KIR3DL1-vermittelte Modulation der NK-Zell-Funktion in chronischen Virusinfektionen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Ramona Grothmann aus Ratingen

Düsseldorf, April 2024

aus dem Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Jörg Timm

2. Prof. Dr. Philipp Lang

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Januar 2025

Inhaltsverzeichnis

naltsverzeichnis	I				
sammenfassung	1				
mmary	4				
Einleitung	7				
1.1 Das Humane Immunsystem	7				
1.1.1 Das Humane Leukozytenantigen-System (HLA-System)	7				
1.1.1.1 Die Peptid-Präsentation über MHC Klasse I Moleküle	9				
1.1.1.2 Immundominante Epitope	11				
1.1.2 Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)	13				
1.1.2.1 Die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen und ihre Effektorfunktion	14				
1.1.2.2 Das Rezeptor-Repertoire von Natürlichen Killerzellen	16				
1.1.2.3 "NK cell education"	20				
1.1.3 T-Zellen	21				
1.2 Ziel der Arbeit	22				
Ergebnisse	24				
2.1 Sequenzvariabilität von HCV GT1 NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉ und deren adaptive Immunantwo	ort25				
2.2 Identifizierung des immundominanten HLA-B*27:05-restringierten HBV GTD Po	I ₁₁₄₋₁₂₂ 32				
2.3 Funktionaler Assay zur Untersuchung der KIR3DL1-vermittelten NK-Zell-Modula	ition39				
2.3.1 Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die HCV GT1 NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉ und HBV G Peptidvarianten	TD Pol ₁₁₄₋₁₂₂				
2.3.2 Funktionaler Assay mit HCV GT1 NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉ und HBV GTD Pol ₁₁₄₋₁₂₂ Peptic	lvarianten47				
2.3.3 NK-Zell-Lizensierung	58				
2.4 NK-Zell-Klone	67				
2.5 NK-Zell-Assay mit endogen Peptid-beladenen T2-HLA-B*27:05 Zellen	73				
Diskussion	80				
3.1 Sequenzanalyse zum HCV GT1 NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop ARMILMTHF	80				
3.2 Sequenzanalyse zum HBV GTD Pol ₁₁₄₋₁₂₂ Epitop ARFYPNVTK					
3.3 Beeinflussbarkeit von KIR3DL1 ⁺ -NK-Zellen durch HLA-B*27:05-gebundene HCV- und HBV-					
Peptide	83				
3.4 Diversität der Aminosäuren an den Positionen 4 bis 9 der HLA-B*27:05-restringierten Peptide					
3.5 Beeinflussbarkeit von NK-Zellen aufgrund ihrer KIR3DL1-Allel-Diversität und des Liganden-					
Dimorphismus HLA-Bw4 80(I) und HLA-Bw4 80(T)	90				
3.6 Zukünftige weiterführende Analysen	96				
Material & Methoden	99				

4.1 Mat	erial	99		
4.1.1	Geräte	99		
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	99		
4.1.3	Antibiotika, Chemikalien & Enzyme			
4.1.4	Puffer, Reagenzien und Lösungen			
4.1.5	Nährmedien & Zusätze			
4.1.6	4.1.6 Gebrauchsfertige Kits			
4.1.7	1.7 Antikörper und fluoreszierende Agenzien			
4.1.8	1.8 Oligonukleotide & Gene Strands			
4.1.9	Vektoren	104		
4.1.10	Bakterienstämme	104		
4.1.11	Zelllinien			
4.1.11	.1 HEK293T			
4.1.11	.2 T2			
4.1.12	Peptide			
4.1.13	Software für die Datenanalyse			
4.2 Met	hoden			
4.2.1	Arbeiten mit E. <i>coli</i>			
4.2.1.1	. Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien			
4.2.1.2	Kultivierung von transformierten E. coli Bakterien			
4.2.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen			
4.2.2.1	Zellkultur			
4.2.2.2	Perstellung von stabilen Zellinien			
4.2.2.3	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)			
4.2.2.4	In Kultur nehmen von Zellkulturen	110		
4.2.2.5	Peptid-Stabilisierung für die Expression von HLA-B*27:05 auf der Zellok	erfläche .114		
4.2.2.6	6 NK-Zell-Assay	115		
4.2.2.7	' Einzelzell-Klonierung	116		
4.2.2.8	B T-Zell-Assay			
4.2.3	Durchflusszytometrie – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)			
4.2.4	Molekularbiologische und immunologische Methoden			
4.2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese			
4.2.4.2	2 Klonierung			
4.2.4.3	DNA-Aufreinigung mittels Qiagen Kits			
4.2.4.4	Plasmid-DNA-Präparation			
Abkürzungsve	rzeichnis	124		

Abbildungsverzeichnis	129
Tabellenverzeichnis	131
Literaturverzeichnis	132
Danksagung	137
Curriculum Vitae	138
Erklärung	141

Zusammenfassung

Zusammenfassung

NK-Zellen sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und für die erste Immunabwehr nach einer Infektion verantwortlich. Im gesunden Zustand sind NK-Zellen inaktiv, indem ein Gleichgewicht von aktivierenden und inhibierenden Signalen über Rezeptor-Liganden-Interaktionen aufrechterhalten wird. Nach einer Infektion werden verstärkt aktivierende Signale bzw. weniger inhibierende Signale an die NK-Zellen weitergeleitet, was die Aktivierung der NK-Zellen zur Folge hat. Im Zusammenhang einer viralen Infektion spielt der inhibierende NK-Zell-Rezeptor KIR3DL1 eine wichtige Rolle. Sein Interaktionspartner sind HLA-Klasse I-Liganden mit dem HLA-Bw4-Motiv, die im gesunden Zustand körpereigene nonamerische Peptide binden und mit KIR3DL1 interagieren, wobei für die Interaktion nicht nur das HLA-Molekül selbst, sondern auch das präsentierte Peptid und hier vor allem die Position 7 des Nonamers von großer Bedeutung sind. Durch diese Interaktion erhalten die NK-Zellen ein inhibierendes Signal, welches zur Aufrechterhaltung des inaktiven Zustands beiträgt.

Im Zuge einer viralen Infektion können virale Peptide an HLA-Bw4 binden und mit KIR3DL1 interagieren. Das hat zur Folge, dass KIR3DL1-exprimierende NK-Zellen inhibiert werden, obwohl eine Virusinfektion vorliegt und die infizierten Zellen eliminiert werden müssten. Dies wird als *"NK-Zell-Escape"* bezeichnet.

Diese Arbeit befasste sich daher mit der KIR3DL1-vermittelten Modulation der NK-Zell-Funktion in chronischen Virusinfektionen. Hierbei wurde untersucht, welchen Einfluss die immundominanten HLA-B*27:05-(Bw4)-restringierten Epitope HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ ARMILMTHF und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ ARFYPNVTK auf die Funktionalität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen haben. Bei Sequenzanalysen der genannten Epitope wurde festgestellt, dass diese Epitope variabel sind und Substitutionen an der entscheidenden Position 7 aufweisen, weshalb sich hier die Frage stellte, ob die Sequenzvarianten selektiert wurden, um den *"NK-Zell-Escape"* zu verstärken.

Zur Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen viralen Peptide auf die Funktion von KIR3DL1⁺-NK-Zellen wurde ein Zellkultur-basierter Assay etabliert, bei dem KIR3DL1⁺-NK-Zellen von gesunden Probanden mit Zielzellen, die den zu untersuchenden HLA-B*27:05/Peptid-Komplex exprimierten, stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch deren Aktivität über die Expression des Degranulationsmarkers CD107a gemessen wurde. Hierbei wurde für die Untersuchung des Einflusses des HCV Epitops auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen die PBMCs einer Kohorte mit insgesamt 46 gesunden Probanden und für die Untersuchung des Einflusses des HBV Epitops auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen die PBMCs einer Kohorte mit insgesamt 36 gesunden Probanden verwendet.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Assays zeigten eindeutig, dass die viralen immundominanten Epitope HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ einen signifikant inhibierenden Einfluss auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen hatten. In Bezug auf deren Sequenzvarianten zeigte sich ein heterogenes Bild. Während die Sequenzvarianten des HBV Epitops einen weniger stark inhibierenden Einfluss auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen besaßen als das HBV Epitop ARFYPNVTK selbst, konnten die Sequenzvarianten des HCV Epitops KIR3DL1⁺-NK-Zellen noch stärker inhibieren als die Epitop-Sequenz ARMILMTHF. Demnach gab es nur für das HCV-Epitop einen Hinweis auf eine Selektion von Varianten, die mit einer Verstärkung des *"NK-Zell-Escape"* einhergingen.

Nun ist bekannt, dass es mehr als 100 Allel-Varianten des KIR3DL1-Rezeptors gibt, die auf drei unterschiedliche Weisen exprimiert werden können. Es gibt die stark exprimierten KIR3DL1-Allele, die in dieser Arbeit als KIR3DL1^{high} bezeichnet werden, die schwach exprimierten Allele, die KIR3DL1^{low} genannt werden und die intrazellulär exprimierten KIR3DL1-Allele mit dem Namen KIR3DL1^{null}. Die drei unterschiedlich exprimierten KIR3DL1-Allele werden laut Literatur mit unterschiedlicher Funktionalität assoziiert. Aus diesem Grund wurde in einer weiterführenden Analyse der Einfluss der untersuchten Epitope und deren Sequenzvarianten auf KIR3DL1^{high}-, KIR3DL^{high/low}- und KIR3DL1^{low}-NK-Zellen untersucht. Diese Analyse ergaben für die Untersuchung der KIR3DL1^{high}- und KIR3DL^{high/low}-NK-Zellen ähnliche Ergebnisse wie die vorherige Untersuchung, dass die Epitop-Sequenzen ARMILMTHF (HCV) und ARFYPNVTK (HBV) inhibierend auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen wirken, die HBV Epitop-Varianten aber weniger inhibierend und die HCV Epitop-Varianten stärker inhibierend auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen einwirken als ihre Epitope. Wurden die KIR3DL1^{low}-NK-Zellen betrachtet, zeigten diesmal nicht nur alle HCV Epitop-Varianten, sondern auch die Hälfte der HBV-Epitop-Varianten einen stärkeren Inhibitionseffekt als das Epitop selbst. Dies ließ die Vermutung zu, dass schwach exprimierte KIR3DL1-Allele stärker durch die Rezeptor/Ligand-Interaktion beeinflussbar sind als stark exprimierte Allele. Gleichzeitig schien der starke Inhibitionseffekt durch KIR3DL1^{low}-NK-Zellen aufgehoben zu sein, wenn die NK-Zellen sowohl stark als auch schwach exprimierte KIR3DL1-Allele besaßen. Dies ließ den Schluss zu, dass bei KIR3DL1^{high/low}-NK-Zellen die KIR3DL1^{high}-Allele die KIR3DL1^{low}-Allele dominieren.

Ein weiterer Aspekt, der in dieser Arbeit berücksichtigt wurde, ist die NK-Zell-Lizensierung. Bekanntermaßen ergibt sich die Funktionalität der NK-Zellen während ihrer Entwicklung über die Rezeptor/Ligand-Interaktion zwischen den inhibierenden Rezeptoren NKG2A bzw. KIRs und deren passenden HLA-Liganden. Werden während der Entwicklung die Rezeptoren der NK-Zellen mit dem passenden Liganden stimuliert, entwickelt die NK-Zelle ihr volles zytotoxisches Potenzial. Fehlen die Liganden, sind die "reifen" NK-Zellen nicht voll funktionsfähig. Um die Frage zu beantworten, ob die viralen Peptide einen unterschiedlichen Einfluss auf lizensierte und nicht lizensierte NK-Zellen haben, wurden die bisher erzielten Ergebnisse neu analysiert. Dabei wurden die Probanden aus beiden

Zusammenfassung

Kohorten entsprechend ihres HLA-Genotyps in HLA-Bw4-tragende und nicht HLA-Bw4-tragende Probanden eingeteilt und die Inhibitionsfähigkeit der viralen Peptide in den beiden Gruppen gegenübergestellt. Bei der Gegenüberstellung fiel auf, dass tendenziell nicht-lizensierte KIR3DL1⁺-NK-Zellen, also NK-Zellen aus Probanden ohne HLA-Bw4, stärker inhibiert wurden als lizensierte KIR3DL1⁺-NK-Zellen. Allerdings war der beobachtete Effekt nicht signifikant.

Alles in allem werden KIR3DL1⁺-NK-Zellen durch virale Peptide auf diverse Arten beeinflusst, wobei nicht nur die virale Peptid-Sequenz, die über den Liganden HLA-Bw4 präsentiert wird, für die Stärke des inhibitorischen Effekt verantwortlich ist, sondern dabei auch die Allel-Diversität des KIR3DL1-Rezeptors und die von diesem Rezeptor abhängige Entwicklung der NK-Zelle eine wichtige Rolle spielen. Im Zusammenhang mit viralen Infektionen zeigten bereits viele genetische Assoziationsstudien zur Interaktion von diversen KIRs und deren Liganden, dass der Ausgang der Infektion von diesen Rezeptoren abhängt. Daher ist es von großer Bedeutung, weiterhin einen Fokus auf die Untersuchung der Interaktion von KIRs, insbesondere von KIR3DL1, mit deren Liganden in Virusinfektionen zu legen.

Summary

Summary

NK cells are a part of the innate immune system and are responsible for the initial immune response after infection. In a healthy state, NK cells are in an inactive state maintained by a balance of activating and inhibitory signals via receptor-ligand interactions. After infection, more activating signals or less inhibitory signals are transmitted to NK cells, resulting in NK cell activation. In the context of viral infections, the inhibitory NK cell receptor KIR3DL1 plays an important role. Its interaction partner is HLA-Bw4, which binds endogenous nonameric peptides in a healthy state and interacts with KIR3DL1, whereby not only the HLA molecule itself, but also both the peptide sequence itself and position 7 of the nonamer are of great importance for the interaction. Through this interaction, NK cells receive an inhibitory signal that contributes to the maintenance of the inactive state.

In the course of a viral infection, viral peptides can bind to HLA-Bw4 and interact with KIR3DL1. As a result, KIR3DL1-expressing NK cells are inhibited, although a viral infection is present and the infected cells should be eliminated. This is called NK cell escape.

This work therefore addressed the KIR3DL1-mediated modulation of NK cell function in chronic viral infections. Here, we investigated the influence of the immunodominant HLA-B*27:05-(Bw4)-restricted epitopes HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ ARMILMTHF and HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ ARFYPNVTK on the functionality of KIR3DL1⁺ NK cells. Sequence analyses of the aforementioned epitopes revealed that these epitopes have sequence variants with substitutions at the crucial position 7, raising the question of whether the sequence variants arose to enhance NK cell escape.

To investigate the influence of different viral peptides on the function of KIR3DL1⁺ NK cells, a cell culture-based assay was established in which KIR3DL1⁺ NK cells from healthy donors were stimulated with target cells expressing the HLA-B*27:05/peptide complex of interest. Their activity was measured by flow cytometry via expression of the degranulation marker CD107a. Here, for the investigation of the influence of the HCV epitope on KIR3DL1⁺ NK cells, the PBMCs of a cohort with a total of 46 healthy donors were used. For the investigation of the influence of the HBV epitope on KIR3DL1⁺ NK cells, the PBMCs of a cohort with a total of 36 healthy donors were used.

The results of these assays clearly showed that the viral immunodominant epitopes HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ and HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ had a significant inhibitory effect on KIR3DL1⁺ NK cells. Regarding their sequence variants, a heterogeneous picture was observed. While the sequence variants of the HBV epitope had a less inhibitory effect on KIR3DL1⁺ NK cells than the HBV epitope ARFYPNVTK itself, the sequence variants of the HCV epitope could inhibit KIR3DL1⁺ NK cells even more strongly than the epitope sequence ARMILMTHF. Therefore, it could not be conclusively said whether

Summary

the sequence variability of the viral epitopes serves to enhance NK cell escape or occurs for another purpose.

Now, it is known that there are more than 100 allelic variants of the KIR3DL1 receptor, which can be expressed in three different ways. There are the strongly expressed KIR3DL1 alleles, referred to in this work as KIR3DL1^{high}, the weakly expressed alleles called KIR3DL1^{low}, and the intracellularly expressed KIR3DL1 alleles called KIR3DL1^{null}. According to the literature the three differentially expressed KIR3DL1 alleles are associated with different functionality. Therefore, in a further analysis, the influence of the studied epitopes and their sequence variants on KIR3DL1^{high}, KIR3DL^{high/low} and KIR3DL1^{low} NK cells was investigated. This analysis revealed similar results to the previous study for KIR3DL1^{high} and KIR3DL^{high/low} NK cells in that the ARMILMTHF (HCV) and ARFYPNVTK (HBV) epitope sequences had inhibitory effects on KIR3DL1⁺ NK cells, but the HBV epitope variants had less inhibitory effects and the HCV epitope variants had more inhibitory effects on KIR3DL1⁺ NK cells than their epitopes. When the KIR3DL1^{low} NK cells were examined, this time not only all HCV epitope variants but also half of the HBV epitope variants showed a stronger inhibitory effect than the epitopes themselves. This suggested that weakly expressed KIR3DL1 alleles were more susceptible to receptor/ligand interaction than strongly expressed alleles. At the same time, the strong inhibitory effect by KIR3DL1^{low} NK cells appeared to be abolished when the NK cells possessed both strongly and weakly expressed KIR3DL1 alleles. This implied that in KIR3DL1^{high/low} NK cells, the KIR3DL1^{high} alleles dominated the KIR3DL1^{low} alleles.

Another aspect considered in this work is NK cell licensing. It is well known that the functionality of NK cells during their development results from the receptor/ligand interaction between the inhibitory receptors NKG2A and KIRs, respectively, and their matching HLA ligands. If the NK cell receptors are stimulated with the appropriate ligand during development, the NK cell develops its full cytotoxic potential. In the absence of the ligands, the "mature" NK cells are not fully functional. To answer the question whether the viral peptides have a different effect on licensed NK cells than on unlicensed NK cells, the previously obtained results were reanalyzed. For this purpose, according to their HLA genotype donors from both cohorts were divided into HLA-Bw4-bearing and non-HLA-Bw4-bearing donors and the inhibitory effect of the viral peptides in the two groups was compared. The comparison showed that there was a tendency for non-licensed KIR3DL1⁺ NK cells. so NK cells from donors without HLA-Bw4, to be more inhibited than licensed KIR3DL1⁺ NK cells. However, the observed effect was not significant.

All in all, KIR3DL1⁺ NK cells are influenced by viral peptides in diverse ways, whereby not only the viral peptide sequence presented via the ligand HLA-Bw4 is responsible for the strength of the inhibitory effect, but also the allelic diversity of the KIR3DL1 receptor and the development of the NK cell which depends on this receptor play an important role. In the context of viral infections, many genetic

association studies on the interaction of diverse KIRs and their ligands already showed that the outcome of infection depends on these receptors. Therefore, it is of great importance to continue focusing on the study of the interaction of KIRs, especially KIR3DL1, with their ligands in viral infections.

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immunsystem

Das Humane Immunsystem dient zum Schutz des menschlichen Körpers vor Pathogenen wie Viren, Bakterien oder Pilzen, aber auch vor der Entstehung von Tumoren durch das Abtöten maligner Zellen. Das Immunsystem wird klassischerweise in das angeborene und adaptive Immunsystem eingeteilt. Die zelluläre angeborene Immunabwehr wird von den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und dendritischen Zellen übernommen, wohingegen die T- und B-Zellen für die spätere, adaptive Immunabwehr verantwortlich sind, wobei diese von der Aktivierung des angeborenen Immunsystems abhängt. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Immunsystems ist das Humane Leukozytenantigen-System (HLA-System), welches unter anderem der Unterscheidung zwischen malignen und gesunden Zellen dient (Murphy and Waever, 2018).

1.1.1 Das Humane Leukozytenantigen-System (HLA-System)

Das Humane Leukozytenantigen-System wird von mehreren Genen des *"Major Histocompatibility Complex"* (MHC) auf Chromosom 6 kodiert und lässt sich in die Genregion MHC Klasse I und MHC Klasse II einteilen. Die MHC Klasse I umfasst hauptsächlich die Proteine HLA-A, -B, -C, -E, -F und -G, wobei die ersten drei zu den klassischen und die letzten drei zu den nicht-klassischen MHC Klasse I Molekülen gehören. Diese HLA-Proteine werden ubiquitär auf der Oberfläche nukleärer Zellen exprimiert (Monos and Winchester, 2019). Im Gegensatz dazu stehen die zur MHC Klasse II zählenden Proteine HLA-DM, -DO, -DP, -DQ und -DR, die nur auf potenziell Antigen-präsentierenden Zellen (*"*antigen-presenting cells", kurz: APC) wie beispielsweise Monozyten, dendritischen Zellen oder Makrophagen exprimiert werden, sobald die APCs durch beispielsweise eine Infektion stimuliert wurden (Djaoud and Parham, 2020).

MHC Klasse I und II Moleküle unterscheiden sich in ihrer Struktur (**Abb. 1.1**). MHC Klasse I Moleküle bestehen aus einer α -Kette mit einer α_1 -, α_2 - und einer α_3 -Domäne und einer kleinen β -Kette, bekannt als β_2 -Mikroglobulin. Die α -Kette besitzt einen extrazellulären (α_1 -, α_2 - und einer α_3 -Domäne), einen Membran-ständigen und einen zytoplasmatischen Teil. Das β_2 -Mikroglobulin besteht nur aus einem extrazellulären Teil t und ist an die α_3 -Domäne der α -Kette nicht-kovalent gebunden ist. Die Bindestelle für die Peptide liegt zwischen der α_1 - und α_2 -Domäne (Monos and Winchester, 2019).





Modifizierte Abbildung zur Veranschaulichung der Proteinstruktur von MHC Klasse I und II Molekülen von Djaoud und Parham, 2020 (HLAs, TCRs and KIRs, a Triumvirate of human mediated immunity; *(Djaoud and Parham, 2020)*). **A** Dargestellt ist die Proteinstruktur eines MHC Klasse I Moleküls auf einer APC in Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor (gelb/blau) einer CD8⁺ T-Zelle als Ligand. Das MHC Klasse I Molekül besteht aus dem Komplex zwischen der α -Kette (hellrosa) und β -Kette (grüngrau), wobei die α -Kette drei extrazelluläre Domänen α_1 , α_2 und α_3 besitzt. Die Bindetasche für die Peptide (dunkelgrau) befindet sich zwischen der α_1 und α_2 -Domäne. **B** Abgebildet ist die Proteinstruktur eines MHC Klasse II Moleküls auf einer APC in Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor (gelb/blau) einer CD4⁺ T-Zelle als Ligand. Das MHC Klasse II Molekül setzt sich aus der α -Kette (dunkelrosa) und β -Kette (grün) zusammen, die jeweils aus zwei Domänen (α_1 , α_2 -Domäne bzw. β_1 , β_2 -Domäne) bestehen. Hier liegt die Bindetasche für die Peptide (dunkelgrau) zwischen der α_1 und β_1 -Domäne. Abkürzungen: CD4/CD8 = Cluster of Differentiation 4/8, β_2 m = β_2 -Mikroglobulin, MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex, APC = Antigen-präsentierende Zelle.

Die MHC Klasse II Moleküle setzen sich aus einer α - und einer β -Kette zusammen, die beide aus einem extrazellulären, einen Membran-ständigen und einen zytoplasmatischen Teil bestehen. Die extrazellulären Teile der α - und β -Kette setzen sich aus je zwei Domänen zusammen: die α_1 - und α_2 -Domäne bzw. die β_1 - und β_2 -Domäne. Zwischen der α_1 - und β_1 -Domäne ist die Peptid-Bindestelle (Djaoud and Parham, 2020).

Die Nomenklatur der HLA-Allele ist sehr komplex. Im Allgemeinen bekommen die Moleküle den Namen des Genabschnitts, auf dem sie kodiert sind, also HLA-A, -B bzw. HLA-DM, -DO etc. Da von den HLA-Molekülen mehrere Allele existieren, werden den unterschiedlichen Allelen Nummern zugeteilt. Hierbei gibt es Unterschiede zwischen MHC Klasse I und Klasse II. Bei den Klasse I Molekülen werden die Nummern mit einem Sternchen (*) vom Buchstaben getrennt (HLA-B*27). Zusätzlich sind unterschiedliche Allelvarianten vorhanden. Um dies zu verdeutlichen, folgt nach der Nummer ein Doppelpunkt und die Varianten-Nummer (HLA-B*27:05). Bei den Klasse II Molekülen können die Allele der einzelnen Ketten variieren, woraus sich folgender Name ergibt: HLA-DRB3. Das B steht in dem Fall für die β-Kette und die 3 für das Gen (Murphy and Waever, 2018).

Ein gemeinsames Merkmal aller HLA-Moleküle ist die Tatsache, dass sie nur durch das Binden kurzer spezifischer Aminosäuresequenzen, sogenannter Peptide oder auch Antigene, stabil auf der Oberfläche exprimiert werden können (Monos and Winchester, 2019). Allerdings unterscheidet sich der Prozessierungsweg zwischen MHC Klasse I und Klasse II Molekülen. Da sich diese Arbeit nur mit dem MHC Klasse I Molekül HLA-B*27:05 befasst, wird im nächsten Kapitel ausschließlich der Prozessierungsweg von MHC Klasse I Molekülen beschrieben.

1.1.1.1 Die Peptid-Präsentation über MHC Klasse I Moleküle

Die HLA-Moleküle dienen der Präsentation von spezifischen Peptiden, die bei gesunden Zellen aus Sequenzen körpereigener Proteine bestehen und als "Selbst-Peptide" bezeichnet werden. Dieser HLA-Peptid-Komplex signalisiert also dem Immunsystem, dass die Zelle intakt ist. Im Falle einer Infektion werden die "Selbst-Peptide" durch Peptide ersetzt, die von Proteinen des Pathogens abgeleitet wurden. Durch diese körperfremden Peptide erkennen die Immunzellen die Infektion einer Zelle (Marijt and van Hall, 2020).





Modifizierte Abbildung zur Veranschaulichung der Peptid-Präsentation über MHC Klasse I Moleküle von Oliveira and van Hall, 2015 (Alternative antigen processing for MHC class I: multiple roads lead to Rome; (Oliveira and van Hall, 2015)). Dargestellt sind der klassische (rot) und alternative Signalweg (grün) zur Peptid-Präsentation. Beim klassischen Signalweg werden Proteine über das Proteasom in Peptide gespalten und über TAP in das Lumen des ER geschleust. Dort werden die MHC Klasse I Moleküle mit Peptiden beladen und anschließend über Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert. Weiterhin in Vesikeln verpackt gelangen diese über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche, wo sie dann mit der Membran fusionieren und auf der Oberfläche exprimiert werden. Beim alternativen Signalweg findet der Transport der Peptide TAP-unabhängig statt. Peptide können aus Proteinen, die in der ER-Membran verankert sind, abgespalten werden, da entweder ihr C-terminalen Teil oder der Teil mit einem Signalpeptid in das Lumen des ER ragt. Diese werden von der SPP vom Protein abgespalten und können dort auf MHC Klasse I Moleküle geladen werden. Von dort aus gleicht der Signalweg dem des klassischen Signalwegs. Neben dem ER können auch im Autophagosom MHC Klasse I Moleküle mit Peptiden TAP-unabhängig beladen werden, wenn dieses Zellkompartiment MHC Klasse I Moleküle und exogene Proteine von beispielsweise Pathogenen von der Oberfläche internalisiert haben. Endoproteasen wie Furin spalten die Proteine zu Peptiden. Diese können dann auf den MHC Klasse I Molekülen präsentiert und im Anschluss wieder zurück zur Zelloberfläche gebracht werden. Welcher Signalweg zur Peptidpräsentation angewendet wird, hängt vom TAP-Level ab. Je geringer das TAP-Level ist, desto wahrscheinlicher werden die alternativen Signalwege genutzt.

Abkürzungen: TAP = Antigen-Peptid-Transporter, ER = Endoplasmatisches Retikulum, SP = Signalpeptid, SPP = Signalpeptid-Peptidase.

Bei einer Virusinfektion gelangt das Pathogen durch Internalisierung in das Zytoplasma der Zelle. Im Rahmen der Replikation entsteht im Zytoplasma eine große Menge an körperfremden Proteinen. Neben körpereigenen Proteinen werden dann auch die Proteine des Virus durch das Proteasom in Peptide gespalten und mithilfe des Antigen-Peptid-Transporters ("Transporter associated with antigen processing", kurz: TAP) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) geschleust (**Abb. 1.2**). Dort befinden sich HLA-Moleküle mit leeren Peptid-Bindestellen und können mithilfe von Helfer-Proteinen mit den vermehrt vorkommenden Pathogenpeptiden beladen werden. Sobald ein HLA-Peptid-Komplex stabil ist, wird es durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gebracht, wo es dann die Antigene des Pathogens an die Immunzellen präsentiert (Klassischer Signalweg, **Abb. 1.2**; (Oliveira and van Hall, 2015)).

Es scheint allerdings auch TAP-unabhängige Prozessierungswege zu geben, um HLA-Moleküle mit ihren Peptiden zu beladen. Zum einen könnten Proteine mithilfe einer sogenannten Signal-Peptid-Sequenz in das ER geschleust werden, wo deren Signal-Peptide dann von der Signal-Peptid-Peptidase (SPP) abgespalten und als Antigen in der Bindetasche von HLA-Molekülen gebunden werden. Zum anderen wird vermutet, dass ein weiteres Transporter-Protein in der ER-Membran vorhanden sein könnte, welches die Peptide zur Beladung von HLA-Molekülen in das Lumen des ERs bringen kann (Del Val et al., 2011). Eine weitere Theorie besagt, dass Peptide aus dem Zytoplasma über endolysosomale Zellkompartimente bzw. exogene Peptide über Autophagosomen mit Recycling-Endosomen verschmelzen können, die gerade HLA-Moleküle von der Oberfläche internalisiert haben. In diesem Zellkompartiment kann dann das recycelte HLA-Molekül mit dem endozytierten Peptid beladen und wieder an die Zelloberfläche gebracht werden (Alternativer Signalweg, **Abb. 1.2**; (Maffei and Harris, 1998)).

1.1.1.2 Immundominante Epitope

Epitope sind Peptide, die auf ihrem geeigneten HLA-Molekül präsentiert werden und nach Binden eines passenden T-Zell-Rezeptors eine Immunantwort auslösen. Hierbei wird zwischen immundominanten und subdominanten Epitopen unterschieden. Bei immundominanten Epitopen handelt es sich um die Peptidsequenz, die die stärkste Immunantwort bei T-Zellen auslöst, subdominante Epitope hingegen lösen nur eine schwächere und in manchen Fällen sogar gar keine Immunantwort aus (Akram and Inman, 2012).

Die Stabilität eines HLA-Peptid-Komplexes ist abhängig von der Sequenz des Peptids. Jedes HLA-Allel hat ein spezifisches Peptid-Bindemuster, sodass die Anzahl an möglichen Peptidsequenzen, die gebunden werden können, eingeschränkt ist. Dieser Umstand wird als HLA-Restriktion bezeichnet und durch die HLA-Allel-Diversität ausgeglichen. Es kann auch vorkommen, dass einige Peptide gar nicht an bestimmte HLA-Moleküle binden können (Sant, 2019).

1.1.1.2.1 Das HLA-B*27:05-restringierte Epitop HCV NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉

HLA-B*27:05-restringierte Epitope verfügen hauptsächlich über eine Aminosäuresequenz mit neun Aminosäuren (Nonamer), an dessen zweiter Stelle laut Seq2Logo (**Abb. 1.3**, Thomsen & Nielsen, 2012) ein Arginin (R) charakteristisch ist. Idealerweise sollten diese Nonamere auch an letzter Position folgende Aminosäuren aufweisen: Leucin (L), Isoleucin (I), Arginin (R), Lysin (K), Phenylalanin (F) oder Methionin (M). Auch an erster Position sind ein Arginin (R), Leucin (L) oder Lysin (K) und an dritter Position ein Leucin (L), Phenylalanin (F), Isoleucin (I), Alanin (A), Methionin (M), Valin (V) oder Tryptophan (Y) für die Bindung des Peptids vorteilhaft (Jardetzky et al., 1991).



Abb. 1.3: Motiv des nonamerischen Peptids für die Bindung an HLA-B*27:05.

Erstellt mit Seq2Logo (Thomsen & Nielsen, 2012). Die Y-Achse beschreibt die Menge der Informationen in Bits. Die X-Achse zeigt die Position der Aminosäure vom N-terminalen Ende (Position 1) bis zum C-terminalen Ende (Position 9) an. An jeder Position befindet sich ein Stapel von Buchstaben, die die Aminosäure darstellen. Große

Symbole stehen für häufig beobachtete Aminosäuren, große Stapel für konservierte Positionen und kleine Stapel für variable Positionen. Das resultierende Bindemotiv von HLA-B*27:05 hat vier konservierte Positionen (Position 1, 2, 3 und 9), an denen am häufigsten ein Arginin (R; Position 1 und 2) und ein Leucin (Position 3 und 9) auftreten.

In dieser Arbeit wurden das virale immundominante Epitop und die dazugehörigen Sequenzvarianten im Hinblick auf ihre Fähigkeit, die NK-Zell-Funktion über KIR3DL1 zu modulieren, untersucht. Das Epitop HCV-NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ stammt aus der Aminosäuresequenz von Position 2841 bis 2849 des Nicht-Strukturproteins 5B des Hepatitis C Virus (HCV) und hat die Prototypsequenz ARMILMTHF. Neumann-Haefelin et al konnten dieses Epitop nach Sequenzanalysen von HCV-infizierten Probanden und zellulären in vitro Experimente mit T-Zellen als immundominantes HLA-B*27:05-restringiertes Epitop identifizieren (Neumann-Haefelin et al., 2006). Weiterhin wurden auch Sequenzvarianten dieses Epitops hinsichtlich ihrer Fähigkeit der T-Zell-Stimulation und ihres Einflusses auf die virale Fitness untersucht. Diese Sequenzvarianten wiesen einzelne Substitution an Position 1, 4, 6 oder 7 der Epitopsequenz oder Kombinationen von Substitutionen an den genannten Positionen auf. Die Sequenzvarianten mit einem einzelnen Aminosäreaustausch zeigten ähnlich hohe Level an aktivierten CD8⁺ T-Zellen wie nach Stimulation mit der prototypischen Sequenz. Ausschließlich Kombinationen von Substitutionen an mehreren Positionen des Epitops verursachten eine stark reduzierte T-Zell-Aktivität ("T-Zell-Escape"). Diese Substitutionen gingen allerdings mit dem Verlust der viralen Fitness einher, sodass die Kernaussage dieser Studie war, dass HLA-B*27:05 einen protektiven Effekt gegenüber einer HCV-Infektion hat. Zum einen wurde trotz Veränderung der Epitopsequenz das Epitop weiterhin auf HLA-B*27:05 präsentiert und von T-Zellen erkannt und zum anderen konnte das Virus nur einer T-Zell-Antwort entgehen, wenn auf Kosten der viralen Fitness mehrere Positionen mutiert waren (Dazert et al., 2009). Eine Substitution wich allerdings von diesem Muster ab. Die Einzelmutation an der siebten Position des Epitops von Threonin (T) zu Prolin (P) zeigte bereits eine starke Reduktion der T-Zell-Aktivität, aber nur einen mäßigen Verlust der viralen Fitness. Daher galt in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf diese Sequenzvariante des NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitops.

1.1.2 Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)

Natürliche Killerzellen sind große, granuläre Lymphozyten und machen etwa 15–20% dieser Leukozyten-Untergruppe im peripheren Blut aus (McDonald and Levy, 2019). Sie sind zentraler Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, da sie ihre Zielzellen im Gegensatz zu T-Zellen ohne vorheriges Priming und unabhängig von der Präsentation pathogener Strukturen abtöten können (Rich and Chaplin, 2019). Klassischerweise werden die NK-Zellen über das Fehlen des T-Zelllinien-Markers CD3 und der Expression von CD16 und CD56 definiert. Hierbei werden die NK-Zellen aufgrund der Menge an CD56-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche und des Vorhandenseins des CD16-Rezeptors in

drei Subtypen eingeteilt: die CD56^{bright} NK-Zellen, die eine hohe CD56-Expression haben, aber kein CD16 exprimieren, die CD56^{dim} NK-Zellen, welche weniger stark CD56 und zusätzlich CD16 aufweisen und die CD56^{negative} NK-Zellen, die nur CD16 auf der Oberfläche haben (Cooper et al., 2001).

Die drei NK-Zell-Subtypen unterscheiden sich nicht nur phänotypisch, sondern auch funktionell. Die CD56^{bright} NK-Zellen machen bis zu 10 % aller NK-Zellen aus und sind hauptsächlich immunmodulatorisch. Sie sind zuständig für die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon γ (IFN γ), Tumornekrose-Faktor α (TNF α) oder Interleukin 10 (IL-10), um sowohl die zytotoxischen NK-Zellen zu stimulieren als auch Immunzellen des adaptiven Immunsystems zum Ort der Infektion migrieren zu lassen (Biron, 2016). Der restliche Anteil der NK-Zellen besteht mit etwa 90 % aus den CD56^{dim} NK-Zellen, welche sich über eine hohe Zytotoxizität auszeichnen. Nach Aktivierung können diese NK-Zellen ihre Zielzellen eigenständig abtöten, indem sie auf unterschiedliche Weise den programmierten Zelltod in den Zielzellen herbeiführen. Der letzte Subtyp kommt in gesunden Individuen äußerst selten vor und ist wenig untersucht. Allerdings wurde bereits für HIV- und HCV-infizierte Personen beschrieben, dass diese CD56^{negative} NK-Zell-Population zunimmt und eine verringerte Zytotoxizität aufweist (Gonzalez et al., 2009, Cocker et al., 2022).

1.1.2.1 Die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen und ihre Effektorfunktion

Bei NK-Zellen hängt die Unterscheidung zwischen tumorösen bzw. infizierten Zellen und gesunden Zellen von der Interaktion ihrer Rezeptoren auf der Zelloberfläche und deren Liganden ab. NK-Zellen besitzen sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren. Die Summe aller inhibierenden und aktivierenden Signale entscheidet darüber, ob eine NK-Zelle aktiviert wird oder nicht. Da die Liganden für viele der inhibierenden Rezeptoren MHC-Moleküle sind, die im gesunden Zustand auf den Zellen ubiquitär exprimiert werden, überwiegt das inhibierende Signal und die NK-Zelle verweilt in einem inaktiven Zustand (Biron, 2016).

Die NK-Zellaktivierung und die damit einhergehende Abtötung der Zielzellen kann auf verschiedenen Wegen ablaufen. Dies hängt davon ab, wie sich die Oberflächenexpression der Zielzelle verändert. Bei tumorösen Zellen oder durch eine virale Infektion mit beispielsweise dem Humanen Zytomegalievirus (HCMV) kann die Expression von MHC Molekülen auf den Zielzellen herunterreguliert werden (Berry et al., 2020). Obwohl dies zu einer Evasion von der T-Zellvermittelten Immunabwehr führt, geht das inhibierende Signal an die NK-Zelle verloren und die verbleibende Stimulation über die aktivierenden Rezeptoren löst die NK-Zell-Aktivierung aus. Dieser Mechanismus, bei dem das inhibierende Signal aufgrund des Fehlens von MHC Molekülen als Liganden für die inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren ausbleibt, wird "*Missing self*" (Abb. 1.4) genannt (Morvan and Lanier, 2016).



Abb. 1.4: Physiologische Funktionen von NK-Zellen.

Modifizierte Abbildung zur Veranschaulichung der physiologischen Funktionen von NK-Zellen von Morvan und Lanier, 2016 (NK cells and cancer you can teach innate cells new tricks; (Morvan and Lanier, 2016)). **A** Ein Gleichgewicht von inhibierenden und aktivierenden Signalen reguliert die Erkennung gesunder Zellen durch NK-Zellen. **B** Tumorzellen oder infizierte, die Klasse-I-Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) herunterregulieren können, werden über "*Missing self*" als geschädigte Zelle erkannt und von NK Zellen lysiert. **C** Tumoröse oder infizierte Zellen regulieren Stress-Liganden hoch, die von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren erkannt werden und die inhibierenden Signale aufheben, um die Lyse der Zielzellen auszulösen. **D** Antigenspezifische Antikörper binden an CD16 und lösen eine Antikörper-abhängige NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität aus. Abkürzungen: NK-Zelle = Natürliche Killerzelle, MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex, ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, CD16 = Cluster of Differentiation 16, "-" = inhibierendes Signal.

Ein weiterer Mechanismus zur Aktivierung von NK-Zellen ist die Stress-Induktion (**Abb. 1.4**). Bei der Stress-Induktion wird eine Körperzelle aufgrund einer Virusinfektion, UV-Strahlen, chemischen Reizen, etc. so gestresst, dass sie Stress-Liganden wie die MHC-Klasse-I-Polypeptid-verwandten Proteine A und B (MICA und MICB) oder die UL16-bindenden Proteine (ULBPs) hochregulieren. Diese vermehrt auftretenden Stress-Liganden binden an mehr aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren als zuvor, sodass nun das aktivierende Signal an die NK-Zelle überwiegt und die NK-Zelle mit der Abtötung der Zielzelle beginnt (McDonald and Levy, 2019).

Das Abtöten der Zielzelle kann über die oben beschriebenen unterschiedlichen Signalwege ausgelöst werden, resultiert jedoch immer mit der Auslösung von Apoptose in den Zielzellen. Zum einen können sie mithilfe der Stimulation von Todesrezeptoren wie Fas bzw. TRAIL oder über die Sekretion der Zytotoxine Perforin und Granzym B den programmierten Zelltod in der Zielzelle hervorrufen. Zum anderen können sie mittels Antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – ADCC) ihre Zielzellen abtöten. CD16 bindet als Schlüsselbestandteil des ADCC den Fc-Teil von Antikörpern, die an die Antigene der Zielzellen gebunden sind. Als Konsequenz entlassen dann die NK-Zellen zytotoxische, Apoptose-auslösende Granula in die Zielzellen aus (Biron, 2016).

1.1.2.2 Das Rezeptor-Repertoire von Natürlichen Killerzellen

NK-Zellen weisen eine hohe Diversität bezüglich der Expression von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche auf. Was die inhibierenden Rezeptoren von den aktivierenden Rezeptoren unterscheidet, ist das Signalisierungsmotiv. Inhibitorische Rezeptoren haben ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Inhibitionsmotiv (ITIM), während aktivierende Rezeptoren ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM) haben (Murphy and Waever, 2018).

Neben den bereits erwähnten Rezeptoren CD16 und CD56 (Klassifizierung der NK-Zell-Subtypen) gibt es Rezeptoren, die zu folgenden drei Rezeptor-Familien gehören: die Natürlichen Zytotoxizität-Rezeptoren ("Natural Cytotoxicity Receptors", kurz: NCR), die CD94/NKG2-Rezeptor-Familie und die Killer-Zell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren ("Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors", kurz: KIR-Rezeptoren; (Moretta et al., 2014)).

1.1.2.2.1 Die Natürlichen Zytotoxizität-Rezeptoren (NCR)

Die NCR sind Rezeptoren, die aktivierende Funktionen aufweisen und hauptsächlich in der Tumorbekämpfung involviert sind. Die bekanntesten zu den NCR zählenden Proteine sind NKp30, NKp44 und NKp46. Für NKp30 und NKp46 ist bekannt, dass diese sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten NK-Zellen exprimiert werden. Da deren Liganden nur auf den Zellen hochreguliert werden, die beispielsweise infiziert wurden oder sich zu einer tumorösen Zellen entwickelten, findet die Stimulation nicht im gesunden Zustand statt. Anders verhält es sich mit dem Rezeptor NKp44, der nur auf aktivierten NK-Zellen exprimiert wird (Barrow et al., 2019).

1.1.2.2.2 Die CD94/NKG2-Rezeptor-Familie

Zu der CD94/NKG2-Rezeptor-Familie gehören die Rezeptoren NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E und NKG2F. Die Rezeptoren NKG2A, C und E sind Heterodimere bestehend aus einem NKG2- und einem CD94-Molekül. NKG2D setzt sich aus einem Homodimer von zwei NKG2D-Molekülen zusammen. Bei NKG2F wird vermutet, dass es genauso wie NKG2A, C und E aus einem Heterodimer besteht (Pegram et al., 2011). Bei dieser Rezeptor-Familie gibt es sowohl inhibierende, wozu NKG2A gehört, als auch aktivierende Rezeptoren wie NKG2C oder E, die sich alle den Liganden HLA-E teilen. Die Ausnahme ist NKG2D, dessen Liganden die Stress-induzierten Moleküle MICA, MICB und einige ULBPs sind. Der Ligand für NKG2F ist noch unbekannt (Walter and Petersen, 2017).

1.1.2.2.3 Die Killer-Zell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIRs)

Die Killer-Zell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren sind im Leukozytenrezeptorkomplex auf Chromosom 19 kodiert, welcher aus 16 unterschiedlichen, polymorphen KIR-Genen besteht. Sieben davon kodieren inhibierende KIRs (3DL1-3, 2DL1-3 und 2DL5), sechs kodieren aktivierende KIRs (3DS1, 2DS1-2DS5), eins kodiert einen KIR, der sowohl inhibierende als auch aktivierende Signale auslösen kann (2DL4), und zwei sind Pseudogene (2DP1 und 3DP1), die keinen Oberflächenrezeptor kodieren (Campbell and Purdy, 2011). Die Nomenklatur der KIRs ergibt sich aus der Struktur dieser Moleküle (Abb. 1.5, (Marsh et al., 2003)). Sowohl die Anzahl der extrazellulären Domänen als auch die Länge der zytoplasmatischen Domäne sind hier entscheidend. KIRs können entweder zwei (2D) oder drei (3D) extrazelluläre Domänen besitzen und entweder eine lange (L) oder kurze (S) zytoplasmatische Domäne aufweisen. KIRs mit einer langen zytoplasmatischen Domäne leiten aufgrund ihrer integrierten ITIM inhibierende Signale weiter. KIRs mit der kurzen zytoplasmatischen Domäne geben ein aktivierendes Signal weiter. Grund dafür ist die Vernetzung mit dem Adapter-Molekül DAP12, welches ITAMs beinhaltet (Borrego et al., 2002). Die Liganden der KIRs sind die MHC Klasse I Moleküle HLA-A, -B, -C, -F und -G (Carlsten and Jaras, 2019).



Abb. 1.5: Killer-Zell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) und ihre Liganden.

Modifizierte Abbildung zur Veranschaulichung der KIR-Allotypen und deren HLA Klasse I Liganden von Djaoud und Parham, 2020 (HLAs, TCRs and KIRs, a Triumvirate of human mediated immunity; (Djaoud and Parham, 2020)). KIR können entweder inhibierend (gelb) oder aktivierend (grün) sein. Angegeben sind die bekannten HLA-Isotypen und Epitop-bindende HLA-Allele, die von KIRs erkannt werden. Ein Fragezeichen kennzeichnet KIR-Liganden, die noch nicht bestimmt wurden. Ein Sternchen zeigt an, dass nur die Untergruppe der HLA-Varianten mit dem aufgeführten Allel bindet. Eine Raute weist auf Interaktionen hin, die ein entsprechendes Peptid erfordern. Ein Diamant zeigt an, dass offene HLA-F-Konformer ohne gebundenes Peptid auch Liganden mit geringerer Affinität für KIR3DL1 und KIR3DL2 sein können.

1.1.2.2.3.1 KIR3DL1 und seine Liganden HLA-A^{Bw4} und -B^{Bw4}

Der inhibierende NK-Zell-Rezeptor KIR3DL1 zeigt eine hohe allelische Variabilität mit mehr als 100 bekannten Allel-Varianten (Saunders et al., 2016). Diese können bezüglich der Oberflächenexpression in drei Gruppen unterteilt werden: die "Null-Allele", dessen Protein nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird, die "Low-Allele", die mit einer geringen Oberflächenexpression einhergehen und die "High-Allele", die mit einer hohen Oberflächenexpression assoziiert sind (Gardiner et al., 2001). Exemplarisch ist in folgender Abbildung eine durchflusszytometrische Untersuchung zur Oberflächenexpression von KIR3DL1 auf NK-Zellen von Probanden, die auf genetischer Ebene KIR3DL1positiv sind, sich jedoch in ihren Allelen unterscheiden, dargestellt (**Abb. 1.6**).





Abb. 1.6: Durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenexpression von KIR3DL1⁺-NK-Zellen

KIR3DL1^{null}-NK-Zellen (links) zeigen keine KIR3DL1⁺-NK-Zellen, während KIR3DL1^{high}-NK-Zellen (mittig) eine hohe und KIR3DL1^{low}-NK-Zellen (rechts) eine geringe KIR3DL1-Oberflächenexpression zeigen.

Die Abbildung zeigt gemessen an der MFI die Stärke der Expression von KIR3DL1-Molekülen (x-Achse) auf der Oberfläche von NK-Zellen (y-Achse: CD56-exprimierende Zellen, **Abb. 1.6**). Hierbei zeigt die linke Abbildung die Oberflächenexpression von KIR3DL1 auf NK-Zellen eines KIR3DL1^{null}-Probanden, wobei hier keine KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen zu erkennen sind. Die mittlere Abbildung zeigt NK-Zellen eines KIR3DL1^{high}-Probanden. Die hohe Oberflächenexpression äußert sich darin, dass die KIR3DL1-positive NK-Zell-Population weit nach rechts verschoben ist. Dem entgegen steht der KIR3DL1^{low}-Proband in der rechten Abbildung, dessen KIR3DL1⁺-NK-Zell-Population aufgrund einer geringeren KIR3DL1-Oberflächenexpression nur wenig nach rechts verschoben ist.

Zu den "Null-Allelen" zählt beispielsweise KIR3DL1*004, zu den "Low-Allelen" zählen beispielsweise KIR3DL1*005 und *007 und zu den "High-Allelen" gehören unter anderem KIR3DL1*001, *002 oder *008 (Campbell and Purdy, 2011). Das Besondere an der Genetik von KIR3DL1 ist, dass KIR3DL1 und KIR3DS1 auf demselben Genlokus kodiert sind, weshalb sie als Allele füreinander fungieren. Dies bedeutet, dass entweder zwei KIR3DL1-Allele, aber kein KIR3DS1-Allel, zwei KIR3DS1-Allele, aber kein KIR3DL1-Allel oder je eins dieser Allele exprimiert werden kann (Gardiner et al., 2001).

Die Liganden für KIR3DL1 werden unter den Namen HLA-Bw4 zusammengefasst und schließt alle HLA-A und -B-Moleküle ein, die in der Bindetasche der α_1 -Domäne von Position 77 – 83 die spezifische Aminosäuresequenz des Bw4-Motivs tragen. Das Bw4-Motiv kann folgende Sequenzen aufweisen: DLRTLLR, NLRIALR, NLRTALR, SLRTLLR oder SLRTALR. Das Alternativ-Motiv bei HLA-B-Molekülen heißt Bw6 und hat SLRNLRG als Aminosäuresequenz. Bei HLA-A-Molekülen gibt es verschiedene andere Alternativ-Motive (Muller et al., 1989). Des Weiteren interagiert KIR3DL1 nicht nur mit dem HLA-Molekül allein, sondern auch mit dem präsentierten Peptid. Eine Kristallstruktur-Analyse von KIR3DL1 im Komplex mit drei HLA-B^{Bw4}-Molekülen hat gezeigt, dass KIR3DL1 direkt mit den Positionen 7 und 8 des gebundenen Peptids interagiert (Stewart-Jones et al., 2005). Die Bindungsaffinität von KIR3DL1 zu seinen Liganden hängt nicht von der KIR3DL1-Alleldiversität ab (Saunders et al., 2021), sondern von drei anderen Faktoren. Der erste Faktor ist der Dimorphismus im Bw4-Motiv an Position 80. Dort kann entweder ein Isoleucin (I) oder Threonin (T) auftreten, wie es beispielsweise bei HLA-B*27:05 der Fall ist (Parham et al., 2012). Cella et al haben beobachtet, dass HLA-Bw4 80(I) mit einer höheren Affinität an KIR3DL1 bindet als 80(T) (Cella et al., 1994). Zweitens ist es von Bedeutung, welches HLA-Bw4-Allel mit KIR3DL1 interagiert. Es ist bekannt, dass im Allgemeinen HLA-A^{Bw4} weniger affin an KIR3DL1 binden als HLA-B^{Bw4}, da sich die Sequenzunterschiede von HLA-A zu HLA-B-Molekülen negativ auf die Protein-Region, die für die Interaktion mit KIR3DL1 zuständig ist, auswirkt (Saunders et al., 2021). Der letzte Punkt ist die Peptid-Sequenz, die auf dem HLA-Molekül präsentiert wird. Es wurde bereits gezeigt, dass die gebundene Peptid-Sequenz die Stärke des KIR3DL1vermittelten inhibierenden Signals beeinflusst. Fadda et al konnten bei unterschiedlichen KIR/HLA-Bw4-Konstellationen bei HIV-infizierten Patienten nachweisen, dass die Aminosäuresequenz, die auf HLA-Bw4 Molekülen präsentiert werden, die Interaktion mit den KIR-Molekülen modulieren kann (Fadda et al., 2011). Ein bekanntes Beispiel für eine genetische Kombination ist HLA-B*27:05 und KIR3DL1 mit den gebundenen Peptiden EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ des Epstein-Barr-Virus (EBV) mit der Sequenz RRIYDLIEL und NP₃₈₃₋₃₉₁ des Influenza-A-Virus (FLU) mit der Sequenz SRYWAIRTR. Stewart-Jones et al konnten zeigen, dass beide Peptide trotz einer ähnlichen Stabilisierungsfähigkeit von HLA-B*27:05 starke Unterschiede in der Aktivierung von KIR3DL1⁺-NK-Zellen aufwiesen. Während das Epstein-Barr Virus Kern-Antigen 3C ("Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C") EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ gar kein inhibierendes Signal über KIR3DL1 an die NK-Zelle vermittelte, zeigten NK-Zellen nach Interaktion mit dem Epitop aus dem Nukleoprotein ("Nucleoprotein") des FLU Virus (Influenza A Virus, IAV) NP₃₈₃₋₃₉₁ eine verringerte Aktivität (Stewart-Jones et al., 2005). Aufgrund dieser Befunde dient HLA-B*27:05 in dieser Arbeit in den zellulären Assays zur Untersuchung der KIR3DL1-vermittelten Modulation der NK-Zell-Funktion als Ligand und die genannten Peptide als Positiv- und Negativkontrollen bezüglich der Beeinflussbarkeit der NK-Zell-Aktivität.

1.1.2.3 "NK cell education"

Um ihr volles zytotoxisches Potenzial zu erreichen und aufrechtzuerhalten, durchlaufen NK-Zellen einen funktionellen Trainingsprozess, der gängigerweise als *"NK cell education"* oder auch NK-Zell-Lizensierung bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um einen dynamischen Prozess, bei dem die Reaktionsfähigkeit einer NK-Zelle auf *"Missing self"* durch die Stärke der Interaktion zwischen ihren inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2A bzw. KIRs und ihren passenden MHC Klasse I Liganden kalibriert wird. NK-Zellen ohne inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren oder mit KIRs ohne passenden Liganden entwickeln nicht ihr vollständiges zytotoxisches Potential (He and Tian, 2017).

Das Ausmaß der Reaktionsfähigkeit der NK-Zellen wird durch die Anzahl der Interaktionen von hemmenden Rezeptoren mit eigenen MHC-Klasse-I-Molekülen auf hämatopoetischen oder stromalen Zellen während der Entwicklung im Knochenmark bestimmt. Je mehr unterschiedliche inhibierende KIRs eine NK-Zelle exprimiert, desto stärker ist die Reaktionsfähigkeit (Boudreau and Hsu, 2018).

1.1.3 T-Zellen

T-Zellen sind die Hauptakteure des adaptiven Immunsystems und für die zelluläre Immunantwort gegen Pathogene verantwortlich. Sie machen ungefähr 70% der Lymphozyten im peripheren Blut aus und definieren sich über die Expression von CD3 (*"Cluster of Differentiation 3"*), welcher gemeinsam mit dem T-Zell-Rezeptor (*"T Cell Receptor"*, kurz: TCR) einen Komplex bildet (Lewis and Blutt, 2019). Aus diesem Grund wird dieses Protein auch als Zelllinien-Marker der T-Zellen verwendet.

Um Autoimmunreaktionen zu verhindern, werden während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus T-Zellen aussortiert, deren TCR körpereigene Peptide erkennen. Aufgrund dieser negativen Selektion bleiben hauptsächlich T-Zellen erhalten, die mit ihren TCR an HLA-Moleküle binden, die körperfremde Peptide tragen (Harrington, 2019). Der HLA-Peptid-Komplex allein reicht als Ligand allerdings nicht aus, um T-Zellen aktivieren zu können. Dafür muss der Rezeptor-Ligand-Komplex entweder über CD4 oder CD8 als Co-Rezeptor stabilisiert werden, welcher in unmittelbarer Nähe des TCRs exprimiert wird. Bei zytotoxischen T-Zellen ist der Co-Rezeptor CD8 und bei T-Helferzellen CD4, weshalb die T-Zellen in die zwei Subtypen CD4 und CD8 T-Zellen unterteilt werden. Die unterschiedlichen Co-Rezeptoren bestimmen auch die Funktion der T-Zelle (Wherry and Masopust, 2016).

Die zytotoxischen CD8 T-Zellen erkennen abnorme Zellen durch das Binden von HLA-Molekülen der MHC Klasse I. Wenn eine naïve CD8 T-Zelle mit CD8 und ihrem bereits hochspezifischen TCR an ein HLA-Molekül bindet, dessen gebundenes Peptid perfekt in die Bindetasche des TCRs passt, erhält die CD8 T-Zelle ein erstes Aktivierungssignal. Für eine endgültige Aktivierung muss die CD8 T-Zelle zusätzliche Stimuli über weitere Ko-Rezeptoren wie CD28 oder von Interferonen erhalten. Sie beginnt zu proliferieren und differenziert sich zu einer Effektor T-Zelle aus, die mithilfe von zytotoxischen Granula, ähnlich wie die NK-Zellen, die infizierte Zelle abtötet. Nach Eliminierung des Pathogens wird ein Großteil dieser CD8 Effektor T-Zellen durch Apoptose abgetötet. Ein kleiner Teil jedoch entwickelt sich zu Gedächtnis T-Zellen, die im Falle einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen eine schnellere Zytotoxizität gewährleisten (Badovinac et al., 2002, Gourley et al., 2004).

Die CD4 T-Helferzellen sind nur indirekt an der Abtötung von Pathogenen beteiligt. Sie binden mit ihren TCR an HLA-Molekülen der MHC Klasse II. Sobald neben der spezifischen Bindung zwischen CD4, dem TCR und dessen Liganden ein zusätzliches co-stimulatorisches Signal von beispielsweise CD28 die naïve CD4 T-Helferzelle erreicht, werden diese T-Zellen aktiviert. Dadurch wird ihre Proliferation und das Ausschütten von diversen immunmodulatorischen Zytokinen ausgelöst (Tay et al., 2021). Bedingt durch die verschiedenen Zytokine differenzieren sich die CD4 T-Helferzellen anschließend zu unterschiedlichen Subtypen aus. Ein wichtiger Subtyp, der sich durch Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 21 (IL-21) zu follikulären T-Helferzellen (T_{FH}-Zellen) ausdifferenziert, sorgt durch das Aussenden von co-stimulatorischen Signalen an die B-Zellen für die Bildung spezifischer Antikörper (Luckheeram et al., 2012).

1.2 Ziel der Arbeit

NK-Zellen sind in der führen Phase der Immunantwort von großer Bedeutung für die Bekämpfung von Virusinfektionen. Diese zytotoxischen Immunzellen besitzen die Fähigkeit, (viral) infizierte Zellen ohne Priming direkt abzutöten, da ihre Aktivität von einer Vielzahl inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren abhängt, die mit infektionsbedingt regulierten Liganden interagieren. Dahingegen haben Viren, die eine chronische Infektion verursachen, in der Ko-Evolution mit ihrem Wirt diverse Mechanismen, sogenannte Immunevasionsstrategien, entwickelt, die eine effiziente NK-Zellantwort verhindern oder hemmen.

Es ist beschrieben, dass virale Peptide, die an HLA Klasse I-Molekülen gebunden sind, die NK-Zellfunktion beeinflussen können. Auf genetischer Ebene gibt es Hinweise, dass der inhibierende NK-Zell-Rezeptor KIR3DL1 zusammen mit seinem Liganden (HLA Klasse I-Moleküle mit Bw4-Motiv) mit einer höheren Ausheilungsrate einer akuten Hepatitis C assoziiert ist. Daher soll in dieser Arbeit der Einfluss von Sequenzvarianten viraler Epitope im Kontext von HLA-Bw4 auf die KIR3DL1 vermittelte NK-Zell Inhibition genauer untersucht werden.

Dafür soll ein Zell-Kultur-System etabliert werden, mit dem gemessen werden kann, wie stark KIR3DL1exprimierende NK-Zellen im Vergleich zu nicht KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen inhibiert werden, wenn unterschiedliche Epitope bzw. Sequenzvarianten des Epitops über den Liganden HLA-B*27:05 mit KIR3DL1 interagiert. Dazu werden T2-Zellen, die HLA-B*27:05 ausschließlich dann, wenn ein passendes Epitop gebunden wird, stabil exprimieren, als Liganden für die Stimulation von humanen NK-Zellen eingesetzt. Der Vorteil der T2-Zellen ist hierbei, dass diese kein TAP exprimieren. Damit wird sichergestellt, dass keine Zell-eigenen Peptide, die im gesunden Zustand auf HLA Klasse I-Molekülen präsentiert werden, auf dem stabil eingebrachten HLA-B*27:05 Molekül gebunden sind. Nur die exogen hinzugefügten Peptide, die es zu untersuchen gilt, werden auf diesem HLA-Molekül präsentiert. Die Aktivität der NK-Zellen soll mittels Oberflächen-Färbung des Degranulationsmarkers CD107a gemessen werden.

Zudem soll untersucht werden, ob zum einen die NK-Zell-Lizensierung von KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen durch endogene HLA-Bw4-Expression eine Rolle in der KIR3DL1-vermittelten NK-Zell-Modulation spielt und zum anderen unterschiedliche KIR3DL1-Allele unterschiedliche Inhibitionseffekte im Zusammenhang mit den präsentierten Peptiden aufweisen. Dazu werden die Probanden sowohl HLA- als auch KIR3DL1-typisiert und anschließend die Inhibitionseffekte untereinander verglichen.

Die Arbeiten folgen der Hypothese, dass in einer chronischen Virusinfektion Epitop-Varianten selektiert werden, die zu einer optimalen NK-Zell-Inhibition führen. Eine zweite Hypothese ist, dass sowohl die NK-Zell-Lizensierung als auch die Diversität in den KIR3DL1-Allelen mit unterschiedlichen Inhibitionseffekten einhergeht. Ziel ist es, neue Erkenntnisse über Immunevasionsstrategien von chronischen Virusinfektionen am Beispiel von HBV und HCV zu erlangen und tiefere Einblicke in KIR3DL1-vermittelte Modulation der NK-Zell-Funktion zu erhalten.

Ergebnisse

2 Ergebnisse

Zur Untersuchung der KIR3DL1-vermittelten NK-Zell-Modulation durch die Stimulation mit unterschiedlichen viralen HLA-B*27:05-restringierten Peptid-Sequenzen soll ein funktionaler, Zellkultur-basierte Assay dienen. Für diesen Assay sind drei Komponenten notwendig:

- a) die Zielzellen: T2 HLA-B*27:05. Nach Hinzugabe der zu untersuchenden Peptide wird HLA-B*27:05 auf den Zielzellen stabil exprimiert und an die KIR3DL1⁺-NK-Zellen (Effektorzellen) präsentiert, um diese zu stimulieren;
- b) die Effektorzellen. Ihre Aktivierung wird nach Stimulation mit ihren Liganden mithilfe des Degranulationsmarkers CD107a gemessen;
- c) Virale HLA-B*27:05-restringierte Epitope mit Sequenzvariabilität. Sie dienen zur Stimulation von KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Bindung an HLA-B*27:05.

Mit dem Zellkultur-Assay könnten folgende Aspekte untersucht werden: die Reaktion von KIR3DL1exprimierenden NK-Zellen auf die Zielzellen, die keinen HLA-B*27:05/Peptid-Komplex auf der Zelloberfläche aufweisen, die Immunantwort von KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen auf die Zielzellen, die den HLA-B*27:05/Peptid-Komplex auf der Zelloberfläche tragen, und die Aktivität von NK-Zellen, die kein KIR3DL1 exprimieren, sowohl auf Zielzellen mit und ohne HLA-B*27:05/Peptid-Komplex auf ihrer Zelloberfläche.

Die Zielzellen, werden von der kollaborierenden Arbeitsgruppe der Abteilung für klinische und experimentelle Wissenschaften der medizinischen Fakultät in der Universität Southampton geleitet von Prof. Salim Khakoo zur Verfügung gestellt.

Als Effektorzellen dienen periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), die von Probanden aus der in unserer Arbeitsgruppe etablierten cryokonservierten Kohorte aus gesunden Spendern stammen.

Das zu untersuchende HLA-B*27:05-restringierte virale Epitop ist das bereits bekannte HLA-B*27:05restringierte HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉, welches Sequentvarianten besitzt. Zusätzlich soll ein weiteres HLA-B*27:05-restringiertes HBV Epitop identifiziert werden, welches eine Sequenzvariabilität aufweisen muss. Diese Epitope und deren Sequenzvarianten sollen in dem funktionalen NK-Zell-Assay auf ihre Fähigkeit zur Modulation der NK-Zell-Funktion analysiert werden.

2.1 Sequenzvariabilität von HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ und deren adaptive Immunantwort

Um den Einfluss von Sequenzvarianten viraler Epitope im Kontext von HLA-B*27:05 auf die KIR3DL1vermittelte NK-Zell-Modulation untersuchen zu können, wurde als erstes eine Sequenzanalyse des bereits beschriebenen HLA-B*27:05-restringierten HCV NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitops ARMILMTHF bezüglich des Auftretens von Substitutionen durchgeführt. Hierbei wurde der Fokus auf die HCV Genotypen 1a und 1b (GT 1a/b) gelegt, da diese die weltweit am häufigsten vorkommenden Genotypen sind (Gower et al., 2014).

Für die Sequenzanalysen wurde auf die online zugängliche Kohorte zurückgegriffen (Viruses: Taxonomy Overview, o. D.), von der ausschließlich die sequenzierten Genome von 10701 isolierten Hepatitis C Viren, aber keine HLA-Genotypen der Probanden zur Verfügung gestellt wurden. Daher konnte keine Untersuchung einer genetischen Assoziation zwischen den Sequenzunterschieden und den HLA-Genotypen der HCV-infizierten Probanden durchgeführt werden. Es wurde lediglich untersucht, wie die am häufigsten aufgetretene Epitop-Sequenz (sog. Prototyp-Sequenz) des NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitops aller in der Kohorte isolierten HCV Genotypen aussah, und welche Substitutionen an welcher Position des Epitops abhängig von den HCV GT 1a/b vorgefunden werden konnten (**Abb. 2.1**).



Abb. 2.1: Phylogenetische Untersuchung von 10701 HCV Genomsequenzen zur Darstellung der genomischen Distanz zwischen den einzelnen HCV Genotyp-Varianten und dessen HCV NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitopen.

Ergebnisse

Der phylogenetische Baum zeigt eine deutliche Unterscheidung der HCV Genotyp 1 Genome von den Genomen der Genotypen 2 bis 6. Zusätzlich spaltet sich der Genotyp 1 nochmals in Genotyp 1a und Genotyp 1b auf.

Zur Untersuchung der Prototyp-Sequenzen der HCV Genotypen wurde ein phylogenetischer Baum mithilfe von 10701 Genomsequenzen erstellt. Dieser enthält sieben Taxa, die je für einen Genotypen bzw. Subtypen stehen. Hierbei wurden 3246 GT1a, 3979 GT1b, 714 GT2, 1673 GT3, 366 GT4, 63 GT5 und 660 GT6 Genomsequenzen analysiert. Die Prototyp-Sequenz der HCV GT 1a und 1b lautete ARMILMTHF und unterschied sich von den restlichen Prototyp-Sequenzen der HCV GT 2 - 6 in den Positionen 1, 3, 4 und 5. Die HCV Genotypen 2 bis 6 wiesen an der ersten Position des Epitops ein Valin (V) anstelle des Alanins (A) des HCV 1a und 1b auf. Weiterhin besaßen diese anstelle des Isoleucins (I) an Position 4 ein Valin (V). Die Position 5 schien am variabelsten, da hier GT 1a, 1b, 2, 4 und 6 ein Leucin (L) vorwiesen, GT 3 ein Methionin (M) und GT 5 ein Arginin (R). Als einzige Ausnahme zeigte GT 5 im Gegensatz zu allen anderen Genotypen auch einen Unterschied an Position 3, wo diese anstelle des Methionins (M) über ein Isoleucin (I) verfügte.

Da mit dieser Analyse bestätigt wurde, dass ARMILMTHF die Epitop-Sequenz der HCV GT 1a und 1b von NS5B₂₄₈₁₋₂₈₄₉ war, wurde anschließend die Sequenzvariabilität dieses Epitops an den neun Positionen untersucht (**Abb. 2.2**).



Sequenzvariabilität bei HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉



Dargestellt sind auf der x-Achse die Aminosäuren und deren Position in der NS5B-Proteinsequenz unterteilt in Genotyp 1a (GT1a) und Genotyp 1b (GT1b). Die y-Achse stellt die Sequenzvariabilität [in %] dar. Die dargestellten Balken zeigen den aufsummierten prozentualen Anteil der einzelnen substituierten Aminosäuren. Dabei stehen die unterschiedlichen Farben für die substituierte Aminosäure: gelb = Alanin, lila = Phenylalanin (F), rot = Isoleucin (I), orange = Leucin (K),, hellblau = Leucin (L), rosa = Methionin (M), dunkelblau = Prolin (P), pink = Threonin (T), grün = Valin (V) und grau = Aminosäure konnte nicht spezifiziert werden.

Die Sequenzanalyse von 3246 GT1a und 3979 GT1b Epitopsequenzen wurde grafisch dargestellt, indem die Sequenzvariabilität angegeben in Prozent (y-Achse) gegen die auf der x-Achse dargestellten neun Positionen der Epitop-Sequenz in Abhängigkeit von den Genotypen 1a bzw. 1b aufgetragen wurden. Hierbei stellte jede Säule den aufsummierten prozentualen Anteil der unterschiedlichen Substitutionen pro Position dar. Diese ergab, dass außer bei GT1b Position 8 an allen Positionen des Epitops Substitutionen aufgetreten sind. Die substituierten Aminosäuren waren Alanin (A), Phenylalanin (F), Isoleucin (I), Lysin (K), Leucin (L), Methionin (M), Prolin (P), Threonin (T), Valin (V) oder X. Das X kann für jede bekannte Aminosäure stehen, konnte bei der Sequenzierung allerdings nicht spezifiziert werden. Insgesamt sind Substititionen in dem Epitop selten und traten in einem prozentualen Bereich von 0,000616 % (GT1a, Position 8, Aminosäure X) bis 0,166359 % (GT1a, Position 1, Aminosäure V) auf.

Bei den Substitutionen an den Positionen 1 bis 5 und an Position 9 handelt es sich um den Austausch von Aminosäuren, die aus der Aminosäure-Gruppe mit den gleichen Eigenschaften stammen. Zum Beispiel wurde an Position 1 das Alanin (A) gegen Valin (V) ausgetauscht, die beide zur unpolaren/hydrophoben Gruppe gehören. Sie unterscheiden sich darin, dass Valin (V) eine Methylgruppe mehr hat als Alanin (A). An der Position 6 gab es neben den Substitutionen aus der gleichen Aminosäure-Gruppe (M \rightarrow A, I, L) zu geringen Anteilen auch einen Austausch von Methionin (M) aus der unpolaren/hydrophoben Gruppe zu Threonin (T), das zur polaren/neutralen Gruppe gehört. Hierbei unterscheiden sich die Aminosäuren darin, dass Threonin (T) anstelle der Schwefelgruppe eine Sauerstoffgruppe besitzt. Eine Besonderheit gab es an Positon 7, wenn die nichtbestimmbaren Aminosäuren (X) ausgeschlossen wurden. Es gab ausschließlich einen Austausch von dem polar/neutralen Threonin (T), das eine Sauerstoff- und Methylgruppe besitzt, zum unpolaren/hydrophoben Prolin (P) mit einem Stickstoffring.

Interessanterweise ist Position 7 eines an HLA-Bw4 gebundenen Epitops die entscheidende Stelle für die Bindung an seinen Interaktionspartner KIR3DL1. Zudem haben bereits Dazert *et al* beobachtet, dass die Sequenzvarianten mit Einzelmutationen an den anderen Positionen ähnlich hohe Level an aktivierten CD8⁺ T-Zellen wie nach Stimulation mit der Prototyp-Sequenz zeigten (Dazert et al., 2009). Eine Ausnahme war die Mutation an Position 7 des Epitops von Threonin (T) zu Prolin (P), die eine starke Reduktion der T-Zell-Aktivität aufwies.

Aufgrunddessen, dass die Studie von Dazert *et al* und die Sequenzanalyse des HCV-Epitops ergab, dass die Position 7 des Epitops eine Sonderstellung einnimmt, wurde die Analyse bei den funktionalen NK-Zell-Assays auf die Varianten mit einem Prolin-Austausch fokussiert, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind (**Tab. 2.1**).

Peptid- Nummer	Sequenz	Vorkommen in GT1a [%] n = 3053	Vorkommen in GT1b [%] n = 3832	Vorkommen in GT1a/b [%] n = 6885
497	ARMILMTHF	81,69	84,86	83,28
506	P	0,13	0,29	0,21
824	VP	0,03	0,21	0,12
870	LP	0,03	0,05	0,04
871	VLP	0,07	0,16	0,12
872	L	0,23	1,23	0,73

Tab. 2.1: Auflistung der zu untersuchenden GT1 HCV NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop Varianten und deren prozentuales Vorkommen in der HCV Online-Kohorte.

Die Tabelle beinhaltet die interne Peptidnummer, deren Sequenz und das prozentuale Vorkommen der Sequenzvarianten in den untersuchten HCV-Sequenzen in Abhängigkeit des Genotyps. Zusammen genommen wurden 6885 Sequenzen des Genotyps 1 (GT 1a: n = 3053; GT 1b: n = 3832) auf Sequenzvariabilität untersucht. Von 6885 GT 1 Sequenzen entsprachen gemittelt 83,28 % der Konsensus-Sequenz (Prototyp-Sequenz). Das Vorkommen der Sequenzvarianten mit dem Prolin an Position 7 in GT 1a und 1b variierte zwischen 0,03 % und 1,23 %. Insgesamt wurden vier verschiedene Prolin-Varianten gefunden. Für Vergleichszwecke, dass ein Prolin (P) an Position 7 möglicherweise den Unterschied ausmacht, wurde auch das Peptid ARMILLTHF (Nummer 872, dunkelgrau unterlegt) in den späteren funktionalen NK-Zell-Assays integriert, da es kein Prolin an Stelle 7, aber ein Leucin (L) an Stelle 6 besitzt, so wie auch die Peptide 870 und 871, die in der Analyse integriert werden.

Zum Schluss sollte in einem funktionalen T-Zell-Assay mit T-Zellen eines HCV-infizierten Probanden, der HLA-B*27:05 positiv ist, getestet werden, ob und wie stark die Sequenzvarianten des Epitops im Vergleich zum Prototypen CD8⁺-T-Zellen aktivieren können. Mit dieser Analyse können Varianten identifiziert werden, die einen *"T-Zell-Escape"* bewirken.

Für den T-Zell-Assay (Abschnitt 4.2.2.8) wurden aus der von unserer Arbeitsgruppe etablierten IDU-Kohorte PBMCs von einem HLA-B*27:05 positiven IDU-Probanden (IDU945) in Kultur genommen und 14 Tage lang in Anwesenheit des Prototyp-Peptids ARMILMTHF kultiviert. Am 14. Tag fand eine fünfstündige Restilumation der T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen aller Peptide statt. Die Start-Konzentration war 10⁰ mg/ml und wurde seriell im Verhältnis 1:10 bis zu einer Konzentration von 10⁻⁴ mg/ml verdünnt. Anschließend wurde die Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen mittels Interferon γ (IFNγ)-Färbung gemessen. Als Negativkontrolle wurde die IFNγ-Produktion von CD8⁺-T-Zellen gemessen, die nicht restimuliert wurden. Als Positivkontrolle wurde die T-Zell-Aktivität von T-Zellen gemessen, die zu Beginn der Expansion und bei der Restimulation mit dem CEF-Pool stimuliert wurden. Der prozentuale Anteil an CD8⁺-T-Zellen, die IFNy produziert haben, wurde durchflusszytometrisch bestimmt (**Abb. 2.3**).





Abb. 2.3: Darstellung der IFNy-produzierenden CD8⁺-T-Zellen eines HCV-Patienten nach Stimulation mit HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop Varianten.

A Durchflusszytometrische Darstellung zur Ermittlung der Menge an IFNγ-produzierenden CD8⁺-T-Zellen eines HCV Patienten nach Stimulation mit dem HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop ARMILMTHF. **B** Grafische Darstellung der CD8⁺-T-Zell-Antworten desselben HCV Patienten nach Stimualtion mit den HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop Varianten in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen [in 10^x mg/ml].

In dieser Abbildung sind zum einen die Gating-Strategie zur Ermittlung des prozentualen Anteils an IFNγ-produzierenden CD8⁺-T-Zellen (**Abb. 2.3 A**) und zum anderen dessen grafische Darstellung in Abhängigkeit der Peptidkonzentration zu jeder einzelnen HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptidsequenz (**Abb. 2.3 B**) wiedergegeben. Der T-Zell-Assay ergab, dass erwartungsgemäß die Positivkontrolle (CEF-Pool) eine starke IFNγ-Produktion in CD8⁺-T-Zellen auslöste, wohingegen die Negativkontrolle (keine Zugabe von Peptiden bei der Restimulation) keine IFNγ-Ausschüttung bei den CD8⁺-T-Zellen verursachte. Die Stimulation der CD8⁺-T-Zellen mit dem Prototyp-Peptid (497 – ARMILMTHF) zeigte einen prozentualen Anteil an IFNγ-produzierenden CD8⁺-T-Zellen von 2,35 % bei einer Peptidmenge von 10⁰ mg/ml. Nach einer zehnfachen Verdünnung der Peptidkonzentration (10⁻¹ mg/ml) reduzierte sich die T-Zell-Aktivität nur gering auf 2,18 %. Nach einer weiteren zehnfachen Verdünnungsstufe (10⁻² mg/ml) verringerte sich der prozentuale Anteil aktiver T-Zellen um das etwa Vierfache auf 0,54 %. Bei der nächsten
Verdünnungsstufe (10⁻³ mg/ml) war nur noch eine geringe T-Zell-Aktivität (0,35 %) nachweisbar. Bei den getesteten Sequenzvarianten konnte nur die Variante ohne Prolin (Peptidnummer 872) bei einer Peptidmenge von 10⁰ mg/ml eine schwache Immunantwort mit einem Anteil an aktivierten T-Zellen von 0,8 % auslösen. In der folgenden Verdünnungsstufe (10⁻¹ mg/ml) reduzierte sich der Anteil an IFNγ-produzierenden T-Zellen bereits um die Hälfte auf 0,4 %, bis bei der dritten Verdünnungsstufe (10⁻² mg/ml) bereits keine T-Zell-Antwort mehr messbar war. Alle Prolin-Sequenzvarianten konnten keine T-Zell-Immunantwort auslösen, was auf einen *"T-Zell-Escape"* hindeutet und die Studie von Dazert *et al* erneut bestätigte (Dazert et al., 2009).

2.2 Identifizierung des immundominanten HLA-B*27:05-restringierten HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂

HBV verursacht ähnlich wie HCV eine chronische Infektion in der Leber. Da unsere Arbeitsgruppe eine HBV-Kohorte etabliert hat, bei der sowohl die HBV-Genomsequenzen als auch die HLA-Genotypen der Probanden bekannt sind, sollte auch für dieses Virus untersucht werden, ob es ein HLA-B*27:05restringiertes HBV-Epitop mit Sequenzvarianbilität gibt. Mit einem solchen neu identifizierten HBV-Epitop und dessen Sequenzvarianten sollten, angelehnt an den Untersuchungen zum HCV-Epitop, ebenfalls die geplanten funktionalen NK-Zell-Assays durchgeführt werden.

Aus diesem Grund wurde zunächst eine *in silico* Sequenzanalyse mit den HBV-Genomsequenzen im Zusammenhang mit den HLA-Genotypen der Probanden durchgeführt, um ein HLA-B*27:05-restringiertes HBV-Epitop zu identifizieren (**Abb. 2.4**).



Abb. 2.4: *In silico* Sequenzanalyse zum HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop in Bezug auf auftretende Substitutionen bei HLA-B*27-positiven und HLA-B*27-negativen HBV⁺-Probanden.

Das hintere Balkendiagramm (orange) zeigt bei HLA-B*27-positiven HBV⁺-Probanden und das vordere Balkendiagramm (blau) bei HLA-B*27-negativen HBV⁺-Probanden den prozentualen Anteil an Aminosäuren, die nicht mit der Konsensus-Sequenz ARFYPNVTK übereinstimmen. Bei einem Vergleich zwischen den insgesamt 379 HLA-B*27-positiven und HLA-B*27-negativen HBV⁺-Probanden ergibt sich eine signifikante Substitutionsrate bei HLA-B*27-positiven HBV⁺-Probanden an Position 7 des Epitops (p = 1,48 x 10⁻¹⁰).

Das Ergebnis der *in silico* Sequenzanalyse wurde grafisch dargestellt, indem die prozentuale Häufigkeit von Abweichungen der Aminosäure-Sequenz von der Konsensus-Sequenz an den verschiedenen Aminosäurepositionen aufgetragen wurde. Mithilfe dieser Analyse konnte aus 379 untersuchten HBV-Genomen die nonamerische Peptid-Sequenz ARFYPNVTK identifiziert werden, die aus der Aminosäure-Sequenz von Position 114 bis 122 der HBV-Polymerase des Hepatitis B Virus des Genotyps D (HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂) stammte. Bei einem Vergleich der Peptid-Sequenz zwischen HLA-B*27:05 positiven zu HLA-B*27:05 negativen HBV-infizierten Probanden zeigten sich Sequenzvariabilitäten an den Positionen 4, 6 und 7. Der Vergleich ergab für Position 7 bei HLA-B*27:05 positiven Probanden eine signifikant erhöhte Sequenzvariabilität mit einem Wert von $p = 1,48 \times 10^{-10}$. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde vermutet, dass es sich bei diesem *in silico* identifizierten HBV-Peptid um ein HLA-B*27:05-restringiertes HBV-Epitop handeln könnte.

Aus dieser Analyse konnte auch eine Tabelle mit einer Auswahl an Sequenzvarianten dieses HBV-Peptids erstellt werden, die nach der Bestätigung dieses Peptids als ein HLA-B*27:05-restringiertes HBV-Epitop für funktionale NK-Zell-Assays eingesetzt werden würden (**Tab. 2.2**).

Peptid- Nummer	Sequenz	Vorkommen in GTD [%] n = 379
830	ARF <mark>Y</mark> P <mark>NV</mark> TK	61,48
831	К	30,08
832	FA	0,26
833	A	0,53
834	КА	2,11
835	KG	0,53
836	KK	0,26

Tab. 2.2: Auflistung der zu untersuchenden GTD HBV Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten und deren prozentuales Vorkommen in der HBV Kohorte unserer Arbeitsgruppe.

Die Tabelle zeigt die internen Peptidnummern für die HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptidvarianten, deren Aminosäuresequenz und deren prozentuales Vorkommen in den untersuchten HBV GTD-Genomsequenzen. Es wurden insgesamt 379 HBV-Genomsequenzen auf Sequenzvariabilität innerhalb des HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptids ARFYPNVTK untersucht und sechs Varianten von Interesse gefunden. Die Sequenzvariabilität variierte zwischen 0,26 % und 30,08 %. Die Positionen, an denen die Substitution auftraten, waren Position 4, 6 und 7, wobei die Substitution an Position 4 nur ein einziges Mal auftrat. An dieser Stelle hatte Peptid Nummer 832 ein Phenylalanin (F) anstelle eines Tyrosins (Y). Die Aminosäuren unterscheiden darin, dass Phenylalanin keine OH-Gruppe mehr am Phenolring besitzt. Dadurch ändert sich die Eigenschaft der Aminosäure von unpolar/neutral zu polar/hydrophob. Zusätzlich hatte dieses Peptid auch eine Substitution an Position 7, wo das Valin (V) der Prototyp-Sequenz zu einem Alanin (A) wurde. Allerdings hatte dieser Austausch keinen Einfluss auf die Eigenschaft der Aminosäure, da beide aus der Gruppe der unpolaren/hydrophoben Aminosäuren gehören. Der Austausch von Valin (V) zu Alanin (A) an Position 7 trat auch als Einzelmutation bei Peptid 833 auf. Eine weitere Einzelmutation trat bei Peptid 831 auf, bei dem an Position 6 anstelle von einem Asparagin (N) aus der polar/neutralen Aminosäure-Gruppe ein Lysin (K) aus der basischen Aminosäure-Gruppe beobachtet werden konnte. Eine Kombination dieser beiden Einzelmutationen lag bei Peptid 834 vor. Die letzten beiden Peptide zeigten wie auch Peptid 834 eine Doppelsubstitution an den Positionen 6 und 7. Beide Peptide haben ein Lysin (K) an Position 6. Peptid 835 wies nun ein Glycin (G) und Peptid 836 ein Lysin (K) an Position 7 auf. Glycin (G), das das unpolare/hydrophobe Valin (V) ersetzt, gehört zur polaren/neutralen Aminosäure-Gruppe, wohingegen das Lysin (K) zur basischen Gruppe zählt, das im Vergleich zum ersetzten Valin zwei Stickstoffreste vorweist.

Um zu bestätigen, dass es sich bei dem *in silico* identifizierten HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid ARFYPNVTK um ein HLA-B*27:05-restringiertes HBV-Epitop handelt, wurden T-Zell-Assays mit T-Zellen von HLA-B*27:05 positiven HBV-infizierten Probanden und dieser Peptid-Sequenz durchgeführt.

Dafür wurden aus der HBV-Kohorte PBMCs von zwei HLA-B*27:05 positiven HBV-Patienten (HBV163 und HBV443) in Kultur genommen und 14 Tage lang in Anwesenheit des Peptids ARFYPNVTK kultiviert. Am 14. Tag fand eine fünfstündige Restilumation der T-Zellen mit dem Peptid statt, wonach die Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen mittels IFNγ-Färbung gemessen wurde. Als Negativkontrolle galten T-Zellen, die nicht restimuliert wurden, und als Positivkontrolle wurde die T-Zell-Aktivität von T-Zellen gemessen, die zu Beginn der Expansion und bei der Restimulation mit dem CEF-Pool stimuliert wurden. Der prozentuale Anteil an CD8⁺-T-Zellen, die IFNγ produziert haben, wurde durchflusszytometrisch bestimmt (**Abb. 2.5**).



Abb. 2.5: Durchflusszytometrische Darstellung der IFNγ-produzierenden CD8⁺-T-Zellen von zwei HBV-Patienten nach Stimulation mit dem HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop.

Dargestellt ist die Gating-Strategie zur Ermittlung der Menge an IFNy-produzierenden CD8⁺-T-Zellen von dem HBV Patienten HBV443 nach Stimulation mit dem HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₁₂ Epitop ARFYPNVTK.

Zur Visualisierung der IFNγ⁺-CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit dem neu *in silico* identifizierten HBV

GTD Polymerase Peptids ARFYPNVTK wurden die zu diesem Experiment gehörenden FACS-Plots

verwendet. Hierbei wurde im oberen Teil der Abbildung die Gating-Strategie, die zur Darstellung der IFNγ-positiven CD8⁺-T-Zellen diente, gezeigt, während im unteren Teil (blaue Umrandung) die FACS-Plots der einzelnen Stimulationsansätze (unstimuliert, CEF-Pool-stimuliert, Peptid-stimuliert) aufgezeigt sind. Auf der y-Achse wurden die CD8-positiven Zellen und auf der x-Achse die IFNγ-positiven Zellen dargestellt, sodass die Zellen, die sich in dem oberen rechten Viertel befinden, als IFNγ-produzierende CD8⁺-T-Zellen gewertet wurden. Die durchflusszytometrischen Daten zeigten, dass die CD8⁺-T-Zellen von beiden HLA-B*27:05 positiven HBV-Patienten eine T-Zell-Antwort in Form von IFNγ-Produktion nach Stimulation mit dem HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptids aufwiesen. Rund 4,9 % der CD8⁺-T-Zellen des Patienten HBV163 und etwa 2,4 % der CD8⁺-T-Zellen des Patienten HBV443 wurden nach Restimulation mit dem HBV-Peptid aktiviert. Die Kontrollen zeigten erwartungsgemäß, dass nach einer Stimulation der CD8⁺-T-Zellen mit dem CEF-Pool eine starke Immunantwort ausgelöst wurde (29,2 %), wohingegen nach keiner Stimulation auch keine IFNγ-Produktion bei den CD8⁺-T-Zellen nachweisbar war. Anhand dieser Ergebnisse konnte geschlussfolgert werden, dass das *in silico* identifizierte Peptid HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ erwiesenermaßen ein HLA-B*27:05-restringiertes HBV-Epitop ist.

Da HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ als HLA-B*27:05-restringiertes HBV-Epitop identifiziert wurde, sollten als nächstes die Sequenzvarianten des HBV-Epitops daraufhin untersucht werden, ob und wie stark diese im Vergleich zum Prototypen CD8⁺-T-Zellen von HLA-B*27:05 positiven HBV-Patienten aktivieren können bzw. ob einige der Varianten einen T-Zell-Escape verursachen. Dafür wurde ein T-Zell-Assay mit den PBMCs des HLA-B*27:05 positiven HBV-Patienten HBV163 durchgeführt, bei dem die HBV-Peptide in einem Titrationsverhältnis von 1 zu 10 beginnend bei einer Peptidmenge von 10⁰ mg/ml in fünf Verdünnungsstufen titriert wurden (**Abb. 2.6**).





Abb. 2.6: Darstellung der IFNy-produzierenden CD8⁺-T-Zellen eines HBV-Patienten nach Stimulation mit HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten.

A Durchflusszytometrische Darstellung zur Ermittlung der Menge an IFNγ-produzierenden CD8⁺-T-Zellen eines HBV Patienten nach Stimulation mit dem HBV GTD Pol 114-122 Epitop ARFYPNVTK. **B** Grafische Darstellung der CD8⁺-T-Zell-Antworten desselben HBV Patienten nach Stimualtion mit den HBV GTD Pol114-122 Epitop Varianten in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen [in 10^x mg/ml].

Die in **Abb. 2.6 A** dargestellte Gating-Strategie zeigt die Ermittlung des prozentualen Anteils an IFNγproduzierenden CD8⁺-T-Zellen, der in **Abb. 2.6 B** in Abhängigkeit der Peptidkonzentration zu jeder einzelnen HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptidsequenz grafisch dargestellt wurde.

Die Titration der HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptide ergab, dass das Prototyp-Peptid ARFYPNVTK mit 20 % IFNyproduzierenden CD8⁺-T-Zellen bei einer Peptidkonzentration von 10⁰ mg/ml die stärkste Immunantwort zeigte. Bei einer zehnfachen Verringerung der Peptidkonzentration auf 10⁻¹ mg/ml reduzierte sich der prozentuale Anteil an IFNy-produzierenden CD8⁺-T-Zellen um weniger als die Hälfte auf 13 %. Nach einer weiteren zehnfachen Verdünnung konnten noch 3 % aktivierte CD8+-T-Zellen gemessen werden, bis bei einer Peptidkonzentration von 10⁻³ mg/ml bis 10⁻⁵ mg/ml keine Immunantwort mehr zu erkennen war. Die Peptide 832 und 833 zeigten bei der Startkonzentration von 10° mg/ml ähnlich hohe Level von IFNy-produzierenden CD8+-T-Zellen mit Werten von 14 % (Peptid 832) bzw. 16 % (Peptid 833). In der nächsten Verdünnungsstufe zeigte sich allerdings bereits eine Reduktion der IFNy-produzierenden CD8⁺-T-Zellen um drei Viertel. Bei einer Peptidkonzentration von 10⁻² mg/ml konnte bei beiden Peptiden keine Immunantwort mehr nachgewiesen werden. Peptid 831 zeigte bei der höchsten Peptidkonzentration von 10⁰ mg/ml mit 2 % einen kleinen prozentualen Anteil an IFNy-produzierenden CD8⁺-T-Zellen, allerdings konnte schon bei der nächsten Konzentration (10⁻¹ mg/ml) keine Immunantwort mehr nachgewiesen werden. Für die Peptide 834, 835 und 836 konnten bei keiner Peptidkonzentration Immunantworten gemessen werden, was auf einen "T-Zell-*Escape* "hindeutete.

2.3 Funktionaler Assay zur Untersuchung der KIR3DL1-vermittelten NK-Zell-Modulation

Für die Untersuchung der KIR3DL1-vermittelten NK-Zell-Modulation mithilfe eines funktionalen Zell-Kultur-Assays wurden in den oben beschriebenen Untersuchungen zwei virale Epitope mit ihren Sequenzvarianten als HLA-B*27:05-restringierte Epitope identifiziert. Daher konnte im Anschluss der Zell-Kultur-Assay durchgeführt werden, der im Folgenden erläutert wird (**Abb. 2.7**).



Abb. 2.7: Schematische Darstellung des Zellkultur-basierten NK-Zell-Assays.

Bei diesem Assay werden KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen mit den Peptid-beladenen Zielzellen T2 HLA-B*27:05 stimuliert und deren Aktivität mittels des Degranulationsmarkers CD107a durchflusszytometrisch bestimmt. **A** Schematische Darstellung der NK-Zell-Stimulation mit T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne exogene Peptid-Zugabe. Hierbei können die Zielzellen das HLA-Molekül nicht auf der Zelloberfläche stabilisieren und stimulieren

gleichermaßen KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen. **B** Schematische Darstellung der NK-Zell-Stimulation mit T2 HLA-B*27:05 Zellen nach exogener Peptid-Zugabe. Hierbei wird HLA-B*27:05 auf der Zelloberfläche der Zielzellen stabilisiert und beeinflusst so die NK-Zellaktivität der KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen in unterschiedlicher Weise. Die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen wird durch den inhibitorischen Rezeptor KIR3DL1 abgeschwächt, wohingegen sich die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁻-NK-Zellen unverändert bleibt. **C** Gating-Strategie zur Ermittlung der aktivierten (CD107a⁺-) KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen.

Die Darstellung zeigt zum einen schematisch den Aufbau des funktionellen Zellkultur-Assays (Abb. 2.7 A + B) und zum anderen die Gating-Strategie bezüglich der Analyse der Degranulation von KIR3DL1positiven und -negativen NK-Zellen (Abb. 2.7 C). Die T2 HLA-B*27:05 Zellen fungieren als Zielzellen für die Stimulation von NK-Zellen. Das Besondere an diesen T2 Zellen ist, dass diese HLA-defizitär sind, wodurch sich diese Zellen gut als Zielzellen eignen, um NK-Zellen über den *"Missing self"* Mechanismus zu aktivieren. Ein weiterer Vorteil dieser Zellen ist deren TAP-Defizienz. Nu nach exogener Hinzugabe von HLA-B*27:05-restringierten Peptiden werden über einen TAP-unabhängigen Weg die stabil transduzierten HLA-B*27:05 Moleküle beladen und dieser HLA/Peptid-Komplex auf der Oberfläche präsentiert. Auf diese Weise soll sichergestellt werden, dass keine Zell-eigenen Peptide als Stabilisator des HLA-B*27:05-Moleküls dienen könnten. Wird also kein Peptid zu den Zellen gegeben (Abb. 2.7 A), können die HLA-Moleküle nicht auf der Zelloberfläche präsentiert werden und somit nicht mit seinem Interaktionspartner KIR3DL1 interagieren. Durch das Fehlen von HLA-Molekülen (*"Missing self"*) auf ihren Zielzellen zeigen die NK-Zellen eine hohe Aktivität in Form von der Ausschüttung zytotoxischer Granula. Diese Degranulation kann mittels Oberflächenfärbung des Degranulationsmarkers CD107a gemessen werden.

Durch das Hinzugeben exogener HLA-B*27:05-restringierter Peptide zu den T2 Zellen (Abb. 2.7 B) wird der HLA/Peptid-Komplex stabil auf der Oberfläche der Zielzellen exprimiert und kann mit KIR3DL1 interagieren. Durch diese Interaktion werden die NK-Zellen weniger stark aktiviert als NK-Zellen ohne KIR3DL1, da KIR3DL1 ein inhibierender NK-Zell-Rezeptor ist, der über sein ITIM hemmende Signale an die NK-Zelle sendet. Die Inhibition äußert sich in geringeren Mengen zytotoxischer Granula. Im Vergleich dazu werden NK-Zellen ohne KIR3DL1 genauso stark aktiviert, wie die NK-Zellen, die über den "*Missing self"*-Mechanismus stimuliert werden.

Die Auswertung der degranulierten NK-Zellen erfolgt mithilfe der Durchflusszytometrie (**Abb. 2.7 C**). Dafür werden die im Assay eingesetzten Effektorzellen (PBMCs) mit Antikörpern angefärbt und mithilfe des Durchlusszytometers analysiert. Die gemessenen Zellen (Lymphozyten) werden nach Ausschluss von Dupplets (Einzelzellen) auf ihre Vitalität geprüft. Von den lebenden Zellen werden dann durch das Aussortieren von CD3-, CD14- und CD19-exprimierenden Zellen die T-Zellen, Monozyten und B-Zellen ausgeschlossen. Anschließend folgt die Darstellung der NK-Zellen mithilfe der NK-Zell-Marker CD16

(x-Achse) und CD56 (y-Achse), die dann durch die Färbung des Rezeptors KIR3DL1 in KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen eingeteilt werden können. Zum Schluss wird die Anzahl an degranulierten KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen durch den Degranulationsmarker CD107a quantifiziert.

Damit dieser Assay jedoch im Bezug auf den Einfluss der Peptide auf den Inhibitionseffekt von KIR3DL1 auf die NK-Zelle aussagekräftig sein konnte, waren geeignete Peptide als Positiv- und Negativkontrolle notwendig. Positivkontrolle hieß in diesem Fall, dass das gebundene Peptid eine starke hemmende Wirkung über KIR3DL1 auf die NK-Zelle verursachte. Die Negativkontrolle sollte trotz Binden an HLA-B*27:05 und Interaktion mit KIR3DL1 keinen inhibierenden Effekt auf die NK-Zelle auslösen. Als Positivkontrolle wurde das immundominante HLA-B*27:05-restringierte Influenza A Virus FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ Epitop und als Negativkontrolle das immundominante HLA-B*27:05-restringierte Eppstein Barr Virus EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ Epitop verwendet. Eine Studie von Stewart-Jones *et al* hat gezeigt, dass diese Peptide über die genannten Eigenschaften verfügten (Stewart-Jones et al., 2005).

2.3.1 Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptidvarianten

Bevor der Assay wie oben beschrieben durchgeführt werden konnte, musste zunächst überprüft werden, ob alle HLA-B*27:05-restringierten Peptide (HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉, HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂, deren Sequenzvarianten und die als Kontrollen fungierenden EBV und FLU Epitope) an HLA-B*27:05 der T2 Zellen gebunden und diese HLA/Peptid-Komplexe exprimiert werden. Dazu wurde die Fähigkeit der einzelnen Peptide zur Stabilisierung von HLA-B*27:05 ermittelt, indem unterschiedliche Peptidkonzentrationen zu den T2 HLA-B*27:05 Zellen gegeben und diese für 24 Stunden bei 26°C inkubiert wurden. Anschließend wurde der HLA-B*27:05/Peptid-Komplex auf der Oberffläche der Zellen mit Hilfe eines HLA-B*27-Antikörpers gefärbt und die Expression durchflusszytometrisch ermittelt (**Abb. 2.8**). Als Negativkontrolle für die Untersuchung der HLA-B*27:05-Stabilisierung wurde ein Peptid verwendet, welches bekanntlich kein HLA-B*27:05-restringiertes Peptid war.





Die Bindungskurven der HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop Varianten sind in dunkelrot, die des nicht HLA-B*27:05-bindenden Peptids ist in schwarz, die des EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ Peptids ist in pink und die des FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ Peptids ist in blau dargestellt; Konz. = Konzentration.

Die Stabilisierungsfähigkeit der einzelnen HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Sequenzvarianten wurde in einer Grafik veranschaulicht, indem die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI = *mean fluorescence intensity*) von HLA-B*27:05 normalisiert auf die gemessene MFI bei Zellen ohne Peptid (*"no peptide"*) auf der y-Achse gegenüber der Peptidkonzentration in μ M aufgetragen wurde. Jede Sequenzvariante (dunkelrot) wurde für Vergleichszwecke mit EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ (pink), FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ (blau) und dem nicht-bindenden Peptid (schwarz) in einer Abbildung dargestellt. Das FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ Peptid, das bekanntermaßen einen starken Inhibitionseffekt auf KIR3DL1-positive NK-Zellen hat, zeigte in der Untersuchung der Stabilisierung von HLA-B*27:05 das schwächste Signal, denn bei einer Peptidkonzentration von 10¹ μ M war kaum eine Erhöhung der HLA-B*27:05-MFI erkennbar. Bei einer Konzentration von 10² μ M konnte auch nur eine geringe Steigerung der MFI um das eineinhalbfache gemessen werden. Das EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ Peptid ermöglichte ähnlich wie das FLU Peptid nur eine geringe Erhöhung der HLA-B*27:05-MFI bei 10¹ μ M Peptid und diese steigerte sich die nach Zugabe

von $10^2 \,\mu$ M Peptid auch nur um das Zweifache. Die Zugabe des nicht-bindenden Peptids führte erwartungsgemäß zu keiner Verstärkung der MFI von HLA B*27:05.

Anders verhielt es sich bei der Untersuchung der Stabilisierungsfähigkeit der HCV Peptide. Die Peptide 506 und 870 zeigten bei einer Peptidkonzentration von $10^1 \mu$ M eine Steigerung der mittleren Fluoreszenzitensität von HLA-B*27:05 ähnlich wie bei dem FLU und EBV Peptiden um das eineinhalbfache. Bei einer Verzehnfachung der Peptidkonzentration stieg die MFI auch um das Zehnfache bei Peptid 870 und um das Neunfache bei Peptid 506. Die Peptide 497 und 872 zeigten bereits bei einer Peptidkonzentration von $10^1 \mu$ M den stärksten Anstieg der mittleren Fluoreszenzitensität von HLA-B*27:05 um das etwa Sechsfache und wurde bei Peptid 497 bei der höheren Peptidkonzentration nicht mehr gesteigert. Bei Peptid 872 hingegen war bei der höhreren Peptidkonzentration noch ein geringer Anstieg auf das Zehnfache zu vermerken. Die Peptide 824 und 871 wiesen sowohl bei $10^1 \mu$ M eine Steigerung um das Sechsfache als auch bei der zehnmal höheren Peptidkonzentration einen Anstieg der mittleren Fluoreszenzitensität um das 30-fache (Peptid 824) bzw. um das 20-fache (Peptid 871) auf.



Abb. 2.9: Stabilsierung von HLA-B*27:05 durch die HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten gemessen an der Veränderung der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur MFI der HLA-B*27:05-Oberflächenexpression bei Zellen ohne Peptid in Abhängigkeit der Peptidkonzentration 10¹ μM und 10² μM.

Die Bindungskurven der HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten sind in dunkelgrün, die Bindungskurven des nicht HLA-B*27:05-bindenen Peptids ist in schwarz, die des EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ Peptids ist in pink und die des FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ Peptids ist in blau dargestellt; Konz. = Konzentration.

Bei der Darstellung der Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptide (**Abb. 2.9**) wurden zu Vergleichszwecken auch hier die Kurven von EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ in pink, von FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ in blau und vom nicht-bindenden Peptid in schwarz hinzugefügt. Die HBV Peptide wurden hier in grün dargestellt. Alle HBV Peptide wiesen ähnliche Anstiegslevel der mittleren Fluoreszenzitensität von HLA-B*27:05 bei den untersuchten Peptidkonzentrationen auf. Diese liegen bis auf das Prototyp-

Peptid 830 zwischen der Bindungskurve des FLU und EBV Peptids und erreichen eine maximale Steigerung der HLA-B*27:05-MFI um das Zweifache bei einer Peptidkonzentration von $10^2 \,\mu$ M. Ausschließlich Peptid 830 konnte bei der höchsten Peptidkonzentration eine Steigerung um das etwa Dreifache erzielen.

Im Vergleich zu den HCV Peptiden fiel auf, dass diese um ein Vielfaches weniger stark an HLA-B*27:05 zu binden schienen, da die maximale Steigerung der mittleren Fluoreszenzitensität von HLA-B*27:05 um das Dreifache durch die Bindung des HBV Prototyp-Peptids (830) erzielt wurde. Alle Peptid-Varianten außer 833 zeigten eine Erhöhung der MFI um das zweifache, Peptid 833 sogar nur eine eineinhalbfache Erhöhung der MFI. Zudem fiel auf, dass die Prototyp-Sequenz des HCV-Peptids im Gegensatz zum HBV-Prototyp den geringsten Anstieg der mittleren Fluoreszenzitensität von HLA-B*27:05 verursachte. Aus diesen Ergebnissen ließ sich lediglich der Schluss ziehen, dass alle getesten HCV und HBV Peptide HLA-B*27:05 auf der Zelloberfläche stabilisieren. Wie zu erwarten ist allerdings die spezifische Aminosäure-Sequenz für die Stärke der Bindung an sein HLA-Molekül ausschlaggebend.

Zum Schluss sollte die Reproduzierbarkeit der Ergbnisse zur Stabilisierungsfähigkeit der getesteten Peptide untersucht werden, da für die funktionalen NK-Zell-Assays eine Peptidkonzentration von 100 μM eingesetzt werden soll, und diese mit einer reproduzierbaren HLA-Stabilisierung einhergehen muss. Dafür wurde stellvertretend für alle Peptidvarianten die HLA-B*27:05-Stabilisierung von EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ in drei unabhängigen Experimenten bestimmt (**Abb. 2.10**).



Abb. 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10¹ μM und 10² μM.

Die linke Abbildung zeigt die drei Bindungskurven von EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, die mittlere Abbildung zeigt die drei Bindungskurven von FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und die rechte Abbildung zeigt die drei Bindungskurven von HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂; Konz. = Konzentration.

In dieser Abbildung ist die Stabilisierung von HLA-B*27:05 auf der Zelloberfläche in Form der absoluten MFI von HLA-B*27:05 (y-Achse) in Abhängigkeit der Peptidkonzentration in $10^{\times} \mu$ M (x-Achse) grafisch dargestellt. Pro Peptid sind drei unabhängige Experimente mit den Peptidkonzentrationen 0 μ M, $10^{1} \mu$ M und $10^{2} \mu$ M durchgeführt und die entstandenen Kurven nebeneinander aufgetragen worden. Bei einem Vergleich der Kurven der Peptide FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ konnte festgestellt werden, dass deren Verläufe fast identisch waren. Ausschließlich beim Peptid EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ wurde bei einem Experiment bei einer Konzentration von $10^{2} \mu$ M ein Ausreißer festgestellt. Da aber die beiden anderen Kurven und der Verlauf der Ausreißerkurve von 0 μ M zu $10^{1} \mu$ M fast kongruent waren, konnte zusammenfassend gesagt werden, dass die Ergebnisse der Stabilisierungsstudie zu den Peptiden reproduzierbar war und somit die Peptidkonzentration von $10^{2} \mu$ M für die funktionalen NK-Zell-Assays eingesetzt werden konnte.

2.3.2 Funktionaler Assay mit HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptidvarianten

Nach Identifizierung der viralen HLA-B*27:05-restringierten Epitope und Sequenzvarianten von HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ (Abschnitt 2.1 + 2.2) und der Bestätigung der Stabilsierungsfähigkeit von HLA-B*27:05 (Abschnitt 2.3.1) konnten die funktionalen Zell-Kultur-Assays mit diesen Peptiden durchgeführt werden. Trotzdem galt es zu Beginn zu kontrollieren, ob die gewählten Kontrollen EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ (Negativkontrolle) und FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ (Positivkontrolle), dessen Stabilisierungsfähigkeit auch bereits bestätigt wurden, im funktionalen Assay die erwarteten Degranulationseffekte zeigen.

Dafür wurden im ersten funktionalen Assay die T2 HLA-B*27:05 Zellen (**Abb. 2.11**), die entweder mit dem EBV oder dem FLU Peptid beladen wurden, als Zielzellen für die Stimulation von NK-Zellen eingesetzt und als zusätzliche Kontrolle T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne Peptid und Überstände mit den Kontrollpeptiden bzw. ohne Peptid zur Stimulation der NK-Zellen verwendet (**Abb. 2.11 A**). Zudem wurden die T2 HLA-B*27:05 Zellen mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen der Kontrollpeptide beladen und diese dann in dem Assay eingesetzt, um zu überprüfen, ob es einen Peptidkonzentrationsabhängigen Effekt gibt (**Abb. 2.11 B**).



Abb. 2.11: Nachweis der Funktionalität des Zellkultur-basierten NK-Zell-Assays durch Ermittlung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen durch unterschiedliche Stimuli.

A Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität als prozentualer Anteil der degranulierten (CD107a+) KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit Zellkulturmedium (weiß), mit dem ungebundenen Peptid FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ (hellgrau), mit dem ungebundenen Peptid EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ (schwarz), mit T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne gebundenen Peptid (dunkelgrau), mit FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ gebunden an HLA-B*27:05 (dunkelblau) und mit EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ gebunden an HLA-B*27:05 (pink). **B** Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁻ NK-Zellen (links) und KIR3DL1⁺-NK-Zellen (rechts) nach Stimulation mit FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ gebunden an HLA-B*27:05 (dunkelblau) und mit EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ gebunden an HLA-B*27:05 (pink) normalisiert auf die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne Peptid in Abhängigkeit der Peptidkonzentration in μM.

Die grafische Darstellung zeigt die Aktivierung von KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen nach unterschiedlichen Stimuli als prozentualer Anteil der degranulierten NK-Zellen, der durch die Expression des Degranulationsmarkers CD107a bestimmt wurde. Das in **Abb. 2.11 A** dargestellte Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der degranulierten KIR3DL1⁺-NK-Zellen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Stimuli. Die ersten drei Balken geben die Aktivierung der KIR3DL1exprimierenden NK-Zellen wieder, die ausschließlich mit Medium stimuliert wurden, das entweder kein Peptid oder 128 µM des jeweiligen Kontrollpeptids enthielt. Es ist zu erkennen, dass bei keinem der drei genannten Ansätze NK-Zellen aktiviert wurden. Dies ließ den Schluss zu, dass nicht an HLA-B*27:05 gebundene Peptide keinen Einfluss auf KIR3DL1 haben.

Der vierte Ansatz (grauer Balken) zeigt die Aktivierungsfähigkeit von T2 HLA*B27:05 Zellen auf KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen. Hier waren etwa 40 % der NK-Zellen positiv für den Degranulationsmarker CD107a. Dieses hohe Maß an Degranulation war zu erwarten, da aus dem

"Missing self"-Mechanismus eine starke Aktivierung von NK-Zellen resultiert. Beim Einsatz von T2 HLA*B27:05 Zellen, die mit dem FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ Peptid beladen wurden (blauer Balken), konnte eine Reduktion der NK-Zell-Aktivierung um mehr als die Hälfte auf 15 % degranulierter NK-Zellen gemessen werden. Nach Stimulation mit dem EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ Peptid, das an T2 HLA*B27:05 Zellen gebunden war (pinker Balken), konnte kein Inhibitionseffekt nachgewiesen werden. Es waren genauso viele NK-Zellen degranuliert wie nach Stimulation mit T2 HLA*B27:05 Zellen ohne gebundenes Peptid. Somit konnte gezeigt werden, dass die gewählten Kontrollen die erwarteten Effekte zeigten.

Die Untersuchung des Konzentrations-abhängigen Inhibitionseffekt auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen wurde in **Abb. 2.11 B** grafisch dargestellt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen zwischen 2 µM und 128 µM, wobei diese von 2 µM beginnend in zweier Logstufen bis 128 µM erhöht wurde. Neben der Untersuchung der Degranulationslevel von KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen wurden zur Kontrolle auch die Degranulationsslevel von NK-Zellen gemessen, die kein KIR3DL1 exprimieren. Die Häufigkeit von degranulierten NK-Zellen, die mit den Peptid-gebundenen T2 HLA*B27:05 Zellen stimuliert wurden, wurde auf die Häufigkeit von aktivierten NK-Zellen, die mit T2 HLA*B27:05 Zellen ohne gebundenes Peptid stimuliert wurden, normalisiert. Die Zahl 1 drückt aus, dass es keine Unterschiede in der Stärke der NK-Zell-Aktivierung zwischen den verschiedenen Stimuli gab. 0,5 beispielsweise bedeutet, dass die Häufigkeit von CD107a+ NK-Zellen nach Stimulation mit T2 HLA*B27:05 Zellen + Peptid im Vergleich zur Stimulation mit T2 HLA*B27:05 Zellen ohne Peptid um 50% reduziert war. Dies bedeutet: Je geringer der Wert, desto stärker der Inhibitionseffekt.

Bei den NK-Zellen, die kein KIR3DL1 exprimieren, konnte bei allen Konzentrationen sowohl nach Stimulation mit T2 HLA*B27:05 Zellen mit dem FLU Peptid (blaue Punkte) als auch mit dem EBV Peptid (pinke Punkte) kein starker Unterschied zur Stimulation mit T2 HLA*B27:05 Zellen ohne Peptid ermittelt werden. Die Werte lagen hier zwischen 0,8 und 1,0. Zudem gab es auch keine Unterschiede zwischen der Aktivierungsstärke durch T2 HLA*B27:05 Zellen mit dem EBV Peptid und mit dem FLU Peptid, was daran zu erkennen ist, dass die Verlaufskurven beider Ansätze nahezu identisch waren.

Bei der Untersuchung der Degranulationslevel von KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen war ein eindeutiger Unterschied zwischen beiden Ansätzen erkennbar. Während auch hier der Einsatz von T2 HLA*B27:05 Zellen mit EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ unabhängig von der eingesetzten Peptidkonzentration zu keiner Inhibition von KIR3DL1⁺-NK-Zellen führte, konnte nach Stimulation mit T2 HLA*B27:05 Zellen mit FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ ein Konzentrations-abhängiger Inhibitionseffekt ermittelt werden. Bei einer Peptidkonzentration von 2 µM war nur ein geringer Inhibitionseffekt um 0,15 zu messen. Allerdings sank mit Zunahme der Peptidkonzentration die Inhibition der NK-Zellen kontinuierlich, sodass beim Einsatz von T2 HLA*B27:05 Zellen, die mit den höchsten Konzentrationen (64 µM bzw. 128 µM) des NP₃₈₃₋₃₉₁ Peptids beladen wurden, eine maximale Reduktion auf einen Wert von 0,4 erreicht wurde. Da

eine Stagnation des Inhibitionseffekts zwischen 64 μ M und 128 μ M zu erkennen ist, und weil die HLA-Stabilsierung (Abschnitt 2.3.1) bei 100 μ M durchgeführt wurde, wurden die folgenden funktionalen Assays mit den HLA-B*27:05-restringierten HCV und HBV Peptiden mit einer Peptidkonzentration von 100 μ M durchgeführt.

Nachdem in dem vorherigen funktionalen Assay gezeigt werden konnte, dass erwartungsgemäß Inhibitionseffekte ausschließlich auf KIR3DL1-positive NK-Zellen gemessen wurden und die Peptide EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ und FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ als Kontrollpeptide funktionieren, konnten nun die HLA-B*27:05restringierten HCV und HBV Peptide und deren Sequenzvarianten hinsichtlich ihrer Inhibitionsstärke auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen untersucht werden. Dafür wurden in mehreren unabhängigen Experimenten gemäß des in Abschnitt 2.3 beschriebenen Assays zur Untersuchung der HCV Peptide NK-Zellen von insgesamt 46 Probanden (siehe Abschnitt 4.2.2.4.1) und zur Untersuchung der HBV Peptide NK-Zellen von insgesamt 36 Probanden (siehe Abschnitt 4.2.2.4.2) analysiert (**Abb. 2.12**).



KIR3DL1+-NK-Zellen normalisiert auf "no peptide" 1.5 ns CD107a⁺ NK-Zellen, 1.0 0.5 0.0 n = 45 ARMILMTHF V----LP----LP-----V----д-----EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ NP₃₈₃₋₃₉₁ no peptide FLU 497 506 824 870 872 871



Abb. 2.12: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁻- und KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ bzw. HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten gebunden an HLA-B*27:05.

Die NK-Zell-Aktivität gemessen als prozentualer Anteil von CD107a⁺-NK-Zellen wurde normalisiert auf die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne Peptid. Zu Vergleichszwecken wurde auch die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit den Kontrollpeptiden (pink und dunkelblau) dargestellt. **A** Abgebildet ist die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁻-NK-Zellen (links) und von KIR3DL1⁺-NK-Zellen (rechts) von insgesamt 45 gesunden Probanden nach Stimulation mit den HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptid Varianten (dunkelrot). **B** Abgebildet ist die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁻-NK-Zellen (links) und von KIR3DL1⁺-NK-Zellen (rechts) von insgesamt 39 gesunden Probanden nach Stimulation mit den HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid Varianten (dunkelgrün). Statistische Signifikanzen wurden mittels One-way ANOVA bestimmt (ns > 0,05, *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001).

Die dargestellte Abbildung stellt die Inhibitionsstärke jedes einzelnen HCV Peptids (**Abb. 2.12 A**) und HBV Peptids (**Abb. 2.12 B**) auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen (rechts in der Abbildung) im Vergleich zu KIR3DL1⁻-NK-Zellen (links) dar. Hierbei wurden die gemessenen Häufigkeiten der CD107a-positiven NK-Zellen auf die Werte des Ansatzes, in dem kein Peptid eingesetzt wurde, normalisiert. Die berechnete Signifikanz bezieht sich immer auf den Ansatz ohne Peptid ("no peptide").

Wird die Inhibitionsstärke der HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Peptid-Varianten auf KIR3DL1-negative NK-Zellen (**Abb. 2.12 A** links) betrachtet, konnte kein Inhibitionseffekt der HCV Peptide nachgewiesen werden, da alle Werte mit Ausnahme des Peptids 872 bei ungefähr 1 lagen. Bei Peptid 872 zeigte die Untersuchung eine signifikant höhere Aktivierung von KIR3DL1-negativen NK-Zellen, was in Anbetracht der Tatsache, dass diese NK-Zellen normalerweise keinen Interaktionspartner für den HLA-B*27:05/Peptid-Komplex besitzt, nicht erklärt werden kann.

Die Untersuchung der Inhibitionseffekte der HCV Peptide auf KIR3DL1-positive NK-Zellen zeigte, dass wie zu erwarten das EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ Peptid keinen (Wert \approx 1) und das FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ einen starken

Inhibitionseffekt mit einem Wert von 0,5 aufwies. Dieser Inhibitionseffekt war auch gleichzeitig der stärkste gemessene Effekt in dieser Untersuchung. Das Prototyp-Peptid 497 – ARMILMTHF wies einen signifikanten Inhibitionseffekt mit einem Wert von 0,8 auf. Alle Sequenzvarianten, die an Position 7 anstelle des Threonins (T) ein Prolin (P) besitzen (Peptide 506, 824, 870, 871), zeigten allerdings einen noch stärkeren Inhibitionseffekt mit Werten von bis zu 0,65. Ausschließlich Peptid 872, das nur eine Substitution an Position 6 von einem Methionin (M) zu Leucin (L) besitzt, wies einen geringen, aber noch signifikanten Inhibitionseffekt von 0,85 auf. Beim Vergleich der Peptide 506 und 824, die sich in einer Substitution an Position 4 unterschieden, fiel auf, dass dieser Unterschied keinen Einfluss auf die Inhibitionsfähigkeit des Peptids hat, da beide Peptide eine gleich hohe Inhibitionsstärke (0,7) aufwiesen. Auch die Inhibitionseffekte der Peptide 870 und 871, die sich untereinander an Position 1 unterschieden und gleichzeitig im Gegensatz zu den Peptiden 506 und 824 über eine zusätzliche Substitution an Position 6 von Methionin (M) zu Leucin (L) verfügten, waren ebenfalls kongruent mit einer Inhibitionsstärke von 0,65, also 0,05 stärker als bei den Peptiden 506 und 824. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass hier die Prolin-Substitution an Position 7 die Inhibition von NK-Zellen verstärkte und die Substitution an Position 6 sogar eine Verstärkung des Inhibitionseffekts bedingte. Es stellte sich die Frage, ob der Inhibitionseffekt bei den Peptiden mit der Doppelmutation (870 und 871) durch eine Addition der Inhibitionseffekte der Einzelmutation an Position 6 bzw. 7 entstand. Wurden die Inhibtionseffekte vom Peptid mit der Einzelmutation an Position 6 (872) mit einer Inhibitionsstärke von 0,15 und dem Peptid mit der Einzelmutation an Position 7 (506) mit einer Inhibitionsstärke von 0,30 aufsummiert, ergab dies einen Wert von 0,45. Dies bedeutete, dass der Theorie folgend die Inhibitionsstärke der Peptide 870 und 871 mit den Doppelmutationen bei 0,55 liegen müssten. Da die Inhibitionsstärke von Peptid 870 und 871 aber bei 0,35 lagen, konnte die Theorie nicht bestätigt werden. Die Inhibitionsstärke der Doppelmutante war nur minimal stärker als die der Einzelmutante.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das Peptid HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₈₄₉ eine Hemmung von KIR3DL1⁺-NK-Zellen verstärkt. Insbesondere der Aminosäureaustausch an Position 7 von einem Threonin (T) zu einem Prolin (P) führte zu einer weiteren Verstärkung der NK-Zellinhibition.

Bei den HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid-Varianten (Abb. 2.12 B) zeigte die Untersuchung auf KIR3DL1⁻-NK-Zellen keinerlei Einfluss, da alle NK-Zellen genauso stark aktiviert wurden wie nach Stimulation mit T2 Zellen ohne HLA/Peptid-Komplex. Beim Betrachten der Ergebnisse bezüglich der Inhibitionseffekte der HBV-Peptid-Varianten auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen konnte ermittelt werden, dass die Kontrollpeptide die erwarteten Ergebnisse zeigten. Das Prototyp-Peptid 830 – ARFYPNVTK zeigte von allen untersuchten Peptid-Varianten den stärksten Inhibitionseffekt mit einem Wert von 0,75. Die Peptid-Varianten besaßen nur schwache Inhibitionseffekte, wobei die Variante mit der Einzelmutation

an Position 7 die stärkste Inhibition mit einem Wert von 0,8 zeigte, also fast genauso stark wie die Prototyp-Sequenz. Die Variante 831 mit einem Einzelaustausch an Position 6 von einem Asparagin (N) zu einem Lysin (K) zeigte zwar die zweitstärkste Inhibition unter den Varianten mit einer Inhibitionsstärke zwischen 0,85 und 0,80, allerdings haben die Varianten, die an Position 6 (N \rightarrow K) und an Position 7 (A: Peptid 834 oder G: 835) eine Substitution aufweisen, einen ähnlichen Inhibitionseffekt wie Peptid 831 mit der Einzelmutation an Position 6. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Mutation an Position 6 zu einem Lysin (K) den Inhibitionseffekt schwächt, und nicht wie zuvor bei der Untersuchung der HCV Peptid-Varianten eine Substitution an Position 6 die Inhibition verstärkt. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass beim Peptid 836, welches zwei Lysine an Position 6 und 7 des Peptids besitzt, der Inhibitionseffekt vollständig aufgehoben wird (0,90 - 095). Auch eine Substitution an Position 4 scheint einen nachteiligen Einfluss auf die Inhibition von KIR3DL1positiven NK-Zellen zu haben, da im Vergleich zu Peptid 833 mit dem stärksten Inhibitionseffekt unter den Varianten der Inhibitionseffekt von Peptid 832, welches im Vergleich zu Peptid 833 eine zusätzliche Mutation an Position 4 von einem Tyrosin (Y) zu einem Phenylalanin (F) aufweist, abgeschwächt wurde. Trotzdem war dieser Effekt immer noch signifikant, so wie auch die Inhibitionseffekte aller Peptide außer der von Peptid 836.

In den folgenden Übersichtstabellen sind die Ergebnisse bezüglich aller durchgeführten Experimente zu den HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ (**Tab. 2.3**) und HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ (**Tab. 2.4**) Peptid-Varianten aufgelistet. Zusätzlich werden auch die Substitutionen und die daraus resultierenden Aminosäure-Eigenschaften aufgezeigt, um mögliche Zusammenhänge zwischen der Inhibitionsstärke und der Aminosäure feststellen zu können.

Tab. 2.3: Übersicht über die ermittelten Ergebnisse bezüglich der Aminosäure-Eigenschaften der substituierten Aminosäuren in den HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid-Varianten, sowie deren Stabilsierungsfähigkeit von HLA-B*27:05, Stärke der T-Zell-Antworten und Inhibitionsstärken gegenüber KIR3DL1⁺-NK-Zellen

Peptid- Nr.	Sequenz- Variante	Substitution	Aminosäure Eigenschaft	T-Zell- Antwort	Stabilsierung von HLA- B*27:05 bei 10² μm [MFI; norm. auf no peptide]	KIR3DL1- pos. NK- Zell- Inhibition [norm. auf no peptide]
830	ARFYPNVTK	/	/	ја	3	0,75
836	KK	Asparagin (N)	polar/neutral	nein	2	0,95 ≤ x ≤
		zu Lysin (K)	zu basisch			0,90

Peptid- Nr.	Sequenz- Variante	Substitution	Aminosäure Eigenschaft	T-Zell- Antwort	Stabilsierung von HLA- B*27:05 bei 10² μm [MFI; norm. auf no peptide]	KIR3DL1- pos. NK- Zell- Inhibition [norm. auf no peptide]
		Valin (V) zu	unpolar/			
		Lysin (K)	70			
			basisch			
832	FA	Tryptophan (T) zu Phenylalanin (F)	beide unpolar/ hydrophob	ja	2	0,85
		Alanin (A)	unpolar/ hydrophob			
834	KA	Asparagin (N) zu Lysin (K) Valin (V) zu Alanin (A)	polar/neutral zu basisch beide unpolar/ hydrophob	nein	2	0,85
835	KG	Asparagin (N) zu Lysin (K) Valin (V) zu Glycin (G)	polar/neutral zu basisch unpolar/ hydrophob zu polar/neutral	nein	2	0,85
831	K	Asparagin (N) zu Lysin (K)	polar/neutral zu basisch	ја	2	0,85 ≤ x ≤ 0,80
833	A	Valin (V) zu Alanin (A)	beide unpolar/ hydrophob	ja	1,5	0,80

Das HBV-Prototyp-Peptid (Peptid 830) zeigte eine Immunantwort gegenüber T-Zellen. Gegenüber KIR3DL1⁺-NK-Zellen konnte eine signifikante Inhibition (0,75) ermittelt werden. Zwei der sechs getesteten Peptid-Varianten (Peptide 831 und 833) zeigten ähnliche Auswirkungen auf KIR3DL1-positive NK-Zellen.

Das Peptid 831 zeigte eine Substitution an Position 6 von einem Asparagin (N) zu einem Lysin (K), was mit einer Veränderung der Aminosäure-Eigenschaften von polar/neutral zu basisch einherging. Es scheint, als haben sich dadurch sowohl die Stabilisierung als auch die Inhibitionsfähigkeit ein wenig verschlechtert.

Das Peptid 833 hat eine Substitution an Position 7 von einem Valin (V) zu einem Alanin (A), die die gleichen Aminosäure-Eigenschaften besitzen. Trotzdem beeinflusste diese Änderung die Stabilisierungsfähigkeit des Peptids dahingehend, dass dieses nur noch halb so gut an HLA-B*27:05 gebunden hat als das Prototyp-Peptid. Zugleich war auch die Inhibitionsfähigkeit gegenüber KIR3DL1-positiven NK-Zellen minimal schwächer.

Das letzte Peptid (Peptid 832), welches auch eine T-Zell-Antwort auslöste, zeigte zwei Substitutionen, die eine an Position 4 von einem Tryptophan (T) zu einem Phenylalanin (F) und an Position 7 von einem Valin (V) zu einem Alanin (A). Beide Substitutionen resultierten in keiner Änderung der Aminosäure-Eigenschaften, weshalb eigentlich hätte vermutet werden können, dass diese "stillen" Substitutionen keinerlei Einfluss auf die Inhibitionsfähigkeit hätte. Allerdings zeigten die Experimente, dass dieses Peptid nur halb so stark KIR3DL1⁺-NK-Zellen inhibieren kann wie der Prototyp.

Die anderen drei Peptide, die keine T-Zell-Antwort hervorriefen, hatten alle eine Doppel-Mutation an Position 6 mit dem Austausch von einem Asparagin (N) zu einem Lysin (K) und Position 7 mit einem Austausch zu entweder Alanin (A, Peptid 834), Glycin (G, Peptid 835) oder Lysin (K, Peptid 836), wobei einmal die Aminosäure-Eigenschaft beibehalten wurde (Peptid 834) und zwei Mal andere Aminosäure-Eigenschaften resultierten (Peptid 835 und 836). Das Peptid 836, das Lysin (K) an den Positionen 6 und 7 hat, verlor seine Inhibitionsfähigkeit gegenüber den KIR3DL1⁺-NK-Zellen, entging aber dafür einer T-Zell-Antwort. Die Peptide 834 und 835 wiesen durchschnittliche Inhibitionsstärken von 15 % auf, also 10 % schwächer als die des Prototyps.

Bei den HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptid-Varianten konnte ein anderes Bild beobachtet werden. Das Prototyp-Peptid zeigte eine T-Zell-Antwort und eine gute Inhibitionsfähigkeit gegenüber KIR3DL1⁺-NK-Zellen mit einer Inhibitionsstärke von 20 %. Die Peptid-Variante, die an Position 6 ein Leucin (L) anstelle des prototypischen Methionins (M) aufwies (Peptid 872), zeigte auch T-Zell-Antworten. Allerdings ist die Inhibitionsstärke im Vergleich zum Prototypen mit 0,85 ein wenig abgeschwächt. Alle anderen Peptide, bei denen an siebter Position ein Prolin (P) anstelle des

Threonins (T) ist und die teilweise zusätzliche Substitutionen trugen, zeigten keine T-Zell-Antwort mehr und verfügten obendrein über eine stärkere Inhibitionsfähigkeit mit Werten bis zu 0,65 (**Tab. 2.4**).

Tab. 2.4: Übersicht über die ermittelten Ergebnisse bezüglich der Aminosäure-Eigenschaften der substituierten Aminosäuren in den HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptid-Varianten, sowie deren Stabilisierungsfähigkeit von HLA-B*27:05, Stärke der T-Zell-Antworten und Inhibitionsstärken gegenüber KIR3DL1⁺-NK-Zellen

Peptid- Nr.	Sequenz- Variante	Substitution	Aminosäure Eigenschaft	T-Zell- Antwort	Stabilsierung von HLA- B*27:05 bei 10² μm [MFI; norm. auf no peptide]	KIR3DL1- pos. NK- Zell- Inhibition [norm. auf no peptide]
497	ARMILMTHF	/	/	ја	6	0,80 ≤ x ≤
						0,75
872	L	Methionin (M)	beide	ја	10	0,85
		zu Leucin (L)	unpolar/			
			hydrophob			
506	P	Threonin (T)	polar/neutral	nein	10	0,70
		zu Prolin (P)	zu unpolar/			
			hydrophob			
824	VP	Isoleucin (I) zu	beide	nein	30	0,70
		Valin (V)	unpolar/			
			hydrophob			
		Threonin (T)	polar/neutral			
		zu Prolin (P)	zu unpolar/			
			hydrophob			
870	LP	Methionin (M)	beide	nein	15	0,65
		zu Leucin (L)	unpolar/			
			hydrophob	_		
		Threonin (T)	polar/neutral			
		zu Prolin (P)	zu unpolar/			
			hydrophob			
871	VLP	Alanin (A) zu	beide	nein	20	0,65
		Valin (V)	unpolar/			
			hydrophob			

Peptid- Nr.	Sequenz- Variante	Substitution	Aminosäure Eigenschaft	T-Zell- Antwort	Stabilsierung von HLA- B*27:05 bei 10² μm [MFI; norm. auf no peptide]	KIR3DL1- pos. NK- Zell- Inhibition [norm. auf no peptide]
		Methionin (M)	beide			
		zu Leucin (L)	unpolar/			
			hydrophob			
		Threonin (T)	polar/neutral			
		zu Prolin (P)	zu unpolar/			
			hydrophob			

Interessant sind hier vor allem die Peptide 870 und 871, die eine Mutation an Position 6 von Methionin (M) zu Leucin (L) und an Position 7 von Threonin zu Prolin (P) aufzeigen. Sie unterscheiden sich lediglich in der ersten Aminosäure-Position des Peptids, da Peptid 870 das prototypische Alanin (A) besitzt und Peptid 871 an dieser Stelle ein Valin (V). Sie sind also weitestgehend eine Kombination aus dem Peptid 872 und 506. Wird das Peptid 872 mit der Leucin-Substitution an Position 6 betrachtet, konnte eine Abschwächung der Inhibitionsfähigkeit im Vergleich zum Prototyp-Peptid gegenüber KIR3DL1-positiven NK-Zellen ermittelt werden. Bei der einfachen Prolin-Substitution an Position 7 hingegen (Peptid 506), konnte eine Verstärkung der inhibitorischen Effekte im Vergleich zum Prototyp-Peptide 870 und 871 mit den Doppelmutationen zwischen den Inhibitionsstärken der Peptide 872 und 506 liegen müssten. Die Ergebnisse zeigten aber, dass diese zwei Peptide einen noch stärkeren Inhibitionseffekt auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen hatten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die funktionelle Bedeutung von Substitutionen an Position 7 in dem HCV und dem HBV-Epitop unterschiedlich ist. Je nach Peptidsequenz scheint auch die Substitution an Position 6 eine Inhibition begünstigen oder abschwächen zu können. Daher liegt der Schluss nahe, dass die Inhibitionseffekte auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen durch Substitutionen an den Positionen 6 und 7 der Epitope beeinflusst werden, allerdings der Effekt auf die Inhibition (Verstärkung oder Abschwächung) von der substituierten Aminosäure abhängig ist.

2.3.3 NK-Zell-Lizensierung

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die *"NK cell education"* (NK-Zell-Lizensierung) einen Einfluss auf die Inhibitionsstärke der HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptide auf KIR3DL1positive NK-Zellen hat. Dazu sollen beide Komponenten (HLA-Bw4- und KIR3DL1-Moleküle), die für die NK-Zell-Lizensierung verantwortlich sind, bei den Probanden betrachtet werden.

Da die verwendeten Kohorten zur Untersuchung der Inhibitionseffekte der Peptid-Varianten auf KIR3DL1-positive NK-Zellen bereits vollständig HLA-typisiert waren, wurden die Kohorten zunächst bezüglich ihres HLA-Genotyps analysiert. Hierbei wurden die Probanden in den Gruppen "O Bw4, 1 Bw4 oder ≥ 2 Bw4 eingeteilt, da nicht nur das Vorhanden- und Nicht-Vorhandensein eines HLA-Bw4-Moleküls bei der NK-Zell-Lizensierung von Belang ist, sondern auch die Anzahl an unterschiedlichen HLA-Bw4-Allelen. Je mehr unterschiedliche Allele, desto funktionaler die NK-Zelle. Es wurde tabellarisch dargestellt, wie viele Probanden der jeweiligen Kohorte in welche HLA-Bw4-Gruppe eingeteilt wurden (Tab. 2.5).

HLA-Bw4-Gruppe	Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten	Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten
0 HLA-Bw4	13	12
1 HLA-Bw4	16	13
≥ 2 HLA-Bw4	16	13
Probanden gesamt	45	38

Tab. 2.5: Zuordnung der Probanden zur jeweiligen HLA-Bw4-Gruppe

Die tabellarische Darstellung (**Tab. 2.5**) zeigte, dass in beiden Kohorten etwa zwei Drittel der Kohorten Probanden beinhalten, die HLA-Bw4-Allele tragen, wohingegen ein Drittel kein HLA-Bw4 trägt. Zudem ist der Anteil der Probanden, die ein HLA-Bw4-Allel tragen, und der Anteil an Probanden, die 2 oder mehr HLA-Bw4-Allele tragen, zueinander in beiden Kohorten etwa gleich groß.

Bevor die grafische Gegenüberstellung der Inhibitionseffekte der HCV und HBV Peptide auf die Probanden aus unterschiedlichen HLA-Bw4-Gruppen untersucht wurde, sollte zunächst die Funktionalität der KIR3DL1⁺-NK-Zellen aus den unterschiedlichen HLA-Bw4-Gruppen gezeigt werden. Hierfür wurde der prozentuale Anteil an CD107a⁺-NK-Zellen mit und ohne KIR3DL1 nach Stimulation mit HLA-B*27:05 positiven T2-Zellen, die kein Peptid präsentierten, der einzelnen Gruppen gegenübergestellt (**Abb. 2.13**). Jeder Proband, der genetisch ein HLA-Bw4 Protein aufwies, wurde im Diagramm in die Gruppe "1 HLA-Bw4" eingeordnet, wohingegen alle Probanden mit zwei oder mehr HLA-Bw4 Allelen der Kategorie "≥2 HLA-Bw4" im Diagramm zugeteilt wurden. Probanden ohne HLA-Bw4 gehörten zur Gruppe "0 HLA-Bw4".



Abb. 2.13: Vergleich der Funktionalität von KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen im Zusammenhang mit der Anzahl an HLA-Bw4-Allelen.

A Funktionalität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl an HLA-Bw4-Allelen. **B** Funktionalität von KIR3DL1⁻-NK-Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl an HLA-Bw4-Allelen. Statistische Signifikanzen wurden mittels Kruskal-Wallis Test bestimmt (ns > 0,05, *p < 0,05).

Aus der Abbildung zum Vergleich der Funktionalität der KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen in Abhängigkeit der Anzahl an HLA-Bw4-Allelen (**Abb. 2.13**) ging hervor, dass die Anzahl an HLA-Bw4-Allele die Funktionalität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen beeinflusst. Die Funktionalität der NK-Zellen von der Gruppe 1 HLA-Bw4 bzw. \geq 2 HLA-Bw4 war signifikant stärker als die der Gruppe 0 HLA-Bw4. Zudem konnte ein Trend festgestellt werden. Je mehr HLA-Bw4-Allele vorhanden waren, desto stärker war die NK-Zell-Antwort (Vergleich der Gruppe 1 HLA-Bw4 und \geq 2 HLA-Bw4). Bei den KIR3DL1-negativen NK-Zellen konnte auch beobachtet werden, dass NK-Zellen aus den Gruppen 1 HLA-Bw4 und \geq 2 HLA-Bw4 eine höhere Funktionalität aufwiesen als die aus der Gruppe 0 HLA-Bw4. Allerdings war die Funktionalität nicht abhängig von der Anzahl an HLA-Bw4-Allelen, da der Anteil an CD107a⁺-NK-Zellen in der \geq 2 HLA-Bw4 Gruppe tendentiell schwächer war.

Da ein Trend festgestellt wurde, dass die Anzahl an HLA-Bw4-Allelen die Funktionanliät der KIR3DL1⁺-NK-Zellen begünstigt, sollten im Anschluss die Inhibitionseffekte der HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptide auf KIR3DL1-positive NK-Zellen der Probanden, die den drei Gruppen (**Tab. 2.5**) entsprechend eingeteilt wurden, analysiert werden (**Abb. 2.14**).

Die Ergebnisse wurden nebeneinander aufgetragen, um Unterschiede in der Inhibitionsfähigkeit der einzelnen HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptide in Bezug auf NK-Zellen ohne Lizensierung (ohne HLA-Bw4) und mit Lizensierung (mit HLA-Bw4) zu visualisieren. Zudem sollte

untersucht werden, ob NK-Zellen, die durch mehere HLA-Bw4-Allele lizensiert wurden, anders beeinflusst werden als NK-Zellen, die nur durch ein HLA-Bw4-Allel lizensiert wurden.



Abb. 2.14: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ bzw. HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten gebunden an HLA-B*27:05 unterteilt in Probanden mit 0 HLA-Bw4, 1 HLA-Bw4 oder ≥ 2 HLA-Bw4.

Die NK-Zell-Aktivität gemessen am prozentualen Anteil an CD107a⁺-NK-Zellen wurde normalisiert auf die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne Peptid. Zu Vergleichszwecken wurde auch die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit den Kontrollpeptiden dargestellt. Graue Balken zeigen die Ergebnisse der gesamten Probanden. **A** Abgebildet ist die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit den HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptid Varianten unterteilt in Probanden mit 0 HLA-Bw4 (n = 13; hellrot), mit 1 HLA-Bw4 (n = 16; rot) und mit \ge 2 HLA-Bw4 (n = 16; dunkelrot). **B** Abgebildet ist die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit den HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid Varianten unterteilt in Probanden ohne HLA-Bw4 (n = 12; hellgrün), mit 1 HLA-Bw4 (n = 13; grün) und mit \ge 2 HLA-Bw4 (n = 13; dunkelgrün). Statistische Signifikanzen wurden mittels Kruskal-Wallis Test bestimmt (ns > 0,05, *p < 0,05, **p < 0,01).

In den Abbildungen (Abb. 2.14 A + B) ist vergleichend die Inhibitionsstärke der einzelnen HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid-Varianten in Abhängigkeit der Anzahl an HLA-

Bw4-Allelen dargestellt. Beim Vergleich der Inhibitionsstärke der HCV Peptide auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen fiel auf (**Abb. 2.14 A**), dass die viralen Peptide 824 und 870 eine signifikant stärkere Inhibition auf nichtlizensierte NK-Zellen als auf NK-Zellen, die durch zwei oder mehr HLA-Bw4-Allele lizensiert wurden, zeigten. Generell ließ sich zeigen, dass je mehr HLA-Bw4-Allele die KIR3DL1⁺-NK-Zellen lizensiert haben, desto geringer fiel der Inhibitionseffekt aus. Hier stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Funktionalität der KIR3DL1⁺-NK-Zellen (**Abb. 2.13**) und der hier gezeigten Beeinflussbarkeit durch virale Peptide gibt.

Beim Betrachten der Ergebnisse der Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten (Abb. 2.14 B) konnte ein anderes Phänomen beobachtet werden: Sowohl der Inhibitionseffekt von Peptid 836, welches in der vorherigen Untersuchung keinen signifikanten Inhibitionseffekt aufwies, als auch der von Peptid 833, das den stärksten Inhibitionseffekt auf KIR3DL1-positive NK-Zellen besaß (Abb. 2.12), zeigte weder eine Tendenz in Richtung lizensierter NK-Zellen noch in Richtung nicht-lizensierter NK-Zellen. Bei den anderen Peptiden schienen die NK-Zellen aus der Gruppe "2 HLA-Bw4" genauso beeinflussbar zu sein wie die der Gruppe "0 HLA-Bw4". Daher konnte aus den Ergebnissen festgehalten werden, dass die Lizensierung der KIR3DL1⁺-NK-Zellen wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Inhibitionsfähigkeit der viralen Peptide hatte.

Da bekannt ist, dass HLA-Bw4 80(I) besser an KIR3DL1 bindet als HLA-Bw4 80(T) sollte im nächsten Vergleich untersucht werden, ob es in Bezug auf die Aminosäure im HLA-Bw4-Protein an Position 80 einen Effekt auf die Inhibitionsfähigkeit gibt. Dazu wurden die HLA-Bw4⁺-Probanden in HLA-Bw4 80(T) bzw. HLA-Bw4 80(I)⁺-Probanden eingeteilt und die oben gezeigte Analyse wiederholt.

Für die zwei unterschiedlichen Kohorten ergaben sich folgende Gruppierungen (Tab. 2.6):

HLA-Bw4 Pos. 80	Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten	Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten
HLA-Bw4 80(I)	7	7
HLA-Bw4 80(T)	15	11
HLA-Bw4 80(I)/(T)	10	8
kein HLA-Bw4	13	12
Probanden gesamt	45	38

Tab. 2.6: Auflistung der HLA-Bw4 80(I) bzw. 80(T)-Genotypen von der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten und von der Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten

In beiden Kohorten konnte bei 7 Probanden HLA-Bw4 80(I) nachgewiesen werden. In der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten hatten 15 Probanden und in der Kohorte zur Untersuchung

der HBV Peptidvarianten 11 Probanden HLA-Bw4 80(T), aber auch Probanden sowohl mit HLA-Bw4 80(I) als auch HLA-Bw4 80(T) konnten in beiden Kohorten ermittelt werden. Diese wurde allerdings aus der Untersuchung zum Einfluss der Position 80 des HLA-Bw4 Proteins auf die Inhibitionsstärke der getesteten viralen Peptide ausgeschlossen, da der Unterschied des Dimorphismus 80(I) vs. 80(T) untersucht werden sollte (**Abb. 2.15**).



Abb. 2.15: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ bzw. HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten gebunden an HLA-B*27:05 unterteilt in Probanden mit HLA-Bw4 80(I) bzw. HLA-Bw4 80(T) und ohne HLA-Bw4.

Die NK-Zell-Aktivität gemessen am prozentualen Anteil an CD107a⁺-NK-Zellen wurde normalisiert auf die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne Peptid. Zu Vergleichszwecken wurde auch die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit den Kontrollpeptiden dargestellt. Graue Balken zeigen die Ergebnisse der Probanden ohne HLA-Bw4. **A** Abgebildet ist die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit den HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptid Varianten unterteilt in Probanden mit HLA-Bw4 80(I) (n = 7; dunkelrot) und mit HLA-Bw4 80(T) (n = 15; rot). **B** Abgebildet ist die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit

den HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid Varianten unterteilt in Probanden mit HLA-Bw4 80(I) (n = 7; dunkelgrün) und mit HLA-Bw4 80(T) (n = 11; grün). Statistische Signifikanzen wurden mittels One-way ANOVA bestimmt (ns > 0,05, *p < 0,05).

Die Abbildungen zeigen den Vergleich der Inhibitionsstärke der einzelnen HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid-Varianten auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen in Abhängigkeit eines anwesenden HLA-Bw4 80(I)- bzw. HLA-Bw4 80(T)-Proteins oder in Abhängigkeit eines abwesenden HLA-Bw4-Proteins während der NK-Zell-Lizensierung (Abb. 2.15 A + B).

Werden die Ergebnisse zum Vergleich der Inhibitionsstärke der HCV Peptide gegenüber HLA-Bw4 80(T) bzw. HLA-Bw4 80(I) lizensierten KIR3DL1⁺-NK-Zellen betrachtet, konnte eine starke Tendenz beobachtet werden, dass NK-Zellen von Probanden mit HLA-Bw4 80(I) durch die viralen Peptide stärker inhibiert wurden als NK-Zellen von Probanden mit HLA-Bw4 80(T) (**Abb. 2.15 A**). Diese Tendenz konnte bei der Betrachtung der HBV Peptide nicht gezeigt werden (**Abb. 2.15 B**). Es gab eher einen leichten Trend dahingehend, dass NK-Zellen, die von HLA-Bw4 80(I) lizensiert wurden, schwächer inhibiert wurden.

Da für die NK-Zell-Lizensierung/Entwicklung nicht nur das Vorhandensein des Liganden HLA-Bw4, sondern auch der Rezeptor KIR3DL1 selbst eine Rolle spielt, erfolgte als nächstes die Genotypisierung beider Kohorten bezüglich ihrer KIR3DL1-Genotypen. Hierbei war von Belang, ob ein KIR3DS1-Allel vertreten war und in welche der 3 möglichen KIR3DL1-Rezeptorgruppen (high, low, null) die gefundenen KIR3DL1-Allele eingeordnet werden. Dabei war auch von Interesse, ob die KIR3DL1-Allele homo- oder heterozygot auftraten.

Durch simultan durchgeführte Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde eine PCR-basierte KIR3DL1-Typisierung etabliert, um die KIR3DL1-Allele der getesteten Probanden zu typisieren. Die Ergebnisse der KIR3DL1-Typisierung wurde anschließend tabellarisch dargestellt (**Tab. 2.7**).

KIR3DL1-Allel-Gruppe	Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten	Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten
KIR3DL1 ^{low} homozygot	7	7
KIR3DL1 ^{low} heterozygot	2	2
KIR3DL1 ^{low/null}	5	3
KIR3DL1 ^{low} /KIR3DS1	0	0
KIR3DL1 ^{Iow} gesamt	14	12
KIR3DL1 ^{high} homozygot	4	5
KIR3DL1 ^{high} heterozygot	6	7
KIR3DL1 ^{high/null}	6	4
KIR3DL1 ^{high} /KIR3DS1	5	3
KIR3DL1 ^{high} gesamt	21	19
KIR3DL1 ^{low/high}	9	8

Tab. 2.7: Auflistung der KIR3DL1-Genotypen von der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten und von der Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten

Von insgesamt 44 Probanden der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten und insgesamt 39 Probanden der Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten konnte der KIR-Genotyp bestimmt werden. In der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten haben zusammengefasst 14 Proben einen KIR3DL1^{low}-Genotyp, 21 Probanden einen KIR3DL1^{high}-Genotyp und 9 Probanden einen KIR3DL1^{high/low}-Genotyp. Die Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten beinhaltete 12 Probanden mit dem KIR3DL1^{low}-Genotyp, 19 mit dem KIR3DL1^{high}-Genotyp und 8 mit dem KIR3DL1^{high/low}-Genotyp. Diese Genotypen wurden noch dahingehend unterteilt, ob diese homozygot oder heterozygot sind bzw. ob das zweite Allel ein Null-Allel ist. Zudem konnten auch Probanden gefunden werden, die ein KIR3DS1-Allel aufwiesen (grau unterlegt). Diese wurden zwar in der Tabelle aufgeführt, aber aus der Analyse ausgeschlossen.

Um die Inhibitionsstärke der HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid-Varianten gegenüber den unterschiedlichen KIR3DL1-Allelen darzustellen, wurden die Ergebnisse aus den Gruppen KIR3DL1^{high}, KIR3DL1^{high/low} und KIR3DL1^{low} jeweils zusammengefasst und gegenübergestellt (**Abb. 2.16**).



Abb. 2.16: Grafische Gegenüberstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit ausgewählten HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ bzw. HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten gebunden an HLA-B*27:05 unterteilt in KIR3DL1^{high}-, KIR3DL1^{high/low}- und KIR3DL1^{low}-Probanden.

Die NK-Zell-Aktivität gemessen am prozentualen Anteil an CD107a⁺-NK-Zellen wurde normalisiert auf die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne Peptid. Zu Vergleichszwecken wurde auch die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit den Kontrollpeptiden dargestellt. **A** Abgebildet ist die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1^{high}-NK-Zellen (n = 21; dunkelrot), von KIR3DL1^{high/low}-NK-Zellen (n = 9; rot) und von KIR3DL1^{low}-NK-Zellen (n = 14; hellrot) nach Stimulation mit den HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptid Varianten. **B** Abgebildet ist die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1^{high}-NK-Zellen (n = 19; dunkelgrün), von KIR3DL1^{high/low}-NK-Zellen (n = 8; grün) und von KIR3DL1^{low}-NK-Zellen (n = 12; hellgrün) nach Stimulation mit den HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid Varianten. Statistische Signifikanzen wurden mittels Kruskal-Wallis Test bestimmt (ns > 0,05, *p < 0,05).

In der Abbildung dargestellt ist die Inhibitionsstärke normalisiert auf die "no peptide"-Kontrolle der einzelnen HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Peptide (**Abb. 2.16 A**) und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptide (**Abb. 2.16 B**) auf NK-Zellen, die entweder KIR3DL1^{high}-, KIR3DL1^{high/low}- oder KIR3DL1^{low}-Allele exprimieren.

Beim Vergleich der Inhibitionsstärke der ausgewählten HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Peptide zwischen den unterschiedlichen KIR3DL1-Allel-Gruppen (Abb. 2.16 A) fällt auf, dass KIR3DL1^{low}-NK-Zellen von den

HCV Peptiden sehr stark inhibiert wurden, wohingegen die NK-Zellen der beiden anderen Gruppen keinen starken Inhibitionseffekt aufwiesen. Zudem war der Inhibitionseffekt in den beiden Gruppen auf dem gleichen Niveau. Die statistische Analyse zeigte, dass KIR3DL1^{low}-NK-Zellen signifikant stärker von Peptid 506 und 871 inhibiert werden als KIR3DL1^{high}-NK-Zellen. Ein ähnlicher Effekt ist auch beim Vergleich mit den KIR3DL1^{low/high}-NK-Zellen zu beobachten. Beim Prototyp sind beide Effekte als Tendenz zu erkennen. Einen ähnlichen, jedoch nicht signifikanten Effekt ließ sich auch beim Vergleich der Inhibitionsstärke der ausgewählten HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptide zwischen den unterschiedlichen KIR3DL1-Allel-Gruppen erkennen (**Abb. 2.16 B**).

In Anbetracht der HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptid-Varianten lässt sich die Aussage treffen, dass diese Peptide sowohl auf die KIR3DL1^{high}- als auch auf die KIR3DL1^{high/low}-NK-Zellen keinen besonders starken Inhibitionseffekt ausüben konnten. Ausschließlich die KIR3DL1^{low}-NK-Zellen schienen durch die viralen Peptide auffällig stark beeinflussbar gewesen zu sein. Zudem konnte in der Gruppe der KIR3DL1^{high/low}-NK-Zellen beobachtet werden, dass sich der starke Inhibitionseffekt der KIR3DL1^{low}-NK-Zellen gegenüber den KIR3DL1^{high}-NK-Zellen nicht durchsetzen konnte, weswegen hier eine mögliche Hierarchie der KIR3DL1-Allele gemutmaßt werden kann, bei der die KIR3DL1^{high}-Allele die KIR3DL1^{low}-Allele dominieren.

Aus diesem Grund wurden die Genotypen der Probanden aus den KIR3DL1^{low}-Gruppen genauer untersucht. Bekannte KIR3DL1^{low}-Allele, die in diesen Kohorten auftreten, sind KIR3DL1*005 und *007 (Campbell and Purdy, 2011, Saunders et al., 2016, Carr et al., 2005). Zudem gibt es die sogenannten Null-Allele, zu denen die in diesen Kohorten auftretenden Allele KIR3DL1*004, *019 und *053 gehören (Harrison et al., 2022, Boudreau et al., 2014). Laut Literatur werden diese nicht auf der Zelloberfläche exprimiert und sind somit nicht funktionell. Genetische Kombinationen aus einem Null- und einem KIR3DL1^{low}-Allel wurden bei dieser Betrachtung eingeschlossen. Die Ergebnisse wurden tabellarisch dargestellt (**Tab. 2.8**).

KIR3DL1 ^{Iow} -Allel	Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten	Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten
KIR3DL1*005/*005	5	7
KIR3DL1*004/*005	4	2
KIR3DL1*005/*007	1	1
KIR3DL1*007/*007	1	0
KIR3DL1*005/*009	1	1
KIR3DL1*004/*009	1	1
KIR3DL1*009/*009	1	0
KIR3DL1 ^{low} gesamt	14	12

Tab. 2.8: Auflistung der KIR3DL1^{low}-Allele in der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten und in der Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten

Aus der Analyse ging hervor, dass insgesamt 14 Probanden in der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten bzw. 12 Probanden in der Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten eine Gen-Kombination der KIR3DL1-Allele aufwiesen, die einen KIR3DL1^{Iow}-Phänotypen hervorrufen. Dabei traten sieben unterschiedliche Allel-Kombinationen auf. In 11 von 14 Fällen bei der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarainten bzw. 11 von 12 Fällen bei der Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten war das KIR3DL1*005-Allel involviert. Hieraus wurde geschlossen, dass die inhibitorischen Effekte der viralen Peptide bei diesen Untersuchungen hauptsächlich durch das KIR3DL1*005 Allel hervorgerufen wurde. Ob die anderen KIR3DL1^{Iow}-Allele ähnlich durch virale Peptide beeinflussbar sind, kann mit diesen Ergebnissen nicht geklärt werden.

2.4 NK-Zell-Klone

Um die Intra-Assay-Variabilität zu verringern, sollten KIR3DL1-exprimierende NK-Zell-Klone etabliert werden, dessen KIR3DL1-Allel definiert werden kann. Mit diesen Klonen sollte dann der zuvor dargestellte NK-Zell-Assay wiederholt werden.

Für die Herstellung von KIR3DL1⁺-NK-Zell-Klonen wurde die Methode der Einzelzell-Klonierung (Abschnitt 4.2.2.7) verwendet. Um bei der Einzelzell-Klonierung sowohl KIR3DL1^{high}- als auch KIR3DL1^{low}-NK-Zell-Klone zu erhalten, wurden Probanden ausgewählt, die einen KIR3DL1^{high/low}-Genound Phänotypen besaßen. Hierbei war es wichtig, dass die KIR3DL1-Populationen im FACS-Plot gut voneinander abzutrennen waren, damit beim Sortieren zwischen KIR3DL1^{high}- und KIR3DL1^{low}-NK-Zellen unterschieden und die Einzelzellen je in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte, die in zwei Hälften für KIR3DL1^{high} und KIR3DL1^{low} unterteilt wurde, sortiert werden konnten (**Abb. 2.17**).


Abb. 2.17: Schematische Darstellung der Einzelzell-Klonierung zur Herstellung von NK-Zell-Klonen mit einem spezifischen KIR3DL1-Allel.

Links dargestellt ist ein FACS-Plot mit KIR3DL1^{low}- und KIR3DL1^{high}-NK-Zellen, die mithilfe eines Durchflusszytometers nach ihrer KIR3DL1-Oberflächenexpression in eine 96-Loch-Platte (rechts) sortiert und anschließend kultiviert wurden.

Für die Einzelzell-Klonierung wurden 5 unterschiedliche Probanden mit den folgenden KIR3DL1^{high/low}-Geno- und Phänotypen verwendet: KIR3DL1*001/*005, KIR3DL1*002/*005, KIR3DL1*007/*008, KIR3DL1*001/*007 und KIR3DL1*001/*005. Hierbei zählen zu den KIR3DL1^{high}-Allelen die Allele *001, *002 und *008 und zu den KIR3DL1^{low}-Allelen die Allele *005 und *007.

Nach dem die Einzelzellen in die Vertiefungen der 96-Loch-Platten sortiert wurden, wurden sie für mehrere Wochen kultiviert, wobei zwischendurch das Medium aufgefüllt wurde. Nach etwa 2 Wochen wurde visuell untersucht, in welcher Vertiefung der 96-Loch-Platten Klone herangewachsen sind. Eine Zellvermehrung war daran zu erkennen, dass sich am Boden der Vertiefung ein Zellpellet gebildet hat. Diese Zellen wurden für die Expansion in eine 48-Loch-Platte überführt. Dieses Vorgehen wurde so lange fortgeführt, bis diese in einer 6-Loch-Platte kultiviert werden konnten. Dann erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der NK-Zell-Klone mit den bekannten NK-Zell-Markern und KIR3DL1. Exemplarisch wird hier die Analyse eines KIR3DL1^{high}-NK-Zell-Klons dargestellt (**Abb. 2.18Abb. 2.18**).



Abb. 2.18: Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse zur Identifizierung eines KIR3DL1^{high}-NK-Zell-Klons.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine klare Zell-Population mit einem etwa 56 %-igen Anteil der gemessenen Events. 98,5 % dieser Zell-Population waren vereinzelte Zellen, von denen 99,0 % als lebende Zellen identifiziert wurden. Die Färbung zum Ausschluss von T- und B-Zellen bzw. Monozyten durch CD3, CD14 und CD19 zeigte, dass keine der Zellen einen dieser Marker exprimiert, sondern dass 99,6 % dieser Zellen die NK-Zell-Marker CD16 und CD56 aufwiesen. Damit wurde bestätigt, dass es sich um einen echten NK-Zell-Klon handelte. Die Färbung des NK-Zell-Rezeptors KIR3DL1 demonstrierte, dass 99,9 % der zuvor definierten NK-Zellen den gewünschten Rezeptor exprimieren, womit nachgewiesen werden konnte, dass die Einzelzell-Klonierung von KIR3DL1⁺-NK-Zellen erfolgreich war.

Tab. 2	.9: T	abellarische	Darstellung	der	etablierten	NK-Zell-Klone.
--------	-------	--------------	-------------	-----	-------------	----------------

KIR3DL1-Genotyp	KIR3DL1 ^{high}	KIR3DL1 ^{low}
B490: KIR3DL1*001/*005	3	3
B493: KIR3DL1*002/*005	2	1
B517: KIR3DL1*007/*008	4	4
B545: KIR3DL1*001/*007	1	1
B547: KIR3DL1*001/*005	1	1
KIR3DL1-Klone gesamt	11	10

Auf diese Weise konnten insgesamt 21 NK-Zell-Klone hergestellt werden (**Tab. 2.9**), wobei 11 ein KIR3DL1^{high}-Allel und 10 ein KIR3DL1^{low}-Allel trugen. Von den 11 KIR3DL1^{high}-NK-Zell-Klonen besaßen 5 Klone das Allel KIR3DL1*001, 2 beinhalteten das Allel KIR3DL1*002 und 4 Klone das Allel KIR3DL1*008. Bei den KIR3DL1^{low}-Klonen hatten je 5 Klone das Allel KIR3DL1*005 bzw. das Allel KIR3DL1*007.

Um herauszufinden, ob der oben beschriebene NK-Zell-Assay mit den NK-Zell-Klonen funktioniert, wurden 5 der generierten Klone für diesen Assay und eine kleine Auswahl der zuvor getesteten HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Peptid-Varianten verwendet (**Abb. 2.19**). Bei der Wahl der Klone wurde darauf geachtet, dass ein Klon mit je einem der 5 verschiedenen KIR3DL1-Allele für die Untersuchung eingesetzt wurde.



Abb. 2.19: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von fünf KIR3DL1⁺-NK-Zell-Klonen nach Stimulation mit einer Auswahl an HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop Varianten gebunden an HLA-B*27:05.

Die NK-Zell-Aktivität gemessen am prozentualen Anteil an CD107a⁺-NK-Zellen wurde normalisiert auf die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne Peptid. Zu Vergleichszwecken wurde auch die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit den Kontrollpeptiden dargestellt. Abgebildet ist in der oberen Reihe links

die NK-Zell-Aktivität von insgesamt 5 verschiedenen KIR3DL1-NK-Zell-Klonen [B490 KIR3DL1*001 (KIR3DL1^{high}), B490 KIR3DL1*005 (KIR3DL1^{low}), B493 KIR3DL1*002 (KIR3DL1^{high}), B517 KIR3DL1*008 (KIR3DL1^{high}) und B517 KIR3DL1*007 (KIR3DL1^{low})] bzw. die Ergebnisse der einzelnen NK-Zell-Klone nach Stimulation mit den ausgewählten HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptid Varianten (obere Reihen mittig und rechts bzw. untere Reihe). Statistische Signifikanzen wurden mittels One-way ANOVA bestimmt (ns > 0,05).

Die dargestellte Grafik zeigt die Inhibitionsfähigkeit der Kontroll-Peptide und der Auswahl an den HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Peptid-Varianten auf die generierten NK-Zell-Klone. Zum einen wurden die Ergebnisse in einem Säulendiagramm zusammengefasst (links oben) und zum anderen wurden die Ergebnisse zu jedem NK-Zell-Klon einzeln in einer Abbildung dargestellt, da jeder Klon ein anderes KIR3DL1-Allel besitzt.

In der Zusammenfassung der Ergebnisse ist erkennbar, dass die Negativkontrolle EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ keine Inhibition der NK-Zell-Klone gegenüber aufwies und dass die Positivkontrolle FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ eine leichte, nicht signifikante Inhibition zeigte. Auch die HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Peptid-Varianten zeigten keinen signifikanten Inhibitionseffekt auf die NK-Zell-Klone. Trotzdem zeigte das Peptid 870 eine Inhibition von ca. 55 % und das Peptid 871 eine Inhibition von ca. 45 %, die somit stärker waren als der Inhibitionseffekt der Positivkontrolle.

Werden die einzelnen Klone betrachtet, ließen sich kontroverse Ergebnisse ermitteln. Der Klon B490 KIR3DL1*001, welcher ein KIR3DL1^{high}-Allel exprimiert, zeigte bei fast allen Peptiden keine Inhibition der NK-Zellen, sondern eine Aktivierung. Sogar die Positivkontrolle, die sonst immer einen inhibierenden Effekt auslöste, aktivierte die NK-Zellen stärker als Zielzellen ohne Peptid. Lediglich die Peptide 870 und 871 konnten einen minimalen Inhibitionseffekt verursachen.

Die Ergebnisse des NK-Zell-Klons desselben Probanden B490 mit KIR3DL1*005-NK-Zellen spiegelte die Ergebnisse wider, die in der zusammenfassenden Grafik der Ergebnisse dargestellt sind. Konkret zeigte die Negativkontrolle keine nennenswerte Inhibition und die Positivkontrolle eine Inhibition von etwa 20 %. Die Prototyp-Sequenz ARMILMTHF und die Variante 506 zeigten keine Inhibition, wohingegen die Varianten 870 und 871 einen Inhibitionseffekt bewirkten, der jeweils stärker war als der der Positivkontrolle.

Die Ergebnisse zum B493 KIR3DL1*002-NK-Zell-Klon bildeten die gewohnten Inhibitionseffekte ab, die zuvor in den NK-Zell-Assays ermittelt wurden. Die Negativkontrolle hatte keinen inhibitorischen Effekt, wogegen die Positivkontrolle mit einem Wert von 70 % einen sehr starken inhibitorischen Effekt verursachte. Die Prototyp-Sequenz 497 zeigte einen minimalen Inhibitionseffekt und die Peptid-Varianten zeigten allesamt einen genauso starken bzw. stärkeren Inhibitionseffekt als die

Positivkontrolle. Auffällig war hierbei, dass das Peptid 870 sogar die Aktivierung des NK-Zell-Klons vollständig aufgehoben zu haben scheint.

Beim Klon B517 KIR3DL1*008 fiel auf, dass die Negativkontrolle einen schwachen inhibitorischen Effekt von etwa 20 % aufwies. Der Inhibitionseffekt der Positivkontrolle lag hier bei 50 %. Die inhibitorischen Effekte der HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Peptid-Varianten 497, 506 und 871 bewegten sich zwischen den Werten der Negativ- und Positivkontrolle, also zwischen 20 % und 50 %. Ausschließlich Peptid 870 zeigte einen stärkeren Inhibitionseffekt als die Positivkontrolle mit etwa 55 %.

Der letzte NK-Zell-Klon B517 KIR3DL1^{low} zeigte bei der Negativkontrolle keinen inhibitorischen oder aktivierenden Effekt. Die Positivkontrolle konnte nur einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die NK-Zellen ausüben, mit einer Inhibitionsstärke von etwa 10 %. Der Inhibitionseffekt des Prototyp-Peptids 497 erreichte einen Wert von 25 % und die Variante 870 inhibierte den NK-Zell-Klon zu etwa 50 %. Das Peptid 506 schien den NK-Zell-Klon aktiviert zu haben, da hier ein Wert von 1,3 erreicht wurde, wohingegen das Peptid 871 genauso wie die Negativkontrolle keinen Effekt auf die NK-Zellen hatte.

Alles in allem kann gesagt werden, dass in Anbetracht der zusammenfassenden Grafik zur Inhibitionsfähigkeit der getesteten Peptide auf KIR3DL1-exprimierende NK-Zell-Klone zunächst das bekannte Inhibitionsmuster abgebildet wurde, welches allerdings keine Signifikanzen aufwies. Werden die Ergebnisse einzeln betrachtet, so ergaben sich variable Inhibitionseffekte bezüglich der getesteten Peptide, wobei hier auch erwähnt werden muss, dass jeder Klon nur einmal getestet wurde. Ausschließlich das Peptid 870 konnte als einziges Peptid konstant einen starken Inhibitionseffekt verursachen, der sogar beim KIR3DL1*002-NK-Zell-Klon eine Inhibition von 100 % erreichte. Auch das Peptid 871 zeigte mit einer Ausnahme beim NK-Zell-Klon B517 KIR3DL1*007 einen kontinuierlich starken Inhibitionseffekt. Die Kontrollpeptide allerdings wiesen häufig Sonderheiten auf. Zwar zeigten diese meistens tendenziell den erwarteten Effekt, jedoch war dieser bezüglich der Positivkontrolle meist zu schwach. Aus diesem Grund ist dieser Assay potenziell anwendbar, um virale HLA-B*27:05-restringierte Peptide auf ihre Inhibitionsfähigkeit gegenüber KIR3DL1-exprimierender NK-Zellen zu untersuchen. Allerdings muss zuvor der Assay so weit mit den NK-Zell-Klonen optimiert werden, dass die Kontrollpeptide wie zuvor auch ihre erwarteten Effekte bewirken. Zudem sollte jeder Klon mindestens dreimal mit den gleichen Peptiden getestet werden, um eine echte Aussage über die Ergebnisse machen zu können, da die erhaltenen Ergebnisse genauso gut, zufällig entstanden sein konnten.

Ergebnisse

2.5 NK-Zell-Assay mit endogen Peptid-beladenen T2-HLA-B*27:05 Zellen

Da bei dem bisher durchgeführten NK-Zell-Assay die zu untersuchenden Peptide exogen mit einer Konzentration von 100 µM zu den HLA-B*27:05-exprimierenden T2 Zellen gegeben wurden, sollte ein Assay etabliert werden, der die physischen Bedingungen im menschlichen Körper näher abbildet. Gemeint ist, dass das virale Peptid in humanen Zellen von einem viralen Protein abgespalten, das HLA-Molekül endogen mit dem Peptid beladen und auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Daher sollten HLA-B*27:05-exprimierende T2 Zelllinien hergestellt werden, die die zu untersuchenden Peptide selbst bilden, die HLA-Moleküle beladen und an die Zelloberfläche bringen.

Für die Herstellung solcher Zelllinien müssen Expressions-Plasmide, die das HLA-B*27:05-Protein samt dem jeweiligen viralen Peptid beinhalten, kloniert und mithilfe von E. *coli*-Bakterien vervielfältigt werden, die dann mittels Transduktion in T2-Zellen eingebracht werden sollten. Da in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits das Plasmid hergestellt wurde, das das HLA-B*27:05 zusammen mit der HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Prototyp-Sequenz ARMILMTHF beinhaltet, konnte dieses Plasmid als Grundlage für die sogenannte "Ortsspezifische Mutagenese" (*"Site-directed mutagensis" - SDM*) zum Klonieren von Plasmiden mit Peptid-Varianten verwendet werden.

Da zunächst getestet werden sollte, ob sowohl die geplanten Zelllinien hergestellt werden können, als auch diese sich zur Untersuchung des Einflusses viraler Peptide auf KIR3DL1-positive NK-Zellen eignen, wurde eine Auswahl an Plasmiden kloniert: die Plasmide mit den Kontroll-Sequenzen RRIYDLIEL (Negativkontrolle) und SRYWAIRTR (Positivkontrolle) und zwei Plasmide mit den HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Peptid-Varianten ARMILMPHF (506) und VRMILLPHF (871).

Für die SDM zur Herstellung der oben genannten Plasmide wurden für die verschiedenen Peptid-Varianten unterschiedliche Primer konzipiert und mit diesen im Anschluss die PCRs durchgeführt (Abschnitt 4.2.4.2.1 + 4.2.4.2.2). Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 4.2.4.1) und die Gel-Banden, die auf der richtigen Höhe waren, ausgeschnitten. In diesem Fall hatten die Plasmide eine Größe von 12226 bp. Da der Größenstandard, der gemeinsam mit den Proben aufgetragen wurde und zur Abschätzung der Bandengröße diente, eine maximale Größe von 20000 bp anzeigte (oberste Bande) und die zweitgrößte Bande bei 10000 bp lag, mussten die PCR-Produkte zwischen diesen beiden Banden liegen (**Abb. 2.20 A**).





A Exemplarisch ist hier die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von HLA-B27-SRY dargestellt. **B** Beispielhaft sind hier die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente der Plasmide von insgesamt zehn unterschiedlichen Bakterienklonen aufgezeigt, die mithilfe des Restriktionsenzyms *Nco* I geschnitten wurden. Als Größenstandard wurde GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder verwendet. Zur DNA-Auftrennung wurde ein 1%-iges Agarose-Gel (120 V, 400 mA, 60 Minuten) verwendet.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (**Abb. 2.20 A**) zeigte in der ersten Spur des Gels den Größenstandard und in den Spuren 3 und 4 die PCR-Produkte von der PCR zur Herstellung des Plasmids HLA-B*27:05-SRYWAIRTR (HLA-B27-SRY). Es wurde eine Bande mit einer Größe von 12226 bp erwartet, da diese der Größe des Plasmids entspricht, allerdings waren viele unterschiedliche Banden mit Größen zwischen etwa 450 bp und 15000 bp vorhanden. Das Auftreten vieler

Ergebnisse

unterschiedlicher Banden kann unterschiedliche Erklärungen haben. Zum einen ist das zu amplifizierende Plasmid mit einer Größe von mehr als 12 kb sehr groß, wodurch die Wahrschlichkeit, ausschließlich ein vollständiges Plasmid zu amplifizieren, sehr gering ist. Zum anderen beinhaltet einer der verwendeten Primer eine Mutation, wodurch das Ansetzen des Primers an die Plasmid-DNA erschwert wird bzw. nicht fehlerfrei passiert. Zudem könnten auch die verwendeten Temperaturen und die Konzentrationen der Puffer bzw. Enzyme eine Rolle gespielt haben. Trotzdem konnte die Bande mit der richtigen Größe (s. blauer Pfeil, **Abb. 2.20 A**) ermittelt werden.

Diese Banden wurden ausgeschnitten und die DNA mithilfe des Gel Extraction Kits (Abschnitt 4.2.4.3) aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Phosphorylierung und Ligation der Plasmide, die dann in E. *coli*-Bakterien transformiert und kultiviert wurden (Abschnitt 4.2.1.1 + 4.2.1.2), um zum Schluss die Plasmid-DNA zu isolieren. Die Größe der isolierten Plasmide wurden mittels eines Restriktionsverdaus mit dem Enzym *Nco* I überprüft (**Abb. 2.20 B**). Die Fragmentierung der Klon-DNA sollte 4 Banden mit folgenden Größen ergeben: 319 bp, 779 bp, 3850 bp und 7278 bp. Aus dem Gelbild ging hervor, dass die Klone 7, 8, 9 und 10 (blau umrandet) das richtige Bandenmuster aufwiesen, daher wurde die DNA der Klone mit dem richtigen Bandenmuster sequenziert und bei positiven Ausgang für die Herstellung der stabilen Zelllinien verwendet.

Da die Sequenzierungsergebnisse bestätigen konnten, dass die hergestellten Klone eine vollständige und korrekte Gensequenz beinhalten, konnte die DNA verwendet werden, um mittels Transduktion stabile T2 Zelllinien (Abschnitt 4.2.2.2) herzustellen. Nach einer mehrwöchigen Kultivierung der etablierten T2 Zelllinien mit Selektionsmedium wurde kontrolliert, ob reine Zelllinien hergestellt werden konnten, indem die Zelllinien mit dem HLA-B*27-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht wurden (**Abb. 2.21**).

Ergebnisse



Abb. 2.21: Histogramme zur Darstellung der Anzahl an HLA-B*27-exprimierenden Zellen von verschiedenen etablierten T2 Zelllinien.

Die HLA-B*27-Oberflächenexpression wurde von insgesamt sechs Zelllinien grafisch dargestellt: T2, T2 B27, T2 B27-ARMILMTHF, T2 B27-SRYWAIRTR, T2 B27-ARMILMPHF und T2 B27-VRMILLPHF. Zu Vergleichszwecken wurden die ungefärbten Zellen (rot) gegen die gefärbten Zellen (blau) der jeweiligen Zelllinie aufgetragen.

Die dargestellten Histogramme (**Abb. 2.21**) zeigen vergleichend die transduzierten Zelllinien, die mit dem HLA-B*27-Antikörper angefärbt (blau) bzw. nicht angefärbt wurden (rot). Dabei zeigt die horizontale Achse die Fluoreszenz-Intensität der HLA-B*27-exprimierenden Zellen, wohingegen die vertikale Achse die Anzahl der fluoreszierenden Zellen wiedergibt. Je mehr HLA-B*27-Moleküle eine Zelle exprimiert, desto stärker ist die Fluoreszenz-Intensität, also desto weiter rechts erscheint die Zelle im Histogramm. Exprimiert die Zelle keine HLA-B*27-Molekül, bleibt die Zelle links im Diagramm.

Um eine mit dem HLA-B*27-Antikörper angefärbte Zell-Population zu zeigen, die kein HLA-B*27:05 exprimiert, wurden nicht transduzierte T2 Zellen mit gemessen. Sowohl die ungefärbte als auch die gefärbte Probe zeigt eine schmale Zell-Population links im Histogramm, dessen Peak bei einem Wert von 0 liegt. Dies bedeutet, dass diese Zellen kein HLA-B*27 exprimieren. Als Positiv-Kontrolle diente die bereits existierende T2 HLA-B*27:05-Zelllinie. Die ungefärbte Probe zeigt wie zuvor auch eine schmale Zell-Population mit einem Peak bei 0. Die gefärbte Probe hingegen zeigte zwei Zell-Populationen, die sich nach rechts im Histogramm bewegen. Eine hat ihren bei einem Wert zwischen 0 und 10³ und die andere einen Peak zwischen 10³ und 10⁴. Dies bedeutet, dass alle gemessenen Zellen zwar HLA-B*27 exprimieren, die zwei Zell-Populationen jedoch im Durchschnitt unterschiedlich viel HLA-B*27-Moleküle auf der Zell-Oberfläche tragen. Dieses Phänomen tritt auf, wenn diese Zelllinie über mehrere Wochen ohne Selektionsmedium in Kultur ist, da die Zellen beginnen, das HLA-B*27 herunterzuregulieren. In diesem Fall müssen frische Zellen in Kultur genommen werden oder die Zellen mit dem Selektionsmedium über mehrere Passagen kultiviert werden.

Die T2 Zellen, die mit dem Plasmid mit HLA-B*27:05 und dem jeweiligen viralen Peptid transduziert wurden, wiesen je eine Zell-Population auf. Die Zelllinie mit dem Prototyp-Peptid ARMILMTHF zeigte eine schmale abgegrenzte Population mit einem Peak bei 10³. Auch die Zelllinie mit der Peptid-Variante ARMILMPHF zeigte eine Zell-Population mit einem Peak bei 10³, allerdings ist diese breiter als die Zell-Population, die ARMILMTHF beinhaltet. Die beiden anderen Zelllinien (T2 B27-SRYWAIRTR und T2 B27-VRMILLPHF) zeigen nur eine leichte Verschiebung der Zell-Population nach rechts mit einem Peak zwischen 0 und 10³. Dies bedeutet, dass diese Zell-Populationen HLA-B*27:05 exprimieren, allerdings nur zu geringen Mengen.

Die Zelllinie, die HLA-B*27:05-RRIYDLIEL exprimieren sollte, konnte nicht hergestellt werden. Bei der Kultivierung mit dem Selektionsmedium haben keine Zellen überlebt. Entweder war die Transduktion mit diesem Konstrukt nicht effizient genug, um einen genügend großen Anteil an Zellen zu infizieren oder die hergestellten Viren konnten generell keine T2 Zellen infizieren. Da alle anderen Transduktionen erfolgreich waren, liegt die Vermutung nahe, dass dem Misserfolg eine mangelnde Transduktionseffizienz bezüglich dieses Konstrukts zu Grunde lag. Trotzdem kann zusammenfassend gesagt werden, dass stabile Zelllinien hergestellt werden konnten, die unterschiedlich stark das HLA-B*27:05 Molekül exprimieren.

Trotz, dass die Zelllinie mit der Negativ-Kontrolle RRIYDLIEL fehlte, wurde entschieden, diese Zellen in einem NK-Zell-Assay einzusetzen, um zu testen, ob der Assay auch mit Zelllinien funktioniert. Dazu wurde zum einen als Kontrolle der NK-Zell-Assay wie zuvor mit exogener Peptid-Zugabe durchgeführt und zum anderen der NK-Zell-Assay mit den stabilen Zelllinien durchgeführt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Verhältnisse von Effektorzellen zu Zielzellen verwendet, 5:1 und 10:1. Der Assay wurde mit insgesamt 6 Probanden durchgeführt.



Abb. 2.22: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁻- und KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit exogen bzw. endogen Peptid-beladenen T2 HLA-B*27:05 Zielzellen.

Die NK-Zell-Aktivität gemessen am prozentualen Anteil an CD107a⁺-NK-Zellen wurde normalisiert auf die NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit T2 HLA-B*27:05 Zellen ohne Peptid. Es wurden NK-Zellen von sechs gesunden Probanden untersucht. Zur Stimulation der NK-Zellen wurden sowohl die Kontrollpeptide als auch eine kleine Auswahl an HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptiden eingesetzt, die entweder exogen mit einer Konzentration von 100 μ M zu den Zielzellen gegeben wurden oder endogen von den generierten T2 Zelllinien exprimiert wurden. Bei den Ansätzen mit der endogenen Peptid-Expression wurde beim Effektor:Target-Verhältnis (E:T) zwischen einem Verhältnis von 5:1 (E:T; mittlere Spalte) und 10:1 (E:T; rechte Spalte) variiert. In der oberen Reihe ist die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁻-NK-Zellen und in der unteren Reihe die NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁺-NK-Zellen dargestellt. Statistische Signifikanzen wurden mittels One-way ANOVA bestimmt (ns > 0,05, *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001, ****p < 0,0001).

In der grafischen Darstellung ist die Inhibitionsfähigkeit der viralen Peptide auf KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen abgebildet, wobei die Peptide entweder exogen hinzugegeben (linke Spalte) oder endogen exprimiert wurden (mittlere und rechte Spalte; **Abb. 2.22**). Der obere Teil der Grafik zeigt die Inhibitionsfähigkeit der Peptide auf KIR3DL1⁻-NK-Zellen, während der untere Teil der Grafik die Inhibitionsfähigkeit der Peptide auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen widerspiegelt. Die Assays mit endogener

Ergebnisse

Peptid-Expression wurden mit einer Effektor:Target:Ratio von 5:1, dessen Ergebnisse in der mittleren Spalten abgebildet sind, bzw. 10:1, dargestellt in der rechten Spalte, durchgeführt.

Bei dem Assay mit exogener Peptid-Zugabe fielen die Ergebnisse wie zu erwarten aus (**Abb. 2.22** linke Spalte). Die Auswahl an Peptiden zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf KIR3DL1⁻-NK-Zellen, wohingegen bezüglich der KIR3DL1⁺-NK-Zellen die Positiv-Kontrolle den stärksten inhibitorischen Effekt aufzeigte und die Peptide 506 und 871 einen sehr guten inhibitorischen Effekt zeigte, besser als dien Prototyp-Sequenz (497). Die Prototyp-Sequenz zeigte auch einen inhibitorischen Effekt, allerdings war dieser begründet durch die geringe Probandenzahl nicht signifikant.

Werden die Ergebnisse in Bezug auf die Inhibitionsfähigkeit der endogen exprimierten Peptide auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen beider Ansätze betrachtet (Abb. 2.22 mittlere und rechte Spalte), zeigten diese das gleiche Inhibitionsmuster wie die Ergebnisse des Assay mit den exogen hinzugegebenen Peptiden. Die Positiv-Kontrolle und die Peptide 506 und 871 zeigen einen starken Inhibitionseffekt, wogegen die Prototyp-Sequenz einen schwächeren inhibitorischen Einfluss aufwies. Allerdings waren die Ergebnisse in diesen Ansätzen gegenüber KIR3DL1-negativen NK-Zellen nicht wie erwartet. Auch hier zeigten die Zelllinien einen inhibitorischen Effekt auf die NK-Zellen, die sogar im Vergleich zu den Ergebnissen mit den KIR3DL1-positiven NK-Zellen stärker waren. Ein Erklärungsansatz ist, dass der Vorgang der Transduktion an sich zur Herstellung der Zelllinien möglicherweise die Morphologie der Zellen so verändert hat bzw. die Oberflächenexpression von anderen NK-Zell-Liganden verursacht hat, sodass die veränderten T2 Zellen einen unerwarteten Einfluss auf die KIR3DL1⁻-NK-Zellen genommen haben. Die fehlende Zelllinie, die die Negativ-Kontrolle hätte exprimieren sollen, ist hierbei nicht von Belang, da diese unabhängig vom Ergebnis nicht zur Klärung der Ergebnisse hätte beitragen können. Auffällig ist jedoch, dass das Inhibitionsmuster identisch mit dem ist, was zuvor in den Assays mit exogener Peptid-Zugabe und auch bei den Assays mit endogener Peptid-Expression in Bezug auf KIR3DL1positiver NK-Zellen beobachtet wurde.

3 Diskussion

Viren haben in der Ko-Evolution mit ihrem Wirt Immunevasionsstrategien entwickelt, um der angeborenen Immunantwort durch NK-Zellen zu entgehen bzw. um diese zu hemmen. Eine Strategie dabei ist das Präsentieren viraler Peptide auf HLA Klasse I-Molekülen, um über die Interaktion mit NK-Zell-Liganden die NK-Zell-Antwort zu beeinflussen. Da genetische Assoziationsstudien eine höheren Ausheilungsrate von einer akuten Hepatitis C Erkrankung mit der KIR3DL1/HLA-Bw4-Interaktion gezeigt haben (Thöns et al., 2017), sollte konkret in dieser Arbeit die Interaktion des inhibierenden NK-Zell-Rezeptors KIR3DL1 und seinem Liganden HLA-B*27:05 im Komplex mit HCV- bzw. HBV-Peptiden untersucht werden.

Mithilfe eines Zell-Kultur-Systems wurden zur Untersuchung des Einflusses viraler Peptide auf die Inhibition der NK-Zell-Aktivierung HLA-B*27:05-exprimierende Zielzellen (T2 HLA-B*27:05-Zellen) exogen mit Peptid-Varianten des bereits bekannten immundominanten HLA-B*27:05-restringierten HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitops und dem in dieser Arbeit neu bestätigten immundominanten HLA-B*27:05-restringierten HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop beladen und für die Stimulation von KIR3DL1exprimierenden NK-Zellen eingesetzt. Die Aktivierung der NK-Zellen wurde durchflusszytometrisch mithilfe der Expression des Degranulationsmarkers CD107a bestimmt und innerhalb der Sequenzvarianten eines viralen Epitops verglichen. Dabei sollte die Hypothese untersucht werden, ob in einer chronischen Virusinfektion Peptid-Varianten selektioniert werden, um die NK-Zell-Inhibition als Evasionsmechanismus zu verstärken.

3.1 Sequenzanalyse zum HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop ARMILMTHF

Bevor die funktionalen NK-Zell-Assays zur Untersuchung der Hypothese zur Selektion von Peptid-Varianten zur Optimierung der NK-Zell-Inhibition durchgeführt wurden, wurden Sequenzanalysen zum HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop mit einer online zugänglichen Kohorte mit 10701 Probanden vorgenommen. Dabei ergab sich zum einen, wie bereits von Neumann-Haefelin *et al* gezeigt (Neumann-Haefelin et al., 2006), dass die Aminosäure-Abfolge ARMILMTHF die Epitop-Sequenz der HCV GT1 Genome darstellt (**Abb. 2.1**). Die Sequenzanalyse zeigte eindeutige Ergebnisse, da von 6885 untersuchten HCV-Genomen 83,28 % dieses Nonamer aufwiesen (**Tab. 2.1**). Wurde diese Aminosäureabfolge genauer betrachtet, wiesen die für die Bindung eines Peptids an HLA-B*27:05 wichtigen Positionen 2, 3 und 9 (**Abb. 1.3**) mit einem Arginin (R), Methionin (M) und Phenylalanin (F) die geeigneten Aminosäuren auf, um an HLA-B*27:05 binden zu können. Des Weiteren konnte durch einen T-Zell-Assay mit einem HCV-positiven HLA-B*27:05-positiven Probanden bestätigt werden, dass dieses Epitop ein immundominantes HLA-B*27:05-restringiertes T-Zell-Epitop ist, da die T-Zellen des getesteten Probanden T-Zell-Antworten nach Stimulation mit dem Epitop und mit einigen seiner

Sequenz-Varianten zeigte (**Abb. 2.3**). Daher konnte mit Bestimmtheit gesagt werden, dass das zu untersuchende HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptid ein immundominantes HLA-B*27:05-restringiertes Epitop ist.

Zum anderen schien die Position 7 des Epitops eine besondere Rolle bei der Peptid-Variabilität einzunehmen (Abb. 2.2). Der Grund für diese Annahme war die Tatsache, dass unter Ausschluss der nicht identifizierbaren Aminosäuren (X) an dieser Position die Aminosäure Threonin (T) ausschließlich durch Prolin (P) ersetzt wurde. Nicht nur charakteristisch, sondern auch strukturell weisen diese beiden Aminosäuren Unterschiede auf. Prolin ist eine Aminosäure mit unpolaren/hydrophoben Eigenschaften und beinhaltet neben der Carboxylgruppe nur noch einen Stickstoffring. Threonin weist neben der Carboxylgruppe, die beide Aminosäuren gemein haben, eine Amino-, eine Sauerstoff- und eine Methylgruppe auf, wodurch das Threonin polar/neutrale Eigenschaften erhält.

Der Aminosäureaustausch von Threonin zu Prolin wird vermutlich genetisch durch einen Einzelbasenaustausch bei der DNA-Replikation verursacht, bei der zufällig die erste Base des für Threonin kodierenden Codons von einem Cytosin (C) zu einem Adenin (A) substituiert wird. Allerdings gibt es keine Untersuchung, die diese Vermutung bestätigen können. Das entstandene Virus scheint durch diese Substitution, wie Dazert *et al* in einer Studie über die Reaktivität von T-Zellen auf die Peptid-Varianten des NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitops gezeigt hat, keinen signifikanten Verlust der viralen Fitness, jedoch dadurch einen Vorteil gegenüber T-Zellen zu haben, die für dieses Epitop restringiert sind (Dazert et al., 2009). Daraus lässt sich die Vermutung anstellen, dass die Aminosäure-Substitution vom polaren/neutralen Threonin (T) zum unpolar/hydrophoben Prolin (P) auf Protein-Ebene keinen großen Einfluss auf die Funktionalität der Polymerase NS5B (Nicht-Strukturprotein 5B) auszuüben scheint.

Allerdings verändert diese Substitution auf Peptid-Ebene gebunden am HLA-Molekül den Einfluss auf die T-Zell-Antwort, da bereits durch Dazert *et al* gezeigt wurde, dass diese Peptid-Variante eine starke Reduktion der T-Zell-Aktivität, also einen *"T-Zell-Escape"*, verursachte (Dazert et al., 2009). Ferner konnte durch den in dieser Arbeit durchgeführten funktionalen T-Zell-Assay beobachtet werden, dass nicht nur die Variante mit der Einzelsubstitution an Position 7 (T \rightarrow P), sondern auch alle anderen Varianten, die an Position 7 das Prolin und einen weiteren Aminosäureaustausch an Position 4 oder 6 des Peptids aufwiesen, ein *"T-Zell-Escape"* zeigten, da diese Varianten keine adaptive Immunantwort auslösten (Abb. 2.3).

Nun würde die Vermutung nahe liegen, dass diese Epitop-Varianten selektiert wurden, um genau diesen *"T-Zell-Escape"* zu verursachen. Allerdings sind für die Bindung mit dem TCR die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen 1, 4 und 8 des Epitops entscheidend (Bowness et al., 1999). Eine Substitution an Position 4 kam nur bei einer Variante vor. Der Theorie nach hätte also nur diese

Variante einen *"T-Zell-Escape"* zeigen sollen. Warum die T-Zell-Aktivität durch Substitutionen an den Positionen 6 und 7 beeinflusst wurde, kann hier nur gemutmaßt werden. Vermutlich wurde die Struktur des Peptids durch die Substitutionen so verändert, dass die Seitenketten der besagten Aminosäuren nicht mehr nach oben hinausragen (Bowness et al., 1999). Wahrscheinlich erzeugen die substituierten Aminosäuren an den Positionen 6 und 7 andere Wechselwirkungen mit den umliegenden Aminosäuren, wodurch sich die Ausrichtung der Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen 1, 4 und 8 verändert haben. Auf diese Weise würde die Bindung des TCR an den HLA-Peptid-Komplex verschlechtert sein oder gänzlich verloren gehen.

Position 7 des Epitops ist entscheidend für die Interaktion des Peptid/HLA-Bw4-Komplexes mit KIR3DL1 (Parham et al., 2012, O'Connor and McVicar, 2013). Daher wäre es wahrscheinlicher, dass hier die Peptid-Selektion für einen *"NK-Zell-Escape"* aufgetreten sein könnte. Diese Hypothese galt es im Rahmen dieser Doktorarbeit mithilfe der funktionalen NK-Zell-Assays zu untersuchen.

3.2 Sequenzanalyse zum HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop ARFYPNVTK

Durch vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde mithilfe einer *in silico* Sequenzanalyse mit 379 HBV-Probanden ein nonamerisches Peptid mit der Aminosäurefolge ARFYPNVTK als HLA-B*27:05-restringiertes HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop vorhergesagt. Dieses Peptid zeigte zum einen Sequenz-Varianten und zum anderen eine signifikante Substitutionsrate an Position 7 des Peptids. Dies waren zwei Bedingungen, die dieses theoretische Epitop interessant für weitere Analysen machte. Auch das zuvor untersuchte HCV Epitop erfüllt diese beiden Bedingungen. Zudem konnte durch den Vergleich mit dem Binde-Motiv für HLA-B*27:05-restringierte Epitope (**Abb. 1.3**) bestätigt werden, dass das vorhergesagte HBV-Epitop potenziell an HLA-B*27:05 binden würde, da die Epitop-Sequenz aus neun Aminosäuren besteht und an Position 2, 3 und 9 die Aminosäuren Arginin (R), Phenylalanin (F) und ein Lysin (K) beinhaltet, die die Bindung an HLA-B*27:05 begünstigen.

Mittels funktionalen T-Zell-Assays wurde dieses *in silico* untersuchte Peptid als immundominantes HLA-B*27:05-restringiertes Epitop bestätigt (**Abb. 2.6**). Ebenso zeigte die Hälfte der sechs Epitop-Varianten eine T-Zell-Antwort. Bei den drei anderen Varianten war keine Immunreaktion zu messen, weshalb hier ein *"T-Zell-Escape"* zu vermuten war. Die Selektion der drei Varianten mit Immunantworten könnte auf einen *"NK-Zell-Escape"* zurückzuführen sein.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde dieses HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop als geeignet erachtet, um gemeinsam mit dem HCV Epitop und dessen Sequenz-Varianten die Fragestellung der Beeinflussbarkeit von KIR3DL1-positiven NK-Zellen durch HLA-B*27:05-gebundene Virus-Peptide zu untersuchen.

3.3 Beeinflussbarkeit von KIR3DL1⁺-NK-Zellen durch HLA-B*27:05-gebundene HCV- und HBV-Peptide

Die Peptide HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ und HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ sind strukturell und funktional bestätigte immundominante HLA-B*27:05-restringierte Epitope. Beide Epitope weisen Sequenz-Varianten auf, die vermutlich entweder für einen "*T*-" oder einen "*NK-Zell-Escape"* selektioniert wurden. Da nicht alle, sondern nur ein Teil dieser Varianten eine T-Zell-Antwort verhindern, wurde vermutet, dass die Varianten-Selektion einem "*NK-Zell-Escape"* zu Grunde lag und der partielle "*T-Zell-Escape"* ein zusätzlicher zufälliger Benefit sei.

Somit wurden funktionale NK-Zell-Assays durchgeführt, in denen KIR3DL1⁺-NK-Zellen mit den viralen Prototyp-Peptiden bzw. dessen Peptid-Varianten, die an HLA-B*27:05 gebunden waren, stimuliert und deren Aktivität mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Menge an exprimierten Degranulationsmarker CD107a gemessen wurden. Es wurde erwartet, dass im Falle der Varianten-Selektion für einen *"NK-Zell-Escape"* die NK-Zell-Antworten auf die Stimulation mit den Peptid-Varianten geringer ausfällt als die Antworten gegenüber der Prototyp-Sequenzen ARMILMTHF (HCV) bzw. ARFYPNVTK (HBV).

Als Voraussetzung für die funktionalen NK-Zell-Assays musste zu Beginn bestätigt werden, ob die zu untersuchenden Peptide an das HLA-B*27:05-Molekül der Zielzellen binden und dadurch die Oberflächenexpression des HLA/Peptid-Komplex erhöhen. Die dafür durchgeführten Experimente zur Untersuchung der Stabilisierungsfähigkeit der einzelnen Peptide (Abb. 2.8 + Abb. 2.9) wurden vergleichend zu den Kontroll-Peptiden FLU NP383-391 (Positivkontrolle), EBV EBNA3C258-266 (Negativkontrolle) und einem nicht-bindenden Peptid durchgeführt. Für alle getesteten Peptide ergab sich eine erhöhte Oberflächenexpression von HLA-B*27:05 nach Stabilisierung mit diesen. Alle HCV-Peptide sorgten für eine stärkere HLA-B*27:05-Expression als die Kontroll-Peptide, wobei die Prototyp-Sequenz ARMILMTHF die geringste Erhöhung der Oberflächenexpression im Vergleich zu dessen Peptid-Varianten zeigte (Abb. 2.8 + Tab. 2.4). Beim HBV Epitop war der gegenteilige Effekt der Fall. Hier konnte die Prototyp-Sequenz ARFYPNVTK die stärkste Steigerung der Oberflächenexpression im Vergleich zu seinen Peptid-Varianten erzeugen. Allerdings lag die HLA-B*27:05-Stabilisierung aller HBV-Peptide zwischen denen der Kontroll-Peptide (Abb. 2.9 + Tab. 2.3). Wurden die Positiv- und Negativkontrolle untereinander betrachtet, fiel wider Erwarten auf, dass die Negativkontrolle, die bekanntermaßen keinen inhibitorischen Einfluss auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen nimmt, HLA-B*27:05 besser stabilisierte als die Positivkontrolle, die KIR3DL1⁺-NK-Zellen sehr stark inhibieren kann (Stewart-Jones et al., 2005). Es wurde erwartet, dass Peptide, die HLA-B*27:05 besser stabilisieren, einen stärkeren Einfluss auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen nehmen. Aber auch bei der Betrachtung der Inhibitionseffekte der HCV

und HBV Peptide unter Berücksichtigung ihrer Stabilisierungsfähigkeiten konnte kein Zusammenhang zwischen der Menge an stabilisierten HLA/Peptid-Komplexe und dessen inhibitorischen Effekt auf KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen festfestellt werden.

Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die getesteten Peptide lediglich zusammen mit dem HLA-Molekül einen stabilen Komplex bildeten, der auf der Zelloberfläche exprimiert wird, um potenziell Einfluss auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen nehmen zu können. Wie stark dieser ausfällt, hängt allerdings nicht von der Menge des HLA/Peptid-Komplexes ab, sonderun muss eine andere Ursache haben.

Da offenbar nicht die Menge des HLA/Peptid-Komplexes ausschlaggebend für den Inhibitionseffekt ist, lag die Vermutung nahe, dass die Aminosäuresequenz selbst dafür verantwortlich ist. Fadda *et al* konnten bereits mit dem HIV-Epitop Gag₂₄₀₋₂₄₉ TSTLQEQIGW zeigen, dass die Sequenzvariabilität des Epitops die Bindung an KIR3DL1 beeinflusst (Fadda *et al*, 2011). Daher ist es denkbar, dass die Sequenzunterschiede der einzelnen Varianten zur Prototyp-Sequenz für den individuellen Inhibitionseffekt verantwortlich sind.

Bei den funktionalen NK-Zell-Assays mit den HCV und HBV Peptiden wurde festgestellt, dass Position 7 die Bindung zu KIR3DL1 und somit den Inhibitionseffekt beeinflusst. Im Fall der HCV Peptide zeigte die Variante mit dem Prolin an Position 7 im Vergleich zur Prototyp-Sequenz eine Verstärkung des Inhibitionseffekts. Bei den HBV Peptiden zeigte die Variante mit der Substitution an Position 7 eine Verminderung des Inhibitionseffekts. Darüber hinaus scheint auch Position 6 des Nonamers die Bindung zu KIR3DL1 zu beeinflussen. Bei der Untersuchung der HCV Peptide zeigte sich der Einfluss sowohl bei der Variante mit der Einzelsubstitution an Position 6 als auch bei den Varianten mit einer Doppelmutation an Position 6 und 7. Jede Variante zeigte einen stärkeren Inhibitionseffekt als die Prototyp-Sequenz. Das gleiche gilt für die Untersuchung der HBV Peptide. Die Variante mit der Einzelsubstitution an Position 6 und auch die mit den Doppelmutationen erreichten nicht die Inhibitionsstärke der Prototyp-Sequenz.

Es könnte gemutmaßt werden, dass der Einfluss der Substitution auf den Inhibitionseffekt bzw. die Bindung zu KIR3DL1 durch den Austausch von Aminosäuren unterschiedlicher Gruppen hervorgerufen wird. Allerdings handelte es sich bei den hier untersuchten Mutationen sowohl um den Austausch von Aminosäuren mit den gleichen Eigenschaften als auch um Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften. Als Beispiel kann hier der Vergleich zwischen den Einzelmutationen an Position 7 beider viraler Peptide angegeben werden. Bei HCV fand ein Austausch einer Aminosäure von polar/neutral zu unpolar/hydrophob (T \rightarrow P) statt, wohingegen beim HBV Peptid die Eigenschaften der substituierten Aminosäure (V \rightarrow A) mit unpolar/hydrophob gleich geblieben sind. Der Theorie nach sollte der

Austausch von Aminosäuren aus der Gruppe mit gleichen Eigenschaften keinen Einfluss auf die Bindung zu KIR3DL1 haben (stille Mutation). Trotzdem zeigten beide Substitutionen einen Einfluss auf die Inhibitionsstärke. Während sich der Inhibitionseffekt beim HCV Peptid verbessert hat, hat sich der Inhibitionseffekt beim HBV Peptid verschlechtert. Das gleiche konnte mit den Einzelmutationen an Position 6 beobachtet werden. Aus diesem Grund liegt der Schluss nahe, dass nicht die Aminosäure-Eigenschaften selbst, sondern die aus der Substitution resultierende Peptidstruktur und die damit verbundenen Wechselwirkungsmöglichkeiten entscheidend dafür ist, wie gut der HLA/Peptid-Komplex an KIR3DL1 bindet.

In Anbetracht der Inhibitionseffekte der Sequenz-Varianten der HBV und HCV Epitope im Zusammenhang mit den Aminosäure-Eigenschaften lässt sich schlussfolgern, dass unabhängig davon, ob die Aminosäure-Substitution in der Epitop-Sequenz mit einer Veränderung der Aminosäure-Eigenschaften einhergeht oder nicht, die entstandene Strukturänderung des Peptids die Bindung an KIR3DL1 und somit die Inhibitionsfähigkeit KIR3DL1⁺-NK-Zellen beeinflusst.

Im Zusammenhang mit der Fragestellung, ob die Varianten für einen "*NK-Zell-Escape"* entstanden sind, lässt sich bezogen auf die HBV Peptide abschließend sagen, dass die Existenz der selektionierten HBV-Peptid-Varianten nicht mit einem *"NK-Zell-Escape"* einhergehen. Das Auftreten der Peptid-Varianten ist zufällig und begünstigt je nach Substitution einen *"T-Zell-Escape"* und geht teilweise mit einer Abschwächung der Inhibitionsstärke gegenüber NK-Zellen einher.

Bezüglich der HCV-Peptid-Varianten kann gefolgert werden, dass diese selektioniert wurden, um einer Immunantwort zu entgehen. Ob allerdings die Varianten selektioniert wurden, um einen "*NK-Zell-Escape"* zu verursachen und als zusätzlicher Benefit ein "*T-Zell-Escape"* resultierte oder ob umgekehrt die Selektion einen "*T-Zell-Escape"* nach sich zog und zugleich ein "*NK-Zell-Escape"* verursacht wurde, kann nicht abschließend gesagt werden. Wahrscheinlicher ist allerdings die Selektion für einen "*NK-Zell-Escape"*, da die Mehrheit der selektionierten Varianten NK-Zellen inhibieren, aber nur die Hälfte der Varianten einen "*T-Zell-Escape"* bewirkten. Zudem spricht die Position der substituierten Aminosäuren auch eher dafür, dass der Selektionsdruck durch die angeborene Immunantwort verursacht wurde, da die Position 7 des Nonamers eine große Bedeutung für die Bindung an KIR3DL1 hat.

3.4 Diversität der Aminosäuren an den Positionen 4 bis 9 der

HLA-B*27:05-restringierten Peptide

Die Aminosäuren lassen sich funktionell in die drei Gruppen "unpolar", "polar" und "geladen" einteilen. Zur Gruppe der unpolaren Aminosäuren gehören Glycin (G), Alanin (A), Valin (V), Leucin (L), Isoleucin (I), Prolin (P), Cystein (C), Methionin (M), Phenylalanin (F) und Tryptophan (W). Diese Aminosäuren sind aufgrund ihrer unpolaren, lipophilen Seitenketten wichtig für die Bindung mit anderen Aminosäuren. Zur Gruppe der polaren, neutralen Aminosäuren gehören Serin (S), Threonin (T), Tyrosin (Y), Asparagin (N) und Glutamin (Q). Diese sind aufgrund dessen, dass die Seitenketten nicht ionisierbar sind, neutral. Die Gruppe der geladenen Aminosäuren lässt sich in negativ geladene (saure) und positiv geladene (basische) Aminosäuren einteilen. Die basischen, positiv geladene Aminosäuren sind Histidin (H), Lysin (K) und Arginin (R), wohingegen Asparaginsäure (Aspartat, D) und Glutaminsäure (Glutamat, E) zu den sauren, negativ geladenen Aminosäuren zählen. Aufgrund ihrer Ladung können sie an ionischen Wechselwirkungen teilnehmen (Horn et al., 2012).

Dass die Aminosäureposition und -eigenschaften Einfluss auf die Bindung an KIR3DL1 nehmen, hat bereits Stewart-Jones *et al* gezeigt. Deren Analysen zu Folge sind die Positionen 4 und 8 der Peptide von großer Bedeutung für die Liganden-Bindung, da die dort befindlichen Aminosäure-Seitenketten aus dem HLA/Peptid-Komplex herausragen. Zudem konnte für das FLU Peptid gezeigt werden, dass auch die Seitenkette des Arginins (R) an Position 7 aus der Bindetasche herausragt und somit für die Bindung eines Liganden zugänglich ist. Für das von Stewart-Jones *et al* untersuchte HIV Peptid HIV Gag₂₆₃₋₂₇₂ KRWIILGLNK konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Seitenkette des Leucins (L) an Position 6 herausragt und daher auch einen Einfluss auf die Liganden-Bindung haben kann (Stewart-Jones *et al.*, 2005). Eine neue Studie zu diesem Epitop konnte in Bezug auf dessen immunevasiven Einfluss auf NK-Zellen zeigen, dass verkürzte Epitop-Varianten produziert werden, die über ein konserviertes N-terminales Motiv an HLA-B*27:05 binden und das vollständige Epitop verdrängen. Dieser Mechanismus resultierte in einem *"NK-Zell-Escape"* (Pymm et al., 2022).

Eine weitere Analyse von Stewart-Jones *et al*, in der das elektrostatische Oberflächenpotenzial der HLA/Peptid-Komplexe von HLA-B*27:05 und FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ bzw. EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ untersucht wurde, ergab eine Auffälligkeit beim EBV-Peptid. Auf der mutmaßlich KIR3DL1-bindenden Oberfläche des MHC-Moleküls wurde eine erhöhte lokale negative Ladungsdichte an P8 des Peptids festgestellt. Dem gegenüber steht ebenfalls die negative Ladung in der Binderegion des KIR3DL1-Moleküls. Möglicherweise erklärt dies die Unfähigkeit des KIR3DL1-Rezeptors, den EBV-Komplex zu binden (Stewart-Jones et al., 2005).

Die nachfolgende Tabelle fasst die Inhibitionseffekte und die Aminosäureeigenschaften aller getesten Peptide zusammen. Dabei sind nur die Aminosäurepositionen 4 bis 9 der Nonamere interessant, da diese von den Substitutionen betroffen sind und laut Bowness *et al* neben Position 1 auch die Positionen 4 und 8 wichtig für die Bindung an KIR3DL1 sind (Bowness et al., 1999). Zudem zeigte Stewart-Jones *et al*, dass je nach Pepitd auch die Positionen 6 und 7 von Bedeutung sein könnten (Stewart-Jones et al., 2005).

Tab. 3.1: Übersichtstabelle zu den getesteten Peptiden bezüglich ihrer Inhibitionseffekte gegenüber KIR3DL
und bezüglich der Eigenschaften der Aminosäuren an Position 4 bis 9 der Nonamere.

Peptid- nummer	Peptid	Inhi- bitions- effekt	Aminos äure- Eigen- schaft Position 4	Aminos äure- Eigen- schaft Position 5	Aminos äure- Eigen- schaft Position 6	Aminos äure- Eigen- schaft Position 7	Aminos äure- Eigen- schaft Position 8	Aminos äure- Eigen- schaft Position 9
911	RRIYDLIEL	1,0	neutral	negativ geladen	unpolar	unpolar	negativ geladen	unpolar
912	SRYWAIRTR	0,50 ≤ x ≤ 0,40	unpolar	unpolar	unpolar	positiv geladen	neutral	positiv geladen
497	ARMILMTHF	0,80 ≤ x ≤ 0,75	unpolar	unpolar	unpolar	neutral	positiv geladen	unpolar
872	ARMILLTHF	0,85	unpolar	unpolar	unpolar	neutral	positiv geladen	unpolar
506	ARMILMPHF	0,70	unpolar	unpolar	unpolar	unpolar	positiv geladen	unpolar
824	ARMVLMPHF	0,70	unpolar	unpolar	unpolar	unpolar	positiv geladen	unpolar
870	ARMILLPHF	0,65	unpolar	unpolar	unpolar	unpolar	positiv geladen	unpolar
871	VRMILLPHF	0,65	unpolar	unpolar	unpolar	unpolar	positiv geladen	unpolar
830	ARFYPNVTK	0,75	neutral	unpolar	neutral	unpolar	neutral	positiv geladen
836	ARFYPKKTK	0,95 ≤ x ≤ 0,90	neutral	unpolar	positiv geladen	positiv geladen	neutral	positiv geladen
832	ARFFPNATK	0,85	unpolar	unpolar	positiv geladen	unpolar	neutral	positiv geladen
834	ARFYPKATK	0,85	neutral	unpolar	positiv geladen	unpolar	neutral	positiv geladen
835	ARFYPKGTK	0,85	neutral	unpolar	positiv geladen	unpolar	neutral	positiv geladen
831	ARFYPKVTK	0,85 ≤ x ≤ 0,80	neutral	unpolar	positiv geladen	unpolar	neutral	positiv geladen
833	ARFYPNVTK	0,8	neutral	unpolar	neutral	unpolar	neutral	positiv geladen

Beim Vergleich aller getesteten Peptide ergaben sich folgende Auffälligkeiten:

- Die Negativkontrolle (Peptid 911), die keinen Inhibitionseffekt verursachte, hat als einziges Peptid negative Ladungen. P8, die mitunter entscheidend für die Bindung an KIR3DL1 ist (Bowness et al., 1999), weist eine negativ geladene Aminosäure auf.
- 2) Die Positivkontrolle hat zwei positiv geladene Aminosäuren (P7 und P9). Zwischen den positiv geladenen Aminosäuren ist an P8 eine neutrale Aminosäure, somit wird P8 von positiv geladenen Aminosäuren umringt.
- 3) Bei den HCV Peptiden scheint die Kombination von einer neutralen Aminosäure an P7 und einer positiv geladenen Aminosäure an P8 die Bindung negativ zu beeinflussen, da diese Peptid-Varianten (497 und 872) eine schwache Inhibition gezeigt haben.
- 4) Bei den HCV Peptiden scheint die Kombination aus einer unpolaren Aminosäure an P6 und einer positiv geladenen Aminosäure an P8 den Inhibitionseffekt zu verstärken. Allerdings scheint es wichtig zu sein, welche unpolare Aminosäure an P6 ist, da die Peptide mit einem Leucin an P6 (870 und 871) einen stärkeren Inhibitionseffekt aufwiesen als die mit einem Methionin (506 und 824). Die Seitenketten beider Aminosäuren sind etwa gleich lang, das Methionin besitzt aber im Gegensatz zum Leucin keinen Kohlenstoff- sondern ein Schwefel-Molekül.
- 5) Alle HCV Peptide, die an Position 7 ein Prolin, also eine Stickstoff-haltige Aminosäure aufwiesen, hatten einen starken Inhibitionseffekt. Beim Vergleich mit der Positivkontrolle fiel auf, dass auch diese an Position 7 eine Stickstoff-haltige Aminosäure besitzt.
- 6) Das HBV Peptid mit dem schlechtesten Inhibitionseffekt (836) hat drei positiv geladene Aminosäuren (P6, P7 und P9). Zudem ist an P8 eine neutrale Aminosäure. Die Reihenfolge ähnelt zwar die der Positivkontrolle, allerdings hat diese an P6 eine unpolare Aminosäure. Dies könnte der ausschlaggebende Punkt sein, warum dieses Peptid trotz positiver Ladungen einen sehr schwachen Inhibitionseffekt zeigte. Möglicherweise stoßen sich die beiden nebeneinander gelegenen positiv geladenen Aminosäuren ab und ändern so die Struktur des Peptids, dass die Positionen P4 und P8 nicht mehr nach oben, sondern z.B. zur Seite hinausragen.
- 7) Die Prototyp-Sequenz des HBV Peptids (830), die die stärkste Inhibition gezeigt hat, und das Peptid 833 mit dem zweitstärksten Inhibitionseffekt weisen bei ihrer Aminosäureabfolge die gleichen Eigenschaften auf, unterscheiden sich allerdings an P7 in ihrer Aminosäure. Der Prototyp hat ein Valin, Peptid 833 ein Alanin. Valin unterscheidet sich zu Alanin ausschließlich darin, dass die Seitenkette durch das zusätzliche Kohlenstoff-Molekül länger ist.
- Die Peptide 832, 834 und 835 haben einen gleich hohen Inhibitionseffekt. Peptid 831 besaß eine etwas bessere Inhibitionsf\u00e4higkeit als die genannten drei Peptidvarianten. Die

Aminosäureeigenschaften bei den Peptiden 831, 834 und 835 war identisch. Sie unterschieden sich darin, dass, so wie beim Vergleich zwischen der Prototyp-Sequenz und Peptid 833, das Peptid 831 mit der etwas stärkeren Inhibitionsfähigkeit das langkettige Valin an P7 hat. Peptid 834 und 835 haben an dieser Position eine Aminosäure mit einer kürzeren Seitenkette (Glycin bzw. Alanin). Das Peptid 832 unterscheidet sich zur Prototyp-Sequenz nur in der Aminosäure an P4. Dieser Unterschied geht mit einer Änderung der Aminosäureeigenschaft von neutral zu unpolar einher. Dies könnte der Grund sein, warum sich ihre Inhibitionsfähigkeit unterscheidet.

Resultierend aus den Auffälligkeiten lassen sich folgende Hypothesen aufstellen:

- a) Negative Ladungen im Peptid zwischen den Positionen 4 und 9 erschweren/verhindern die Bindung an KIR3DL1 und das Peptid zeigt keinen Inhibitionseffekt.
- b) Positiv geladene Aminosäuren im hinteren Bereich des Peptids stärken die Bindung an KIR3DL1 und somit den Inhibitionseffekt. Allerdings sollten gleich geladene Aminosäuren nicht direkt nebeneinander liegen.
- c) Langkettige, Kohlenstoff-haltige Aminosäuren an P6 verstärken die Bindung an KIR3DL1.
- d) Stickstoffhaltige Aminosäuren an P7 stärken die Bindung an KIR3DL1.

Um diese Hypothesen zu untersuchen, könnten HLA-B*27:05-restringierte Peptide in Anlehnung an das Bindemotiv von HLA-B*27:05-restringierten Epitopen (Abb. 1.3) kreiert werden, die die oben genannten Bedingungen erfüllen. Mit diesen Peptiden könnten dann NK-Zell-Assays analog zu den in dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente durchgeführt werden. Alternativ könnte in Epitop-Datenbanken gezielt nach Epitopen gesucht werden, die diesen Bedingunden entsprechen, um zu sehen, ob diese häufiger selektioniert werden. Möglicherweise lassen sich dadurch weitere Peptidsequenzen finden, die in dem Assay untersucht werden könnten. Sollten sich die Hypothesen bewahrheiten, müssten diese Peptide einen starken Inhibitionseffekt auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen ausüben.

Eine weitere Methode zur Untersuchung, ob die genannten Hypothesen stimmen, wären Kristall-Strukturanalysen zum einen vom HLA/Peptid-Komplex der getesteten Peptide und zum anderen von dessen Rezeptor-Ligand-Interaktion. Als Kontrolle können die Kristall-Struktur-Analysen von Stewart-Jones *et al* zu den Kontrollpeptiden FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ gebunden an HLA-B*27:05 betrachtet werden (Stewart-Jones et al., 2005).

3.5 Beeinflussbarkeit von NK-Zellen aufgrund ihrer KIR3DL1-Allel-Diversität und des Liganden-Dimorphismus HLA-Bw4 80(I) und HLA-Bw4 80(T)

Wie bereits beschrieben, gibt es eine hohe KIR3DL1-Allel-Diversität, die sich nicht nur genetisch, sondern auch phänotypisch unterscheiden. Aufgrund ihrer Oberflächenexpression lassen sich die KIR3DL1-Allele in drei verschiedene Allel-Gruppen (KIR3DL1^{high}, KIR3DL1^{low} und KIR3DL1^{null}) einteilen. Dem Rezeptor gegenüber steht der Ligand HLA-Bw4, der an der Position 80 des Bindemotivs einen Dimorphismus aufweist. An dieser Position ist entweder ein Isoleucin [HLA-Bw4 80(I)] oder ein Threonin [HLA-Bw4 80(T)] vorhanden. Sowohl die Rezeptor-Allel-Diversität als auch der Liganden-Dimorphismus könnten deren Interaktion beeinflussen.

In der hier durchgeführten Studie wurde die Inhibitionsstärke von KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit dem mit einem viralen Peptid gebundenen Liganden HLA-B*27:05 (HLA-Bw4) betrachtet. Zum einen wurden hierbei die NK-Zellen in die KIR3DL1-Gruppen KIR3DL1^{high}, KIR3DL1^{high/low} und KIR3DL1^{low} und zum anderen die NK-Zellen nach Probanden mit oder ohne HLA-Bw4 bzw. mit HLA-Bw4 80(I) oder HLA-Bw4 80(T) eingeteilt, um mögliche KIR3DL1-Allelgruppen- oder HLA-Bw4-Effekte zu untersuchen. Diese Studie erlaubte es allerdings nicht, einzelne KIR3DL1-Allel/HLA-Bw4-Kombinationen zu analysieren. Dafür war die genetische Variabilität der Probanden zu hoch bzw.

Trotzdem konnten einige Besonderheiten in dieser Analyse beobachtet werden. Im Zuge dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass mit Zunahme der Anzahl an HLA-Bw4-Allelen der Inhibitionseffekt gegenüber den HCV Peptidvarianten abnahm (Abb. 2.14 A). Hier liegt die Vermutung nahe, dass dieser Effekt auf der NK-Zell-Lizensierung beruht. KIR3DL1⁺-NK-Zellen von Probanden mit HLA-Bw4 wurden in ihrer Entwicklung durch die von ihrem Liganden ausgehenden Stimulus sensibilisiert und reagieren daher stärker auf eine Stimulation mit dem Peptid-beladenen HLA-B*27:05-Molekül. KIR3DL1⁺-NK-Zellen von HLA-Bw4-negativen Probanden können ohne passenden Liganden während ihrer Lizensierung nicht sensibilisiert worden sein und reagieren somit weniger stark auf den Peptid/HLA-B*27:05-Komplex. Allerdings wird diese Vermutung durch die Betrachtung der Inhibitionseffekte der HBV-Peptid/HLA-B*27:05-Komplexe auf die unterschiedlichen HLA-Bw4-Gruppen widerlegt (Abb. 2.14 B). Hier konnte das Phänomen beobachtet werden, dass zwar Probanden mit einem HLA-Bw4-Allel schlechter inhibiert wurde als Probanden ohne HLA-Bw4-Allele, allerdings nahm der Inhibitionseffekt der HBV Peptide bei Zunahme der Anzahl an HLA-Bw4-Allelen wieder zu. Daher wurde geschlussfolgert, dass die Lizensierung, wenn nur einen minimalen Einfluss auf die Inhibierbarkeit von KIR3DL1-positiven NK-Zellen hat. Diese Schlussfolgerung wird dadurch untermauert, dass die Positivkontrolle FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ bei den Experimenten mit den

HBV Peptidvarianten keinen signifikanten Unterschied zwischen lizensierten und nicht-lizensierten KIR3DL1-NK-Zellen zeigte, wohingegen bei den Experimenten mit den HCV Peptidvarianten die Positivkontrolle die nicht-lizensierten NK-Zellen tendenziell stärker beeinflusste als die lizensierten NK-Zellen.

Weiterhin wurde beobachtet, dass KIR3DL1⁺-NK-Zellen von Probanden mit einem oder mehreren HLA-Bw4-Allelen nach Stimulation mit den HCV-Peptid/HLA-B*27:05-Komplexen schlechter inhibiert wurden als Probanden, die kein HLA-Bw4 besitzen. Bei den HBV Peptidvarianten konnte kein solcher Effekt festgestellt werden. In Bezug auf die Inhibitionsstärke der HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptid-Varianten konnte zudem beobachtet werden, dass KIR3DL1⁺-NK-Zellen, die in ihrer Entwicklung mit HLA-Bw4 80(I) lizensiert wurden, einen tendenziell stärkeren Inhibitionseffekt aufwiesen als NK-Zellen, die mit HLA-Bw4 80(T) lizensiert wurden (Abb. 2.14 A). Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ergebnis einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe. Bei einer genetischen Assoziationsstudie mithilfe einer PWID-Kohorte (PWID = "People who inject drugs") wurde nachgewiesen, dass mit der Anzahl an unterschiedlichen HLA-Bw4 Allelen auch die Funktionalität der NK-Zellen erhöht war. Zudem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der spontanen Ausheilung von HCV und der genetischen Kombination KIR3DL1/HLA-Bw4(T) (Thöns et al., 2017). Auch Umemura et al konnte für die genetische Konstellation von KIR3DL1/HLA-Bw4 zeigen, dass mit HCV Genotyp 1b infizierte Patienten eine erhöhte antivirale Reaktivität aufwiesen, wenn sie mit PEGylierter IFNα und Ribavirin in Kombination mit oder ohne Telaprevir behandelt wurden (Umemura et al., 2014). Des Weiteren konnten Umemura et al in einer späteren Studie bezüglich einer Assoziation von KIR3DL1/HLA-Bw4 im Verlauf einer HCV-Infektion zeigen, dass chronisch infizierte HCV-Patienten mit dieser genetischen Konstellation ein erhöhtes Risiko besitzen, an einem Leberzellkarzinom zu erkranken, wobei unabhängig davon auch das männliche Geschlecht und das Fetoprotein mit einer Konzentration > 5,6 ng/ml im Blut als Indikator für das Auftreten eines Leberzellkarzinoms betrachtet wird. Zudem fanden sie heraus, dass die Patienten, die ein Leberkarzinom entwickelten, hauptsächlich die genetische Konstellation von KIR3DL1/HLA-Bw4 80(I) aufzeigten (Umemura et al., 2021). Es sprechen mehrere Studien und auch die Ergebnisse der hier durchgeführten Analysen dafür, dass die Kombination aus KIR3DL1 und HLA-Bw4 80(T) einen protektiven Effekt auf eine HCV-Infektion haben könnte. Liegt die Ursache dieses protektiven Effekts in der NK-Zell-Immunabwehr, könnte die Stärke der KIR3DL1/HLA-Bw4 80(T)-Interaktion ausschlaggebend sein, denn Cella et al haben beobachtet, dass HLA-Bw4 80(T) mit einer schlechteren Affinität an KIR3DL1 bindet als 80(I) (Cella et al., 1994). Möglicherweise werden KIR3DL1⁺-NK-Zellen trotz schwacher Bindung an HLA-Bw4 80(T) und folglich schwachem inhibitorischen Signal aktiviert und lösen die angeborene Immunabwehr aus. Dies könnte im Umkehrschluss bedeuten, dass die genetische Konstellation von KIR3DL1/HLA-Bw4 80(I) eine Chronifizierung einer HCV-Infektion begünstigt. Zudem weist eine Interaktion zwischen HLA-Bw4 80(I)

mit KIR3DS1 (dem KIR3DL1-Allel, der zur Aktivierung der NK-Zelle führt) einen protektiven Effekt in unterschiedlichen chronischen Virusinfektionen auf. Shah-Hosseini *et al* brachten die Genesung einer HBV-Infektion mit der genetischen Kombination aus KIR3DS1 und HLA-Bw4 80(I) in Verbindung (Shah-Hosseini et al., 2017). Die gleiche genetische Konstellation ist laut Martin *et al* mit dem Verhindern des Fortschreitens einer HIV-Infektion zu AIDS verbunden (Martin et al., 2007, Martin and Carrington, 2013). Und bei einer chronischen HCV-Infektion wurde festgestellt, dass die Abwesenheit von dieser Gen-Kombination zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Leberzellkarzinoms führt (De Re et al., 2015, Lopez-Vazquez et al., 2005). Die Bindung zwischen dem Rezeptor und dem Liganden HLA-Bw4 80(I) bzw. HLA-Bw4 80(T) scheint in chronischen Virusinfektionen von großer Bedeutung zu sein.

Diverse Studien zeigen, dass entweder die inhibierenden KIR3DL1-Rezeptoren allein oder in Kombination mit seinem Liganden den Ausgang bzw. Verlauf von chronischen Virusinfektionen beeinflussen können. Die Kombination von HLA-Bw4/KIR3DL1 in HIV-infizierten Personen verlangsamt das Fortschreiten der HIV-Infektion zu AIDS (Alter and Altfeld, 2009). Weiter konnten Analysen zeigen, dass die Allel-Diversität von KIR3DL1 einen Einfluss auf eine HIV-Infektion hat. Bei HIV-infizierten Probanden mit KIR3DL1*004 (KIR3DL1^{null}) in Kombination mit HLA-B^{Bw4} 80(I) konnte beobachtet werden, dass das Fortschreiten der HIV-Infektion zu AIDS im Vergleich zur HIV-Infektion bei Probanden mit einer KIR3DL1*004/HLA-Bw6-Kombination verlangsamt wurde. Ein Erklärungsansatz für den protektiven Effekt der KIR3DL1*004/HLA-Bw4 80(I)-Kombination könnte sein, dass weil KIR3DL1*004 als Protein bekanntlich in der Zelle verweilt, es keine Interaktion mit seinem Liganden HLA-Bw4 80(I) gibt. Dadurch erhalten die KIR3DL1*004-NK-Zellen kein inhibierendes Signal und werden so aktiviert. Hierbei würde jedoch der Ligand eine eher zweitrangige Rolle spielen. Da die Studie eine genetische Assoziation gezeigt hat, vermuten Martin *et al*, dass KIR3DL1*004 trotz intrazellulärer Expression mit HLA-Bw4 80(I) interagiert und so die angeborene Immunantwort beeinflusst (Martin et al., 2007).

Joshita *et al* haben in ihrer Assoziationsstudie im Zusammenhang mit einer HBV-Infektion feststellen können, dass HBV-Patienten mit einer genetischen Kombination von KIR3DL1/HLA-B^{Bw4} eine Beendigung der NUC-Therapie erreichen konnten (Joshita et al., 2021). Theoretisch würde das bedeuten, dass das Immunsystem die HBV-Infektion aufgrund der Interaktion zwischen KIR3DL1 und HLA-B^{Bw4} unter Kontrolle gebracht hat. Die Ergbenisse dieser Arbeit ünterstützen diese Theorie. Unabhängig von der Peptidsequenz zeigten das HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop und seine Sequenzvarianten nur schwache Inhibitionseffekte. Eine schwache Inhibition der KIR3DL1⁺-NK-Zellen resultieren in einer Aktivierung der angeborenen Immunabwehr.

Varbanova *et al* führten in einer bulgarischen Kohorte ebenfalls eine Assoziationsstudie im Zusammenhang mit einer HBV-Infektion und KIR3DL1 durch. Sie stellten fest, dass chronische HBV-

infizierte Probanden signifikant häufiger das KIR3DL1*004-Allel besaßen als die gesunden Kontrollen. Daraus haben sie geschlussfolgert, dass die Chronifizierung der HBV-Infektion auf eine verstärkte NK-Zell-Inhibition über KIR3DL1*004 zurückzuführen sei. Des Weiteren wurde in spontan genesenen Probanden weniger häufig HLA-Bw4 80(I) vorgefunden als bei gesunden Probanden (Varbanova et al., 2021). Dies würde die Hypothese widerlegen, die Martin et al in Bezug auf eine HIV-Infektion und dieser genetischen Konstellation aufgestellt haben (Martin et al., 2007). Es gäbe allerdings eine Erklärung, wie diese Studien übereinkämen. Bei der Bindung zwischen KIR3DL1 und seinem Liganden ist neben dem Bindemotiv Bw4 auch die präsentierte Peptidsequenz entscheidend für die Stärke der Bindung und der daraus resultierende inhibitorische Effekt. Vermutlich sind die HLA-Bw4restringierten immundominanten Epitope dieser Viren so unterschiedlich in ihrer Struktur, dass diese HLA/Peptid-Komplexe unterschiedlich starke inhibitorische Effekte auf KIR3DL1-positive NK-Zellen haben. Unterstützt wird diese Theorie von der Studie von Stewart-Jones et al. Sie konnten zeigen, dass Epitope von unterschiedlichen Viren (Influenza, HIV und EBV) die Bindung an KIR3DL1 beeinflussen können, obwohl sie alle über den gleichen Liganden HLA-B*27:05 präsentiert wurden. Während die Epitope des Influenza A und des Humanen Immundefizienz Virus gute bis sehr gute inhibitorische Effekte auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen ausübten, zeigte die Bindung mit dem EBV Epitop keinerlei inhibitorischen Effekt (Stewart-Jones et al., 2005). Auch die Ergebnisse der hier durchgeführten Studie untermauern diese Vermutung. Durch die Substitutionen einzelner Aminosäuren in der Peptidsequenz des HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₄₈₉ Epitops bzw. des HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitops wurden unterschiedlich starke inhibitorische Effekte auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen gemessen. Diese zum Teil konträre Beobachtungen bezüglich bestimmter Genetiken in unterschiedlichen Viruserkrankungen bedeuten lediglich, dass die Auswirkungen bestimmter genetischer Konstellationen Virus-spezifisch betrachtet werden muss.

Zudem ergab sich aus weiteren Studien, dass der Ausgang chronischer Virusinfektionen nicht nur allein von KIR3DL1, sondern auch von anderen (KIR-)Rezeptoren abhängig sein kann. Bei chronischen HCV-Infektionen wurde herausgefunden, dass NK-Zellen überwiegend einen aktivierten Phänotyp aufwiesen, der sich durch einen geringeren Anteil an KIR3DL1-Expression und einem gleichzeitigen höheren Anteil an NKG2D-Expression auszeichnete (Oliviero et al., 2009). In chronisch infizierten HCV-Patienten wurde deutlich, dass bei Trägern des KIR-Haplotyps B (KIR2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1) die NK-Zellen durch das Vorhandensein von KIR3DL1 mit seinem Liganden HLA-Bw4 funktionell beeinträchtigt sind. Dagegen war bei Trägern des KIR-Haplotyps A bei fehlender KIR-HLA-Bw4-Übereinstimmung eine erhöhte zytolytische Aktivität der NK-Zellen mit einer höheren STAT1-Phosporylierung, also einer erhöhten Immunantwort, verbunden (Mele et al., 2019). Bei HCVbedingten Krankheiten hat De Re *et al* festgestellt, dass KIR2D-Allele das Fortschreiten der HCV-Erkrankung in Richtung lymphoproliferativer Erkrankungen steuern können, während KIR3D/HLA das Fortschreiten der HCV-Erkrankung eher in Richtung eines Lymphoms als in Richtung einer

Lebererkrankung lenkt (De Re et al., 2015). Joshita *et al* haben festgestellt, dass HBV-Patienten mit einem Leberzellkarzinom signifikant häufiger KIR2DS3 exprimieren (Joshita et al., 2021). KIR2DS3 wurde bereits in älteren Studien mit kolorektalem Krebs, mit dem Versagen einer spontanen Ausheilung von einer HCV-Infektion und dem tödlichen Ausgang einer Ebola-Virusinfektion in Verbindung gebracht (Diaz-Pena et al., 2020, Dring et al., 2011, Wauquier et al., 2010, De Re et al., 2015). In einer Studie über die Kontrolle einer akuten HBV-Infektion wurde darüber hinaus gezeigt, dass während einer akuten HBV-Infektion das CD56^{dim} NK-Zell-Profil in Bezug auf die Oberflächenexpression von NK-Zell-Rezeptoren voraussagen kann, ob die HBV-Infektion in der frühen oder späten Phase unter Kontrolle gebracht wird. Dabei war KIR3DL1 gemeinsam mit KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5 und NKp46 der entscheidende Faktor für die Immunkontrolle in der späten Phase einer akuten HBV-Infektion (Yu et al., 2018). Mit den hier durchgeführten Experimenten kann keine Aussage über den Einfluss von weiteren Rezeptoren gemacht werden, da keine phänotypischen Untersuchungen der NK-Zellen durchgeführt wurde.

In dieser Arbeit konnte eine weitere interessante Beobachtung Im Zusammenhang mit der KIR3DL1-Oberflächenexpression und der Inhibitionsfähigkeit der hier getesteten viralen Peptide gemacht werden. Die viralen HBV und HCV Peptide, die bereits bei den Ergebnissen in Bezug auf alle KIR3DL1-Allele einen guten oder starken inhibitorischen Effekt auf die KIR3DL1-positiven NK-Zellen hatten, zeigten bei der Unterteilung in die jeweiligen Allel-Gruppen, dass die Peptide auf die KIR3DL1-Allele mit schwacher Oberflächenexpression (KIR3DL1^{low}-NK-Zellen) den stärksten inhibitorischen Effekt auszuüben schienen. Bei einem Vergleich der HBV Peptide mit den HCV Peptiden innerhalb dieser KIR3DL1-Allel-Gruppe fiel auf, dass dieser Effekt bei den HCV-Peptiden deutlich stärker war. Hier konnte beispielsweise beim Peptid 870 beobachtet werden, dass sich der prozentuale Anteil an inhibierten KIR3DL1⁺-NK-Zellen von 35 % (inhibitorischer Effekt auf alle KIR3DL1^{low}-NK-Zellen, Abb. 2.16 A) erhöht hat. Beim HBV Peptid 833 erhöhte sich der prozentuale Anteil inhibierter KIR3DL1⁺-NK-Zellen lediglich von 20 % (inhibitorischer Effekt auf alle KIR3DL1⁺-NK-Zellen zusammen, Abb. 2.12 B) auf 25 % (inhibitorischer Effekt auf ausschließlich KIR3DL1^{low}-NK-Zellen, Abb. 2.16 B).

Bei Betrachtung des Inhibitionseffekt der HBV Peptide auf KIR3DL1^{high/low}-NK-Zellen war dieser im Vergleich zu den Ergebnissen des Inhibitionseffekts auf alle KIR3DL1⁺-NK-Zellen abgeschwächt. Bei Peptid 836 ging die inhibitorische Wirkung sogar gänzlich verloren. Dieser abgeschwächte Effekt auf KIR3DL1^{high/low}-NK-Zellen konnte in Tendenz auch bei den HCV-Peptiden gemessen werden, allerdings war dieser hier weniger deutlich.

Werden die Inhibitionseffekte der viralen Peptide auf KIR3DL1^{high}-NK-Zellen analysiert, fiel auf, dass im Hinblick auf die HCV-Peptide deren inhibitorische Wirkung schwächer war als in der Gesamt-

Betrachtung. Dieses Resultat spricht dafür, dass möglicherweise die KIR3DL1^{high}-NK-Zellen die Ausheilung der HCV-Infektion begünstigen. Martin *et al* haben in ihrer Studie zur HIV-Infektion im Zusammenhang mit KIR3DL1^{high}-NK-Zellen und dem dazugehörigen Liganden HLA-Bw4 80(I) bereits festgestellt, dass diese Gen-Kombination die HIV-Infektion verlangsamt. Die KIR3DL1^{low} und HLA-Bw4 80(T)-Kombination schien hingegen keinen protektiven Effekt zu haben (Martin et al., 2007, Martin and Carrington, 2013).

Bei den HBV-Peptiden konnte nicht beobachtet werden, dass die KIR3DL1^{high}-NK-Zellen weniger gut inhibiert wurden als NK-Zellen aus anderen KIR3DL1-Allel-Gruppen. Dieser Befund zeigt, dass in einer HBV-Infektion die Interaktion von KIR3DL1 mit seinem Liganden nicht von der Menge an exprimierten KIR3DL1-Molekülen abhängig zu sein scheint. Zusammenfassend kann damit die Aussage getroffen werden, dass der Einfluss der genetischen Assoziationen von KIR/HLA-Bw4 in viralen Infektionen Virusabhängig ist und nicht verallgemeinert werden kann.

Abschließend lassen die Ergebnisse die Hypothese zu, dass KIR3DL1^{low}-NK-Zellen am stärksten vom HLA-Bw4/Peptid-Komplex beeinflusst werden. Möglicherweise wurden NK-Zellen mit geringer KIR3DL1-Oberflächenexpression (low-Allele) das Ziel für einen viralen Evasionsmechanismus, indem sich ko-evolutionär die Aminosäuresequenz der viralen Proteine, die das immundominante Epitop beinhalten, so angepasst haben, dass diese gebunden an HLA-B*27:05 einen starken inhibitorischen Effekt auf KIR3DL1^{low}-NK-Zellen ausüben. Um diese Theorie zu untermauern, wurde die KIR3DL1-Allel-Verteilung in einer globalen bzw. europäischen Kohorte untersucht, da dieser Immunevasionsmechanismus nur Sinn ergeben würde, wenn die Ziel-Allele (KIR3DL1^{low}) in der Population häufig verteilt sind.

Interessanterweise gehören laut einer Studie von Harrison *et al* zwei der sieben häufigsten KIR3DL1-Allele sowohl in einer globalen als auch in einer europäischen Kohorte zur *low*-Allelgruppe, obwohl zum jetzigen Stand der Forschung nur neun der insgesamt 220 KIR3DL1/S1-Allele mit einer geringen Oberflächenexpression assoziiert sind [KIR3DL1*005, *041, *044, *053 und *073 (*005-Gruppe) bzw. *007, *032, *033 und *068 (*007-Gruppe; (Harrison et al., 2022, Boudreau et al., 2014)]. KIR3DL1*00501 war laut dieser Analyse in der globalen Kohorte bestehend aus 2024 Probanden das vierthäufigste KIR3DL1-Allel mit einer Allel-Frequenz von etwa 8 %. Das häufigste und das dritthäufigste Allel gehörten zu den *high*-Allelen (*01502 bzw. *00101), wobei deren Frequenzen bei 18 % bzw. 12 % lagen. Das zweithäufigste Allel war KIR3DS1 (KIR3DL1*01301). Ein weiteres *low*-KIR3DL1-Allel (*007) kam mit einer Frequenz von etwa 5 % am siebthäufigsten in der globalen Kohorte vor. Die restlichen Plätze belegten zum einen das Null-Allel KIR3DL1*00401 mit 7 % und das *high*-Allel *01501 mit 6 %. Ähnlich verhielt es sich bei der europäischen Kohorte mit 345 Probanden, wo auch das viert- und siebthäufigste KIR3DL1-Allel die Allele KIR3DL1*00501 bzw. *007 waren. Deren Allel-

Frequenzen lagen bei 15 % bzw. 4 % (Harrison et al., 2022). Diese Studie belegt durchaus, dass es aus evolutionärer Sicht vom Standpunkt des Virus aus vorteilhaft wäre, auf KIR3DL1^{low}-NK-Zellen abzuzielen. Allerdings wären auch KIR3DL1^{high}-NK-Zellen ein sinnvolles Ziel für eine Immunevasionsstrategie gewesen, da diese noch häufiger in der Population vertreten sind. Hier bleibt die Frage offen, ob sich möglicherweise nur KIR3DL1^{low}-Allele als Ziel für eine Immunevasion eigneten, weil sie sich strukturell so von den KIR3DL1^{high}-Allelen unterscheiden, dass es für das Virus nicht möglich war, sich dementsprechend anzupassen. Damit ist gemeint, dass die Aminosäure-Sequenz des immundominanten Epitops nicht so abgeändert werden konnte, dass weiterhin die Funktionalität des Proteins und die virale Fitness erhalten geblieben wäre.

3.6 Zukünftige weiterführende Analysen

Die bisherigen Experimente zur Klärung der KIR3DL1-vermittelten Modulation der NK-Zellfunktion bei chronischen Virusinfektionen beschränkten sich ausschließlich auf das Zellkultur-System, in dem mithilfe des Degranulationsmarkers CD107a die Aktivität der NK-Zellen von gesunden Probanden nach Stimulation mit dem HLA-B*27:05/Peptid-Komplex gemessen wurden. Durch diese Experimente konnten bereits eindeutige Ergebnisse in Bezug auf eine NK-Zell-Modulation durch Sequenzunterschiede der viralen Epitope gezeigt werden. Trotzdem wäre es interessant zu untersuchen, welche Effektormoleküle vermehrt oder vermindert ausgeschüttet werden und welche Auswirkungen das auf die angeborene Immunabwehr in Bezug auf die virale Infektion hat. Da die Effektormoleküle inflammatorisch, zytotoxisch oder immunmodulierend sein können, könnten die Untersuchungen einen Hinweis darauf liefern, auf welchen Teil des Immunsystems die virale Immunevasion abzielen soll.

Des Weiteren könnte es bei dieser Analyse auch von Bedeutung sein, ob NK-Zellen von gesunden Probanden oder von Probanden mit einer chronischen HBV- oder HCV-Infektion bzw. mit einer ausgeheilten Infektion stammen, um mögliche Unterschiede in der Aktivität der KIR3DL1⁺-NK-Zellen ausmachen zu können. In diesem Zusammenhang wäre auch interessant, eine Kohorte aufzubauen, die entweder in die verschiedenen KIR3DL1-Allelgruppen *high, low* und *null* oder, wenn möglich, anhand ihrer KIR3DL1-Allele eingeteilt werden. Darüber hinaus sollte auch bei der Auswahl der Probanden auf den HLA-Bw4-Dimorphismus 80(I)/80(T) geachtet werden, da der Literatur und auch den hier gezeigten Ergebnissen zufolge HLA-Bw4 80(T) einen anderen Einfluss auf die KIR3DL1-NK-Zellen hat als HLA-Bw4 80(I).

Um die genannten Anforderungen zu erfüllen, würde sich eine NK-Zell-Klonierung eignen, die im Laufe dieser Arbeit bereits erfolgreich durchgeführt wurde (**Abb. 2.17**). Es könnten so Klone mit spezifischen KIR3DL1-Allelen generiert werden, die zum einen aus gesunden Probanden oder zum anderen aus

chronisch infizierten bzw. ausgeheilten Probanden stammen. Zudem könnten Klone aus lizensierten oder nicht lizensierten Probanden, also aus Probanden mit oder ohne geeigneten HLA-Liganden, generiert werden. Zudem könnte bei der Lizensierung zusätzlich zwischen HLA-Bw4 80(T) und HLA-Bw4 80(I) differenziert werden. Die Ergebnisse zum NK-Zell-Assay, bei dem die einzelnen Klone als Effektorzellen eingesetzt wurden, zeigten allerdings, dass der Assay mit den Klonen optimiert werden muss. Außerdem könnte beim Klonieren weitere Rezeptoren berücksichtigt werden, die laut Literatur eine Virusinfektion beeinflussen können.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Interaktion zwischen dem HLA-B*27:05/Peptid-Komplex und KIR3DL1 wäre eine Kristallstrukturanalyse, wie sie bereits von Stewart-Jones et al durchgeführt wurde. Dabei wurde sowohl die Bindung der Peptide an das HLA-Molekül, aber interessanter noch, die Interaktion des HLA/Peptid-Komplexes mit KIR3DL1 untersucht und festgestellt, dass die lokale Ladungsdichte der KIR3DL1-bindenden Oberfläche der untersuchten HLA/Peptid-Komplexe höchstwahrscheinlich ausschlaggebend für die Stimulation der KIR3DL1⁺-NK-Zellen sind (Stewart-Jones et al., 2005). Daher könnten die HLA-B*27:05/Peptid-Komplexe in Bezug auf ihre lokale Ladungsdichte der KIR3DL1-bindenden Oberfläche untersucht werden, um möglicherweise mithilfe eines Vergleichs der Ladungsdichten der Kontrollpeptide FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ bzw. EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ ein Muster zu erkennen und dadurch Rückschlüsse auf die Inhibitionsfähigkeit der zu untersuchenden viralen Peptide zu ziehen. Immerhin konnte in dieser Arbeit erstmalig durch den funktionalen NK-Zell-Assay gezeigt werden, dass Sequenzunterschiede eines Epitops mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die KIR3DL1-Interaktion einhergehen. Genauer noch konnte gezeigt werden, dass langkettige, Kohlenstoff-haltige Aminosäuren an Position 6 und Stickstoff-haltige Aminosäuren an Position 7 des Nonamers die Bindung zu KIR3DL1 scheinbar verstärken. Zudem haben positiv geladene Aminosäuren im hinteren Bereich des Peptids auch einen stärkenden Effekt auf die KIR3DL1-Interaktion und somit die Inhibierbarkeit von KIR3DL1⁺-NK-Zellen.

Das Zusammenspiel der Rezeptor/Liganden-Kombination von KIR3DL1 und HLA-Bw4 nimmt nachweislich einen Einfluss auf chronische Virusinfektionen. Der Einfluss hängt dabei von vielen unterschiedlichen Faktoren wie beispielsweise vom Dimorphismus des HLA-Bw4-Allels [80(T), 80(I)], von der Diversität des KIR3DL1-Allels mit der damit einhergehenden Variabilität in der Oberflächenexpression oder von der Aminosäure-Sequenz des präsentierten Peptids ab. Die in dieser Arbeit durchgeführten funktionalen NK-Zell-Assays ergaben, dass HCV sich diese Diversität zu Nutze zu machen scheint. Es wurden Peptidvarianten des immundominanten GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitops selektioniert, um mit großer Wahrscheinlichkeit einen *"NK-Zell-Escape"* hervorzurufen. Zudem scheint eine Immunevasionsstrategie von HCV vom Dimorphismus des Liganden zu profitieren, da hier eindeutig gezeigt werden konnte, dass KIR3DL1⁺-NK-Zellen von HLA-Bw4 80(I) Probanden verstärkt

inhibiert wurden. Auch HBV scheint von unterschiedlichen genetischen Konstellationen zwischen KIR3DL1 und seinem Liganden zu profitieren. Diese Arbeit konnte mithilfe des untersuchten immundominanten GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Epitop zwar nicht bestätigen, dass das Vorhandensein der Peptidvarianten auf einen *"NK-Zell-Escape"* beruht. Trotzdem scheint die Interaktion zwischen KIR3DL1 und HLA-Bw4 von Bedeutung zu sein, da die hier generierten Ergebnisse die Studien anderer Arbeitsgruppen bezüglich genetischer Assoziationen unterstützten. Somit ist es unwahrscheinlich, dass HBV keine Immunevasionsstategien bezogen auf das angeborene Immunsystem besitzt. Daher sollte weiterhin die Interaktion zwischen KIR3DL1 und HLA-Bw4 im Zusammenhang mit einer HCV- bzw. HBV-Infektion genauer untersucht werden.

4 Material & Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Blutbild-Analysegerät	Sysmex XP-300	Sysmex Corporation
Durchflusszytometer	Canto II	BD
Elektrophoresekammer	Compact Multi-Wide	Biometra
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
	Thermostat Plus	
Inkubatoren	BBD 6620	Haraeus
	IC505	Memmert
Power Supplies	Power Pack P25T	Biorad
	EPS 301	Amersham
Rotor	4IK25RGN-CW2	Oriental Motor
Spektralphotometer	Nanodrop 1000	Peqlab
Sterilbank	Herasafe	
Thermocycler	T3000	Biometra
Thermoschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf
UV-Transilluminator	Gel iX Imager	Intas
Vortexer	L46	Labinco
	VV3	VWR
Wasserbad	GFL 1092	GFL
Zentrifugen	3K30 Sigma	Sartorius
	Allegra X-15R	Beckman Coulter
	Centrifuge	Eppendorf
	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Centrifuge 5417R	Eppendorf
	Centrifuge 5810R	

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäß	72.706.400	Sarstedt
2,0 ml Reaktionsgefäß	0030120094	Eppendorf
1,8 ml Cryo-Röhrchen	72.379.002	Sarstedt
5,0 ml Combitips	0030089669	Eppendorf
15 ml Zentrifugenröhrchen	62.554.502	Sarstedt
50 ml Zentrifugenröhrchen	62.547.254	Sarstedt
50 ml Leukosept™ Röhrchen	227290	Greiner Bio-One
6-Loch-Platte (Flachboden)	Z707767	Sigma Aldrich
12-Loch-Platte (Flachboden)	92412	ТРР
24-Loch-Platte (Flachboden)	CLS3524	Corning [®] Costar [®]

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
48-Loch-Platte (Flachboden)	677180	Greiner Bio-One
96-Loch-Platte (Rundboden)	10062-902	VWR
Blunt Fill Needle, 18G x 1 ½ (1.2mm x	303129	BD
40mm) steril, ohne Filter		
PCR-Reaktionsgefäß	72.737.002	Sarstedt
FACS Röhrchen	55.1579.002	Sarstedt
Filter Spitzen (TipOne®)		Sarstedt
10/20 μl	S1120-3810	
200 μl	S1120-8810	
1000 μl	S1122-1830	
FP 30/0.2 CA-S Filter Unit, steril	10462200	Whatman
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter		
Omnifix [®] 20 ml, Lock-Ansatz, zentrisch	4617207V	BBraun
Serologische Pipetten		Corning [®] Costar [®]
5 ml	CLS4487	
10 ml	CLS4488	
25 ml	CLS4489	
T25-Zellkulturflasche	10288990	Thermo Fisher Scientific
T75-Zellkulturflasche	15360591	Thermo Fisher Scientific
T175-Zellkulturflasche	83.3912.002	Sarstedt

4.1.3 Antibiotika, Chemikalien & Enzyme

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Blasticidin (10 mg/ml)	ant-bl	InvivoGen
Bromphenolblau	1.08122.0005	Merck
CD28/CD49d Beads BD Fastimmune™	347690	Fisher Scientific
Ethanol absolut	107017 (Größe 2511)	Sigma Aldrich
Ethidiumbromidlösung 0,025% in der	HP47.1	Carl Roth
Tropfflasche (wässrige Lsg, 250 µg/ml)		
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	SM1333	Thermo Fisher Scientific
Glycerol	3783.2	Carl Roth
Isopropanol	20842.330	VWR
LE Agarose	840004	Biozym
Magnesiumchlorid	KK36.3	Carl Roth
My-Budget dNTP-Mix (20 mM –	80-80010250	Biobudget
5 μmol each)		
T4 DNA Ligase (400.000 U/ml)	M0202S	New England BioLabs
T4 Polynukleotid-Kinase	M0201L	New England BioLabs
Q5 [®] High Fidelity DNA Polymerase	M0491L	New England BioLabs
(10 U/μl)		
Restriktionsenzyme (10 U/µl)		New England BioLabs
Dpn I	R0176S	
Nco I-HF®	R3193S	

4.1.4 Puffer, Reagenzien und Lösungen

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
BD FACS Clean	340345	Fisher Scientific
BD FACS Flow	342003	Fisher Scientific
BD FACS Rinse	340346	Fisher Scientific
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	L6113	Biochrom
CutSmart [®] Buffer (10x)	B7204S	New England BioLabs
Gel Loading Dye (6x)	B7024S	New England BioLabs
Intrazellulärer (IC) Fixierpuffer	00-8222	Invitrogen
Permeabilisierungspuffer (10x Perm-	00-8333	Invitrogen
Puffer; 10.000 μg/ml)		
1x Perm-Puffer		
10 % (v/v) 10x Perm-Puffer in H ₂ O		
Q5 [®] Reaction Buffer (5x)	B9027S	New England BioLabs
T4 10x Buffer (10 mM ATP)	B0202A	New England BioLabs
TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA; 10x)	T4415-4L	Sigma Aldrich
900 mM Tris		
900 mM Borsäure		
20 mM EDTA; pH 8,0		
1x TBE-Puffer		
10% (v/v) 10x TBE-Puffer in H ₂ O		
TransIT [®] -LT1 Reagent	MIR2306	Mirus

4.1.5 Nährmedien & Zusätze

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Brefeldin A (BFA; 10 mg/ml)	B5936	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO) ROTIPURAN [®] ≥99,8 %, p.a.	4720.2	Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 1x) 4,5 g/l D-Glucose 4,5 g/l L-Glutamine 110 mg/l Sodium Pyruvate Phenolrot 10% (v/v) FBS supreme 1% (v/v) P/S	11995-065	Gibco™
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; 1x) pH 7,4 steril filtriert 136 mM NaCl 2,6 mM KCl 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	14190144	Gibco™

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
1,5 mM KH ₂ PO ₄		
Ohne CaCl ₂		
Ohne MaCl ₂		
Fetal Bovine Serum (FBS) supreme	P30-3031	PAN Biotech
0,2 μm steril filtriert		
Hitze-inaktiviert bei 56°C für 30 min		
Einfrier-Medium		
FBS supreme + 10% (v/v) DMSO		
GMP Stem Cell Growth Medium	20802-0500	CellGenix
(SCGM; 1x) – NK-Zell-Medium		
Serum-free		
Xeno-free		
10% (v/v) FBS supreme		
5% humanes Serum		
1% HEPES-Buffer		
250 U/ml hIL-2 (frisch dazu geben)		
2,5 μg/ml PHA-L (frisch dazu geben)		
3000 bestrahlte (30gy), heterologe		
PBMCs/Loch einer 96-Loch-Platte		
HEPES-Buffer (1 M)	15630	Gibco™
Humanes Interleukin-2 (hIL-2;	11147528001	Sigma Aldrich
50000 U)		
Humanes Interleukin-15 (hIL-15;	RKP40933	Reprokine
10 µg)		
Humanes Serum	P40-3001	Pan Biotech
Steril filtriert		
Hitze-inaktiviert bei 56°C für 30 min		
Seraclot		
Type AB		
Male		
LB-Agar (1x)	22700025	Invitrogen
LB-Medium		
1% (w/v) Agar		
LB-Medium (1x)	X964.2	Carl Roth
1% (w/v) Trypton (10 g/l)		
5% (w/v) Hefeextrakt (5 g/l)		
5% (w/v) NaCl (5 g/l; pH 7,0)		
Penicillin/Streptomycin (P/S;	15410-122	Gibco™
10.000 U/ml)		
Phytohemagglutinin-L in DPBS (PHA-L)	11249738001	Roche
RPMI 1640 (1x) – R10-Medium	72400-021	Gibco™
Steril filtriert		
25 mM HEPES-Buffer		
GlutaMAX™-I		
PhenoIrot		
10% (v/v) FBS supreme		
1% P/S		
Trypan Blau (0,4%)	15250-061	Gibco™
Trypsin (2,5%; no phenol red)	15090-046	Gibco™
25% (v/v) Trypsin in DPBS		

4.1.6 Gebrauchsfertige Kits

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
QIAamp DNA Blood Mini Kit	51106	Qiagen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	12163	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	28106	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen

4.1.7 Antikörper und fluoreszierende Agenzien

Spezifität	Fluorochrom	Klon	μl/ 100 μl DPBS	Katalognummer	Hersteller
HLA-Bw4	FITC	REA274	2,0	130-103-846	Miltenyi Biotec
HLA-B*27	APC	REA176	4,0	130-123-554	Miltenyi Biotec
CD3	PerCP-Cy5.5	OKT3	1,0	45-0037-42	eBioscience™
CD4	PE	RPA-T4	0,1	12-0049-42	eBioscience™
CD8	APC	RPA-T8	0,2	17-0088-42	eBioscience™
CD14	PerCP-Cy5.5	61D3	2,0	45-0149-42	eBioscience™
CD16	APC-eFluor780	eBioCB16	1,0	47-0168-42	eBioscience™
CD19	PerCP-Cy5.5	SJ25C1	2,0	45-0198-42	eBioscience™
CD56	BV421	HCD56	2,0	318328	BioLegend
CD56	FITC	TuLY56	2,0	11-0566-42	eBioscience™
CD107a	PE-Cy7	H4A3	2,0	561348	Fisher Scientific
Interferon γ	FITC	4S.B3	0,1	11-7319-82	eBioscience™
KIR3DL1	APC	DX9	2,0	312716	BioLegend
NKG2A	FITC	REA110	2,0	130-098-818	Miltenyi Biotec
NKG2C	PE	134591	5,0	FAB138P	R&D Systems
Viability Dye	eFluor506	-	1:1000	65-0866-18	eBioscience™
Viability Dye	eFluor780	-	1:5000	65-0865-18	eBioscience™

4.1.8 Oligonukleotide & Gene Strands

Oligonukleotide für die Synthese von pWPI-BSD HLA-B*27:05:02+2a_ER_`HCV-Epitop'

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
4	SDM-ARMILMPHF-	5'-GATGATACTGATGCCCCATTTCTGATTGAC-3'
	Primer-F	
5	SDM-ARMILLPHF-Primer-	5'-GATGATACTGTTGCCCCATTTCTGATTGAC-3'
	F	
6	SDM-ARMILMTHF-	5´-CTCGCAGCGGAGCAGACTG-3´
	Primer-R	
Nr.	Bezeichnung	Sequenz
-----	------------------------	---
7	Pep-Ex-ARMVLMIHF-	5'-CCTTGCGGCAGTCTGCTCCGCTGCGAGGATGGTACTGATGATCC
	Primer-F	ATTTCTGATTGACGAGGGATCCACTAG-3
8	Pep-Ex-R	5'-CATGATTTTAGGCTTGCTCGC-3'
9	Pep-Ex-SRY-SpeI-3F-fwd	5'-AGCAGGTACTGGGCCATAAGGACCAGATGATTGACGAGGGATC
		CAC-3′
10	Pep-Ex-SRY-3F-rev	5'-AGCAGGTACTGGGCCATAAGGACCAGAAGCGGAGCAGACTGC-
		3′

Oligonukleotide für die Sequenzierung der klonierten Gene in pWPI

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
11	EF1-alpha	5´-ACTGAGTGGGTGGAGACT-3´
12	(-)-WPRE-seq	5'-AGCTGACAGGTGGTGGCAAT-3'
13	(-)-pWPI-ORF-Seq-Minus	5'-GAAGCCGCTTGGAATAAGGCCG-3'
14	pWPI-IRES-F	5'-CGAGGGATCCACTAGTACCGGTTAGACTACGGGCTGCAGGAAT
		TC-3′
15	pWPI-RFP-R	5´-CGTGTTTTTCAAAGGAAAACCACG-3´

4.1.9 Vektoren

pWPI [P1] Addgene

4.1.10 Bakterienstämme

 $DH5\alpha$ und 10- β von New England BioLabs

4.1.11 Zelllinien

4.1.11.1 HEK293T

HEK293T ist eine humane embryonale Nierenzelllinie, die von Frank L. Graham hergestellt wurde (Graham et al., 1977). Nach einer Transfektion dieser Zelle mit dem humanen Adenovirus 5, wurde ein 4,3 kb großes DNA-Fragment des Virus in das Chromosom 19 eingebaut, welches die Gensequenzen der viralen Proteine E1A und E1B beinhaltet. Die Expression dieser viralen Proteine führt zur Immortalisierung dieser Zelllinie (Lin et al., 2014, Louis et al., 1997).

4.1.11.2 **T2**

Die humane T2 Zelllinie ist TAP-defizient und ein Hybrid aus einer B- und T-lymphoblastoiden Zelllinie. Diese Zelllinie kodiert sowohl für die HLA-A*02 und -B*05, exprimiert aber nur geringe Mengen von HLA-A*02 und nicht nachweisbare Mengen von HLA-B*05 an der Zelloberfläche aufgrund einer Mutation, die ein trans-agierendes regulatorisches Gen in der Klasse-II-Region des menschlichen Haupthistokompatibilitätskomplexes inaktiviert. Eine Northern-Blot-Analyse mit HLA-A- und HLA-Bspezifischen Sonden zeigte, dass die T2-Zelllinie die Menge an mRNA des A- und B-Locus synthetisiert, die mit denen der Klasse-I-Antigen-positiven Mutterzelllinie vergleichbar ist. Immunpräzipitationsstudien zeigten, dass T2 Zellen normale schwere Ketten des HLA-Moleküls und β 2-Mikroglobulin synthetisieren, die aber keine Dimere bilden. Die schweren Ketten sind normal N-glykosyliert, aber die Verarbeitung des Glykans zur komplexen Form findet nicht statt. Darüber hinaus sind die freien schweren Ketten in dieser Zelllinie nicht phosphoryliert. Somit verbinden sich die meisten schweren Ketten der Klasse I in den T2 Zellen nicht mit β 2-Mikroglobulin und werden nicht verarbeitet oder an die Zelloberfläche transportiert (Salter et al., 1985, Salter and Cresswell, 1986).

Die T2 HLA-B*27:05 Zelllinie wurde unserem Labor von Prof. Salim Khakoo zur Verfügung gestellt.

4.1.12 Peptide

Nr.	Ursprung	Protein	HLA- Allel	Sequenz	Quelle	Hersteller
497	HCV	NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉	B*27:05	ARMILMTHF	(Neuman	EMC
					n- Haofolin	microcollections
					et al.	
					2006)	
506	HCV	NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉	B*27:05	P		EMC
						microcollections
824	HCV	NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉	B*27:05	VP		EMC
						microcollections
870	HCV	NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉	B*27:05	LP		EMC
						microcollections
871	HCV	NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉	B*27:05	VLP		EMC
						microcollections
872	HCV	NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉	B*27:05	L		EMC
						microcollections
830	HBV	Pol ₁₁₄₋₁₂₂	B*27:05	ARFYPNVTK	eigene	EMC
					Arbeits-	microcollections
					gruppe	
831	HBV	Pol ₁₁₄₋₁₂₂	B*27:05	K		EMC
						microcollections
832	HBV	Pol ₁₁₄₋₁₂₂	B*27:05	F—A		EMC
						microcollections
833	HBV	Pol ₁₁₄₋₁₂₂	B*27:05	A		EMC
						microcollections
834	HBV	Pol ₁₁₄₋₁₂₂	B*27:05	КА		EMC
						microcollections

Nr.	Ursprung	Protein	HLA- Allel	Sequenz	Quelle	Hersteller
835	HBV	Pol ₁₁₄₋₁₂₂	B*27:05	KG		EMC
						microcollections
836	HBV	Pol ₁₁₄₋₁₂₂	B*27:05	KK		EMC
						microcollections
911	EBV	EBNA3C ₂₅₈₋	B*27:05	RRIYDLIEL	(Brooks et	EMC
		266			al., 1993)	microcollections
912	IAV (FLU)	NP ₃₈₃₋₃₉₁	B*27:05	SRYWAIRTR	(Bowness	EMC
					et al.,	microcollections
					1994)	

4.1.13 Software für die Datenanalyse

Bezeichnung	Hersteller	Art der Analyse
FlowJo Version 10.5.3	FlowJo, LLC, Ashland USA	Phänotypische und Funktionelle Analyse von
		Zell-Populationen aus
		durchflusszytometrischen Daten
GraphPad Prism 8.4.0	GraphPad Software, San	Statistische Analyse von FlowJo Daten
	Diego California USA	
Geneious [®] 10.1.3	Copyright © 2005-2020	In silico Klonierung und Sequenzanalysen
	Biomatters Limited.,	
	Auckland, Neuseeland	

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit E. coli

4.2.1.1 Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien

Für die Transformation von chemisch kompetenten E. *coli* Bakterien wurde ein 50 µl-Aliquot der E. *coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut und 7 µl des Ligationsansatzes der klonierten Plasmid-DNA (Abschnitt 4.2.4.2) zu den Bakterien pipettiert. Hierbei sollten DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 8 kb in DH5 α Bakterien und größere Plasmide in die 10- β Bakterien transformiert werden. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden mithilfe des Heizblocks ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden durchgeführt. Anschließend wurden 750 µl LB-Medium zu den Bakterien gegeben und vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine 1,5-stündige Inkubation bei 37°C und 750 rpm auf dem Thermoschüttler. Zum Schluss wurden 200 µl der Bakteriensuspension auf Selektiv-Agarplatten, die mit Antibiotikum versetzt waren, das dem Resistenzgen auf dem Vektorplasmid entsprach, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutraum bebrütet.

4.2.1.2 Kultivierung von transformierten E. coli Bakterien

Um die transformierte E. *coli* Bakterien für eine Plasmid-DNA-Präparation zu kultivieren, wurde die entsprechende Menge an LB-Medium mit dem Selektions-Antibiotikum in einem Verhältnis von 1:1000 versetzt und in ein entsprechendes Gefäß für die Kultivierung gegeben. Für eine Plasmid-DNA-Minipräparation waren es 3 ml LB-Medium in einem Reagenzglas und für eine Plasmid-DNA-Maxipräparation 200 ml LB-Medium in einem Erlenmeyer-Kolben.

Von der bebrüteten Agar-Platte (Abschnitt 4.2.1.1) wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine Bakterienkolonie entnommen und samt Pipettenspitze in das Reagenzglas mit den 3 ml LB-Medium überführt. Anschließend wurde die Bakterien üN im Brutraum bei 37°C auf einem Rotor inkubiert und am Folgetag entweder für eine Plasmid-DNA-Minipräparation (Abschnitt 4.2.4.4) verwendet oder 1 ml dieser Bakteriensuspension in den Erlenmeyer-Kolben mit den 200 ml LB-Medium gegeben, um dieses Bakteriengemisch erneut üN bei 37°C auf einem Schüttler zu bebrüten. Am Folgetag konnte dies für die Plasmid-DNA-Maxipräparation (Abschnitt 4.2.4.4) verwendet werden.

4.2.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

4.2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte in einem Inkubator bei 37° C mit einer Luftfeuchtigkeit von 80 % und einem CO₂-Gehalt von 5 %.

4.2.2.1.1 Suspensionszellen

Die Suspensionszellinie T2 wurde im R10-Medium bei einer Zellzahl von 3 x 10⁵ Zellen/ml in Kultur genommen. Zur Aufrechterhaltung der Zellkultur wurde abhängig von der Zelldichte die Zellzahl alle 3 bis 4 Tage auf 5 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt, indem die T2-Zellen in einem Verhältnis von 1:3 passagiert wurden. Dazu wurden in einer neuen Zellkulturflasche frisches R10-Medium vorgelegt und entsprechend dem Passagier-Verhältnis das Volumen der Zellsuspension dazugegeben. Danach wurden die Zellen wieder im Inkubator kultiviert.

4.2.2.1.2 Adhärente Zellen

Die adhärente Zelllinie HEK293T wurde in DMEM-Medium kultiviert und begann bei einer Zellzahl von 5 x 10⁵ Zellen/ml. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und für 10 Sekunden mit Trypsin behandelt. Nachdem das Trypsin abgenommen wurde, wurden die Zellen für

etwa eine Minute im Inkubator bebrütet, damit sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche wurde kontrolliert, ob sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst haben. Danach konnten die Zellen in DMEM-Medium aufgenommen und dem Passagier-Verhältnis entsprechend in eine neue Zellkulturflasche gegeben werden. Nach kurzem Schwenken zur Homogenisierung der Zellsuspension wurden die Zellen zurück in den Inkubator gestellt.

4.2.2.2 Herstellung von stabilen Zelllinien

Für die Herstellung von stabilen Zelllinien wurden retrovirale Vektoren mit dem Gen von Interesse hergestellt (Transfektion), die anschließend dem retroviralen Gentransfer (Transduktion) dienten. Für die Transfektion wurde an der Sterilbank als erstes die entsprechende Menge des Transfektionsreagenz (2 μl TransIT[®]-LT1 Reagent pro μg Plasmid-DNA) mit serum-freien DMEM-Medium für 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde auch die benötigte Plasmid-DNA mit der gleichen Menge an serum-freien DMEM-Medium wie beim Transfektionsansatz gemischt und nach der Inkubationszeit mit dem Transfektionsansatz zusammengebracht. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 20 min bei RT wurde das Plasmid-DNA-Transfektionsgemisch mit dem gleichen Volumen an HEK293T-Zellen, die vorher abtrypsiniert und in 1 x 10⁶ Zellen/ml serum-freien DMEM-Medium aufgenommen wurden, zusammen pipettiert und in eine Zellkulturflasche gegeben. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Medium abgenommen, frisches DMEM mit allen Zusätzen zu den Zellen gegeben und weiter inkubiert.

Die transfizierten Plasmide kodierten für verschiedene Komponenten für die Herstellung eines Viruspartikels: 1) Das Vektorplasmid pWPI beinhaltete das Transgen, den Fluoreszenzmarker und das Antibiotika-Resistenzgen, 2) das Verpackungsplasmid pCMVR8.74 [P3], welches auf HIV basierte, kodierte für die Verpackungsproteine Gag und Pol, um das Nukleokapsid zu synthetisieren und die Enzyme für die reverse Transkription zur Verfügung zu stellen und 3) das Helferplasmid pMD2.G [P4] kodierte für die Bestandteile der Virushülle des VS-Virus. Mithilfe des Transfektionsreagenz gelangten die Plasmide in den Zellkern, wo die Proteinbiosynthese der viralen Bestandteile und die Amplifikation des viralen Genoms bestehend aus Transgen, Fluoreszenzmarker und Antibiotikaresistenz durchgeführt wurden. Im Zytoplasma der Zelle erfolgte dann die Bildung der Viruspartikel, die zum Schluss an das Medium abgegeben wurden. Dieser Vorgang dauerte 72 bis 96 Stunden, sodass zu beiden Zeitpunkten das Medium von den Zellen abgenommen, bei 4°C für 15 min bei 3739 g die Zelltrümmer abzentrifugiert und danach das Medium mit einem 0,2 µm Filter steril in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert wurde. Nach der Abnahme des Mediums zum Zeitpunkt 72 Stunden

Material & Methoden

wurden 10 ml frisches DMEM-Medium hinzugegeben, damit zum Zeitpunkt 96 Stunden das Medium mit den retroviralen Partikeln abgenommen werden konnte. Die Viruspartikel wurden bis zur Weiterverwendung für die Transduktion bei 4°C gelagert.

Bei der Transduktion wurden die wildtypischen T2-Zellen mit R10-Medium auf 1 x 10⁷ Zellen/ml eingestellt und 2 x 10⁶ Zellen zu 7 ml des Virus-beinhaltenden Mediums gegeben. Zur Erleichterung des Viruseintritts in die Zielzellen erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 100 g und RT, wonach dann die Zellen wieder in dem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt wurden. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde mit der Selektion begonnen, indem die Zellen erneut herunterzentrifugiert (100 g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in Selektionsmedium aufgenommen wurden. Danach wurden sie wieder im Brutschrank kultiviert. Alle 3 Tage wurde das Selektions-Medium mittels Zentrifugation gewechselt, solange bis eine reine Transduktanten-Zelllinie etabliert wurde. Zur Überprüfung der Reinheit der Zelllinie wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des transduzierten Moleküls HLA-B*27:05 untersucht.

4.2.2.3 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Bei der Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden aus den *Buffy Coats*, die von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden, die Lymphozyten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation von den in der Probe zusätzlich enthaltenen Leukozyten und Thrombozyten separiert und Cryo-konserviert. Dazu wurden an der Sterilbank vorbereitend die Leukosept[™]-Röhrchen mit 15 ml der Biocoll-Trennlösung (Ficoll) befüllt und für 1 min bei 200 g zentrifugiert, damit die Trennlösung unterhalb des Filters gelangt und für die anschließende Zentrifugation einen Dichtegradienten aufbauen kann. Das Blut aus den *Buffy-Coat*-Beuteln wurde unter sterilen Bedingungen in einen Erlenmeyer-Kolben überführt und in einem Verhältnis von 1:2 mit DPBS verdünnt. Das Blut wurde dann in die Leukosept[™]-Röhrchen gegeben und für die Trennung der Lymphozyten von den restlichen Zellen bei 900 g zentrifugiert.

Der entstandene Lymphozyten-Ring im Leukosept[™]-Röhrchen wurde resuspendiert und anschließend die gesamte Flüssigkeit oberhalb des Filters in ein neues 50 ml Röhrchen geschüttet. Danach wurde mit DPBS auf 50 ml Volumen aufgefüllt und die Zellen bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zum Waschen in 50 ml DPBS resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 200 g für 10 min. Das Zellpellet wurde wieder in 50 ml DPBS resuspendiert und nun die Zellzahl mithilfe des Blutbild-Analysegeräts bestimmt. Nach einer letzten Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurden die Zellen mit dem Einfrier-Medium auf 40 Mio Zellen/ml eingestellt und 1 ml der Zellsuspension in ein 2 ml Cryo-Röhrchen

überführt. Für einen schonenden Einfriervorgang wurden die Cryo-Röhrchen in einen Gefrierbehälter gestellt und bei -80°C eingefroren, da der Behälter dafür sorgte, dass der Temperaturabfall beim Einfrieren konstant bei 1°C pro Minute lag. Nachdem -80°C erreicht wurden, wurden die Cryo-Röhrchen in den Stickstofftank transferiert.

4.2.2.4 In Kultur nehmen von Zellkulturen

Die Cryo-konservierten Zelllinien oder PBMCs wurden im Stickstoff-Tank gelagert. Um diese Zellen in Kultur zu nehmen, mussten diese zunächst aufgetaut werden. Dafür wurden die Cryo-Röhrchen nach Entnahme aus dem Stickstoff-Tank auf Eis zum 37°C-vorgewärmten Wasserbad transportiert und darin aufgetaut. In der Zwischenzeit wurden 15 ml Röhrchen mit 9 ml DPBS pro Probe vorbereitet und anschließend die Zellsuspension unter der Sterilbank in die Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 200 g für 7 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen in R10-Medium aufgenommen, wobei bei den Zelllinien (Abschnitt 4.1.11) und bei den PBMCs eine bestimmte Zellkonzentration eingestellt wurde. Die Zellkonzentration bei den PBMCs war für den NK-Zell-Assay 1,5 Mio Zellen/ml und für die Verwendung als Feeder-Zellen 0,3 Mio Zellen/ml.

4.2.2.4.1 Kohorte zur Untersuchung der HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptidvarianten

Die folgende Kohorte besteht aus 45 gesunden Probanden, die zur Untersuchung der Inhibitionseffekte der HCV GT1 NS5B₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Peptidvarianten auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen verwendet wurden. Die Tabelle (**Tab. 4.1**) enthält neben den KIR3DL1-Genotyp auch die Information zum HLA-Bw4-Status bzw. die Zuordnung zur KIR3DL1-Allel- bzw. HLA-Bw4/Pos. 80-Gruppe. Die Allele, die kein HLA-Bw4 darstellen, werden in der Tabelle mit einem Querstrich "-" gleichgesetzt. Nicht bekannte Informationen werden durch "N/A" gekennzeichnet.

Proband	KIR3 All	DL1- ele	KIR3DL1- Allel-Gruppe	HLA-A ^{Bw} Allel	4_	HLA-B ^{Bw4}	^I -Allel	HLA- Bw4- Gruppe	HLA- Bw4 Pos. 80
B237	*001	*002	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*44:02	B*49:01	2	T/I
			heterozygot						
B265	*002	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	A*32:01	-	B*44:02	-	2	I/T
B266	*005	*020	KIR3DL1 ^{low/high}	A*24:02	-	-	-	1	I
B274	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B280	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	-	-	B*37:01	B*44:03	2	T/T
			homozygot						

Tab. 4.1: Übersicht über die Kohorte zur Untersuchung der HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₈₄₉ Peptidvarianten

Proband	KIR3 All	DL1- ele	KIR3DL1- Allel-Gruppe	HLA-A ^{₿₩} Allel	⁴ _	HLA-B ^{Bw4}	-Allel	HLA- Bw4- Gruppe	HLA- Bw4 Pos. 80
B282	*001	*020	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*27:03/05	-	1	Т
			heterozygot						
B283	*001	*020	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*44:05	B*57:01	2	T/I
			heterozygot						
B286	*004	*005	KIR3DL1 ^{null/low}	-	-	B*13:02	B*57:01	2	T/I
B297	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	-	-	B*44:02	-	1	Т
			homozygot						
B314	*002	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	A*32:01	-	B*47:01	-	2	I/T
B315	*002	*007	KIR3DL1 ^{high/low}	A*23:01	-	B*13:02	B*44:03	3	T/T/T
B319	*004	*005	KIR3DL1 ^{null/low}	-	-	B*44:02	-	1	Т
B323	*009	*009	KIR3DL1 ^{low}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B325	*001	*001	KIR3DL1 ^{high}	A*32:01	-	-	-	1	I
			homozygot						
B328	*005	*009	KIR3DL1 ^{low}	A*23:01	-	B*44:03	B*51:01	3	T/T/T
			heterozygot						
B329	*001	*004	KIR3DL1 ^{high/null}	-	-	B*27:02	-	1	I
B334	*001	*001	KIR3DL1 ^{high}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B342	*001	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	-	-	B*27:03/05	B*37:01	2	T/T
B345	*004	*005	KIR3DL1 ^{null/low}	A*25:01	-	B*44:02	-	2	I/T
B352	*002	*002	KIR3DL1 ^{high}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B355	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B361	*002	*004	KIR3DL1 ^{high/null}	A*24:02	-	B*27:02	-	2	1/1
B366	*007	*007	KIR3DL1 ^{low}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B372	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	A*24:02	-	-	-	1	
			homozygot						
B391	*008	S1	KIR3DL1 ^{nign/S1}	-	-	B*27:03/05	B*57:01	2	T/I
B395	*008	S1	KIR3DL1 ^{nign/SI}	-	-	B*44:03	-	1	Т
B398	-	-	-	-	-	B*13:02	-	1	Т
B402	*001	*004	KIR3DL1 ^{nign/null}	-	-	B*44:02	-	1	
B403	*004	*015	KIR3DL1	-	-	B*44:02	B*57:01	2	T/I
B405	*002	*004	KIR3DL1 ^{nign/null}	-	-	-	-	0	-
B413	*001	*005	KIR3DL1 ^{nign/iow}	-	-	-	-	0	-
B421	*001	*002	KIR3DL1 ^{nign}	-	-	-	-	0	-
	*000		heterozygot			D*42.22			
B435	*008	\$1	KIR3DL1	-	-	B*13:02	-	1	 . /
B446	*005	*007	KIR3DL1 ¹⁰	A*24:02	-	B*27:03/05	-	2	I/T
D 4 4 7	*001	*005	neterozygot		<u> </u>				
B447	*001	*005		-	-		-	0	-
B456	*020	51		-	-	B*27:03/05	-		
B462	*002	×000		-	-	-	-	0	-
B468	*004	*009	KIK3DL1 ^{nun/low}	-	-	-	-	0	-
B472	*004	*008	KIR3DL1	A*32:01	-	B*38:01	-	2	/

Proband	KIR3 All	DL1- ele	KIR3DL1- Allel-Gruppe	HLA-A ^{Bw} Allel	4_	HLA-B ^{Bw4}	-Allel	HLA- Bw4- Gruppe	HLA- Bw4 Pos. 80
B517	*007	*008	KIR3DL1 ^{low/high}	-	-	B*44:03	-	1	Т
B523	*002	*008	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*27:03/05	-	1	Т
			heterozygot						
B545	*001	*007	KIR3DL1 ^{high/low}	-	-	-	-	0	-
B549	*004	*005	KIR3DL1 ^{null/low}	A*24:02	-	-	-	1	I
B553	*008	*015	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*13:02	B*49:01	2	T/I
			heterozygot						
B582	*001	*001	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*27:03/05	-	1	Т
			homozygot						

4.2.2.4.2 Korhorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten

Die folgende Kohorte besteht aus 39 gesunden Probanden, die zur Untersuchung der Inhibitionseffekte der HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ Peptidvarianten auf KIR3DL1⁺-NK-Zellen verwendet wurden. Die Tabelle (**Tab. 4.2**) enthält neben den KIR3DL1-Genotyp auch die Information zum HLA-Bw4-Status bzw. die Zuordnung zur KIR3DL1-Allel- bzw. HLA-Bw4/Pos. 80-Gruppe. Die Allele, die kein HLA-Bw4 darstellen, werden in der Tabelle mit einem Querstrich "-" gleichgesetzt. Nicht bekannte Informationen werden durch "N/A" gekennzeichnet.

Tab. 4.2: Übersicht die Kohorte zur Unt	ersuchung der HBV GTD Pol ₁	14-122 Peptidvarianten
---	--	------------------------

Pro- band	KIR3 All	DL1- ele	KIR3DL1- Allel-Gruppe	HLA-A ^B Allel	₩4_	HLA-B ^{Bw/}	¹ -Allel	HLA- Bw4- Grup- pe	HLA- Bw4 Pos. 80
B237	*001	*002	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*44:02	B*49:01	2	T/I
			heterozygot						
B265	*002	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	A*32:01	-	B*44:02	-	2	I/T
B266	*005	*020	KIR3DL1 ^{low/high}	A*24:02	-	-	-	1	I
B274	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B278	*004	*005	KIR3DL1 ^{null/low}	-	-	B*57:01	-	1	I
B280	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	-	-	B*37:01	B*44:03	2	T/T
			homozygot						
B282	*001	*020	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*27:03/05	-	1	Т
			heterozygot						
B314	*002	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	A*32:01	-	B*47:01	-	2	I/T
B319	*004	*005	KIR3DL1 ^{null/low}	-	-	B*44:02	-	1	Т
B325	*001	*001	KIR3DL1 ^{high}	A*32:01	-	-	-	1	I
			homozygot						
B328	*005	*009	KIR3DL1 ^{low}	A*23:01	-	B*44:03	B*51:01	3	T/T/T
			heterozygot						

Pro- band	KIR3 All	DL1- ele	KIR3DL1- Allel-Gruppe	HLA-A ^B Allel	w4_	HLA-B ^{Bw}	¹ -Allel	HLA- Bw4- Grup- pe	HLA- Bw4 Pos. 80
B329	*001	*004	KIR3DL1 ^{high/null}	-	-	B*27:02	-	1	I
B333	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	N/A	N/	N/A	N/A	N/A	N/A
			homozygot		Α				
B334	*001	*001	KIR3DL1 ^{high}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B339	*002	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	-	-	B*38:01	B*44:05	2	I/T
B342	*001	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	-	-	B*27:03/05	B*37:01	2	Т/Т
B352	*002	*002	KIR3DL1 ^{high}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B355	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B361	*002	*004	KIR3DL1 ^{high/null}	A*24:02	-	B*27:02	-	2	1/1
B372	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	A*24:02	-	-	-	1	I
			homozygot						
B391	*008	S1	KIR3DL1 ^{high/S1}	-	-	B*27:03/05	B*57:01	2	T/I
B392	*001	*002	KIR3DL1 ^{high}	-	-	-	-	0	-
			heterozygot						
B395	*008	S1	KIR3DL1 ^{high/S1}	-	-	B*44:03	-	1	Т
B405	*002	*004	KIR3DL1 ^{high/null}	-	-	-	-	0	-
B413	*001	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	-	-	-	-	0	-
B421	*001	*002	KIR3DL1 ^{high}	-	-	-	-	0	-
			heterozygot						
B446	*005	*007	KIR3DL1 ^{low}	A*24:02	-	B*27:03/05	-	2	I/T
			heterozygot						
B447	*001	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	-	-	-	-	0	-
B456	*020	S1	KIR3DL1 ^{high/S1}	-	-	B*27:03/05	-	1	Т
B468	*004	*009	KIR3DL1 ^{null/low}	-	-	-	-	0	-
B472	*004	*008	KIR3DL1 ^{null/high}	A*32:01	-	B*38:01	-	2	1/1
B475	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	-	-	-	-	0	-
			homozygot						
B476	*001	*002	KIR3DL1 ^{high}	-	-	-	-	0	-
			heterozygot						
B483	*001	*001	KIR3DL1 ^{high}	A*24:02	-	B*13:02	-	2	I/T
			homozygot						
B486	*005	*005	KIR3DL1 ^{low}	-	-	B*37:01	-	1	Т
			homozygot						
B490	*001	*005	KIR3DL1 ^{high/low}	-	-	B*44:03	-	1	Т
B523	*002	*008	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*27:03/05	-	1	Т
			heterozygot						
B553	*008	*015	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*13:02	B*49:01	2	T/I
			heterozygot						
B582	*001	*001	KIR3DL1 ^{high}	-	-	B*27:03/05	-	1	Т
			homozygot						

4.2.2.5 Peptid-Stabilisierung für die Expression von HLA-B*27:05 auf der Zelloberfläche

Die Peptid-Stabilisierung ermöglichte die HLA-B*27:05-Expression auf der Oberfläche der stabil transduzierten T2 HLA-B*27 Zelllinie. Bei der Peptid-Stabilisierung wurden die Peptide ins Zellkulturmedium gegeben, welche dann exogen internalisiert wurden und TAP-unabhängig einen stabilen Komplex mit HLA-B*27:05 bildeten. Dieser konnte dann auf der Oberfläche exprimiert werden.

4.2.2.5.1 HLA-B*27:05-Stabilisierung durch die viralen Peptide

Zur Bestimmung der Stabilisierungsfähigkeit der Peptide an HLA-B*27:05 wurden aufsteigende Konzentrationen des Peptids in das Zellkulturmedium gegeben. Dafür wurden zunächst die T2 HLA-B*27-Zellen gezählt, nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 500 g mit R10-Medium auf eine Zellkonzentration von 1,11 Mio Zellen/ml eingestellt und in je eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte (Rundboden) 90 µl (100.000 Zellen) der Zellsuspension gegeben. Von den Peptiden wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen angesetzt:

Endkonzentration [µM]	Peptid [µl]	R10-Medium [µl]
100	1,1 aus der 20 mM Stammlösung	20,9
10	2,0 aus der 100 µM Verdünnung	18,0

Aus diesen Verdünnungen wurde nach dem folgenden Pipettier-Schema je 10 µl/Vertiefung zur Zellsuspension pipettiert:

	Kon	zentratio	n [µM]
Peptid	0	10	100
XXX			
XXX			

Zum Schluss wurden die Zellen für 24 Stunden bei 26°C im Inkubator bebrütet und am Folgetag die Oberflächenexpression des Peptid/HLA-B*27-Komplexes durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativ-Kontrolle dienten die Zellen, zu denen keine Peptide hinzugegeben wurden (0 μM).

Material & Methoden

4.2.2.5.2 Peptid-Stabilisierung zur Stimulation der PBMCs (NK-Zell-Assay)

Die Peptid-Stabilisierung zur Stimulation der PBMCs erfolgte ähnlich wie die zur Ermittlung der Stabilisierungsfähigkeit der Peptide. Zu Beginn der Peptid-Stabilisierung wurden die T2-Zellen gezählt und mit R10-Medium auf 1 Mio Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden dann jeweils 60 μ l in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte (Rundboden) pipettiert und 0,3 μ l Peptid aus der 20 mM-Stammlösung dazugegeben, um eine Endkonzentration des Peptids von 100 μ M zu erreichen. Nach vorsichtigen Resuspendieren wurde die Platte für 24 Stunden bei 26°C inkubiert.

4.2.2.6 NK-Zell-Assay

Der NK-Zell-Assay diente dem Nachweis der NK-Zell-Aktivierung nach der Stimulation mit T2-Zellen, die mithilfe der Peptid-Stabilisierung den Peptid/HLA-B*27:05-Komplex exprimierten. Dafür wurde zum einen am Vortag die Peptid-Stabilisierung (Abschnitt 4.2.2.5) angesetzt, die als Zielzellen eingesetzt wurden. Zum anderen wurden die Cryo-konservierten PBMCs von gesunden Spendern in Kultur genommen, dessen NK-Zellen den NK-Zell-Rezeptor KIR3DL1 exprimierten (Abschnitt 4.2.2.4). Die PBMCs wurden aufgetaut und nach einer Zellzählung mit dem R10-Medium (Abschnitt 4.1.5) auf 1,2 Mio Zellen/ml eingestellt. Für eine Vorstimulation wurde 1 ng/ml IL-15 zu den PBMCs hinzugegeben und anschließend jeweils 250 µl der Zellsuspension (300.000 Zellen) in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte (Rundboden) pipettiert. Um sich von dem Auftauvorgang zu erholen, wurden die Zellen üN im Brutschrank inkubiert.

BXX1		BXX2		
θ	870	835		
T2	871	836		
T2 B27	872	-		
911	830	-		
912	831	-		
497	832	-		
506	833	-		
824	834	-		

Pipettierschema:

Am Folgetag wurden die Platte mit der Peptid-Stabilisierung und die Platte mit den PBMCs bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand ausgeschlagen. Danach wurden in jede Vertiefung der PBMC-Platte 50 μl R10-Medium + 0,6 μl α-CD107 und in jede Vertiefung der Peptid-Stabilisierungs-Platte 50 μl R10-Medium hinzugegeben. Danach wurden die T2-Zellen mithilfe einer Multikanalpipette in die Vertiefung der PBMC-Platte überführt, sodass nun die Effektorzellen, also die in den PBMCs enthaltenen NK-Zellen, mit den Zielzellen (T2 HLA-B*27:05-Zellen) für 5 Stunden bei 26°C im Inkubator stimuliert werden konnten. Nach der Inkubation erfolgte die Antikörperfärbung der Oberflächenmoleküle der PBMCs (Abschnitt 4.2.3) und die durchflusszytometrische Messung am FACS Canto (Abschnitt 4.1.1).

4.2.2.7 Einzelzell-Klonierung

Die Einzelzell-Klonierung ist eine durchflusszytometrische Methode zur Vereinzelung von Zellen, die in Zell-Kultur-Platten sortiert werden, um einzelne Zellklone zu generieren und zu kultivieren. Für diese Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um KIR3DL1⁺-NK-Zell-Klone herzustellen. Dabei wurden Probanden verwendet, die einen KIR3DL1^{high/low}-Genotypen/Phänotypen aufwiesen, um sowohl NK-Zell-Klone mit KIR3DL1^{high}- als auch mit KIR3DL1^{low}-Allelen zu generieren.

Vorbereitung des Mediums und der Zell-Kultur-Platten

Bezüglich des NK-Zell-Mediums ist zu beachten, dass ausschließlich das Grund-NK-Zell-Medium vorbereitend hergestellt werden kann. Dies basiert auf dem CellGenix Stem Cell Growth Medium (Abschnitt 4.1.5) und beinhaltet folgende Zusätze:

- 10 % FBS supreme (v/v), welches zuvor bei 56°C für 30 min Hitze-inaktiviert wurde
- 5 % humanes Serum (v/v), welches zuvor bei 56°C für 30 min Hitze-inaktiviert wurde
- 1 % HEPES Buffer (v/v)

Die weiteren Zusätze müssen unmittelbar vor Verwendung hinzugegeben werden. Dazu zählt humanes IL-2 (250 U/ml), PHA-L (2,5 µg/ml) und bestrahlte PBMCs (30 gy; 3000 Zellen/Loch einer 96-Loch-Platte), die als Feeder-Zellen fungieren. Außerdem werden alle verwendeten Medien zur Vermeidung von Kontaminiatin vor der Verwendung steril filtriert. Weiterhin müssen die Medien bei 37°C vorgewärmt werden, da die NK-Zell-Klone Kälte-empfindlich sind.

Bestrahlen von PBMCs

Je ein Cryo mit den PBMCs von drei unterschiedlichen Probanden, die nicht den Probanden für die Einzelzell-Klonierung entsprachen, wurden gemäß Abschnitt 4.2.2.4 aufgetaut und in ein mit 7 ml steril filtrierten DPBS vorbereiteten 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach Resuspendieren wurden 100 µl der Zellsuspension in ein 1,5 ml-Reagiergefäß überführt und die Zellen mithilfe des Blutbild-Analysegeräts (Sysmex) gezählt. Zeitgleich wurde die Zellsuspension bei 500 g für 5 min zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstands die Zellen mit steril filtriertem R10-Medium auf eine

Konzentration von 3x10⁵ Zellen eingestellt. Im Anschluss konnten die Zellen im 15 ml Zentrifugenröhrchen bei 30 gy bestrahlt werden. Pro 96-Loch-Platte werden 1 ml der bestrahlten Feeder-Zellsuspension benötigt.

Nachdem das NK-Zell-Medium vollständig hergestellt wurde, konnten je 90 µl des Mediums in jede Vertiefung einer 96-Loch-Platte (Rundboden) gegeben werden. Anschließend wurden je 10 µl der Feeder-Zellsuspension in jede Vertiefung hinzu pipettiert. Die vorbereiteten Platten wurden bis zum Gebrauch im Brutschrank bei 37°C gelagert.

Vorbereitung der PBMCs für die Sortierung

Je ein Cryo jedes Probanden wurde gemäß Abschnitt 4.2.2.4 aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein mit 9 ml steril filtrierten DPBS vorbereiteten 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und resuspendiert. Für die Zellzählung am Blutbild-Analysegerät (Sysmex) wurden 100 µl der Zellsuspension entnommen. Das 15 ml Zentrifugenröhrchen wurde anschließend bei 100 g für 7 min zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands die Zellen in 700 µl steril filtrierten DPBS resuspendiert. 2,5 Mio Zellen (0,5 Mio Zellen/Einzelfärbung) werden für die Einzelfärbungen, die für die Kompensationen bei der Durchflusszytometrie benötigt werden, abgenommen. Zu den restlichen Zellen der Zellsuspension wurden für die komplette Färbung der PBMCs die Antikörper folgendermaßen hinzugegeben: CD3/14/19 – PerCP-Cy5.5 (14 µl/28 µl/28 µl auf 700 µl), CD16 – APCeFluor780 (14 µl auf 700 µl), CD56 – FITC (20 µl auf 700 µl) und KIR3DL1 – APC (28 µl auf 700 µl). Für die Einzelfärbungen in FACS-Röhrchen wurden je 0,5 Mio Zellen in 100 µl DPBS gefärbt: CD3/14/19 – PerCP-Cy5.5 (2 µl/4 µl/4 µl), CD16 – APC-eFluor780 (2 µl), CD56 – FITC (2,8 µl) und KIR3DL1 – APC (4 µl). Ein Aliquot blieb ungefärbt und fungierte als Negativkontrolle.

Die Färbung erfolgte für 15 min bei RT. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 100 g für 7 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und die Zellen in steril-filtrierten DPBS auf 30-50 Mio Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde über einen Filter in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und konnte nun mithilfe eines Durchflusszytometers sortiert werden. Während der Zellsortierung wurden die KIR3DL1-eprimierenden NK-Zellen abhängig von ihrer Expressionsstärke des Rezeptors (KIR3DL1^{high} oder KIR3DL^{low}) in unterschiedliche Platten sortiert, um schlussendlich NK-Zell-Klone zu erhalten, die unterschiedliche KIR3DL1-Allele beinhalten.

Material & Methoden

4.2.2.8 T-Zell-Assay

Für die Untersuchung der Aktivierbarkeit von T-Zellen durch virale Peptide mithilfe einer Interferon-y Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse wurde ein funktionaler T-Zell-Assay durchgeführt. Dazu wurden zu Beginn Gebrauchslösungen aller zu testenden Peptide und der Kontrolle "CEF-Pool" mit einer Konzentration von 1 mg/ml in R10-Medium (Abschnitt 4.2.2.8) hergestellt. Anschließend wurden die PBMCs der entsprechenden Kohorte gemäß Abschnitt 4.2.2.4 aufgetaut, mithilfe des Blutbild-Analysegeräts (Sysmex) gezählt und mit R10-Medium auf eine Konzentration von $2x10^6$ Zellen eingestellt. Danach wurde in eine entsprechende Menge von Vertiefungen einer 48-Loch-Platte 0,5 ml der Zellsuspension gegeben, die pro Vertiefung folgende Zusätze enthielten: 0,5 µl Anti-CD28 (1 µl/ml) und 1,25 µl IL-2 (2,5 µl/ml). Anschließend wurden in je eine Vertiefung 0,5 µl des jeweiligen Peptids bzw. des CEF-Pools gegeben und für 10 Tage bei 37°C in Brutschrank kultiviert. Nach 5 bis 7 Tagen musste in jede Vertiefung der 48-Loch-Platte 250 µl R10 zusammen mit 0,625 µl IL-2 (2,5 µl/ml) hinzu pipettiert werden.

Am zehnten Tag erfolgte die Restimulation der PBMCs mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse (Abschnitt 4.2.3). Dazu wurden von jedem Ansatz 2x 250 μ l (0,5 Mio Zellen) in eine 96-Loch-Platte (Rundboden) überführt. Die 96-Loch-Platte wurde dann für 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand anschließend ausgeschlagen. Es erfolgte ein Waschschritt, bei dem in jede Vertiefung 200 μ l R10 gegeben und die Platte erneut für 5 min bei 500 g zentrifugiert wurde. Während des Zentrifugierens wurde BFA (1 mg/ml) 1:10000 in entsprechender Menge R10 verdünnt, damit in jede Vertiefung 100 μ l R10/BFA-Lösung pipettiert werden konnte. Das BFA sorgte dafür, dass das zu messende Interferon γ (IFN γ) nicht von den T-Zellen freigesetzt wird und mittels intrazellulärer Antikörper-Färbung quantifiziert werden konnte. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand erneut ausgeschlagen und 100 μ l der R10/BFA-Lösung in jede Vertiefung hinzugefügt. Zusätzlich wurde in je eine Probe jedes Ansatzes 1 μ l des entsprechenden Peptids (1 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz ohne Peptid diente hierbei als Negativkontrolle. Dann wurden die Zellsuspensionen für 5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach 5-stündiger Inkubation erfolgte die Antikörper-Färbung, indem zunächst die Platte bei 500 g für 5 min zentrifugiert und im Anschluss der Überstand ausgeschlagen wurde. Dann wurden zum Waschen der Zellen in jede Vertiefung der 96-Loch-Platte 200 µl DPBS gegeben und erneut für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Nach dem Ausschlagen des Überstands wurde in jede Vertiefung der Platte 100 µl der DPBS/Vitalitätsmarker-Lösung gegeben, wobei der Vitalitätsmarker eFluor780 1:5000 verdünnt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 4°C wurden 100 µl DPBS in jede Vertiefung gegeben und die Platte zentrifugiert (5 min, 500 g). Der Überstand wurde ausgeschlagen und anschließend 100 µl der Antikörper-Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Für die Antikörper-Lösung wurde die entsprechende

Material & Methoden

Menge DPBS mit CD4-PE (1 µl/ml), CD8-APC (2 µl/ml) und CD3-PerCP-Cy5.5 (2 µl/ml) gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 15 min. Nach einem weiteren Waschschritt (Hinzugabe von 100 µl DPBS, Zentrifugation für 5 min bei 500 g und Ausschlagen des Überstands) wurden die Zellen mit 50 µl IC Fixation Buffer für 10 min bei 4°C fixiert, um diese anschließend die Zellen zu permeabilisieren, indem 150 µl des 1x Perm-Puffers zu den Zellen pipettiert und anschließend die 96-Loch-Platte bei 500 g für 5 min zu zentrifugieren. Der Überstand wurde erneut ausgeschlagen und die Zellen mit 200 µl des 1x Perm-Puffers gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 500 g wurde der Überstand wieder mittels Ausschlagens entfernt und für die IFNγ-Färbung die entsprechende Menge des 1xPerm-Puffers mit IFNy-FITC 1:1000 verdünnt, um 100 µl dieser Lösung in jede Vertiefung der 96-Loch-Platte zu geben. Die IFN-y-Färbung bei 4°C dauerte 15 min und wurde mit einem letzten Waschschritt mit je 100 µl DPBS pro Vertiefung und einer Zentrifugation für 5 min bei 500 g beendet. Nachdem ein letztes Mal der Überstand ausgeschlagen und die Zellen in 100 µl DPBS aufgenommen wurden, konnte die Quantifizierung der IFN-y-positiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt werden (Abschnitt 4.2.3).

4.2.3 Durchflusszytometrie – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Das Verfahren der Durchflusszytometrie wurde zur quantitativen Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen verwendet. Dafür wurden die zu untersuchenden Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt, die gegen Zelllinienmarker, Aktivitätsmarker oder Zytokine gerichtet sein konnten. Zu Beginn der Antikörper-Färbung wurden die Zellen in eine 96-Loch-Platte (Rundboden) überführt und zentrifugiert (700 g, 3 min). Nachdem der Überstand ausgeschlagen wurde, wurden die Zellen mit 100 µl DPBS gewaschen. Dafür wurde DPBS zu den Zellen gegeben, die Zellen mittels Zentrifugation (700 g, 3 min) pelletiert, der Überstand ausgeschlagen und die 96-Loch-Platte kurz gevortext (dieser Vorgang wird in der folgenden Beschreibung als Waschschritt benannt). Danach wurde mit der Färbung begonnen, wobei jeder Färbeschritt in einem Volumen von 100 µl erfolgte.

Im ersten Schritt wurden die Zellen mit dem Vitalitätsfarbstoff für 10 min bei RT inkubiert, indem DPBS mit der entsprechenden Menge des Farbstoffs (Abschnitt 4.1.7) versetzt und dies zu den Zellen gegeben wurde. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen. Während des Waschschritts wurde der Antikörper-Mastermix für die Färbung der Oberflächenmoleküle angesetzt [Die Menge an Antikörpern pro 100 µl DPBS wurde zuvor austitriert und tabellarisch festgehalten (Abschnitt 4.1.7)]. Danach wurden je 100 µl des Mastermix zu den Zellen gegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte die Fixierung der Zellen mit 50 µl des intrazellulären Fixier Puffers (IC Puffer) für

10 min im Dunkeln bei RT. Danach konnte entweder ein letzter Waschschritt erfolgen oder eine intrazelluläre Färbung von Zytokinen oder anderen Proteinen. Dafür wurden die Zellen zweimal anstelle von DPBS mit dem Permeabilisierungspuffer 1x Perm-Puffer gewaschen. In der Zwischenzeit wurde der Mastermix mit 1x Perm-Puffer und den Antikörpern angesetzt und nach dem zweiten Waschschritt 100 μ l des Mastermix zu den Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 15 min im Dunkeln bei RT und ein Waschschritt mit DPBS. Danach konnten die Zellen in ihrem Messvolumen DPBS resuspendiert und für die Messung am Durchflusszytometer verwendet werden.

4.2.4 Molekularbiologische und immunologische Methoden

4.2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel über ein elektrisches Feld ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die negativ-geladenen DNA-Fragmente zum positiv-geladenen Ende der Elektrophorese-Kammer wanderten. Die Gelelektrophorese diente der Größenbestimmung der amplifizierten PCR-Produkte oder mittels Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmid-Fragmente (Abschnitt 4.2.4.2).

Für die Durchführung einer Gel-Elektrophorese wurde zunächst ein Agarose-Gel hergestellt, wobei je nach erwarteter Größe der Fragmente die Prozentualität des Agarose-Gels variieren konnte. Da die hier verwendeten Plasmide und PCR-Produkte eine Größe zwischen 500 bp und 12 kb aufwiesen, wurde immer ein 1%-ige Agarose-Gel hergestellt. Dazu wurde für einen kleinen Elektrophorese-Schlitten 0,5 g LE-Agarose abgewogen und in 50 ml 1xTBE-Puffer unter Verwendung einer Mikrowelle aufgekocht (für einen großen Elektrophorese-Schlitten wurde die doppelte Menge verwendet). Nach einer kurzen Abkühlphase wurden 5 (bzw. 10) Tropfen der Ethidiumbromidlösung dazugegeben, vermischt und das flüssige Gel in den Schlitten, der mit einem Gel-Kamm bestickt war, gegossen. Nach dem Aushärten konnte der Kamm entfernt und die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer befüllt werden, bis das Gel bedeckt war. Die Geltaschen wurden nun mit dem Größenstandard und den Proben, die mit dem 6x Gel Loading Dye versetzt wurden, beladen. Zum Schluss wurde die Elektrophorese-Kammer am Power-Supply angeschlossen und die Elektrophorese bei 120 V und max. 400 mA für 30 bis 60 min durchgeführt.

Nach Beenden der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte bzw. DNA-Fragmente wurde das Gel mithilfe des UV-Transilluminators abgelichtet und das Gelbild am Computer mithilfe der Software Intas dargestellt. Auf diese Weise konnten die Gelbanden der abgebildeten PCR-Produkte

oder DNA-Fragmente mit dem Größenstandard verglichen und die Größe der DNA abgeschätzt werden.

4.2.4.2 Klonierung

In dieser Arbeit sollten Zelllinien generiert werden, die das HLA-B*27:05-Molekül gemeinsam mit einem viralen Peptid exprimieren, welches dann auf dem HLA-Molekül stabilisiert und auf der Zelloberfläche exprimiert werden soll. Dabei wurde das Expressionsplasmid so entworfen, dass ein Transkript mit der Gensequenz des HLA-Moleküls, einer Spaltstelle, einer Bindestelle für das ER (endoplasmatische Retikulum) und der Gensequenz des viralen Peptids gebildet wird.

Durch vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits das Plasmid mit dem HLA-B*27:05 Molekül, einer zwischengeschalteten Spaltstelle und dem HCV GT1 NS5B₂₄₈₁₋₂₄₈₉ Epitop ARMILMTHF in ein Expressionsplasmid kloniert, sodass dieses Plasmid als Grundlage für die Klonierungsmethode "Ortsspezifische Mutagenese – SDM (*Site-directed mutagenesis*)" verwendet werden, um Plasmide zu erstellen, die das HLA-Molekül mit der gewünschen Peptid-Variante beinhalten. Danach kann die entstandene Plasmidesequenz nach gelelektrophoretischer Auftrennung aufgereinigt, phosphoryliert, ligiert und zum Schluss in E. *coli*-Bakterien transformiert (Abschnitt 4.2.1.1) werden, um die Plasmid-DNA zu vervielfältigen.

4.2.4.2.1 Ortsspezifische Mutagenese – SDM (Site-directed mutagenesis)

Die ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis – SDM*) ist eine Klonierungsmethode zum Austausch von einem bis wenige Basenpaare innerhalb einer beliebigen Gensequenz. Bei der SDM wird das gesamte Plasmid mittels PCR amplifiziert und der Basenaustausch zur Veränderung der Aminosäuresequenz des viralen Peptids über die Primer verursacht. Ein Primer wird dazu so konzipiert, dass dieser den beabsichtigten Basenaustausch bereits beinhaltet und an der Stelle, wo die Gensequenz des viralen Peptids im Plasmid integriert ist, ansetzt. Die Basen im Primer sowohl vor als auch hinter der Stelle des Basenaustauschs sind komplementär zur Plasmidsequenz, um das Ansetzen des Primers zu gewährleisten. Der zweite Primer setzt direkt hinter dem anderen Primer an und amplifiziert das Plasmid in entgegengesetzter Richtung. Auf diese Weise wird das gesamte Plasmid kloniert und enthält den gewünschten Basenaustausch.

4.2.4.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion – PCR (Polymerase chain reaction)

Der erste Schritt zur Erstellung der HLA-B*27:05/Peptid-Plasmide ist das Konzipieren der *reverse*-Primer, die den Basenaustausch enthalten, und der *forward*-Primer ohne Basenaustausch

(Abschnitt 4.1.8). Diese Primer wurden zusammen mit dem bereits existierenden Plasmid P217 (pWPI-Puro/mCherry-HLA-B*27:05:02+2a_ER_ARMILMPHF) im folgenden PCR-Ansatz eingesetzt:

<i>template</i> P217 (50,0 ng/μl)	1,0 µl
Q5® High Fidelity DNA Polymerase ohne Hot Start (10 U/ μ l)	0,5 μl
dNTPs (20 mM – 5 μmol each)	2,0 µl
<i>forward</i> -Primer (10 pmol/μl)	2,5 µl
<i>reverse</i> -Primer (10 pmol/μl)	2,5 µl
5x Q5-Puffer mit MgCl ₂	10,0 µl
ddH2O	31,5 μl

PCR-Produkt: 12226 bp

Für die Reaktion im Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet:

Deckel-Temperatur: 98°C

1.	98°C	2 min		
2.	98°C	30 sec	•	
3.	72°C	30 sec		35x
4.	72°C	6 min		
5.	72°C	10 min		
6.	4°C	Pause		

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden nach einem halbstündigen Restriktionsverdau mit *Dpn* I bei 37°C zur Fragmentierung der *template*-DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 4.2.4.1) und mithilfe eines Qiagen-Kits (Abschnitt 4.2.4.3) aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden im Anschluss mithilfe der T4 Polynukleotid-Kinase (T4 PNK) phosphoryliert. Folgendes Pipettier-Schema wurde verwendet:

T4 ΡΝΚ (10 U/μl)	1,0 µl
T4 10x Buffer (10 mM ATP)	2,0 µl
DNA (Plasmid/PCR-Produkt)	17,0 μl

Der Phosphorylierungsansatz wurde für 30 min bei 37°C in einem Thermocycler inkubiert. Anschließend erfolgte die Ligation der linearisierten Plasmidsequenzen, zu dem 0,5 µl der T4 Ligase (400.000 U/ml) pipettiert wurde und dieser Ligationsansatz bei RT für 1 Stunde inkubiert wurde. Zum Schluss wurden 10 μl des Ligationsansatzes in E. *coli* Bakterien transformiert (Abschnitt 4.2.1.1).

4.2.4.3 DNA-Aufreinigung mittels Qiagen Kits

Die DNA-Aufreinigung diente der Trennung der DNA-Fragmente von Puffern und Enzymen aus vorherigen Reaktionen. Dazu konnte die DNA entweder über das PCR QIAquick PCR Purification Kit direkt nach der PCR oder über das QIAquick Gel Extraction Kit nach eine Gelelektrophorese aufgereinigt werden, wobei die Aufreinigung nach Hersteller-Angaben durchgeführt wurde.

4.2.4.4 Plasmid-DNA-Präparation

Mithilfe der Plasmid-DNA-Präparation wurden die klonierten Plasmide aus den E. *coli* Bakterien isoliert. Dies erfolgte je nach Menge der Bakteriensuspension (Abschnitt 4.2.1.2) entweder mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit oder mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit. Die Durchführung der DNA-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität ("Antibody-dependent cell- mediated Cytotoxicity")
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom ("Acquired Immunodeficiency Syndrome")
APC	biologisch: Antigen-präsentierende Zelle ("Antigen presenting cell") biochemisch: Allophycocyanin (Fluorochrom)
АРС-Су7	Allophycocyanin konjugiert mit Cyanine 7
АТР	Adenosintriphosphat
β2m	Beta-2-Mikroglobulin
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BV	Brilliant Violet [™]
CaCl₂	Calciumchlorid
CD	Differenzierungs-Cluster ("Cluster of Differentiation")
CEF	Peptidpool bestehend aus 32 Peptiden vom Zyomegalievirus (" C ytomegalovirus"), <u>E</u> pstein-Barr-Virus und Influenzavirus (<u>F</u> LU)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("Deoxyribonucleic Acid")
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phospate Buffered Saline
E. <i>coli</i>	Escherichia <i>coli</i>
EBNA3C	Epstein-Barr Virus Kern-Antigen 3C ("Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C")

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ("Ethylenediaminetetraacetic acid")
ER	Endoplasmatisches Retikulum
E:T	Effektor:Target
et al	und andere (<i>"et alii"</i>)
FACS	Durchflusszytometrie ("Fluorescence Activated Cell Sorting")
FBS	Fetales Kälberserum ("Fetal Bovine Serum")
Fc	Fragment c vom Immunglobulin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht ("Forward Scatter")
g	relative Zentrifugalkraft
G	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen ("Group-specific Antigen")
GT	Genotyp
Gy	Gray
HBV	Hepatitis B Virus
HCMV	Humanes Zytomegalievirus (<i>"Human Cytomegalovirus"</i>)
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-Sulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IAV	Influenza A Virus
IC	Intrazellulär (<i>"Intracellular"</i>)
IDU	Injizierende Drogenkonsumenten ("Injecting Drug Users")
IFN	Interferon
(h)IL	(humanes) Interleukin

ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (<i>"Immunoreceptor Tyrosine-based activating Motif"</i>)
ΙΤΙΜ	Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Inhibitionsmotiv ("Immunoreceptor Tyrosine-based inhibitory Motif")
Kb	Kilobasen paare
KCI	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KIR	Killerzell-Immunoglobulin-ähnlicher Rezeptor (<i>"Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor"</i>)
Konz.	Konzentration
I	Liter
LB	Lysogenie-Bouillon
Lsg.	Lösung
М	Molar
mA	Milliampere
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität ("Mean Fluorescence Intensity")
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
МНС	Haupthistokompatibilitätskomplex ("Major Histocompatibility Complex")
MIC	MHC-Klasse-I-Polypeptid-verwandtes Protein
Min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NCR	Natürliche Zytotoxizität-Rezeptoren ("Natural Cytotoxicity Receptors")
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NP	Nukleoprotein (<i>"Nucleprotein"</i>)
ns	nicht signifikant
NS5B	Nicht-Strukturprotein 5B
РВМС	Periphere mononukleäre Blutzellen ("Peripheral Blood Mononuclear Cells")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction")
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-bindendes Protein konjugiert mit Cyanine 5.5
рН	Potential des Wasserstoffs ("pondus hydrogenii oder potentia hydrogenii")
РНА	Phytohemagglutinin
Pol	Polymerase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PWID	Leute, die Drogen injizieren ("People who inject drugs")
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>"rounds per minute"</i>)
RT	Raumtemperatur
SCGM	GMP Stem Cell Growth Medium
SDM	Ortsspezifische Mutagenese ("Side-directed Mutagenesis")
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
SP	Signalpeptid
SPP	Signalpeptid-Peptidase
SSC	Seitliches Streulicht (<i>"Side Scatter"</i>)

Tab.	Tabelle
ТАР	Antigen-Peptid-Transporter ("Transporter associated with antigen processing")
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>"T Cell Receptor"</i>)
T _{FH}	follikuläre T-Helferzellen
TNF α	Tumornekrose-Faktor alpha
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (<i>"TNF-related apoptosis-inducing ligand"</i>)
U	Einheit (<i>"Unit"</i>)
üN	über Nacht
UL16	Unique Long
ULBP	UL16-bindendes Protein (<i>"UL16-binding protein"</i>)
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μmol	Mikromol
μΜ	Mikromolar
V	Volt
v/v	Volumenprozent

Abbildungsverzeichnis

Abb.	1.1: Proteinstruktur der MHC Klasse I und II Moleküle8
Abb.	1.2: Peptid-Präsentation über MHC Klasse I Moleküle10
Abb.	1.3: Motiv des nonamerischen Peptids für die Bindung an HLA-B*27:05
Abb.	1.4: Physiologische Funktionen von NK-Zellen15
Abb.	1.5: Killer-Zell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) und ihre Liganden
Abb.	1.6: Durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenexpression von KIR3DL1 ⁺ -NK-Zellen
Abb.	2.1: Phylogenetische Untersuchung von 10701 HCV Genomsequenzen zur Darstellung der genomischen
	Distanz zwischen den einzelnen HCV Genotyp-Varianten und dessen HCV NS5B2841-2849 Epitopen 25
Abb.	2.2: Sequenzvariabilität der HCV Genotyp 1a und 1b NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitope27
Abb.	2.3: Darstellung der IFNγ-produzierenden CD8⁺-T-Zellen eines HCV-Patienten nach Stimulation mit
	HCV GT1 NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop Varianten
Abb.	2.4: In silico Sequenzanalyse zum HBV GTD Pol ₁₁₄₋₁₂₂ Epitop in Bezug auf auftretende Substitutionen bei
	HLA-B*27-positiven und HLA-B*27-negativen HBV ⁺ -Probanden
Abb.	2.5: Durchflusszytometrische Darstellung der IFNy-produzierenden CD8 ⁺ -T-Zellen von zwei HBV-
	Patienten nach Stimulation mit dem HBV GTD Pol ₁₁₄₋₁₂₂ Epitop
Abb.	2.6: Darstellung der IFNγ-produzierenden CD8 ⁺ -T-Zellen eines HBV-Patienten nach Stimulation mit
	HBV GTD Pol ₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten
Abb.	2.7: Schematische Darstellung des Zellkultur-basierten NK-Zell-Assays.
Abb.	2.8: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die HCV GT1 NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉ Epitop Varianten gemessen an der
	Veränderung der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur MFI der HLA-B*27:05-
	Oberflächenexpression bei Zellen ohne Peptid in Abhängigkeit der Peptidkonzentration 10 ⁺ µM und
	10 ² μM
Abb.	2.9: Stabilsierung von HLA-B*27:05 durch die HBV GTD Pol ₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten gemessen an der
	Veranderung der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur MFI der HLA-B*27:05-
	Oberflachenexpression bei Zellen ohne Peptid in Abhangigkeit der Peptidkonzentration 10° µW und
4 h h	10 μ W
Abb.	2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C ₂₅₈₋₂₆₆ , FLU NP ₃₈₃₋₃₉₁ und
Abb.	2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C ₂₅₈₋₂₆₆ , FLU NP ₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol ₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren
Abb.	 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10¹ μM und 10² μM
Abb. Abb.	 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10¹ μM und 10² μM
Abb. Abb.	 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10¹ μM und 10² μM
Abb. Abb. Abb.	 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10¹ μM und 10² μM46 2.11: Nachweis der Funktionalität des Zellkultur-basierten NK-Zell-Assays durch Ermittlung der NK-Zell- Aktivität von KIR3DL1⁺- und KIR3DL1⁻-NK-Zellen durch unterschiedliche Stimuli48 2.12: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁻- und KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit HCV GT1 NS5Bases and bzw. HBV GTD Polise tas Epiton Varianten gebunden an
Abb. Abb. Abb.	 10 μM
Abb. Abb. Abb.	 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10¹ μM und 10² μM
Abb. Abb. Abb. Abb.	 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10¹ μM und 10² μM
Abb. Abb. Abb. Abb.	 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, FLU NP₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10¹ μM und 10² μM
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	 10 μW
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μM. 45 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C ₂₅₈₋₂₆₆ , FLU NP ₃₈₃₋₃₉₁ und 45 HBV GTD Pol ₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10 ¹ μM und 10 ² μM
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μW. 43 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C258-266, FLU NP383-391 und HBV GTD Pol144-122 aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10 ¹ μM und 10 ² μM
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μM. 43 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C258-266, FLU NP383-391 und HBV GTD Pol144-122 aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10 ¹ μM und 10 ² μM
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μM. 43 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C ₂₅₈₋₂₆₆ , FLU NP ₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol ₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10 ¹ μM und 10 ² μM
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μW. 43 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C ₂₅₈₋₂₆₆ , FLU NP ₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol ₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10 ¹ μM und 10 ² μM
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μWi 43 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C ₂₅₈₋₂₆₆ , FLU NP ₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol ₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10 ¹ μM und 10 ² μM
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μM. 43 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C ₂₅₈₋₂₆₆ , FLU NP ₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol ₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10 ¹ μM und 10 ² μM
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μW. 43 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C ₂₅₈₋₂₆₆ , FLU NP ₃₈₃₋₃₉₁ und 45 HBV GTD Pol ₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10 ¹ µM und 10 ² µM
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 µN. 45 2.10: Stabilisierung von HLA-B*27:05 durch die Peptide EBV EBNA3C ₂₅₈₋₂₆₆ , FLU NP ₃₈₃₋₃₉₁ und HBV GTD Pol ₁₄₄₋₁₂₂ aus drei unabhängigen Experimenten gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration 10 ¹ µM und 10 ² µM. 46 2.11: Nachweis der Funktionalität des Zellkultur-basierten NK-Zell-Assays durch Ermittlung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1 ⁺ . und KIR3DL1 ⁺ .NK-Zellen durch unterschiedliche Stimuli. 48 2.12: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1 ⁻ und KIR3DL1 ⁺ .NK-Zellen nach 51 2.13: Vergleich der Funktionalität von KIR3DL1 ⁺ und KIR3DL1 ⁺ .NK-Zellen im Zusammenhang mit der 59 2.14: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1 ⁺ .NK-Zellen nach Stimulation mit 59 2.14: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1 ⁺ .NK-Zellen nach Stimulation mit 60 Probanden mit 0 HLA-Bw4. Allelen. 60 2.15: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1 ⁺ .NK-Zellen nach Stimulation mit 60 1CV GT1 NS5B ₂₈₄₁₋₂₈₄₉ bzw. HBV GTD Pol ₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten gebunden an HLA-B*27:05 unterteilt in 60 2.15: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1 ⁺ .NK-Zellen nach Stimulation mit 60 2.16: Grafische Barstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1 ⁺ .NK-Zellen nach Stimulation mit 62 2.16: Grafische Gegenüberstellung der NK-Zell-A
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μW
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μW
Abb. Abb. Abb. Abb. Abb. Abb. Abb.	10 μW

Abb.	2.20: Gelelektrophoretische Darstellung der Klonierung von Plasmiden mit HLA-B*27:05 und den
	endogen zu exprimierenden HCV GT1 NS5B2841-2849 Epitop Varianten und den Kontrollpeptiden
	FLU NP383-391 (SRY) und EBV EBNA3C258-266 (RRI)74
Abb.	2.21: Histogramme zur Darstellung der Anzahl an HLA-B*27-exprimierenden Zellen von verschiedenen
	etablierten T2 Zelllinien
Abb.	2.22: Grafische Darstellung der NK-Zell-Aktivität von KIR3DL1⁻- und KIR3DL1⁺-NK-Zellen nach
	Stimulation mit exogen bzw. endogen Peptid-beladenen T2 HLA-B*27:05 Zielzellen

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Auflistung der zu untersuchenden GT1 HCV NS5B2841-2849 Epitop Varianten und deren prozentuales
Vorkommen in der HCV Online-Kohorte29
Tab. 2.2: Auflistung der zu untersuchenden GTD HBV Pol ₁₁₄₋₁₂₂ Epitop Varianten und deren prozentuales
Vorkommen in der HBV Kohorte unserer Arbeitsgruppe34
Tab. 2.3: Übersicht über die ermittelten Ergebnisse bezüglich der Aminosäure-Eigenschaften der
substituierten Aminosäuren in den HBV GTD Pol $_{ m 114-122}$ Peptid-Varianten, sowie deren
Stabilsierungsfähigkeit von HLA-B*27:05, Stärke der T-Zell-Antworten und Inhibitionsstärken gegenüber
KIR3DL1 ⁺ -NK-Zellen
Tab. 2.4: Übersicht über die ermittelten Ergebnisse bezüglich der Aminosäure-Eigenschaften der
substituierten Aminosäuren in den HCV GT1 NS5B2841-2849 Peptid-Varianten, sowie deren
Stabilisierungsfähigkeit von HLA-B*27:05, Stärke der T-Zell-Antworten und Inhibitionsstärken
gegenüber KIR3DL1 ⁺ -NK-Zellen
Tab. 2.5: Zuordnung der Probanden zur jeweiligen HLA-Bw4-Gruppe58
Tab. 2.6: Auflistung der HLA-Bw4 80(I) bzw. 80(T)-Genotypen von der Kohorte zur Untersuchung der HCV
Peptidvarianten und von der Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten61
Tab. 2.7: Auflistung der KIR3DL1-Genotypen von der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten und von der Kohorte zur Untersuchung der HBV Peptidvarianten
Tab. 2.8: Auflistung der KIR3DL1 ^{low} -Allele in der Kohorte zur Untersuchung der HCV Peptidvarianten und in
der Kohorte zur Ontersuchung der HBV Peptidvarianten
Tab. 2.9: Tabellarische Darstellung der etablierten NK-Zell-Klone
Tab. 3.1: Ubersichtstabelle zu den getesteten Peptiden bezüglich ihrer Inhibitionseffekte gegenüber KIR3DL1
und bezüglich der Eigenschaften der Aminosäuren an Position 4 bis 9 der Nonamere
Tab. 4.1: Übersicht über die Kohorte zur Untersuchung der HCV GT1 NS5B2481-2849 Peptidvarianten
Tab. 4.2: Übersicht die Kohorte zur Untersuchung der HBV GTD Pol114-122 Peptidvarianten

Literaturverzeichnis

- AKRAM, A. & INMAN, R. D. 2012. Immunodominance: a pivotal principle in host response to viral infections. *Clin Immunol*, 143, 99-115.
- ALTER, G. & ALTFELD, M. 2009. NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J Intern Med*, 265, 29-42.
- BADOVINAC, V. P., PORTER, B. B. & HARTY, J. T. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol*, 3, 619-26.
- BARROW, A. D., MARTIN, C. J. & COLONNA, M. 2019. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol*, 10, 909.
- BERRY, R., WATSON, G. M., JONJIC, S., DEGLI-ESPOSTI, M. A. & ROSSJOHN, J. 2020. Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. *Nat Rev Immunol*, 20, 113-127.
- BIRON, C. A. 2016. Innate Immunity. Viral Pathogenesis.
- BORREGO, F., KABAT, J., KIM, D. K., LIETO, L., MAASHO, K., PENA, J., SOLANA, R. & COLIGAN, J. E. 2002. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol*, 38, 637-60.
- BOUDREAU, J. E. & HSU, K. C. 2018. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol*, 39, 222-239.
- BOUDREAU, J. E., LE LUDUEC, J. B. & HSU, K. C. 2014. Development of a novel multiplex PCR assay to detect functional subtypes of KIR3DL1 alleles. *PLoS One*, 9, e99543.
- BOWNESS, P., ALLEN, R. L. & MCMICHAEL, A. J. 1994. Identification of T cell receptor recognition residues for a viral peptide presented by HLA B27. *Eur J Immunol*, 24, 2357-63.
- BOWNESS, P., ZACCAI, N., BIRD, L. & JONES, E. Y. 1999. HLA-B27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. *Expert Rev Mol Med*, 1999, 1-10.
- BROOKS, J. M., MURRAY, R. J., THOMAS, W. A., KURILLA, M. G. & RICKINSON, A. B. 1993. Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant Epstein-Barr virus peptide. *J Exp Med*, 178, 879-87.
- 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, 315-25.
- CARLSTEN, M. & JARAS, M. 2019. Natural Killer Cells in Myeloid Malignancies: Immune Surveillance, NK Cell Dysfunction, and Pharmacological Opportunities to Bolster the Endogenous NK Cells. *Front Immunol*, 10, 2357.
- CARR, W. H., PANDO, M. J. & PARHAM, P. 2005. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol*, 175, 5222-9.
- CELLA, M., LONGO, A., FERRARA, G. B., STROMINGER, J. L. & COLONNA, M. 1994. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med*, 180, 1235-42.
- COCKER, A. T. H., LIU, F., DJAOUD, Z., GUETHLEIN, L. A. & PARHAM, P. 2022. CD56-negative NK cells: Frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity, and KIR expression. *Front Immunol*, 13, 992723.
- COOPER, M. A., FEHNIGER, T. A. & CALIGIURI, M. A. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22, 633-40.
- DAZERT, E., NEUMANN-HAEFELIN, C., BRESSANELLI, S., FITZMAURICE, K., KORT, J., TIMM, J.,
 MCKIERNAN, S., KELLEHER, D., GRUENER, N., TAVIS, J. E., ROSEN, H. R., SHAW, J., BOWNESS,
 P., BLUM, H. E., KLENERMAN, P., BARTENSCHLAGER, R. & THIMME, R. 2009. Loss of viral
 fitness and cross-recognition by CD8+ T cells limit HCV escape from a protective HLA-B27restricted human immune response. *J Clin Invest*, 119, 376-86.
- DE RE, V., CAGGIARI, L., DE ZORZI, M., REPETTO, O., ZIGNEGO, A. L., IZZO, F., TORNESELLO, M. L., BUONAGURO, F. M., MANGIA, A., SANSONNO, D., RACANELLI, V., DE VITA, S., PIOLTELLI, P., VACCHER, E., BERRETTA, M., MAZZARO, C., LIBRA, M., GINI, A., ZUCCHETTO, A., CANNIZZARO,

R. & DE PAOLI, P. 2015. Genetic diversity of the KIR/HLA system and susceptibility to hepatitis C virus-related diseases. *PLoS One*, 10, e0117420.

- DEL VAL, M., IBORRA, S., RAMOS, M. & LAZARO, S. 2011. Generation of MHC class I ligands in the secretory and vesicular pathways. *Cell Mol Life Sci*, 68, 1543-52.
- DIAZ-PENA, R., MONDELO-MACIA, P., MOLINA DE LA TORRE, A. J., SANZ-PAMPLONA, R., MORENO, V. & MARTIN, V. 2020. Analysis of Killer Immunoglobulin-Like Receptor Genes in Colorectal Cancer. *Cells*, 9.
- DJAOUD, Z. & PARHAM, P. 2020. HLAs, TCRs, and KIRs, a Triumvirate of Human Cell-Mediated Immunity. *Annu Rev Biochem*, 89, 717-739.
- DRING, M. M., MORRISON, M. H., MCSHARRY, B. P., GUINAN, K. J., HAGAN, R., IRISH, H. C. V. R. C., O'FARRELLY, C. & GARDINER, C. M. 2011. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5736-41.
- FADDA, L., O'CONNOR, G. M., KUMAR, S., PIECHOCKA-TROCHA, A., GARDINER, C. M., CARRINGTON, M., MCVICAR, D. W. & ALTFELD, M. 2011. Common HIV-1 peptide variants mediate differential binding of KIR3DL1 to HLA-Bw4 molecules. J Virol, 85, 5970-4.
- GARDINER, C. M., GUETHLEIN, L. A., SHILLING, H. G., PANDO, M., CARR, W. H., RAJALINGAM, R., VILCHES, C. & PARHAM, P. 2001. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol*, 166, 2992-3001.
- GONZALEZ, V. D., FALCONER, K., BJORKSTROM, N. K., BLOM, K. G., WEILAND, O., LJUNGGREN, H. G., ALAEUS, A. & SANDBERG, J. K. 2009. Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment. *J Immunol*, 183, 6612-8.
- GOURLEY, T. S., WHERRY, E. J., MASOPUST, D. & AHMED, R. 2004. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol*, 16, 323-33.
- GOWER, E., ESTES, C., BLACH, S., RAZAVI-SHEARER, K. & RAZAVI, H. 2014. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, 61, S45-57.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- HARRINGTON, L. E. 2019. T-Cell Development. Clinical Immunology.
- HARRISON, G. F., LEATON, L. A., HARRISON, E. A., KICHULA, K. M., VIKEN, M. K., SHORTT, J., GIGNOUX, C. R., LIE, B. A., VUKCEVIC, D., LESLIE, S. & NORMAN, P. J. 2022. Allele imputation for the killer cell immunoglobulin-like receptor KIR3DL1/S1. *PLoS Comput Biol*, 18, e1009059.
- HE, Y. & TIAN, Z. 2017. NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands. *Cell Mol Immunol*, 14, 321-330.
- HORN, F. 2012. *Biochemie der Menschen*. Thieme.
- JARDETZKY, T. S., LANE, W. S., ROBINSON, R. A., MADDEN, D. R. & WILEY, D. C. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*, 353, 326-9.
- JOSHITA, S., OTA, M., KOBAYASHI, H., WAKABAYASHI, S. I., YAMASHITA, Y., SUGIURA, A., YAMAZAKI, T., TANAKA, E. & UMEMURA, T. 2021. Association analysis of KIR/HLA genotype with liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and NUC freedom in chronic hepatitis B patients. *Sci Rep*, 11, 21424.
- LEWIS, D. E. & BLUTT, S. E. 2019. Organization of the Immune System. *Clinical Immunology*.
- LIN, Y. C., BOONE, M., MEURIS, L., LEMMENS, I., VAN ROY, N., SOETE, A., REUMERS, J., MOISSE, M., PLAISANCE, S., DRMANAC, R., CHEN, J., SPELEMAN, F., LAMBRECHTS, D., VAN DE PEER, Y., TAVERNIER, J. & CALLEWAERT, N. 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 5, 4767.
- LOPEZ-VAZQUEZ, A., MINA-BLANCO, A., MARTINEZ-BORRA, J., NJOBVU, P. D., SUAREZ-ALVAREZ, B., BLANCO-GELAZ, M. A., GONZALEZ, S., RODRIGO, L. & LOPEZ-LARREA, C. 2005. Interaction between KIR3DL1 and HLA-B*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 infection in a Zambian population. *Hum Immunol*, 66, 285-9.

- LOUIS, N., EVELEGH, C. & GRAHAM, F. L. 1997. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, 233, 423-9.
- LUCKHEERAM, R. V., ZHOU, R., VERMA, A. D. & XIA, B. 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012, 925135.
- MAFFEI, A. & HARRIS, P. E. 1998. Peptides bound to major histocompatibility complex molecules. *Peptides*, 19, 179-98.
- MARIJT, K. A. & VAN HALL, T. 2020. To TAP or not to TAP: alternative peptides for immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol,* 64, 15-19.
- MARSH, S. G., PARHAM, P., DUPONT, B., GERAGHTY, D. E., TROWSDALE, J., MIDDLETON, D., VILCHES, C., CARRINGTON, M., WITT, C., GUETHLEIN, L. A., SHILLING, H., GARCIA, C. A., HSU, K. C. & WAIN, H. 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens*, 62, 79-86.
- MARTIN, M. P. & CARRINGTON, M. 2013. Immunogenetics of HIV disease. *Immunol Rev*, 254, 245-64.
- MARTIN, M. P., QI, Y., GAO, X., YAMADA, E., MARTIN, J. N., PEREYRA, F., COLOMBO, S., BROWN, E. E., SHUPERT, W. L., PHAIR, J., GOEDERT, J. J., BUCHBINDER, S., KIRK, G. D., TELENTI, A., CONNORS, M., O'BRIEN, S. J., WALKER, B. D., PARHAM, P., DEEKS, S. G., MCVICAR, D. W. & CARRINGTON, M. 2007. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*, 39, 733-40.

MCDONALD, D. R. & LEVY, O. 2019. Innate Immunity. *Clinical Immunology*.

- MELE, D., PASI, A., CACCIATORE, R., MANTOVANI, S., OLIVIERO, B., MONDELLI, M. U. & VARCHETTA, S. 2019. Decreased interferon-gamma production by NK cells from KIR haplotype B carriers in hepatitis C virus infection. *Liver Int*, 39, 1237-1245.
- MONOS, D. S. & WINCHESTER, R. J. 2019. The Major Histocompatibility Complex. *Clinical Immunology*.
- MORETTA, L., MONTALDO, E., VACCA, P., DEL ZOTTO, G., MORETTA, F., MERLI, P., LOCATELLI, F. & MINGARI, M. C. 2014. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol*, 164, 253-64.
- MORVAN, M. G. & LANIER, L. L. 2016. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*, 16, 7-19.
- MULLER, C. A., ENGLER-BLUM, G., GEKELER, V., STEIERT, I., WEISS, E. & SCHMIDT, H. 1989. Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6. *Immunogenetics*, 30, 200-7.
- MURPHY, K. & WAEVER, C. 2018. Janeway Immunologie, Springer Sprektrum.
- NEUMANN-HAEFELIN, C., MCKIERNAN, S., WARD, S., VIAZOV, S., SPANGENBERG, H. C., KILLINGER, T., BAUMERT, T. F., NAZAROVA, N., SHERIDAN, I., PYBUS, O., VON WEIZSACKER, F., ROGGENDORF, M., KELLEHER, D., KLENERMAN, P., BLUM, H. E. & THIMME, R. 2006.
 Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology*, 43, 563-72.
- O'CONNOR, G. M. & MCVICAR, D. 2013. The yin-yang of KIR3DL1/S1: molecular mechanisms and cellular function. *Crit Rev Immunol*, 33, 203-18.
- OLIVEIRA, C. C. & VAN HALL, T. 2015. Alternative Antigen Processing for MHC Class I: Multiple Roads Lead to Rome. *Front Immunol*, 6, 298.
- OLIVIERO, B., VARCHETTA, S., PAUDICE, E., MICHELONE, G., ZARAMELLA, M., MAVILIO, D., DE FILIPPI, F., BRUNO, S. & MONDELLI, M. U. 2009. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology*, 137, 1151-60, 1160 e1-7.
- PARHAM, P., NORMAN, P. J., ABI-RACHED, L. & GUETHLEIN, L. A. 2012. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367, 800-11.
- 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, 216-24.

- PYMM, P., TENZER, S., WEE, E., WEIMERSHAUS, M., BURGEVIN, A., KOLLNBERGER, S., GERSTOFT, J., JOSEPHS, T. M., LADELL, K., MCLAREN, J. E., APPAY, V., PRICE, D. A., FUGGER, L., BELL, J. I., SCHILD, H., VAN ENDERT, P., HARKIOLAKI, M. & IVERSEN, A. K. N. 2022. Epitope length variants balance protective immune responses and viral escape in HIV-1 infection. *Cell Rep*, 38, 110449.
- RICH, R. R. & CHAPLIN, D. D. 2019. The Human Immune Response. *Clinical Immunology*.
- SALTER, R. D. & CRESSWELL, P. 1986. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J*, 5, 943-9.
- SALTER, R. D., HOWELL, D. N. & CRESSWELL, P. 1985. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics*, 21, 235-46.
- SANT, A. J. 2019. Overview of T-Cell Recognition. *Clinical Immunology*.
- SAUNDERS, P. M., MACLACHLAN, B. J., WIDJAJA, J., WONG, S. C., OATES, C. V. L., ROSSJOHN, J., VIVIAN, J. P. & BROOKS, A. G. 2021. The Role of the HLA Class I alpha2 Helix in Determining Ligand Hierarchy for the Killer Cell Ig-like Receptor 3DL1. *J Immunol*, 206, 849-860.
- SAUNDERS, P. M., PYMM, P., PIETRA, G., HUGHES, V. A., HITCHEN, C., O'CONNOR, G. M., LOIACONO,
 F., WIDJAJA, J., PRICE, D. A., FALCO, M., MINGARI, M. C., MORETTA, L., MCVICAR, D. W.,
 ROSSJOHN, J., BROOKS, A. G. & VIVIAN, J. P. 2016. Killer cell immunoglobulin-like receptor
 3DL1 polymorphism defines distinct hierarchies of HLA class I recognition. *J Exp Med*, 213, 791-807.
- SHAH-HOSSEINI, A., JAFARI, M., MOHAMMADI, A., SANAEI, R., ALAVIAN, S. M., DOOSTI-IRANI, A., NOORADEH KEYKAVOUSI, M. & TAJIK, N. 2017. The impact of KIR-HLA genotype on hepatitis B virus clearance in Iranian infected individuals. *Med Microbiol Immunol*, 206, 463-470.
- STEWART-JONES, G. B., DI GLERIA, K., KOLLNBERGER, S., MCMICHAEL, A. J., JONES, E. Y. & BOWNESS, P. 2005. Crystal structures and KIR3DL1 recognition of three immunodominant viral peptides complexed to HLA-B*2705. *Eur J Immunol*, 35, 341-51.
- 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, 5-17.
- THÖNS, C., SENFF, T., HYDES, T. J., MANSER, A. R., HEINEMANN, F. M., HEINOLD, A., HEILMANN, M., KIM, A. Y., UHRBERG, M., SCHERBAUM, N., LAUER, G. M., KHAKOO, S. I. & TIMM, J. 2017. HLA-Bw4 80(T) and multiple HLA-Bw4 copies combined with KIR3DL1 associate with spontaneous clearance of HCV infection in people who inject drugs. *J Hepatol*, 67, 462-470.
- THOMSEN, M. C. & NIELSEN, M. 2012. Seq2Logo: a method for construction and visualization of amino acid binding motifs and sequence profiles including sequence weighting, pseudo counts and two-sided representation of amino acid enrichment and depletion. Nucleic Acids Res, 40, W281-7. https://services.healthtech.dtu.dk/services/MHCMotifViewer/
- UMEMURA, T., OTA, M., KATSUYAMA, Y., WADA, S., MORI, H., MARUYAMA, A., SHIBATA, S., NOZAWA, Y., KIMURA, T., MORITA, S., JOSHITA, S., KOMATSU, M., MATSUMOTO, A., KAMIJO, A., KOBAYASHI, M., TAKAMATSU, M., YOSHIZAWA, K., KIYOSAWA, K. & TANAKA, E. 2014. KIR3DL1-HLA-Bw4 combination and IL28B polymorphism predict response to Peg-IFN and ribavirin with and without telaprevir in chronic hepatitis C. Hum Immunol, 75, 822-6.
- UMEMURA, T., JOSHITA, S., SAITO, H., WAKABAYASHI, S. I., KOBAYASHI, H., YAMASHITA, Y., SUGIURA, A., YAMAZAKI, T. & OTA, M. 2021. Investigation of the Effect of KIR-HLA Pairs on Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis C Virus Cirrhotic Patients. *Cancers (Basel)*, 13.
- VARBANOVA, V., POPOV, G., GRIGOROVA, V., PETROVA, D., NAUMOVA, E. & MIHAYLOVA, A. 2021. KIR/HLA ligands immunogenetics markers associated with outcome of hepatitis B virus infection in the Bulgarian population. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 165, 270-276.
- VIRUSES: TAXONOMY OVERVIEW. (o. D.). Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC). https://www.bv-brc.org/view/Virus/10239.

- WALTER, L. & PETERSEN, B. 2017. Diversification of both KIR and NKG2 natural killer cell receptor genes in macaques implications for highly complex MHC-dependent regulation of natural killer cells. *Immunology*, 150, 139-145.
- WAUQUIER, N., PADILLA, C., BECQUART, P., LEROY, E. & VIEILLARD, V. 2010. Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. *Immunogenetics*, 62, 767-71.

WHERRY, E. J. & MASOPUST, D. 2016. Adaptive Immunity. Viral Pathogenesis.

YU, W. H., COSGROVE, C., BERGER, C. T., CHENEY, P. C., KRYKBAEVA, M., KIM, A. Y., LEWIS-XIMENEZ, L., LAUER, G. M. & ALTER, G. 2018. ADCC-Mediated CD56(DIM) NK Cell Responses Are Associated with Early HBsAg Clearance in Acute HBV Infection. *Pathog Immun*, 3, 2-18.

Danksagung

Danksagung

Als aller erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Timm bedanken, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, meine Dissertation am Institut für Virologie anzufertigen. Zugleich bedanke ich mich bei Dr. Tina Senff, die mich in dem Projekt als Betreuerin tatkräftig unterstützt hat. Mit eurer Hilfe konnte ich viele Hürden meistern und mir neues fachliches Wissen aneignen.

Zudem bedanke ich mich auch bei Prof. Dr. Philipp Lang für die Übernahme der Zweitbetreuung und die Supervisor-Meetings, bei denen ich durch konstruktive Kritik gute neue Ideen und Anregungen erhalten habe.

An alle aus dem Institut der Virologie: "Es bleibt nichts zu tun außer `Danke´ zu sagen". Egal, ob missglückte Experimente mich am liebsten laut "Can´t you hear me S.O.S" oder "The Show must go on" singen ließen, oder ob die Realität mich manchmal mit den Worten "They don´t care about us" eingeholt hat, ihr habt mir alle stets das Gefühl von "You´ll never walk alone" gegeben. Vor allem die sozialen Abende, bei denen wir häufig unsere innere "Dancing Queen" rausgelassen haben und wir der Meinung waren, dass wir "The Greatest" sind, gaben mir wieder neues Durchhaltevermögen. Deshalb: Bleibt, so großartig wie ihr seid!

Meiner Familie möchte ich auch tausendmal "Danke" sagen. In seltenen Fällen habe ich mich dabei erwischt, wie ich mich gefragt habe: "Warum hast du [zum Studium] nicht `Nein´ gesagt?". Doch "You raise me up", weswegen ich mit eurer Unterstützung immer wieder zu dem Punkt kam: "I´m not afraid!", also "Relax, take it easy". Mama, Papa und Angi: "You´re simply the best!"

Finally, I would like to thank you, Salah. You came into my life late in my PhD journey, but you had to go through the hardest one with me. You always told me "You are not alone" and were always there for me. You taught me to "Don't worry about a thing" which helped me keep a clear head and focus on what was most important. Thank you for your support. "You are the reason" why I didn't lose my motivation until the end.

Insgesamt waren es viele zwar anstrengende, aber sehr schöne Jahre. "I'm still standing" und zum Schluss kann ich sagen: "I did it my way"!

Curriculum Vitae

Hochschulausbildung

Seit 03/2018	PhD Biologie Institut für Virologie am Universitätsklinikum Düsseldorf Betreuer: Prof. Dr. Jörg Timm Thema: "KIR3DL1-vermittelte Modulation der NK-Zell-Funktion in chronischen Virusinfektionen"
02/2016 – 12/2017	M.Sc. Biologie (Note 1,4) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Betreuer: PD Dr. rer. nat. Albert Zimmermann Thema: "Untersuchungen zur Antagonisierung der Funktion von Natürlichen Killerzellen durch das humane Zytomegalievirus"
09/2012 – 02/2016	B.Sc. Biologie (Note 1,9) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Betreuer: PD Dr. rer. nat. Albert Zimmermann Thema: "Analyse polycistronischer Transkriptionseinheiten des humanen Zytomegalievirus"

Berufserfahrung

Seit 01/2022	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei MukoCell GmbH 01/2022 – 08/2022: Stellvertretende Leitung der Qualitätssicherung Seit 09/2022: Stellvertretende Leitung der Herstellung
03/2018 – 11/2021	Tutorin im Institut für Virologie am Universitätsklinikum Düsseldorf Betreuung der Biologie-Master-Module "Molekulare Virologie und Strukturbiologie" und "Immunbiologie der Leber & Virusinfektionen"
08/2020 – 09/2020	Studentische Hilfskraft im Medizinischen Versorgungszentrum Düsseldorf Analyse des Abstrichmaterials mittels qPCR für die Corona-Diagnostik
04/2020 – 07/2020	Produktionshelferin bei Xebios Diagnostics GmbH Herstellung von Corona-Test-Kits
10/2015 – 02/2018	Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie am Universitätsklinikum Düsseldorf Betreuung des Mediziner-Praktikums in der medizinischen Mikrobiologie, Virologie und Krankenhaushygiene unter Anwendung mikrobiologischer Methoden wie ELISA oder IFT

08/2014 – 09/2014 **Praktikantin in der Unfall- und Handchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf (Life-Science-Center)** Erlernen der Grundlagen zur Kultivierung von humanen Zellen in Zellkultur

Zusatzqualifikationen und Kompetenzen

Fortbildung	Vermittlung der Sachkunde nach §15 Abs. 2 S. 1 Nr. 3, Abs. 4 Gentechnik- Sicherheitsverordnung
Sprachen	Deutsch (Muttersprache) Englisch (sehr gute Kenntnisse)
Hard Skills	steriles Arbeiten unter GMP-Bedingungen im Reinraum bis Reinraumklasse A Zellkultur (auch unter S2-Bedingungen), Infektion und Transfektion PCR, qPCR und Klonierungstechniken DNA/RNA-Isolierung / -analyse (Southern Blot, Northern Blot) Protein-Isolierung / -analyse (SDS PAGE, Western Blot, ELISA, IFT) Durchflusszytometrie, zelluläre Funktionalitätstests Kultivierung von Bakterien und Gram-Färbung

Konferenzbeiträge und Publikationen

- *Mündlicher Vortrag* bei der Online-Konferenz "30th Annual Meeting of the Society for Virology" in Hannover; **Grothmann R**, Senff T, Schwarz T, Walker A, Heinemann F, Heinold A, Khakoo SI, Timm J. Variants of the immunodominant HBV GTD Pol₁₁₄₋₁₂₂ epitope presented by HLA-B*27:05 impact the function of KIR3DL1+ NK cells; 30th Annual Meeting of the Society for Virology, 24-26.03.2021 in Hannover;
- Posterpräsentation bei der Konferenz "29th Annual Meeting of the Society for Virology" in Düsseldorf; Senff T*, Grothmann R, Skibbe K, Walker A, Scherbaum N, Heinemann F, Khakoo SI, Timm J. Variants of the immunodominant HCV NS5B₂₈₄₁ epitope presented by HLA-B*27:05 impact the function of KIR3DL1+ NK cells; 29th Annual Meeting of the Society for Virology, 20-23.03.2019 in Düsseldorf;
- Teilnahme an der Konferenz "28th Annual Meeting of the Society for Virology" in Würzburg
- Müller L, Andrée M, Moskorz W, Drexler I, Walotka L, Grothmann R, Ptok J, Hillebrandt J, Ritchie A, Rabl D, Ostermann PN, Robitzsch R, Hauka S, Walker A, Menne C, Grutza R, Timm J, Adams O, Schaal H. Age-dependent immune response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 COVID-19 vaccination. Clin Infect Dis.2021 Dec 6;73(11):2065-2072.
- Müller L, Ptok J, Nisar A, Antemann J, **Grothmann R**, Hillebrandt F, Brillen AL, Ritchie A, Theiss S, Schaal H. Modeling splicing outcome by combining 5'ss strength and splicing regulatory elements. Nucleid Acid Res.2022 Aug 26;50(15):8834-8851.
- Müller L, Andrée M, Moskorz W, Drexler I, Hauka S, Ptok J, Walotka L, Grothmann R, Hillebrandt J, Ritchie A, Peter L, Walker A, Timm J, Adams O, Schaal H. Adjusted COVID-19 booster schedules balance age-dependent differences in antibody titers benefitting risk populations. Front Aging.2022 Oct 12;3:1027885.
• Jaguva Vasudevan AA, Bähr A, **Grothmann R**, Singer A, Häussinger D, Zimmermann A, Münk C. MXB inhibits murine cytomegalovirus. Virology.2018 Sep;522:158-167.

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 _____

Ramona Grothmann