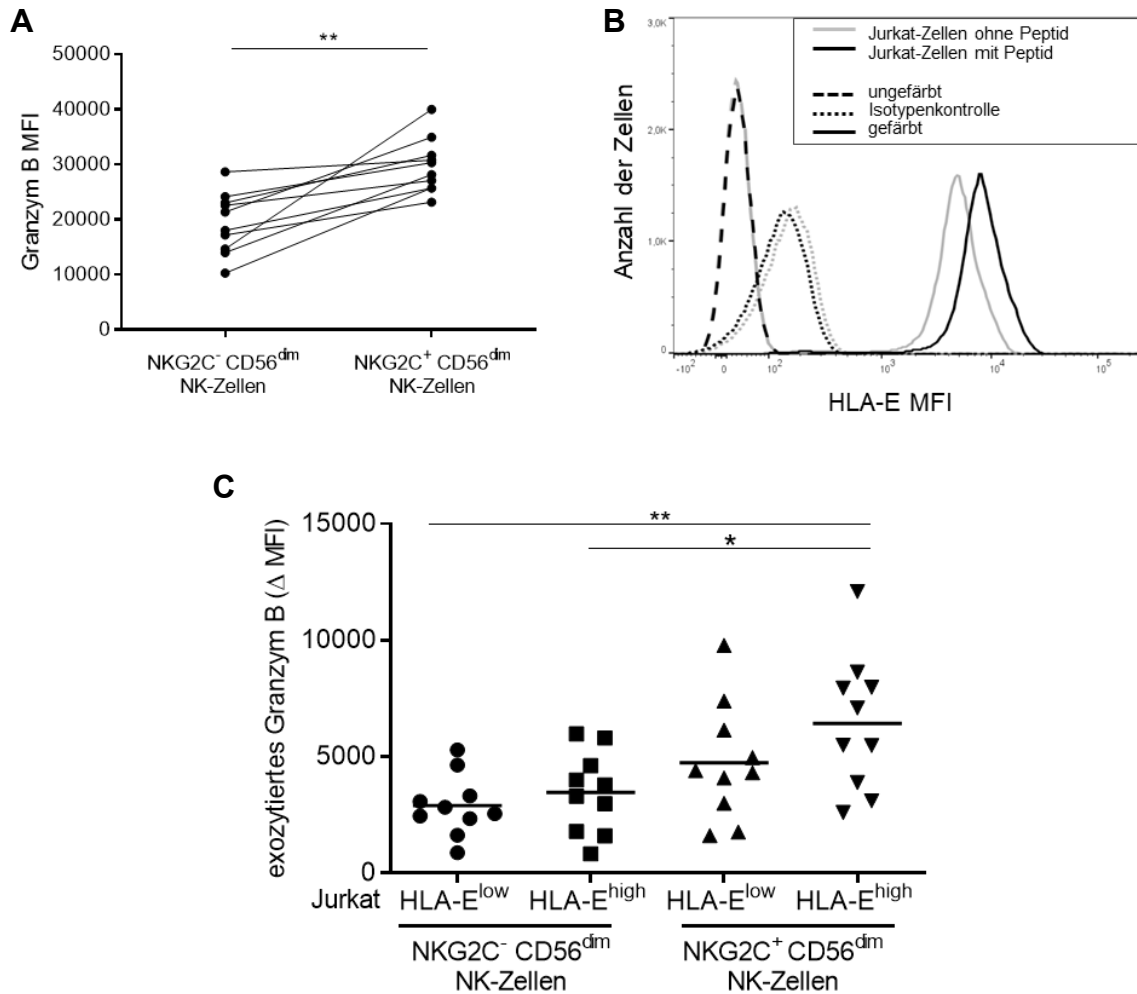


Abbildung 3.3 – Analyse der Zytotoxizität von NK-Zellen gegen HLA-E^{high} exprimierende Jurkat-Zellen.

Durchflusszytometrische Analyse des (A) intrazellulären Granzym B Levels in NK-Zellpopulationen *ex vivo*. Die statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem t-Test bestimmt (** $p \leq 0,001$). (B) Peptidabhängige Stabilisierung der HLA-E Oberflächenexpression auf Jurkat-Zellen mit dem Peptid VMAPRTLFL ÜN bei 26°C. (C) Analyse der Degranulation von Granzym B durch NK-Zellen nach Co-Kultivierung von PBMCs mit HLA-E^{high} und HLA-E^{low} exprimierenden Jurkat-Zellen. Für die Berechnung des sekretierten Granzym B wurde das Granzym B Signal der Probe von dem Granzym B Signal der Kontrolle ohne Jurkat-Zellen subtrahiert. Zusätzlich wird der jeweilige Mittelwert mit einer Linie gezeigt. Die statistischen Signifikanzen wurden mittels One-way ANOVA und einer Tukey-Korrektur bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Um nicht nur die Sekretion von Granzym B durch NK-Zellen, sondern auch die Apoptose in den Zielzellen zu untersuchen, wurde die Caspase 3/7-Aktivität in Jurkat-Zellen nach 5 h Kultur mit PBMCs gemessen. Die sich strukturell ähnlichen Caspasen 3 und 7 werden durch Granzym B aktiviert (Saini et al., 2011). Für das Experiment wurde die HLA-E Expression in einem Teil der Jurkat-Zellen in einer abgegrenzten Kultur mittels dem HLA-E bindenden Peptid (VMAPRTLFL) stabilisiert. Als Kontrolle wurden Jurkat-Zellen ohne das Peptid inkubiert (siehe 2.2.1.4). Anschließend wurden die Jurkat-Zellen in Abhängigkeit ihrer HLA-E Expression mit zwei verschiedenen *CellTrace™ Cell Proliferation Kits* von Thermo Fisher Scientific markiert und zusammen für 5 h mit PBMCs von gesunden CMV_{pos} Blutspendern co-kultiviert, die mehr als 20% NKG2C⁺ NK-Zellen besitzen (Abbildung 3.4A). Die Frequenz der Caspase 3/7-Aktivität wurde errechnet, indem die Frequenz der Caspase 3/7⁺-Zellen der

Kontrolle (Jurkat-Zellen ohne PBMCs) von der Frequenz der Caspase 3/7⁺-Zellen der Probe (Jurkat-Zellen mit PBMCs) subtrahiert wurde. In Übereinstimmung mit der erhöhten Degranulation von Granzym B durch NKG2C⁺ NK-Zellen (Abbildung 3.3C) zeigten Jurkat-Zellen mit einer hohen HLA-E Expression nach der Kultivierung mit PBMCs mit einer hohen Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen eine erhöhte Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zu Jurkat-Zellen mit einer niedrigen HLA-E Expression (Abbildung 3.4B, $p < 0,0001$). Die Hypothese, dass T-Zellen mit hohen HLA-E Expressionen bevorzugte Zielzellen von NKG2C⁺ NK-Zellen sind, wird mit diesen Ergebnissen unterstützt.

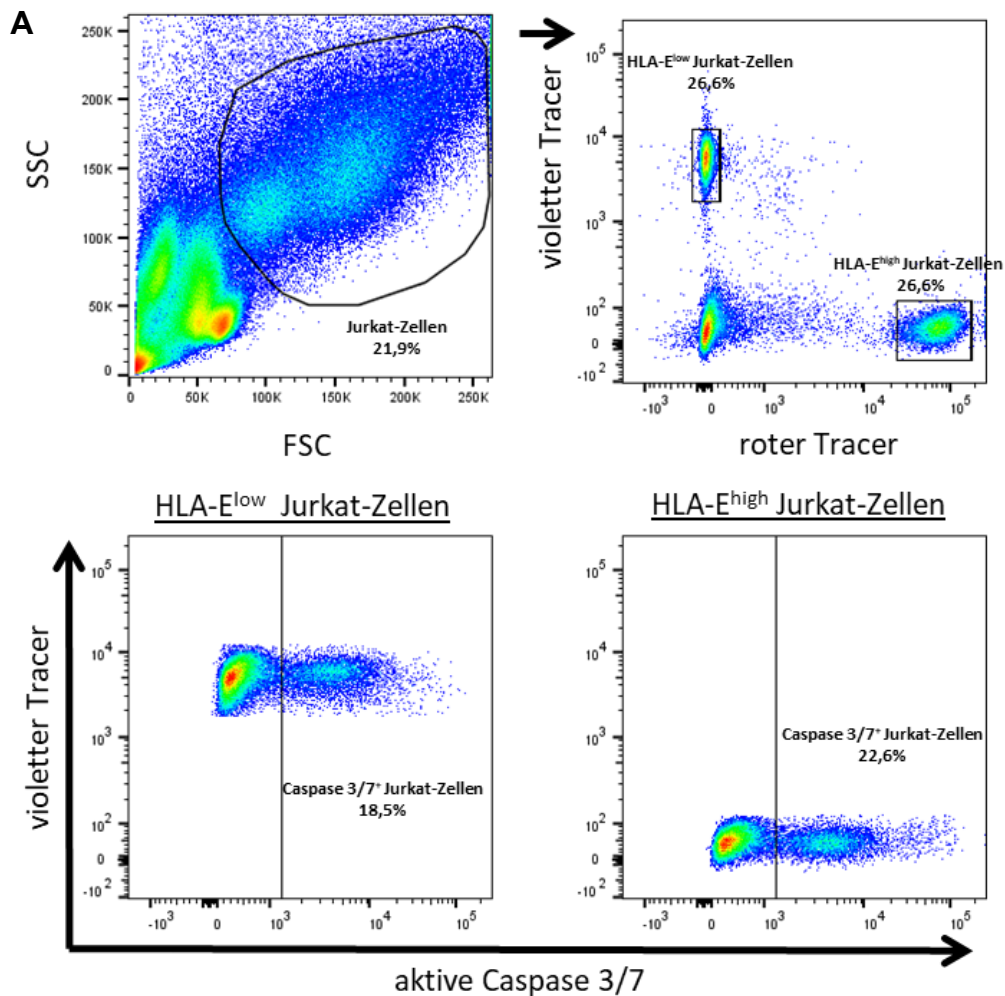
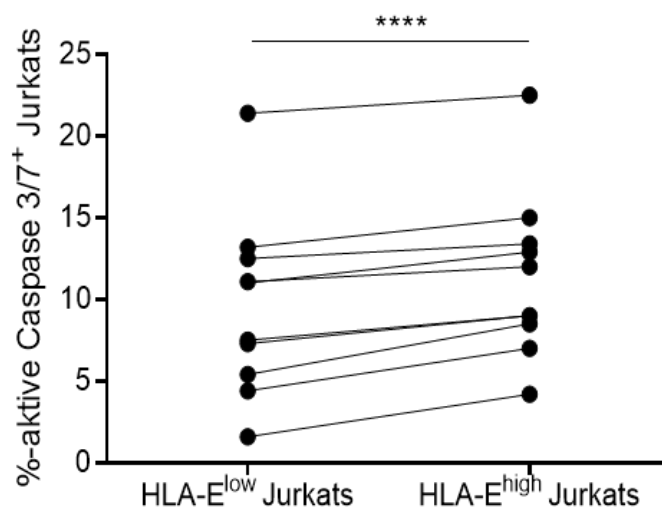
**B**

Abbildung 3.4 – Analyse der Caspase 3/7-Aktivität in Jurkat-Zellen in Abhängigkeit ihrer HLA-E Expression nach Kultur mit PBMCs mit einer hohen Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen.

PBMCs von CMV_{pos} Probanden mit mehr als 20% NKG2C⁺ NK-Zellen wurden für 5 h mit HLA-E^{low} und HLA-E^{high} exprimierenden Jurkat-Zellen co-kultiviert. (A) Gating-Strategie für HLA-E^{high} und HLA-E^{low} exprimierende Jurkat-Zellen nach Markierung mit Hilfe von verschiedenen *CellTrace™ Cell Proliferation Kits* von Thermo Fisher Scientific in Abhängigkeit ihrer HLA-E Expression. (B) Die Frequenz der Caspase 3/7-Aktivität wurde errechnet, indem die Frequenz der Caspase 3/7⁺-Zellen der Kontrolle (Jurkat Zellen ohne PBMCs) von der Frequenz der Caspase 3/7⁺-Zellen der Probe (Jurkat Zellen mit PBMCs) subtrahiert wurde. Die statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem t-Test ermittelt (****p < 0,0001).

3.2 Charakterisierung der NKG2C⁺ NK-Zellen in CMV_{pos} Personen

Die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (siehe 1.5), sowie die Ergebnisse aus dem Zytotoxizitätsassay aus dem Kapitel 3.1.3 zeigen, dass NKG2C⁺ NK-Zellen eine interessante NK-Zellpopulation für die Regulation von T-Zellen und Zellen mit einer hohen HLA-E Oberflächenexpression sind. Da in der Literatur bereits einige phänotypische Unterschiede zwischen NKG2C⁺ NK-Zellen und anderen NK-Zellpopulationen beschrieben wurden, stellt sich die Frage, ob NKG2C⁺ NK-Zellen auch eine besondere Rolle in weiteren immunologischen Prozessen übernimmt. Für eine Einordnung dieser Fragestellung wurde zunächst das Rezeptorrepertoire von NKG2C⁺ NK-Zellen mit Hilfe eines Screenings der Oberflächenmoleküle untersucht.

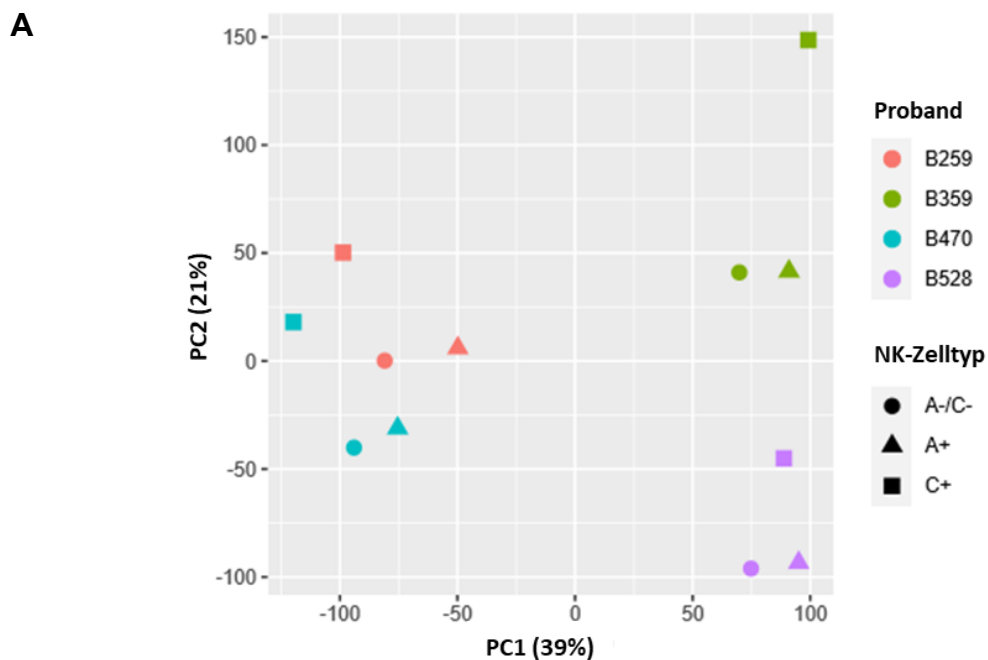
3.2.1 NKG2C⁺ NK-Zellen haben ein verändertes Rezeptorrepertoire im Vergleich zu anderen NK-Zellpopulationen

Das Screening von 361 Oberflächenmolekülen auf NK-Zellen wurde mit Hilfe des LEGENDScreen™-Kits von BioLegend® mit PBMCs von vier CMV_{pos} Blutspendern durchgeführt, die eine NKG2C⁺ NK-Zellfrequenz von über 8% hatten. Dabei wurden die Frequenzen der Zellen, die das zu untersuchende Oberflächenmolekül exprimieren, zwischen NKG2A⁻NKG2C⁺ (NKG2C⁺), NKG2A⁺NKG2C⁻ (NKG2A⁺) und NKG2A⁻NKG2C⁻ (NKG2A⁻) NK-Zellen verglichen. NKG2A⁺NKG2C⁺ NK-Zellen wurden aufgrund ihrer niedrigen Frequenzen nicht berücksichtigt, da folglich zu wenig Zellen pro Loch für eine zuverlässige Auswertung vorhanden waren.

Zum Vergleich der Expression aller gemessenen Oberflächenmoleküle der NK-Zellen zwischen den Probanden und der verschiedenen NK-Zellsubtypen wurde eine *Principal Component Analyse* (PCA) durchgeführt. Bei einer PCA werden diese hochdimensionalen Daten während einer Dimensionsreduktion in zwei sogenannte Hauptkomponenten (*principle components*) zusammengefasst, die die zweidimensionale Abbildung der Variabilität zwischen den Daten mit möglichst geringem Informationsverlust erlaubt. Der Abstand der Punkte zueinander spiegelt die Ähnlichkeit der Daten unter Berücksichtigung der Dimensionsreduktion wider (Pearson, 1901).

Die PCA zeigt einen großen Abstand der Datenpunkte zwischen den Blutspendern und damit einen deutlichen Unterschied der Gesamtexpressionsdaten auf den NK-Zellpopulationen in Abhängigkeit des Blutspenders. Zusätzlich gibt es zwischen NKG2C⁺ NK-Zellen und den anderen NK-Zellpopulationen größere Unterschiede in den Expressionsdaten der betrachteten Oberflächenmoleküle als zwischen NKG2A⁺ und NKG2A⁻ NK-Zellen (Abbildung 3.5A).

Bei der Expressionsanalyse der einzelnen Oberflächenmoleküle konnten zwölf Oberflächenmoleküle gefunden werden, die auf NKG2C⁺ NK-Zellen statistisch signifikant anders exprimiert werden als auf NKG2A⁺ und NKG2A⁻C⁻ NK-Zellen. Bei NKG2C⁺ NK-Zellen gibt es einen höheren Anteil an Zellen, die CD158b (KIR2DL2/DL3), CD52 (CAMPATH-1), CD44 und CD2 exprimieren, während weniger NKG2C⁺ NK-Zellen die Oberflächenmoleküle CD366 (TIM-3), Integrin β 7, CD328 (SIGLEC-7), CD160, CD161 (KLRB1), CD49f (Integrin α 6), CD337 (NKp30) und CD31 (PECAM-1) exprimieren (Abbildung 3.5B). Da insgesamt nur PBMCs von vier Blutspendern untersucht wurden, sollte eine weitere Analyse durchgeführt werden, die sich nicht auf die statistischen Signifikanzwerte, sondern auf den mittleren Unterschied in der Frequenz der Oberflächenmolekül⁺ NK-Zellen bezieht. Hierbei konnten acht Oberflächenmoleküle gefunden werden, die auf NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu NKG2A⁺ und NKG2A⁻C⁻ NK-Zellen eine mindestens 10% erhöhte mittlere Frequenz zeigten. Neun Oberflächenmoleküle hatten auf NKG2C⁺ NK-Zellen eine mindestens 10% verringerte mittlere Frequenz. Alle Oberflächenmoleküle mit einer veränderten Expression in der statistischen Signifikanzanalyse aus Abbildung 3.5B wiesen auf NKG2C⁺ NK-Zellen auch einen Unterschied in der mittleren Frequenz der Oberflächenmolekül⁺ NK-Zellen von über 10% auf (Abbildung 3.5C). Zusätzlich gab es, verglichen zu den anderen NK-Zellpopulationen, mehr NKG2C⁺ NK-Zellen, die die Oberflächenmoleküle CD57 (B3GAT1), CD278 (ICOS), HLA-DR und CD223 (LAG-3) exprimierten und weniger NKG2C⁺ NK-Zellen, die das Oberflächenmolekül CD335 (NKp46) exprimierten (Abbildung 3.5C).



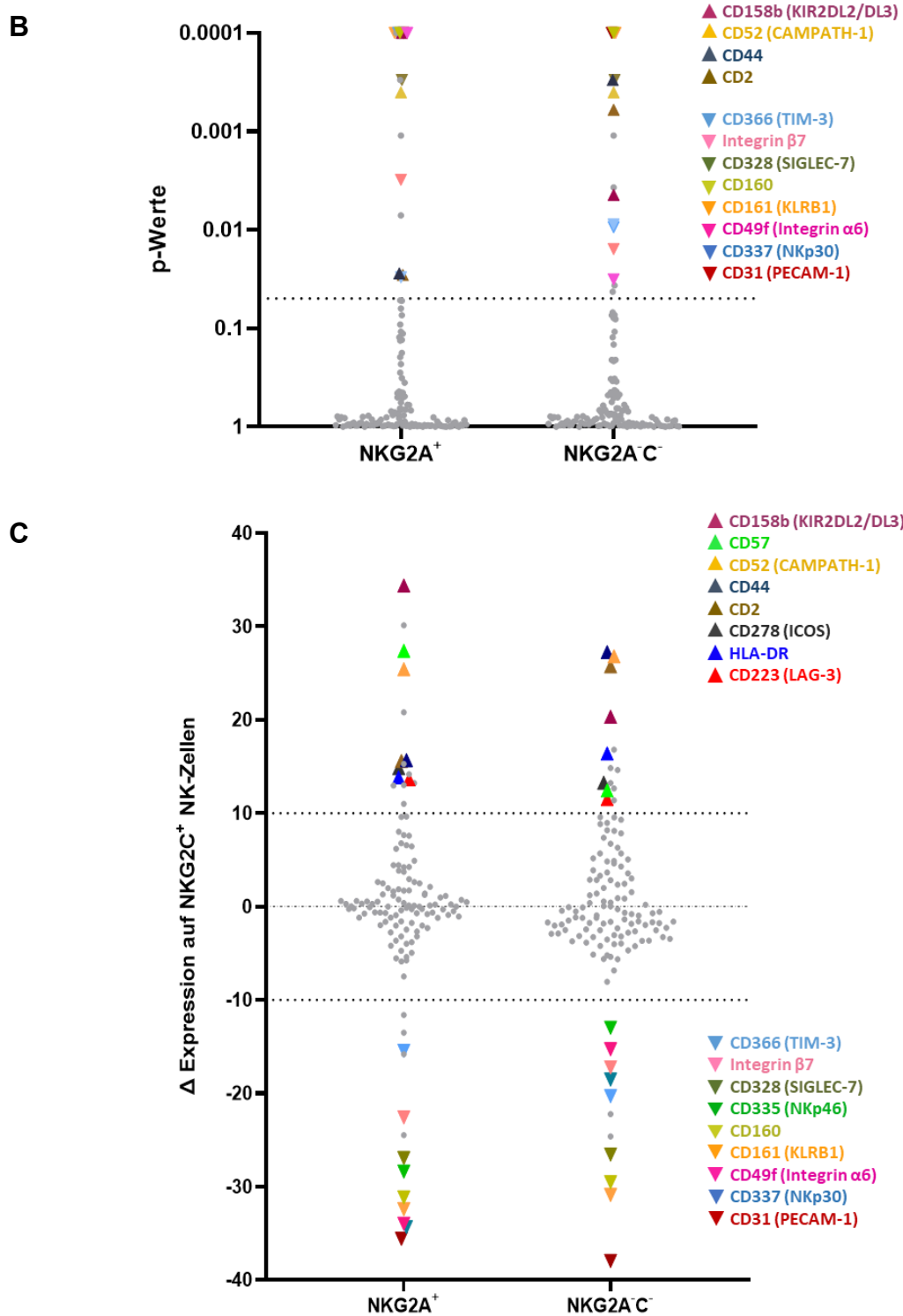


Abbildung 3.5 - Expressionsanalysen von 361 Oberflächenmolekülen auf NK-Zellpopulationen.

Die Oberflächenmolekülexpressionen wurden mit Hilfe des LEGENDScreen™ Kits von BioLegend® gemessen. (A) *Principal Component Analyse* (PCA) der Oberflächenexpressionen bei vier CMV_{pos} Blutspendern mit Hilfe von R („stats“ Paket Version 3.6.2 und „ggplot2“ Paket Version 3.3.3). Abkürzungen: PC1 = *Principle Component 1*; PC2 = *Principle Component 2*; Bxxx = Identifikationsnummer des Blutspenders. (B) Es wurden die Frequenzen der Oberflächenmolekül⁺ Zellen in NKG2A⁺ bzw. NKG2A⁻ NK-Zellen mit den Frequenzen der Oberflächenmolekül⁺ Zellen in NKG2C⁺ NK-Zellen verglichen. Die statistischen Signifikanzen wurden mittels einer Two-way ANOVA mit Holm-Šidák Korrektur bestimmt. Oberflächenmoleküle, die in beiden statistischen Signifikanzanalysen p-Werte unter 0,05 aufwiesen (gestrichelte Linie), wurden farblich hervorgehoben. Oberflächenmoleküle, bei denen das Dreieck nach oben zeigt, sind auf NKG2C⁺ NK-Zellen in höheren Frequenzen vorhanden. Oberflächenmoleküle, bei denen das Dreieck nach unten zeigt, sind auf NKG2C⁺ NK-Zellen in niedrigeren Frequenzen vorhanden. (C) Die mittlere Frequenz der Oberflächenmolekül⁺ Zellen in NKG2A⁺ bzw. NKG2A⁻ NK-Zellen wurde von der mittleren Frequenz der Oberflächenmolekül⁺ Zellen in NKG2C⁺ NK-Zellen subtrahiert. Oberflächenmoleküle, die in beiden Vergleichen einen mittleren Frequenzunterschied von über 10% aufwiesen, wurden farblich hervorgehoben.

3.2.2 Bestätigung der Expressionsunterschiede aus dem LEGENDscreen™

Aufgrund der niedrigen Zahl der analysierten Proben in Kapitel 3.2.1 ($n = 4$), sollten die Expressionsunterschiede der in Abbildung 3.5C farblich markierten Oberflächenmoleküle auf NKG2C⁺ NK-Zellen mit einer größeren Anzahl an Blutspendern bestätigt werden. Dazu wurden PBMCs von 26 CMV_{pos} Blutspendern durchflusszytometrisch analysiert. Aufgrund der Vielzahl an Oberflächenmolekülen musste die durchflusszytometrische Charakterisierung in mehrere Färbepanel unterteilt werden. Färbungen mit zehn Blutspendern für die Analyse der Expression von ICOS, SIGLEC-7 und CD31 wurden freundlicherweise von Wiebke Moskorz zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden einige Oberflächenmoleküle mit Hilfe retrospektiver Auswertungen anderer Experimente analysiert, bei der NKG2C⁺ NK-Zellen ebenfalls *ex vivo* phänotypisch charakterisiert wurden. Dazu gehören die Analysen der Oberflächenmoleküle CD49d (Integrin $\alpha 4$), CD18 (Integrin $\beta 2$) und CD119 (IFN γ R1).

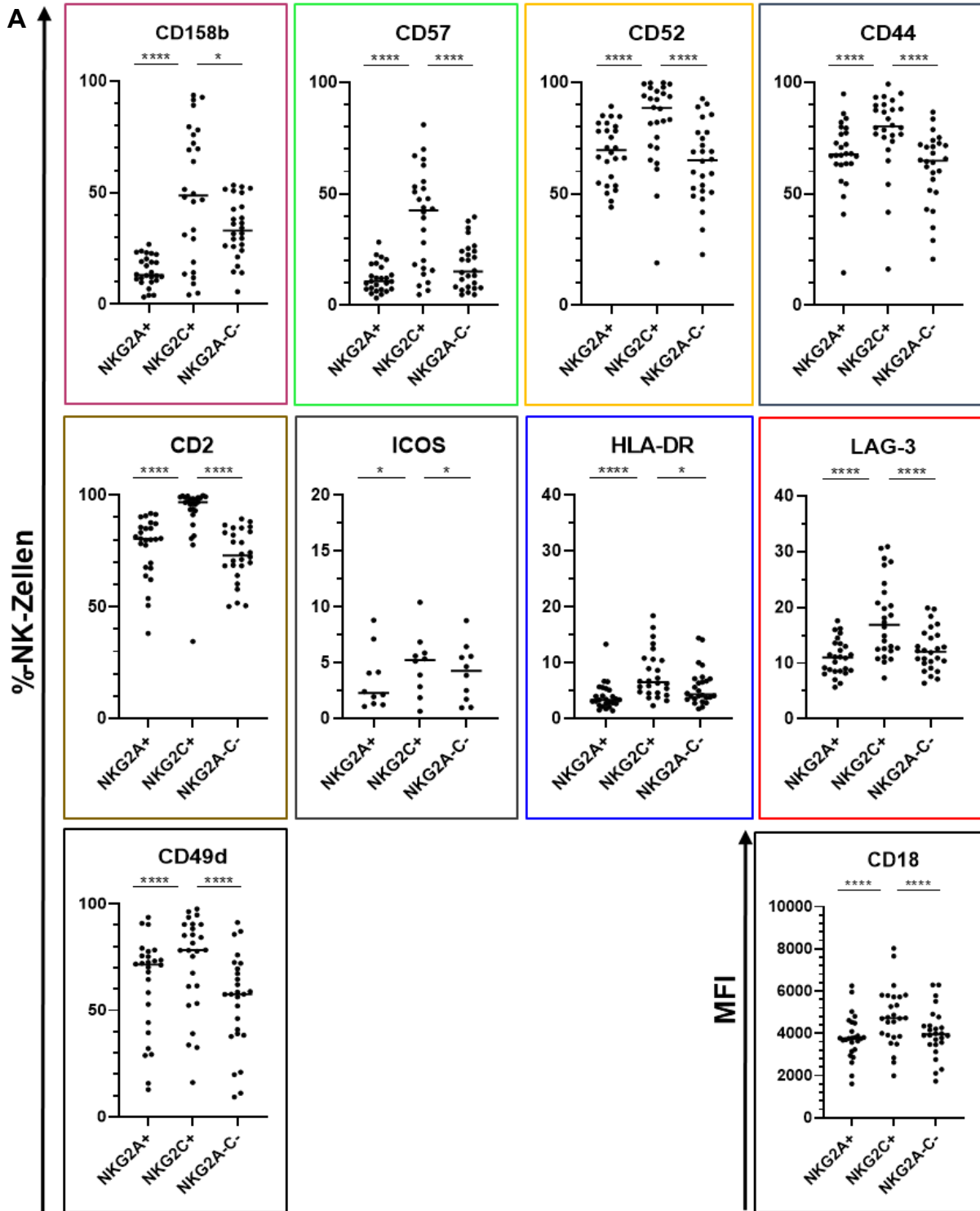
Auch andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass einige der untersuchten Oberflächenmoleküle auf NKG2C⁺ NK-Zellen anders exprimiert werden als auf NKG2A⁺ oder NKG2A⁻/C⁻ NK-Zellen. So konnten auf NKG2C⁺ NK-Zellen beispielsweise erhöhte Frequenzen von CD2, KIR, CD57, CD85j, CD44, LAG-3 und HLA-DR, sowie niedrigere Frequenzen von CD161, TIM-3, SIGLEC-7, NKp46 und NKp30 beobachtet werden (Guma et al., 2004; Hammer & Romagnani, 2017; Kared et al., 2018; Kim et al., 2019; Kobyzeva et al., 2020; Muntasell et al., 2016). In einigen Publikationen wurden NKG2C⁺ NK-Zellen zusätzlich über eine Expression von CD57 oder eine Defizienz von Fc ϵ R1 γ definiert.

Die veränderte Expression von 15 der 17 Oberflächenmoleküle aus der Abbildung 3.5C konnte bestätigt werden (Abbildung 3.6A+B). Darunter konnten einige bisher noch nicht beschriebene Expressionsunterschiede in *ex vivo* Färbungen von NKG2C⁺ NK-Zellen gemessen werden. Eine erhöhte Expression von ICOS, CD52 und den Adhäsionsmolekülen CD49d und CD18 auf NKG2C⁺ NK-Zellen wurde noch nicht publiziert. Niedrigere Expressionen von CD160, CD49f, CD31 und CD119 wurden auf NKG2C⁺ NK-Zellen ebenfalls noch nicht beschrieben.

Neben den bestätigten Oberflächenmolekülen zeigte NKp30 auf NKG2A⁻/C⁻ NK-Zellen eine niedrigere Frequenz als auf NKG2C⁺ NK-Zellen (Abbildung 3.6B). Es konnte bereits in Studien gezeigt werden, dass NKp30 auf NKG2C⁺ NK-Zellen niedriger exprimiert wird als auf NKG2C⁻ NK-Zellen, jedoch wurden in diesen Publikationen neben NKG2C⁺ NK-Zellen nur NKG2C⁻ und NKG2A⁺ NK-Zellen definiert, ohne die zusätzliche Einteilung in NKG2A⁻/C⁻ NK-Zellen (Guma et al., 2004; Kim et al., 2019; Kobyzeva et al., 2020).

Die Expressionsanalyse von Integrin $\beta 7$ wurde aufgrund von Engpässen verfügbarer Antikörper nicht durchgeführt. Stattdessen wurde die Expression von Integrin $\alpha 4$ (CD49d) gemessen, welches zusammen mit Integrin $\beta 7$ den heterodimeren Integrinrezeptor $\alpha 4\beta 7$ bildet. Interessanterweise zeigte Integrin $\alpha 4$ eine höhere Frequenz auf NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu den anderen NK-Zellpopulationen, während Integrin $\beta 7$ bei der Auswertung des LEGENDscreens eine niedrigere Frequenz auf NKG2C⁺ NK-Zellen zeigte. Sowohl Integrin $\beta 7$, als auch Integrin $\alpha 4$ können jeweils noch mit einem anderen Integrin dimerisieren. Integrin $\beta 7$ kann neben Integrin $\alpha 4$ auch einen heterodimeren Rezeptor mit Integrin αE bilden (Yamada et al., 2014). Integrin $\alpha 4$ kann neben Integrin $\beta 7$ auch einen heterodimeren Rezeptor mit Integrin $\beta 1$ bilden (Rodewald & Fehling, 1998). Das kann durchaus zu konträren Expressionsunterschieden von Integrin $\alpha 4$ und Integrin $\beta 7$ zwischen den NK-Zellpopulationen auf der Oberfläche führen.

Die statistisch signifikanten Unterschiede der Expression von Rezeptoren aus der retrospektiven Analyse von anderen Experimenten (z.B. CD18 oder CD119) machen deutlich, dass der LEGENDscreen™ aufgrund der geringen Anzahl an Probanden nicht alle Oberflächenmoleküle herausfiltern kann, die auf NKG2C⁺ NK-Zellen anders exprimiert werden.



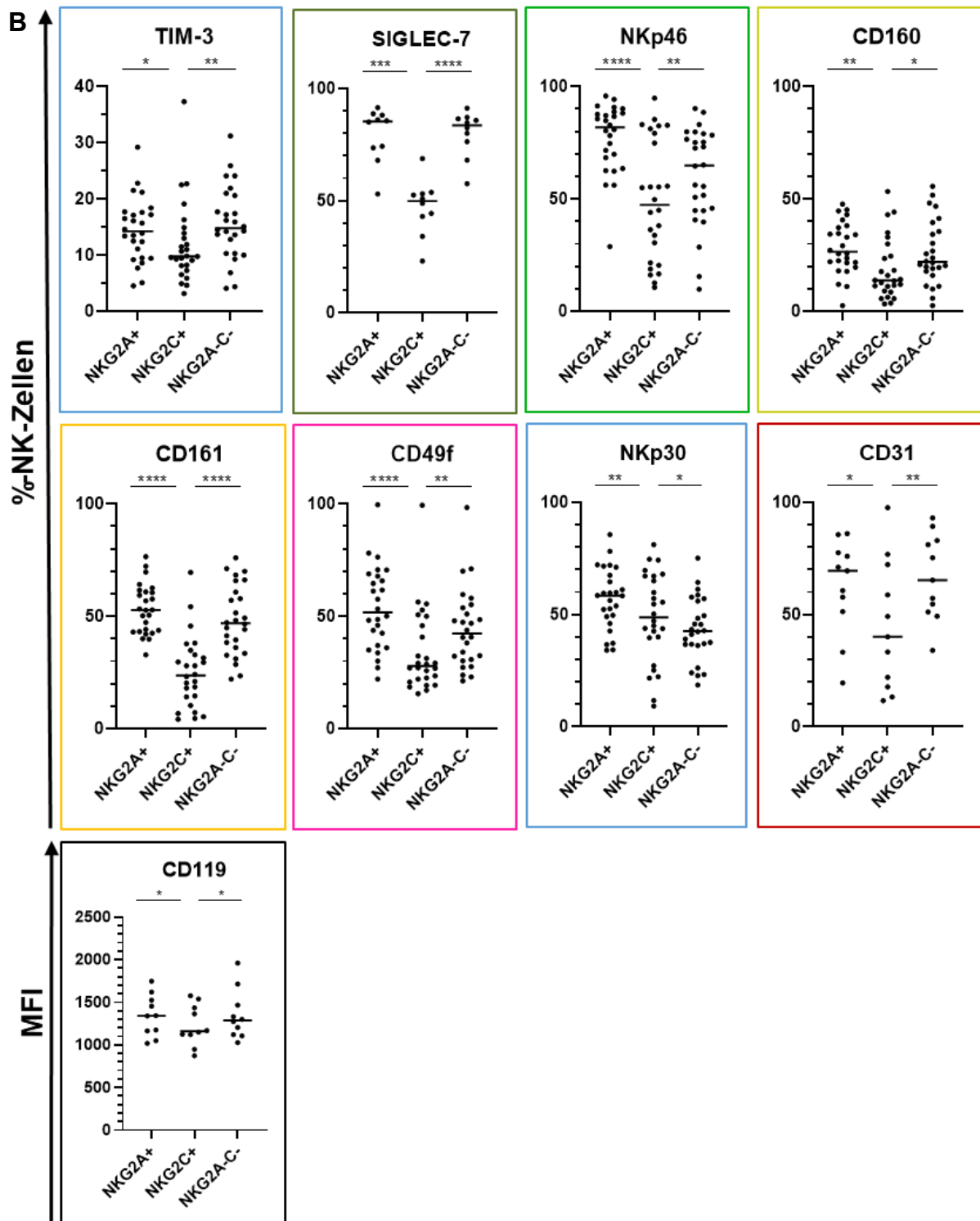


Abbildung 3.6 – Analyse der Expressionsunterschiede von Oberflächenmolekülen aus dem LEGENDScreen-Experiment.

Durchflusszytometrische Expressionsanalyse der Oberflächenmoleküle, die im LEGENDScreen eine (A) höhere bzw. eine (B) niedrigere Frequenz auf NKG2C⁺ NK-Zellen gezeigt haben. Die farbliche Zuordnung ist entsprechend der Abbildung 3.5. Zusätzlich sind retrospektive Auswertungen anderer Experimente gezeigt, bei denen NKG2C⁺ NK-Zellen ebenfalls *ex vivo* phänotypisch charakterisiert wurden (schwarz umrandet). Der jeweilige Mittelwert wird mit einer Linie gezeigt. Statistische Signifikanzen wurden mittels gepaarten t-Tests bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

3.2.3 Funktionelle Einordnung der untersuchten Oberflächenmoleküle aus dem LEGENDscreen™

Nach der Bestätigung der Expressionsunterschiede in den untersuchten Oberflächenmolekülen sollten funktionelle Gemeinsamkeiten der unterschiedlich exprimierten Oberflächenmoleküle gefunden werden. Aufgrund der Vorauswahl an immunologischen Oberflächenmolekülen durch das LEGENDscreen-Kit konnte keine klassische *Gene Ontology Term Enrichment* (GO-Term) Analyse durchgeführt werden. Eine GO-Term Analyse, bei der die Oberflächenmoleküle durch das zugehörige Gen ersetzt wurden und bei dem als Referenzliste nur die im LEGENDscreen-Kit enthaltenen Oberflächenmoleküle angegeben wurden, konnte keine statistisch signifikanten Veränderungen in biologischen Prozessen oder Signalwegen finden (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die untersuchten Oberflächenmoleküle einschließlich ihrer Funktion und Interaktionspartner in einer Tabelle zusammengefasst. Es fällt auf, dass besonders Oberflächenmoleküle auf NKG2C⁺ NK-Zellen stärker exprimiert werden, die mit einer fortschreitenden Maturation assoziiert werden, wie z.B. CD57, CD52, CD2 oder KIR (Binder et al., 2020; Kirchhoff, 1996; Lopez-Verges et al., 2010; Pende et al., 2019). Außerdem sind auf NKG2C⁺ NK-Zellen mit CD57, CD44, CD18, CD2 und CD49d fünf Moleküle stärker exprimiert, die mit Adhäsionsprozessen assoziiert werden, während nur CD49f und CD31 aus der Gruppe der Adhäsionsmoleküle schwächer exprimiert werden (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 - Einteilung der Oberflächenmoleküle aus Abbildung 3.6 in ihre Funktion und Interaktionspartner.

Die Oberflächenmoleküle wurden mit der Funktion, dem Interaktionspartner und der Quelle aufgelistet, aus der die Informationen zum Oberflächenmolekül stammen. Die Pfeile zeigen an, ob das Oberflächenmolekül auf NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu den anderen NK-Zellpopulationen stärker (↑) oder schwächer (↓) exprimiert wird.

Oberflächenmolekül	Funktion/Sonstiges	Interaktionspartner	Auf NKG2C ⁺ NK-Zellen	Quelle
CD158b (KIR2DL2/DL3)	Inhibition	HLA-B, HLA-C	↑	(Moradi et al., 2021)
CD57 (B3GAT1)	Adhäsion/ Maturationsmarker	Laminin, CD62L, CD62P, Amphoterin	↑	(Kared et al., 2016; Kunemund et al., 1988)
CD52 (CAMPATH-1)	Unklar/Migration Maturationsmarker	HMGB1/SIGLEC-10	↑	(Kasarello & Mirowska-Guzel, 2021; Zhao et al., 2017)

CD44	Adhäsion/Aktivierung	Hyaluronsäure, Kollagen, Fibronectin, Laminin, Chondroitinsulfat	↑	(Jordan et al., 2015) (Naor et al., 1997)
CD2 (T- Zelloberflä- chenantigen)	Adhäsion/Aktivierung/ Co-Stimulator	LFA-3, CD48	↑	(Selvaraj et al., 1987)
CD278 (ICOS)	Co-Stimulator	ICOSLG	↑	(Wikenheiser & Stumhofer, 2016)
HLA-DR (MHC-II- Molekül)	Antigenpräsentation	CD4 TCR	↑	(Costa-Garcia et al., 2019)
CD223 (LAG-3)	Inhibition/ Immuncheckpoint	MHC-II-Moleküle, FGL1	↑	(Maruhashi et al., 2020)
CD49d (Integrin α -4)	Adhäsion	Fibronectin, VCAM1	↑	(Zucchetto et al., 2012)
CD18 (Integrin β -2)	Adhäsion	CD11, ICAM-1, ICAM-2	↑	(Arnaout, 1990)
CD366 (TIM-3)	Inhibition/ Immuncheckpoint/ Maturationsmarker	Gal-9, Phosphatidylserin, HMGB1, CAECAM-1	↓	(Das et al., 2017)
CD328 (SIGLEC-7)	Inhibition	Sialinsäure	↓	(Zheng et al., 2020)
CD335 (NKp46)	Aktivierung	unbekannt, Liganden besonders auf Tumorzellen exprimiert, Hämagglutinin	↓	(Bianconi et al., 2001)
CD160	Aktivierung	MHC-I-Moleküle, HVEM	↓	(Le Bouteiller et al., 2011)
CD161 (KLRB1)	Inhibition	LLT1	↓	(Kurioka et al., 2018)
CD49f (Integrin α -6)	Adhäsion	Laminin	↓	(Yu et al., 2012)
CD337 (NKp30)	Aktivierung	B7-H6, BAG-6 (aktivierend), Gal-3 (inhibierend)	↓	(Pogge von Strandmann et al., 2015)
CD31 (PECAM-1)	Transmigration/ Adhäsion	PECAM-1, CD38, CD177	↓	(Woodfin et al., 2007)
CD119 (IFN γ R1)	Zytokinrezeptor	IFN γ	↓	(Blouin & Lamaze, 2013)

3.2.4 t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) Analyse mit NK-Zellen

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2 haben gezeigt, dass sich das Rezeptorrepertoire in NKG2C⁺ deutlich vom Rezeptorrepertoire der anderen NK-Zellpopulationen unterscheidet. Hierbei stellt sich die Frage, ob die NKG2C⁺ NK-Zellen anhand der Expressionlevel der Oberflächenmoleküle in weitere Zellsubtypen klassifiziert werden können. Für ein NK-Zellclustering wurden die Daten aus Kapitel 3.2.2 mittels t-SNE Analyse mit der FlowJo_V10 Software in NK-Zellsubpopulationen unterteilt. Mit Hilfe einer t-SNE Analyse werden hochdimensionale Daten durch eine nichtlineare Dimensionsreduktionstechnik in eine zwei- oder dreidimensionale Abbildung „gepresst“ (van der Maaten & Hinton, 2008). Dadurch kann man beispielsweise ausgehend von den untersuchten Parametern die Ähnlichkeit zwischen analysierten Zellen visualisieren. Kleinere Abstände der Datenpunkte innerhalb der t-SNE Abbildung bedeuten ähnlichere Expressionsdaten in den untersuchten Parametern. Zusätzlich können weitere Zellpopulationen abgegrenzt und deren Expressionsdaten mit Hilfe eines Histogramms ausgegeben werden.

In allen drei Färbepanel konnten NKG2C⁺ NK-Zellen unter anderem aufgrund der Expression von NKG2C von den anderen NK-Zellpopulationen abgegrenzt werden (jeweils die violette Population in Abbildung 3.7). Auch bei der t-SNE-Analyse konnten die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Unterschiede in den Expressionsleveln zwischen NKG2C⁺ NK-Zellen und den anderen NK-Zellpopulationen gezeigt werden. Beispielsweise konnten niedrigere Expressionen von CD161, NKp46 und CD49f, sowie höhere Expressionen von CD2, CD52, CD44 und CD49d auf NKG2C⁺ NK-Zellen gemessen werden. Weitere NK-Zellpopulationen unterschieden sich beispielsweise in der NKG2A Expression. Diese NK-Zellpopulationen zeigten untereinander ähnliche Expressionen der untersuchten Oberflächenmoleküle (Abbildung 3.7A-C).

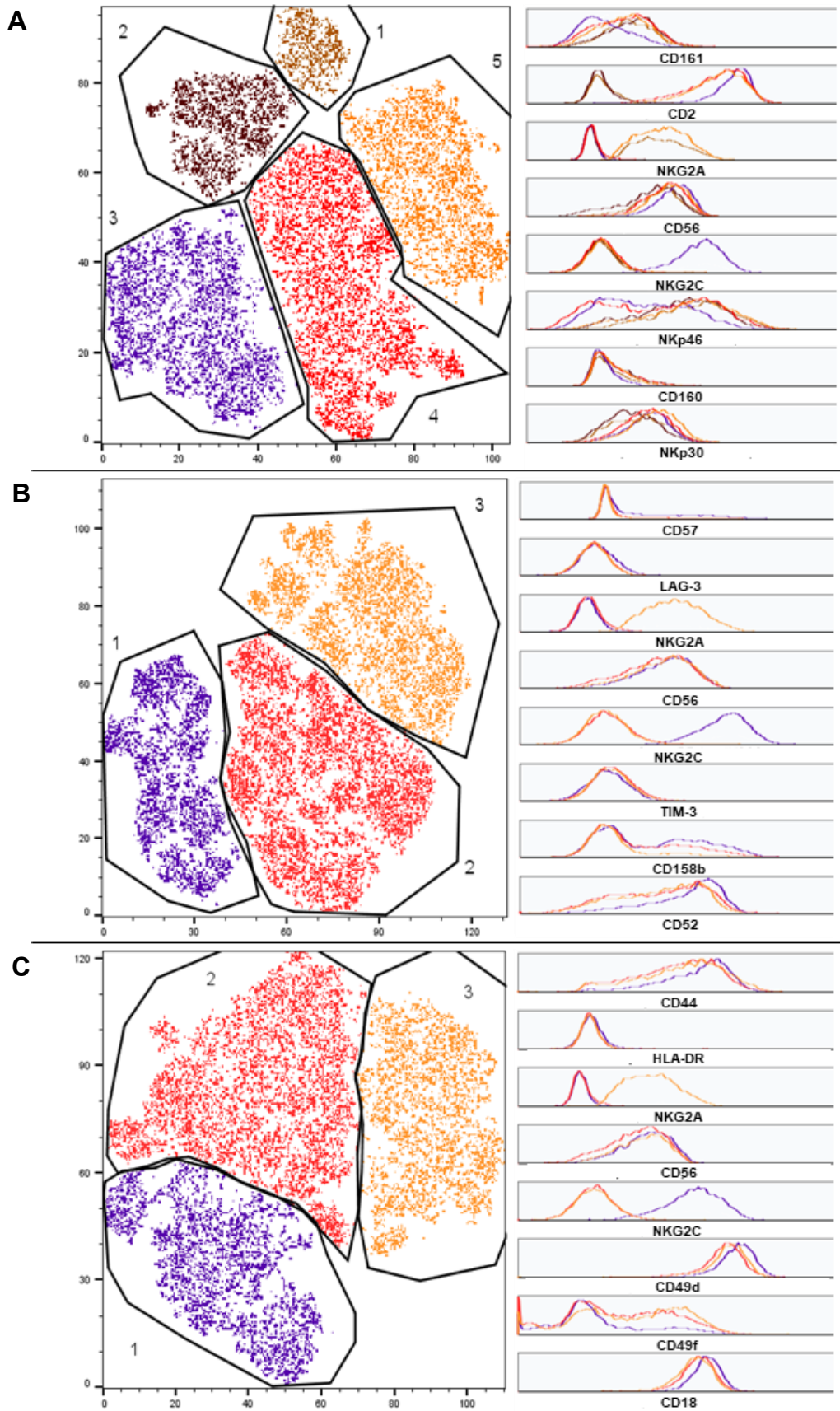


Abbildung 3.7 - t-SNE Analysen mit CD56^{dim} NK-Zellen.

Es wurden t-SNE Analysen mit CD56^{dim} NK-Zellen und dem (A) Färbepanel 1, (B) Färbepanel 2 und (C) Färbepanel 3 durchgeführt. Die NK-Zellpopulationen innerhalb eines Färbepanels wurden durchnummeriert. Die Analysen wurden mit der FlowJo_V10 Software durchgeführt. Im Histogramm wurden die Expressionsdaten der jeweiligen Moleküle farblich zu den NK-Zellpopulationen zugeordnet.

Es gibt Publikationen, in denen NKG2C⁺ NK-Zellen mit Hilfe von einer Vielzahl an Durchflusszytometrie- oder mRNA-Expressionsdaten aufgrund der unterschiedlichen Expression von Molekülen oder Genen in weitere NK-Zellcluster unterteilt werden. Auch innerhalb der NKG2C⁺ NK-Zellen gibt es also unterschiedliche Expressionsmuster (Maucourant et al., 2020).

Für weitere Analysen innerhalb der NKG2C⁺ NK-Zellen wurden die Gates der NKG2C⁺ NK-Zellen in jeweils drei weitere Populationen unterteilt. NKG2C⁺ NK-Zellen mit niedrigeren Expressionen von NKp46 zeigten auch niedrigere Expressionen von NKp30, einem anderen Rezeptor aus der NCR-Familie (Abbildung 3.8A). CD57⁺ NKG2C⁺ NK-Zellen zeigten hingegen eine erhöhte Expression von CD52 (Abbildung 3.8B). Weitere Populationen konnten aufgrund der unterschiedlichen Expression des Oberflächenmoleküls CD49f abgegrenzt werden. Die anderen untersuchten Oberflächenmoleküle wurden auf diesen Populationen ähnlich exprimiert (Abbildung 3.8C). Aufgrund der Limitation durch die Laseranzahl des Durchflusszytometers konnten nicht alle Oberflächenmoleküle aus Kapitel 3.2.2 in einem gemeinsamen Färbepanel untersucht werden.

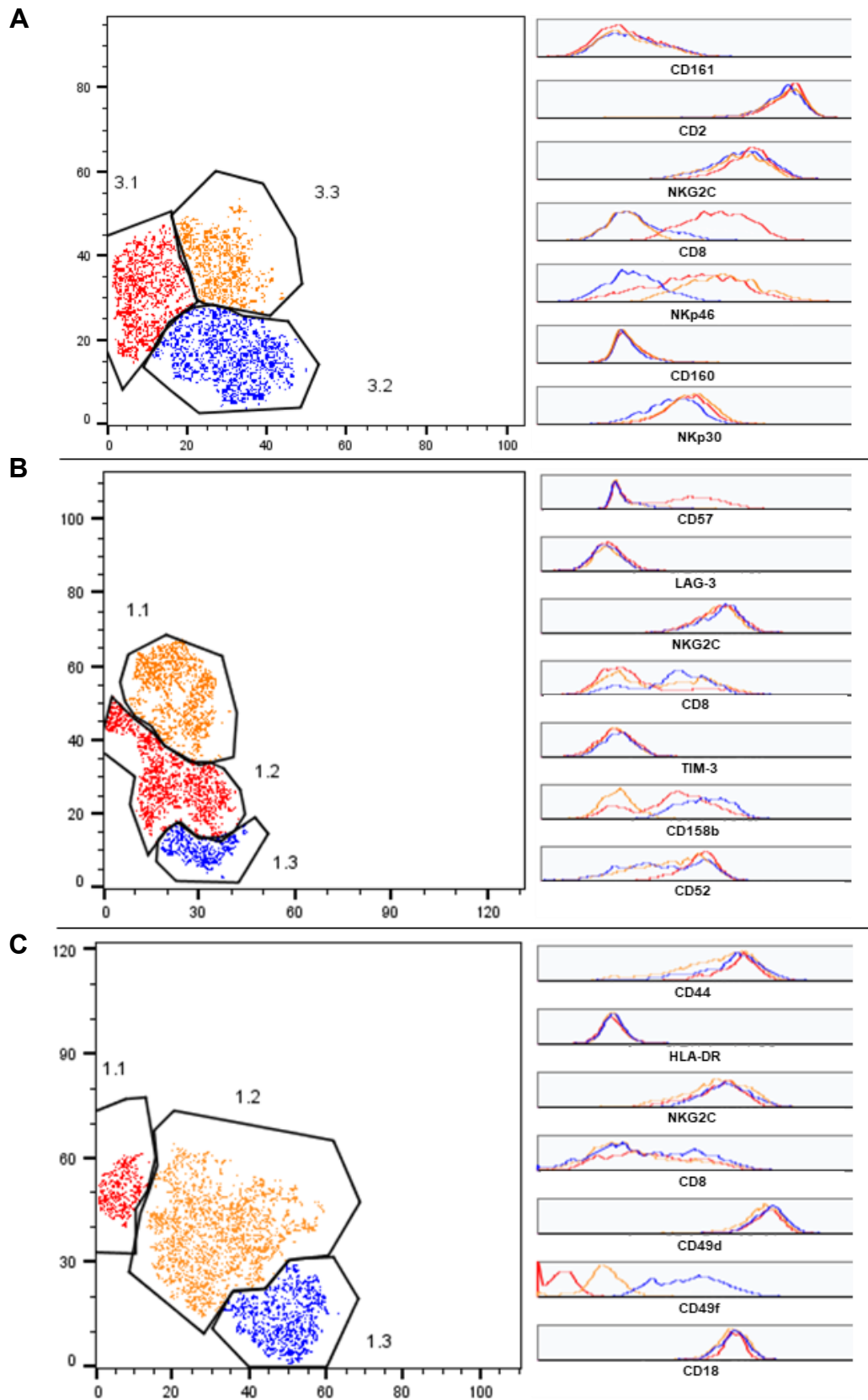


Abbildung 3.8 - t-SNE Analysen mit NKG2C⁺ NK-Zellen.

Es wurden t-SNE Analysen mit NKG2C⁺ NK-Zellpopulationen aus Abbildung 3.7 und dem (A) Färbepanel 1, (B) Färbepanel 2 und (C) Färbepanel 3 durchgeführt. Die Analysen wurden mit der FlowJo_V10 Software durchgeführt. Die NK-Zellpopulationen innerhalb eines Färbepanels wurden durchnummeriert. Im Histogramm wurden die Expressionsdaten der jeweiligen Moleküle farblich zu den NK-Zellpopulationen zugeordnet.

3.3 Analyse des Immunsystems von CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen nach einer Influenza-Impfung

3.3.1 Aufbau von zwei Kohorten mit Influenza-geimpften Personen

In der Literatur werden neben einer Expansion von NKG2C⁺ NK-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen auch andere Einflüsse auf das Immunsystem nach einer primären CMV-Infektion beschrieben. Unter anderem wird eine beschleunigte epigenetische Alterung und Immunseneszenz, sowie eine damit einhergehende abgeschwächte Immunantwort gegen Infektionen oder Impfungen diskutiert (Frasca et al., 2015; Kananen et al., 2015; Trzonkowski et al., 2003; Turner et al., 2014). Neben den Publikationen, die eine abgeschwächte Immunantwort nach Infektionen und Impfungen in CMV_{pos} Personen beschreiben, gibt es auch Arbeitsgruppen, die keinen Einfluss durch CMV oder sogar verstärkte Immunantworten nach Infektionen und Impfungen in CMV_{pos} Personen beschreiben. Begründet werden die verstärkten Antworten durch ein höheres Level an Basalinflammation und mehr IFN γ -produzierenden T-Zellen in CMV_{pos} Personen (Furman et al., 2015; McElhaney et al., 2015).

Mit Hilfe von zwei Kohorten mit Personen, die mit dem Influenza-Impfstoff Inluvac[®] Tetra 2019/20 bzw. Inluvac[®] Tetra 2020/21 geimpft wurden, sollten sowohl Fragestellungen der generellen Influenza-Immunantwort als auch Fragestellungen mit Hinblick auf den Einfluss vom CMV-Serostatus auf die Influenza-Immunantwort thematisiert werden. Außerdem wurde untersucht, ob die Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen einen Einfluss auf die humorale Antwort nach einer Influenza-Impfung hat. Experimente mit diesem Fokus wurden bisher noch nicht publiziert. Die Blutentnahmen erfolgten vor, ein bis zwei Tage nach, 13 - 15 Tage nach, 28 - 32 Tage nach und vier bis fünf Monate nach der Impfung (Abbildung 3.9). Anschließend wurden PBMCs und das Plasma aufgereinigt und für weitere Untersuchungen cryokonserviert (PBMCs) bzw. bei -80°C eingefroren (Plasma) (siehe Kapitel 2.2.2.1).

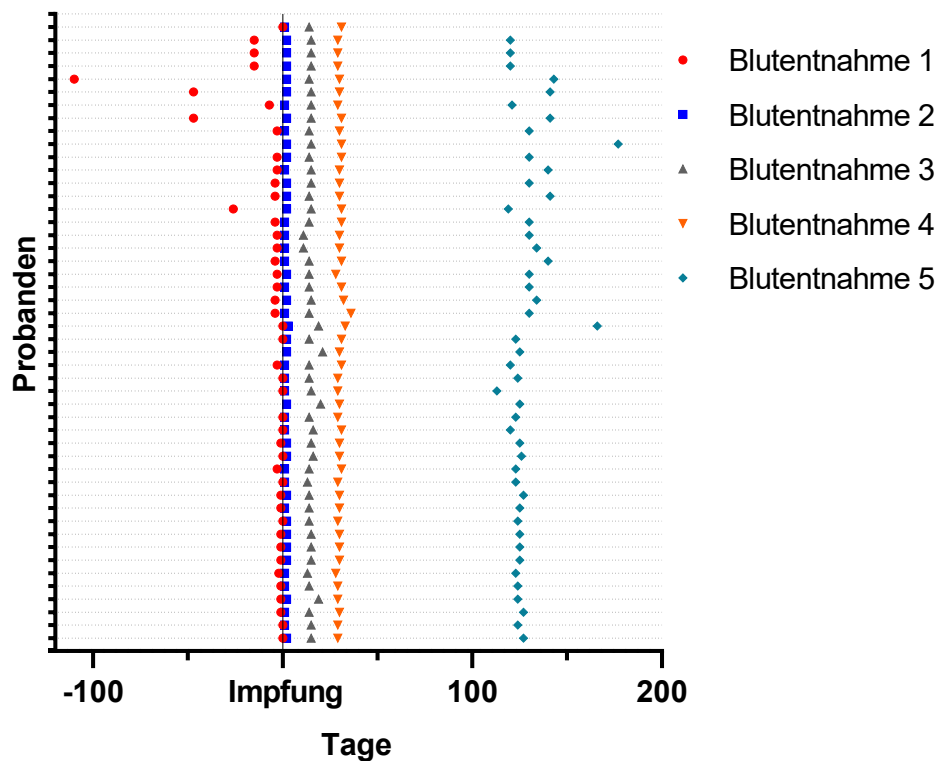


Abbildung 3.9 - Zeitpunkte der Blutentnahmen bei den Influenzakoorten 2019/20 und 2020/21.

Die Blutentnahmezeitpunkte beider Influenza-Kohorten wurden auf den Impftag normalisiert. Jede gestrichelte Linie ist je einem Probanden zugeordnet.

Beide Kohorten zusammen umfassen 36 Probanden, von denen 12 Probanden jeweils in der Kohorte „2019/20“ und „2020/2021“ eingeschlossen sind. Die Seroprävalenz für CMV liegt in der Kohorte „2019/20“ bei 50% und in der Kohorte „2020/21“ bei 45,83%. Für eine deutsche Kohorte aus dem Jahr 1998 gibt eine Publikation eine CMV-Seroprävalenz von 56,7% an. Die Seroprävalenz stieg mit dem Alter (Lachmann et al., 2018). Unsere beiden Influenza-Kohorten waren mit einem Altersmedian zwischen 27 und 27,5 Jahren zwei Kohorten mit überwiegend jungen Probanden. Das erklärt die niedrigere CMV-Seroprävalenz zwischen 45% und 50%. Der vorherrschende HLA-A Typ ist mit 66,67% (Kohorte 2019/20) bzw. 75% (Kohorte 2020/21) in beiden Kohorten HLA-A*02:01 (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 - Charakterisierung der Influenzakoorten 2019/20 und 2020/21.

Die Zahlen in den Klammern bei den Spalten, die das Alter der Influenza-Koorten angeben, zeigen den Bereich des Alters der Probanden.

	Influenzakoorte 2019/20	Influenzakoorte 2020/21
Anzahl Probanden:	n = 24	n = 24
Impfstoff:	<u>Influvac® Tetra 2019/20:</u> A/Brisbane/02/2018 A/Kansas/14/2017 B/Maryland/15/2016 B/Phuket/3073/2013	<u>Influvac Tetra® 2020/21:</u> A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 A/Hong Kong/2671/2019 B/Washington/02/2019 B/Phuket/3073/2013
Alter [Median]:	27,5 (21 - 63)	27 (23 - 48)
CMV seropositiv:	12 (50%)	11 (45,83%)
Alter_{CMVpos} [Median]:	26,5 (25 - 63)	26 (23 - 44)
CMV seronegativ:	12 (50%)	13 (54,17%)
Alter_{CMVneg} [Median]:	28,5 (21 - 47)	27 (23 - 47)
HLA-A*02:01:	16 (66,67%)	18 (75%)

3.3.2 Keine Veränderungen der Frequenz einzelner Lymphozytenpopulationen nach einer Influenza-Impfung

Für die Untersuchung einer allgemeinen Immunreaktion auf die Impfung wurde zunächst die Verteilung der Zellpopulationen *ex vivo* analysiert. Dazu wurde die Frequenz der T-, NK- und B-Zellen von allen lebenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. In Übereinstimmung mit der Literatur wurde zu keinem Zeitpunkt nach der Influenza-Impfung ein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der Lymphozytenpopulationen gemessen (Abbildung 3.10) (Long et al., 2008). Die Studie der zum Vergleich herangezogenen Publikation hat die Frequenzen von T- und NK-Zellen nach Impfung mit den trivalenten Influenza-Impfstoffen aus den Influenzasaisons 2003/04 und 2005/06 gemessen. Außerdem konnten wir übereinstimmend mit dieser Studie nach der Impfung keine Veränderungen der Frequenzen von NKG2C⁺, NKG2A⁺ oder NKp46⁺ NK-Zellen beobachten (Daten nicht gezeigt).

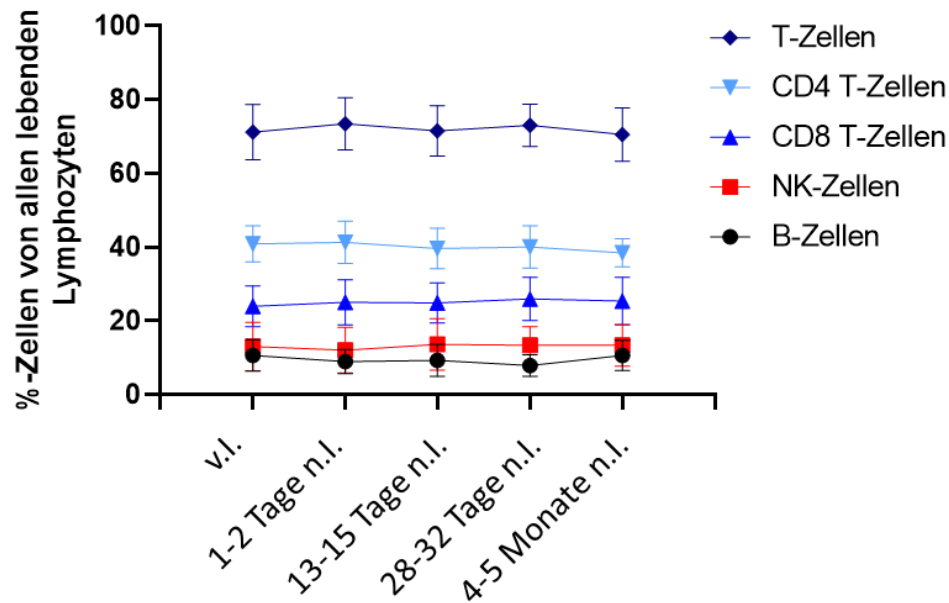


Abbildung 3.10 - Mittlere Frequenzen der Lymphozytenpopulationen nach einer Influenza-Impfung.

Die Mittelwerte der Frequenzen von den Lymphozytenpopulationen wurden von 16 Probanden *ex vivo* durchflusszytometrisch bestimmt. Es handelt sich um die Frequenz bezogen auf alle lebenden Lymphozyten. Zusätzlich ist die Standardabweichung gezeigt. Die Probanden wurden mit dem Influenza-Impfstoff Inluvac® Tetra 2019/20 geimpft. Abkürzungen: v.l. = vor Impfung; n.l. = nach Impfung.

3.3.3 Analyse des Aktivierungsgrads von unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen nach der Influenza-Impfung

Neben der Analyse der Frequenz von einzelnen Lymphozytenpopulationen nach der Influenza-Impfung sollte die Aktivierung der Lymphozyten mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67, der HLA-E Expression, sowie der Expression des *early activation antigens* CD69 gemessen werden. Bei der Analyse der Ki-67⁺-Zellen konnten 28 - 32 Tage nach Impfung statistisch signifikant mehr Ki-67⁺ B-Zellen beobachtet werden als zum Zeitpunkt davor, was für eine verstärkte Proliferation von B-Zellen spricht, da Ki-67 während allen aktiven Phasen der Zellteilung, jedoch nicht in den Ruhephasen exprimiert wird (Abbildung 3.11A; $p = 0,02$) (Soares et al., 2010). Dazu passend wird der höchste Antikörpertiter nach einer Influenza-Impfung zwischen vier und sechs Wochen erwartet (Rastogi et al., 1995). In der klinischen Phase 1/2-Studie des AstraZeneca SARS-CoV-2-Impfstoffs *ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222; Vaxzevria)* wurden bei allen Zeitpunkten nach der Impfung erhöhte Expressionen von Ki-67 in B-Zellen gemessen, mit der höchsten Ki-67 Expression nach 28 Tagen (Ewer et al., 2021).

Interessanterweise gab es bei B-Zellen 1 - 2 Tage und 28 - 32 Tage nach der Impfung ebenfalls eine Hochregulation der HLA-E Expression, die zum jeweiligen darauffolgenden Zeitpunkt wieder auf das Ausgangslevel zurückging. Die Hochregulation von HLA-E 1 - 2 Tage

nach der Impfung konnte ebenfalls bei T- und NK-Zellen beobachtet werden, auch wenn die Hochregulation bei den NK-Zellen statistisch nicht signifikant war (Abbildung 3.11B; $p = 0,06$). Eine Hochregulation von HLA-E auf T-Zellen nach Aktivierung konnte bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden (Grutza et al., 2020). Neben der Hochregulation von HLA-E konnten bei B-, NK- und CD8 T-Zellen 1 - 2 Tage nach der Impfung ebenfalls mehr CD69 exprimierende Zellen gemessen werden, was für eine Aktivierung dieser Zellpopulationen spricht (Abbildung 3.11C). Ein Unterschied zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Probanden konnte hierbei nicht beobachtet werden.

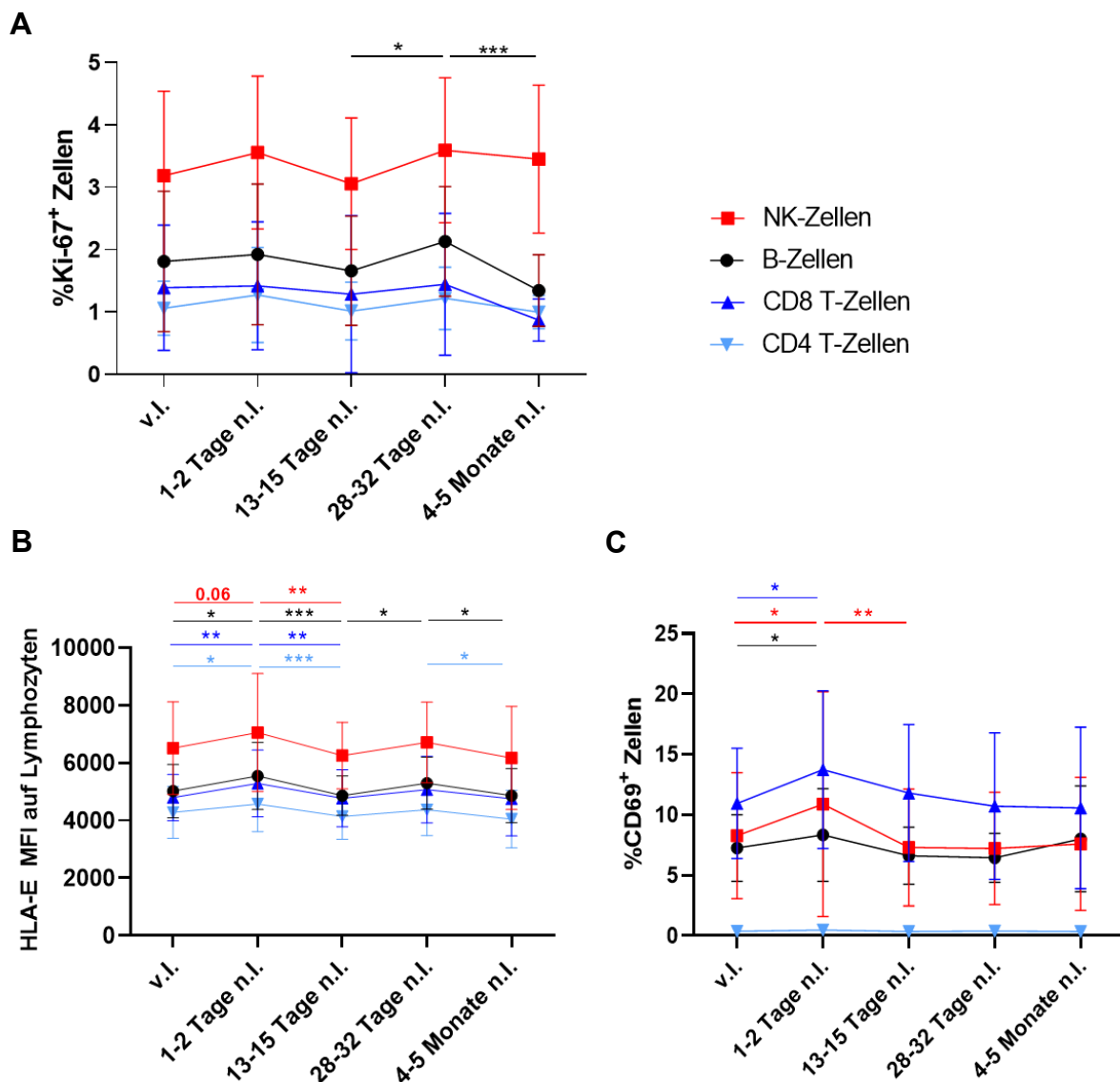


Abbildung 3.11 - Analyse von Aktivierungsmarkern auf Lymphozyten nach einer Influenza-Impfung.

Die Mittelwerte der Frequenzen und der MFI von Aktivierungsmarkern auf Lymphozyten wurden bei 16 Probanden *ex vivo* durchflusszytometrisch bestimmt. Zusätzlich ist die Standardabweichung gezeigt. Statistische Signifikanzen wurden mittels One-way ANOVA und einer Šidák-Korrektur bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die Signifikanzsterne sind der Farbe der Datenpunkte von der bestimmten Lymphozytenpopulation zugeordnet. Abkürzungen: MFI = *mean fluorescence intensity*; v.l. = vor Impfung; n.l. = nach Impfung.

3.3.4 Degranulation von NK-Zellen nach Kultivierung mit Influenza-infizierten Zellen

In Kapitel 3.2 konnten NKG2C⁺ NK-Zellen phänotypisch näher charakterisiert werden. Außerdem konnte in Übereinstimmung mit der Literatur gezeigt werden, dass sich die NK-Zellpopulation phänotypisch von anderen NK-Zellpopulationen unterscheidet. Studien haben vermutet, dass NKG2C⁺ NK-Zellen aufgrund einer erhöhten zytolytischen Kapazität und Zytokinproduktion eine entscheidende Rolle in der Virusbeseitigung spielen könnten (Song et al., 2020). Hier wurde die Aktivität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen Influenza-infizierte MRC-5-Zellen untersucht. MRC-5 ist eine Zelllinie, die aus der Lunge eines gesunden Fötus stammt und permissiv für Influenza ist (Herrero-Urbe et al., 1983; Jacobs et al., 1970). In Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen durch unbehandelte MRC-5-Zellen nicht aktiviert werden (Daten nicht gezeigt). Durch Influenza-infizierte MRC-5-Zellen hingegen wurde eine erhöhte Frequenz von CD107a⁺ NK-Zellen und somit eine erhöhte Frequenz von degranulierenden NK-Zellen beobachtet. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Degranulation zwischen den NKG2A/C NK-Zellpopulationen gefunden werden. Außerdem konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit des Zeitpunkts vor bzw. nach der Impfung gemessen werden (Abbildung 3.12). Neben der in der Literatur beschriebenen verbesserten antiviralen Zytotoxizität von NKG2C⁺ NK-Zellen wurde in Kapitel 3.2 eine verringerte Expression von NKp46 auf NKG2C⁺ NK-Zellen gemessen. NK-Zellen können mit NKp46 das Hämagglutinin von Influenza binden und folglich Influenza-infizierte Zellen NKp46-vermittelt lysieren (Mandelboim et al., 2001). Die niedrigere NKp46 Expression auf NKG2C⁺ NK-Zellen könnte die verbesserte antivirale Zytotoxizität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen Influenza-infizierte Zellen aufheben.

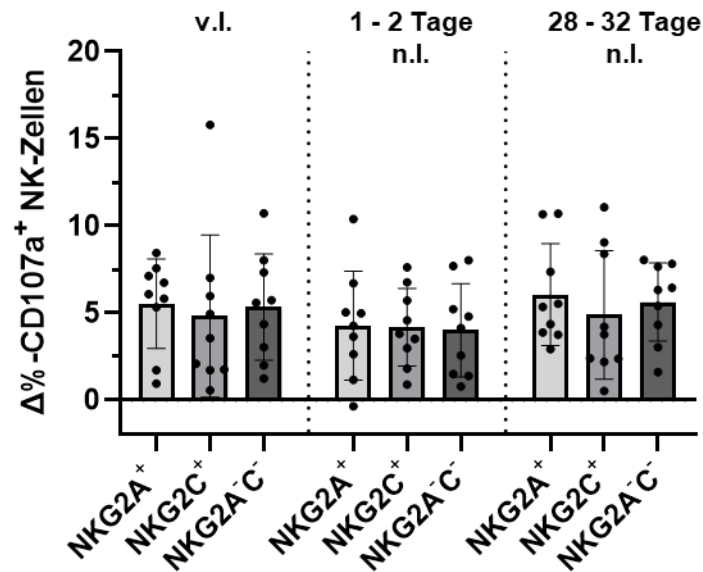


Abbildung 3.12 - Degranulation von NKG2A/C NK-Zellen nach Inkubation mit Influenza-infizierten MRC-5-Zellen.

PBMCs wurden für 5 h mit Influenza-infizierten (A/PR/8/34; H1N1) MRC-5-Zellen inkubiert. NK-Zellsubpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden Proben von den Zeitpunkten vor Impfung (v.l.), 1 - 2 Tage nach Impfung (n.l.) und 28 - 32 Tage n.l. benutzt. Für die Berechnung der $\Delta\%$ -CD107a⁺ NK-Zellen wurde die Frequenz von CD107a⁺ NK-Zellen nach Inkubation mit nicht infizierten MRC-5-Zellen von der Frequenz von CD107a⁺ NK-Zellen nach Inkubation mit infizierten MRC-5-Zellen subtrahiert. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Datenpunkte. Zusätzlich ist die Standardabweichung gezeigt. Die Rohdaten wurden von Lena Possenriede für ein Projekt ihrer Masterarbeit gemessen.

3.4 CD8 T-Zellen nach einer Influenza-Impfung

Proteinbasierte Impfstoffe rufen generell keine starken CD8 T-Zellantworten hervor, jedoch reichen diese laut einer Studie aus, um eine Expansion von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen zu beobachten (Kosor Krnic et al., 2008; Koup & Douek, 2011). Nachdem Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, dass CMV-spezifische CD8 T-Zellen in Abwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen *in vitro* besser expandieren können, sollten Influenza-spezifische CD8 T-Zellen in Influenza-geimpften Personen analysiert werden (Grutza et al., 2020).

3.4.1 Frequenzen von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen *ex vivo*

Zunächst wurde überprüft, ob es eine Korrelation zwischen den Frequenzen von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen und NKG2C⁺ NK-Zellen gibt. Die Frequenzen der Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen wurden in HLA-A*02:01-positiven Blutspendern mit einem fluoreszenzmarkiertem Multimer gegen das im Influenza-Matrixprotein enthaltene HLA-A*02:01-Epitop GILGFVFTL bestimmt. Es konnte keine Korrelation zwischen den Frequenzen von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen und NKG2C⁺ NK-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.13; $p = 0,6378$, $R^2 = 0,0087$).

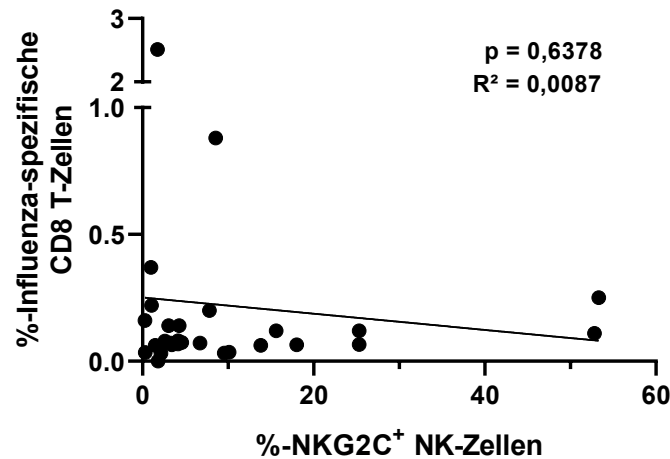


Abbildung 3.13 – Analyse der Frequenzen von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen und NKG2C⁺ NK-Zellen. Die Frequenzen von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen (gemessen mit einem Multimer gegen das im Influenza-Matrixprotein enthaltene HLA-A*02:01-Epitop GILGFVFTL) und NKG2C⁺ NK-Zellen wurden von 28 Blutspendern durchflusszytometrisch bestimmt. Der p-Wert und Korrelationskoeffizient R² wurde mit einer Pearson-Korrelationsanalyse bestimmt.

Die Frequenz von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen wird auch in anderen Publikationen oft mit fluoreszenzmarkierten Multimeren des immundominanten Influenza-Matrixprotein HLA-A*02:01-Epitops GILGFVFTL bestimmt (Rosendahl Huber et al., 2016). Obwohl in den Inluvac[®] Tetra Impfstoffen nur 15 µg Hämagglutinin und ein undefinierter Anteil an Neuraminidase der jeweiligen Influenzastämme enthalten ist, wurde der Anteil an Matrixprotein-spezifischen CD8 T-Zellen mittels Multimerfärbung nach der Impfung bestimmt, um Expansionen von Matrixprotein-spezifischen CD8 T-Zellen durch mögliche Rückstände des Matrixproteins im Impfstoff zu untersuchen. Nach der Influenza-Impfung konnte keine *in vivo* Expansion von Matrixprotein-spezifischen CD8 T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.14).

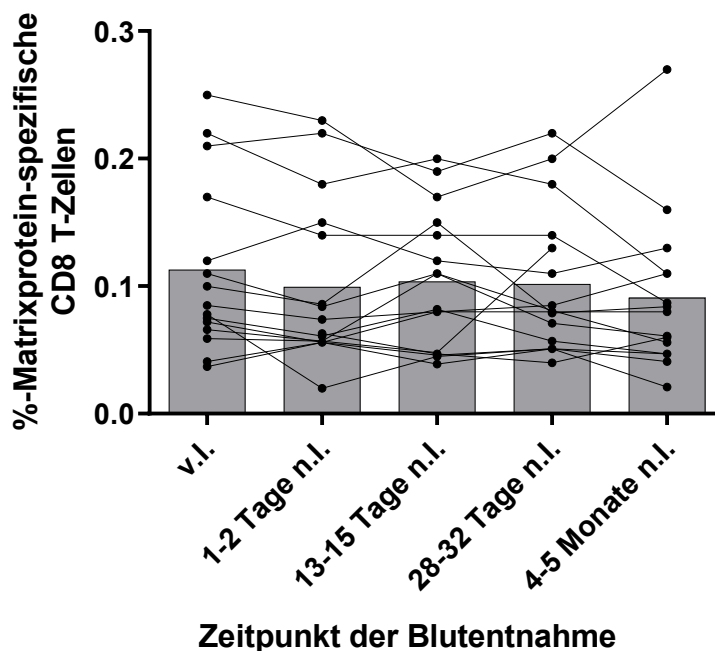


Abbildung 3.14 - Frequenzen von Matrixprotein-spezifischen CD8 T-Zellen nach einer Influenza-Impfung. Die Frequenz von Matrixprotein-spezifischen CD8 T-Zellen wurde von 16 HLA-A*02:01-positiven Probanden der Influenza-Kohorte 2019/20 zu verschiedenen Zeitpunkten vor bzw. nach der Influenza-Impfung mittels Multimerfärbung bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Datenpunkte. Eine Analyse mittels One-way ANOVA zeigte keine statistische Signifikanz zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Abkürzungen: v.l. = vor Impfung; n.l. = nach Impfung.

3.4.2 Epitop-Screening im Hämagglutinin der Influenzastämme aus den Influvac® Tetra Impfstoffen 2019/20 und 2020/21

Da die Influvac Tetra Impfstoffe das Hämagglutinin der jeweiligen Influenzastämme beinhalten, wurden HLA-A*02:01-Epitope in den Hämagglutinin-Proteinen gesucht, um die T-Zellantworten nach einer Influenza-Impfung zu untersuchen. Hier sollte untersucht werden, ob Influenza-spezifische CD8 T-Zellen, ähnlich wie CMV-spezifische CD8 T-Zellen, besser in Abwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen expandieren können. Das wäre interessant, da Influenza-spezifische CD8 T-Zellen deutlich niedrigere Level an HLA-E exprimieren und es nach der Impfung die Möglichkeit gäbe, *in vivo* Expansionen von T-Zellen zu untersuchen (Grutza et al., 2020). Für die Suche nach geeigneten Epitopen im Hämagglutinin wurden die Proteinsequenzen des Hämagglutins der Influenzastämme aus den Impfstoffen von der „Global Initiative on Sharing All Influenza Data“ (GISAID) Datenbank in die *Immune Epitope Database* (IEDB) geladen (GISAID, abgerufen am 25.10.2021). Mit Hilfe des *T Cell Epitope Prediction Tools* wurden mögliche Epitope ausgegeben, die aufgrund diverser biochemischer Faktoren die besten Eignungen als HLA-A*02:01-Epitop besitzen (IEDB, abgerufen am 25.06.2021). Die 27 Peptide mit den besten Eignungen (*Rank-Score* cut-off < 1) wurden zunächst für eine *in vitro* T-Zellexpansion verwendet, um das Epitop für die stärkste spezifische CD8 T-Zellexpansion zu finden (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 – Ergebnisse des *in silico* Epitopscreenings im Hämagglutinin.

Die Peptide wurden als mögliche Epitope mit Hilfe des *T Cell Epitope Prediction Tools* von IEDB bestimmt und anschließend nummeriert. Es wurden nur Peptide ausgewählt, die bei der Analyse von IEDB einen *Rank-Score* von unter 1 hatten. Die Peptidnummer, Position im Hämagglutininprotein (Start/Ende), Aminosäurelänge und -sequenz, sowie der *Rank-Score* und die H1N1-Influenzastämme aus den Impfstoffen, in denen das Peptid vorkommt, wurden aufgeführt. Abkürzung: AS = Aminosäure.

Peptidnummer	Peptidpool	Start	Ende	AS-Länge	AS-Sequenz	Rank	Influenzastamm
p00	Pool 1	35	43	9	TVLEKNVTV	0,06	Brisbane/Guangdong
p01	Pool 1	330	338	9	RLATGLRNV	0,1	Brisbane/Guangdong
p02	Pool 1	444	452	9	VLLENERTL	0,13	Brisbane/Guangdong
p03	Pool 1	388	396	9	AIDKITNKV	0,16	Brisbane/Guangdong
p04	Pool 1	432	440	9	FLDIWTYNA	0,16	Brisbane/Guangdong
p05	Pool 1	402	410	9	KMNTQFTAV	0,17	Brisbane/Guangdong
p06	Pool 1	309	317	9	FQNVHPVTI	0,23	Brisbane
p07	Pool 1	309	317	9	FQNVHPITI	0,23	Guangdong
p08	Pool 1	461	470	10	NLYEKVRNQL	0,26	Brisbane/Guangdong
p09	Pool 2	536	544	9	TVASSLVLV	0,26	Brisbane/Guangdong
p10	Pool 2	391	399	9	KITNKVNSV	0,32	Brisbane/Guangdong
p11	Pool 2	182	190	9	YINDKGKEV	0,32	Brisbane/Guangdong
p12	Pool 2	451	459	9	TLDYHDSNV	0,32	Brisbane/Guangdong
p13	Pool 2	207	216	10	SLYQNADAYV	0,46	Brisbane/Guangdong
p14	Pool 2	511	520	10	KLNREKIDGV	0,54	Brisbane/Guangdong
p15	Pool 2	416	424	9	HLEKRIENL	0,63	Brisbane/Guangdong
p16	Pool 2	7	15	9	VLLYTFTTA	0,78	Brisbane/Guangdong
p17	Pool 2	209	218	10	YQNADAYVFV	0,79	Brisbane/Guangdong
p18	Pool 3	427	435	9	KVDDGFLDI	0,81	Brisbane/Guangdong
p19	Pool 3	117	125	9	ELREQQLSSV	0,85	Brisbane/Guangdong
p20	Pool 3	345	354	10	GLFGAIAGFI	0,96	Brisbane/Guangdong
p21	Pool 3	48	58	11	NLLEDKHNGKL	0,97	Brisbane/Guangdong
p22	Pool 3	60	69	10	KLGGVAPLHL	0,51	Brisbane
p23	Pool 3	306	315	10	SLPFQNVHPV	0,54	Brisbane
p24	Pool 3	57	67	11	KLCKLGGVAPL	0,56	Brisbane
p25	Pool 3	192	202	11	VLWGIHHPPTT	0,81	Brisbane
p26	Pool 3	192	202	11	VLWGIHHPPTI	0,26	Guangdong

Um zu überprüfen, ob die Peptide tatsächlich T-Zellantworten hervorrufen, wurden PBMCs von vier HLA-A*02:01 Blutspendern für 14 Tage mit 25 IU/mL IL-2 und Peptidpools (1 µg/mL pro Peptid) aus je neun Peptiden stimuliert. Dabei wurden PBMCs vom Zeitpunkt 13 - 15 Tage nach Impfung gewählt, um sicher zu gehen, dass das Immunsystem der Personen genügend Zeit hatte, um auf die Impfung zu reagieren, denn der Höhepunkt einer CD8 T-Zellantwort nach einer natürlichen Influenzainfektion ist nach etwa 10 Tagen (Schmidt & Varga, 2018). An Tag 14 der *in vitro* Expansion wurden die Zellen in Anwesenheit von 10 ng/mL BFA für 5 h mit den Peptiden (1 µg/mL pro Peptid) restimuliert.

Neben der Positivkontrolle (p_{GIL}) zeigten zwei Probanden eine IFN γ -Antwort bei einer Expansion mit dem Peptidpool 3 (Abbildung 3.15A). Bei weiteren T-Zellexpansionen mit den Einzelpeptiden des Peptidpools 3 konnten bei jeweils ein bis zwei Probanden IFN γ -Antworten mit den Peptiden p18, p21, p25 und p26 nachgewiesen werden (Abbildung 3.15B). Für eine Analyse der Bindungsstärke dieser vier Peptide an HLA-A*02:01 wurde das easYmer[®]-Kit der Firma Immunaware verwendet. Mit Hilfe des Kits werden die Peptide auf leere

HLA-A*02:01-Moleküle geladen. Die HLA-Moleküle sind mit Biotin-Molekülen versehen und können somit an Streptavidin beladene Beads binden. Diese Beads sind mit PE-konjugierten Antikörpern gegen das β_2 -microglobulin beschichtet. Nur bei einer korrekten Faltung des HLA-Komplexes durch die Bindung an das Peptid entstehen Signale durch die PE-konjugierten Antikörper (Immunaware, abgerufen am 02.08.2021). Das Peptid p18 zeigte eine minimal bessere Bindungsaffinität zu HLA-A*02:01 als die Negativkontrolle (p_{NRE}), das Peptid p21 hatte eine deutlich bessere Bindungsaffinität. Die Peptide p25 und p26 zeigten eine ähnlich gute Bindungsaffinität wie die Positivkontrolle (p_{NLV}) (Abbildung 3.15C). Sowohl das Peptid p21, als auch die Peptide p25 und p26 binden also gut an HLA-A*02:01.

Nach Kontrolle der Bindung der untersuchten Peptide an HLA-A*02:01 sollten Influenza-spezifische CD8 T-Zellen von geimpften HLA-A*02:01 Probanden mit dem Peptid p26 expandiert werden, da dieses Peptid die beste Bindungsstärke aufwies. Dazu wurden Proben von verschiedenen Zeitpunkten vor bzw. nach der Impfung benutzt, um zu untersuchen, ob CD8 T-Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Impfung besser expandieren können als vor der Impfung. Zu keinem Zeitpunkt nach der Impfung konnten statistisch signifikant erhöhte Frequenzen von IFN γ ⁺ CD8 T-Zellen gemessen werden, jedoch zeigte ein Proband (IAV-50) zu jedem Zeitpunkt mehr als 2% IFN γ ⁺ CD8 T-Zellen (Abbildung 3.15D). Da die Restimulation der expandierten T-Zellen von dieser Person auch in der Probe vor Impfung eine IFN γ -Antwort auslöste, könnten diese Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen von einer kürzlich zurückliegenden Influenza-Infektion oder einer Impfung aus den letzten Jahren mit einem Influenzavirus stammen, das dieses Epitop im Hämagglutinin besitzt.

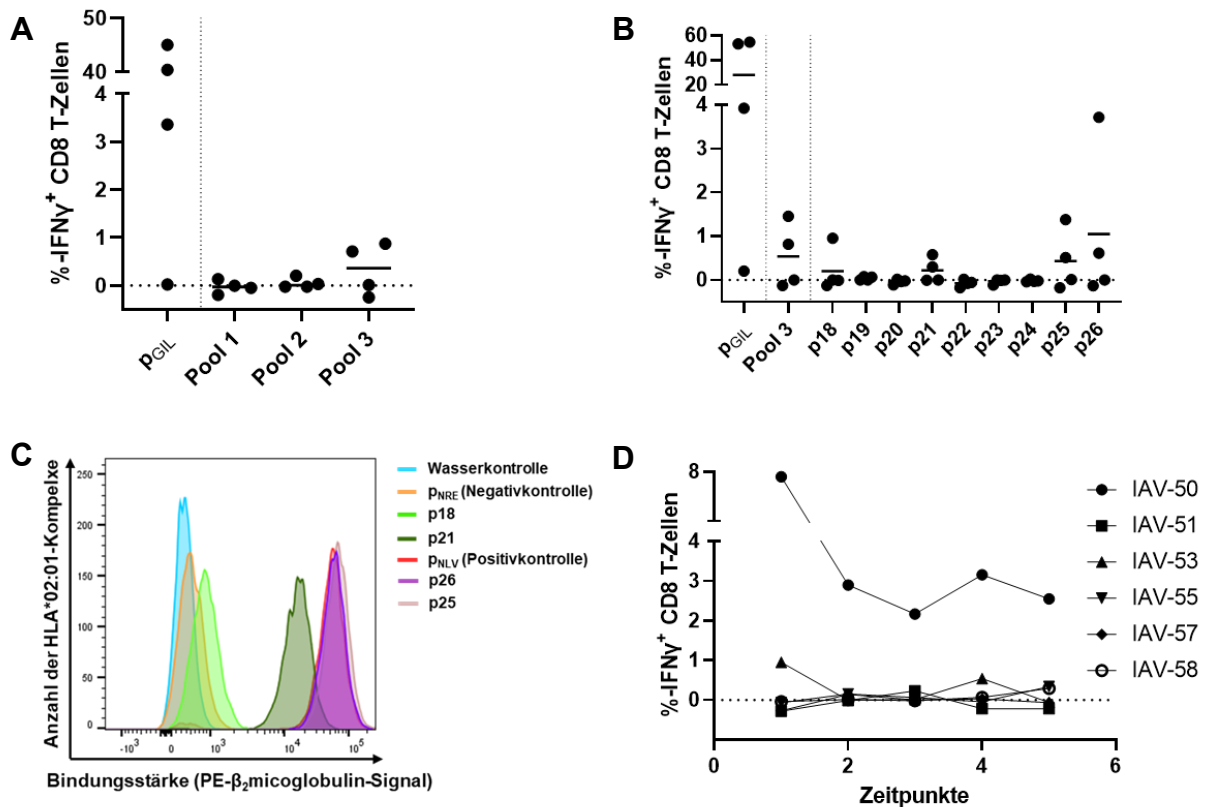


Abbildung 3.15 - *In vitro* Screening von CD8 T-Zellepitopen im Hämagglutinin des Influenza A Virus.

14-tägige CD8 T-Zellexpansionen wurden (A) mit den Peptidpools (je neun Peptide) bzw. (B) den Einzelpeptiden aus dem Peptidpool 3 und einem HLA-A*02:01-Kontrollpeptid aus dem Influenza-Matrixprotein (GILGFVFTL) durchgeführt. Der jeweilige Mittelwert der Datenpunkte wird mit einer Linie gezeigt. (C) Peptid-Bindungsassay mittels easYmer®-Kit von Immunaware. Als Negativkontrolle wurde das HLA-B*40:01 spezifische Peptid aus dem humanen Polyomavirus (NREESMELMDL) benutzt. Als Positivkontrolle wurde das HLA-A*02:01 spezifische Peptid aus CMV (NLVPMVATV) benutzt. Alle Peptide wurden in einer Konzentration von 10 μ M und die HLA-A*02:01 Moleküle in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt. (D) 14-tägige CD8 T-Zellexpansionen wurden mit dem Peptid p26 und PBMCs von Probanden aus der Influenzakoheorte 2020/21 vor bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung durchgeführt. Zeitpunkte: 1 = vor Impfung, 2 = ein bis zwei Tage nach Impfung, 3 = 13 - 15 Tage nach Impfung, 4 = 28 - 32 Tage nach Impfung, 5 = vier bis fünf Monate nach Impfung.

3.5 Einfluss vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort nach Impfungen

Wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben, wird der Einfluss der phänotypischen Veränderungen des Immunsystems auf die Immunantwort nach einer Impfung häufig diskutiert. Ein Review von Sara van den Berg fasst 17 Studien zusammen, die alle den Einfluss vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort nach einer Influenza-Impfung untersuchen. Überraschenderweise kommen die Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen. Obwohl einige Studien einen negativen CMV-Effekt auf die humorale Antwort nach einer Influenza-Impfung zeigen, sehen andere Studien keinen oder sogar einen positiven Effekt vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort. Auch altersabhängige Einflüsse werden unterschiedlich beschrieben. Während einige Studien einen positiven Effekt vom CMV-Serostatus bei jungen Probanden

und keinen Effekt bei älteren Probanden sehen, beschreibt eine Studie keinen Effekt vom CMV-Serostatus bei jungen Probanden, aber einen negativen Effekt vom CMV-Serostatus auf die humorale Immunantwort nach einer Influenza-Impfung bei älteren Probanden (van den Berg et al., 2019b)

Zusätzlich konnte in Kapitel 3.3.3 eine minimal höhere HLA-E Expression auf B-Zellen im Vergleich zu CD8 T-Zellen gemessen werden. Außerdem stieg die HLA-E Expression zusammen mit dem Ki-67 Proliferationsmarker an, was für eine HLA-E Hochregulation während der Aktivierung und Proliferation der B-Zellen spricht. Daher wurde der Einfluss der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die humorale Antwort nach einer Influenza-Impfung analysiert. Expandieren B-Zellen schlechter in Anwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen aufgrund der NKG2C/HLA-E Interaktion zwischen NK- und B-Zelle, wird eine schwächere Antikörperproduktion und somit eine schwächere humorale Immunantwort nach einer Impfung erwartet, so die Hypothese. Zusätzlich wurde der Einfluss vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort nach einer Influenza-Impfung und einer SARS-CoV-2-Impfung gemessen. Neben dem Fokus auf die humorale Immunantwort von jungen Probanden mit der Influenzakoohorte können wir den Einfluss vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort nach Impfung mit einem mRNA-basierten Impfstoff analysieren. Veröffentlichte Daten zu Antikörpertitern nach einer Impfung mit dem *Biontech/Pfizer BNT162b2* Impfstoff in Abhängigkeit des CMV-Serostatus gibt es zu diesem Zeitpunkt noch nicht (Stand 26.08.2021). Da von der Kohorte der SARS-CoV-2 Impfstudie aufgrund des Alters der meisten Probanden nur wenig Blut abgenommen und das Serum aufgereinigt wurde, konnten keine Frequenzen von NKG2C⁺ NK-Zellen gemessen werden, um den Einfluss der NKG2C⁺ NK-Zellen auf die humorale Antwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung zu analysieren.

Für die Bestimmung der Antikörpertiter gegen Influenza wurde ein Hämagglutinations-Hemm-Test (HHT) durchgeführt. Für die Bestimmung der Antikörpertiter gegen SARS-CoV-2 wurden mit Hilfe des Euroimmun Anti-SARS-CoV-2-Quantivac ELISA IgG Antikörper gegen die Spike-Protein-Untereinheit S1 von SARS-CoV-2 gemessen.

3.5.1 Einfluss vom CMV-Serostatus und der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die humorale Antwort nach einer Influenza-Impfung

Um die Antikörpertiter gegen das Hämagglutinin der Influenzastämme aus den Impfstoffen zu bestimmen, wurde mit dem Plasma der Probanden aus den Influenzakoohorten 2019/20 und 2020/21 ein HHT durchgeführt. Die Daten der beiden Influenzakoohorten wurden zusammengefasst. In Übereinstimmung mit Angaben des *Centers for Disease Control and*

Prevention (CDC) wurde bereits zwei Wochen nach Impfung ein erhöhter geometrische mittlere Titer (GMT) gemessen (CDC, abgerufen am 25.08.2021). Nach einem Monat wurden die höchsten GMT erreicht und nach vier Monaten konnte bereits eine Abnahme des GMT gemessen werden. Zu jedem Zeitpunkt vor und nach der Impfung war der GMT gegen den H3N2-Influenzastamm höher als der GMT gegen den H1N1-Influenzastamm (Abbildung 3.16A).

Zusätzlich konnte kein Einfluss der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die humorale Antwort nach einer Influenza-Impfung gefunden werden. Die HHT-Titer gegen den H1N1-Influenzastamm waren 28 - 32 Tage nach Impfung unabhängig von der Frequenz der NKG2C⁺ NK-Zellen (Abbildung 3.16B; $p = 0,8810$, $R^2 = 0,0008$). Auch die HHT-Titer gegen den H3N2-Influenzastamm waren unabhängig von der Frequenz der NKG2C⁺ NK-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Per Definition gilt eine Person ab einem HHT-Titer von ≥ 40 als seroprotectiert gegen den untersuchten Influenzastamm (Zacour et al., 2016). Vor der Impfung waren bereits 19 von 24 CMV_{neg} und 16 von 23 CMV_{pos} Probanden seroprotectiert gegen die H1N1-Influenzastämme (Abbildung 3.16C). Gegen die H3N2-Influenzastämme waren vor der Impfung 23 von 24 CMV_{neg} und 20 von 23 CMV_{pos} Probanden seroprotectiert (Abbildung 3.16E). Infektionen mit oder Impfungen gegen diese oder ähnliche Influenzastämme aus den letzten Jahren zeigen oft eine anhaltende, messbare Immunität in diesen Probanden (Krammer, 2019).

Im Vergleich zwischen vor und einem Monat nach der Impfung wurde unabhängig vom CMV-Serostatus und unabhängig vom Influenzastamm eine statistisch signifikante Steigerung der HHT-Titer gemessen (Abbildung 3.16C+E; jeweils $p < 0,0001$). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Probanden konnten weder bei den HHT-Titern, noch bei den Quotienten aus den HHT-Titern 28 - 32 Tage nach der Impfung und den Titern vor Impfung beobachtet werden (Abbildung 3.16C-F). Der Quotient war dabei, wie in der Literatur beschrieben, stark abhängig vom HHT-Titer vor der Impfung (Olafsdottir et al., 2017). Probanden, die vor der Impfung bereits einen hohen HHT-Titer hatten, zeigten demnach einen kleineren Vervielfachungsfaktor des HHT-Titers nach der Impfung (Daten nicht gezeigt). Jeweils zwei unterschiedliche Probanden waren 28 - 32 Tage nach der Impfung nicht seroprotectiert gegen die H1N1- bzw. H3N2-Influenzastämme, wobei es sich bei den Probanden um CMV_{pos} Personen handelte (Abbildung 3.16C+E).

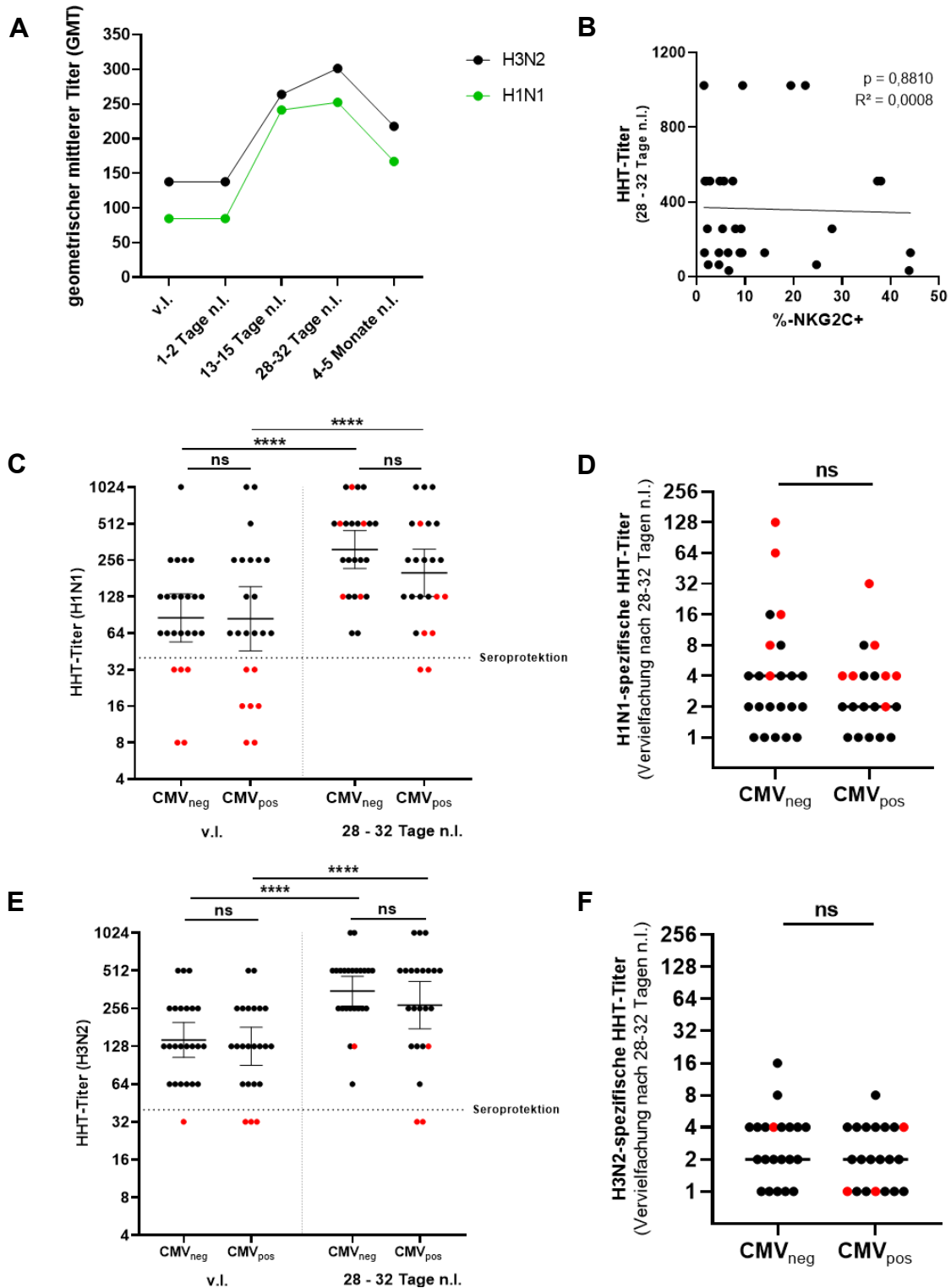


Abbildung 3.16 - Humorale Immunantwort nach einer Influenza-Impfung.

Die Daten der beiden Influenzakoorten 2019/20 und 2020/21 wurden zusammengefasst. (A) Der geometrische mittlere Titer (GMT) gegen die H3N2- und die H1N1-Influenzastämme wurde berechnet und aufgetragen. (B) Die Hämagglutinations-Hemmtest-Titer (HHT-Titer) gegen den H1N1-Influenzastamm 28 - 32 Tage nach Impfung (n.l.) wurden gegen die Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen aufgetragen. Der p-Wert und Korrelationskoeffizient R^2 wurde mit einer Pearson-Korrelationsanalyse bestimmt. Die HHT-Titer vor Impfung (v.l.) und 28 - 32 Tage n.l. gegen die (C) H1N1- bzw. (E) H3N2-Influenzastämme wurden ebenfalls aufgetragen. Zusätzlich wurde der Vervielfachungsfaktor der HHT-Titer von vor der Impfung zu 28 - 32 Tage nach Impfung berechnet (D + F). In rot wurden die Probanden hervorgehoben, die vor Impfung noch keine Seroprotektion (HHT-Titer < 40) gegen den Influenzastamm hatten. Der jeweilige Mittelwert der Datenpunkte wird mit einer Linie gezeigt. Die Rohdaten wurden von Lena Possenriede für ein Projekt ihrer Masterarbeit gemessen. Statistische Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Tests in Abhängigkeit der Zeit bzw. Mann-Whitney-Tests in Abhängigkeit des CMV-Serostatus bestimmt (**** $p < 0,0001$). Abkürzung: ns = nicht signifikant.

3.5.2 Einfluss vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung

Für die Untersuchung der humoralen Antwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung in Abhängigkeit des CMV-Serostatus wurde die Kohorte in drei Altersgruppen eingeteilt (jung < 40 Jahre; mittel = 40 - 60 Jahre; alt \geq 80 Jahre), da die CMV-Seroprevalenz mit dem Alter steigt (Abbildung 3.17A). Das konnte in Übereinstimmung mit der Literatur auch mit Hilfe einer Korrelationsanalyse in dieser Kohorte gezeigt werden (Abbildung 3.17B; $p = 0,0002$, $R^2 = 0,7712$) (Lachmann et al., 2018). Aus diesem Grund mussten die Vergleiche der Antikörpertiter zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen innerhalb von Altersgruppen stattfinden. Es konnten weder bei der ersten, noch bei der zweiten Impfung statistisch signifikante Unterschiede im Antikörpertiter zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen gemessen werden (Abbildung 3.17C+D). Nach der zweiten *Biontech/Pfizer BNT162b2* Impfdosis konnten höhere Antikörpertiter erreicht werden als nach der ersten Impfdosis, wobei nur acht der 179 Bewohner nach der zweiten Impfdosis keinen positiven SARS-CoV-2 Spike-spezifischen Antikörpernachweis hatten (< 25,6 BAU/mL). Alle acht Probanden waren aus der Altersgruppe „alt“. Die Antikörpertiter nahmen mit dem Alter ab (Müller et al., 2021). Bei CMV_{pos} Probanden der Altersgruppen „mittel“ und „alt“ konnte nach der zweiten Impfdosis im Vergleich zu CMV_{neg} Probanden der gleichen Altersgruppe eine Tendenz zu niedrigeren Antikörpertitern beobachtet werden, auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant ist ($p_{\text{mittel}} = 0,055$; $p_{\text{alt}} = 0,082$; Abbildung 3.17D). Ein Grund für diese Beobachtung könnte die in Kapitel 3.3.1 beschriebene beschleunigte Immunseneszenz durch CMV sein. PBMCs für die Überprüfung des Einflusses der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die Antikörpertiter nach der Impfung waren für diese Kohorte nicht verfügbar.

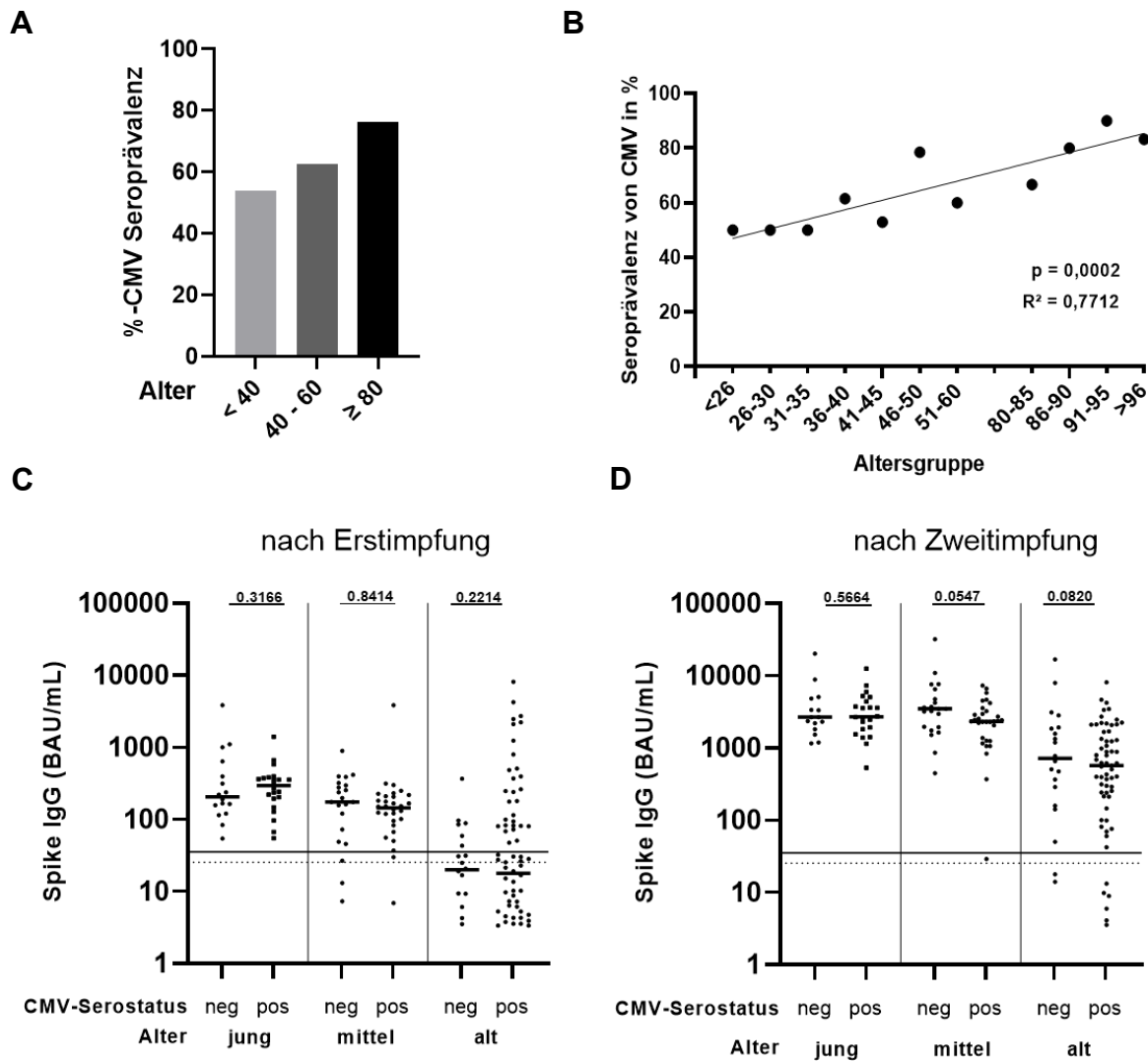


Abbildung 3.17 - Alters- und CMV-Serostatus-abhängige Analyse der humoralen Immunantwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung.

(A) Die CMV-Seroprävalenz wurde innerhalb von drei Altersgruppen untersucht (Alter: < 40 Jahre, 40 - 60 Jahre & ≥ 80 Jahre). Der CMV-Serostatus wurde mit Hilfe des Architect i2000SR (Abbott Core Laboratory) gemessen. (B) Die altersabhängige CMV-Seroprävalenz wurde mit Hilfe von Altersgruppen mit einem Abstand von fünf Jahren gemessen. Bei Altersgruppen mit weniger als drei Personen wurde die Altersgruppe auf zehn Jahre erweitert. Der p-Wert und Korrelationskoeffizient R^2 wurde mit einer Pearson-Korrelationsanalyse bestimmt. (C) Der Spike IgG Titer (BAU/mL; BAU = bindende Antikörper Einheiten) 17 - 19 Tage nach einer bzw. (D) 17 Tage nach zwei Impfstoffdosen *Biontech/Pfizer BNT162b2* wurde mittels Euroimmun Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac ELISA bestimmt. Die Kohorte wurde in drei Altersgruppen unterteilt: jung < 40 Jahre; mittel = 40 - 60 Jahre; alt > 80 Jahre. Proben mit Antikörpertitern über 25,6 BAU/mL gelten als grenzwertig seropositiv (horizontale, gestrichelte Linie). Proben mit Antikörpertitern über 35,2 BAU/mL gelten als seropositiv für SARS-CoV-2 (horizontale Linie). Der jeweilige Mittelwert der Datenpunkte wird mit einer Linie gezeigt. Die statistischen Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test bestimmt.

4 Diskussion

4.1 NKG2C⁺ NK-Zellen in CMV_{pos} Personen

Eine der viel beschriebenen Veränderungen des humanen Immunsystems bei CMV_{pos} Personen ist die Expansion von NK-Zellen, die den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2C tragen. In dieser Arbeit wurden NKG2C⁺ NK-Zellen phänotypisch *ex vivo* und funktionell gegen Jurkat-Zellen in Abhängigkeit der HLA-E Expression auf den Jurkat-Zellen charakterisiert. Bei der Untersuchung der Frequenzen von NK-Zellpopulationen in unserer Kohorte konnten wir in Übereinstimmung mit der Literatur in CMV_{pos} Personen eine statistisch signifikant höhere Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen messen (Abbildung 3.1) (Guma et al., 2004). Interessant ist dabei, dass dennoch in sechs von siebzehn CMV_{pos} Personen weniger als 10% NKG2C⁺ NK-Zellen gemessen werden konnten. Das Phänomen, dass NKG2C⁺ NK-Zellen in nur etwa ein Drittel der CMV_{pos} Personen expandieren, wurde bereits beschrieben (Barnes et al., 2020). Obwohl noch nicht alle Mechanismen hinter diesem Phänomen aufgeklärt sind, konnten im Jahre 2018 *in vitro* NKG2C⁺ NK-Zellen von CMV_{neg} Personen expandiert werden. Es wurde gezeigt, dass die variablen CMV-Peptide des UL40 Proteins aus den jeweiligen Virusisolaten, welches an das HLA-E bindet, einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Stärke der Expansion und Aktivierung von NKG2C⁺ NK-Zellen haben (Hammer et al., 2018).

4.2 Immunregulatorische Funktion von NKG2C⁺ NK-Zellen

gegenüber HLA-E^{high} exprimierenden T-Zellen

Eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass CMV-spezifische CD8 T-Zellen in Abwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen *in vitro* besser expandieren können (Grutza et al., 2020). Aufgrund der hohen Oberflächenexpression von HLA-E auf CMV-spezifischen CD8 T-Zellen und einer erhöhten HLA-E Expression während der Expansion dieser T-Zellen wird angenommen, dass die schwächere Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen in Anwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen die Folge von immunregulatorischen Mechanismen durch NKG2C/HLA-E-Interaktion zwischen NKG2C⁺ NK-Zellen und T-Zellen ist. Dazu sollte überprüft werden, ob es einen Einfluss von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die Frequenz von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen gibt, da der Großteil der CMV-spezifischen CD8 T-Zellen einen maturierten Phänotyp besitzen und somit eine hohe HLA-E Expression aufweisen (Grutza et al., 2020; Smith et al., 2016; van den Berg et al., 2019a).

Mit Hilfe von *ex vivo* Messungen mit PBMCs von CMV_{pos} Personen konnte gezeigt werden, dass die Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen keinen Einfluss auf die generelle Frequenz von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen hat (Abbildung 3.2A). Die Frequenz von CD8 TEMRA-Zellen war hingegen niedriger bei CMV_{pos} Personen mit einer hohen Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen ($\geq 30\%$) (Abbildung 3.2B). Das könnte daran liegen, dass CD8 TEMRA-Zellen die höchste HLA-E Expression im Vergleich zu anderen CD8 T-Zellpopulationen aufweisen, da die HLA-E Expression mit der Maturation der T-Zelle steigt (Abbildung 3.2C). In den einzelnen T-Zellpopulationen gab es in Abhängigkeit von ihrer Maturation keinen Unterschied in der HLA-E Expression zwischen Personen mit hoher und niedriger Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen (Abbildung 3.2D). Daher ergibt sich die Theorie, dass nur aktivierte und proliferierende Zellen mit einer erhöhten HLA-E-Expression durch NKG2C⁺ NK-Zellen reguliert werden.

Um die Aktivität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen T-Zellen in Abhängigkeit ihrer HLA-E Expression zu messen, wurden Aktivitätsassays mit der Jurkat-Zelllinie durchgeführt. *Ex vivo* Untersuchungen über das zytotoxische Potential von NKG2C⁺ NK-Zellen zeigten zunächst, dass NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu NKG2C⁻ NK-Zellen mehr intrazelluläres Granzym B beinhalten (Abbildung 3.3A). Eine erhöhte Expression von Granzymen und Perforin und somit ein erhöhtes zytotoxisches Potential konnte bereits in HCMV-assoziierten NKG2C⁺CD57⁺ NK-Zellen beobachtet werden (Kared et al., 2018). NKG2C⁺ NK-Zellen zeigten in Kultur mit HLA-E^{high} exprimierenden Jurkat-Zellen eine erhöhte Rate an Exozytose von Granzym B im Vergleich zu NKG2C⁻ NK-Zellen. Außerdem konnte bei NKG2C⁺ NK-Zellen eine Tendenz zu einer erhöhten Rate an Exozytose von Granzym B gemessen werden, wenn HLA-E^{high} exprimierende Jurkat-Zellen im Vergleich zu HLA-E^{low} exprimierenden Jurkat-Zellen in Kultur waren, auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant ist (Abbildung 3.3C). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten im Vergleich zu HLA-E^{low} exprimierenden Jurkat-Zellen höhere Frequenzen von aktivierten Caspasen 3 und 7 in HLA-E^{high} exprimierenden Jurkat-Zellen gemessen werden, wenn Jurkat-Zellen aus beiden Konditionen (HLA-E^{low} und HLA-E^{high}) gleichzeitig mit PBMCs von Personen mit mehr als 20% NKG2C⁺ NK-Zellen kultiviert wurden (Abbildung 3.4B). Die Caspasen 3 und 7 werden durch Granzym B gespalten und aktiviert, was zur Apoptose der Zielzelle führt (Afonina et al., 2010). Da Granzym B auch bei der Aktivierung von anderen Caspasen involviert ist, können bei diesem Experiment nicht alle Signalwege verfolgt werden. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die schwächere Expansion von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen in Anwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen aufgrund der Hochregulation der HLA-E Expression während der Proliferationsphase der T-Zellen und der NKG2C/HLA-E-Interaktion mit NKG2C⁺ NK-Zellen zustande kommt.

4.3 Phänotypische Charakterisierung von NKG2C⁺ NK-Zellen

Neben der Inhibition von expandierenden CMV-spezifischen CD8 T-Zellen sollte überprüft werden, ob es Anzeichen für weitere, bisher unbekannte immunregulatorische Funktionen von NKG2C⁺ NK-Zellen gibt. Dazu wurde das Rezeptorrepertoire der CMV-assoziierten NKG2C⁺ NK-Zellen mit anderen NK-Zellpopulationen verglichen.

In anderen Studien wurden bereits einige Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen und Transkriptionsfaktoren zwischen NKG2C⁺ und NKG2C⁻ NK-Zellen ausfindig gemacht. Dabei wurden NKG2C⁺ NK-Zellen in einigen Publikationen weiter in Abhängigkeit ihrer Expression von CD57 und FcεR1γ unterteilt (Kared et al., 2018; Kim et al., 2019; Kobyzeva et al., 2020; Wu et al., 2013).

Die Oberflächenmolekül-Expressionsanalyse mit Hilfe des LEGENDscreen-Kits konnte zeigen, dass NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu NKG2A⁺ und NKG2A⁻/C⁻ NK-Zellen ein verändertes Rezeptorrepertoire haben. Die PCA zeigt größere Abstände zwischen den Datenpunkten der Oberflächenmolekülexpressionen von NKG2C⁺ NK-Zellen und den anderen NK-Zellpopulationen als zwischen NKG2A⁺ und NKG2A⁻/C⁻ NK-Zellen. Zusätzlich wurden deutliche Unterschiede in den Oberflächenmolekülexpressionen auf NK-Zellen zwischen den verschiedenen Probanden gemessen (Abbildung 3.5A). Da das Geschlecht, das Alter, die Herkunft und weitere Daten dieser Probanden anonym sind, konnten keine spezifischeren Schlussfolgerungen über die Gründe der Diversität gezogen werden. Aufgrund der Vielzahl an epigenetischen und genetischen Unterschiede zwischen zwei Individuen war jedoch ein großer Unterschied im Phänotyp der NK-Zellen zu erwarten.

Statistische Signifikanzanalysen der einzelnen 361 Oberflächenmoleküle, die mit dem LEGENDscreen-Kit untersucht wurden, ergaben vier Oberflächenmoleküle, die auf NKG2C⁺ NK-Zellen statistisch signifikant höher exprimiert werden als auf NKG2A⁺ und NKG2A⁻/C⁻ NK-Zellen (CD158b, CD52, CD44 und CD2) und acht Moleküle, die auf NKG2C⁺ NK-Zellen statistisch signifikant niedriger exprimiert werden als auf NKG2A⁺ und NKG2A⁻/C⁻ NK-Zellen (TIM-3, Integrin β7, SIGLEC-7, CD160, CD161, CD49f, NKp30 und CD31) (Abbildung 3.5B). Auch eine Analyse, bei der der mittlere Frequenzunterschied der Oberflächenmolekül⁺ NK-Zellen untersucht wurde, bestätigte die veränderte Expression der genannten Moleküle. Zusätzlich hatten NKG2C⁺ NK-Zellen im Durchschnitt über 10% mehr ICOS⁺, HLA-DR⁺ und LAG-3⁺ Zellen als NKG2A⁺ und NKG2A⁻/C⁻ NK-Zellen und über 10% weniger NKp30⁺ Zellen (Abbildung 3.5C). Aufgrund der geringen Anzahl an Probanden (n = 4) wurde die Oberflächenexpression dieser Moleküle bei einer größeren Anzahl an Probanden in weiteren Färbepanel verglichen, um die Unterschiede aus Abbildung 3.5 zu bestätigen.

Alle auf den NKG2C⁺ NK-Zellen stärker exprimierte Oberflächenmoleküle aus Abbildung 3.5C zeigten auch bei der Bestätigungsanalyse eine statistisch signifikant höhere Frequenz auf NKG2C⁺ NK-Zellen. Bei einigen Oberflächenmolekülen, wie z.B. ICOS, HLA-DR oder LAG-3 war der Expressionsunterschied im Durchschnitt jedoch kleiner als 10% (Abbildung 3.6A).

Einige der beschriebenen Expressionsunterschiede auf NKG2C⁺ NK-Zellen wurden bereits in anderen Publikationen diskutiert. So konnte beispielsweise eine Studie eine höhere Oberflächenexpression von HLA-DR auf NKG2C^{bright} NK-Zellen messen, was in einem *in vitro* Experiment aufgrund der verstärkten Antigenpräsentation über HLA-DR die Aktivierung von polyfunktionalen Effektorgedächtnis CD4 T-Zellen zur Folge hatte (Costa-Garcia et al., 2019).

Die erhöhte Expression des Maturierungsmarkers CD57 auf NKG2C⁺ NK-Zellen ist ebenfalls bekannt. Einige Studien nutzten CD57 als zusätzlichen Marker für die Definition von HCMV-assoziierten adaptiven NK-Zellen (Florez-Alvarez et al., 2020; Kared et al., 2018). Ein weiteres Oberflächenmolekül, das auf NKG2C⁺ NK-Zellen höher exprimiert wird, ist der co-stimulatorische Rezeptor CD2. Ähnlich wie in unserem Experiment, konnten in anderen Studien höhere Expressionslevel von CD2 bei NKG2C⁺ NK-Zellen gefunden werden, sowohl in RNA-, als auch Proteinanalysen (Lee et al., 2015; Schlums et al., 2015). Experimente mit Antikörper-beschichteten p815-Zellen zeigten dabei eine deutlich stärkere Aktivierung von adaptiven bzw. NKG2C⁺ NK-Zellen mit co-Stimulation über CD2 (Liu et al., 2016). Neben CD2 konnte in unserem Experiment auch eine höhere Frequenz von ICOS⁺ Zellen bei NKG2C⁺ NK-Zellen gemessen werden. Da ICOS im Mausmodell auch co-stimulatorische Funktionen in NK-Zellen besitzt, könnte man ein verstärktes Aktivierungspotential bei NKG2C⁺ NK-Zellen in Menschen vermuten (Ogasawara et al., 2002). Für die Bestätigung dieser Hypothese sind funktionelle Experimente mit ICOS⁺ NK-Zellen nötig.

Auch die höhere Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen mit inhibitorischen KIR-Rezeptoren wurde bereits beschrieben. Der fehlende KIR-Polymorphismus in expandierten NKG2C⁺ NK-Zellen wurde mit einer klonalen Expansion von NKG2C⁺ NK-Zellen nach einer primären CMV-Infektion in Verbindung gebracht (Manser et al., 2019). Neben den aktivierenden, co-stimulatorischen und inhibitorischen Oberflächenmolekülen waren auf NKG2C⁺ NK-Zellen auch einige Adhäsionsmoleküle stärker exprimiert. Das Matrixadhäsionsmolekül CD44, CD18, sowie CD49d und CD52, zeigten eine höhere Frequenz auf NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu den anderen NK-Zellpopulationen. Eine erhöhte Expression von CD44 auf CD56^{dim}NKG2C⁺ NK-Zellen wurde bereits *ex vivo* gemessen, jedoch nicht funktionell untersucht. In Publikationen wird CD44 als Rezeptor für Hyaluronsäure, als Matrixadhäsionsmolekül und Homing-Marker für peripheres lymphatisches Gewebe beschrieben (Kobyzeva et al., 2020;

Marhaba & Zoller, 2004). Die erhöhte Expression von CD49d lässt ebenfalls auf eine verstärkte Adhäsionsfähigkeit von NKG2C⁺ NK-Zellen schließen.

Die Analyse der Expressionsunterschiede von Oberflächenmolekülen auf NKG2C⁺ NK-Zellen zeigte ein deutlich höheres Level in der CD52 Oberflächenexpression. Obwohl die physiologischen und pathologischen Wirkmechanismen von CD52 wenig aufgeklärt sind, wird Alemtuzumab, ein anti-CD52 Antikörper, beispielsweise bei Therapien gegen multiple Sklerose eingesetzt (Sanofi, abgerufen am 25.08.2021). Seit 2019 wurde die Verwendung von Alemtuzumab (Lemtrada®) aufgrund von schweren, teils tödlichen Nebenwirkungen eingeschränkt (EMA, abgerufen am 25.08.2021). Bei RNA-Expressionsanalysen konnten bereits zwei Studien eine deutlich erhöhte Expression von CD52 bei NK-Zellclustern gemessen werden, die in der Publikation als CMV-assoziierte adaptive NK-Zellen beschrieben werden (Smith et al., 2020; Yang et al., 2019). Die Hochregulation der beschriebenen Adhäsionsmoleküle auf NKG2C⁺ NK-Zellen lässt eine verstärkte Formation von Effektor-Target Zellkonjugaten und eine verstärkte Zytotoxizität gegen NK-Zell sensitive Zielzellen vermuten, da diese Eigenschaften bereits mit anderen Zelladhäsionsmolekülen auf NK-Zellen assoziiert werden konnten (Robertson et al., 1990).

Auch die Expression von LAG-3 auf NKG2C⁺ NK-Zellen wurde bereits in Studien untersucht. Während im Gegensatz zu unseren Ergebnissen *ex vivo* keine höhere Expression von LAG-3 auf NKG2C⁺ NK-Zellen beobachtet wurde, konnte eine verstärkte LAG-3 Hochregulation auf NKG2C⁺ NK-Zellen nach einer siebentägigen Stimulation mit 10 ng/mL IL-15 und Antikörpern gegen aktivierende Rezeptoren wie NKG2C, NKG2D oder NKp30 beobachtet werden, was eine Dysfunktionalität der Zellen gegen Tumorzellen zur Folge hatte (Merino et al., 2019).

Insgesamt konnten höhere Frequenzen von Oberflächenmolekülen auf NKG2C⁺ NK-Zellen gemessen werden, die besonders mit Maturation, co-Stimulation und Adhäsion in Verbindung gebracht werden. Dies deutet auf mehrfache Aktivierungen und stärkeres Aktivierungspotenzial von NKG2C⁺ NK-Zellen hin.

Auch bei den schwächer exprimierten Oberflächenmolekülen aus Abbildung 3.5C konnten bei der Bestätigungsanalyse statistisch signifikant niedrigere Frequenzen auf NKG2C⁺ NK-Zellen gemessen werden. Lediglich NKp30⁺ NK-Zellen waren in der NKG2A⁻/C⁻ NK-Zellpopulation seltener zu finden als in der NKG2C⁺ NK-Zellpopulation (Abbildung 3.6B). Einige Studien haben eine niedrigere Expression von NKp30 auf NKG2C⁺ im Vergleich zu anderen NK-Zellpopulationen gezeigt. Diese Studien zeigten jedoch den Vergleich zwischen NKG2C⁺ und NKG2A⁺ NK-Zellen (Guma et al., 2004) oder zwischen NKG2C⁺ und NKG2C⁻ NK-Zellen (Kim et al., 2019; Kobyzeva et al., 2020) und keinen exakten Vergleich zu NKG2A⁻/C⁻

NK-Zellen. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte auf der Oberfläche von NKG2C⁺ NK-Zellen eine schwächere Expression von NKp46 gemessen werden, einem anderen aktivierenden NCR. Eine Studie beschreibt eine entscheidende Rolle von FcεR1γ in der Unterstützung der NKp46 Expression auf der Oberfläche von NK-Zellen. Viele NKG2C⁺ NK-Zellen exprimieren kein FcεR1γ, weshalb die NKp46 Oberflächenexpression auf diesen Zellen nicht unterstützt wird (Kim et al., 2019). Unter anderem wird eine geringere Tumorzytotoxizität von CMV-assoziierten NKG2C⁺ NK-Zellen auf die fehlende Expression von FcεR1γ und die damit einhergehende Herunterregulation der NCR-Oberflächenexpression zurückgeführt (Hwang et al., 2012; Liu et al., 2020).

Bei einer Studie aus dem Jahr 2018 wurde neben einer erhöhten Frequenz von NKG2C⁺CD57⁺SIGLEC-7⁺CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen bei CMV_{pos} Personen auch eine Korrelation zwischen dem anti-CMV IgG Titer und dieser NK-Zellsubpopulation beobachtet (Kared et al., 2018). Der auf NKG2C⁺ NK-Zellen schwächer exprimierte Rezeptor SIGLEC-7 ist mit inhibitorischen Funktionen assoziiert, wenn der Rezeptor an Sialinsäure bindet (Zheng et al., 2020). Das Fehlen des inhibierenden Rezeptors könnte eine stärkere Aktivierung von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen verschiedene Zelltypen auslösen. Sialinsäure kommt nämlich ubiquitär auf Zelloberflächen vor (Varki, 2008).

Bezogen auf CD161 wird in der Literatur ein unvollständiges Verständnis über die Funktion des Moleküls auf NK-Zellen beschrieben. In einer Publikation werden CD161⁺ NK-Zellen als proinflammatorische NK-Zellen definiert (Kurioka et al., 2018). In Übereinstimmung mit der Literatur konnten wir niedrigere Expressionen von CD161 auf NKG2C⁺ NK-Zellen messen (Beziat et al., 2012). Eine Bindung von CD161 an den Liganden *Lectin-Like Transcript 1* (LLT1) inhibiert die Zytotoxizität von NK-Zellen, was aufgrund der niedrigeren Expression von CD161 auf NKG2C⁺ NK-Zellen eine stärkere Zytotoxizität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen LLT1 tragende Zellen vermuten lässt (Aldemir et al., 2005). Die Expression von LLT1 trägt auf Tumorzellen zur Immunevasion bei (Sanchez-Canteli et al., 2020).

Die Maturation der NK-Zellen bei persistierenden Pathogenen wie CMV, sowie die Akquisition von Rezeptoren wie CD2, CD57 und NKG2C wird unter anderem durch Tim-3 reguliert. In einer Publikation wird die Herunterregulation von TIM-3, zusammen mit der Akquisition von inhibitorischen Rezeptoren mit einem erschöpften und zytotoxischen Phänotyp in inflammatorischer Umgebung während einer chronischen HIV Infektion in Zusammenhang gebracht (Kared et al., 2018). NKG2C⁺ NK-Zellen haben in unserem Experiment eine niedrigere Expression von TIM-3.

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Rezeptoren konnten wir niedrigere Frequenzen von CD160 auf NKG2C⁺ NK-Zellen messen. CD160 bindet an HLA-C und aktiviert die NK-Zelle

(Le Bouteiller et al., 2002). Neben den stärker exprimierten Adhäsionsmarkern konnten auch zwei Adhäsionsmarker gefunden werden, die auf NKG2C⁺ NK-Zellen niedriger exprimiert werden, CD49f und CD31. Diese beiden Oberflächenmoleküle wurden noch nicht im Zusammenhang mit NKG2C⁺ NK-Zellen untersucht. Für die funktionelle Einordnung sollten in Zukunft funktionelle Analysen mit NKG2C⁺ NK-Zellen mit Fokus auf diese beiden Moleküle durchgeführt werden. Eine von uns beobachtete niedrigere Expression von CD119 (IFN γ R1) auf NKG2C⁺ NK-Zellen deutet auf eine verringerte Aktivität der NKG2C⁺ NK-Zellen nach Stimulation mit IFN γ hin.

Mit Hilfe der t-SNE Analysen konnten NKG2C⁺ NK-Zellen aufgrund der Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen in weitere NK-Zellcluster unterteilt werden. So konnten NKG2C⁺ NK-Zellen unter anderem in Abhängigkeit ihrer NKp46 oder CD49f Expression weiter unterteilt werden. Für detailliertere Charakterisierungen dieser NKG2C⁺ NK-Zellsubpopulationen könnten funktionelle Experimente, phänotypische Durchflusszytometrieanalysen mit mehr Oberflächenmolekülen und Transkriptionsfaktoren oder Massenzytometrieanalysen durchgeführt werden. Dass mehrere NK-Zellcluster in NKG2C⁺ NK-Zellen gefunden werden können, zeigt eine Studie, bei der NK-Zellen in COVID-19 Patienten untersucht wurden (Maucourant et al., 2020). Eine Analyse mittels Massenzytometrie schätzt 6.000 - 30.000 verschiedene phänotypische NK-Zellpopulationen (Horowitz et al., 2013). Interessant wären besonders die funktionellen Unterschiede dieser NK-Zellpopulationen und ihre Bedeutung im pathologischen Umfeld.

4.4 Zelluläre Immunantworten in Personen nach einer

Influenza-Impfung

Neben der Analyse des Einflusses von CMV-assoziierten NKG2C⁺ NK-Zellen und dem CMV-Serostatus auf die Immunantwort nach Impfungen und Infektionen, wurden zunächst allgemeine Aktivierungsmarker nach einer Influenza-Impfung beobachtet.

4.4.1 Aktivierungsgrad von Lymphozytenpopulationen nach einer Influenza-Impfung

Obwohl nach einer Influenza-Impfung nachweislich verstärkte adaptive und angeborene zelluläre Immunantworten *in vitro* nachgewiesen werden können, konnten wir in Übereinstimmung mit der Literatur keine Veränderungen der Lymphozytenpopulation-Frequenzen beobachten (Abbildung 3.10) (Long et al., 2008). Eine Aktivierung von NK-, T- und B-Zellen 1 - 2 Tage nach der Influenza-Impfung konnte mittels Hochregulation der HLA-E und

CD69 Expression beobachtet werden (Abbildung 3.11B+C). Die Hochregulation von HLA-E auf T-Zellen durch Aktivierung konnte bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben werden (Grutza et al., 2020). 28 - 32 Tage nach der Influenza-Impfung konnte außerdem eine statistisch signifikante Hochregulation der HLA-E Expression auf B-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.11B). Zusätzlich konnten zu diesem Zeitpunkt mehr proliferierende B-Zellen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 nachgewiesen werden als zum Zeitpunkt davor (Abbildung 3.11A). Ein Unterschied zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Probanden konnte hierbei nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Für detailliertere Analysen sollten die B- und Plasmazellen zukünftig bei der Färbung mit Hilfe von Markern in ihre antikörperproduzierenden Subtypen unterteilt werden.

4.4.2 Degranulation von NK-Zellen nach Kultivierung mit Influenza-infizierten MRC-5-Zellen und der Einfluss einer Influenza-Impfung

NKG2C⁺ NK-Zellen werden in der Literatur eine gute antivirale Eigenschaften zugeschrieben. So ist die Menge der HBV-DNA beispielsweise in HIV/HBV co-infizierten Patienten invers mit der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen korreliert (Song et al., 2020). Außerdem zeigen Studien, dass NKG2C⁺ NK-Zellen zur Kontrolle der HIV-Virämie während einer primären Infektion mit dem Virus beiträgt (Gondois-Rey et al., 2017; Ma et al., 2017). In dieser Arbeit wurde die Aktivität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen Influenza-infizierte MRC-5-Zellen analysiert. Dabei konnte keine stärkere Degranulation durch NKG2C⁺ NK-Zellen im Vergleich zu NKG2A⁺ oder NKG2A⁻ NK-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.12). Ein Grund dafür könnte die in Kapitel 3.2 beschriebene niedrigere Expression von NKp46 auf NKG2C⁺ NK-Zellen sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen Influenza-infizierte Zellen NKp46-vermittelt lysieren können. Durch Blockieren von NKp46 kann diese Lyse inhibiert werden (Mandelboim et al., 2001). Als Grund für die niedrigere NKp46 Expression in NKG2C⁺ NK-Zellen wird die fehlende Expression von FcεR1 beschrieben, denn FcεR1 unterstützt die Oberflächenexpression von NKp46 (Kim et al., 2019; Liu et al., 2020). Die niedrigere Expression von NKp46 auf NKG2C⁺ NK-Zellen könnte bezogen auf Influenza die sonst stärkere antivirale Aktivität von NKG2C⁺ NK-Zellen ausgleichen. Zusätzlich zeigt das Oberflächenmolekül-Screening in Kapitel 3.2, dass CMV-assoziierte NKG2C⁺ NK-Zellen neben NKp46 noch viele weitere Oberflächenmoleküle anders exprimieren. Für eine Einordnung sollten beispielsweise stressinduzierte Liganden auf Influenza-infizierten MRC-5-Zellen untersucht werden, um mögliche Interaktionspartner für NK-Zellrezeptoren zu identifizieren. Außerdem gibt eine Analyse mittels CD107a eine Auskunft über die Degranulation von Molekülen und nicht über die spezifische Zytotoxizität gegen Influenza-

infizierte Zellen. Daher sollte in Zukunft die Zytotoxizität der NK-Zellen mit Hilfe von Degranulation von Granzymen oder die Lyse der Influenza-infizierten MRC-5-Zellen analysiert werden.

Aufgrund der Hochregulation der Aktivierungsmarker von NK-Zellen nach der Impfung (Abbildung 3.11) sollte die Aktivität der NK-Zellen gegen Influenza-infizierte Zellen mit den Proben von verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Impfung analysiert werden. Trotz der hochregulierten Aktivierungsmarker bei *ex vivo* Messungen nach der Impfung wurde keine stärkere Degranulation bei NK-Zellsubpopulationen in Kultur mit Influenza-infizierten MRC-5-Zellen gemessen (Abbildung 3.12). Bei den Proben ein bis zwei Tage nach der Impfung wurde bei den NK-Zellsubpopulationen sogar eine minimal niedrigere Degranulation gemessen, auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant ist. Grund dafür könnte eine inhibierende Wirkung des Hämagglutinins vom Influenza-Impfstoff sein. Studien haben bereits beschrieben, dass das Blockieren von NKp46 durch Hämagglutinin vor einer Kultur mit Zielzellen die Zytotoxizität von NK-Zellen inhibiert (Mao et al., 2010).

In einer Studie wurden 21 - 38 Tage nach Impfung von gesunden Erwachsenen mit einem inaktivierten trivalenten Influenza-Impfstoff minimal erhöhte IFN γ ⁺ NK-Zellen nach Stimulation mit inaktiviertem Influenzavirus beobachtet (Long et al., 2008). Eine andere Studie konnte 6 - 12 Tage nach einer trivalenten Impfung mit abgetöteten Influenzaviren eine erhöhte NK-Zellzytotoxizität gegen K562-Zellen messen (Schapiro et al., 1990). Eine weitere Studie aus dem Jahr 2020 adressierte auch die Degranulation von NK-Zellen nach einer Influenza-Impfung. Dabei konnten sieben Tage nach Impfung mit einem adjuvantierten pandemischen Impfstoff Pandemrix[®] *ex vivo* erhöhte Frequenzen von CD107a⁺ Zellen in CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen gemessen werden (Riese et al., 2020). Der nicht-adjuvantierte proteinbasierte Impfstoff Inluvac[®] Tetra hat die Frequenz der CD107a⁺ NK-Zellen nach Impfung nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Trotz Analyse der Degranulation kann mit unseren Daten keine abschließende Aussage über die Zytotoxizität von einzelnen NK-Zellsubpopulationen gegenüber Influenza-infizierten Zellen nach der Influenza-Impfung getroffen werden. Dafür sind weitere Analysen z.B. der exozytierten zytotoxischen Granula oder der Lyse von infizierten Zielzellen notwendig.

4.4.3 CD8 T-Zellantworten nach einer proteinbasierten Influenza-Impfung

Neben NK-Zellen spielen besonders CD8 T-Zellen eine Rolle in der Virusbeseitigung nach einer Infektion (Moradi et al., 2021; Thimme et al., 2003). Daher wurde auch die CD8 T-Zellantwort nach einer Influenza-Impfung analysiert. Da ein Einfluss von NKG2C⁺ NK-

Zellen auf T-Zellen bekannt ist (siehe Kapitel 3.1.3), wurde auch ein möglicher Einfluss von der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die Frequenz von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen untersucht. Ähnlich wie bei CMV-spezifischen CD8 T-Zellen gibt es keine Korrelation zwischen den Frequenzen von NKG2C⁺ NK-Zellen und Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen *ex vivo* (Abbildung 3.13). Die Frequenzen wurden mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Multimers gegen das im Influenza-Matrixprotein enthaltene HLA-A*02:01-Epitop GILGFVFTL bestimmt. Eine Studie, die das gleiche Multimer für die Messung der Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen benutzt hat, konnte niedrigere Frequenzen von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen in CMV_{pos} Probanden im Vergleich zu CMV_{neg} Probanden mit einem Alter von über 60 Jahren messen (van den Berg et al., 2021). Bei Probanden zwischen 20 und 52 Jahren gibt es bei dieser Studie, ähnlich wie in unserer Kohorte mit einem Altersmedian von 27 Jahren, keinen Unterschied in der Frequenz von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Probanden (Daten nicht gezeigt).

Nach der Influenza-Impfung konnte keine Expansion von Matrixprotein-spezifischen CD8 T-Zellen gemessen werden. Grund dafür ist die Zusammensetzung des Impfstoffs, denn der Inluvac[®] Tetra Impfstoff ist ein proteinbasierter Impfstoff und beinhaltet lediglich 15 µg Hämagglutinin und eine unbestimmte Menge an Neuraminidase, also kein Matrixprotein (Mylan, abgerufen am 13.09.2021). Natürliche Infektionen mit Influenza hingegen zeigen eine Expansion von Matrixprotein-spezifischen CD8 T-Zellen (van den Berg et al., 2021). Bei Screenings von HLA-A*02:01-Epitopen, die im Hämagglutinin der Influenzaviren vorhanden sind, konnten zwar an HLA-A*02:01 bindende Peptide gefunden werden, jedoch zeigten nur CD8 T-Zellen in einer Person eine IFN γ -Antwort von über 2% nach einer T-Zellexpansion mit dem Peptid p26 aus dem Hämagglutinin (Abbildung 3.15D). Dabei konnten die p26-spezifischen CD8 T-Zellen auch bei Proben von Zeitpunkten nach der Impfung keine höhere Frequenzen von IFN γ ⁺ CD8 T-Zellen nach Expansion aufweisen. Ein Grund dafür könnte sein, dass proteinbasierte Impfstoffe generell weniger CD8 T-Zellantworten hervorrufen, da Peptide von exogenen Proteinen, außer bei der Kreuzpräsentation, insbesondere über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden (Kosor Krnic et al., 2008; Koup & Douek, 2011; Purcell et al., 2007). Für eine weitere Analyse sollten mit Proben nach der Impfung Multimerfärbungen von Hämagglutinin-spezifischen CD8 T-Zellen durchgeführt werden, um zu schauen, ob es T-Zellen gibt, die spezifisch für dieses Peptid sind. Eine Multimerfärbung hat den Vorteil, virusspezifische CD8 T-Zellen ohne *in vitro* Manipulation zu detektieren (Sims et al., 2010). In einer Studie mit Probanden, die mit einem proteinbasierten Influenza-Impfstoff immunisiert wurden, konnten nach der Impfung mittels Multimerfärbung signifikant höhere Hämagglutinin-spezifische CD8 T-Zellen gemessen werden (Kosor Krnic et al., 2008).

4.5 Humorale Immunantworten in CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen nach einer Influenza-Impfung

Der wichtigste Schutz vor einer Influenza-Infektion ist die jährliche Impfung, die jedes Jahr tausende von Influenza-Toten verhindert (CDC, abgerufen am 07.10.2021). Aufgrund von Impfungen und Infektionen mit Influenzaviren in den letzten Jahren gibt es in der Bevölkerung eine gewisse Grundimmunität gegen zirkulierende Influenzaviren (Olafsdottir et al., 2017; Strindhall et al., 2016). Schon vor der Impfung konnte in unserer Studie bei 35 von 47 Probanden eine Seroprotektion (HHT-Titer ≥ 40) gegen die H1N1-Influenzastämme und bei 43 von 47 Probanden eine Seroprotektion gegen die H3N2-Influenzastämme nachgewiesen werden (Abbildung 3.16B+D). 13 - 15 Tage nach der Influenza-Impfung konnten gegen beide Influenzastämme statistisch signifikant steigende Antikörpertiter verzeichnet werden, die nach 28 - 32 Tagen den Höhepunkt erreicht haben (Abbildung 3.16). Diese Beobachtung der Antikörperkinetik wird durch Ergebnisse anderer Studien unterstützt (Kositanont et al., 2012; Skowronski et al., 2008). Trotz eines Rückgangs der HHT-Antikörper 4 - 5 Monate nach der Impfung sind alle Probanden, die nach der Impfung gemäß der EMA-Definition serokonvertiert sind, immer noch seroprotectiert (Daten nicht gezeigt) (EMA, abgerufen am 27.10.2021). Auch ein Review über 14 Studien zeigt, dass die Seroprotektion innerhalb einer Influenza-Saison anhält, auch bei älteren Personen. In den Studien wurden Antikörpertiter und Seroprotektion ≥ 4 Monate nach einer Influenza-Impfung untersucht (Skowronski et al., 2008). Dennoch wird empfohlen, sich aufgrund der Mutationsrate, der Vielzahl an unterschiedlichen zirkulierenden Influenzaviren und der verringerten Immunität mit der Zeit, jährlich impfen zu lassen (WHO, abgerufen am 08.10.2021).

Der Einfluss vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort nach einer Influenza-Impfung wird kontrovers diskutiert (van den Berg et al., 2019b). In unserer Studie sollte zusätzlich zum CMV-Serostatus überprüft werden, ob CMV-assoziierte NKG2C⁺ NK-Zellen einen Einfluss auf die humorale Immunantwort nach einer Influenza-Impfung haben. Grund dafür ist die hohe Oberflächenexpression vom NKG2C-Liganden HLA-E auf B-Zellen, die nach HLA-E Hochregulation während der Aktivierungsphase Zielzellen von NKG2C⁺ NK-Zellen sein könnten (Abbildung 3.11B). Eine immunregulatorische Funktion von NKG2C⁺ NK-Zellen gegenüber aktivierten B-Zellen hätte wahrscheinlich eine schwächere Antikörperproduktion zur Folge. Es konnte jedoch kein Einfluss von der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die Antikörpertiter nach Impfung gefunden werden (Abbildung 3.16B). Statistisch signifikante Unterschiede im Antikörpertiter konnten zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Probanden ebenfalls zu keinem Zeitpunkt vor bzw. nach der Impfung gemessen werden. Der Antikörpertiter nach der Impfung war, wie bereits in der Literatur beschrieben, stark abhängig vom Antikörpertiter

vor der Impfung (Olafsdottir et al., 2017). In einer Studie aus dem Jahr 2016 wird als möglicher Grund dafür genannt, dass bereits vorhandene Antikörper einen Komplex mit dem Impfstoff-Antigen bilden könnten und somit die Immunantwort limitiert wird (Strindhall et al., 2016).

Daher wird für die Untersuchung des Einflusses von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die humorale Antwort nach Impfungen eine größere Kohorte mit Probanden benötigt, die vor der Impfung keine Seroprotektion gegen die Influenzastämme haben. Zusätzlich könnte die *in vitro* Expansion von B-Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit von NKG2C⁺ NK-Zellen beobachtet werden, ähnlich, wie es schon für CMV-spezifische CD8 T-Zellen untersucht wurde (Grutza et al., 2020).

4.6 Humorale Immunantworten in CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen nach einer SARS-CoV-2-Impfung

Bei der SARS-CoV-2 Kohorte wurde aufgrund der geringen abgenommenen Blutmengen nur das Serum und keine PBMCs aufgereinigt. Daher konnte in dieser Studie nicht der Zusammenhang zwischen der Frequenz von NKG2C⁺ NK-Zellen und der humoralen Immunantwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung untersucht werden. Dennoch war die Analyse des Einflusses vom CMV-Serostatus auf die humorale Antwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung mit dieser Kohorte interessant, da es bisher keine CMV-bezogenen Auswertungen von Antikörpertitern nach einer Immunisierung mit dem *Biontech/Pfizer BNT162b2* Impfstoff gibt. Aufgrund der steigenden CMV-Seroprävalenz mit dem Alter musste die Auswertung der Antikörpertiter in Altersgruppen stattfinden, da ansonsten altersbedingte Einflüsse auf die humorale Antwort mit in die Auswertung einfließen würden (Abbildung 3.17A+B). Dazu ist bereits bekannt, dass die humorale Immunantwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung im Alter schwächer wird (Müller et al., 2021).

Die Analysen der humoralen Immunantwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede im Antikörpertiter 17 - 19 Tage nach einer bzw. beiden Impfdosen zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen (Abbildung 3.17C+D). Dennoch konnte in CMV_{pos} Probanden mit einem Alter von über 40 Jahren eine Tendenz zu niedrigeren Antikörpertitern 17 Tage nach der zweiten Impfung gemessen werden, auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant ist. Studien, die schwächere humorale Immunantworten von älteren CMV_{pos} Personen zeigen, argumentieren, dass eine beschleunigte Alterung des Immunsystems und die darausfolgende Immunseneszenz durch CMV verantwortlich für die schwächere Immunantwort ist (Frasca et al., 2015; Trzonkowski et al., 2003; van den Berg et al., 2019b). Neben humoralen Immunantworten sollten in Zukunft

auch T-Zellantworten in CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen untersucht werden, da mRNA-basierte Impfstoffe wie der *Biontech/Pfizer BNT162b2* Impfstoff nachweislich auch gute T-Zellantworten hervorrufen (Sahin et al., 2021). Ein Fokus auf die immunregulatorische Funktion von NKG2C⁺ NK-Zellen auf die Expansion von SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen *in vivo* wäre in diesem Rahmen besonders interessant.

4.7 Fazit

Aufgrund der ausgeprägten Änderungen des humanen Immunsystems nach einer primären CMV-Infektion und einer geschätzten weltweiten CMV-Seroprävalenz von 83%, ist die Analyse des Einflusses von CMV-assoziierten Änderungen im humanen Immunsystem auf immunologische Prozesse in Bezug auf andere Infektionskrankheiten von großer Bedeutung (Zuhair et al., 2019)

Neben der verstärkten Zytotoxizität von NKG2C⁺ NK-Zellen gegen HLA-E^{high} exprimierende T-Zellen konnten bereits bekannte phänotypische Merkmale von NKG2C⁺ NK-Zellen bestätigt und neue phänotypische Merkmale gefunden werden. Diese Ergebnisse bilden eine Grundlage für weitere Experimente zur funktionellen Charakterisierung von NKG2C⁺ NK-Zellen. Trotz fehlender statistisch signifikanter Unterschiede in der humoralen Immunantwort zwischen CMV_{pos} und CMV_{neg} Personen nach einer Influenza- und SARS-CoV-2-Impfung gibt es Anzeichen für eine schwächere humorale Immunantwort in CMV_{pos} Personen mit einem Alter von über 40 Jahren. Der Einfluss von CMV-assoziierten NKG2C⁺ NK-Zellen auf die Expansion von B- und Plasmazellen aufgrund der NKG2C/HLA-E Interaktion sollte dazu zukünftig untersucht werden. Die CMV-charakteristischen Veränderungen des Immunsystems sollten in Bezug auf die Immunantwort gegen andere Infektionen weiter analysiert werden, um den Einfluss vom CMV-Serostatus auf andere Krankheiten besser verstehen zu können.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
bspw.	beispielsweise
BV	Brilliant Violet™
CD	Cluster of Differentiation
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
ca.	<i>circa</i>
Cy7	Cyanin 7
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure; DNS)
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	<i>hour</i> (Stunden)
HLA-A	HLA-Klasse-I-Histokompatibilitätsantigen, Alpha-Kette A
HLA-E	HLA-Klasse-I-Histokompatibilitätsantigen, Alpha-Kette E
HLA-E ^{high}	Zellen mit einer hohen HLA-E Oberflächenexpression
HLA-E ^{low}	Zellen mit einer niedrigen HLA-E Oberflächenexpression
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IFN γ	Interferon- <i>gamma</i>
IFN γ R1	Interferon- <i>gamma</i> Rezeptor 1
IL	Interleukin
IU/mL	Internationale <i>Units</i> /mL
kbp	Kilobasenpaare
min	Minuten
Mio.	Millionen
mL	Milliliter
ng	Nanogramm
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-protein
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
TNF α	Tumornekrosefaktor- <i>alpha</i>
ÜN	über Nacht
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 – Replikationszyklus des Influenza A Virus.	- 13 -
Abbildung 1.2 - Peptidpräsentation über MHC-I-Moleküle.	- 16 -
Abbildung 1.3 - NK-Zellaktivierung.	- 19 -
Abbildung 2.1 - Plattenlayout des TCID ₅₀ -Tests.....	- 37 -
Abbildung 2.2 – Identifikation von NK-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	- 41 -
Abbildung 2.3 – Identifikation von T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.	- 42 -
Abbildung 3.1 – Analyse der Frequenzen von NKG2A/C NK-Zellpopulationen in CMV _{pos} und CMV _{neg} Personen.	- 45 -
Abbildung 3.2 – Frequenzen von T-Zellpopulationen und die HLA-E Expression in Abhängigkeit der T-Zell-Maturation.	- 46 -
Abbildung 3.3 – Analyse der Zytotoxizität von NK-Zellen gegen HLA-E ^{high} exprimierende Jurkat-Zellen.	- 48 -
Abbildung 3.4 – Analyse der Caspase 3/7-Aktivität in Jurkat-Zellen in Abhängigkeit ihrer HLA-E Expression nach Kultur mit PBMCs mit einer hohen Frequenz von NKG2C ⁺ NK-Zellen.....	- 50 -
Abbildung 3.5 - Expressionsanalysen von 361 Oberflächenmolekülen auf NK-Zellpopulationen.....	- 53 -
Abbildung 3.6 – Analyse der Expressionsunterschiede von Oberflächenmolekülen aus dem LEGENDscreen-Experiment.....	- 57 -
Abbildung 3.7 - t-SNE Analysen mit CD56 ^{dim} NK-Zellen.	- 61 -
Abbildung 3.8 - t-SNE Analysen mit NKG2C ⁺ NK-Zellen.	- 63 -
Abbildung 3.9 - Zeitpunkte der Blutentnahmen bei den Influenzakoorten 2019/20 und 2020/21.....	- 65 -
Abbildung 3.10 - Mittlere Frequenzen der Lymphozytenpopulationen nach einer Influenza-Impfung.	- 67 -
Abbildung 3.11 - Analyse von Aktivierungsmarkern auf Lymphozyten nach einer Influenza-Impfung.	- 68 -

Abbildung 3.12 - Degranulation von NKG2A/C NK-Zellen nach Inkubation mit Influenza-infizierten MRC-5-Zellen.	- 70 -
Abbildung 3.13 – Analyse der Frequenzen von Influenza-spezifischen CD8 T-Zellen und NKG2C ⁺ NK-Zellen.	- 71 -
Abbildung 3.14 - Frequenzen von Matrixprotein-spezifischen CD8 T-Zellen nach einer Influenza-Impfung.	- 72 -
Abbildung 3.15 - <i>In vitro</i> Screening von CD8 T-Zellepitopen im Hämagglutinin des Influenza A Virus.	- 75 -
Abbildung 3.16 - Humorale Immunantwort nach einer Influenza-Impfung.	- 78 -
Abbildung 3.17 - Alters- und CMV-Serostatus-abhängige Analyse der humoralen Immunantwort nach einer SARS-CoV-2-Impfung.	- 80 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 - Einteilung der Oberflächenmoleküle aus Abbildung 3.6 in ihre Funktion und Interaktionspartner.	- 58 -
Tabelle 3.2 - Charakterisierung der Influenzakoorten 2019/20 und 2020/21.	- 66 -
Tabelle 3.3 – Ergebnisse des <i>in silico</i> Epitopscreenings im Hämagglutinin.	- 73 -

Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T., & Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol*, 4(4), 301-308. DOI:10.1038/nri1330
- Afonina, I. S., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2010). Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev*, 235(1), 105-116. DOI:10.1111/j.0105-2896.2010.00908.x
- Aicheler, R. J., Wang, E. C. Y., Tomasec, P., Wilkinson, G. W. G., & Stanton, R. J. (2013). Potential for Natural Killer Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity for Control of Human Cytomegalovirus. *Antibodies*, 2(4), 617-635.
- Akkaya, M., Kwak, K., & Pierce, S. K. (2020). B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol*, 20(4), 229-238. DOI:10.1038/s41577-019-0244-2
- Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M. J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., & Braud, V. M. (2005). Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol*, 175(12), 7791-7795. DOI:10.4049/jimmunol.175.12.7791
- Arnaout, M. A. (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 75(5), 1037-1050.
- Arnon, T. I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D. 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
- Badovinac, V. P., Porter, B. B., & Harty, J. T. (2002). Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol*, 3(7), 619-626. DOI:10.1038/ni804
- Barnes, S., Schilizzi, O., Audsley, K. M., Newnes, H. V., & Foley, B. (2020). Deciphering the Immunological Phenomenon of Adaptive Natural Killer (NK) Cells and Cytomegalovirus (CMV). *Int J Mol Sci*, 21(22). DOI:10.3390/ijms21228864
- Barrow, A. D., Martin, C. J., & Colonna, M. (2019). The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol*, 10, 909. DOI:10.3389/fimmu.2019.00909
- Benz, C., Reusch, U., Muranyi, W., Brune, W., Atalay, R., & Hengel, H. (2001). Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 82, 2061-2070. DOI:10.1099/0022-1317-82-9-2061
- Besold, K., Wills, M., & Plachter, B. (2009). Immune evasion proteins gpUS2 and gpUS11 of human cytomegalovirus incompletely protect infected cells from CD8 T cell recognition. *Virology*, 391(1), 5-19. DOI:10.1016/j.virol.2009.06.004
- Beziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debre, P., Bjorkstrom, N. K., Malmberg, K. J., Marcellin, P., & 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
- Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C., & Moretta, A. (2001). Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev*, 181, 203-214. DOI:10.1034/j.1600-065x.2001.1810117.x
- Binder, C., Cvetkovski, F., Sellberg, F., Berg, S., Paternina Visbal, H., Sachs, D. H., Berglund, E., & Berglund, D. (2020). CD2 Immunobiology. *Front Immunol*, 11, 1090. DOI:10.3389/fimmu.2020.01090

Biorender, abgerufen am 15.11.2021. <https://www.biorender.com>

- Biron, C. A. (2016). Chapter 4 - Innate Immunity: Recognizing and Responding to Foreign Invaders—No Training Needed. In M. G. Katze, M. J. Korth, G. L. Law, & N. Nathanson (Eds.), *Viral Pathogenesis (Third Edition)* (pp. 41-55). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800964-2.00004-5>:
- Blouin, C. M., & Lamaze, C. (2013). Interferon gamma receptor: the beginning of the journey. *Front Immunol*, 4, 267. DOI:10.3389/fimmu.2013.00267
- Blunt, M. D., & Khakoo, S. I. (2020). Activating killer cell immunoglobulin-like receptors: Detection, function and therapeutic use. *Int J Immunogenet*, 47(1), 1-12. DOI:10.1111/iji.12461
- Boeckh, M., Leisenring, W., Riddell, S. R., Bowden, R. A., Huang, M. L., Myerson, D., Stevens-Ayers, T., Flowers, M. E., Cunningham, T., & Corey, L. (2003). Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood*, 101(2), 407-414. DOI:10.1182/blood-2002-03-0993
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & McMichael, A. J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 391(6669), 795-799. DOI:10.1038/35869
- Broadley, I., Pera, A., Morrow, G., Davies, K. A., & Kern, F. (2017). Expansions of Cytotoxic CD4(+)CD28(-) T Cells Drive Excess Cardiovascular Mortality in Rheumatoid Arthritis and Other Chronic Inflammatory Conditions and Are Triggered by CMV Infection. *Front Immunol*, 8, 195. DOI:10.3389/fimmu.2017.00195
- Bundesärztekammer,
abgerufen am 27.03.2021 <https://www.bundesaerztekammer.de/aerzte/versorgung/notfallmedizin/influenza-pandemie/>
- Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, abgerufen am 19.04.2021.
https://www.impfen-info.de/impfempfehlungen/fuer-kinder-0-12-jahre/grippe-influenza/#/jfmulticontent_c33118-3
- Campbell, K. S., & Purdy, A. K. (2011). Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*, 132(3), 315-325. DOI:10.1111/j.1365-2567.2010.03398.x
- Cannon, M. J., Hyde, T. B., & Schmid, D. S. (2011). Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol*, 21(4), 240-255. DOI:10.1002/rmv.695
- Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*, 20(4), 202-213. DOI:10.1002/rmv.655
- Carbone, J. (2016). The Immunology of Posttransplant CMV Infection: Potential Effect of CMV Immunoglobulins on Distinct Components of the Immune Response to CMV. *Transplantation*, 100 Suppl 3, S11-18. DOI:10.1097/TP.0000000000001095
- CDC, abgerufen am 07.10.2021. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/keyfacts.htm>; Key Facts About Seasonal Flu Vaccine
- CDC, abgerufen am 19.04.2021a. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-selection.htm>
- CDC, abgerufen am 19.04.2021b. [https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/vaccineeffect.htm#:~:text=While%20vaccine%20effectiveness%20\(VE\)%20can,matched%20to%20the%20flu%20vaccine](https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/vaccineeffect.htm#:~:text=While%20vaccine%20effectiveness%20(VE)%20can,matched%20to%20the%20flu%20vaccine)
- CDC, abgerufen am 25.08.2021. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/keyfacts.htm>; Key Facts About Seasonal Flu Vaccine

- CDC, abgerufen am 27.03.2021. <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1918-pandemic-h1n1.html#:~:text=It%20is%20estimated%20that%20about,occurring%20in%20the%20United%20States.>
- CDC, abgerufen am 28.06.2021. <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
- Chan, A., Hong, D. L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A. D., Buckley, C. D., McMichael, A., Enver, T., & Bowness, P. (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*, 179(1), 89-94. DOI:10.4049/jimmunol.179.1.89
- 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
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S3-23. DOI:10.1016/j.jaci.2009.12.980
- Chapman, T. L., Heikeman, 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. DOI:10.1016/s1074-7613(00)80135-1
- Chaudhari, K., Rizvi, S., & Syed, B. A. (2019). Non-Hodgkin lymphoma therapy landscape. *Nat Rev Drug Discov*, 18(9), 663-664. DOI:10.1038/d41573-019-00051-6
- Cook, C. H., & Trgovcich, J. (2011). Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent hosts: a decade of progress and remaining challenges. *Antiviral Res*, 90(3), 151-159. DOI:10.1016/j.antiviral.2011.03.179
- Costa-Garcia, M., Ataya, M., Moraru, M., Vilches, C., Lopez-Botet, M., & Muntasell, A. (2019). Human Cytomegalovirus Antigen Presentation by HLA-DR+ NKG2C+ Adaptive NK Cells Specifically Activates Polyfunctional Effector Memory CD4+ T Lymphocytes. *Front Immunol*, 10, 687. DOI:10.3389/fimmu.2019.00687
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*, 29, 621-663. DOI:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, 41(4), 529-542. DOI:10.1016/j.immuni.2014.10.004
- Crough, T., & Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 76-98, Table of Contents. DOI:10.1128/CMR.00034-08
- Cruz-Tapias, P., Castiblanco, J., & Anaya, J. (2013). Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. El Rosario University Press.
- Cyster, J. G., & Allen, C. D. C. (2019). B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*, 177(3), 524-540. DOI:10.1016/j.cell.2019.03.016
- Das, M., Zhu, C., & Kuchroo, V. K. (2017). Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev*, 276(1), 97-111. DOI:10.1111/imr.12520
- de Ona, M., Melon, S., de la Iglesia, P., Hidalgo, F., & Verdugo, A. F. (1995). Isolation of influenza virus in human lung embryonated fibroblast cells (MRC-5) from clinical samples. *J Clin Microbiol*, 33(7), 1948-1949. DOI:10.1128/jcm.33.7.1948-1949.1995
- de Vries, E., Tscherne, D. M., Wienholts, M. J., Cobos-Jimenez, V., Scholte, F., Garcia-Sastre, A., Rottier, P. J., & de Haan, C. A. (2011). Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog*, 7(3), e1001329. DOI:10.1371/journal.ppat.1001329
- Doroshenko, A., & Halperin, S. A. (2009). Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines). *Expert Rev Vaccines*, 8(6), 679-688. DOI:10.1586/erv.09.31

Dou, D., Revol, R., Ostbye, H., Wang, H., & Daniels, R. (2018). Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol*, 9, 1581. DOI:10.3389/fimmu.2018.01581

EMA, abgerufen am 25.08.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/lemtrada>

EMA, abgerufen am 27.10.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-harmonisation-requirements-influenza-vaccines_en.pdf

Ewer, K. J., Barrett, J. R., Belij-Rammerstorfer, S., Sharpe, H., Makinson, R., Morter, R., Flaxman, A., Wright, D., Bellamy, D., Bittaye, M., Dold, C., Provine, N. M., Aboagye, J., Fowler, J., Silk, S. E., Alderson, J., Aley, P. K., Angus, B., Berrie, E., Bibi, S., Cicconi, P., Clutterbuck, E. A., Chelysheva, I., Folegatti, P. M., Fuskova, M., Green, C. M., Jenkin, D., Kerridge, S., Lawrie, A., Minassian, A. M., Moore, M., Mujadidi, Y., Plested, E., Poulton, I., Ramasamy, M. N., Robinson, H., Song, R., Snape, M. D., Tarrant, R., Voysey, M., Watson, M. E. E., Douglas, A. D., Hill, A. V. S., Gilbert, S. C., Pollard, A. J., Lambe, T., & Oxford, C. V. T. G. (2021). T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nat Med*, 27(2), 270-278. DOI:10.1038/s41591-020-01194-5

Florez-Alvarez, L., Blanquiceth, Y., Ramirez, K., Ossa-Giraldo, A. C., Velilla, P. A., Hernandez, J. C., & Zapata, W. (2020). NK Cell Activity and CD57(+)/NKG2C(high) Phenotype Are Increased in Men Who Have Sex With Men at High Risk for HIV. *Front Immunol*, 11, 537044. DOI:10.3389/fimmu.2020.537044

Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E. K., Anasetti, C., Weisdorf, D., & Miller, J. S. (2012). 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

Forte, E., Zhang, Z., Thorp, E. B., & Hummel, M. (2020). Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 130. DOI:10.3389/fcimb.2020.00130

Frasca, D., Diaz, A., Romero, M., Landin, A. M., & Blomberg, B. B. (2015). Cytomegalovirus (CMV) seropositivity decreases B cell responses to the influenza vaccine. *Vaccine*, 33(12), 1433-1439. DOI:10.1016/j.vaccine.2015.01.071

Freud, A. G., Mundy-Bosse, B. L., Yu, J., & Caligiuri, M. A. (2017). The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*, 47(5), 820-833. DOI:10.1016/j.immuni.2017.10.008

Fulop, T., Larbi, A., & Pawelec, G. (2013). Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front Immunol*, 4, 271. DOI:10.3389/fimmu.2013.00271

Furman, D., Jovic, V., Sharma, S., Shen-Orr, S. S., Angel, C. J., Onengut-Gumuscu, S., Kidd, B. A., Maecker, H. T., Concannon, P., Dekker, C. L., Thomas, P. G., & Davis, M. M. (2015). Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Sci Transl Med*, 7(281), 281ra243. DOI:10.1126/scitranslmed.aaa2293

GISAID, abgerufen am 25.10.2021. <https://www.gisaid.org/>

Glasner, A., Ghadially, H., Gur, C., Stanietsky, N., Tsukerman, P., Enk, J., & Mandelboim, O. (2012). Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *J Immunol*, 188(6), 2509-2515. DOI:10.4049/jimmunol.1102461

Glasner, A., Isaacson, B., Viukov, S., Neuman, T., Friedman, N., Mandelboim, M., Sexl, V., Hanna, J. H., & Mandelboim, O. (2017). Increased NK cell immunity in a transgenic mouse model of NKp46 overexpression. *Sci Rep*, 7(1), 13090. DOI:10.1038/s41598-017-12998-w

Gondois-Rey, F., Cheret, A., Granjeaud, S., Mallet, F., Bidaut, G., Lecuroux, C., Ploquin, M., Muller-Trutwin, M., Rouzioux, C., Avettand-Fenoel, V., Moretta, A., Pialoux, G., Goujard, C., Meyer, L., & Olive, D. (2017). NKG2C(+) memory-like NK cells contribute to the control of HIV

- viremia during primary infection: Optiprim-ANRS 147. *Clin Transl Immunology*, 6(7), e150. DOI:10.1038/cti.2017.22
- Gourley, T. S., Wherry, E. J., Masopust, D., & Ahmed, R. (2004). Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol*, 16(5), 323-333. DOI:10.1016/j.smim.2004.08.013
- Gregersen, J. P., Schmitt, H. J., Trusheim, H., & Broker, M. (2011). Safety of MDCK cell culture-based influenza vaccines. *Future Microbiol*, 6(2), 143-152. DOI:10.2217/fmb.10.161
- Grutza, R., Moskorz, W., Senff, T., Backer, E., Lindemann, M., Zimmermann, A., Uhrberg, M., Lang, P. A., Timm, J., & Cosmovici, C. (2020). NKG2C(pos) NK Cells Regulate the Expansion of Cytomegalovirus-Specific CD8 T Cells. *J Immunol*, 204(11), 2910-2917. DOI:10.4049/jimmunol.1901281
- 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
- Hadrup, S. R., Strindhall, J., Kollgaard, T., Seremet, T., Johansson, B., Pawelec, G., Thor Straten, P., & 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. DOI:10.4049/jimmunol.176.4.2645
- 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
- Halwachs-Baumann, G., Genser, B., Pailer, S., Engele, H., Rosegger, H., Schalk, A., Kessler, H. H., & Truschnig-Wilders, M. (2002). Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *J Clin Virol*, 25 Suppl 3, S81-87. DOI:10.1016/s1386-6532(02)00188-9
- Hammer, Q., & Romagnani, C. (2017). OMIP-039: Detection and analysis of human adaptive NKG2C(+) natural killer cells. *Cytometry A*, 91(10), 997-1000. DOI:10.1002/cyto.a.23168
- Hammer, Q., Rückert, T., Borst, E. M., Dunst, J., Haubner, A., Durek, P., Heinrich, F., Gasparoni, G., Babic, M., Tomic, A., Pietra, G., Nienen, M., Blau, I. W., Hofmann, J., Na, I. K., Prinz, I., Koenecke, C., Hemmati, P., Babel, N., Arnold, R., Walter, J., Thurley, K., Mashreghi, M. F., Messerle, M., & Romagnani, C. (2018). Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nat Immunol*, 19(5), 453-463. DOI:10.1038/s41590-018-0082-6
- Hampe, C. S. (2012). B Cell in Autoimmune Diseases. *Scientifica (Cairo)*, 2012. DOI:10.6064/2012/215308
- Herrero-Urbe, L., Mann, G. F., Zuckerman, A. J., Hockley, D., & Oxford, J. S. (1983). Replication of influenza A and B viruses in human diploid cells. *J Gen Virol*, 64 (Pt 2), 471-475. DOI:10.1099/0022-1317-64-2-471
- Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A., & Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res*, 17(9), 2619-2627. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-1114
- Horowitz, A., Strauss-Albee, D. M., Leipold, M., Kubo, J., Nemat-Gorgani, N., Dogan, O. C., Dekker, C. L., Mackey, S., Maecker, H., Swan, G. E., Davis, M. M., Norman, P. J., Guethlein, L. A., Desai, M., Parham, P., & Blish, C. A. (2013). Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med*, 5(208), 208ra145. DOI:10.1126/scitranslmed.3006702
- Hummel, M., & Abecassis, M. M. (2002). A model for reactivation of CMV from latency. *J Clin Virol*, 25 Suppl 2, S123-136. DOI:10.1016/s1386-6532(02)00088-4

- Hwang, I., Zhang, T., Scott, J. M., Kim, A. R., Lee, T., Kakarla, T., Kim, A., Sunwoo, J. B., & Kim, S. (2012). Identification of human NK cells that are deficient for signaling adaptor FcRgamma and specialized for antibody-dependent immune functions. *Int Immunol*, 24(12), 793-802. DOI:10.1093/intimm/dxs080
- IEDB, abgerufen am 25.06.2021. <http://tools.iedb.org/main/tcell/>
- Immunaware, abgerufen am 02.08.2021. <https://immunaware.com/wp-content/uploads/2020/06/Assesment-of-HLA-complex-folding-FACS-assay.pdf>
- Jackson, S. E., Redeker, A., Arens, R., van Baarle, D., van den Berg, S. P. H., Benedict, C. A., Cicin-Sain, L., Hill, A. B., & Wills, M. R. (2017). CMV immune evasion and manipulation of the immune system with aging. *Geroscience*, 39(3), 273-291. DOI:10.1007/s11357-017-9986-6
- Jacobs, J. P. (1976). The status of human diploid cell strain MRC-5 as an approved substrate for the production of viral vaccines. *J Biol Stand*, 4(2), 97-99. DOI:10.1016/0092-1157(76)90018-4
- Jacobs, J. P., Jones, C. M., & Baille, J. P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, 227(5254), 168-170. DOI:10.1038/227168a0
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K. W., & Schmidt, R. E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*, 31(10), 3121-3127. DOI:10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::aid-immu3121>3.0.co;2-4
- Janeway, C. J., Travers, P., & Walport, M. (2001). *The Immune System in Health and Disease; The major histocompatibility complex and its functions* (Vol. 5th edition). Garland Science.
- Janeway, C. J., Travers, P., & Walport, M. (2012). *The Immune System in Health and Disease; Chapter 7: Signaling Through Immune-System Receptors* (Vol. 8th edition). Garland Science.
- Johnson, N. P., & Müller, J. (2002). Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918-1920 "Spanish" Influenza Pandemic. *Bulletin of the history of medicine*, volumes.
- Jordan, A. R., Racine, R. R., Hennig, M. J., & Lokeshwar, V. B. (2015). The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front Immunol*, 6, 182. DOI:10.3389/fimmu.2015.00182
- Kananen, L., Nevalainen, T., Jylhava, J., Marttila, S., Hervonen, A., Jylha, M., & Hurme, M. (2015). Cytomegalovirus infection accelerates epigenetic aging. *Exp Gerontol*, 72, 227-229. DOI:10.1016/j.exger.2015.10.008
- 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
- Kared, H., Martelli, S., Tan, S. W., Simoni, Y., Chong, M. L., Yap, S. H., Newell, E. W., Pender, S. L. F., Kamarulzaman, A., Rajasuriar, R., & Larbi, A. (2018). Adaptive NKG2C(+)CD57(+) Natural Killer Cell and Tim-3 Expression During Viral Infections. *Front Immunol*, 9, 686. DOI:10.3389/fimmu.2018.00686
- Kasarello, K., & Mirowska-Guzel, D. (2021). Anti-CD52 Therapy for Multiple Sclerosis: An Update in the COVID Era. *Immunotargets Ther*, 10, 237-246. DOI:10.2147/ITT.S240890
- Kaufmann, L., Syedbasha, M., Vogt, D., Hollenstein, Y., Hartmann, J., Linnik, J. E., & Egli, A. (2017). An Optimized Hemagglutination Inhibition (HI) Assay to Quantify Influenza-specific Antibody Titers. *J Vis Exp*(130). DOI:10.3791/55833
- Kim, J., Kim, A. R., & Shin, E. C. (2015). Cytomegalovirus Infection and Memory T Cell Inflation. *Immune Netw*, 15(4), 186-190. DOI:10.4110/in.2015.15.4.186

- Kim, K. H., Yu, H. T., Hwang, I., Park, S., Park, S. H., Kim, S., & Shin, E. C. (2019). Phenotypic and Functional Analysis of Human NK Cell Subpopulations According to the Expression of FcepsilonRIgamma and NKG2C. *Front Immunol*, 10, 2865. DOI:10.3389/fimmu.2019.02865
- Kirchhoff, C. (1996). CD52 is the 'major maturation-associated' sperm membrane antigen. *Mol Hum Reprod*, 2(1), 9-17. DOI:10.1093/molehr/2.1.9
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*, 14(6), 377-391. DOI:10.1038/nri3667
- Kobyzeva, P. A., Streltsova, M. A., Erokhina, S. A., Kanevskiy, L. M., Telford, W. G., Sapozhnikov, A. M., & Kovalenko, E. I. (2020). CD56(dim) CD57(-) NKG2C(+) NK cells retaining proliferative potential are possible precursors of CD57(+) NKG2C(+) memory-like NK cells. *J Leukoc Biol*, 108(4), 1379-1395. DOI:10.1002/JLB.1MA0720-654RR
- Kositanont, U., Assantachai, P., Wasi, C., Puthavathana, P., & Praditsuwan, R. (2012). Kinetics of the antibody response to seasonal influenza vaccination among the elderly. *Viral Immunol*, 25(6), 471-476. DOI:10.1089/vim.2012.0024
- Kosor Krnic, E., Gagro, A., Drazenovic, V., Kuzman, I., Jeren, T., Cecuk-Jelicic, E., Kerhin-Brkljacic, V., Gjenero-Margan, I., Kaic, B., Rakusic, S., Sabioncello, A., Markotic, A., Rabatic, S., Mlinaric-Galinovic, G., & Dekaris, D. (2008). Enumeration of haemagglutinin-specific CD8+ T cells after influenza vaccination using MHC class I peptide tetramers. *Scand J Immunol*, 67(1), 86-94. DOI:10.1111/j.1365-3083.2007.02042.x
- 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. DOI:10.1073/pnas.97.4.1695
- Koup, R. A., & Douek, D. C. (2011). Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a007252. DOI:10.1101/cshperspect.a007252
- Koutsakos, M., McWilliam, H. E. G., Aktepe, T. E., Fritzljar, S., Illing, P. T., Mifsud, N. A., Purcell, A. W., Rockman, S., Reading, P. C., Vivian, J. P., Rossjohn, J., Brooks, A. G., Mackenzie, J. M., Mintern, J. D., Villadangos, J. A., Nguyen, T. H. O., & Kedzierska, K. (2019). Downregulation of MHC Class I Expression by Influenza A and B Viruses. *Front Immunol*, 10, 1158. DOI:10.3389/fimmu.2019.01158
- Krammer, F. (2019). The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat Rev Immunol*, 19(6), 383-397. DOI:10.1038/s41577-019-0143-6
- Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & Garcia-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1), 3. DOI:10.1038/s41572-018-0002-y
- Kunemund, V., Jungalwala, F. B., Fischer, G., Chou, D. K., Keilhauer, G., & Schachner, M. (1988). The L2/HNK-1 carbohydrate of neural cell adhesion molecules is involved in cell interactions. *J Cell Biol*, 106(1), 213-223. DOI:10.1083/jcb.106.1.213
- Kurioka, A., Cosgrove, C., Simoni, Y., van Wilgenburg, B., Geremia, A., Bjorkander, S., Sverremark-Ekstrom, E., Thurnheer, C., Gunthard, H. F., Khanna, N., Swiss, H. I. V. C. S., Oxford, I. B. D. C. I., Walker, L. J., Arancibia-Carcamo, C. V., Newell, E. W., Willberg, C. B., & Klenerman, P. (2018). CD161 Defines a Functionally Distinct Subset of Pro-Inflammatory Natural Killer Cells. *Front Immunol*, 9, 486. DOI:10.3389/fimmu.2018.00486
- Lachmann, R., Loenenbach, A., Waterboer, T., Brenner, N., Pawlita, M., Michel, A., Thamm, M., Poethko-Muller, C., Wichmann, O., & Wiese-Posselt, M. (2018). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS One*, 13(7), e0200267. DOI:10.1371/journal.pone.0200267
- Lang, P. A., Lang, K. S., Xu, H. C., Grusdat, M., Parish, I. A., Recher, M., Elford, A. R., Dhanji, S., Shaabani, N., Tran, C. W., Dissanayake, D., Rahbar, R., Ghazarian, M., Brustle, A., Fine,

- J., Chen, P., Weaver, C. T., Klose, C., Diefenbach, A., Haussinger, D., Carlyle, J. R., Kaech, S. M., Mak, T. W., & Ohashi, P. S. (2012). Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(4), 1210-1215. DOI:10.1073/pnas.1118834109
- 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.
- Lau, B., Poole, E., Krishna, B., Sellart, I., Wills, M. R., Murphy, E., & Sinclair, J. (2016). The Expression of Human Cytomegalovirus MicroRNA MiR-UL148D during Latent Infection in Primary Myeloid Cells Inhibits Activin A-triggered Secretion of IL-6. *Sci Rep*, 6, 31205. DOI:10.1038/srep31205
- Le Bouteiller, P., Barakonyi, A., Giustiniani, J., Lenfant, F., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Hilgert, I., Mami-Chouaib, F., Tabiasco, J., Boumsell, L., & Bensussan, A. (2002). Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(26), 16963-16968. DOI:10.1073/pnas.012681099
- Le Bouteiller, P., Tabiasco, J., Polgar, B., Kozma, N., Giustiniani, J., Siewiera, J., Berrebi, A., Aguerre-Girr, M., Bensussan, A., & Jabrane-Ferrat, N. (2011). CD160: a unique activating NK cell receptor. *Immunol Lett*, 138(2), 93-96. DOI:10.1016/j.imlet.2011.02.003
- Lee, J., Zhang, T., Hwang, I., Kim, A., Nitschke, L., Kim, M., Scott, J. M., Kamimura, Y., Lanier, L. L., & 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.
- Lelic, A., Verschoor, C. P., Ventresca, M., Parsons, R., Eveleigh, C., Bowdish, D., Betts, M. R., Loeb, M. B., & Bramson, J. L. (2012). The polyfunctionality of human memory CD8+ T cells elicited by acute and chronic virus infections is not influenced by age. *PLoS Pathog*, 8(12), e1003076. DOI:10.1371/journal.ppat.1003076
- Liu, L. L., Landskron, J., Ask, E. H., Enqvist, M., Sohlberg, E., Traherne, J. A., Hammer, Q., Goodridge, J. P., Larsson, S., Jayaraman, J., Oei, V. Y. S., Schaffer, M., Tasken, K., Ljunggren, H. G., Romagnani, C., Trowsdale, J., Malmberg, K. J., & 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, W., Scott, J. M., Langguth, E., Chang, H., Park, P. H., & Kim, S. (2020). FcRgamma Gene Editing Reprograms Conventional NK Cells to Display Key Features of Adaptive Human NK Cells. *iScience*, 23(11), 101709. DOI:10.1016/j.isci.2020.101709
- Ljunggren, H. G., & Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11(7), 237-244. DOI:10.1016/0167-5699(90)90097-s
- Long, B. R., Michaelsson, J., Loo, C. P., Ballan, W. M., Vu, B. A., Hecht, F. M., Lanier, L. L., Chapman, J. M., & Nixon, D. F. (2008). Elevated frequency of gamma interferon-producing NK cells in healthy adults vaccinated against influenza virus. *Clin Vaccine Immunol*, 15(1), 120-130. DOI:10.1128/CVI.00357-07
- Lopez-Botet, M., Muntasell, A., & Vilches, C. (2014). The CD94/NKG2C+ NK-cell subset on the edge of innate and adaptive immunity to human cytomegalovirus infection. *Semin Immunol*, 26(2), 145-151. DOI:10.1016/j.smim.2014.03.002
- Lopez-Verges, S., Milush, J. M., Pandey, S., York, V. A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P. J., Nixon, D. F., & Lanier, L. L. (2010). CD57 defines a functionally distinct population of

- mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*, 116(19), 3865-3874. DOI:10.1182/blood-2010-04-282301
- Lopez-Verges, S., Milush, J. M., Schwartz, B. S., Pando, M. J., Jarjoura, J., York, V. A., Houchins, J. P., Miller, S., Kang, S. M., Norris, P. J., Nixon, D. F., & 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
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012, 925135. DOI:10.1155/2012/925135
- Lugovtsev, V. Y., Melnyk, D., & Weir, J. P. (2013). Heterogeneity of the MDCK cell line and its applicability for influenza virus research. *PLoS One*, 8(9), e75014. DOI:10.1371/journal.pone.0075014
- Ma, M., Wang, Z., Chen, X., Tao, A., He, L., Fu, S., Zhang, Z., Fu, Y., Guo, C., Liu, J., Han, X., Xu, J., Chu, Z., Ding, H., Shang, H., & Jiang, Y. (2017). NKG2C(+)NKG2A(-) Natural Killer Cells are Associated with a Lower Viral Set Point and may Predict Disease Progression in Individuals with Primary HIV Infection. *Front Immunol*, 8, 1176. DOI:10.3389/fimmu.2017.01176
- Madin, S. H., & Darby, N. B., Jr. (1958). Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 98(3), 574-576. DOI:10.3181/00379727-98-24111
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., & Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, 409(6823), 1055-1060. DOI:10.1038/35059110
- Manser, A. R., Scherenschlich, N., Thons, C., Hengel, H., Timm, J., & Uhrberg, M. (2019). KIR Polymorphism Modulates the Size of the Adaptive NK Cell Pool in Human Cytomegalovirus-Infected Individuals. *J Immunol*, 203(8), 2301-2309. DOI:10.4049/jimmunol.1900423
- Mao, H., Tu, W., Liu, Y., Qin, G., Zheng, J., Chan, P. L., Lam, K. T., Peiris, J. S., & Lau, Y. L. (2010). Inhibition of human natural killer cell activity by influenza virions and hemagglutinin. *J Virol*, 84(9), 4148-4157. DOI:10.1128/JVI.02340-09
- Marhaba, R., & Zoller, M. (2004). CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol*, 35(3), 211-231. DOI:10.1023/b:hijo.0000032354.94213.69
- Martoglio, B., & Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol*, 8(10), 410-415. DOI:10.1016/s0962-8924(98)01360-9
- Maruhashi, T., Sugiura, D., Okazaki, I. M., & Okazaki, T. (2020). LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother Cancer*, 8(2). DOI:10.1136/jitc-2020-001014
- Mattila, J. M., Vuorinen, T., & Heikkinen, T. (2020). Comparative Severity of Influenza A and B Infections in Hospitalized Children. *Pediatr Infect Dis J*, 39(6), 489-493. DOI:10.1097/INF.0000000000002610
- Maucourant, C., Filipovic, I., Ponzetta, A., Aleman, S., Cornillet, M., Hertwig, L., Strunz, B., Lentini, A., Reinius, B., Brownlie, D., Cuapio, A., Ask, E. H., Hull, R. M., Haroun-Izquierdo, A., Schaffer, M., Klingstrom, J., Folkesson, E., Buggert, M., Sandberg, J. K., Eriksson, L. I., Rooyackers, O., Ljunggren, H. G., Malmberg, K. J., Michaelsson, J., Marquardt, N., Hammer, Q., Stralin, K., Bjorkstrom, N. K., & Karolinska, C.-S. G. (2020). Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci Immunol*, 5(50). DOI:10.1126/sciimmunol.abd6832
- McDonald, D. R., & Levy, O. (2019). 3 - Innate Immunity. In R. R. Rich, T. A. Fleisher, W. T. Shearer, H. W. Schroeder, A. J. Frew, & C. M. Weyand (Eds.), *Clinical Immunology (Fifth Edition)* (pp. 39-53.e31). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00003-X>:
- McElhaney, J. E., Garneau, H., Camous, X., Dupuis, G., Pawelec, G., Baehl, S., Tessier, D., Frost, E. H., Frasca, D., Larbi, A., & Fulop, T. (2015). Predictors of the antibody response to

- influenza vaccination in older adults with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 3(1), e000140. DOI:10.1136/bmjdr-2015-000140
- McWilliams, E. M., Mele, J. M., Cheney, C., Timmerman, E. A., Fiazuddin, F., Strattan, E. J., Mo, X., Byrd, J. C., Muthusamy, N., & Awan, F. T. (2016). Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*, 5(10), e1226720. DOI:10.1080/2162402X.2016.1226720
- Merino, A., Zhang, B., Dougherty, P., Luo, X., Wang, J., Blazar, B. R., Miller, J. S., & Cichocki, F. (2019). Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprogramming. *J Clin Invest*, 129(9), 3770-3785. DOI:10.1172/JCI125916
- Merzoug, L. B., Marie, S., Satoh-Takayama, N., Lesjean, S., Albanesi, M., Luche, H., Fehling, H. J., Di Santo, J. P., & Vosshenrich, C. A. (2014). Conditional ablation of NKp46+ cells using a novel Ncr1(greenCre) mouse strain: NK cells are essential for protection against pulmonary B16 metastases. *Eur J Immunol*, 44(11), 3380-3391. DOI:10.1002/eji.201444643
- Miller, D. M., Zhang, Y., Rahill, B. M., Waldman, W. J., & Sedmak, D. D. (1999). Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J Immunol*, 162(10), 6107-6113.
- Modrow, S., Falke, D., & Truyen, U. (2010). *Molekulare Virologie* (S. Spektrum, Ed. Vol. 2. Auflage). Springer Spektrum.
- Moradi, S., Stankovic, S., O'Connor, G. M., Pymm, P., MacLachlan, B. J., Faoro, C., Retiere, C., Sullivan, L. C., Saunders, P. M., Widjaja, J., Cox-Livingstone, S., Rossjohn, J., Brooks, A. G., & Vivian, J. P. (2021). Structural plasticity of KIR2DL2 and KIR2DL3 enables altered docking geometries atop HLA-C. *Nat Commun*, 12(1), 2173. DOI:10.1038/s41467-021-22359-x
- Muccio, L., Falco, M., Bertaina, A., Locatelli, F., Frassoni, F., Sivori, S., Moretta, L., Moretta, A., & Della Chiesa, M. (2018). Late Development of FcepsilonRgamma(neg) Adaptive Natural Killer Cells Upon Human Cytomegalovirus Reactivation in Umbilical Cord Blood Transplantation Recipients. *Front Immunol*, 9, 1050. DOI:10.3389/fimmu.2018.01050
- Muller-Durovic, B., Grahlert, J., Devine, O. P., Akbar, A. N., & Hess, C. (2019). CD56-negative NK cells with impaired effector function expand in CMV and EBV co-infected healthy donors with age. *Aging (Albany NY)*, 11(2), 724-740. DOI:10.18632/aging.101774
- Müller, L., Andrée, M., Moskorz, W., Drexler, I., Walotka, L., Grothmann, R., Ptok, J., Hillebrandt, J., Ritchie, A., Rabl, D., Ostermann, P. N., Robitzsch, R., Hauka, S., Walker, A., Menne, C., Grutza, R., Timm, J., Adams, O., & Schaal, H. (2021). Age-dependent immune response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 COVID-19 vaccination. *Clin Infect Dis*. DOI:10.1093/cid/ciab381
- Muntasell, A., Pupuleku, A., Cisneros, E., Vera, A., Moraru, M., Vilches, C., & Lopez-Botet, M. (2016). Relationship of NKG2C Copy Number with the Distribution of Distinct Cytomegalovirus-Induced Adaptive NK Cell Subsets. *J Immunol*, 196(9), 3818-3827. DOI:10.4049/jimmunol.1502438
- Mylan, abgerufen am 13.09.2021. <https://www.fachinfo.de/pdf/023451>
- Naor, D., Sionov, R. V., & Ish-Shalom, D. (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*, 71, 241-319. DOI:10.1016/s0065-230x(08)60101-3
- Nutt, S. L., & Huntington, N. D. (2019). Cytotoxic T Lymphocytes and Natural Killer Cells. In R. Rich, T. A. Fleisher, W. T. Shearer, H. W. Schroeder, A. J. Frew, & C. M. Weyand (Eds.), *Clinical Immunology (Fifth Edition)* (pp. 247-259.e241). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6896-6.00017-X:

- O'Callaghan, C. A. (2000). Molecular basis of human natural killer cell recognition of HLA-E (human leucocyte antigen-E) and its relevance to clearance of pathogen-infected and tumour cells. *Clin Sci (Lond)*, 99(1), 9-17. DOI:10.1042/cs0990009
- Ogasawara, K., Yoshinaga, S. K., & Lanier, L. L. (2002). Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK cells. *J Immunol*, 169(7), 3676-3685. DOI:10.4049/jimmunol.169.7.3676
- Olafsdottir, T. A., Alexandersson, K. F., Sveinbjornsson, G., Lapini, G., Palladino, L., Montomoli, E., Del Giudice, G., Gudbjartsson, D. F., & Jonsdottir, I. (2017). Age and Influenza-Specific Pre-Vaccination Antibodies Strongly Affect Influenza Vaccine Responses in the Icelandic Population whereas Disease and Medication Have Small Effects. *Front Immunol*, 8, 1872. DOI:10.3389/fimmu.2017.01872
- Parham, P. (2014). *The Immune System (Vol. 4. Auflage)*. Garland Pub.
- Pearson, K. (1901). LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 2(11), 559-572. DOI:10.1080/14786440109462720
- Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*, 89(2), 216-224. DOI:10.1038/icb.2010.78
- Pende, D., Falco, M., Vitale, M., Cantoni, C., Vitale, C., Munari, E., Bertaina, A., Moretta, F., Del Zotto, G., Pietra, G., Mingari, M. C., Locatelli, F., & Moretta, L. (2019). Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol*, 10, 1179. DOI:10.3389/fimmu.2019.01179
- Picarda, G., & Benedict, C. A. (2018). Cytomegalovirus: Shape-Shifting the Immune System. *J Immunol*, 200(12), 3881-3889. DOI:10.4049/jimmunol.1800171
- Pogge von Strandmann, E., Shatnyeva, O., & Hansen, H. P. (2015). NKp30 and its ligands: emerging players in tumor immune evasion from natural killer cells. *Ann Transl Med*, 3(20), 314. DOI:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.08
- Prod'homme, V., Sugrue, D. M., Stanton, R. J., Nomoto, A., Davies, J., Rickards, C. R., Cochrane, D., Moore, M., Wilkinson, G. W. G., & Tomasec, P. (2010). Human cytomegalovirus UL141 promotes efficient downregulation of the natural killer cell activating ligand CD112. *J Gen Virol*, 91(Pt 8), 2034-2039. DOI:10.1099/vir.0.021931-0
- Purcell, A. W., McCluskey, J., & Rossjohn, J. (2007). More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov*, 6(5), 404-414. DOI:10.1038/nrd2224
- Rastogi, S., Gross, P. A., Bonelli, J., Dran, S., Levandowski, R. A., Russo, C., Weksler, M. E., Kaye, D., Levison, M., Abrutyn, E., & et al. (1995). Time to peak serum antibody response to influenza vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2(1), 120-121. DOI:10.1128/cdli.2.1.120-121.1995
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497. DOI:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
- Reeves, M. B., Lehner, P. J., Sissons, J. G. P., & Sinclair, J. H. (2005). An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *J Gen Virol*, 86(Pt 11), 2949-2954. DOI:10.1099/vir.0.81161-0
- Rehm, A., Engelsberg, A., Tortorella, D., Korner, I. J., Lehmann, I., Ploegh, H. L., & Hopken, U. E. (2002). Human cytomegalovirus gene products US2 and US11 differ in their ability to attack major histocompatibility class I heavy chains in dendritic cells. *J Virol*, 76(10), 5043-5050. DOI:10.1128/jvi.76.10.5043-5050.2002
- Reverberi, R. (2008). The statistical analysis of immunohaematological data. *Blood Transfus*, 6(1), 37-45. DOI:10.2450/2008.0001-08

Riese, P., Trittel, S., Pathirana, R. D., Klawonn, F., Cox, R. J., & Guzman, C. A. (2020). Responsiveness to Influenza Vaccination Correlates with NKG2C-Expression on NK Cells. *Vaccines (Basel)*, 8(2). DOI:10.3390/vaccines8020281

RKI, abgerufen am 06.04.2021. https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Pandemieplanung/FAQ_Liste_Pandemieplanung.html

RKI, abgerufen am 07.04.2021. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza_saisonal.html

RKI, abgerufen am 08.03.2021, 08.03.2021. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html

RKI, abgerufen am 15.04.2021. https://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2018/09_2018.html

Robertson, M. J., Caligiuri, M. A., Manley, T. J., Levine, H., & Ritz, J. (1990). Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J Immunol*, 145(10), 3194-3201.

Rodewald, H. R., & Fehling, H. J. (1998). Molecular and cellular events in early thymocyte development. *Adv Immunol*, 69, 1-112. DOI:10.1016/s0065-2776(08)60606-9

Rosendahl Huber, S. K., Luimstra, J. J., van Beek, J., Hoppes, R., Jacobi, R. H., Hendriks, M., Kapteijn, K., Ouwerkerk, C., Rodenko, B., Ovaa, H., & de Jonge, J. (2016). Chemical Modification of Influenza CD8+ T-Cell Epitopes Enhances Their Immunogenicity Regardless of Immunodominance. *PLoS One*, 11(6), e0156462. DOI:10.1371/journal.pone.0156462

Sahin, U., Muik, A., Vogler, I., Derhovanessian, E., Kranz, L. M., Vormehr, M., Quandt, J., Bidmon, N., Ulges, A., Baum, A., Pascal, K. E., Maurus, D., Brachtendorf, S., Lorks, V., Sikorski, J., Koch, P., Hilker, R., Becker, D., Eller, A. K., Grutzner, J., Tonigold, M., Boesler, C., Rosenbaum, C., Heesen, L., Kuhnle, M. C., Poran, A., Dong, J. Z., Luxemburger, U., Kemmer-Bruck, A., Langer, D., Bexon, M., Bolte, S., Palanche, T., Schultz, A., Baumann, S., Mahiny, A. J., Boros, G., Reinholz, J., Szabo, G. T., Kariko, K., Shi, P. Y., Fontes-Garfias, C., Perez, J. L., Cutler, M., Cooper, D., Kyratsous, C. A., Dormitzer, P. R., Jansen, K. U., & Tureci, O. (2021). BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature*, 595(7868), 572-577. DOI:10.1038/s41586-021-03653-6

Saini, R. V., Wilson, C., Finn, M. W., Wang, T., Krensky, A. M., & Clayberger, C. (2011). Granulysin delivered by cytotoxic cells damages endoplasmic reticulum and activates caspase-7 in target cells. *J Immunol*, 186(6), 3497-3504. DOI:10.4049/jimmunol.1003409

Sanchez-Canteli, M., Hermida-Prado, F., Sordo-Bahamonde, C., Montoro-Jimenez, I., Pozo-Agundo, E., Allonca, E., Vallina-Alvarez, A., Alvarez-Marcos, C., Gonzalez, S., Garcia-Pedrero, J. M., & Rodrigo, J. P. (2020). Lectin-Like Transcript 1 (LLT1) Checkpoint: A Novel Independent Prognostic Factor in HPV-Negative Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Biomedicines*, 8(12). DOI:10.3390/biomedicines8120535

Sanofi, abgerufen am 25.08.2021 <https://mein.sanofi.de/produkte/Lemtrada/Downloads?id=d601ce34-d49b-4fee-8054-5cf42323112f>

Schapiro, J. M., Segev, Y., Rannon, L., Alkan, M., & Rager-Zisman, B. (1990). Natural killer (NK) cell response after vaccination of volunteers with killed influenza vaccine. *J Med Virol*, 30(3), 196-200. DOI:10.1002/jmv.1890300310

Schleiss, M. R. (2006). Nonprimate models of congenital cytomegalovirus (CMV) infection: gaining insight into pathogenesis and prevention of disease in newborns. *ILAR J*, 47(1), 65-72. DOI:10.1093/ilar.47.1.65

Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T. D., Han, H., Chiang, S. C., Foley, B., Mattsson, K., Larsson, S., Schaffer, M., Malmberg, K. J., Ljunggren, H. G., Miller, M., & Sallusto, F. (2015). A human natural killer cell subset provides an inhibitory check-

- J. S., & Bryceson, Y. T. (2015). Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*, 42(3), 443-456. DOI:10.1016/j.immuni.2015.02.008
- Schmidt, M. E., & Varga, S. M. (2018). The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections. *Front Immunol*, 9, 678. DOI:10.3389/fimmu.2018.00678
- Schneider, U., Schwenk, H. U., & Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 19(5), 621-626. DOI:10.1002/ijc.2910190505
- Schulz, A. R., Malzer, J. N., Domingo, C., Jurchott, K., Grutzkau, A., Babel, N., Nienen, M., Jelinek, T., Niedrig, M., & Thiel, A. (2015). Low Thymic Activity and Dendritic Cell Numbers Are Associated with the Immune Response to Primary Viral Infection in Elderly Humans. *J Immunol*, 195(10), 4699-4711. DOI:10.4049/jimmunol.1500598
- Sederdahl, B. K., & Williams, J. V. (2020). Epidemiology and Clinical Characteristics of Influenza C Virus. *Viruses*, 12(1). DOI:10.3390/v12010089
- Selvaraj, P., Plunkett, M. L., Dustin, M., Sanders, M. E., Shaw, S., & Springer, T. A. (1987). The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature*, 326(6111), 400-403. DOI:10.1038/326400a0
- Sester, M., Sester, U., Gartner, B., Kubuschok, B., Girndt, M., Meyerhans, A., & Kohler, H. (2002). Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus. *J Virol*, 76(8), 3748-3755. DOI:10.1128/jvi.76.8.3748-3755.2002
- Shresta, S., MacIvor, D. M., Heusel, J. W., Russell, J. H., & Ley, T. J. (1995). Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5679-5683. DOI:10.1073/pnas.92.12.5679
- Sims, S., Willberg, C., & Klenerman, P. (2010). MHC-peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells. *Expert Rev Vaccines*, 9(7), 765-774. DOI:10.1586/erv.10.66
- Skowronski, D. M., Tweed, S. A., & De Serres, G. (2008). Rapid decline of influenza vaccine-induced antibody in the elderly: is it real, or is it relevant? *J Infect Dis*, 197(4), 490-502. DOI:10.1086/524146
- Slobedman, B., & Mocarski, E. S. (1999). Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol*, 73(6), 4806-4812. DOI:10.1128/JVI.73.6.4806-4812.1999
- Smith, C. J., Quinn, M., & Snyder, C. M. (2016). CMV-Specific CD8 T Cell Differentiation and Localization: Implications for Adoptive Therapies. *Front Immunol*, 7, 352. DOI:10.3389/fimmu.2016.00352
- Smith, J. D. (1986). Human cytomegalovirus: demonstration of permissive epithelial cells and nonpermissive fibroblastic cells in a survey of human cell lines. *J Virol*, 60(2), 583-588. DOI:10.1128/JVI.60.2.583-588.1986
- Smith, S. L., Kennedy, P. R., Stacey, K. B., Worboys, J. D., Yarwood, A., Seo, S., Solloa, E. H., Mistretta, B., Chatterjee, S. S., Gunaratne, P., Allette, K., Wang, Y. C., Smith, M. L., Sebra, R., Mace, E. M., Horowitz, A., Thomson, W., Martin, P., Eyre, S., & Davis, D. M. (2020). Diversity of peripheral blood human NK cells identified by single-cell RNA sequencing. *Blood Adv*, 4(7), 1388-1406. DOI:10.1182/bloodadvances.2019000699
- Smith, W., Tomasec, P., Aicheler, R., Loewendorf, A., Nemcovicova, I., Wang, E. C., Stanton, R. J., Macauley, M., Norris, P., Willen, L., Ruckova, E., Nomoto, A., Schneider, P., Hahn, G., Zajonc, D. M., Ware, C. F., Wilkinson, G. W., & Benedict, C. A. (2013). Human cytomegalovirus glycoprotein UL141 targets the TRAIL death receptors to thwart host innate antiviral defenses. *Cell Host Microbe*, 13(3), 324-335. DOI:10.1016/j.chom.2013.02.003

- Soares, A., Govender, L., Hughes, J., Mavakla, W., de Kock, M., Barnard, C., Pienaar, B., Janse van Rensburg, E., Jacobs, G., Khomba, G., Stone, L., Abel, B., Scriba, T. J., & Hanekom, W. A. (2010). Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J Immunol Methods*, 362(1-2), 43-50. DOI:10.1016/j.jim.2010.08.007
- Song, T., Li, L., Su, B., Liu, L., Liu, Y., Yang, X., Zhang, Q., Guo, N., Zhang, T., Sun, G., & Wu, H. (2020). NKG2C+ natural killer cell function improves the control of HBV replication in individuals with acute HIV infection coinfecting with HBV. *Medicine (Baltimore)*, 99(18), e20073. DOI:10.1097/MD.00000000000020073
- Stern-Ginossar, N., & Mandelboim, O. (2010). *Natural Killer Cells*. Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-370454-2.00011-9:
- Stern, L., Withers, B., Avdic, S., Gottlieb, D., Abendroth, A., Blyth, E., & Slobedman, B. (2019). Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Front Microbiol*, 10, 1186. DOI:10.3389/fmicb.2019.01186
- Strindhall, J., Ernerudh, J., Morner, A., Waalen, K., Lofgren, S., Matussek, A., & Bengner, M. (2016). Humoral response to influenza vaccination in relation to pre-vaccination antibody titres, vaccination history, cytomegalovirus serostatus and CD4/CD8 ratio. *Infect Dis (Lond)*, 48(6), 436-442. DOI:10.3109/23744235.2015.1135252
- Strong, R. K., Holmes, M. A., Li, P., Braun, L., Lee, N., & Geraghty, D. E. (2003). HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem*, 278(7), 5082-5090. DOI:10.1074/jbc.M208268200
- Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., & Veit, M. (2017). Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*, 8(8), 1580-1591. DOI:10.1080/21505594.2017.1365216
- Sun, J. C., Beilke, J. N., & Lanier, L. L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*, 457(7229), 557-561. DOI:10.1038/nature07665
- Swain, S. L., McKinstry, K. K., & Strutt, T. M. (2012). Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*, 12(2), 136-148. DOI:10.1038/nri3152
- Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P. R., Grabstein, K. H., Hosken, N. A., Kern, F., Nelson, J. A., & Picker, L. J. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med*, 202(5), 673-685. DOI:10.1084/jem.20050882
- Takatsuki, A. (2002). Golgi-acting drugs: inducers and inhibitors of Golgi dispersal as probes to analyze Golgi membrane dynamics. In I. Endo, T. Kudo, H. Osada, T. Shibata, & I. Yamaguchi (Eds.), *Progress in Biotechnology* (Vol. 22, pp. 35-44). Elsevier. DOI: 10.1016/S0921-0423(02)80041-7:
- Tay, R. E., Richardson, E. K., & Toh, H. C. (2021). Revisiting the role of CD4(+) T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer Gene Ther*, 28(1-2), 5-17. DOI:10.1038/s41417-020-0183-x
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K. A., Purcell, R. H., & Chisari, F. V. (2003). CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*, 77(1), 68-76. DOI:10.1128/jvi.77.1.68-76.2003
- Tomasec, P., Braud, V. M., Rickards, C., Powell, M. B., McSharry, B. P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L. K., McMichael, A. J., & Wilkinson, G. W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*, 287(5455), 1031. DOI:10.1126/science.287.5455.1031
- Trzonkowski, P., Mysliwska, J., Szmit, E., Wieckiewicz, J., Lukaszuk, K., Brydak, L. B., Machala, M., & Mysliwski, A. (2003). Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-

- influenza vaccination--an impact of immunosenescence. *Vaccine*, 21(25-26), 3826-3836. DOI:10.1016/s0264-410x(03)00309-8
- Turner, J. E., Campbell, J. P., Edwards, K. M., Howarth, L. J., Pawelec, G., Aldred, S., Moss, P., Drayson, M. T., Burns, V. E., & Bosch, J. A. (2014). Rudimentary signs of immunosenescence in Cytomegalovirus-seropositive healthy young adults. *Age (Dordr)*, 36(1), 287-297. DOI:10.1007/s11357-013-9557-4
- 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. DOI:10.4049/jimmunol.164.10.5019
- van den Berg, S. P. H., Lanfermeijer, J., Jacobi, R. H. J., Hendriks, M., Vos, M., van Schuijlenburg, R., Nanlohy, N. M., Borghans, J. A. M., van Beek, J., van Baarle, D., & de Wit, J. (2021). Latent CMV Infection Is Associated With Lower Influenza Virus-Specific Memory T-Cell Frequencies, but Not With an Impaired T-Cell Response to Acute Influenza Virus Infection. *Front Immunol*, 12, 663664. DOI:10.3389/fimmu.2021.663664
- van den Berg, S. P. H., Pardieck, I. N., Lanfermeijer, J., Sauce, D., Klenerman, P., van Baarle, D., & Arens, R. (2019a). The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. *Med Microbiol Immunol*, 208(3-4), 365-373. DOI:10.1007/s00430-019-00608-7
- van den Berg, S. P. H., Warmink, K., Borghans, J. A. M., Knol, M. J., & van Baarle, D. (2019b). Effect of latent cytomegalovirus infection on the antibody response to influenza vaccination: a systematic review and meta-analysis. *Med Microbiol Immunol*, 208(3-4), 305-321. DOI:10.1007/s00430-019-00602-z
- van der Maaten, L., & Hinton, G. (2008). Visualizing Data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research*, 9, 2579-2605.
- van Montfoort, N., Borst, L., Korner, M. J., Sluijter, M., Marijt, K. A., Santegoets, S. J., van Ham, V. J., Ehsan, I., Charoentong, P., Andre, P., Wagtmann, N., Welters, M. J. P., Kim, Y. J., Piersma, S. J., van der Burg, S. H., & van Hall, T. (2018). NKG2A Blockade Potentiates CD8 T Cell Immunity Induced by Cancer Vaccines. *Cell*, 175(7), 1744-1755 e1715. DOI:10.1016/j.cell.2018.10.028
- Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med*, 14(8), 351-360. DOI:10.1016/j.molmed.2008.06.002
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmbj, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., & Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 9(12), 1341-1346. DOI:10.1038/ni.1659
- Verhoeckx, K., Cotter, P., Lopez-Exposito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (2015). The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. In. 10.1007/978-3-319-16104-4:
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., & Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*, 12(4), 239-252. DOI:10.1038/nri3174
- 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
- Welsh, R. M., & Waggoner, S. N. (2013). NK cells controlling virus-specific T cells: Rheostats for acute vs. persistent infections. *Virology*, 435(1), 37-45. DOI:10.1016/j.virol.2012.10.005
- Whitmire, J. K., Eam, B., Benning, N., & Whitton, J. L. (2007). Direct interferon-gamma signaling dramatically enhances CD4+ and CD8+ T cell memory. *J Immunol*, 179(2), 1190-1197. DOI:10.4049/jimmunol.179.2.1190

- WHO, abgerufen am 08.10.2021. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/vaccination/influenza-vaccination-frequently-asked-questions>
- WHO, abgerufen am 16.08.2021. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/data-and-statistics/virology-of-human-influenza>
- WHO, abgerufen am 27.03.2021. <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrjoiZTlxMzAwMzYtZW44NC00YTU2LWE3MTU0MTI0OGY1ZjQyMWViliwidCI6ImY2MTBjMGI3LWJkMjQ0NGIzOS04MTBiLTNKYzI4MGFmYjU5MCI6ImMiOj9>
- Wikenheiser, D. J., & Stumhofer, J. S. (2016). ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe? *Front Immunol*, 7, 304. DOI:10.3389/fimmu.2016.00304
- Woodfin, A., Voisin, M. B., & Nourshargh, S. (2007). PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(12), 2514-2523. DOI:10.1161/ATVBAHA.107.151456
- Wu, Z., Sinzger, C., Frascaroli, G., Reichel, J., Bayer, C., Wang, L., Schirmbeck, R., & 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
- Yamada, D., Kadono, T., Masui, Y., Yanaba, K., & Sato, S. (2014). beta7 Integrin controls mast cell recruitment, whereas alphaE integrin modulates the number and function of CD8+ T cells in immune complex-mediated tissue injury. *J Immunol*, 192(9), 4112-4121. DOI:10.4049/jimmunol.1300926
- Yamayoshi, S., & Kawaoka, Y. (2019). Current and future influenza vaccines. *Nat Med*, 25(2), 212-220. DOI:10.1038/s41591-018-0340-z
- Yang, C., Siebert, J. R., Burns, R., Gerbec, Z. J., Bonacci, B., Rymaszewski, A., Rau, M., Riese, M. J., Rao, S., Carlson, K. S., Routes, J. M., Verbsky, J. W., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2019). Heterogeneity of human bone marrow and blood natural killer cells defined by single-cell transcriptome. *Nat Commun*, 10(1), 3931. DOI:10.1038/s41467-019-11947-7
- Yu, K. R., Yang, S. R., Jung, J. W., Kim, H., Ko, K., Han, D. W., Park, S. B., Choi, S. W., Kang, S. K., Scholer, H., & Kang, K. S. (2012). CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. *Stem Cells*, 30(5), 876-887. DOI:10.1002/stem.1052
- Zacour, M., Ward, B. J., Brewer, A., Tang, P., Boivin, G., Li, Y., Warhuus, M., McNeil, S. A., LeBlanc, J. J., Hatchette, T. F., Public Health Agency of, C., & Canadian Institutes of Health Influenza Research, N. (2016). Standardization of Hemagglutination Inhibition Assay for Influenza Serology Allows for High Reproducibility between Laboratories. *Clin Vaccine Immunol*, 23(3), 236-242. DOI:10.1128/CVI.00613-15
- Zhang, K., Na, T., Wang, L., Gao, Q., Yin, W., Wang, J., & Yuan, B. Z. (2014). Human diploid MRC-5 cells exhibit several critical properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Vaccine*, 32(50), 6820-6827. DOI:10.1016/j.vaccine.2014.07.071
- Zhao, Y., Su, H., Shen, X., Du, J., Zhang, X., & Zhao, Y. (2017). The immunological function of CD52 and its targeting in organ transplantation. *Inflamm Res*, 66(7), 571-578. DOI:10.1007/s00011-017-1032-8
- Zheng, Y., Ma, X., Su, D., Zhang, Y., Yu, L., Jiang, F., Zhou, X., Feng, Y., & Ma, F. (2020). The Roles of Siglec7 and Siglec9 on Natural Killer Cells in Virus Infection and Tumour Progression. *J Immunol Res*, 2020, 6243819. DOI:10.1155/2020/6243819
- Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., & Paul, W. E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective

growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*, 16(1), 3-10. DOI:10.1038/sj.cr.7310002

Zucchetto, A., Vaisitti, T., Benedetti, D., Tissino, E., Bertagnolo, V., Rossi, D., Bomben, R., Dal Bo, M., Del Principe, M. I., Gorgone, A., Pozzato, G., Gaidano, G., Del Poeta, G., Malavasi, F., Deaglio, S., & Gattei, V. (2012). The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 26(6), 1301-1312. DOI:10.1038/leu.2011.369

Zuhair, M., Smit, G. S. A., Wallis, G., Jabbar, F., Smith, C., Devleeschauwer, B., & Griffiths, P. (2019). Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*, 29(3), e2034. DOI:10.1002/rmv.2034

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Timm und Dr. Christine Cosmovici bedanken, dass ich die Dissertation unter eurer Betreuung anfertigen durfte. Die letzten drei Jahre haben mir viel Spaß bereitet. Ich durfte sehr viel Neues lernen und konnte mich stets auf euch verlassen.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Philipp Lang für die Übernahme der Zweitbetreuung bedanken. Die jährlichen Supervisor-Meetings haben mir immer wieder neue Ideen und Anregungen gegeben.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Masterstudentin Lena Possenriede. Ich durfte durch dich erste Erfahrungen als Betreuer sammeln. Du hast es mir durch deine Selbstständigkeit und Eigeninitiative wirklich leicht gemacht.

Vielen Dank auch an die Büro-Kolleginnen Ramona Grothmann und Lara Olejnik. Durch die fachlichen und außer-fachlichen Diskussionen über alles Mögliche kam nie Langeweile auf. Die fachlichen Diskussionen haben zusätzlich viele Lösungsansätze hervorgebracht.

Ein Dank geht auch an die LEGENDscreen-Crew um Wiebke Moskorz und Christopher Menne für die tolle Schichtarbeit bei den LEGENDscreen-Experimenten, die vielen fachlichen Diskussionen und unvergesslichen Dance Moves auf jeder Party. Vielen Dank Johannes Ptok, du Zauberer der Bioinformatik.

Danke an Lisa Müller, Dr. Marcel Andrée, Prof. Dr. Ortwin Adams und Prof. Dr. Heiner Schaal für die Bereitstellung der Serumproben und Daten der SARS-CoV-2-Studie. Danke Philipp Ostermann für nichts. Du bringst mich immer zum Lachen. Ich find dich ganz okay.

Ein besonderer Dank geht an die wahren Helden des Labors, Eugen Bäcker, Alexandra Graupner und Anja Voges. Tausende Bestellungen und Wünsche habt ihr bearbeitet. Die Sätze: „Hast du xxx schon bestellt?“ und „Kannst du im System schauen, wann xxx ankommt?“ habt ihr oft genug gehört. Und Eugen, danke für die Planung der vielen Mittagessen. Subway, Döner oder doch lieber Pizza? Sorry für die zusätzlichen Kilos. ;-). Für alle weiteren tollen Mitarbeiter*Innen dieses Instituts: Danke, ich habe mich im Institut immer wohl gefühlt!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ohne eure Hilfe hätte ich es niemals bis hierhin geschafft. Ich bin stolz, dass ich Leute wie euch hinter mir habe, die mich in jeder Situation unterstützen. Ein ganz besonderer Mensch fehlt noch. Isabel Schäfer, ich möchte Dir für den dauerhaften Rückhalt und das Vertrauen ganz besonders danken. Seit der Bachelorarbeit stehst du mir Tag für Tag zur Seite. Danke!

Curriculum Vitae

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aufgrund
des Datenschutzes nicht enthalten.**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aufgrund
des Datenschutzes nicht enthalten.**

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den _____

Ralf Grutza