

Durchflusszytometrie-basierte Analyse der T- und NK-Zellantwort während der frühen symptomatischen Primärinfektion mit dem Epstein-Barr-Virus

Franziska Gabriele Fischer

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Dirk H. Busch

Prüfer:innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Uta Behrends
2. Prof. Dr. Andreas Pirchlmaier, Ph. D.

Die Dissertation wurde am 14.08.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 20.12.2023 angenommen.

Für Nonno.

Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist mit einer Durchseuchungsrate von ca. 90 % ein weltweit sehr weit verbreiteter humanpathogener Erreger. Eine Primärinfektion im Kindesalter verläuft meist a- oder oligosymptomatisch und führt zu einer lebenslangen Persistenz des Virus in den Infizierten. Allerdings kann eine Primärinfektion auch zu einer infektiösen Mononukleose (IM) führen, die mit dem Symptomkomplex Fieber, Tonsillopharyngitis, zervikaler Lymphadenopathie und Abgeschlagenheit einhergeht. In seltenen Fällen kann es aber auch zu schweren Komplikationen wie Hepatitis, Enzephalitis, Milzriss, *kissing tonsils* mit Atemnot oder hämophagozytischer Lymphohistiozytose (HLH) kommen. Eine weitere schwere Komplikation einer EBV-IM ist ein protrahierter Krankheitsverlauf, der in schweren Fällen in ein Chronisches Fatigue-Syndrom (syn. Myalgische Enzephalomyelitis, ME/CFS) mündet und die Betroffenen erheblich in ihrer Lebensqualität und Teilhabe am sozialen, sowie Berufsleben einschränkt. Ebenso erhöht eine EBV-IM das Risiko für die Entwicklung eines Hodgkin Lymphoms und Multipler Sklerose.

Die Ursachen, die zu schweren bzw. protrahierten Verläufen einer EBV-Primärinfektion führen, sind bislang nicht umfassend bekannt. Im Rahmen der IMMUC-Studie zur EBV-IM in München sollen Biomarker identifiziert werden, die mit einem schweren bzw. protrahierten Verlauf der EBV-IM assoziiert sind. Das Ziel dieser Dissertation war es, anhand der IMMUC-Pilotkohorte zum einen Methoden und Abläufe zur Probenverarbeitung und weiteren Analyse zu etablieren und zum anderen die T- und NK-Zellantwort während der frühen EBV-IM anhand innovativer Marker und Stimulationsantigene mittels Durchflusszytometrie-basierter Analysen zu charakterisieren.

Hierfür wurden Blutproben von insgesamt 31 Patient:innen mit EBV-IM an zwei Studienzeitpunkten analysiert. Die erste Probe wurde im Rahmen der Rekrutierung gewonnen (v1), die zweite innerhalb von 8 Wochen nach Auftreten der ersten IM-typischen Symptome (v2). Aus den Proben wurden die NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie in Bezug auf die Expression der Oberflächenmarker CD56, CD16, CD57 und HLA-DR untersucht. Die Analyse der EBV-spezifischen T-Zellen fokussierte sich vor allem auf die Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF. Zur Stimulation der EBV-spezifischen T-Zellen wurden zum einen *EB-Virus-like particles* (EB-VLP) verwendet, die immunogene EBV-Strukturantigene, aber keine virale Erbinformation enthalten. Zum anderen kamen T-*activated* EBV-Proteine zum Einsatz, die mittels einer speziellen Aktivierung sowohl über endogene als auch exogene Signalwege prozessiert werden und an T-Zellen präsentiert werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass mit den verwendeten innovativen Stimulationsantigenen ein optimiertes Immunmonitoring sowohl der CD4 als auch der CD8 T-Zellen während der frühen EBV-IM möglich ist. Außerdem wurde festgestellt, dass die Analyse mehrerer Zytokine in der Untersuchung EBV-spezifischer T-Zellen notwendig ist, um eine adäquate Einschätzung der T-Zellantwort zu ermöglichen. Bereits in der IMMUC-Pilotkohorte fielen zudem Veränderungen im CD8 T-Zellkompartiment auf, die mit einem schweren bzw. prolongierten Verlauf der EBV-IM assoziiert sein könnten.

Hinsichtlich der Expression innovativer Oberflächenmarker auf NK-Zellen konnten einige NK-Subpopulationen identifiziert werden, die als Biomarker für den schweren Verlauf einer EBV-IM vielversprechend sein könnten. Einerseits fielen HLA-DR-exprimierende NK-Zell-Subpopulationen auf, andererseits auch CD56-negative NK-Zellen, bei denen im Rahmen anderer Viruserkrankungen wie beispielsweise Hepatitis ein Einfluss auf den Krankheitsverlauf vermutet wird, die bei EBV-Infektionen jedoch bisher nicht beschrieben wurden.

Summary

The Epstein-Barr-Virus (EBV) is one of the most common human pathogens, infecting more than 90 % of the global population. Primary infection during childhood often occurs with no or only few symptoms and leads to a lifelong persistence of the virus within the host. However primary infection with EBV can cause Infectious mononucleosis (IM), a disease associated with fever, tonsillopharyngitis, cervical lymphadenopathy and fatigue. In some cases, EBV-IM can result in severe complications such as hepatitis, encephalitis, splenic rupture, kissing tonsils with stridor or hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). Another complication of an EBV-IM is a protracted course of disease, leading to the so-called chronic-fatigue-syndrome which seriously affects the quality of life of the patients including social activities and work life. Furthermore, the risk to develop Hodgkin lymphoma or multiple sclerosis is increased after an EBV-IM.

Until now, the risk factors leading to a severe or protracted course of EBV-IM are widely unexplored. The IMMUC-Study about EBV-IM in Munich aims to identify biomarkers linked to a severe or protracted course of disease. The objective of this dissertation was to establish methods and implement workflows for sample-administration and -processing within the IMMUC-Pilot-cohort, as well as to characterise T- and NK-cell-responses during early EBV-IM using novel markers and stimulating agents.

Samples of 31 patients with EBV-IM were collected at two visits. One during recruitment for the study (v1), the other one within 8 weeks after emergence of the first IM-typical symptoms (v2). The NK-cells were analysed using flow-cytometry based methods to determine the expression of the surface-antigens CD56, CD16, CD57 and HLA-DR. The emphasis analysing EBV-specific T-cells lay on the expression of the intracellular cytokines IFN- γ , IL-2 and TNF. Novel stimulating antigens were used for T-cell stimulation. Firstly, EB-Virus-like particles (EB-VLP), containing immunogenic EBV structural antigens without carrying viral DNA. Secondly, T-activated EBV-proteins which are specifically activated to be processed using endogenous as well as exogenous antigen-presenting pathways for T-cell-presentation.

Using novel stimulating antigens, it was possible to establish an optimized immunomonitoring of EBV-specific CD4 and CD8 T-cells during early EBV-IM. Additionally, it was shown that it is necessary to analyse more than one cytokine to allow an appropriate assessment of EBV-specific T-cell responses. During the analysis of the IMMUC-pilot-cohort alterations within the CD8 T-cell compartment emerged, which could be linked to a severe or prolonged course of EBV-IM.

Regarding the expression of novel surface markers on NK-cells some NK-subpopulations were identified which could be promising as biomarkers for a severe course of EBV-IM. Firstly, HLA-DR-expressing NK-cell subpopulations and, secondly CD56 negative NK-cells, which were shown to have an impact on the course of several viral diseases, such as Hepatitis, but were not described in EBV-infection so far.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	S. 4
Summary.....	S. 5
Inhaltsverzeichnis.....	S. 6
Abkürzungsverzeichnis.....	S. 10
1 Einleitung	
1.1 Die Geschichte des Epstein-Barr-Virus.....	S. 13
1.2 Die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus	
1.2.1 Epidemiologie und Infektionswege.....	S. 14
1.2.2 Bindung und Fusion mit den Zielzellen.....	S. 15
1.2.3 EBV-Lebenszyklus	
1.2.3.1 Lytische Phase.....	S. 16
1.2.3.2 Latente Phase.....	S. 17
1.3 EBV-assoziierte Erkrankungen	
1.3.1 Infektiöse Mononukleose.....	S. 18
1.3.2 X-chromosomales lymphoproliferatives Syndrom.....	S. 19
1.3.3 Chronisch-aktive EBV-Infektion.....	S. 20
1.3.4 EBV-assoziierte Malignome.....	S. 20
1.4 Angeborene Immunantwort: NK-Zellen	
1.4.1 NK-Zelldifferenzierung und Expression von Oberflächenmarkern.....	S. 21
1.4.2 Expression von HLA-DR auf NK-Zellen.....	S. 24
1.4.3 NK-Zellfunktion im Rahmen viraler Infektionen.....	S. 25
1.5 Adaptive Immunantwort	
1.5.1 EBV-spezifische CD8 T-Zellen.....	S. 28
1.5.2 EBV-spezifische CD4 T-Zellen.....	S. 30
1.5.3 Antikörperantwort.....	S. 31
2 Material und Methoden	
2.1 Material	
2.1.1 Medien.....	S. 34
2.1.2 Medienzusätze.....	S. 34
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	S. 34

2.1.4	Reagenzsysteme.....	S. 34
2.1.5	Antikörper	
2.1.5.1	Stimulationsantikörper.....	S. 34
2.1.5.2	Fluorochromkonjugierte Antikörper.....	S. 35
2.1.6	EBV-Antigene.....	S. 35
2.1.7	Laboraausstattung.....	S. 36
2.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	S. 36
2.1.9	Software.....	S. 36
2.2	Methoden	
2.2.1	Studiendesign.....	S. 36
2.2.2	Probengewinnung und Transport.....	S. 37
2.2.3	Isolation und Kryokonservierung peripherer mononukleärer Blutzellen.....	S. 38
2.2.4	Durchflusszytometrie-basierte Analyse frischer Zellen: NK-Panel.....	S. 39
2.2.5	Auftauen und <i>Resting</i>	S. 39
2.2.6	Durchflusszytometrie-basierte Analyse kryokonservierter Zellen: Effektor T- Zell Panel	
2.2.6.1	<i>Ex vivo</i> Stimulation.....	S. 39
2.2.6.2	Färbung intrazellulärer Zytokine.....	S. 40
2.2.7	Datengewinnung und -interpretation.....	S. 41
2.2.8	Statistische Methoden.....	S. 41
3	Ergebnisse	
3.1	Patient:innenkohorte.....	S. 42
3.2	Angeborene Immunantwort: NK-Zellen	
3.2.1	<i>Gating</i> -Strategie für die Durchflusszytometrie-basierte Analyse der NK-Zellen.....	S. 43
3.2.2	NK-Zellfrequenzen im Verlauf der frühen EBV-IM.....	S. 45
3.2.3	Frequenz der CD56 ^{bright} NK-Zellen während der frühen EBV-IM.....	S. 46
3.2.4	Frequenz der CD56 ^{dim} NK-Zellen und Expression von CD57 im Verlauf der frühen EBV-IM.....	S. 47
3.2.5	Frequenz von CD56-negativen NK-Zellen und ihre Expression von CD57 im Verlauf der frühen EBV-IM.....	S. 49
3.2.6	Expression von HLA-DR auf den NK-Subpopulationen im Verlauf der frühen EBV-IM.....	S. 49

3.2.7	Korrelation der NK-Zellantwort zu klinischen und virologischen Parametern während der frühen EBV-IM	S. 52
3.3	Erworbene Immunantwort: EBV-spezifische T-Zellen	
3.3.1	<i>Gating</i> -Strategie für die Durchflusszytometrie-basierte Analyse EBV-spezifischer T-Zellen	S. 53
3.3.2	Frequenz EBV-spezifischer T-Zellen und Verhältnis der CD4 und CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM	S. 55
3.3.3	Gesamtzytokinexpression EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM	S. 56
3.3.4	Funktionalität EBV-spezifischer CD4 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM	S. 59
3.3.5	Zytokinexpressionsmuster EBV-spezifischer CD4 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM	S. 62
3.3.6	Zytokinexpressionsmuster EBV-spezifischer CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM	S. 64
3.3.7	Korrelation der EBV-spezifischen T-Zellantwort zu klinischen und virologischen Parametern der frühen EBV-IM	S. 65
4	Diskussion	
4.1	Datenerhebung und Zusammenstellung der Patient:innenkohorte	S. 68
4.2	Während der frühen EBV-IM kam es zu einer Abnahme der absoluten NK-Zellzahlen	S. 69
4.3	Die Frequenz der CD56 ^{bright} NK-Zellen nahm im Rahmen der frühen EBV-IM zu	S. 70
4.4	Früh-differenzierte NK-Zellen machten nur einen kleinen Anteil der NK-Zellen während der frühen EBV-IM aus	S. 72
4.5	Vorkommen von CD56 ⁻ CD16 ⁺ NK-Zellen während der frühen EBV-IM	S. 73
4.6	HLA-DR wurde vor allem von früh-differenzierten und CD56 ⁻ NK-Zellen exprimiert	S. 76
4.7	Zusammenfassung: NK-Zellantwort während der frühen EBV-IM	S. 77
4.8	Frequenz der EBV-spezifischen T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM	S. 78
4.9	Gesamtzytokinexpression EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation mit BZLF1, EBNA3A und EB-VLP	S. 80
4.10	Analyse der Funktionalität EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM	S. 82
4.11	Zusammenfassung: CD4 und CD8 T-Zellantwort während der frühen EBV-IM	S. 86
5	Literaturverzeichnis	S. 88
6	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	S. 102

7	Anhang.....	S. 104
8	Danksagung.....	S. 112

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
BFA	Brefeldin A
BL	Burkitt-Lymphom
CAEBV	Chronisch aktive EBV-Infektion
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
CFS	Chronisches Fatigue-Syndrom
CMV	Cytomegalievirus
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DZIF	Deutsches Zentrum für Infektionsforschung
EA	Frühes Antigen (<i>early antigen</i>)
EBER	Epstein-Barr-Virus-codierte RNA (<i>EBV encoded RNA</i>)
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EB-VLP	Epstein-Barr-Virus-ähnliche Partikel (<i>Epstein-Barr-Virus-like particles</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GCM	Keimzentren-Modell (<i>germinal center model</i>)
Geq	Genomäquivalente
GP	Glykoprotein
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
HMGU	Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
HSV	Herpes simplex-Virus
IEA	Sehr frühes Antigen (<i>immediate early antigen</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose
IMMUC	Studie zur Infektiösen Mononukleose in München
KIR	<i>Killer-immunoglobulin like receptor</i>
LA	Spätes Antigen (<i>late antigen</i>)
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LMP	Latentes Membranprotein
LPD	Lymphoproliferative Erkrankung (<i>lymphoproliferative disease</i>)
max.	maximal
ME	Myalgische Enzephalomyelitis
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min.	minimal
MS	Multiple Sklerose
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NPC	Nasopharynxkarzinom (<i>nasopharyngeal carcinoma</i>)
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral mononuclear blood cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PTLD	Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (<i>post-transplant lymphoproliferative disease</i>)

RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
SAP	SLAM-assoziiertes Protein
SH2D1A	Gen mit 1A enthaltender SH2 Domäne (<i>SH2 domain containing 1A gene</i>)
SLAM	Signalisierendes Lymphozytenaktivierendes Molekül (<i>signaling lymphocyte activation molecule</i>)
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>Transforming growth factor β</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
VCA	Virales Kapsid-Antigen (<i>viral capsid antigen</i>)
VLP	Virusähnliches Partikel (<i>virus-like particle</i>)
Wt	Wildtyp
XLP	X-chromosomales lymphoproliferatives Syndrom (<i>X-linked lymphoproliferative syndrome</i>)

1 Einleitung

1.1 Die Geschichte des Epstein-Barr-Virus

Es ist wohl einer Reihe glücklicher Zufälle zu verdanken, dass Anthony Epstein am 24. Februar 1964 das Epstein-Barr-Virus (EBV) in einer Zellkultur aus Burkitt-Lymphomzellen entdeckte (Epstein, 2015). Zu dieser Zeit steckte die Elektronenmikroskopie noch in den Kinderschuhen, nur 16 Jahre zuvor war es Nagler und Rake zum ersten Mal gelungen, ein Virus mit dieser Methode darzustellen (Roingard, 2008). Auch die kulturelle Anzucht von Lymphozyten befand sich in ihren Anfängen und man hatte gerade erst begonnen sich mit dem Gedanken auseinanderzusetzen, dass Viren Auslöser von Tumorerkrankungen sein könnten (Javier & Butel, 2008). Gerade in diesem Kontext sticht die Entdeckung von EBV, dem ersten menschlichen Tumovirus als Meilenstein in der Geschichte der Virologie heraus.

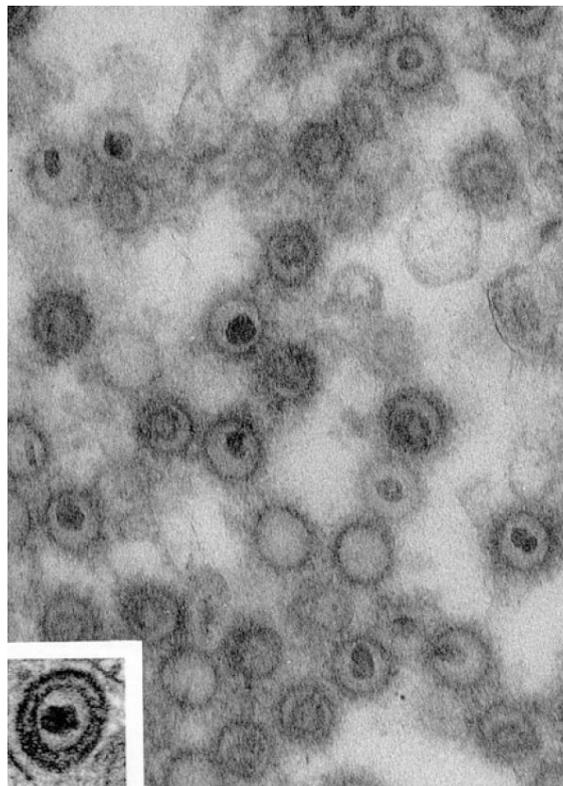


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme EBV-infizierter Lymphomzellen (Epstein, 2015). Erkennbar sind unreife Virionen innerhalb des Zytoplasmas von Lymphomzellen. Im eingblendeten Bildausschnitt eine vergrößerte Darstellung eines reifen Viruspartikels.

Das Virus, das Epstein in der Zellkultur nachwies, hatte zwar beträchtliche Gemeinsamkeiten zum bereits bekannten Herpes simplex-Virus (HSV), ließ sich aber keinem bis *dato* bekannten Erreger konkret zuordnen (Epstein, Henle, Achong, & Barr, 1965) (**Abbildung 1**). Wenige Jahre später gelang schließlich der Nachweis, dass EBV tatsächlich ein bis dahin unbekanntes Virus war (Epstein & Achong, 1967; G. Henle & Henle, 1966). Auffällig war, dass es Wachstum und die Integrität der Zellen in Kultur

nicht zu beeinflussen schien. Diese Beobachtung wurde durch Gertrude und Werner Henle bestätigt, die das Virus überdies in diversen Proben einer gesunden Proband:innenkohorte nachwiesen (G. Henle & Henle, 1966). EBV überdauerte also nach der Übertragung unbemerkt in den infizierten Individuen ohne Krankheitssymptome zu verursachen.

In den darauffolgenden Jahren nahm die Anzahl der Publikationen, die sich mit EBV beschäftigten, stetig zu (vgl. *Pubmed Puclication Timeline* zu EBV¹). Bereits 1968 stellten Henle et al. fest, dass EBV der Erreger der Infektiösen Mononukleose (IM, *Pfeiffer'sches Drüsenfieber*) ist, einer Erkrankung, deren Ätiologie zuvor unbekannt war (G. Henle, Henle, & Diehl, 1968). Im Jahr 1984 gelang Baer et al. mit der Entschlüsselung der EBV-Genomstruktur ein weiterer wichtiger Schritt in der Erforschung des Virus (Baer et al., 1984). Insbesondere seit der Erkenntnis, dass zahlreiche Malignome und Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise das Hodgkin-Lymphom, das Nasopharynxkarzinom (NPC) oder die Multiple Sklerose (MS) mit EBV assoziiert sind, nahm das Interesse der internationalen Forschungsgemeinschaft an dem Virus weiter zu (Ascherio & Munger, 2010; Parkin, 2006). Bis heute, über 50 Jahre nach seiner Entdeckung bleiben dennoch zahlreiche Fragen ungeklärt, insbesondere in Bezug auf die Mechanismen der EBV-assoziierten Tumorentstehung und das heterogene klinische Bild der Primärinfektion mit EBV (Taylor, Long, Brooks, Rickinson, & Hislop, 2015; Young, Yap, & Murray, 2016).

1.2 Die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus

1.2.1 Epidemiologie und Infektionswege

EBV, synonym Humanes Herpesvirus 4 (HHV-4), gehört zur Familie der gamma-Herpesviridae. Mit einer Durchseuchungsrate von bis zu 90 % ist es eines der am weitesten verbreiteten humanpathogenen Viren (de-Thé et al., 1975). Der Anteil EBV-seropositiver Individuen unterscheidet sich in verschiedenen Kollektiven allerdings erheblich. Insbesondere Ethnie und soziales Umfeld haben einen Einfluss auf die Durchseuchungsrate mit EBV (Condon et al., 2014). In einer amerikanischen Studie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kinder aus einkommensschwachen Familien deutlich häufiger mit EBV infiziert waren als Kinder aus Familien mit höherem Einkommen. Auch scheint in sozial schlechter gestelltem Umfeld die Infektion bereits in jüngerem Lebensalter stattzufinden (Dowd, Palermo, Brite, McDade, & Aiello, 2013; Hjalgrim, Friborg, & Melbye, 2007). Deutliche Unterschiede traten auch zwischen afro- und hispanoamerikanischen Kindern und weißen Kindern zutage, hier war eine deutlich niedrigere Durchseuchungsrate bei weißen Kindern auffällig, was auf einen Einfluss genetischer Faktoren hindeutet (Balfour, Sifakis, et al., 2013).

¹ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=epstein-barr%20virus&timeline=expanded>; Zugriff am 07.08.2023, 09:40 Uhr

Über die Jahre hinweg wurde in Längsschnittstudien ein Rückgang in der EBV-Seroprävalenz bei Kindern und jungen Erwachsenen beobachtet (Balfour, Sifakis, et al., 2013; Grimm et al., 2016). Eine Erklärung hierfür könnte beispielsweise eine Verbesserung des sozioökonomischen Status innerhalb der untersuchten Population sein.

Das Alter scheint außerdem zum einen Einfluss auf die Symptomatik bei Primärinfektion mit EBV zu haben (Balfour, Odumade, et al., 2013; und vgl. Kapitel 1.3.1). Zum anderen ist das Risiko für EBV-assoziierte Folgeerkrankungen wie beispielsweise für das endemische Burkitt-Lymphom (BL) scheinbar höher, je jünger die Patient:innen bei Primärinfektion sind (Piriou et al., 2012).

Eine Ansteckung, bzw. Virusübertragung erfolgt meist durch den Kontakt mit infektiösem Speichel. Im jungen Erwachsenenalter ist daher häufig inniges Küssen ursächlich, bei jüngeren Kindern wird EBV dagegen eher durch den elterlichen Speichel übertragen (Balfour, Odumade, et al., 2013; Cederberg et al., 2019; Sumaya & Ench, 1986). Auch eine Transmission durch Bluttransfusionen oder im Rahmen von allogenen Organ- bzw. Stammzelltransplantationen ist möglich (Alfieri et al., 1996; Trottier et al., 2012; Vergheze, Schmeling, Knight, Matas, & Balfour, 2015).

1.2.2 Bindung und Fusion mit den Zielzellen

Nach der Übertragung werden primär Epithel- und B-Zellen des Mundrachenraums, genauer des Waldeyer-Rachenrings, infiziert. Dabei unterscheidet sich der Übertragungsmechanismus bei den beiden Zelltypen. Zur Infektion der B-Lymphozyten bindet das virale Glykoprotein gp350 an das zelluläre Oberflächenantigen CD21 bzw. CD35 (Ogembo et al., 2013). Die Mechanismen zur Bindung an Epithelzellen sind zum Teil noch unklar. Ein Erklärungsansatz ist beispielsweise die Interaktion viraler Glykoproteine mit Integrinen der Zellmembran (Chesnokova, Nishimura, & Hutt-Fletcher, 2009; Tugizov, Berline, & Palefsky, 2003). Außerdem ist eine Übertragung von EBV auf Epithelzellen durch infizierte B-Lymphozyten möglich (Bornkamm, Behrends, & Mautner, 2006; C. D. Shannon-Lowe, Neuhierl, Baldwin, Rickinson, & Delecluse, 2006).

Nach Bindung von EBV an die Zelloberfläche ist eine Interaktion der viralen Glykoproteine gp42-gH/gL mit HLA-II-Rezeptoren auf der B-Zelloberfläche notwendig, damit das Virus mit der Zellmembran fusionieren und die Zelle effizient infizieren kann (C. Shannon-Lowe & Rowe, 2014). Eine Interaktion mit gH/gL ist auch zur Infektion von Epithelzellen zwingend notwendig. Bei der Bindung dieser Glykoproteine an Integrine der Epithelzelle kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Übertragung triggert (Chesnokova et al., 2009). Zur Infektion von B-Zellen wird also ein Komplex aus drei (gp42/ gH/ gL) und für Epithelzellen ein Komplex aus zwei (gH/gL) Glykoproteinen benötigt. Durch Alteration der Glykoproteinkomplexe innerhalb der Virushülle (z.B. das Herunterregulieren von gp42) kann sich dementsprechend der primäre Replikationsort des Virus ändern. Interessanterweise scheint

aus Epithelzellen stammendes Virus B-Zellen effektiver zu infizieren als Epithelzellen, während EBV aus B-Zellen eher Epithelzellen infiziert (Borza & Hutt-Fletcher, 2002). Dieser Mechanismus hat einerseits eine wirkungsvollere Übertragung von Mensch zu Mensch zur Folge und ermöglicht andererseits eine intermittierende Reaktivierung der Virusreplikation in latent infizierten Personen. Nach Bindung und Fusion des Virus mit der Wirtszelle wird das Viruskapsid letztlich mithilfe des viralen Glykoproteins gB in das Zytoplasma freigesetzt (Neuhierl et al., 2009).

1.2.3 EBV-Lebenszyklus

Sobald die Virus-DNA erfolgreich in die Wirtszellchromosomen integriert wurde ist EBV wie alle Herpesviren in der Lage, eine lytische Infektion hervorzurufen und anschließend lebenslang latent in der infizierten Person zu persistieren. Die Bildung neuer, funktionsfähiger Viruspartikel findet ausschließlich während der lytischen Infektion statt, welche nur in Epithelzellen und nach Ausdifferenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen beobachtet wird. Bei Infektion naiver B-Zellen, wird dagegen rasch ein Latenzstadium etabliert, während dem die Virusreplikation ruht (Hammerschmidt, 2015; C. Shannon-Lowe & Rowe, 2014).

1.2.3.1 Lytische Phase

Die Infektiosität von EBV hängt vorrangig von der Virusreplikation während der lytischen Phase ab. In dieser Phase der EBV-Infektion werden neue Viruspartikel gebildet, über die das Virus von Mensch zu Mensch bzw. von Zelle zu Zelle übertragen wird. Zu Beginn der Infektion findet vorrangig die lytische Replikation statt, aber auch später während der latenten Phase wird intermittierend die lytische Phase aktiviert, um den Pool infizierter B-Zellen kontinuierlich zu erneuern (McKenzie & El-Guindy, 2015). So bleibt die Anzahl infektiöser B-Zellen in asymptomatisch Erkrankten auf einem niedrigen (1-50 von 10^6 B-Zellen), aber über die Jahre konstanten Niveau. So kann das Virus persistieren und gleichzeitig einer antiviralen Immunantwort entgehen (Hatton, Harris-Arnold, Schaffert, Krams, & Martinez, 2014; Khan, Miyashita, Yang, Babcock, & Thorley-Lawson, 1996).

Verschiedene Faktoren können einen solchen Wechsel von der latenten in die lytische Phase bewirken. Eine antigenvermittelte Aktivierung des B-Zellrezeptors (Packard & Cambier, 2013) oder z.B. auch eine iatrogene Immunsuppression triggern die Induktion des lytischen Zyklus (Laichalk & Thorley-Lawson, 2005). In dieser Phase werden ca. 70 virale Gene in einer strengen zeitlichen Abfolge aktiviert (Hammerschmidt, 2015). Zunächst werden die sogenannten sehr frühen (*immediate-early*, IE) Gene, BZLF1 und BRLF1 exprimiert, zwei virale Transkriptionsfaktoren. Diese aktivieren anschließend die Promotoren früher (*early*, E) lytischer Gene, die zur Expression viraler Replikationsproteine führen. Nach der Replikation des viralen Genoms werden die sog. späten (*late*, L) viralen Gene exprimiert, die für virale Strukturproteine und Glykoproteine kodieren. Diese sind für die Verpackung der viralen DNA,

sowie Bindung und Fusion mit der Wirtszelle erforderlich (Kenney & Mertz, 2014; Yuan, Cahir-McFarland, Zhao, & Kieff, 2006).

1.2.3.2 Latente Phase

Während seiner Evolution mit dem Menschen hat EBV die Fähigkeit perfektioniert, lebenslang latent in der infizierten Person fortzubestehen. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, infiziert das Virus zunächst B-Zellen des Waldeyer-Rachenrings. Eine Theorie, wie es anschließend zur latenten Infektion kommt, ist das sogenannte „Keimzentren-Modell“ (*Germinal Center Model*, GCM) (D. A. Thorley-Lawson & Babcock, 1999; D. A. Thorley-Lawson, Hawkins, Tracy, & Shapiro, 2013). Demnach imitiert das Virus den physiologischen Lebenszyklus einer B-Zelle. Durch die Expression von Latenzgenen wird die B-Zelle zur Proliferation angeregt und migriert anschließend in die Lymphfollikel, wo sie als ruhende B-Gedächtniszelle persistiert. Man geht davon aus, dass diese ruhenden B-Gedächtniszellen das EBV-Reservoir darstellen (Babcock, Decker, Volk, & Thorley-Lawson, 1998). Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in Patient:innen mit Bruton-Agammaglobulinämie, die keine reifen B-Zellen bilden können, keine dauerhafte EBV-Infektion etabliert werden kann (Faulkner et al., 1999). Wenn die Zelle erneut in den Rachenraum migriert und dort zur terminalen Differenzierung angeregt wird, kann sie allerdings als Plasmazelle in den lytischen Infektionszyklus übergehen und neue Viruspartikel produzieren (Laichalk & Thorley-Lawson, 2005).

Während der latenten Phase wird die virale Genexpression auf ein Minimum reduziert. Maximal neun virale Proteine, zwei nicht-kodierende RNAs (*EBV encoded RNAs*, EBER1 und 2) und ca. 40 microRNAs werden exprimiert. Die neun viralen Proteine umfassen sechs nukleäre Proteine (*EBV nuclear antigens*, EBNA1, -2, -3a, -3b, -3c und -LP) und drei Membranproteine (*latent membrane proteins*, LMP 1, 2A, 2B) (Longnecker, Kieff, & Cohen, 2013). Schon früh wurde festgestellt, dass B-Zellen *in vitro* durch die Expression bestimmter Latenzgene ‚immortalisiert‘ werden, wodurch es zu einer dauerhaften Proliferation der B-Lymphozyten und dem Auswachsen lymphoblastoider Zelllinien (*lymphoblastoid Cell Line*, LCL) kommt (W. Henle, Diehl, Kohn, Zur Hausen, & Henle, 1967; Miller, 1982). Je nachdem in welcher Kombination die Latenzgene exprimiert werden, lassen sich vier Latenzphasen unterscheiden. Diese entsprechen Genexpressionsmustern, die auch bei diversen EBV-assoziierten epithelialen Malignomen und lymphoproliferativen Erkrankungen (*lymphoproliferative disease*, LPD) beobachtet werden können (Price & Luftig, 2014). Bei Burkitt-Lymphomzellen entspricht die virale Genexpression beispielsweise den Latenzstadien 0 und I, die man auch in B-Gedächtniszellen findet: Es werden entweder keine EBV-Proteine und nur EBERs exprimiert (Latenzstadium 0) oder nur EBNA1 (Latenzstadium I). Letzteres ist dabei essenziell für die Erhaltung des viralen Erbguts in der Wirtszelle und inhibiert die Erkennung durch CD8T-Zellen (Blake et al., 1997; Yates, Warren, Reisman, & Sugden, 1984). Im Latenzstadium II werden zusätzlich zu EBNA1 auch die LMPs exprimiert. Dieses

Genexpressionsmuster entspricht dem einer B-Zelle im Keimzentrum und dem bei EBV-assoziierten Hodgkin-Lymphomen, Nasopharynx- und Magenkarzinomen. Das Latenzstadium III geht mit einer Expression aller EBV-Latenzgene einher. Es entspricht der Genexpression aktivierter naiver B-Zellen und kommt auch im Rahmen der akuten EBV-assoziierten IM, dem AIDS-assoziierten diffus-großzelligen B-Zell Lymphom, der EBV-PTLD (*post-transplant LPD*) und in LCL vor (Longnecker et al., 2013; Price & Luftig, 2014).

1.3 EBV-assoziierte Erkrankungen

Schon früh nach der Entdeckung von EBV stellten Werner und Gertrude Henle den Zusammenhang zu einer Erkrankung fest, die bereits als IM bekannt war (G. Henle et al., 1968; Sutton, 1972). In den folgenden Jahren identifizierte man immer mehr Erkrankungen, die mit einer EBV-Infektion assoziiert zu sein schienen. Dazu gehören das Burkitt-Lymphom, in dem Epstein EBV zuerst nachwies, aber auch andere LPD und einige Malignome epithelialen Ursprungs, wie das Nasopharynx- und Magenkarzinom. Außerdem finden sich zunehmend Hinweise, dass diverse Autoimmunerkrankungen durch eine Infektion mit EBV begünstigt werden. Dazu gehören u.a. MS, Systemischer Lupus erythematodes (SLE) oder Rheumatoide Arthritis (RA).

1.3.1 Infektiöse Mononukleose

Die IM ist in der Regel eine selbstlimitierende Erkrankung, die innerhalb einiger Wochen folgenlos ausheilt. In bis zu 90 % der Fälle ist sie durch eine Primärinfektion mit EBV bedingt, seltener sind HHV-6, Cytomegalievirus (CMV) oder Adenoviren die Ursache (Hurt & Tammaro, 2007). Nach einer Inkubationszeit von zwei bis sechs Wochen entwickeln Patient:innen die typischen Symptome Fieber, Tonsillopharyngitis, zervikale Lymphadenopathie und Fatigue. Zusätzlich können aber auch schwere akute Komplikationen auftreten. Häufig ist beispielsweise eine Thrombozytopenie, eine Erhöhung der Leberwerte aufgrund einer Begleithepatitis, eine massive Splenomegalie oder Verlegung der Atemwege durch Schwellung der Tonsillen beschrieben. Seltener treten neurologische (z.B. Enzephalitis, Krampfanfälle, Guillain-Barré-Syndrom) oder schwere hämatologische Symptome (z.B. hämolytische Anämie) auf (Lennon, Crotty, & Fenton, 2015). Etwa 10 % der Patient:innen berichten von einer Leistungsminderung und krankhafter Erschöpfung (Fatigue), die länger als sechs Monate nach Infektion bestehen bleibt, was auch als *Chronisches Fatigue Syndrom* (synonym Myalgische Enzephalomyelitis, ME/CFS) bezeichnet wird (Longnecker et al., 2013). Auch lebensbedrohliche Komplikationen wie eine hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH), ein Hyperinflammationssyndrom das sepsisähnliche Krankheitssymptome hervorruft, sind möglich (Dunmire, Hogquist, & Balfour, 2015).

Beobachtungen legen nahe, dass eine Primärinfektion mit EBV im Klein- und Schulkindalter in der Regel asymptomatisch verläuft, während eine Infektion Jugendlicher und junger Erwachsener in bis zu 77 %

zu einer EBV-IM führt (Balfour, Odumade, et al., 2013). Die Ursachen für den Einfluss des Alters auf die Symptomatik bei EBV-Primärinfektion sind noch nicht geklärt. Diskutiert werden unter anderem diagnostische Schwierigkeiten bei jüngeren Kindern, da hier ein Nachweis heterophiler Antikörper gegen EBV erschwert ist und eine spezifische EBV-Serologie häufig nicht erfolgt (Horwitz et al., 1981). Auch die Menge an infektiösem Virus ist bei einer Übertragung im jungen Erwachsenenalter deutlich höher als die Viruslast im elterlichen Speichel, durch den eine Infektion bei Kleinkindern meist erfolgt (Balfour, Odumade et al., 2013; Cederberg et al., 2019). Eine weitere Ursache könnten kreuzreaktive Influenza-spezifische T-Gedächtniszellen sein, die unter anderem auch reaktiv gegen das EBV-Protein BMLF1 sind (Clute et al., 2005). Da man davon ausgehen kann, dass im Blut Jugendlicher und junger Erwachsener mehr Influenza-spezifische T-Zellen zirkulieren als bei Kleinkindern, ist eine verstärkte Kreuzreaktivität bei älteren Kindern anzunehmen.

1.3.2 X-chromosomales lymphoproliferatives Syndrom

Mögliche Ursachen für schwere Verläufe einer EBV-Primärinfektion können unter anderem bestimmte primäre Immundefekte sein. Fällt aufgrund eines genetischen Defektes eine Komponente des normalerweise genau aufeinander abgestimmten Immunsystems aus, kann dies zu einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit für bestimmte Pathogene führen.

Ein Beispiel für einen primären Immundefekt, der mit einem schweren Verlauf einer Infektion mit EBV assoziiert ist, ist das X-chromosomale lymphoproliferative Syndrom (*X-linked lymphoproliferative syndrome*, XLP). Interessanterweise geht der Immundefekt nur mit einer erhöhten Krankheitsschwere einer EBV-Infektion einher, die Immunantwort auf andere Herpesviren ist nicht beeinträchtigt (Nagy & Klein, 2010). Bei der XLP kommt es zu einer Mutation des SH2D1A-Gens (*SH2 domain containing 1A gene*). Dieses codiert für das *signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)- associated protein (SAP)*, das auf T- und NK-Zellen exprimiert wird (Longnecker et al., 2013). Die Mutation führt bei betroffenen Jungen zu einer fehlerhaften T- und NK-Zellfunktion. Insbesondere die T-Helferzell-abhängige Bildung von B-Gedächtniszellen und die Erkennung infizierter B-Zellen durch T- und NK-Zellen ist gestört (Bottino et al., 2001; Hislop et al., 2010; Tangye, 2014). Die fehlende Immunkontrolle durch T- und NK-Zellen führt schließlich zur unkontrollierten Proliferation EBV-infizierter B-Zellen.

Gleichzeitig expandieren auch die vorhandenen CD8 T-Zellen aufgrund einer Störung in Apoptose-Signalwegen, was zu einer massiven proinflammatorischen Zytokinantwort führt (Snow et al., 2009). Typischerweise entwickeln die Patienten Symptome einer fulminanten EBV-IM, zum Teil auch eine HLH, Agammaglobulinämie oder Lymphome (Booth et al., 2011; Purtilo, Grierson, Davis, & Okano, 1991).

1.3.3 Chronisch-aktive EBV-Infektion

Die Relevanz der T- und NK-Zellen für eine ausreichende Kontrolle der EBV-Infektion wird auch bei Betrachtung der chronisch aktiven EBV-Infektion (CAEBV) deutlich. Diese besondere Form der EBV-assoziierten LPD tritt vor allem auf, wenn T- und NK-Zellen mit EBV infiziert werden. Die Betroffenen entwickeln Symptome einer IM, die aber nicht ausheilen, sondern chronisch-rezidivierend und mit anhaltend hoher Viruslast im Blut auftreten. Bleibt die Erkrankung unbehandelt, kann es zu einem Hyperinflammationssyndrom und durch Organinfiltration unkontrolliert proliferierender T- und NK-Zellen zu Multiorganversagen kommen (Kimura et al., 2001). Die Umstände, die eine Übertragung von EBV auf T- und NK-Zellen begünstigen, sind noch nicht vollständig geklärt. Auch in der akuten EBV-IM ohne CAEBV ist teilweise EBV-DNA in T- und NK-Zellen nachweisbar, eine unkontrollierte Proliferation dieser Zelltypen wird aber nicht beobachtet (Anagnostopoulos, Hummel, Kreschel, & Stein, 1995). Eine Häufung der CAEBV-Fälle ist in Japan und Südostasien zu beobachten, weshalb von einer begleitenden genetischen Komponente ausgegangen wird (Fujiwara et al., 2014).

Immunologisch fällt auf, dass bei einer CAEBV EBV-spezifische CD8 T-Zellen fehlen, bzw. vermindert sind und im Vergleich zu gesunden Proband:innen die Konzentration proinflammatorischer Zytokine (z.B. Interferon Gamma (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor (TNF)) deutlich erhöht ist (Arai et al., 2012; Sugaya et al., 2004). Diese Beobachtungen legen nahe, dass zur Kontrolle einer EBV-Infektion eine intakte T- und NK-Zellantwort notwendig ist. Allerdings kann eine überschießende proinflammatorische Zytokinantwort (z.B. durch Proliferation zytotoxischer CD8 T-Zellen) auch Ursache einer schweren Symptomatik sein (Balfour et al., 2013a).

1.3.4 EBV-assoziierte Malignome

Man geht davon aus, dass weltweit jährlich etwa ein Prozent aller Krebserkrankungen mit EBV-assoziiert sind (Parkin, 2006). In den meisten Fällen gehen Malignome von den Zellreihen aus, die EBV hauptsächlich infiziert, also B- und Epithelzellen. Zu den typischen EBV-assoziierten B-Zellmalignomen gehören z.B. das Burkitt- und das Hodgkin-Lymphom, oder auch das diffus großzellige B-Zell Lymphom. In Entwicklungsländern treten bis zu 90 % der Hodgkin-Lymphome in Verbindung mit einer EBV-Infektion auf. Das in Äquatorial-Afrika und Papua-Neuguinea endemisch auftretende Burkitt-Lymphom ist in nahezu 100 % der Fälle EBV-positiv (Rickinson, 2014).

Besonders hoch ist das Risiko für die Entwicklung einer lymphoproliferativen malignen Erkrankung nach Infektion mit EBV, wenn die Immunantwort beeinträchtigt ist. Bei iatrogener Immunsuppression nach Transplantation entwickeln beispielsweise bis zu 20 % der Patient:innen eine PTLD (Green & Michaels, 2013). Diese tritt meist im ersten Jahr nach Transplantation auf und ist in der Regel durch die unkontrollierte Proliferation EBV-infizierter B-Lymphozyten bedingt. Das Risiko für eine PTLD steigt, je stärker die Immunsuppression ist bzw., je mehr die T-Zellantwort beeinträchtigt ist (Green &

Michaels, 2013; Macedo et al., 2005). Die Relevanz der EBV-spezifischen T-Zellantwort in der Immunkontrolle latent infizierter B-Zellen wird auch in späten Stadien des erworbenen Immunschwächesyndroms (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) deutlich. Sind die zirkulierenden T-Zellen bereits erheblich reduziert und das Immunsystem deutlich geschwächt, kommt es zu einer Proliferation von EBV-infizierten B-Zellen, ähnlich wie bei einer PTLD. Manifestationsort ist in diesem Fall häufig das zentrale Nervensystem (Kasamon & Ambinder, 2005).

Das NPC tritt vor allem im asiatischen und nordafrikanischen Raum gehäuft bei EBV-Infizierten auf. Bei bis zu 96 % der NPC-Patient:innen wurde in einer Studie aus Hong-Kong zirkulierende EBV-DNA nachgewiesen (Lo et al., 1999). Eine Infektion mit EBV scheint in Endemiegebieten mit einem erhöhten Risiko für ein NPC zusammenzuhängen und mit einem schwereren Krankheitsverlauf und einer schlechteren Prognose einherzugehen (Chien et al., 2001; Lin et al., 2004).

1.4 Angeborene Immunantwort: NK-Zellen

Bei Erstkontakt mit einem Virus stellt die angeborene Immunantwort die schnellste, da erregerunabhängige Reaktion auf die Konfrontation mit einem ‚fremden‘ Erreger dar. Mittels Phagozytose und Präsentation von Virusantigenen beispielsweise durch Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) wird einerseits der Erreger unschädlich gemacht und andererseits die adaptive Immunantwort aktiviert. Zusätzlich kann die infizierte Zielzelle durch direkte zytotoxische Effekte z.B. im Rahmen der angeborenen NK-Zellantwort unschädlich gemacht werden (Murphy, Mowat, & Janeway, 2012b).

NK-Zellen scheinen gerade während der lytischen Phase der EBV-Infektion wichtig für eine ausreichende Immunkontrolle zu sein (Longnecker et al., 2013; Murphy, Mowat, & Janeway, 2012b). Da ich mich in meiner Arbeit mit der frühen Infektionsphase beschäftigte, habe ich mich vor allem auf diese Zellpopulation als wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunantwort gegen EBV konzentriert.

1.4.1 NK-Zelldifferenzierung und Expression von Oberflächenmarkern

NK-Zellen sind ein elementarer Bestandteil sowohl der antiviralen Immunantwort als auch der Immunantwort gegen Tumorzellen (Cerwenka & Lanier, 2001). Die Erkennung von Krankheitserregern bzw. Tumorzellen erfolgt auch ohne vorherige Immunisierung durch Virus- oder Tumorantigene. Dadurch wird sehr schnell eine Immunreaktion induziert und die Infektion so zunächst ‚in Schach gehalten‘, bevor antigenspezifische T-Zellen im Rahmen der adaptiven Immunantwort aktiviert werden. Der Mechanismus, der zur Lyse der Zielzelle führt, ist dabei ähnlich wie der zytotoxischer T-Zellen, welche die Zielzelle durch die Ausschüttung zellschädigender Substanzen aus Granula lysieren (Murphy, Mowat, & Janeway, 2012b). Die Rolle der NK-Zellen beschränkt sich jedoch nicht allein auf ihre zytotoxischen Fähigkeiten. Durch Ausschüttung verschiedener Zytokine üben sie eine

immunregulatorische Funktion aus, durch die sie sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort beeinflussen können. Differenzierung, Funktion und die Balance zwischen Aktivierung bzw. Inhibition von NK-Zellen wird durch die Expression einer Reihe von Oberflächenmarkern reguliert (Montaldo et al., 2013).

Bildungsort der NK-Zellen ist in der Regel das Knochenmark (Murphy, Mowat, & Janeway., 2012b). In selteneren Fällen können sie auch in anderen Geweben, beispielsweise Lymphknoten, gebildet werden (Freud et al., 2005). Von dort migrieren die NK-Zellen als unreife Vorläuferzellen zu den sekundär lymphatischen Organen (z.B. Tonsillen, Milz, Mukosa-assoziierten Lymphfollikeln u.a.), wo sie weiter ausreifen, bevor sie schließlich in den Blutkreislauf gelangen (Ferlazzo & Carrega, 2012). Typischerweise lassen sich NK-Zellen durch ihre Expression von CD56, CD16 und der fehlenden Expression von CD3 charakterisieren (Cooper, Fehniger, & Caligiuri, 2001). Der Differenzierungsgrad unterscheidet sich dabei je nach Expressionslevel von CD56. Man nimmt an, dass NK-Zellen mit einem hohen Expressionsgrad von CD56 (CD56^{bright}) eine Vorstufe der CD56^{dim} NK-Zellen sind, bei denen die Expression dieses Markers auf der Zelloberfläche reduziert ist. In *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass CD56^{bright} NK-Zellen zu CD56^{dim} NK-Zellen differenzieren können und außerdem eine längere Telomerstruktur aufweisen, was die Theorie der CD56^{bright} NK-Zellen als Vorstufe der CD56^{dim} NK-Zellen stützt (Chan et al., 2007). Auch in ihrer Funktion unterscheiden sich CD56^{bright} von CD56^{dim} NK-Zellen. CD56^{bright} NK-Zellen weisen eine höhere proliferative Kapazität und Fähigkeit zur Zytokin-Ausschüttung auf, wohingegen CD56^{dim} NK-Zellen eine höhere Expression von Perforinen und dadurch eine bessere zytotoxische Funktion haben (Cooper et al., 2001). CD56^{bright} Zellen erfüllen daher vermutlich eher eine immunregulatorische Rolle, während CD56^{dim} Zellen vor allem direkte zytotoxische Wirkung entfalten.

Auch in ihrer bevorzugten Lokalisation unterscheiden sich die beiden NK-Subpopulationen. Während beispielsweise tonsilläre NK-Zellen größtenteils CD56^{bright} sind, macht dieser Phänotyp im peripheren Blut nur rund 10 % der zirkulierenden NK-Zellen aus, die restlichen 90 % sind CD56^{dim} (Montaldo et al., 2013).

Im Rahmen der NK-Zelldifferenzierung wird zum einen CD56 herunterreguliert, zum anderen kommt es sequenziell zur Expression weiterer Oberflächenmarker. Horowitz et al. fanden mittels Massenspektrometrie und einem Panel von 28 NK-Zellmarkern 6.000 bis 30.000 verschiedene NK-Subpopulationen innerhalb eines einzelnen Individuums. In der untersuchten Kohorte von 20 Personen waren es insgesamt über 100.000 (Horowitz et al., 2013). Innerhalb dieser immensen Zahl möglicher NK-Subpopulationen identifizierte man neben CD56 vier weitere Marker, die sich besonders zur Einteilung verschiedener NK-Zell-Cluster eignen: NKG2A, CD94, CD16 und CD57. Dabei werden

undifferenzierte NK-Zellen durch Expression von NKG2A und CD94 gekennzeichnet, während CD16 und CD57 vor allem auf differenzierteren NK-Zellen zu finden sind (Horowitz et al., 2013).

Zusätzlich zur Herunterregulierung von CD56 auf der Zelloberfläche kommt es im NK-Differenzierungsprozess also zur Expression von CD16. Während nur wenige der CD56^{bright} NK-Zellen CD16 exprimieren, sind über 95 % der CD56^{dim} NK-Zellen CD16 positiv (Lanier, Le, Civin, Loken, & Phillips, 1986). Durch CD16 wird die antikörperabhängige Zytotoxizität der NK-Zellen vermittelt, was zur besseren zytotoxischen Funktion dieser Subpopulation beiträgt (Cooper et al., 2001). Der Marker CD57 wird ebenfalls im Rahmen der terminalen NK-Differenzierung exprimiert. Man geht davon aus, dass CD57 im Anschluss an eine Aktivierung der NK-Zelle auf der Zelloberfläche erscheint. Für diese Theorie spricht, dass die Frequenz CD57-positiver NK-Zellen mit dem Alter zunimmt (Lopez-Vergès et al., 2010). Man stellte außerdem fest, dass nach einer Infektion mit CMV eine terminal differenzierte CD57⁺ NKG2C⁺ NK-Zell-Subpopulation vorrangig expandierte (Lee et al., 2015; Lopez-Vergès et al., 2011). Diese terminal differenzierte NK-Subpopulation zeigte *in vivo* bei Re-Infektion mit murinem CMV (MCMV) eine stärkere Zytokinausschüttung als beispielsweise nach einer Infektion mit Influenzaviren (Min-Oo & Lanier, 2014). Diese terminal differenzierte NK-Subpopulation scheint dementsprechend eine Art ‚NK-Gedächtnis‘ darzustellen, das eine verbesserte Immunantwort auf CMV gewährleistet. Auch bei CD4 und CD8 T- Zellen geht eine Expression von CD57 mit dem Stadium terminaler Differenzierung einher (Brenchley et al., 2003).

Eine weitere wichtige Gruppe von NK-Oberflächenmarkern reguliert den Aktivierungsstatus der Zelle. Die Toleranz gegenüber ‚eigenem‘ Antigen wird durch Präsentation körpereigener HLA-I-Moleküle an inhibitorische NK-Zellmarker induziert. Dementsprechend werden NK-Zellen bei Fehlen dieses HLA-Moleküls aktiviert und die Zielzelle lysiert. Diese Theorie wird auch als *missing self* Theorie bezeichnet (Kärre, Ljunggren, Piontek, & Kiessling, 1986). Die Expression toleranzvermittelnder inhibitorischer Oberflächenmarker wird unter anderem auch durch genetische Faktoren oder Stress (z.B. im Rahmen von Infektionen) reguliert (Jie & Sarvetnick, 2004). Eine Gruppe dieser Marker sind die *killer immunoglobulin-like receptors* (KIR), die vor allem auf den differenzierteren CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen exprimiert werden (Cooper et al., 2001). Sie können je nach Subtyp sowohl inhibitorische als auch aktivierende Funktionen ausüben (Montaldo et al., 2013). Die bereits erwähnten Marker CD94 und NKG2A, die in erster Linie auf frühen NK-Zelldifferenzierungsstufen exprimiert werden, zählen ebenfalls zu den NK-Zellrezeptoren mit inhibitorischer Funktion (Colonna, Nakajima, & Cella, 1999). Jede reife NK-Zelle exprimiert mindestens einen Oberflächenmarker, der bei Bindung an eigene HLA-I-Moleküle inhibitorisch wirkt, sodass eine Toleranz gegenüber den eigenen Zellen gewährleistet ist (Anfossi et al., 2006). In **Abbildung 2** sind die unterschiedlichen NK-Zell-Differenzierungsstufen, die jeweiligen Rezeptorexpressionsmuster und die Funktionalität zusammenfassend dargestellt.

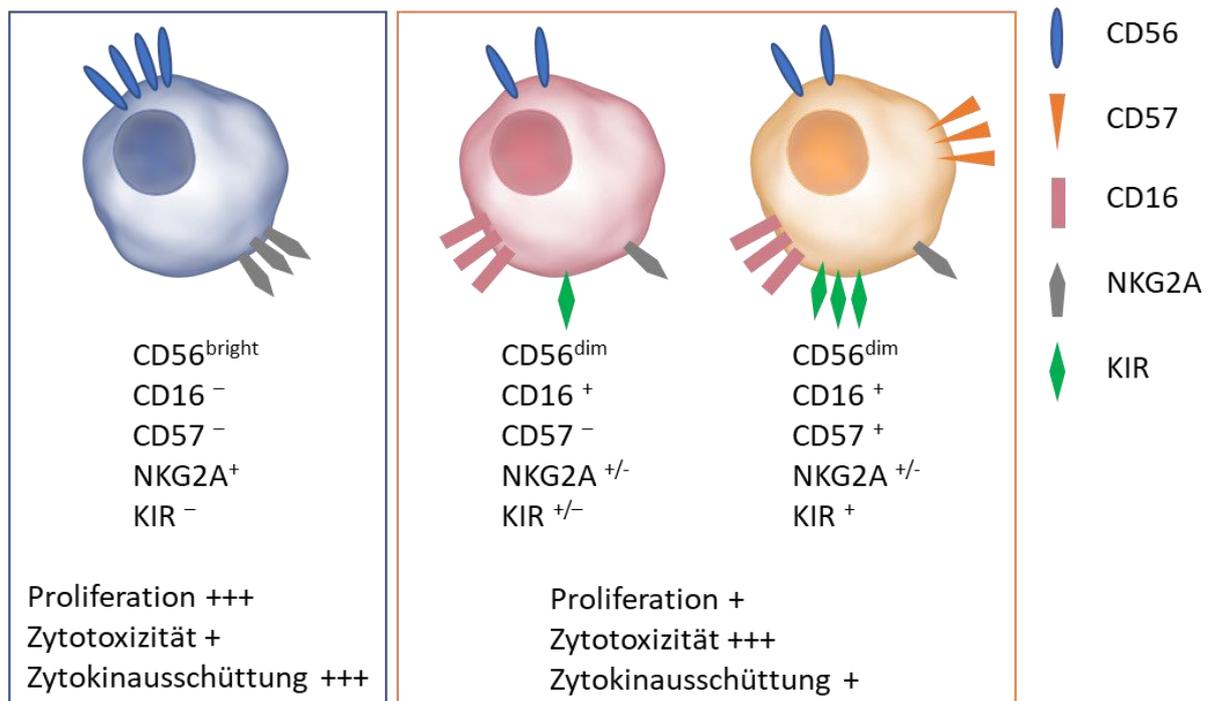


Abbildung 2: Differenzierungsstufen reifer NK-Zellen. Dargestellt sind in Blau CD56^{bright} NK-Zellen und die von diesem NK-Zellsubtyp exprimierte Oberflächenmarker (linkes Feld). Rechts Darstellung von differenzierteren CD56^{dim} NK-Zellen. In Rot CD56^{dim} CD57⁻ NK-Zellen, in Gelb CD56^{dim} CD57⁺ NK-Zellen. Bilddateien aus *Library of Science and Medical Illustrations* lizenziert unter CC BY-NC-SA 4.0 (<https://gumroad.com/l/library?wanted=true>). Abbildung erstellt von Franziska Fischer in Anlehnung an Cooper et al., 2001 und Abel et al., 2018.

1.4.2 Expression von HLA-DR auf NK-Zellen

Ein weiterer Oberflächenmarker, der unter bestimmten Umständen auch auf NK-Zellen exprimiert wird, ist ein Glykoprotein aus dem System der humanen Leukozyten-Antigene (HLA), das HLA-DR. HLA-Moleküle ermöglichen die Unterscheidung zwischen körpereigenen und -fremden Zellen und dienen zudem der Antigenpräsentation, die zur Aktivierung und Proliferation antigenspezifischer T-Zellen durch Bindung an den T-Zellrezeptor führt (Murphy, Mowat & Janeway, 2012d). Die HLA-Moleküle lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. Erstens HLA-I-Moleküle (Subgruppen HLA-A, -B und -C), die auf allen kernhaltigen Zellen des Individuums exprimiert werden und so die Zelle als ‚selbst‘ identifizieren. Ein Fehlen von HLA-I-Molekülen induziert eine Immunantwort gegen das entsprechende Antigen (Murphy, Mowat, & Janeway, 2012d und vgl. Kapitel 1.4.3). HLA-II-Moleküle dagegen sind vor allem auf den Zellen des Immunsystems zu finden und lassen sich noch weiter in die Subgruppen HLA-DR, -DQ und -DP einteilen. Wird ein Antigen auf diesen Molekülen präsentiert, werden vor allem CD4 T-Zellen aktiviert, was eine Verstärkung der humoralen Immunantwort bewirkt (Murphy, Mowat, & Janeway, 2012d).

Typischerweise werden HLA-2-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen oder auch T-Zellen exprimiert, seltener allerdings auch auf bestimmten NK-Subpopulationen. Neben den bereits beschriebenen Oberflächenmarkern, kann also auch die Expression von HLA-DR auf NK-Zellen hochreguliert werden (Phillips, Le, & Lanier, 1984). Interessanterweise scheint die Expression von HLA-DR auf NK-Zellen nicht an die Expression anderer Aktivierungsmarker gekoppelt zu sein, sondern deutlich verzögert als Marker einer späten Aktivierung zu erscheinen (Caruso et al., 1997; Lucia, Rutella, Rumi, & Cauda, 1997).

HLA-DR positive NK-Zellen scheinen bei einer Reihe von Erkrankungen relevant zu sein. Bei AIDS- oder Tuberkulose-Patient:innen oder auch im Rahmen verschiedener Autoimmunerkrankungen ist beispielsweise ein erhöhter Anteil HLA-DR-exprimierender Zellen zu finden (Evans et al., 2011; Naluyima et al., 2014; Rinaldi et al., 2006). Die Expression von HLA-DR kann dabei durch verschiedene Stimuli angeregt werden, darunter z.B. Zytokine, Kontakt mit bestimmten Oberflächenmarkern oder auch über eine Stimulation durch DC (Benlahrech et al., 2009; Evans et al., 2011; Rölle et al., 2016). NK-Zellen, die HLA-DR exprimieren schütten vermehrt proinflammatorische Zytokine aus und haben gleichzeitig eine ausgeprägte zytotoxische Funktion (Burt et al., 2008; Evans et al., 2011). Zusätzlich sind diese NK-Zellen vermutlich auch in der Lage, Antigene an T-Zellen zu präsentieren und so in einer weiteren Funktion als Immunmodulatoren und Verbindungselement zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort zu fungieren (Burt et al., 2008).

Die Funktion dieser NK-Zellsubpopulation insbesondere im Rahmen von Infektionen ist noch nicht abschließend geklärt. Einerseits weisen HLA-DR-exprimierende NK-Zellen immunmodulatorische und zytotoxische Funktionen auf, andererseits wird die vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in Zusammenhang mit der Pathogenese z.B. chronischer Hepatitis-Infektionen gebracht (Serti et al., 2015). Ähnliche Beobachtungen wurden bei Autoimmunerkrankungen wie MS oder SLE gemacht (Rinaldi et al., 2006; Voynova, Skinner, & Bolland, 2015). Zum Vorkommen HLA-DR positiver NK-Zellen im Rahmen einer EBV-Infektion gibt es noch keine Daten. Eine genauere Charakterisierung dieser NK-Subpopulation während der akuten EBV-IM könnte aber zum einen Hinweise auf die Funktionalität dieser NK-Zellen geben und möglicherweise neue Erkenntnisse zur Ätiologie der Unterschiede im Verlauf einer EBV-Primärinfektion bringen.

1.4.3 NK-Zellfunktion im Rahmen viraler Infektionen

Die aufgrund der zahllosen möglichen Expressionsmuster von NK-Oberflächenmarkern beachtliche Diversität von NK-Subpopulationen befähigt diese Zellen dazu, auf viele unterschiedliche Stimuli zu reagieren. Eine funktionierende NK-Zellantwort ermöglicht dementsprechend eine Immunreaktion gegen verschiedenste Pathogene (Mandal & Viswanathan, 2015).

Ist die NK-Zellfunktion allerdings beeinträchtigt hat dies einen Einfluss auf Krankheitsprogression, bzw. -schwere bei diversen Virusinfektionen, z.B. akuter und chronischer Hepatitis oder Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV). Diese negativen Auswirkungen können z.B. durch eine reduzierte Zytotoxizität, verminderte Zytokinexpression oder auch durch fehlende Expression von NK-Aktivierungsmarkern bedingt sein (Iannello, Debbeche, Samarani, & Ahmad, 2008; Lunemann et al., 2014; Thomas et al., 2012). Patient:innen mit genetischen Defekten, die mit einer verminderten NK-Zellfrequenz bzw. einer NK-Zelldefizienz einhergehen, sind außerdem häufig anfälliger für Infektionen mit Herpesviren (vgl. Kapitel 1.3.3) (Biron, Byron, & Sullivan, 1989).

Bei einer Infektion mit EBV kommt es zu einer Expansion von NK-Zellen. Die NK-Zellfrequenz bleibt nach akuter Infektion auch noch bis zu einem Monat nach Diagnosestellung erhöht (Williams et al., 2005). Über die Auswirkungen dieser Zunahme in der NK-Zellfrequenz auf den Krankheitsverlauf einer Primärinfektion besteht allerdings Uneinigkeit. Balfour et al. beobachteten in ihrer Studie zur EBV-Primärinfektion bei amerikanischen College-Studierenden einen positiven Zusammenhang zwischen der NK-Zellfrequenz und der EBV-Last im peripheren Blut (Balfour, Sifakis, et al., 2013). In einer anderen Studie wurde dagegen eine negative Korrelation nachgewiesen (H. Williams et al., 2005). Eine mögliche Erklärung für diese diskrepanten Ergebnisse könnte beispielsweise darin liegen, dass unterschiedliche NK-Subpopulationen bei einer EBV-Infektion in verschiedenem Maße expandieren und daher individuell erfasst werden müssen. Eine genaue Charakterisierung der verschiedenen NK-Subpopulationen bei einer Infektion mit Herpesviren ist auch notwendig, weil sich die primär proliferierenden NK-Subpopulationen je nach Virus zum Teil deutlich unterscheiden. Während sich bei einer Infektion mit HSV das NK-Zell Kompartiment kaum verändert, kommt es bei einer Infektion mit CMV oder EBV zur Expansion spezifischer NK-Subpopulationen (Azzi et al., 2014; Björkström, Svensson, Malmberg, Eriksson, & Ljunggren, 2011; Gumá et al., 2004).

Wie bereits in Abschnitt 1.4.1.1 erläutert, expandiert im Rahmen einer Infektion mit CMV in erster Linie eine terminal differenzierte CD57⁺ NKG2C⁺ NK-Subpopulation. Der Phänotyp, der bei EBV-Infektion bevorzugt proliferierenden NK-Subpopulation unterscheidet sich deutlich von diesen terminal differenzierten NK-Zellen. Bei einer akuten EBV-IM ist die Frequenz einer CD56^{dim} NKG2A⁺ KIR⁻ Subpopulation im Vergleich zu Nicht-infizierten Kontrollproband:innen signifikant erhöht (Azzi et al., 2014). Entsprechend der Expression von Oberflächenmarkern ist dieser NK-Phänotyp als früh-differenziert einzuordnen, da bereits eine Herunterregulierung von CD56 stattgefunden hat, aber noch keine KIR-Expression vorliegt. Interessanterweise zeigte diese Population einen Monat nach Diagnosestellung der EBV-IM eine signifikant höhere CD57-Expression als zu Beginn der Erkrankung. Die Autor:innen postulierten deshalb, dass die von ihnen beschriebene NK-Zellpopulation eine ähnliche Gedächtnis-Funktion haben könnte, wie CD57⁺ NKG2C⁺ NK-Zellen in MCMV-infizierten

Mäusen (Azzi et al., 2014). Diese CD56^{dim} NKG2A⁺ KIR⁻ Population könnte zudem eine Erklärung für das häufigere Auftreten einer symptomatischen EBV-Primärinfektion bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen sein, da die Frequenz dieser NK-Zellpopulation bei Neugeborenen und im jungen Lebensalter höher ist als bei älteren Personen (Sundström et al., 2007). Bemerkenswert ist, dass der Anteil CD56^{bright} bzw. CD56^{dim} NK-Zellen während der Inkubationszeit der EBV-IM weitgehend stabil bleibt und es erst mit Beginn der Symptome einer EBV-IM zu einer NK-Zellexpansion kommt (Dunmire, Grimm, Schmeling, Balfour, & Hogquist, 2015). Die Faktoren, die zu dieser Expansion führen, sind allerdings noch nicht bekannt.

Funktionell zeigte sich eine Reaktivität der früh-differenzierten NK-Zellen vor allem gegen lytisch mit EBV infizierten Zellen (Azzi et al., 2014). Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Erkenntnissen, die eine Kontrolle der EBV-Replikation durch NK-Zellen während der lytischen Phase feststellten (L. R. Williams, Quinn, Rowe, & Zuo, 2016). Nach NK-Zelldepletion entwickelten Mäuse mit humanisiertem Immunsystem dagegen Merkmale, wie sie bei einer EBV-IM beobachtet werden (Chijioke et al., 2013). Unter anderem ist diese erhöhte Anfälligkeit lytisch-infizierter Zellen gegenüber NK-Zellen der Herunterregulierung von HLA-I-Molekülen in dieser Phase geschuldet. Durch die verminderte Expression wird die Erkennung durch EBV-spezifische CD8 T-Zellen zwar erfolgreich verhindert, NK-Zellen werden dagegen vermehrt aktiviert und führen zur Lyse der Zielzelle (Pappworth, Wang, & Rowe, 2007).

Auch in den Tonsillen sind NK-Zellen an einer Kontrolle der Infektion mit EBV beteiligt. Lünemann et al. identifizierten eine IFN- γ -produzierende NK-Subpopulation innerhalb der Tonsillen, die die Immortalisierung EBV-positiver B-Zellen einschränkte (Lünemann, Vanoaica, Azzi, Nadal, & Münz, 2013). Die dort lokalisierten NK-Zellen sind also in der Lage, die Transformation EBV-infizierter B-Zellen zu beeinträchtigen. Diese NK-Zellen scheinen außerdem die EBV-Primärinfektion in den Tonsillen limitieren zu können, wodurch eine effizientere adaptive Immunantwort zur Kontrolle der Infektion etabliert werden kann (Strowig et al., 2008). So greifen tonsilläre NK-Zellen bereits früh in den EBV-Infektionszyklus ein. Den NK-Zellen scheint also insbesondere in der Frühphase der EBV-Infektion und während der lytischen Replikation eine besondere Rolle in der Immunantwort gegen EBV zuzukommen.

1.5 Adaptive Immunantwort

Während die angeborene Immunantwort bereits ohne vorherige Sensibilisierung mit einem spezifischen Antigen funktionsfähig ist, entfalten die Zellen des erworbenen, bzw. adaptiven Immunsystems erst nach Konfrontation mit Erregerantigenen ihre Wirkung. Durch die von den Zellen des angeborenen Immunsystems ausgeschütteten Zytokine und die Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch die Antigen-präsentierenden Zellen wird die erworbene Immunantwort

eingeleitet (Murphy, Mowat, & Janeway, 2012c). Zu den Bestandteilen des adaptiven Immunsystems gehören die T-Zellen, die sich in CD4 und CD8 T-Zellen einteilen lassen und die B-Zellen. Während T-Zellen sowohl direkte zytotoxische Effekte als auch immunregulatorische Funktion haben, produzieren B-Zellen nach Aktivierung erregerspezifische Antikörper.

1.5.1 EBV-spezifische CD8 T-Zellen

Eine der drastischsten Veränderungen während einer EBV-IM findet innerhalb der CD8 T-Zellfraktion statt. Im Rahmen einer symptomatischer EBV-Primärinfektion expandiert das Kompartiment EBV-spezifischer CD8 T-Zellen deutlich (Callan et al. 1996). Diese sind zwar einerseits zur effektiven Kontrolle der Infektion notwendig, andererseits scheinen höhere CD8 T-Zellzahlen mit der Entwicklung von Krankheitssymptomen zusammenzuhängen und mit einer höheren Viruslast im peripheren Blut zu korrelieren (Balfour, Odumade, et al., 2013). Auch während einer asymptomatischen Primärinfektion mit EBV werden hohe Viruslasten nachgewiesen, allerdings ohne dass es zu einer vergleichbaren Expansion des CD8 T-Zellkompartimentes kommt (Jayasooriya et al., 2015; Silins et al., 2001). Die Entwicklung von Symptomen lässt sich also nicht durch eine hohe Viruslast erklären. Die EBV-spezifischen CD8 T-Zellen sind zwar einerseits notwendig zur Immunkontrolle bei EBV-Infektion, schütten andererseits aber auch eine Reihe proinflammatorischer Zytokine aus. Man geht davon aus, dass diese Zytokine zu einer Hyperinflammation und einer Dysregulation des Immunsystems führen. Diese Hyperinflammation infolge einer ausgeprägten proinflammatorischen Zytokinantwort EBV-spezifischer CD8 T-Zellen könnte ein Erklärungsansatz für die Symptomatik einer EBV-IM sein (M. F. C. Callan et al., 2000).

Ein großer Teil der bei einer EBV-IM nachzuweisenden CD8 T-Zellen ist spezifisch für EBV. Diese virusspezifischen CD8 T-Zellen machen bis zu 40 % der zirkulierenden CD8 T-Zellen während einer symptomatischen EBV-Primärinfektion aus (Annels, Callan, Tan, & Rickinson, 2000; Callan et al., 1996; Hislop, Taylor, Sauce, & Rickinson, 2007). In Studien zur Inkubationszeit von EBV-Infektionen gelangte man zu dem Erkenntnis, dass vor Symptombeginn kaum Veränderungen innerhalb der CD8 T-Zellfraktion stattfinden. Erst wenn die Betroffenen Krankheitssymptome entwickeln, ist eine deutliche Zunahme der CD8 T-Zellfrequenz nachweisbar. Die CD8 T-Zellzahlen bleiben dann bis zu 50 Tage nach Beginn der Symptome erhöht, bevor sie mit abnehmender Viruslast wieder auf das ursprüngliche Niveau sinken (Balfour, Odumade, et al., 2013; Dunmire, Grimm, et al., 2015).

Betrachtet man die Spezifität der EBV-spezifischen CD8 T-Zellen, ist eine klare Immundominanz-Hierarchie zu erkennen (vgl. **Abbildung 3**). So sind diese zu einem Großteil gegen lytische Antigene gerichtet, in bis zu 50 % der Fälle werden vor allem *IE* oder *E*-Genprodukte, wie beispielsweise BZLF1 von den CD8 T-Zellen erkannt (Taylor et al., 2015). Gegen späte lytische Epitope reaktive CD8 T-Zellen sind dagegen deutlich seltener (Abbott et al., 2013).

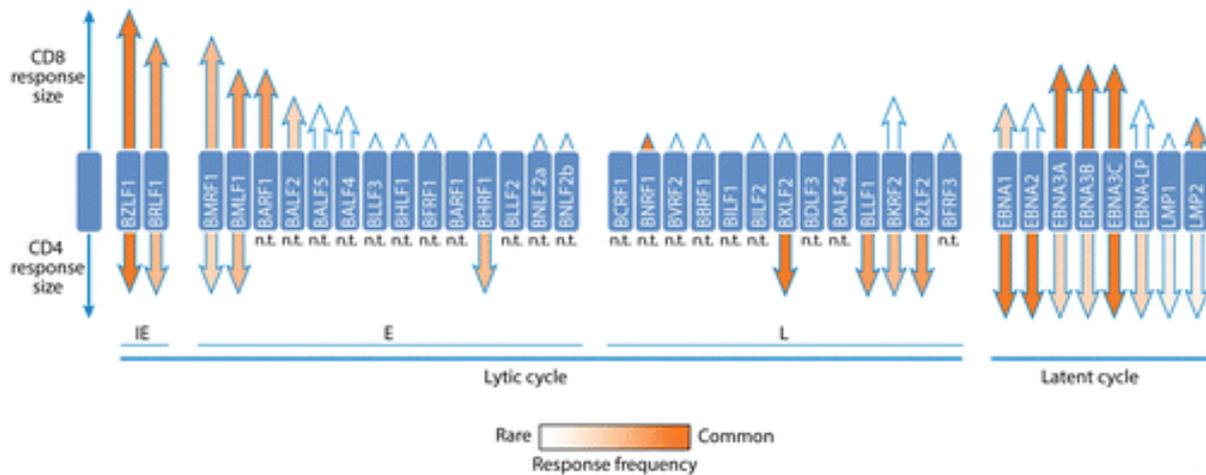


Abbildung 3: Reaktivität EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen gegenüber lytischen und latenten Virusantigenen (Taylor et al., 2015). Die Pfeillänge deutet die Frequenz EBV-spezifischer T-Zellantworten auf das entsprechende Antigen an, die Farbe die Häufigkeit EBV-spezifischer T-Zellen gegen ein bestimmtes Antigen innerhalb der Kohorte (rot = häufig, weiß = selten). Dargestellt sind die zwei IE, 14 E, 13 L Antigene der lytischen Phase und die 8 latenten EBV-Antigene.

In vitro zeigten vor allem gegen IE-Genprodukte gerichtete CD8 T-Zellen eine gute Antigenerkennung. Die Immundominanz der Epitope korreliert dabei direkt mit der Effektivität der Antigenpräsentation durch lytisch infizierte Zellen, die im zeitlichen Verlauf der lytischen Infektion deutlich abnimmt (Pudney, Leese, Rickinson, & Hislop, 2005). Eine Erklärung für diese Immunhierarchie könnte sein, dass nach der frühen lytischen Phase die HLA-I-Expression auf infizierten Zellen herunterreguliert wird, wodurch die Erkennung durch CD8 T-Zellen untergraben wird (Keating, Prince, Jones, & Rowe, 2002). Eine weitere Strategie, mit der eine Erkennung durch EBV-spezifische CD8 T-Zellen im Verlauf der Infektion behindert wird, ist die Inhibition der Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche durch Expression bestimmter EBV-Gene (BNLF2a, BGLF5 und BILF1) (Quinn et al., 2014). Diese und auch andere Strategien, durch die das Virus der Immunantwort der infizierten Person entgeht, ermöglichen unter anderem die lebenslange EBV-Persistenz. Im weiteren Verlauf der EBV-Infektion sind zunehmend CD8 T-Zellen nachweisbar, die gegen latente Antigene gerichtet sind. Am häufigsten sind diese spezifisch für Epitope der EBNA3-Gruppe (Hislop et al., 2007). Die Frequenz der gegen Latenzantigene gerichteten CD8 T-Zellen sinkt im Verlauf der Infektion nur langsam, v.a. verglichen zu den CD8 T-Zellen lytischer Spezifität, deren Frequenz mit sinkender Viruslast rasch abnimmt (Longnecker et al., 2013). Diese rasche Abnahme scheint durch eine Induktion von Apoptosemechanismen bei Wegfall der Stimulation durch Virusantigen bedingt zu sein (Callan et al., 2000).

Nach durchgemachter Primärinfektion sind schließlich noch ca. 1 - 2 % der CD8 T-Zellen gesunder EBV-positiver Proband:innen EBV-spezifische T-Gedächtniszellen. Diese sind zwar etwas häufiger gegen lytische Epitope gerichtet als gegen latente, allerdings ist der Unterschied in der Immundominanz

während der latenten Infektion deutlich geringer ausgeprägt als in der lytischen Phase (Hislop et al., 2007). Die Frequenz dieser Gedächtniszellen bleibt über die Jahre stabil. Im Laufe der Viruspersistenz kommt es aber immer wieder zu Fluktuationen in der T-Zellpopulation, die am ehesten mit einer rezidivierend auftretenden subklinischen Reaktivierung des lytischen Zyklus zusammenhängen (Crough et al., 2005). Zur kontinuierlichen Kontrolle der persistierenden EBV-Infektion scheint also ein schnell reagibles EBV-spezifisches CD8 T-Zellkompartiment unabdinglich zu sein.

1.5.2 EBV-spezifische CD4 T-Zellen

Neben den CD8 T-Zellen spielen auch CD4 T-Zellen eine Rolle in der Immunkontrolle von EBV. Zur Dynamik und Funktionalität dieser Zellpopulation während der symptomatischen EBV-Primärinfektion ist allerdings deutlich weniger bekannt. Dies ist unter anderem der Tatsache geschuldet, dass im Gegensatz zu der deutlichen Zunahme der CD8 T-Zellfrequenz im Rahmen einer EBV-IM die CD4 T-Zellfrequenz deutlich geringer ist. Während der akuten Phase der Infektion machen EBV-spezifische CD4 T-Zellen nur etwa ein Prozent der zirkulierenden CD4 T-Zellen aus (Rickinson, Long, Palendira, Munz, & Hislop, 2014).

Zusätzlich unterscheidet sich die CD4 T-Zellantwort auch durch die fehlende Immundominanz einzelner EBV-Epitope, wie sie bei EBV-spezifischen CD8 T-Zellen vorliegt (Long et al., 2011). Die CD4 T-Zellantworten sind gegen Antigene jeder Phase des lytischen Zyklus, EBV-Strukturantigene und vor allem auch gegen latente Antigene gerichtet (Adhikary et al., 2007; Taylor et al., 2015; **Abbildung 3**). Die Begründung hierfür könnte sein, dass die Präsentation viraler Antigene nicht wie bei CD8 T-Zellen über zelluläre HLA-I-Moleküle vermittelt wird. Stattdessen werden den CD4 T-Zellen extrazelluläre virale Bestandteile aus zuvor lysierten virusinfizierten Zellen durch DC oder B-Zellen auf MHC-II-Molekülen präsentiert (Long et al., 2011; Mautner & Bornkamm, 2012). Immunevasionsmechanismen, die eine Präsentation gegenüber CD8 T-Zellen durch die Herunterregulierung von HLA-I verhindern, spielen bei der CD4 T-Zellantwort also keine Rolle. Auf diese Weise wird während der akuten EBV-Infektion eine in der Frequenz der CD8 T-Zellantwort unterlegene, dafür aber gegen eine deutlich größere Anzahl von Antigenen gerichtete CD4 T-Zellantwort etabliert. Auffällig ist allerdings, dass CD4 T-Zellen, die gegen das latente Antigen EBNA1 gerichtet sind, im Gegensatz zu anderen EBV-spezifischen CD4 T-Zellen, zu Beginn der Infektion kaum zu detektieren sind. Erst zwei bis 13 Monate später ist eine nennenswerte Population EBNA1-spezifischer CD4 T-Zellen nachweisbar (Long et al., 2013). Möglicherweise beruht diese Beobachtung auf einer mangelnden Freisetzung von EBNA1 aus virusinfizierten Zellen. Eine Präsentation von EBNA1 gegenüber CD4 T-Zellen wird so verzögert, da sie über andere Mechanismen, z.B. Autophagozytose erfolgen muss (Paludan et al., 2005). Interessanterweise spiegelt sich diese Verzögerung in der EBNA1-spezifischen CD4 T-Zellantwort auch

in der Antikörperantwort gegen EBNA1 in IM-Patient:innen wider, die auch erst später im Verlauf der Infektion nachweisbar wird (vgl. Kapitel 1.5.3).

Bezüglich der Funktionalität EBV-spezifischer CD4 T-Zellen ist bis dato noch wenig bekannt. Insbesondere in Bezug auf die akute EBV-IM beschränken sich die Untersuchungen meist auf die Expression von IFN- γ (Amyes et al., 2003; Scherrenburg, Piriou, Nanlohy, & van Baarle, 2008). Da allerdings die Expression von IFN- γ nur gering ist, bzw. nicht alle T-Zellen IFN- γ ausschütten, ist die Betrachtung eines einzelnen Zytokins für eine differenzierte Beurteilung der T-Zell-Funktionalität nicht ausreichend (Betts et al., 2005; Ning, Xu, Chan, & Chiang, 2011). Eine detailliertere Analyse der Funktionalität EBV-spezifischer T-Zellen wurde bei latent EBV-infizierten Proband:innen durchgeführt. Ning et al. analysierten die Expression von drei Zytokinen (IFN- γ , TNF, Interleukin 2 (IL-2)), einem Degranulierungs-Marker (CD107a) und einem Chemokin (MIP1- α). Auf diesem Wege wurden polyfunktionale CD4 und CD8 T-Zellen nachgewiesen, die in der Regel vor allem gegen immundominante EBV-Epitope gerichtet waren. Diese polyfunktionalen T-Zellen exprimierten nicht nur einzelne, sondern eine Kombination aus unterschiedlichen Zytokinen. Interessanterweise zeigten sich Unterschiede in der Zusammensetzung der Zytokin-Kombinationen zwischen gesunden Virusträger:innen und Patient:innen mit PTLD. Bei PTLD-Patient:innen war die Expression von IFN- γ und IL-2 vermindert, während die Expression von TNF und die Fähigkeit zur Degranulation erhalten blieb. Die Autor:innen interpretieren diese Beobachtung als einen Funktionalitäts-Shift von einem antiviralen Expressionsprofil bei gesunden Virusträgern zu einem proinflammatorischen Profil bei PTLD-Patient:innen. Außerdem waren die T-Zellen der PTLD-Patient:innen meist mono- oder bifunktional, während die gesunden EBV-positiven Proband:innen polyfunktionalere T-Zellen aufwiesen (Ning et al., 2011).

Auch in anderen viralen Infektionen, z.B. mit HIV, sind positive Effekte polyfunktionaler T-Zellen auf den Krankheitsverlauf beschrieben. In Studien mit sogenannten *Elite-controllers*, also Patient:innen, die auch ohne antiretrovirale Therapie die Virusreplikation im Blut kontrollieren können, waren deutlich mehr polyfunktionale CD4 T-Zellen nachzuweisen als in der Vergleichsgruppe (Ferre et al., 2010). Auch in der Impfstoffentwicklung sind Impfstoffe, die polyfunktionale T-Zellantworten generieren in der Regel deutlich länger wirksam. Dies trifft beispielweise auf den Gelbfieber-Impfstoff zu, der eine Immunität über bis zu 35 Jahre induziert (Ahmed & Gottschalk, 2009; Gaucher et al., 2008).

1.5.3 Antikörperantwort

Nachdem die angeborene und die zelluläre Ebene der erworbenen Immunantwort bei EBV-Infektion besprochen wurde, soll nun auf die humorale, bzw. antikörpervermittelte Ebene der adaptiven Immunantwort eingegangen werden. Über antikörpervermittelte Mechanismen werden extrazellulär zirkulierende Viruspartikel unschädlich gemacht und so der Infektionsverlauf abgeschwächt (Murphy,

Mowat, & Janeway, 2012a). Die Bildung von Antikörpern findet in B-Zellen statt. Naive B-Zellen werden zunächst durch die sogenannten T-Helferzellen, spezielle CD4 T-Zellen zur Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen angeregt (Murphy, Mowat, & Janeway, 2012a).

Bei einer akuten Infektion mit EBV dienen serologische Antikörpernachweise als wichtiges diagnostisches Tool, um die Infektion zu verifizieren, da sich bei einer EBV-Infektion Antikörpermuster detektieren lassen, die für jede Phase der Erkrankung ohne große interindividuelle Variabilität, spezifisch sind (Middeldorp, 2015). Um eine EBV-Infektion serologisch festzustellen, geben Antikörper gegen verschiedene virale Antigene Aufschluss über den Infektionsstatus eines Individuums. Die Antikörperantwort, insbesondere in Bezug auf eine länger zurückliegende Infektion, scheint sich bei symptomatischer und bei asymptomatischer Primärinfektion nicht zu unterscheiden (Middeldorp, 2015).

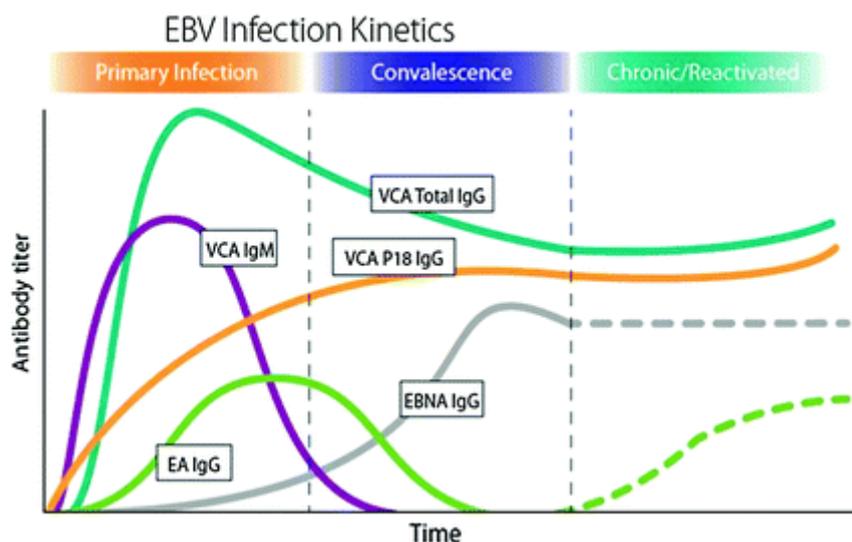


Abbildung 4: Dynamik der Antikörperantwort auf EBV bei Primärinfektion, in der Rekonvaleszenzzeit und bei chronischer Viruspersistenz bzw. Reaktivierung (Middeldorp, 2015). Dargestellt ist auf der Y-Achse die Höhe des Antikörpertiters in Bezug auf den zeitlichen Verlauf der EBV-Infektion (X-Achse). Es werden die für die Diagnostik relevantesten EBV-spezifischen Antikörper gezeigt: VCA IgM (lila), EA IgG (grün), VCA IgG (türkis), VCA P18 IgG (orange) und EBNA IgG (EBNA1, grau). Die gestrichelten Linien sollen die möglichen Unterschiede der Antikörpertiter gegen EBNA und EA je nach Krankheitsverlauf symbolisieren.

Die ersten Antikörper, die nach einer Primärinfektion mit EBV in Erscheinung treten sind IgM-Antikörper, die gegen das virale Kapsidantigen (*viral capsid antigen*, VCA) gerichtet sind (**Abbildung 4**). Sie sind in der Regel bereits acht Tage vor Symptombeginn einer EBV-IM nachweisbar und fallen nach Ablauf der akuten Infektion rasch ab, wodurch sie als diagnostischer Marker einer akuten EBV-Infektion mit Einschränkung geeignet sind (Balfour, Odumade et al., 2013). IgM-Antworten können auch unspezifisch sein und beweisen daher eine frische Infektion nicht (Luzuriaga & Sullivan, 2010). IgG-VCA-Antikörper erscheinen ebenfalls zu Beginn der Infektion, bleiben allerdings auch langfristig

nachweisbar. Eine stattgehabte Infektion mit EBV ist dementsprechend durch das Vorliegen von VCA-IgG gekennzeichnet (Middeldorp, 2015). Zusätzlich kann eine zurückliegende Infektion durch das Vorliegen von Antikörpern gegen EBNA1 diagnostiziert werden. Diese sind in der Regel erst drei bis sechs Monate nach Ablauf der akuten Infektion nachweisbar, was unter anderem der Tatsache geschuldet ist, dass erst sehr spät eine EBNA1-spezifische CD4 T-Zellantwort induziert wird (vgl. Kapitel 1.5.2). In 5-10% der Fälle ist trotz stattgehabter Infektion keine EBNA1-IgG nachweisbar, was die Diagnostik der zurückliegenden Infektion erschweren kann (De Paschale & Clerici, 2012).

IgG-Antikörper gegen *EA* können entweder eine akute Infektion oder eine Reaktivierung einer bereits stattgehabten Infektion bedeuten. Der Übergang in die latente Phase der EBV-Infektion wird von sinkenden VCA-IgM und *EA*-IgG Titern, sowie steigenden Antikörpertitern für VCA-IgG und EBNA1-IgG begleitet (Middeldorp, 2015). Diese zeitliche Abfolge serologischer Ereignisse läuft in den meisten Fällen identisch ab. Unterschiede in der humoralen Immunantwort treten aber beispielsweise bei verzögerter Genesung oder auch CAEBV auf. Insbesondere eine Persistenz der *EA*-Antikörper und ein Ausbleiben von EBNA-Antikörpern könnte mit einer schlechteren Immunkontrolle über die latente EBV-Infektion und einer EBV-Reaktivierung zusammenzuhängen und wurde beispielsweise bei EBV-assoziiertem ME/CFS oder Autoimmunerkrankungen beobachtet (Lerner et al., 2012; Lossius, Johansen, Torkildsen, Vartdal, & Holmøy, 2012).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien

Name	Hersteller und Inhaltsstoffe
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific
RPMI-10	RPMI-1640 versetzt mit 10 % Hitze-inaktiviertem fetalen Kälber-Serum (FCS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin
Einfrier-Medium	90 % FCS versetzt mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.1.2 Medienzusätze

Name	Hersteller
FCS, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/ Streptomycin	Thermo Fisher Scientific

2.1.3 Puffer und Lösungen

Name	Hersteller
Pancoll Trenn-Lösung	PAN-Biotech
DMSO	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific
VersaLyse	Beckman Coulter
Flow Cytometry Staining Buffer (FACS Buffer)	Thermo Fisher Scientific
FACS Clean	Becton Dickinson (BD)
FACS Rinse	
FACS Flow	
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich

2.1.4 Reagenzsysteme

Name	Hersteller
Cytofix/ Cytoperm Fixation/ Permeabilization Kit	BD
LIVE/ DEAD Fixable Near-Infra Red Dead Cell Stain Kit (NIR)	Thermo Fisher Scientific

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Stimulationsantikörper

Antigen	Hersteller	Klon	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
CD28	BD	L293	1,00

2.1.5.2 Fluorochromkonjugierte Antikörper

A) NK-Zell Panel

Antigen	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
CD3	PE-CF 594	BD	UCHT1	0,31
CD8	Pacific Blue	Dako	DK25	0,63
CD3	PE-Cy5	BD	UCHT1	0,16
CD4	APC	Thermo Fisher Scientific	OKT4	0,10
CD3	PE-Cy7	BD	SK7	0,16
CD3	PerCP Cy 5.5	BD	SK7	0,31
CD8	PE	BD	SK1	0,08
CD158e1	BV711	BD	DX9	0,16
CD8	FITC	BD	SK1	0,08
CD4	PE-CF594	BD	RPA-T4	0,16
CD16	Pacific Blue	BioLegend	3G8	1,25
CD56	PE-Cy7	BioLegend	5.1H11	0,63
CD57	APC	BioLegend	HCD57	0,16
CD14	PE-Cy5	Thermo Fisher Scientific	61D3	0,31
CD19	PE-Cy5	Thermo Fisher Scientific	HIB19	0,31
HLA-DR	FITC	BD	G46-6	0,16
CD158	PerCP-Cy5.5	BioLegend	HP-MA4	0,31
CD158b	PE	BD	CH-L	0,13
Hoechst	-	ImmunoChemistry Technologies	-	0,50

B) Effektor T-Zell Panel

Antigen	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
CD8	FITC	BD	SK1	0,31
CD8	ECD	Beckman Coulter	SFC121Thy2D3	0,16
CD4	PerCP	BD	SK3	0,15
CD3	eF450	Thermo Fisher Scientific	OKT3	1,25
CD3	BV510	BD	SK7	1,00
CD3	Alexa 700	BD	UCHT1	1,25
IL-2	FITC	Thermo Fisher Scientific	MQ1-17H12	3,13
TNF	eF450	eBioscience	MAb11	3,13
IFN- γ	Alexa 700	BD	B27	0,13

2.1.6 EBV-Antigene

Name	Konzentration	Hersteller
BZLF1 (T- <i>activated</i>)	10 $\mu\text{g/ml}$	Lophius Biosciences
EBNA3A (T- <i>activated</i>)	10 $\mu\text{g/ml}$	Lophius Biosciences

EB-Virus-like particles (EB-VLP)	$\cong 6,5 \times 10^8$ Kopien EBV wt/ml	Mit freundlicher Genehmigung der AG <i>Gene Vectors</i> des Helmholtz-Zentrum, München
----------------------------------	--	--

2.1.7 Laborausstattung

Name	Hersteller
Pipettierhilfe <i>Pipetboy</i>	Thermo Fisher Scientific
Einfrierhilfe <i>Mr. Frosty</i>	Sigma-Aldrich
Zellzählgerät, <i>Vi-CELL XR</i>	Beckman-Coulter
Durchflusszytometer, <i>LSR Fortessa</i>	BD

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Pipettenspitzen (10-1000 μ l)	Sarstedt
Einmalpipetten (5-25 ml)	Greiner
Einfrier-Röhrchen (1,8 ml)	Thermo Fisher Scientific
<i>Falcon</i> -Röhrchen (15/ 50 ml)	BD
<i>ViCell</i> -Röhrchen	Beckman-Coulter
Microtiter 96-Loch Platten (<i>U-bottom</i>)	Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäße (0,5-2,0 ml)	Sarstedt
S-Monovette® EDTA	Sarstedt

2.1.9 Software

Name	Hersteller
GraphPad Prism v5.0	GraphPad Software Inc.
FACS Diva Software v8.0.1	BD
FlowJo v10	BD
Pestle v2.0	Joshua Nozzi/ Dr. Mario Roederer, NIH
Spice v6.1	Joshua Nozzi/ Dr. Mario Roederer, NIH
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Die für die Dissertation verwendeten Proben wurden im Rahmen der durch das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) geförderten IMMUC-Studie zur EBV-IM in München gewonnen. Die Studie wurde durch des Ethikkomitee der Technischen Universität München mit der Nummer 112/14 genehmigt und eine Einverständniserklärung zur Studienteilnahme der Patient:innen bzw. deren Sorgeberechtigten lag vor. Ziel der Studie war die Identifikation von Biomarkern und Ursachen einer protrahierten, bzw. schwer verlaufenden Primärinfektion mit EBV. Die für die Dissertation

verwendeten Proben wurden im Rahmen der Pilotphase der IMMUC-Studie gewonnen, während der die klinischen Abläufe und die Prozessierung der Proben im Labor optimiert wurden.

In die Studie eingeschlossen wurden Patient:innen, bei denen eine symptomatische Primärinfektion mit EBV diagnostiziert wurde. Zunächst wurde die Diagnose auf Basis klinischer Kriterien gestellt und anschließend mittels EBV-ELISA, -Immunoblot und -PCR bestätigt. Die Einschlusskriterien sind im Detail in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Tabelle 1: Einschlusskriterien für die IMMUC-Studie

A) Neuauftreten von mindestens einem von vier typischen IM-Symptomen \leq vier Wochen vor Rekrutierung.
1. Tonsillopharyngitis 2. Fieber $\geq 38,5$ °C 3. Lymphadenopathie 4. Fatigue
B) Zusätzlich drei von drei virologischen Kriterien an v1.
1. EBV-PCR (Zellfraktion/ Plasma positiv) und/ oder positive EBV VCA IgM- und/ oder EBV VCA IgG-Antikörper 2. EBNA1 IgG-Antikörper in mindestens einem serologischen Test negativ 3. EBNA1 ≤ 1 im EBV-Immunoblot
C) Zusätzlich ein mit einer EBV-Primärinfektion vereinbarer Verlauf der virologischen Parameter.
D) Zusätzliche Einschlusskriterien:
Alter ≤ 39 Jahre Keine Schwangerschaft ≤ 12 Monate vor Rekrutierung Keine Transfusion und/ oder Transplantation ≤ 12 Monate vor Rekrutierung Einverständnis zur Studienteilnahme

Meine Dissertation konzentrierte sich auf die Analyse der Immunantwort während der frühen Phase einer symptomatischen EBV-Primärinfektion. Es erfolgten zu diesem Zweck insgesamt zwei Blutentnahmen, die erste bei Studieneinschluss im Rahmen der ersten Visite (v1), die zweite im Rahmen der zweiten Visite (v2) bei einer Verlaufsuntersuchung innerhalb von acht Wochen nach Symptombeginn.

2.2.2 Probengewinnung und -transport

Nach der Blutentnahme wurde das mit EDTA antikoagulierte Blut bei Raumtemperatur in das weiterverarbeitende Labor transportiert. Im Median trafen die Proben nach 2,3 Stunden ein (min. 0,8 – max. 6,8 Stunden), woraufhin sie unverzüglich weiterverarbeitet wurden. Innerhalb von zwei Stunden nach Ankunft im Labor wurde die durchflusszytometrische Analyse des frischen Zellmaterials durchgeführt. Die Kryokonservierung der Proben erfolgte ebenfalls innerhalb von zwei Stunden nach

Ankunft der Proben im Labor. Auf diese Weise wurde die Lagerzeit der Blutproben möglichst kurzgehalten, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch lange Liegezeiten zu verhindern.

2.2.3 Isolation und Kryokonservierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Nach Ankunft im Labor wurden zunächst aus dem EDTA-antikoagulierten Blut die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) isoliert. Die Proben wurden hierfür zunächst mit PBS verdünnt und auf Pancoll-Trennlösung aufgebracht. Durch die anschließende Zentrifugation (20 Minuten, 800 g bei Raumtemperatur) wurden die Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte getrennt, sodass die Leukozytenschicht isoliert und in PBS pipettiert werden konnte (vgl. **Abbildung 5**).

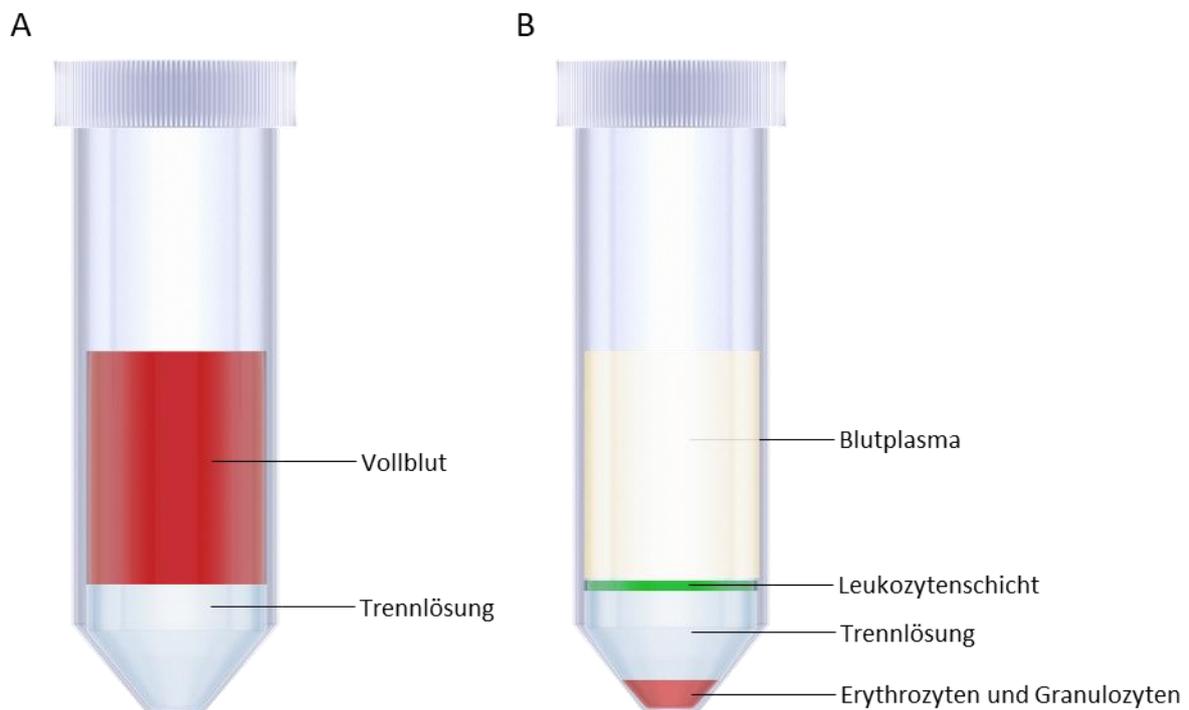


Abbildung 5: Auftrennung der Blutbestandteile mittels Pancoll-Trennlösung. Vollblut wurde auf Pancoll-Trennlösung aufgetragen (A) und anschließend für 20 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Dadurch trennten sich die Blutbestandteile (B), wodurch die Leukozyten (grün) isoliert werden konnten. Bild aus *Library of Science and Medical Illustrations* lizenziert unter CC BY-NC-SA 4.0 (<https://gumroad.com/l/library?wanted=true>). Abbildung erstellt von Franziska Fischer in Anlehnung an die Gebrauchsanweisung des Herstellers.

Es folgten drei Waschschrte mit PBS und jeweils Zentrifugation über 10 Minuten (300 g, Raumtemperatur), nach denen die PBMC gezählt wurden. Vor der Zählung mithilfe eines Zellzählers (ViCell®, Beckman-Coulter) wurden die Erythrozyten mittels VersaLyse lysiert.

Bei ausreichender Zellzahl ($\geq 15 \times 10^6$ PBMC) konnte anschließend eine Analyse der NK-Zellen aus frischem Zellmaterial durchgeführt werden. Die übrigen Zellen wurden zehn Minuten zentrifugiert (300 g, 4 °C), mit Einfriermedium verdünnt (1×10^6 PBMC/ ml) in *Kryotubes* transferiert und zunächst

stufenweise auf – 80 °C gekühlt. Nach spätestens 72 Stunden wurden die Proben schließlich in die Gasphase flüssigen Stickstoffs übertragen (vgl. Körber et al., 2021).

2.2.4 Durchflusszytometrie-basierte Analyse frischer Zellen: NK-Panel

Nach der Zellisolierung wurden die frischen PBMC zur Analyse der NK-Zellantwort verwendet. Hierfür wurden zunächst je 1×10^6 PBMC pro Spender:in auf eine 96-Loch Multititerplatte aufgetragen. Die PBMC wurden anschließend in FACS-Puffer gewaschen, für fünf Minuten zentrifugiert (560 g, 4 °C) und mit fluorochromkonjugierten Antikörpern in einem Volumen von insgesamt 80 µl gefärbt. Die PBMC wurden dann mit der Antikörpermischung bestehend aus CD3 PE-CF594, CD4 PE-CF594, CD16 Pacific Blue, CD56 PE-Cy7, CD57 APC, CD14 PE-Cy5, CD19 PE-Cy5, HLA-DR FITC, CD158 PerCP-Cy5.5, CD158b PE und CD158e1 BV711 für 30 Minuten auf Eis und unter Lichtabschluss inkubiert. Die Proben wurden anschließend erneut zentrifugiert (fünf Minuten 560 g, 4 °C) und zwei Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Unmittelbar vor der Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde den Proben *Hoechst* als Farbstoff zur lebend/tot-Diskriminierung hinzugefügt.

2.2.5 Auftauen und *Resting*

Die PBMC, die nicht direkt durchflusszytometrisch analysiert wurden, wurden wie in Abschnitt 2.3 beschrieben zunächst kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt zur Analyse der EBV-spezifischen T-Zellantwort verwendet. Die kryokonservierten Zellen wurden am Vortag der Versuchsdurchführung im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend tropfenweise in RPMI-10-Medium übertragen und zehn Minuten zentrifugiert (300 g bei Raumtemperatur). Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2 beschrieben gezählt, in einer Konzentration von 2×10^6 PBMC/ml in RPMI-10 resuspendiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor der nächtlichen Inkubation (*Resting*) lag der Anteil lebender PBMC im Median bei 98,8 % (min. 94,2 – max. 100,0 %) (vgl. Körber et al., 2021).

2.2.6 Durchflusszytometrie-basierte Analyse kryokonservierter Zellen: Effektor T-Zell Panel

2.2.6.1 *Ex vivo* Stimulation

Ein umfassendes Monitoring der T-Zellantwort auf EBV *in vitro*, stellt aufgrund der Komplexität der adaptiven Immunantwort eine Herausforderung dar. Die ausgewählten Stimulationsantigene sollten daher ein möglichst breites Antigenspektrum abdecken, um eine möglichst detaillierte Analyse der EBV-spezifischen T-Zellantwort zu ermöglichen. Hierfür wurden die T-*activated* Proteine BZLF1 und EBNA3A (im Folgenden kurz BZLF1 und EBNA3A) verwendet, die mittels einer speziellen Aktivierung sowohl über endogene als auch exogene Signalwege prozessiert werden und so eine CD4 und auch eine CD8 T-Zellantwort generieren können (Barabas et al., 2008). Außerdem erfolgte eine Stimulation mit Epstein-Barr-Virus-ähnlichen Partikeln (*Epstein-Barr-Virus-like particles*, EB-VLP), die durch

Johannes Mücke im Rahmen seiner Dissertation in der AG *Gene Vectors* des Helmholtz-Zentrums München (HMGU) produziert, aufgereinigt und quantifiziert wurden. Letztere enthalten EBV-Strukturantigene, die eine EBV-spezifische CD4 T-Zellantwort erzeugen, aber keine virale DNA enthalten und somit nicht infektiös sind (Adhikary et al., 2007; Adhikary, Behrends, Feederle, Delecluse, & Mautner, 2008; Linnerbauer et al., 2014).

Nach dem *Resting* wurden die PBMC erneut gewaschen, zentrifugiert (zehn Minuten, 300 g, Raumtemperatur) und gezählt. Nach dem *Resting* lag der Anteil lebender PBMC im Median bei 96,9 % (min. 93,3 – max. 100,0 %). Anschließend wurden je 1×10^6 PBMC in 200 μ l RPMI-10 Medium versetzt mit 1 μ g/ml des ko-stimulierenden Antigens CD28 auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert.

Die Proben wurden anschließend für sieben Stunden mit T-*activated* BZLF1 und in einer Konzentration von jeweils 10 μ g/ml und für 18 Stunden mit 50 μ l/ml EB-VLP (entsprechend $6,5 \times 10^5$ Viruskopien von wildtyp EBV/ml) bei 37 °C stimuliert. Zusätzlich wurde für jede Patient:innenprobe eine unstimulierte Probe als Negativkontrolle verwendet. Die letzten vier Stunden wurden 10 μ g/ml Brefeldin-A (BFA) zur Inhibition des Golgiapparates hinzugefügt. BFA verhinderte den retrograden Transport der Zytokine zum Endoplasmatischen Retikulum und damit deren Sekretion, sodass diese in der Zelle zurückgehalten wurden. So waren im Nachhinein die während der Stimulation gebildeten Zytokine in der Zelle nachweisbar. Die Reaktion wurde nach vier Stunden durch eine Inkubation bei 4 °C über Nacht gestoppt.

2.2.6.2 Färbung intrazellulärer Zytokine

Am nächsten Tag wurden die intrazellulären Zytokine mit Hilfe fluorchromkonjugierter Antikörper gefärbt. Zur Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen wurden die Proben zunächst mithilfe des *LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit* (NIR) in einem Gesamtvolumen von 50 μ l gefärbt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und nachfolgender Zentrifugation (fünf Minuten, 710 g, 4 °C) wurden die Zellen zunächst mittels des *Fixation & Permeabilization Buffer Set* fixiert und anschließend permeabilisiert, um die Anfärbung intrazellulärer Zytokine zu ermöglichen. Die Proben wurden nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis zwei Mal mit der im Set enthaltenen *Perm/Wash*-Lösung gewaschen. Schließlich wurden die Proben in einem Gesamtvolumen von 80 μ l mit der Mischung fluorchromkonjugierter Antikörper bestehend aus CD3 BV510, CD8 ECD, CD4 PerCP, IFN- γ Alexa 700, TNF eFluor 450 und IL-2 FITC gefärbt und 30 Minuten auf Eis und unter Lichtabschluss inkubiert. Nach der Inkubation wurden die PBMC zwei Mal gewaschen, zentrifugiert (fünf Minuten, 710 g, 4 °C) und im Anschluss mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.7 Datengewinnung und -interpretation

Alle Proben wurden mit dem Durchfluss-Zytometer LSRFortessa (BD) und der zugehörigen Software FACSDiva (Version 8.0.1, BD) gemessen. Im Rahmen jeder Messung wurde zunächst die Spannung der Photoelektronenvervielfacher (*Photomultiplier*-, bzw. PMT-Spannung) kalibriert und anschließend eine Kompensation erstellt, um Streueffekte zu minimieren. Die Datenauswertung erfolgte bei Proben mit jeweils mindestens 1×10^5 vitalen Lymphozyten mithilfe der Software FlowJo (Version 10, Treestar). Alle Analysen und die entsprechenden Rohdaten wurden auf Servern des HMGU gespeichert.

Zusätzlich zu den mit EBV-Antigenen stimulierten Proben wurde bei der Analyse EBV-spezifischer T-Zellen pro Patient:in eine unstimulierte Kontrollprobe gefärbt. So konnte für jede einzelne Patient:innenprobe eine mögliche unspezifische Zytokinexpression festgestellt werden. Dieser unspezifische ‚Hintergrund‘ wurde im Rahmen der Datenauswertung mithilfe der *Pestle*-Software (Version 2.0, NIH) von den Ergebnissen der stimulierten Patient:innenproben abgezogen. So wurde gewährleistet, dass die gemessene Gesamtzytokinexpression allein auf einer Stimulation durch EBV-Antigene beruhte (vgl. Körber et al., 2021). Für den Fall, dass sich durch eine hohe unspezifische Zytokinexpression in der unstimulierten Probe nach Abzug des Hintergrunds ein negativer Wert für die Gesamtzytokinexpression ergab, wurde zusätzlich ein unterer Detektions-Grenzwert definiert (Roederer, Nozzi, & Nason, 2011). Lag die Höhe der Gesamtzytokinexpression der stimulierten Patient:innenproben unterhalb dieses Grenzwertes, wurde diese als ‚Null‘ gewertet. Der hierbei verwendete Begriff ‚Gesamtzytokinexpression‘ umfasst die Summe aller CD4 bzw. CD8 T-Zellen, die für mindestens eines der Zytokine IFN- γ , TNF oder IL-2, bzw. einer Kombination der verschiedenen Zytokine positiv waren.

2.2.8 Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad) durchgeführt. Zur Testung des Signifikanzniveaus wurde für verbundene Stichproben der Wilcoxon-Test verwendet, für unverbundene der Mann-Whitney-Test. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde bei gepaarten Beobachtungen der Friedman-, bei ungepaarten der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Bei allen statistischen Tests wurde ein Konfidenzintervall von 95 % vorausgesetzt, p -Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Die angegebenen Korrelationen wurden nach Spearman berechnet, auch hier wurde ein Konfidenzintervall von 95 % angewandt. Ein sehr starker Zusammenhang wurde nach Cohen et al. als $r > 0,85$, ein starker Zusammenhang als $r = 0,65 - 0,85$, ein moderater Zusammenhang als $r = 0,35 - 0,65$ und ein schwacher Zusammenhang als $r = 0,20 - 0,35$ definiert (Cohen, Manion, & Morrison, 2018).

3 Ergebnisse

3.1 Patient:innenkohorte

Im Rahmen der Pilotphase der IMMUC-Studie wurden insgesamt 217 Proben von 94 Patient:innen isoliert und kryokonserviert. Von den initial asservierten Patient:innenproben wurden $n = 71$ Patient:innen und 151 Proben nach virologischer Bestätigung einer frischen EBV-Infektion in die Studie eingeschlossen.

Für meine Dissertation wurden die NK-Zellen und EBV-spezifischen T-Zellen aus peripherem Blut von insgesamt 31 Patient:innen mit Hilfe Durchflusszytometrie-basierter Verfahren an zwei Zeitpunkten untersucht. Die erste Blutentnahme erfolgte am Tag der Studienrekrutierung (v1), die zweite (v2) maximal acht Wochen nach Auftreten der ersten IM-typischen Symptome. Im Median wurden die Patient:innen 12 Tage nach Symptombeginn (v_{onset}) in die Studie eingeschlossen (min. 4 – max. 28 Tage). Der Kontrolltermin v2 erfolgte dann innerhalb von acht Wochen nach v_{onset} (Median 32 Tage, min. 24 – max. 52 Tage). Die Charakteristika der untersuchten Kohorte sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

Tabelle 2: Beschreibung der Patient:innenkohorte

A) Charakteristika der Patient:innenkohorte (n = 31)	
Alter	Median 15 (min. 3 – max. 31) Jahre
Weiblich	n = 15 (48,4 %)
Männlich	n = 16 (51,6 %)
B) Differenz in Tagen zwischen Symptombeginn (v_{onset}) und Studienzeitpunkten	
$\Delta v_{\text{onset}} - v1$	Median 12 (min. 4 – max. 28) Tage
$\Delta v_{\text{onset}} - v2$	Median 32 (min. 24 – max. 52) Tage
$\Delta v1 - v2$	Median 21 (min. 6 – max. 42) Tage
C) Untersuchte Zellpopulationen	
EBV-spezifische T-Zellen	n = 18 (58,0 %)
NK-Zellen	n = 30 (96,8 %)

Die Kohorte setzte sich aus 15 weiblichen und 16 männlichen Patient:innen zusammen, die zum Zeitpunkt der Rekrutierung im Median 15 Jahre alt waren (min. 3 – max. 31 Jahre). Von den 31 Patient:innen war von 30 ausreichend Zellmaterial asserviert worden, um eine Analyse der NK-Zellen durchzuführen. Bei 24 Patient:innen (80,0 %) erfolgte die NK-Zellanalyse an beiden Studienzeitpunkten, bei den übrigen sechs lagen entweder an v1 (zwei Patient:innen, 6,7 %) oder an v2 (vier Patient:innen, 13,4 %) die Zahlen der vitalen Lymphozyten unter dem unteren Grenzwert von 1×10^5 , weshalb die einzelnen Studienzeitpunkte ausgeschlossen wurden. Eine Analyse der EBV-

spezifischen T-Zellen erfolgte bei 18 Patient:innen an beiden Studienzeitpunkten. Hier wurde ebenfalls ein:e Patient:in ausgeschlossen, da an beiden Studienzeitpunkten nach dem Auftauen die vitalen Lymphozyten unterhalb des Grenzwertes lagen. Drei weitere Patient:innenproben konnten aufgrund technischer Probleme des Durchflusszytometers nicht verwendet werden. Von 22 Patient:innenproben an zwei Zeitpunkten, bei denen eine durchflusszytometrische Analyse kryokonservierter PBMC durchgeführt wurde, konnten dementsprechend 18 eingeschlossen werden. Von den insgesamt 71 Patient:innen, die während der Pilotphase in die IMMUC-Studie eingeschlossen wurden, wurden 24 Patient:innen nicht in die Kohorte eingeschlossen, da an einem oder beiden Studienzeitpunkten zu wenig Zellmaterial für eine durchflusszytometrische Analyse vorlag. Bei 16 Patient:innen lagen technische (Durchflusszytometer nicht funktionsfähig) oder organisatorische (fehlende Laborkapazität) Gründe vor, wegen derer eine Analyse der Patient:innenproben nicht erfolgen konnte.

3.2 Angeborene Immunantwort: NK-Zellen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Charakterisierung der NK-Zellantwort im Rahmen der frühen EBV-IM gezeigt. Zunächst werde ich auf die Frequenz der NK-Zellen und der verschiedenen NK-Subpopulationen eingehen. Ein besonderes Augenmerk werde ich darüber hinaus auf NK-Subpopulationen und Oberflächenmarker legen, welche in der Analyse Auffälligkeiten zeigten, bzw. deren gehäuftes Vorkommen im Rahmen akuter und chronischer Infektionen sowie bei Tumor- oder Autoimmunerkrankungen in der Literatur beschrieben wurde.

3.2.1 *Gating*-Strategie für die Durchflusszytometrie-basierte Analyse der NK-Zellen

Die *Gating*-Strategie für NK-Zellen ist in **Abbildung 6** am Beispiel einer Patient:innenprobe dargestellt. Zunächst wurden die Lymphozyten aufgrund ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (FSC, SSC) eingegrenzt. Dann wurden nacheinander Doubletten, apoptotische Lymphozyten, CD14- und/oder CD19-positive Lymphozyten und CD3- und/oder CD4-positive Lymphozyten ausgeschlossen. Bei der verbleibenden Zellpopulation wurde angenommen, dass es sich vorwiegend um NK-Zellen handelte. Diese Population wurde im nächsten Schritt in sechs verschiedene Subpopulationen je nach der Expression der Marker CD56 und CD16 eingeteilt. Zum einen erfolgte die Einteilung in CD16-positive bzw. negative Zellen, zum anderen in die Kategorien CD56^{bright} (starke Expression), CD56^{dim} (geringe Expression) oder CD56⁻ (keine Expression). Zellen, die negativ für beide Marker CD56 und CD16 waren, wurden nicht als NK-Zellen betrachtet und ausgeschlossen. Die verbleibenden fünf Subpopulationen wurden als NK-Zellen betrachtet.

Diese fünf NK-Subpopulationen wurden anschließend im Hinblick auf die Expression von CD57 und HLA-DR analysiert.

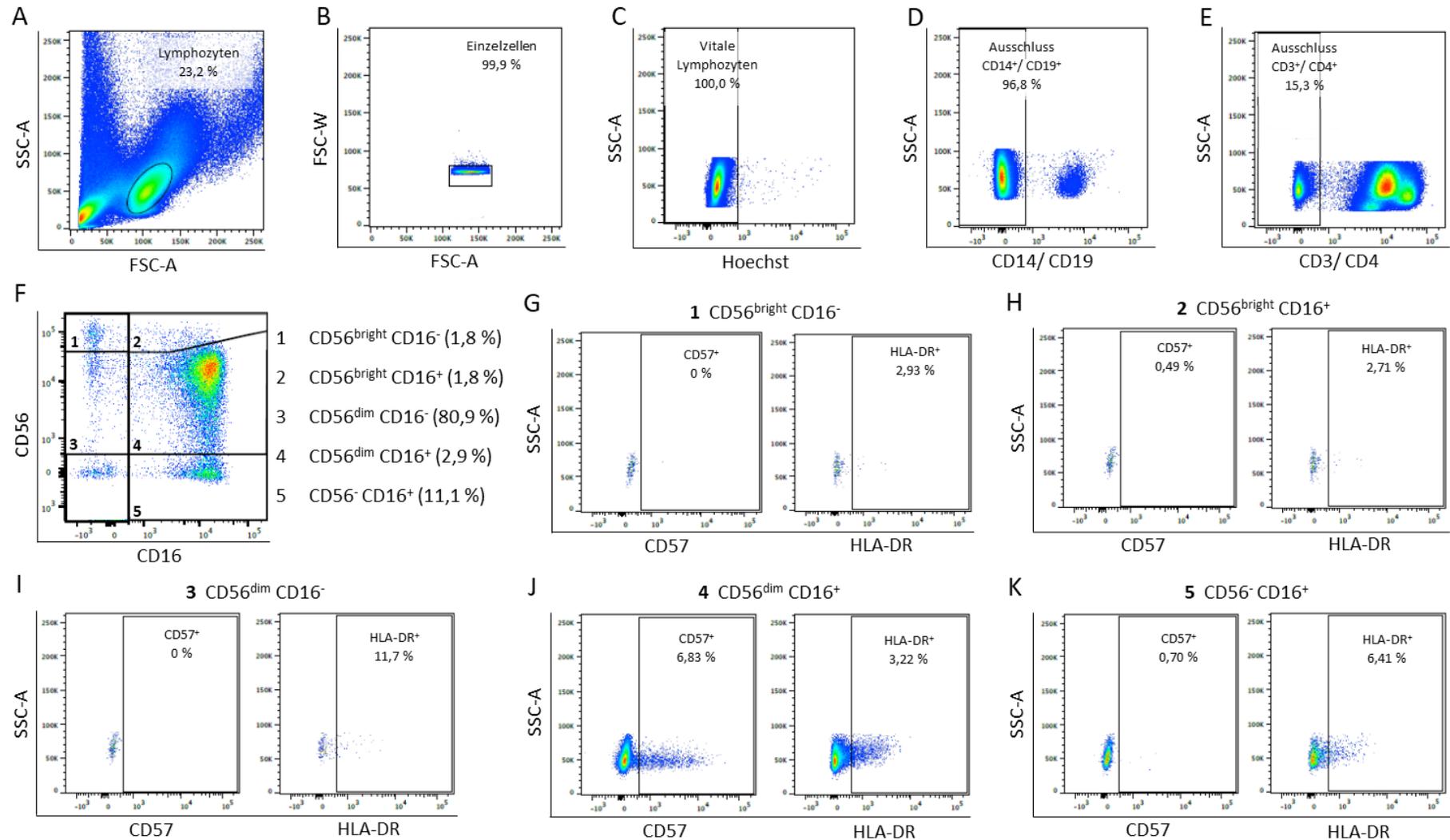


Abbildung 6: *Gating-Strategie für die Analyse von NK-Zellen.* Zunächst erfolgte die Identifikation der Lymphozyten aus PBMC (A). Anschließend wurden die NK-Zellen nach Ausschluss von Doubletten (B), apoptotischen (C), sowie CD14⁻/CD19⁻ (D) und CD3⁻/CD4⁻ (E) Zellen *gated*. Die NK-Zellen wurden anschließend basierend auf der Expression von CD56 und CD16 in 5 Subpopulationen eingeteilt (F 1-5). Jede der fünf Subpopulationen wurde im Anschluss im Hinblick auf die Expression der Marker CD57 (G-K, links) und HLA-DR (G-K, rechts) analysiert.

3.2.2 NK-Zellfrequenzen im Verlauf der frühen EBV-IM

Abbildung 7 zeigt die NK-Zellfrequenz im Verlauf der frühen EBV-IM. Es wird erkennbar, dass der relative Anteil der NK-Zellen von v1 (Median 9,9 %, min. 3,7 – max. 23,2 %) zu v2 (Median 9,6 %, min. 4,8 – max. 19,4 %) weitgehend stabil bleibt. **Abbildung 7B** zeigt die NK-Zellzahl pro μl Vollblut. Im Unterschied zum relativen Anteil der NK-Zellen verringerte sich die absolute NK-Zellzahl signifikant von im Median 111 $/\mu\text{l}$ an v1 (min. 6 – max. 521 $/\mu\text{l}$) auf im Median 61 $/\mu\text{l}$ an v2 (min. 6 – max. 266 $/\mu\text{l}$; $p = 0,0411$).

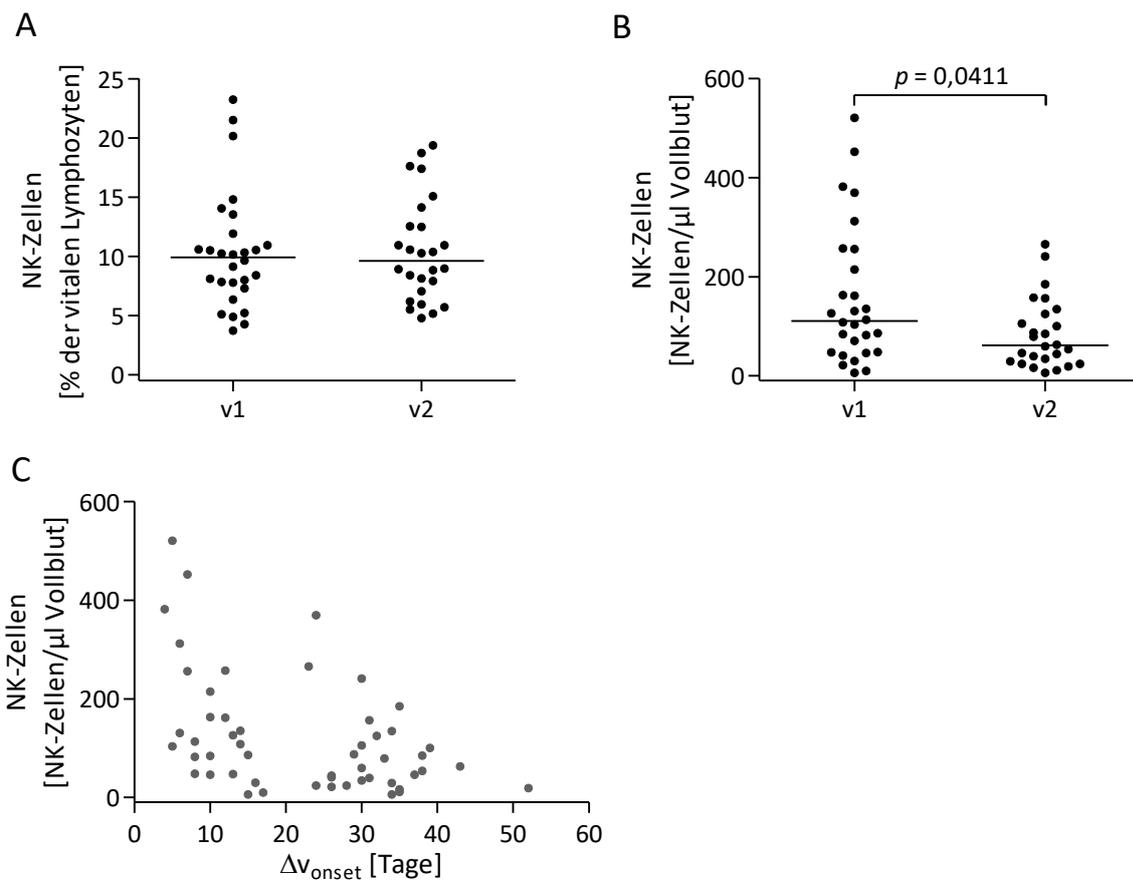


Abbildung 7: NK-Zellfrequenz im Verlauf der frühen EBV-IM. PBMC von EBV-IM-Patient:innen wurden an v1 ($n = 28$) und v2 ($n = 26$) isoliert und mittels Durchflusszytometrie-basierter Analyse der relative Anteil von NK-Zellen an den vitalen Lymphozyten bestimmt (A). Aus den so ermittelten Daten und der bei Isolierung bestimmten Lymphozytenzahl pro μl Vollblut wurde die NK-Zellzahl pro μl Vollblut an v1 und v2 berechnet (B) und in (C) im Zusammenhang mit dem zeitlichen Abstand in Tagen zum Symptombeginn (Δv_{onset}) dargestellt. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Zur statistischen Testung wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet.

In der Korrelationsanalyse fiel auf, dass die NK-Zellzahlen mit zunehmendem Abstand vom Symptombeginn abnahmen. Diese Korrelation war an v1 deutlich ausgeprägter als an v2 und an v1 statistisch signifikant (v1: $r = -0,6042$; $p = 0,0007$; v2: $r = -0,1556$; $p = 0,4577$; vgl. **Tabelle S1** im Anhang).

3.2.3 Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen während der frühen EBV-IM

Die NK-Zellen wurden anhand des Expressionslevels von CD56 und CD16 an der Zelloberfläche in fünf verschiedene Subpopulationen eingeteilt (vgl. **Abbildung 6**). In **Abbildung 8** sind jene NK-Zellsubpopulationen dargestellt, die CD56 stark exprimieren und daher zu den früheren NK-Zelldifferenzierungsstufen gezählt werden. Es wird ersichtlich, dass die CD56^{bright} CD16⁻ NK-Zellen von v1 zu v2 leicht zunahm. An v1 waren im Median 1,8 % der NK-Zellen CD56^{bright} CD16⁻ (min. 0,2 – max. 6,0 %), an v2 im Median 2,8 % (min. 0,9 – max. 12,7 %; $p = 0,0034$).

Auch die CD56^{bright} NK-Zellen, die CD16 auf der Zelloberfläche exprimierten machten an v1 und v2 etwa zwei Prozent der NK-Zellen während der frühen EBV-IM aus. Wie bei den CD56^{bright} CD16⁻ NK-Zellen nahm die Frequenz dieser Subpopulation im Median von v1 zu v2 leicht zu (v1: 1,8 %, min. 0,2 – max. 4,6 %; v2: 2,7 %, min. 0,9 – max. 6,9 %; $p = 0,0064$). Bei beiden Subpopulationen war die Änderung von v1 zu v2 statistisch signifikant.

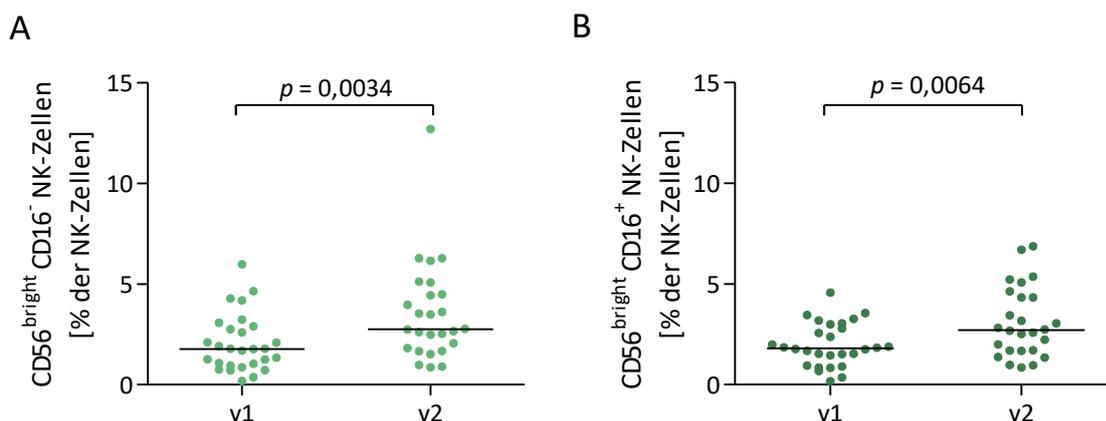


Abbildung 8: Frequenz von CD56^{bright} CD16⁻ (A) und CD56^{bright} CD16⁺ NK-Zellen (B) im Verlauf der frühen EBV-IM. Mittels Durchflusszytometrie-basierter Analyse wurde der Anteil CD56^{bright} CD16⁻ (A, hellgrün) und CD56^{bright} CD16⁺ (B, dunkelgrün) NK-Zellen an den NK-Zellen an v1 (n = 28) und v2 (n = 26) bestimmt. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Zur statistischen Testung wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet.

Da den CD56^{bright} NK-Zellsubpopulationen vor allem regulatorische Eigenschaften zugesprochen werden (vgl. Kapitel 1.4.1), wurde die Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen mit der Frequenz der EBV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen an v1 und v2 korreliert (**Tabelle 3**). An v1 zeigte sich nach Stimulation mit EBNA3A und EB-VLP eine statistisch signifikante, moderat negative Korrelation zwischen den EBV-spezifischen CD8 T-Zellen und den CD56^{bright} CD16⁻ NK-Zellen. An v2 war dieser Effekt nicht mehr feststellbar. Ähnlich verhielt es sich auch bei den CD56^{bright} CD16⁺ NK-Zellen, allerdings waren diese Korrelationen nicht statistisch signifikant. Zur Frequenz der CD4 T-Zellen bestand lediglich ein geringer Zusammenhang, der nicht statistisch signifikant war.

Tabelle 3: Korrelation der CD56^{bright} NK-Zellen zur Frequenz der EBV-spezifischen CD4- und CD8-T-Zellen

Spearman-Korrelation	CD56 ^{bright} CD16 ⁻ NK-Zellen			
	v1		v2	
T-Zellen [% der CD3 ⁺ T-Zellen]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4 BZLF1	-0,1996	0,4587	0,0432	0,8739
CD8 BZLF1	0,0875	0,7473	-0,0326	0,9046
CD4 EBNA3A	-0,2974	0,2633	0,3188	0,2288
CD8 EBNA3A	-0,5769	0,0193*	-0,2653	0,3207
CD4 EB-VLP	-0,1756	0,5153	-0,0209	0,9388
CD8 EB-VLP	-0,6681	0,0047**	0,1588	0,5569
Spearman-Korrelation	CD56 ^{bright} CD16 ⁺ NK-Zellen			
	v1		v2	
T-Zellen [% der CD3 ⁺ T-Zellen]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4 BZLF1	-0,2487	0,3530	0,2547	0,3410
CD8 BZLF1	0,2787	0,2959	-0,0452	0,8679
CD4 EBNA3A	-0,2062	0,4437	0,0358	0,8954
CD8 EBNA3A	-0,4840	0,1163	-0,1843	0,4944
CD4 EB-VLP	-0,0959	0,7237	-0,1120	0,6795
CD8 EB-VLP	-0,4930	0,0523	0,0986	0,7164

r = Spearman *r*; * = *p* < 0,05; ** = *p* < 0,01

3.2.4 Frequenz der CD56^{dim} NK-Zellen und Expression von CD57 im Verlauf der frühen EBV-IM

Als nächstes wurde der Anteil der CD56^{dim} NK-Zellen, die als späteres Differenzierungsstadium von NK-Zellen gelten, im Verlauf der frühen EBV-IM betrachtet. Diese lassen sich auf Basis ihrer Expression von CD16 weiter einteilen. Typischerweise exprimieren CD56^{dim} NK-Zellen auch CD16. CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen wurden als ‚unkonventionelle‘ NK-Zellen bezeichnet (Mamessier et al., 2013) und leiten sich möglicherweise von CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen ab.

Die CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen machten im Median einen Anteil von etwa zwei Prozent der NK-Zellen aus und entsprachen in der Frequenz dementsprechend jeweils etwa dem Anteil der CD56^{bright} CD16⁺ bzw. CD16⁻ NK-Zellen (**Abbildung 9**; vgl. Kapitel 3.2.3). Die CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen nahmen im Gegensatz zu den CD56^{bright} NK-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM signifikant ab (*p* = 0,0003). An v1 wiesen im Median 2,2 % diesen Phänotyp auf (min. 0,3 – max. 6,3 %), an v2 im Median nur noch 1,5 % (min. 0,5 – max. 5,8 %).

Die CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen blieben im Verlauf der frühen EBV-IM in ihrer Frequenz weitgehend konstant. Im Median waren an v1 79,0 % der NK-Zellen CD56^{dim} CD16⁺ (min. 36,8 – max. 88,6 %), an v2 77,2 % (min. 51,2 – max. 86,4 %). Damit machten sie den weitaus größten Anteil an den NK-Zellen im peripheren Blut in der untersuchten Kohorte aus.

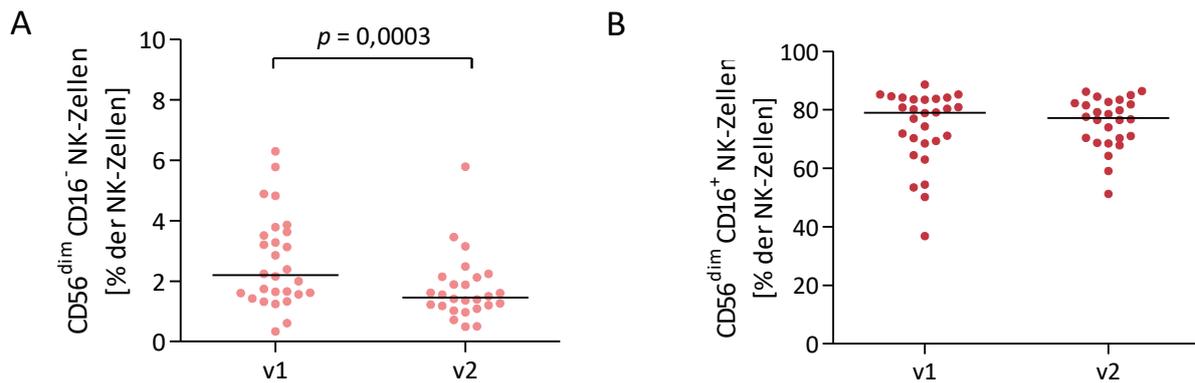


Abbildung 9: Frequenz von CD56^{dim} CD16⁻ und CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM. Mittels Durchflusszytometrie-basierter Analyse wurden die Frequenzen CD56^{dim} CD16⁻ (A) und CD56^{dim} CD16⁺ (B) NK-Zellen an v1 (n = 28) und v2 (n = 26) bestimmt. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Zur statistischen Testung wurde der Wilcoxon Test für verbundene Stichproben verwendet.

Zur weiteren Charakterisierung wurde anschließend die Expression von CD57 untersucht, einem Marker, der die terminale Differenzierung von NK-Zellen kennzeichnet. In **Abbildung 10** ist der Anteil CD57 exprimierender Zellen an den beiden zuvor beschriebenen NK-Subpopulationen dargestellt.

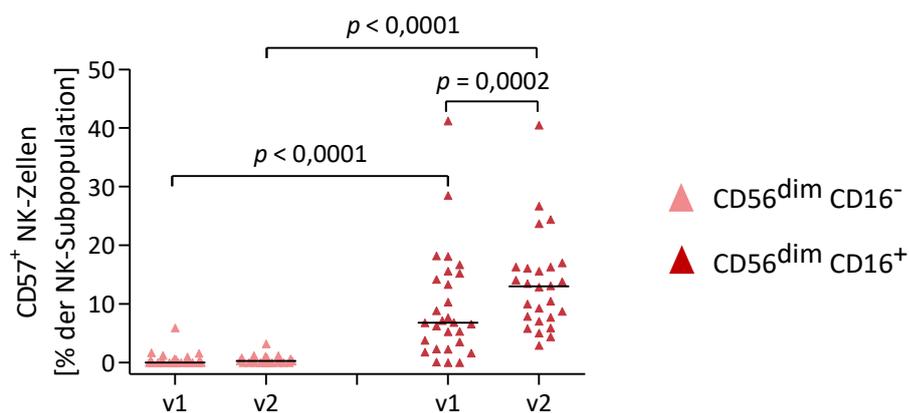


Abbildung 10: Anteil CD57⁺ NK-Zellen an CD56^{dim} CD16⁻ und CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM. Mittels Durchflusszytometrie-basierter Analyse wurde der Anteil CD57 exprimierender Zellen an den CD56^{dim} CD16⁻ (hellrot) und CD56^{dim} CD16⁺ (dunkelrot) NK-Zellen an v1 (n = 28) und v2 (n = 26) ermittelt. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Zur statistischen Testung wurde der Wilcoxon-Test für verbundene und der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Auf den CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen wurde CD57 nicht oder nur gering exprimiert (Median v1: 0,0 %; min. 0,0 – max. 5,9 %; Median v2: 0,2 %; min. 0,0 – max. 3,2 %). Auf einem Teil der CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen war an v1 CD57 auf der Zelloberfläche nachweisbar. Die Expression nahm im Verlauf der frühen EBV-IM von im Median 6,8 % CD57-positiver CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen an v1 (min. 0,0 – max. 41,2 %) auf im Median 13,0 % an v2 zu (min. 2,9 – max. 40,5 %; $p = 0,0002$). Der deutliche Unterschied in der CD57-Expression der beiden NK-Subpopulationen war an beiden Studienzeitpunkten statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

3.2.5 Frequenz von CD56-negativen NK-Zellen und ihre Expression von CD57 im Verlauf der frühen EBV-IM

Bei der Analyse der unterschiedlichen NK-Subpopulationen fiel eine CD56⁻ NK-Subpopulation auf, die während der frühen EBV-IM nach den CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen den zweitgrößten Anteil der NK-Zellen ausmachte. Die Frequenz dieser CD56⁻ Zellen ist in **Abbildung 11** an v1 und v2 dargestellt. Im Median waren an v1 7,5 % (min. 1,3 – max. 27,0 %) der NK-Zellen CD56⁻ CD16⁺ und an v2 6,3 % (min. 1,0 – max. 24,2 %). Diese Abnahme von v1 zu v2 war statistisch signifikant, ($p < 0,0001$), die Differenz der Medianwerte allerdings gering.

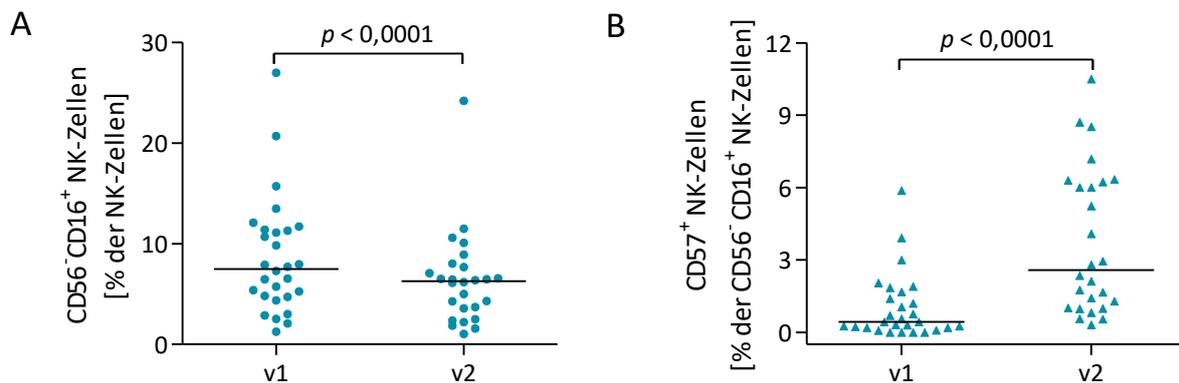


Abbildung 11: Frequenz der CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen und Expression von CD57 an v1 und v2. Mittels Durchflusszytometrie-basierter Analysen wurde die Frequenz der CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen an v1 (n = 28) und v2 (n = 26) bestimmt (A). Anschließend wurden diese hinsichtlich der Expression von CD57 an v1 und v2 analysiert (B). Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Die statistische Testung erfolgte mittels Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben.

Anschließend wurden die CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CD57 analysiert. Hier fiel auf, dass an v1 nur ein geringer Anteil CD57 exprimiert (Median v1 0,4 %; min. 0,0 – max. 5,9 %). An v2 kam es dann zu einer signifikanten Zunahme des Anteils CD57-positiver Zellen ($p < 0,0001$). Im Median waren an v2 2,6 % CD57⁺, wobei einzelne Patient:innen eine Frequenz CD56⁻ CD16⁺ CD57⁺ Zellen von bis zu 10,5 % aufwiesen (min. 0,3 %).

3.2.6 Expression von HLA-DR auf den NK-Subpopulationen im Verlauf der frühen EBV-IM

Die fünf bereits zuvor beschriebenen NK-Subpopulationen wurden zusätzlich auf die Expression von HLA-DR hin untersucht. In **Abbildung 12** wird erkennbar, dass sich das Expressionslevel innerhalb der einzelnen Subpopulationen mitunter deutlich unterschied. Der größte Anteil HLA-DR exprimierender Zellen fand sich innerhalb der CD56^{dim} CD16⁻ NK-Subpopulation. An v1 exprimierten im Median 11,4 % der CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen HLA-DR (min. 2,4 – max. 68,2 %). An v2 nahm der Anteil signifikant ab ($p = 0,0008$) auf im Median 4,5 % (min. 0,5 – max. 28,3 %).

Auch die CD56⁻ CD16⁺ Zellen zeigten einen deutlichen Anteil an HLA-DR exprimierenden Zellen und auch hier kam es von v1 zu v2 zu einer signifikanten Reduktion der HLA-DR exprimierenden CD56⁻

CD16⁺ NK-Zellen ($p = 0,0170$). So exprimierten an v1 im Median 5,4 % HLA-DR (min. 0,9 – max. 39,7 %), an v2 noch etwa die Hälfte (Median: 2,1 %; min. 0,1 – max. 25,4 %).

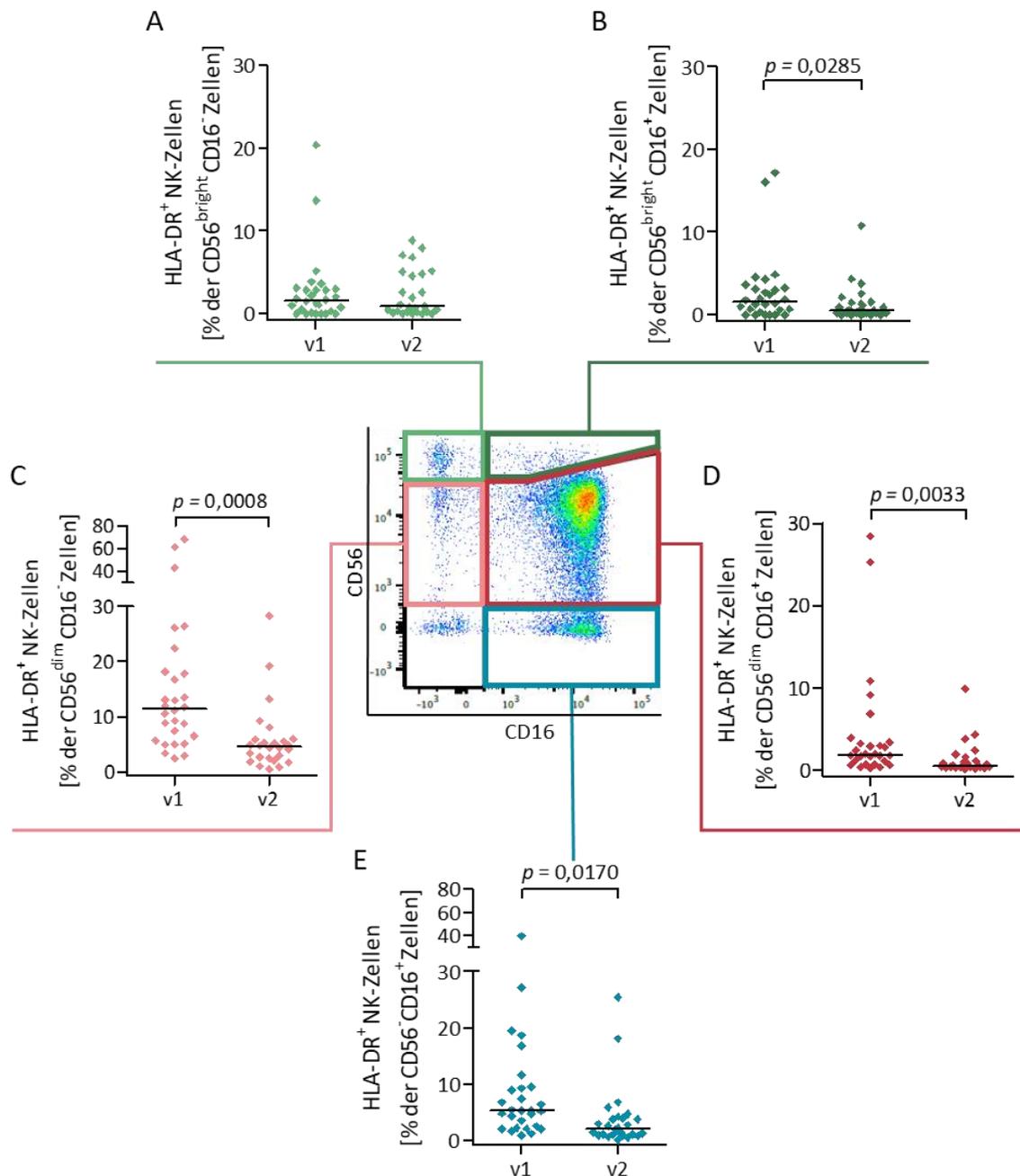


Abbildung 12: Expression von HLA-DR auf den verschiedenen NK-Zell-Subpopulationen an v1 und v2. Mittels Durchflusszytometrie-basierter Analyse wurde der Anteil HLA-DR exprimierender Zellen an den CD56^{bright} CD16⁻ (A), CD56^{bright} CD16⁺ (B), CD56^{dim} CD16⁻ (C), CD56^{dim} CD16⁺ (D) und an den CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen (E) an v1 (n = 28) und v2 (n = 26) bestimmt. Das Durchflusszytometrie-Diagramm zeigt exemplarisch ein *Gating* der entsprechenden NK-Subpopulationen. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Zur statistischen Testung wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet.

In den übrigen Subpopulationen lag der Anteil HLA-DR exprimierender Zellen auf einem Niveau von im Median ca. 2 % an v1 (CD56^{bright} CD16⁻: 1,6 %; min. 0,0 – max. 20,4 %; CD56^{bright} CD16⁺: 1,6 %; min. 0,0

– max. 17,2 %; CD56^{dim} CD16⁺: 1,9 %; min. 0,2 – max. 28,4 %). Hier ließ sich ebenfalls ein Abfall HLA-DR exprimierender Zellen im Verlauf der frühen IM feststellen (v2: CD56^{bright} CD16⁻: 0,9 %; min. 0,0 – max. 8,9 %; CD56^{bright} CD16⁺: 0,6 %; min. 0,0 – max. 10,8 %; CD56^{dim} CD16⁺: 0,5 %; in. 0,1 – max. 9,9 %). Im Falle der CD56^{bright} CD16⁺ und der CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen war dieser statistisch signifikant (CD56^{bright} CD16⁺: $p = 0,0285$; CD56^{dim} CD16⁺: $p = 0,0033$).

Anschließend wurden die HLA-DR exprimierenden CD56^{dim} CD16⁻ und CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen zur Frequenz der EBV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen korreliert (**Tabelle 4**). Es fiel auf, dass unabhängig von dem Stimulationsantigen die Frequenz der EBV-spezifischen CD4 T-Zellen an v1 moderat negativ, die Frequenz der EBV-spezifischen CD8 T-Zellen dagegen nicht, bzw. nur im Falle der mit EB-VLP stimulierten CD8 T-Zellen moderat positiv mit den CD56^{dim} CD16⁻ HLA-DR⁺ NK-Zellen korrelierte. Etwas schwächer ausgeprägt, aber von der Tendenz ähnlich verhielt es sich bei den CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen. Auffällig war außerdem, dass an v2 dagegen die HLA-DR⁺ CD56^{dim} CD16⁻ und die CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen positiv mit der Frequenz der CD4 und CD8 T-Zellen korrelierten. Ein Zusammenhang der bei Korrelation der CD56^{dim} CD16⁻ HLA-DR⁺ NK-Zellen sowohl mit CD4 als auch mit CD8 T-Zellen statistisch signifikant war.

Tabelle 4: Korrelation der HLA-DR⁺ CD56^{dim} CD16⁻ und CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen mit der Frequenz der EBV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen

Spearman-Korrelation	CD56 ^{dim} CD16 ⁻ HLA-DR ⁺ NK-Zellen			
	v1		v2	
T-Zellen [% der CD3 ⁺ T-Zellen]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4 BZLF1	-0,4974	0,0500*	0,2502	0,3499
CD8 BZLF1	-0,2593	0,3322	0,0519	0,8487
CD4 EBNA3A	-0,1369	0,6132	0,2840	0,2864
CD8 EBNA3A	-0,0454	0,8675	0,0946	0,7274
CD4 EB-VLP	-0,1181	0,6632	0,5015	0,0478*
CD8 EB-VLP	0,3826	0,1435	0,5000	0,0486*
Spearman-Korrelation	CD56 ⁻ CD16 ⁺ HLA-DR ⁺ NK-Zellen			
	v1		v2	
T-Zellen [% der CD3 ⁺ T-Zellen]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4 BZLF1	-0,2978	0,2626	0,4185	0,1067
CD8 BZLF1	-0,2236	0,4051	-0,1363	0,6147
CD4 EBNA3A	-0,0169	0,9505	0,2608	0,3292
CD8 EBNA3A	-0,2139	0,4263	0,0254	0,9258
CD4 EB-VLP	0,1387	0,6083	0,3314	0,2099
CD8 EB-VLP	0,2929	0,2710	0,2676	0,3163

r = Spearman r ; * = $p < 0,05$

3.2.7 Korrelationen der NK-Zellantwort zu klinischen und virologischen Parametern während der frühen EBV-IM

Zusätzlich zu den mittels Durchflusszytometrie-basierten Analysen generierten Daten wurden von den Patient:innen an beiden Studienzeitpunkten klinische und virologische Daten erhoben. In diesem Abschnitt sollen die klinischen Parameter Alter und der Abstand in Tagen zwischen dem Beginn der IM-typischen Symptome und der Blutentnahme (Δv_{onset}) zu den erhobenen NK-Zellparametern korreliert werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur relevante Korrelationen gezeigt, die vollständigen Korrelationen befinden sich in **Tabelle S1** im Anhang.

Tabelle 5: Korrelationen ausgewählter NK-Zellparameter mit Δv_{onset} und Alter der Patient:innen

Spearman-Korrelation	Δv_{onset} [Tage]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	-0,3950	0,0375*	0,2773	0,1702
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁻]	-0,3772	0,0479*	-0,0216	0,9166
Alter [Jahre]				
NK-Zellfrequenz [NK/ μ l Vollblut]	-0,3731	0,0505	-0,1982	0,3423
CD56 ⁻ CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	-0,5750	0,0014**	-0,5356	0,0048**
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁻]	-0,1476	0,4534	-0,4454	0,0226*
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	-0,1942	0,3222	-0,4126	0,0362*

r = Spearman *r*; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$

In der Korrelationsanalyse fiel auf, dass die Populationen der HLA-DR⁺ CD56^{bright} CD16⁺ und CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen mit zunehmendem Abstand vom Symptombeginn abnahmen. Diese Korrelation war an v1 ausgeprägter als an v2 und statistisch signifikant.

Das Alter der Patient:innen korrelierte moderat negativ mit der absoluten NK-Zellzahl an v1, allerdings ohne statistische Signifikanz. Außerdem bestand zum einen eine Korrelation zwischen Alter und dem Anteil CD56⁻ CD16⁺ Zellen, die an v1 und v2 ähnlich stark ausgeprägt und statistisch signifikant war. Zum anderen sieht man in **Tabelle 5** an v2 eine moderate negative Korrelation zwischen dem Alter und dem Anteil der HLA-DR positiven CD56^{bright} CD16⁻ und CD56^{bright} CD16⁺ NK-Zellen. Diese Korrelation war an v1 allerdings nicht vorhanden. Auch bei den anderen NK-Subpopulationen und der NK-Zellfrequenz bestand kein Zusammenhang zwischen Alter und Frequenz der untersuchten Populationen (vgl. **Tabelle S1**).

3.3 Erworbene Immunantwort: EBV-spezifische T-Zellen

Zusätzlich zu der angeborenen Immunantwort wurde im Rahmen der Dissertation auch die erworbene Immunantwort in der frühen Phase der EBV-IM innerhalb der IMMUC-Pilotkohorte untersucht. Hierzu wurde die CD4 und CD8 T-Zellantwort mit Hilfe Durchflusszytometrie-basierter Methoden analysiert. Um ein möglichst breites Spektrum der EBV-spezifischen T-Zellimmunität abzubilden, wurden die T-Zellen mit drei verschiedenen EBV-Antigenen stimuliert. Zum einen mit EB-VLP, zum anderen mit den T-activated EBV-Proteinen BZLF1 und EBNA3A. Die CD4 und CD8 T-Zellen wurden nach der Stimulation mit den eben genannten Antigenen auf die Expression von IFN- γ , TNF und IL-2 untersucht.

3.3.1 Gating-Strategie für die Durchflusszytometrie-basierte Analyse EBV-spezifischer T-Zellen

In **Abbildung 13** ist, exemplarisch anhand einer Patient:innenprobe, die *Gating*-Strategie für die Analyse EBV-spezifischer T-Zellen dargestellt. Zunächst wurden die Lymphozyten erfasst. Im Anschluss wurden apoptotische Lymphozyten und Zell-Doubletten ausgeschlossen. Zur Identifikation der T-Zellen wurden erst CD3-positive Zellen selektiert, die anschließend in CD4- und CD8-positive T-Zellen eingeteilt wurden.

Zur Analyse der Effektor T-Zellen wurden von jede:r Patient:in an zwei Zeitpunkten PBMC isoliert, zunächst bei Registrierung für die IMMUC-Studie (v1) und ein zweites Mal innerhalb von acht Wochen nach Symptombeginn der akuten EBV-IM (v2). Um eine gleichzeitige Messung beider Studienzeitpunkte zu ermöglichen, wurden die PBMC nach der Isolation zu den Zeitpunkten v1 und v2 kryokonserviert und in der Gasphase flüssigen Stickstoffs bis zur Verwendung gelagert. Nach dem Auftauen und einer *Resting*-Phase über Nacht folgte die Stimulation mit BZLF1, EBNA3A und EB-VLP. Im Anschluss wurden die PBMC mit gegen T-Zell-spezifische Marker gerichteten fluorochromkonjugierten Antikörpern gefärbt.

Zur Analyse der Funktionalität EBV-spezifischer T-Zellen wurden die zuvor permeabilisierten PBMC mit fluorochromkonjugierten Antikörpern gegen intrazelluläre Zytokine gefärbt. So konnten sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen in Hinblick auf die Expression von IFN- γ , TNF und IL-2 analysiert werden. Durch die so ermittelten Daten für die einzelnen Zytokine wurde anschließend in der FlowJo-Software mit Hilfe eines Boolean-*Gatings* die Funktionalität EBV-spezifischer T-Zellen bestimmt. Die in **Abbildung 13** dargestellte, von mir erstellte *Gating*-Strategie für EBV-spezifische T-Zellen wird ebenfalls in der Publikation „*Evaluation of novel Epstein-Barr virus-derived antigen formulations for monitoring virus-specific T cells in pediatric patients with infectious mononucleosis.*“ gezeigt. Mit freundlicher Genehmigung der beteiligten Koautoren und des Verlags.

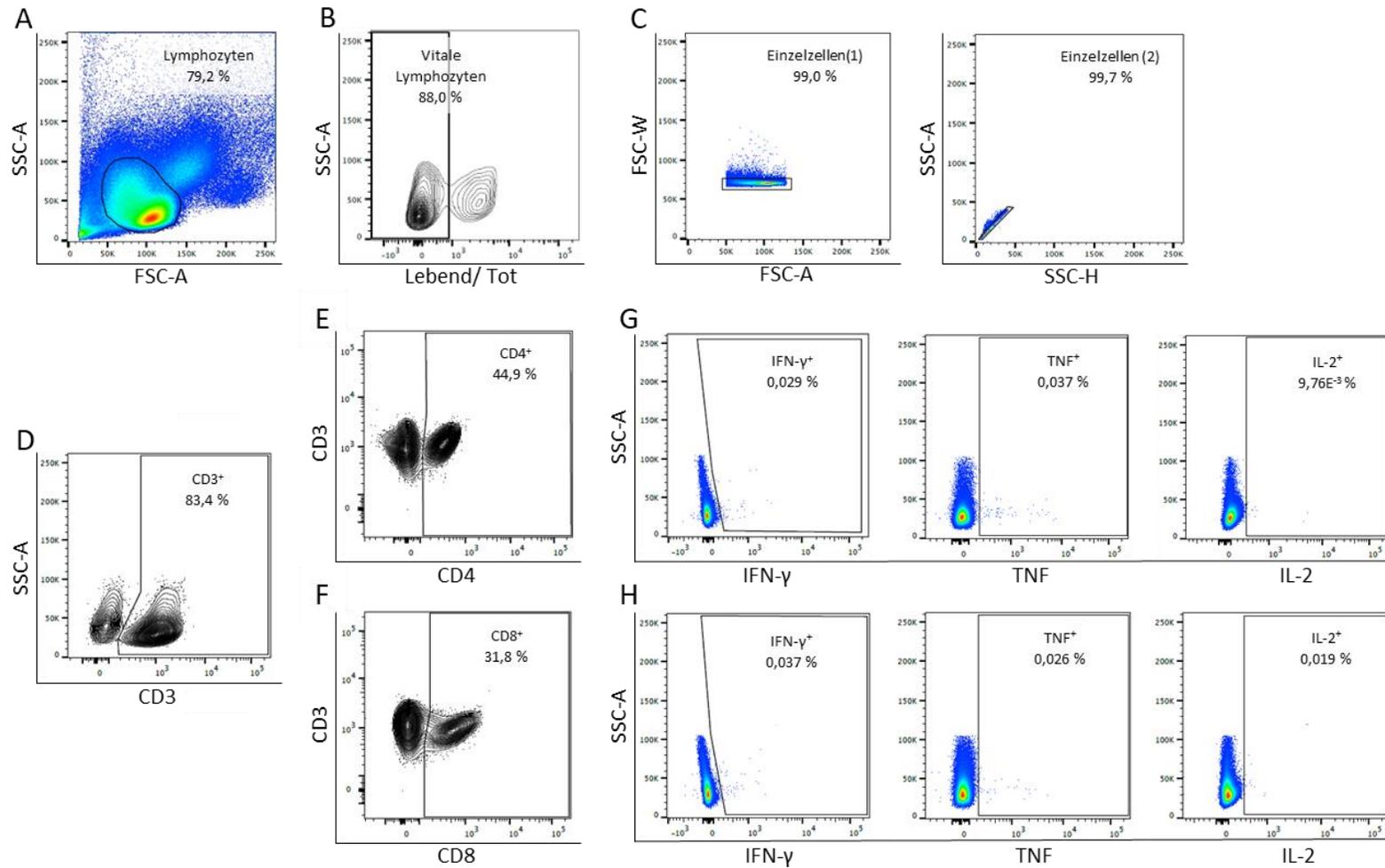


Abbildung 13: *Gating-Strategie für die Analyse EBV-spezifischer T-Zellen.* Zunächst erfolgte die Identifikation der Lymphozyten aus PBMC von IM-Patient:innen (A). Nachdem auf die lebenden Lymphozyten *gated* (B), sowie Doubletten (C) exkludiert wurden, wurde auf CD3-positive Lymphozyten *gated* (D). Aus dieser Population wurden jeweils die CD4 (E) und CD8 T-Zellen (F) identifiziert und auf die intrazellulären Zytokine IFN- γ , TNF und IL-2 *gated* (G und H, von links nach rechts).

3.3.2 Frequenz EBV-spezifischer T-Zellen und Verhältnis der CD4 und CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM

Abbildung 14 zeigt beispielhaft anhand der mit BZLF1 stimulierten Proben den Anteil an CD3, CD4 und CD8 T-Zellen, sowie das Verhältnis der CD4/CD8 T-Zellen bei 18 EBV-IM-Patient:innen an v1 und v2. In **Tabelle S2** im Anhang sind die Angaben zu den mit EBNA3A und der mit EB-VLP-stimulierten Proben sowie der unstimulierten Kontrolle angegeben. Zwischen den Proben zeigte sich kein signifikanter Unterschied (mittlere Standardabweichung: CD3: 1,2 %, CD4: 1,9 %, CD8: 2,0 %).

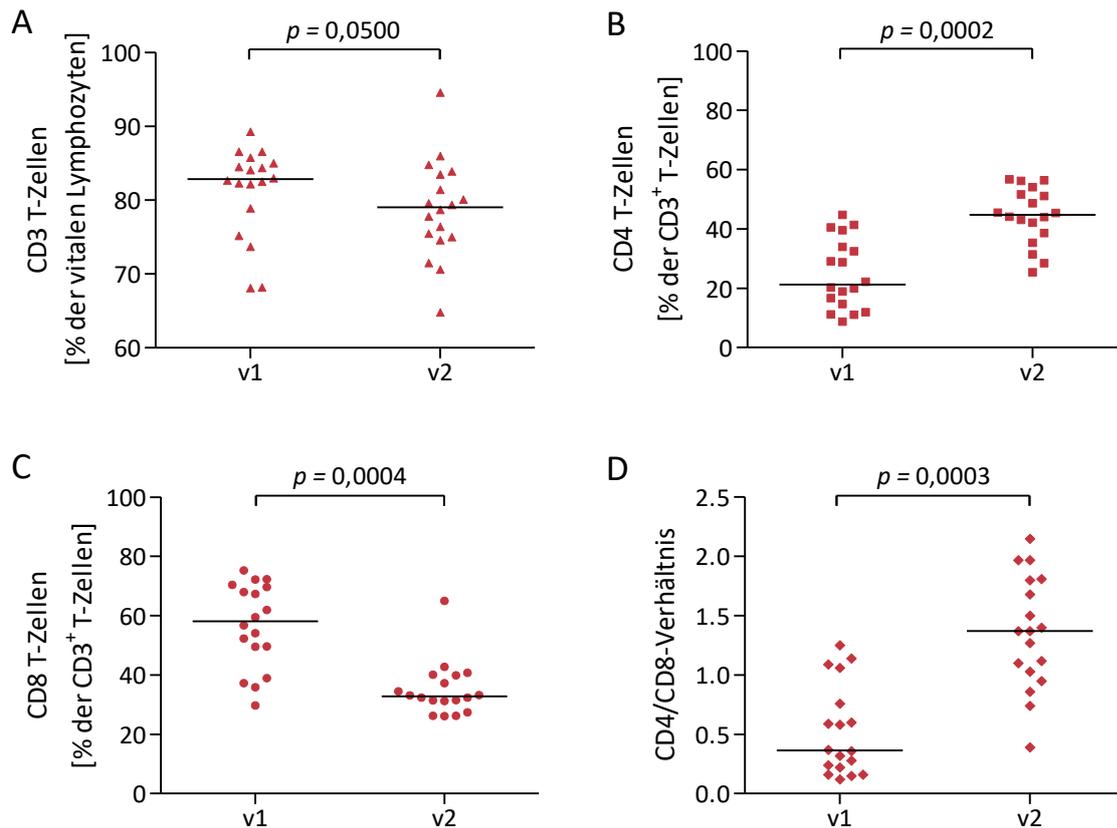


Abbildung 14: Frequenz EBV-spezifischer CD3, CD4 und CD8 T-Zellen sowie CD4/CD8-Verhältnis im Verlauf der frühen EBV-IM. PBMC von EBV-IM-Patient:innen (n = 18) wurden an v1 und v2 isoliert und kryokonserviert. Nach Auftauen und *Resting* erfolgte die Stimulation mit BZLF1. Mittels Durchflusszytometrie-basierter Analyse wurde anschließend der Anteil von CD3 T-Zellen (A) an den lebenden Lymphozyten bestimmt. Im Anschluss wurde der Anteil der CD4 (B) bzw. CD8 T-Zellen (C) an den CD3 T-Zellen ermittelt. Dargestellt ist der Anteil der CD4 bzw. CD8 T-Zellen nach Stimulation mit BZLF1 pro Patient:in und Studienzeitpunkt. In (D) ist das CD4/CD8-Verhältnis an v1 und v2 dargestellt. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Zur statistischen Testung wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet.

Bei Betrachtung des Anteils der CD3 T-Zellen an den vitalen Lymphozyten zeigte sich eine signifikante Abnahme von v1 zu v2 ($p = 0,0500$) von 82,9 % im Median an v1 (min. 68,1 – max. 86,6 %) auf 79,1 % an v2 (min. 64,8 – max. 94,6 %).

Betrachtete man den Anteil der CD4 und CD8 T-Zellen an den CD3-positiven Zellen im Vergleich von v1 und v2 fiel eine gegenläufige Dynamik der beiden Zellpopulationen auf. Während der Anteil CD4 T-Zellen im Verlauf signifikant zunahm ($p = 0,0002$), kam es bei den CD8 T-Zellen zu einer signifikanten Abnahme von v1 zu v2 ($p = 0,0004$). Der Anteil der CD4 T-Zellen verdoppelte sich im Median nahezu von 21,3 % (min. 8,8 – max. 44,8 %) an v1 auf 44,8% (min. 25,4 – max. 56,7 %) an v2. Dagegen sank der Anteil der CD8 T-Zellen im Median von 58,1 % (min. 29,7 – max. 75,3 %) an v1 auf 32,75 % (min. 26,1 – max. 65,0 %) an v2.

Das Verhältnis der CD4 zu den CD8 T-Zellen nahm von v1 zu v2 signifikant zu ($p = 0,0003$). Im Median zeigte sich eine deutliche Zunahme von 0,4 (min. 0,1 – max. 1,3) an v1 auf 1,4 (min. 0,4 – max. 2,2) an v2.

3.3.3 Gesamtzytokinexpression EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM

Um die Gesamtzytokinexpression der EBV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen zu charakterisieren, wurden diese mittels Durchflusszytometrie-basierter Analyse auf die Expression von IFN- γ , TNF, und IL-2 untersucht. **Abbildung 15** zeigt die Gesamtzytokinexpression der CD4 und CD8 T-Zellen bei 18 EBV-IM-Patient:innen nach Stimulation mit BZLF1, EBNA3A und EB-VLP an v1 und v2.

Es wird ersichtlich, dass die Zahl BZLF1-reaktiver CD4 T-Zellen von v1 zu v2 weitestgehend stabil blieb ($p = 0,9097$). Der Median änderte sich von 0,01 % an v1 (min. 0,0 – max. 0,2 %) kaum (0,0 % an v2, min. 0,0 – max. 4,2 %). Allerdings wiesen vereinzelte Patient:innen an v2 eine deutlich höhere Gesamtzytokinexpression nach Stimulation mit BZLF1, verglichen zu v1 auf. Im Falle der BZLF1-reaktiven CD8 T-Zellen hingegen kam es im Verlauf von v1 zu v2 zu einem signifikanten Anstieg ($p = 0,0040$). Die Gesamtzytokinexpression nahm im Median moderat von 0,0 % (min. 0,0 – max. 0,4 %) an v1 auf 0,1 % (min. 0,0 – max. 5,0 %) an v2 zu.

Nach Stimulation mit EBNA3A war nur bei einzelnen Patient:innen eine deutliche CD4 T-Zellantwort erkennbar (Median v1 0,0 %; min. 0,0 – max. 0,1 %; Median v2 0,0 %; min. 0,0 – max. 4,3 %, $p = 0,4688$). Bei den vereinzelten Patient:innen, die reaktive T-Zellen aufwiesen, war die Tendenz der Gesamtzytokinexpression von v1 zu v2 zunehmend. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei Betrachtung der Gesamtzytokinexpression der CD8 T-Zellen ab. Auch hier blieb die Gesamtzytokinexpression im Verlauf niedrig ohne eine statistisch signifikante Änderung von v1 zu v2 (Median v1: 0,0 %, min. 0,0 – max. 0,1 %; v2: 0,0 %, min. 0,0 – max. 4,7 %, $p = 0,8311$).

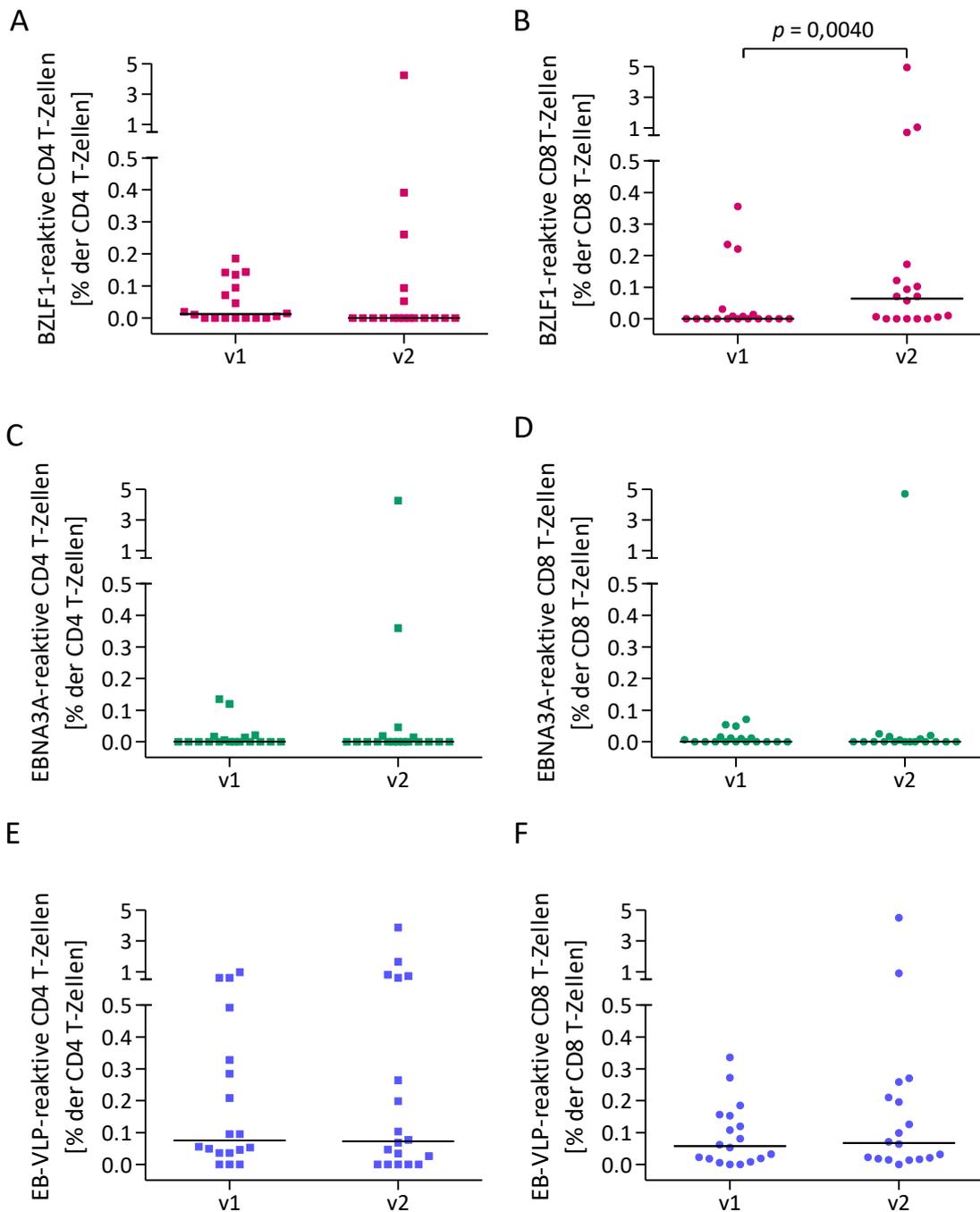


Abbildung 15: Gesamtzytokinexpression EBV-spezifischer T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM. PBMC von IM-Patient:innen ($n = 18$) wurden an v1 (links) und v2 (rechts) mit BZLF1 (A, B) und EBNA3A (B, C), sowie mit EB-VLP (E, F) stimuliert. Mittels Durchflusszytometrie-basierten Analysen wurde anschließend der Anteil EBV-spezifischer CD4 (A, C, E) und CD8 T-Zellen (B, D, F) ermittelt. Dargestellt ist die Gesamtzytokinexpression der T-Zellen, zusammengesetzt aus der Summe der IFN- γ -, TNF- und IL-2-Expression. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Zur statistischen Testung wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet.

Die im Median höchste Gesamtzytokinexpression zeigten EB-VLP-stimulierte CD4 und CD8 T-Zellen (E und F). Auch hier blieb die Gesamtzytokinexpression von v1 zu v2 stabil (CD4: Median v1 0,1 %; min. 0,0 – max. 1,0 %; Median v2 0,1 %; min. 0,0 - max. 3,9 %; $p = 0,3655$; CD8: Median v1 0,1 %; min. 0,0 – max. 0,3 %; Median v2 0,1 %; min. 0,0 – max. 4,5 %; $p = 0,4591$).

Tabelle 6: Anteil reaktiver Patient:innen innerhalb der untersuchten Kohorte

Zelltyp	Reaktive Patient:innen [%]*						
	BZLF1	EBNA3A	EB-VLP	EB-VLP / BZLF1	EB-VLP / EBNA3A	BZLF1 / EBNA3A	EB-VLP / EBNA3A / BZLF1
	v1						
CD4	61	33	83	89	89	61	89
CD8	39	44	89	94	89	61	94
v2							
CD4	28	28	72	72	72	39	72
CD8	72	33	94	100	94	72	100

*Anteil der Patient:innen in Prozent, deren CD4, bzw. CD8 T-Zellen ein oder mehrere Zytokine nach Stimulation mit den jeweiligen EBV-Stimulationsantigenen exprimieren.

Um die verwendeten Stimulationsantigene hinsichtlich ihrer Eignung zum Monitoring der EBV-spezifischen T-Zellantwort zu beurteilen, wurde der Anteil der Patient:innen bestimmt, die nach Stimulation mit einem und/oder einer Kombination der drei Antigene eine CD4 oder CD8 T-Zellantwort aufwiesen (*response-rate*). In **Tabelle 6** ist die *response-rate* der Kohorte dargestellt. Hierbei wurde erkennbar, dass unabhängig vom Stimulationsantigen an v1 mehr Patient:innen EBV-spezifische CD4 T-Zellantworten aufwiesen als an v2. Besonders auffällig wurde dies bei den mit BZLF1 stimulierten CD4 T-Zellen, bei denen an v1 61 % der Patient:innen eine Zytokinantwort zeigten, an v2 dagegen nur 28 %.

Im Falle der CD8 T-Zellen ist zu erkennen, dass von v1 zu v2 der Anteil der Patient:innen mit EBV-spezifischen T-Zellen nach Stimulation mit EBNA3A und EB-VLP konstant blieb, lediglich nach Stimulation mit BZLF1 nahm die *response-rate* von 39 % an v1 deutlich auf 72 % an v2 zu. Betrachtet man die einzelnen Stimulationsantigene, wurden EBV-spezifische T-Zellantworten bei den meisten Patient:innen nach Stimulation mit EB-VLP nachgewiesen (CD4: v1 83 %, v2 72 %; CD8: v1 89 %, v2 94 %). Bessere *response-rates* wurden durch eine Kombination der Antigene erreicht. Die besten *response-rates* konnten durch eine Kombination der mit EB-VLP stimulierten Proben mit einer oder beiden mit T-activated Proteinen stimulierten Probe erzielt werden (**Tabelle 6**).

3.3.4 Funktionalität EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM

Abbildung 16 zeigt die Gesamtzytokinexpression EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen aufgeteilt in den Anteil mono-, bi- und trifunktionaler Zellen nach Stimulation mit BZLF1, EBNA3A und EB-VLP an v1 und v2. Gezeigt ist der mittlere Anteil mono- bzw. polyfunktionaler CD4 und CD8 T-Zellen an der Gesamtzytokinexpression.

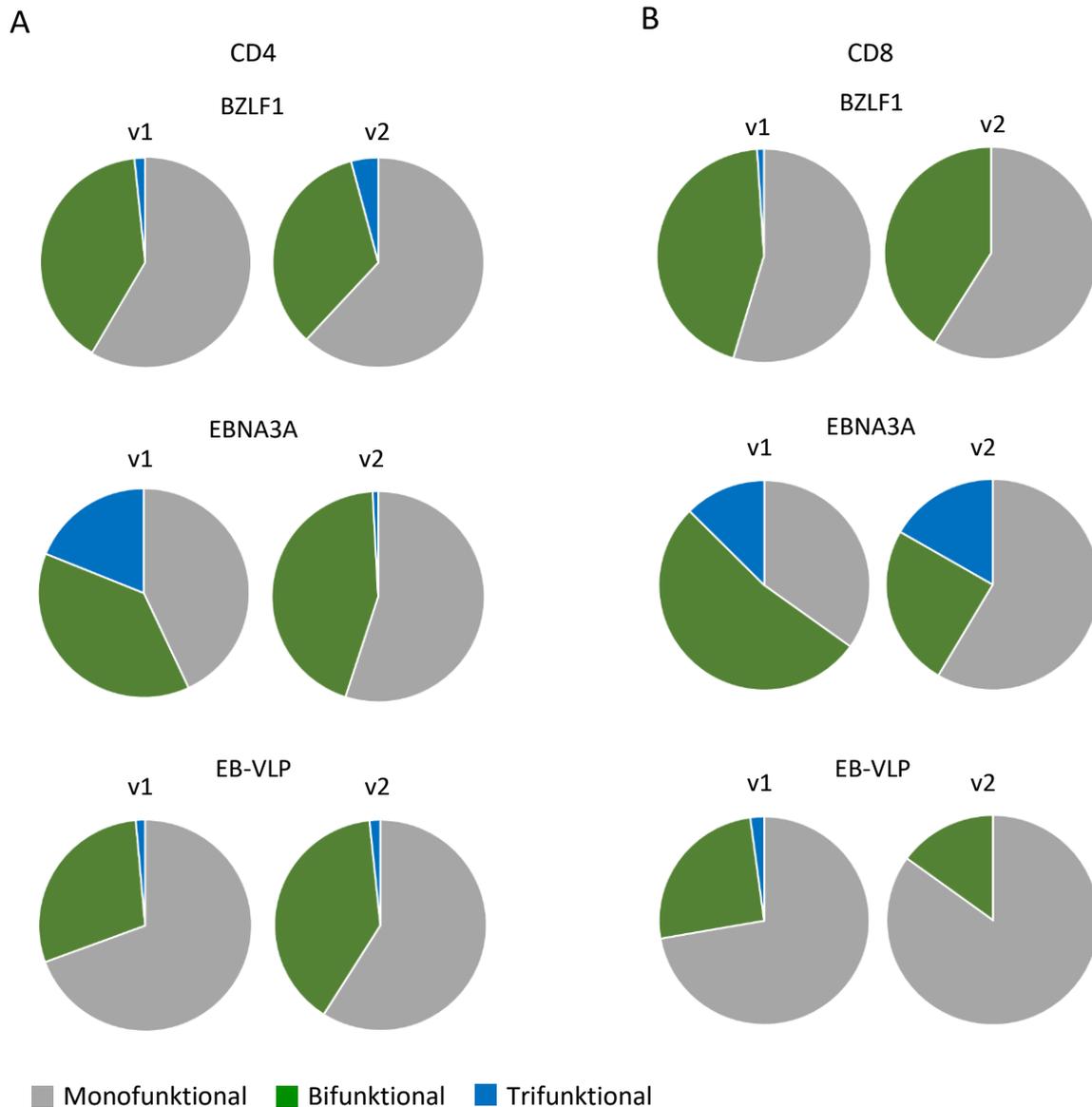


Abbildung 16: Funktionalität EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen im Krankheitsverlauf nach Stimulation mit BZLF1 und EBNA3A sowie mit EB-VLP. Dargestellt ist die Funktionalität EBV-spezifischer CD4 (A) und CD8 (B) T-Zellen nach Stimulation mit BZLF1 und EBNA3A sowie EB-VLP an v1 (links) und v2 (rechts). In den Kreisdiagrammen ist der mittlere Anteil mono- (grau), bi- (grün) und trifunktionaler (blau) Zellen an der Gesamtzytokinexpression der CD4 und CD8 T-Zellen dargestellt. Zur statistischen Testung wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet.

Hierbei konnte bei allen Antigenen zwischen den beiden Studienzeitpunkten kein signifikanter Unterschied in der Funktionalität der T-Zellen festgestellt werden. Es ist erkennbar, dass an v2 nach

Stimulation mit BZLF1 im Mittel ca. ein Drittel der EBV-spezifischen CD4 T-Zellen mindestens zwei Zytokine exprimierte. Dabei nahm der Anteil bifunktionaler Zellen von 39,9 % an v1 moderat auf 33,9 % an v2 ab. Der Anteil trifunktionaler Zellen war gering und nahm von 1,6 % an v1 auf 4,2 % an v2 etwas zu. Der Anteil monofunktionaler CD4 T-Zellen war am höchsten und nahm von v1 zu v2 ebenfalls gering zu (v1 58,4 %, v2 61,9 %).

Bei Betrachtung der BZLF1-reaktiven CD8 T-Zellen ergab sich ein ähnliches Bild. Ein Großteil der CD8 T-Zellen war monofunktional (v1: 54,6 %; v2: 58,9 %). Der Anteil bifunktionaler Zellen betrug an v1 44,4 % und nahm an v2 etwas ab auf 41,1 %. Wie auch bei den BZLF1-reaktiven CD4 T-Zellen war der Anteil trifunktionaler Zellen am geringsten. An v1 waren im Mittel nur 1,0 % der CD8 T-Zellen trifunktional, an v2 waren bei keinem Patient:in trifunktionale CD8 T-Zellen detektierbar.

Betrachtete man die EBNA3A-reaktiven CD4 T-Zellen wurde deutlich, dass der Anteil bifunktionaler CD4 T-Zellen von v1 zu v2 zunahm. Während an v1 38,1 % der Zellen bifunktional waren, waren es an v2 44,1 %. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil trifunktionaler CD4 T-Zellen nach Stimulation mit EBNA3A von 18,9 % an v1 deutlich auf 0,8 % an v2 ab. Die monofunktionalen CD4 T-Zellen nahmen von 43,0 % an v1 etwas zu auf 54,9 % an v2. Neben dem massiven Abfall der trifunktionalen CD4 T-Zellen von v1 zu v2, fielen die deutlichsten Unterschiede zwischen v1 und v2 bei den EBNA3A-reaktiven CD8 T-Zellen auf. Auch hier war ein großer Teil der Zellen trifunktional und blieb im Verlauf der frühen EBV-IM stabil (v1: 12,6 %, v2: 16,7 %). Die bifunktionalen CD8 T-Zellen nahmen dagegen von 52,6 % an v1 deutlich ab auf 24,8 % an v2. Die monofunktionalen CD8 T-Zellen nahmen von 34,9 % an v1 auf 58,5 % an v2 zu. Allerdings fiel auf, dass nur ein kleiner Teil der Patient:innen EBNA3A-reaktive T-Zellen aufwies (**Tabelle 6**). Da die Daten auf Basis einer sehr geringen Patient:innenzahl erhoben wurden, kann hier lediglich eine Tendenz festgestellt werden.

Nach Stimulation mit EB-VLP war bei den meisten Patient:innen eine CD4 und CD8 T-Zellantwort detektierbar. Bei den mit EB-VLP-stimulierten CD4 T-Zellen blieb der Anteil trifunktionaler Zellen von v1 zu v2 stabil (v1: 1,4 %; v2: 1,7 %). Die monofunktionalen CD4 T-Zellen machten mit 69,4 % an v1 und 59,0 % an v2 den größten Anteil an der Gesamtzytokinexpression aus. Während diese von v1 zu v2 eher abnahmen, war der Anteil bifunktionaler CD4 T-Zellen deutlich zunehmend (v1: 29,2 %, v2: 39,4 %). Im Falle der EB-VLP-reaktiven CD8 T-Zellen fiel eine gegenteilige Tendenz auf. Die monofunktionalen CD8 T-Zellen waren klar dominant und nahmen von 72,3 % an v1 auf 85,0 % an v2 zu. Der Anteil polyfunktionaler Zellen nahm dagegen deutlich ab. Die bifunktionalen CD8 T-Zellen machten an v1 noch 25,6 % aus und nahmen an v2 auf 15,0 % ab. Der Anteil trifunktionaler CD8 T-Zellen fiel kaum ins Gewicht. An v1 sind 2,1 % der CD8 T-Zellen trifunktional, an v2 traten bei keinem Patient:in noch trifunktionale Zellen nach Stimulation mit EB-VLP auf.

Um die Zytokinexpression mono-, bzw. polyfunktionaler T-Zellen besser einordnen zu können ist in **Abbildung 17** dargestellt, wie viele Patient:innen der untersuchten Kohorte (n = 18) jeweils mono-, bi-, oder trifunktionale T-Zellen aufwiesen.

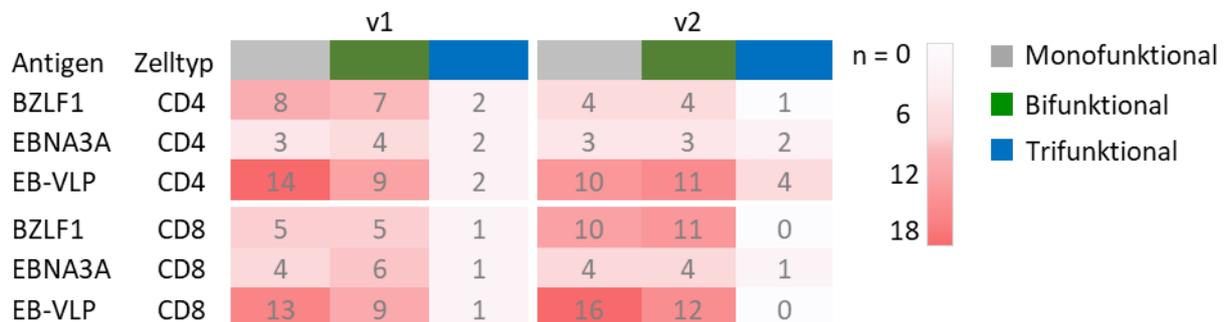


Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung EBV-spezifischer mono- und polyfunktionaler CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation mit T-activated Proteinen und EB-VLP an v1 und v2. Anzahl der Patient:innen innerhalb der Kohorte (n = 18), die nach Stimulation mit BZLF1, EBNA3A sowie EB-VLP an v1 bzw. v2 EBV-spezifische CD4, bzw. CD8 T-Zellen aufweisen.

In der Abbildung wird ersichtlich, dass die Gesamtzytokinexpression unabhängig vom Stimulationsantigen sowohl bei den CD4 als auch bei den CD8 T-Zellen von mono- und bifunktionalen T-Zellen dominiert wurde. Trifunktionale T-Zellen kamen bei maximal vier Patient:innen nach Stimulation mit EB-VLP an v2 vor und machten nur einen geringen Anteil an der Gesamtzytokinexpression aus (vgl. **Abbildung 16**). Lediglich bei EBNA3A-reaktiven T-Zellen lag der Anteil trifunktionaler T-Zellen an der Gesamtzytokinexpression höher, allerdings wiesen hier nur einzelne Patient:innen eine EBV-spezifische T-Zellantwort auf. Wie in **Abbildung 16** ersichtlich, nahm der Anteil polyfunktionaler T-Zellen von v1 zu v2 tendenziell ab. Betrachtet man die mit T-activated Proteinen stimulierten CD4 T-Zellen, spiegelte sich dies auch in einer Abnahme der Anzahl von Patient:innen mit bi- bzw. trifunktionalen CD4 T-Zellen. Betrachtet man dagegen die EB-VLP reaktiven Patient:innen, nahm die Anzahl derer, die polyfunktionale T-Zellen aufwiesen von v1 zu v2 zu. Ähnlich verhielt es sich bei Betrachtung der CD8 T-Zellen. Nach Stimulation mit EBNA3A nahm die Anzahl der Patient:innen mit polyfunktionalen T-Zellen von v1 zu v2 ab, nach Stimulation mit EB-VLP dagegen zu. Ein auffälliger Unterschied ist die Zunahme von Patient:innen, die nach Stimulation mit BZLF1 an v2 bifunktionale CD8 T-Zellen aufwiesen. Zwar nahm der Anteil polyfunktionaler Zellen an der Gesamtzytokinexpression moderat ab (vgl. **Abbildung 16**), insgesamt wiesen aber mehr Patient:innen bifunktionale CD8 T-Zellen auf.

3.3.5 Zytokinexpressionsmuster EBV-spezifischer CD4 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM

Zur Darstellung der Zusammensetzung der mono- bzw. polyfunktionalen CD4 T-Zellantwort sind in **Abbildung 18** die Zytokin-Expressionsmuster nach Stimulation mit T-*activated* Proteinen und EB-VLP an v1 und v2 dargestellt.

Bei den meisten Patient:innen war ein großer Teil der CD4 T-Zellen IFN- γ positiv. Vor allem bei den BZLF1 und EB-VLP reaktiven Patient:innen waren die bei den meisten Patient:innen vorkommenden und auch in Bezug auf die Frequenz höchsten CD4 Subpopulationen die IFN- γ exprimierenden monofunktionalen und die bifunktionalen IFN- γ - und TNF-positiven CD4 T-Zellen. An v1 waren im Mittel 24,4 % der monofunktionalen CD4 T-Zellen nach Stimulation mit BZLF1 IFN- γ positiv, an v2 47,1 %. Bei den BZLF1-reaktiven IFN- γ und TNF positiven CD4 T-Zellen waren es im Mittel an v1 20,7 %, an v2 28,4 %. Nach Stimulation mit EB-VLP waren an v1 im Mittel 64,2 % der CD4 T-Zellen IFN- γ positiv, an v2 44,7 %. Die IFN- γ und TNF positiven bifunktionalen Zellen machten nach Stimulation mit EB-VLP einen Anteil von 28,7 % im Mittel an v1 und 30,4 % an v2 aus. Nach Stimulation mit EBNA3A waren dagegen keine IFN- γ und TNF positiven bifunktionalen CD4 T-Zellen nachweisbar und nur bei zwei Patient:innen an v2 IFN- γ positive monofunktionale CD4 T-Zellen, die im Mittel einen Anteil von 39,9 % der Gesamtzytokinexpression ausmachten.

Bei Betrachtung der EBNA3A-reaktiven CD4 T-Zellen waren dagegen Subpopulationen auffällig, die IL-2 exprimieren. Die bei den meisten EBNA3A-reaktiven Patient:innen vorkommende Zytokinkombination waren die IL-2 und TNF positiven bifunktionalen, sowie die TNF positiven monofunktionalen CD4 T-Zellen. Nach Stimulation mit EBNA3A waren an v1 im Mittel 26,4 % der CD4 T-Zellen TNF positiv, an v2 15,0 %. Die IL-2 und TNF positiven CD4 T-Zellen machten an v1 21,4 % und an v2 44,2 % der EBNA3A-reaktiven CD4 T-Zellen aus. Die Frequenzen nach Stimulation mit BZLF1 und EB-VLP lagen bei Betrachtung dieser Zytokinkombination im Mittel deutlich niedriger (BZLF1: TNF_{mono} v1: 13,9 %, v2: 14,8 %; IL-2/TNF_{Bi} v1: 10,1 %, v2: 5,54%; EB-VLP: TNF_{mono} v1: 3,5 %, v2: 9,4 %; IL-2/TNF_{Bi} v1: 0,0 %, v2: 0,8 %).

Im Vergleich zu den o.g. Zytokinkombinationen kamen IL-2 monofunktionale, IFN- γ und IL-2 positive bifunktionale und trifunktionale CD4 T-Zellen nur bei einzelnen Patient:innen in meist geringer Frequenz vor. Der im Mittel höchste Anteil trifunktionaler CD4 T-Zellen war an v1 nach Stimulation mit EBNA3A zu finden (18,9 %), an v2 sank dieser auf 0,8 %. Nach Stimulation mit BZLF1 und EB-VLP lag der Anteil im Mittel stets unter fünf Prozent (BZLF1 v1: 1,6 %, v2: 4,2 %; EB-VLP: 1,4 %, v2: 1,7 %). Bei Betrachtung der IFN- γ und IL-2 positiven bifunktionalen CD4 T-Zellen fiel auf, dass ebenfalls nur sehr wenige Patient:innen diese Zytokinkombination aufwiesen und diese meist in niedriger Frequenz (BZLF1 v1: 9,1 %, v2: 0,0 %; EBNA3A v1: 16,7 %, v2: 0,0 %; EB-VLP v1: 0,5 %, v2: 8,2 %). Lediglich ein:e Patient:in hatte unabhängig vom Stimulationsantigen hohe Frequenzen IFN- γ und IL-2 positiver CD4 T-

Zellen. Ähnliches war bei den monofunktionalen IL-2 positiven CD4 T-Zellen zu beobachten (BZLF1 v1: 20,1 %, v2: 0,0 %; EBNA3A v1: 16,7 %, v2: 0,0 %; EB-VLP v1: 1,7 %, v2: 4,8 %).

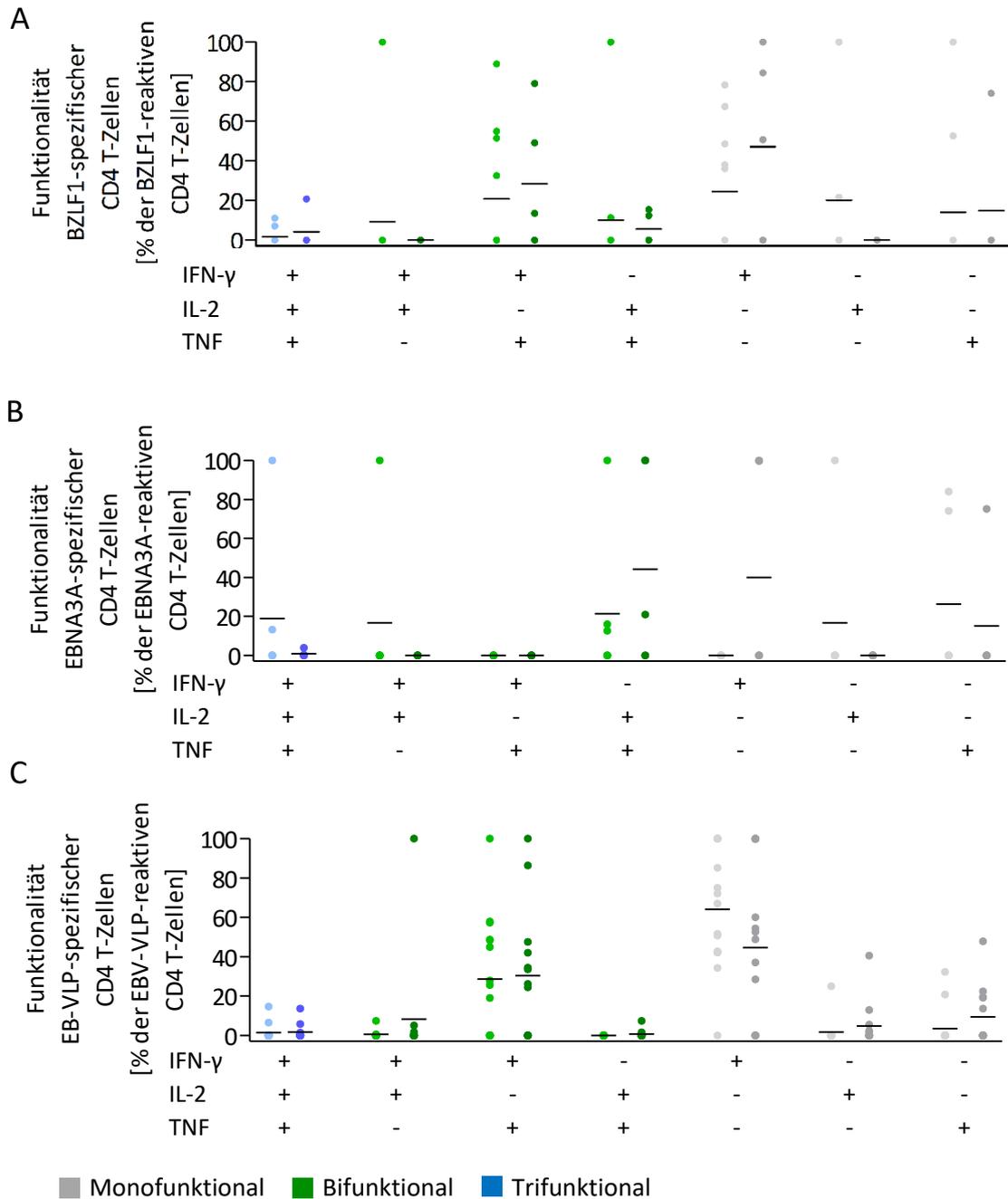


Abbildung 18: Anteil EBV-spezifischer mono- und polyfunktionaler CD4 T-Zellen nach Stimulation mit T-activated Proteinen und EB-VLP an v1 und v2. Funktionalität EBV-spezifischer CD4 T-Zellen nach Stimulation mit BZLF1 (A) und EBNA3A (B) sowie EB-VLP (C) an v1 (hell) und v2 (dunkel). Es sind die häufigsten Phänotypen mono- (grau), bi- (grün) und trifunktionaler (blau) CD4 T-Zellen an der Gesamtzytokinexpression dargestellt. Die Punkte kennzeichnen jeweils eine:n Patient:in, die horizontale Linie den Mittelwert.

3.3.6 Zytokinexpressionsmuster EBV-spezifischer CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM

In **Abbildung 19** sind die nach Stimulation mit T-activated Proteinen sowie EB-VLP vorkommenden Zytokinexpressionsmuster abgebildet.

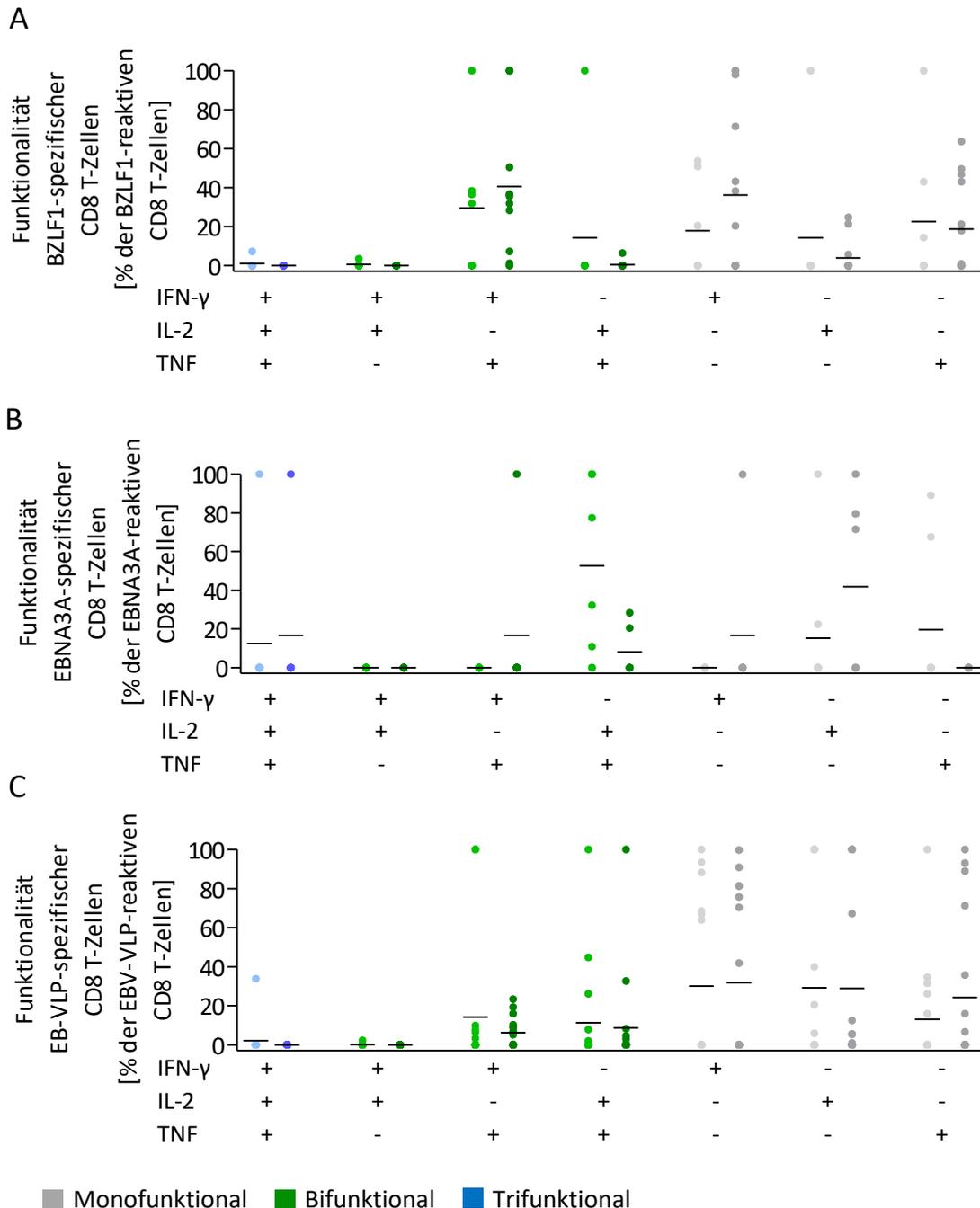


Abbildung 19: Anteil EBV-spezifischer mono- und polyfunktionaler CD8 T-Zellen nach Stimulation mit T-activated Proteinen und EB-VLP an v1 und v2. Funktionalität EBV-spezifischer CD8 T-Zellen nach Stimulation mit BZLF1 (A) und EBNA3A (B) sowie EB-VLP (C) an v1 (hell) und v2 (dunkel). Es sind die möglichen Zytokin-kombinationen mono- (grau), bi- (grün) und trifunktionaler (blau) CD8 T-Zellen an der Gesamtzytokinexpression dargestellt. Die Punkte kennzeichnen jeweils eine:n Patient:in, die horizontale Linie den Mittelwert.

In **Abbildung 19** wird erkennbar, dass nach Stimulation mit BZLF1 die bei den meisten Patient:innen monofunktionale CD8 T-Zellen IFN- γ (v1, Mittelwert 17,9) und TNF (v1, Mittelwert 22,5 %) exprimierten. Auch an v2 waren diese beiden die häufigsten Phänotypen monofunktionaler CD8 T-Zellen. Hier wiesen im Mittel 36,2 % der Patient:innen IFN- γ -, bzw. 18,7 % TNF-positive CD8 T-Zellen auf.

Nach Stimulation mit EB-VLP wurden alle drei Zytokine monofunktionaler CD8 T-Zellen im Mittel ähnlich stark exprimiert. Unterschiede in der Frequenz zwischen v1 und v2 fielen dabei kaum auf. Im Mittel exprimierten an v1 30,1 % der CD8 T-Zellen IFN- γ , 29,2 % IL-2 und 13,0 % TNF. An v2 blieben die mittleren Frequenzen der monofunktionalen CD8 T-Zellen stabil (IFN- γ 31,9 %, IL-2 28,9 %, TNF 24,2 %).

Die auffälligsten bifunktionalen CD8 T-Zellen waren nach Stimulation mit BZLF1 IFN- γ - und TNF-positiv. An v1 machte dieser Phänotyp nach Stimulation mit BZLF1 im Mittel 29,6 % der Gesamtzytokinexpression aus. An v2 waren es im Mittel 40,6 % der Gesamtzytokinexpression. Nach Stimulation mit EB-VLP war dieses Zytokinexpressionsmuster an v1 bei 14,2 % und an v2 bei 6,2 % nachweisbar. Nach Stimulation mit EBNA3A wies nur ein Patient an v2 IFN- γ und TNF positive CD8 Zellen auf (Mittelwert v1: 0,0 %, v2 16,7 %). Wie auch im Falle der CD4 T-Zellen fiel nach Stimulation mit EBNA3A vor allem die IL-2 und TNF exprimierende Subpopulation bifunktionaler CD8 T-Zellen auf. Der Anteil an der Gesamtzytokinexpression nahm im Mittel von 52,6 % an v1 deutlich auf 8,1 % an v2 ab. Bei den mit BZLF1 stimulierten Proben waren an v1 (Mittelwert 14,3 %) und v2 (Mittelwert 0,5 %) deutlich geringere Frequenzen dieser Subpopulation nachweisbar. Ähnlich verhielt es sich bei den EB-VLP-reaktiven CD8 T-Zellen (Mittelwert v1: 11,3 %, v2: 8,8 %).

Trifunktionale CD8 T-Zellen waren nur bei wenigen Patient:innen und in meist niedriger Frequenz nachweisbar. Nach Stimulation mit EBNA3A waren an v1 im Mittel 12,5 % der CD8 T-Zellen trifunktional, an v2 16,8 %. Da aber lediglich ein Patient sehr hohe Frequenzen trifunktionaler CD8 T-Zellen aufwies, ist die Aussagekraft eingeschränkt. Bei den mit BZLF1 und EB-VLP stimulierten Proben lag der mittlere Anteil trifunktionaler Zellen deutlich niedriger (BZLF1 v1: 1,0 %, v2: 0,0 %; EB-VLP v1: 2,1 %, v2: 0,0 %).

3.3.7 Korrelation der EBV-spezifischen T-Zellantwort zu klinischen und virologischen Parametern der frühen EBV-IM

Neben der Analyse immunologischer Daten wurden im Rahmen der IMMUC-Studie verschiedene klinische und virologische Marker erhoben, von denen einige zur untersuchten T-Zellantwort der IMMUC-Pilot-Kohorte korreliert wurden. Aufgrund der geringen Fallzahl lassen sich wie bereits zuvor

erwähnt lediglich Tendenzen abschätzen, zur Feststellung aussagekräftigerer Zusammenhänge gilt es die Ergebnisse der gesamten Kohorte abzuwarten.

In **Tabelle 7** ist der Zusammenhang der Frequenz EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen zu den klinischen Parametern Alter und dem zeitlichen Abstand in Tagen zwischen Symptombeginn und erstem Studienzeitpunkt (Δv_{onset}), sowie den virologischen Parametern Viruslast in der Zellfraktion und im Plasma dargestellt. Da kaum nennenswerte Unterschiede zwischen den T-Zellfrequenzen nach Stimulation mit den unterschiedlichen Antigenen vorlagen, ist hier exemplarische die Korrelation mit BZLF1-stimulierten Proben gezeigt. Eine vollständige Tabelle mit allen Antigenen ist im Anhang zu finden (**Tabelle S3**).

Tabelle 7: Korrelation der EBV-spezifischen T-Zellfrequenz mit klinischen und virologischen Parametern am Beispiel BZLF1-stimulierter Proben

Spearman-Korrelation	Δv_{onset} [Tage]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	0,3461	0,1594	-0,0776	0,7597
CD8 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	-0,5109	0,0303*	0,2443	0,3286
CD4/CD8 Verhältnis	0,4435	0,0652	-0,1065	0,6740
CD3 T-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	-0,1001	0,6928	0,1830	0,4672
	Alter [Jahre]			
CD4 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	-0,4252	0,0786	-0,4231	0,0802
CD8 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	0,3566	0,1464	0,5973	0,0089**
CD4/CD8 Verhältnis	-0,4148	0,0870	-0,5572	0,0163*
CD3 T-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	-0,1383	0,5841	0,2994	0,2275
	Viruslast Zellfraktion [IU/10 ⁵]			
CD4 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	-0,3944	0,1053	0,1840	0,4796
CD8 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	0,5503	0,0180*	-0,1255	0,6312
CD4/CD8 Verhältnis	-0,4966	0,0360*	0,1019	0,6972
CD3 T-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	0,3554	0,1478	-0,1642	0,5288
	Viruslast Plasma [IU/ml]			
CD4 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	-0,4385	0,0687	n.m.	n.m.
CD8 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	0,6159	0,0065**	n.m.	n.m.
CD4/CD8 Verhältnis	-0,5025	0,0336*	n.m.	n.m.
CD3 T-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	0,3577	0,1450	n.m.	n.m.

r = Spearman *r*; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$, n.m. = nicht möglich

Hierbei fiel auf, dass es an v1 einen signifikanten moderat negativen Zusammenhang zwischen der Frequenz der CD8 T-Zellen und Δv_{onset} gab. An v2 war der Zusammenhang lediglich schwach ausgeprägt. Zu den CD4 T-Zellen und zum Verhältnis von CD4 und CD8 T-Zellen bestand an v1 ein geringer bis moderater positiver Zusammenhang, der an v2 ebenfalls nicht mehr vorlag.

Betrachtet man das Alter fiel eine moderate positive Korrelation zur Frequenz der CD8 T-Zellen auf, die an v2 etwas stärker ausgeprägt war als an v1 und statistisch signifikant war. Die CD4 T-Zellen und das CD4/CD8-Verhältnis korrelierten moderat negativ mit dem Alter der Patient:innen.

Zusätzlich zu den klinischen Parametern wurde die Viruslast zur T-Zellantwort korreliert. Hier fiel sowohl bei der Viruslast in der Zellfraktion als auch im Plasma an v1 eine signifikante moderat-positive Korrelation zur CD8 T-Zellfrequenz auf. Eine Korrelation zur Viruslast im Plasma war an v2 nicht möglich, da bei keinem Patient:in an v2 noch EBV im Plasma nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu korrelierte die Viruslast in Zellfraktion und Plasma an v1 moderat positiv mit der Frequenz der CD4 T-Zellen und dem CD4/CD8-Verhältnis.

4 Diskussion

4.1 Datenerhebung und Zusammenstellung der Patient:innenkohorte

Ein wesentlicher Bestandteil meiner Doktorarbeit war unter anderem die Implementierung logistischer Prozesse und die Optimierung von Arbeitsabläufen im Rahmen der Pilotphase der IMMUC-Studie. Eine besondere Herausforderung bestand in der Organisation der zeitlichen Abläufe, da anfänglich sämtliche Proben aus München und dem Münchener Umland sowohl zum Zeitpunkt der Registrierung für die Studie als auch zu den späteren Kontrolluntersuchungen von einem zweiköpfigen Team gewonnen und anschließend prozessiert wurden. Zur Erhaltung einer möglichst hohen Zellviabilität sollten die zeitlichen Abstände zwischen Blutentnahme und der Verarbeitung der frischen Blutproben im Labor möglichst gering gehalten werden. Dies gelang im Verlauf der Studie durch optimierte Planungsabläufe und eine genaue Abstimmung des klinischen bzw. Labor-Teams zunehmend besser, sodass eine Verarbeitung der Proben durchschnittlich in weniger als drei Stunden nach der Blutentnahme erfolgte. Die Analyse der frischen Proben mittels Durchflusszytometrie wurde im Median innerhalb von 4,15 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt. Eine rasche Prozessierung war insbesondere im Hinblick auf die spätere Zytokinanalyse essenziell. Neuere Untersuchungen zur Expression von Zytokinen im Plasma aber auch zur Viabilität von PBMC konnten einen negativen Effekt langer Lagerungszeiten nachweisen (Cohen, Keegan, Melanson, & Walt, 2019; Navas, Giraldo-Parra, Prieto, Cabrera, & Gómez, 2019). Erfreulicherweise war bei keiner der im Rahmen der IMMUC-Studie gesammelten Proben ein Ausschluss aufgrund Überschreitung der laborintern festgelegten maximalen Lagerungszeit (\leq acht Stunden) notwendig.

Trotz der schnellen Prozessierung fiel auf, dass bei etwa einem Drittel der Patient:innen an einem oder an beiden Studienzeitpunkten zu wenig Zellmaterial vorlag, um die für meine Dissertation vorgesehenen durchflusszytometrischen Analysen durchzuführen. Das Zellmaterial, das gewonnen wurde, war vermutlich aufgrund des akuten inflammatorischen Geschehens besonders vulnerabel. Daher ist es wichtig, dass die im Rahmen der Pilotphase implementierten Handlungsabläufe auch in der Hauptstudie weiterhin streng eingehalten werden. Da während der Pilotphase in einigen Fällen eine mangelnde Laborkapazität dazu führte, dass Probenmaterial nicht durchflusszytometrisch analysiert werden konnte, wurde die personelle Besetzung im Verlauf verbessert. Durch regelmäßige Absprachen und eine Verbesserung der Koordination mit den anderen in dem Labor durchgeführten Projekten konnten Ausfälle aufgrund fehlender Laborkapazitäten minimiert werden.

Zusammenfassend war festzustellen, dass bereits im Rahmen der Pilotphase die logistische Organisation sehr gut funktionierte. Optimierungen erfolgten im Verlauf insbesondere in den Bereichen der personellen Besetzung und laborinternen Organisation.

4.2 Während der frühen EBV-IM kam es zu einer Abnahme der absoluten NK-Zellzahlen

Im Verlauf der frühen EBV-IM wurde in der von mir untersuchten Kohorte eine signifikante Reduktion der absoluten NK-Zellzahlen festgestellt, die ebenfalls im Rahmen anderer Studien beobachtet wurde. Bei Symptombeginn kam es zunächst zu einer Zunahme der NK-Zellzahl, ca. 30-50 Tage nach Symptombeginn befinden sich die NK-Zellzahlen wieder auf dem Ausgangsniveau (Azzi et al., 2014; Balfour et al., 2013a; Williams et al., 2005).

Im Gegensatz dazu blieb der prozentuale Anteil der NK-Zellen an den vitalen Lymphozyten von v1 zu v2 bei den Patient:innen der IMMUC-Pilotkohorte weitestgehend stabil, während andere Arbeitsgruppen bereits in der frühen Phase der EBV-IM Veränderungen sahen. Lam et al. stellten beispielsweise einen Monat nach Diagnosestellung der EBV-IM eine deutliche Reduktion des prozentualen NK-Zellanteils im Vergleich zum Diagnosezeitpunkt fest (Lam et al., 2020). Während der prozentuale NK-Zellanteil bei Lam et al. zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ebenfalls im Median bei ca. 10 % lag, halbierte sich der Anteil bei Lam et al. einen Monat nach Diagnosestellung (Lam et al., 2020). Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte darin gelegen sein, dass bei Lam et al. der zweite Studienzeitpunkt etwa einen Monat nach Diagnosestellung festgelegt wurde, der zeitliche Abstand vom Symptombeginn bis zur Feststellung der EBV-IM aber nicht berücksichtigt wurde. Anhand der Erkenntnisse, die mit der IMMUC-Pilotkohorte gewonnen wurden, zeigte sich aber, dass der Zeitraum zwischen Symptombeginn und Diagnosestellung sehr variabel war und zwischen vier bis maximal 28 Tagen lag (vgl. Tabelle 2, Kapitel 3.1). Daher ist es möglich, dass der zweite Studienzeitpunkt bei Lam et al. bereits deutlich länger als einen Monat nach Symptombeginn lag, da keine Angaben zur Latenz zum Symptombeginn gemacht wurden. Und betrachtete man dann die weiteren Studienzeitpunkte bei Lam et al. wurde deutlich, dass der NK-Zellanteil im späteren Verlauf (drei, sechs und zwölf Monate nach Diagnosestellung) im Median nahezu auf dem gleichen Niveau blieb wie einen Monat nach Diagnosestellung. Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass eine zeitliche Angabe zum Abstand zwischen Symptombeginn und Probenentnahme zwingend notwendig ist, um vergleichbare Ergebnisse in der NK-Zellanalyse zu erhalten.

Daher führte ich Korrelationsanalysen der NK-Zellzahlen zum Einfluss des zeitlichen Abstands zwischen Symptombeginn und Diagnosestellung durch. Hier zeigte sich während der frühen EBV-IM bei Betrachtung der absoluten NK-Zellzahlen ein deutlicher Zusammenhang der NK-Zellzahl zum Zeitverlauf. Es fiel auf, dass die NK-Zellzahl niedriger war, je länger der zeitliche Abstand zwischen Symptombeginn und Zeitpunkt der Blutentnahme war. Dieser Effekt war insbesondere innerhalb der ersten 28 Tage nach Symptombeginn ausgeprägt und statistisch signifikant. Diese Beobachtung passte zu Untersuchungen der Inkubationsperiode der EBV-IM, während der Veränderungen des NK-

Zellkompartimentes in Bezug auf Frequenz und auch Phänotyp vor allem im Zeitraum bis zu 50 Tagen nach Symptombeginn beobachtet wurden (Azzi et al., 2014; Dunmire, Grimm, et al., 2015; Dunmire, Hogquist, et al., 2015). Erst mit Beginn der IM-Symptome expandierte das NK-Kompartiment und fiel dann ca. 50 Tage nach Symptombeginn wieder auf das Ausgangsniveau (Balfour, Odumade, et al., 2013). Bisher gibt es wenig Erkenntnisse zum Einfluss der NK-Zellzahlen auf die Symptomschwere oder -dauer einer EBV-IM. Die Tatsache, dass es erst mit Symptombeginn zu einer Expansion der NK-Zellzahlen kam und sich diese bereits innerhalb der ersten ein bis zwei Monate nach Symptombeginn so deutlich änderten, ließ allerdings vermuten, dass hier ein Zusammenhang bestand (Dunmire, Grimm, et al.). Es wird interessant sein, bei Analyse der gesamten IMMUC-Kohorte zu prüfen, ob eventuell ein Zusammenhang zwischen der NK-Zellzahl und der Symptomschwere bzw. -dauer der EBV-IM festgestellt werden kann und möglicherweise somit absolute NK-Zellzahlen als prädiktives Tool diesen könnten.

4.3 Die Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen nahm im Rahmen der frühen EBV-IM zu

Bei der Analyse der NK-Zellantwort während der frühen EBV-IM konzentrierte ich mich besonders auf die Analyse der unterschiedlichen NK-Zell-Differenzierungsstufen. Denn wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, treten bestimmte NK-Zell Phänotypen im Laufe einer Infektion mit unterschiedlichen Herpesviren gehäuft auf und unterscheiden sich in ihrer antiviralen Funktion.

CD56^{bright} CD16⁻ NK-Zellen sind normalerweise vor allem in sekundär lymphatischen Organen (z.B. Tonsillen) nachweisbar. Dort limitierten sie eine EBV-Infektion von B-Zellen und trugen so zur lokalen Kontrolle der frühen EBV-Infektion bei (Hatton et al., 2016; Jud et al., 2017). In der von mir untersuchten Kohorte beobachtete ich eine Zunahme sehr früh differenzierter peripherer NK-Zellen (CD56^{bright}CD16⁻) während der frühen EBV-IM. Auffällig war, dass der prozentuale Anteil (im Median an v1 rund zwei Prozent und an v2 rund 3 Prozent) deutlich geringer war als bei gesunden Kontrollpersonen in vergleichbaren Studien, bei denen rund zehn Prozent der peripheren NK-Zellen CD56^{bright} waren (Azzi et al., 2014; Cooper et al., 2001; Forconi et al., 2020). Azzi et al. beobachteten erst nach sechs Monaten eine Normalisierung des prozentualen Anteils der CD56^{bright} CD16⁻ NK-Zellen bei IM-Patient:innen auf das Niveau gesunder Kontrollen (Azzi et al., 2014). Interessant war bei der Betrachtung der IMMUC-Pilotkohorte, dass bereits in den ersten acht Wochen nach Symptombeginn eine signifikante Zunahme dieser NK-Zellsubpopulation zu beobachten war. Der deutlich verringerte Anteil an CD56^{bright} CD16⁻ NK-Zellen könnte auf eine Verschiebung der Anteile zugunsten anderer NK-Subpopulationen während der frühen EBV-IM hindeuten bzw. auf eine vermehrte Ausreifung früh differenzierter NK-Zellen im peripheren Blut in der frühen Phase der Infektion.

Auch in der Population der CD56^{bright} CD16⁺ NK-Zellen war im Verlauf der frühen EBV-IM in der IMMUC-Pilotkohorte eine signifikante Frequenzzunahme zu beobachten. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass während des NK-Zell Reifungsprozesses CD56 auf der Zelloberfläche herunter- und CD16 hochreguliert wird (Nguyen, Béziat, Roos-Weil, & Vieillard, 2011). Allerdings wurde beobachtet, dass es auch später in der Zellreifung durch eine Zunahme der Expression von CD56 und CD16 auf bereits ausgereiften CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen zur Entwicklung dieser Kombination von Oberflächenmarkern kommen konnte (Takahashi et al., 2007). In diesen Fällen blieb eine ggf. bereits vorhandene KIR-Expression bestehen, die in der Regel erst im Rahmen der späten NK-Zelldifferenzierung stattfindet. Zusätzlich produzierten diese CD56^{bright} CD16⁺ NK-Zellen vermehrt proinflammatorische Zytokine (v.a. IFN- γ), sie besaßen also wie auch die CD56^{bright} CD16⁻ NK-Zellen eine regulatorische Funktion (Takahashi et al., 2007). Takahashi et al. konnten für diese CD56^{bright} CD16⁺ NK-Zellen außerdem eine gesteigerte Zytotoxizität gegenüber Tumoren und mit *Streptococcus pyogenes* infizierten Zelllinien zeigen (Takahashi et al., 2007). Dementsprechend war dieser Zelltyp am ehesten als intermediäre Reifungsstufe einzuordnen, mit einerseits regulatorischer Funktion bei gleichzeitig gesteigerten zytotoxischen Eigenschaften. Daher könnte für die Betrachtung der gesamten IMMUC-Kohorte eine Analyse der KIR-Expression der CD56^{bright} CD16⁺ NK-Zellen zur weiteren Einordnung dieser NK-Zell-Subpopulation im Verlauf der EBV-IM beitragen.

Um zu untersuchen, ob die CD56^{bright} NK-Zellsubpopulationen mit ihren regulatorischen Eigenschaften einen Zusammenhang zur EBV-spezifischen T-Zellantwort zeigten, wurde die Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen zur Frequenz der EBV-spezifischen CD4- und CD8-T-Zellen an v1 und v2 korreliert. Interessant war hier vor allem die signifikante negative Korrelation zur Frequenz der CD8 T-Zellen nach Stimulation mit EBNA3A und EB-VLP. Je höher die Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen war, desto geringer war der Anteil an CD8 T-Zellen. CD8 T-Zellen proliferieren im Rahmen einer EBV-IM vermehrt und führen durch die Expression proinflammatorischer Zytokine zu einer Hyperinflammation (Taylor et al., 2015). Diese Hyperinflammation wurde wiederum mit der Entwicklung EBV-IM-typischer Symptome in Zusammenhang gebracht (Taylor et al., 2015). Interessanterweise wird eine höhere Frequenz von CD56^{bright} NK-Zellen in der Schwangerschaft als protektiver Faktor bei Patientinnen mit MS diskutiert. Airas et al. postulieren, dass diese NK-Zell-Subpopulation autoinflammatorische Prozesse während der Schwangerschaft kontrollieren könnte (Airas et al., 2008; Michel et al., 2016). Analog hierzu könnte man vermuten, dass ein hoher Anteil von CD56^{bright} NK-Zellen einer CD8-getriggerten Hyperinflammation während der EBV-IM möglicherweise entgegenwirkt. Dies würde zur Beobachtung von Sundström et al. passen, die in einer Untersuchung der verschiedenen NK-Subpopulationen im Kindesalter Hinweise auf eine Reduktion der Fraktion der CD56^{bright} NK-Zellen mit zunehmendem Alter sahen (Hjalgrim et al., 2007; Sundström et al., 2007). Grundsätzlich entwickeln vor allem ältere Kinder eine symptomatische EBV-IM, weshalb es möglicherweise einen Zusammenhang zu der Frequenz der

CD56^{bright} NK-Zellen gibt. Allerdings war die Pilotkohorte der IMMUC-Studie noch zu klein, um valide Aussagen zu treffen. Sollten diese Beobachtungen auch in der finalen IMMUC-Kohorte Bestand haben, wäre eine genauere Betrachtung des Einflusses der CD56^{bright} NK-Zellen auf die CD8 T-Zellen und die assoziierten Inflammationsprozesse auch im Hinblick auf die Identifikation möglicher Biomarker für einen schweren Verlauf der EBV-IM aufschlussreich.

4.4 Früh-differenzierte NK-Zellen machten nur einen kleinen Anteil der NK-Zellen während der frühen EBV-IM aus

Auf die sogenannten *early-differentiated* NK-Zellen wurde in Bezug auf ihre Rolle während der akuten EBV-Infektion ein besonderes Augenmerk gelegt. Üblicherweise wird NKG2A vor allem auf CD56^{bright} NK-Zellen exprimiert (Cichocki, Grzywacz, & Miller, 2019). Diese CD56^{bright} NKG2A⁺ NK-Zellen werden dann als früh-differenziert bezeichnet, weshalb im Folgenden der Begriff *early-differentiated* NK-Zellen zur besseren Unterscheidung für CD56^{dim} CD16⁻ NKG2A⁺ NK-Zellen verwendet wird. Bereits in verschiedenen Studien wurde auf Erkenntnissen von Azzi et al. basierend vermutet, dass die CD56^{dim} NKG2A⁺ KIR⁻ NK-Zell-Subpopulation maßgeblich an der Immunantwort gegen EBV beteiligt sein könnte (Azzi et al., 2014; Hatton et al., 2016; Lam et al., 2020). Dieses NK-Zellkompartiment machte in der von Azzi untersuchten Kohorte bis zu 60 Prozent der CD56⁺ CD3⁻ Zellen aus und war zusammen mit den reiferen CD56^{dim} CD16⁺ KIR⁺ NK-Zellen der häufigste NK-Phänotyp im peripheren Blut während der frühen EBV-IM (Azzi et al., 2014). Auch in der von mir untersuchten Kohorte machten die reifen CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen den weitaus größten Anteil der NK-Zellen aus. Auffällig war jedoch der deutliche Unterschied im Anteil der sogenannten *early-differentiated* CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen. Zwar wurden die *early-differentiated* NK-Zellen von Azzi et al. nicht primär nach ihrer Expression von CD16 selektiert, allerdings wurde beobachtet, dass im Rahmen der NK-Zelldifferenzierung NKG2A meist auf CD16⁻ NK-Zellen exprimiert wird und seltener auf den differenzierteren CD16⁺ NK-Zellen (Di Vito, Mikulak, & Mavilio, 2019; Freud, Mundy-Bosse, Yu, & Caligiuri, 2017). Es ist also davon auszugehen, dass im Falle einer Expression von NKG2A auf CD56^{dim} NK-Zellen, diese in erster Linie auf CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen stattfindet. Wie auch bei Azzi et al. sah man in der von mir untersuchten Kohorte eine Reduktion des Anteils der CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen von v1 zu v2, allerdings wiesen maximal sechs Prozent der NK-Zellen diesen Phänotyp auf, der damit eine der kleinsten NK-Zell-Subpopulationen in der IMMUC-Pilotkohorte ausmachte.

Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte in der unterschiedlichen Methodik liegen. Während für meine Dissertation frisch isolierte PBMC verwendet wurden, analysierten Azzi et al. wie auch Lam et al. kryokonservierte Proben (Azzi et al., 2014; Lam et al., 2020). Ein Problem hierbei ist, dass NK-Zellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion, wie z.B. während einer akuten EBV-IM, besonders empfindlich gegenüber einer Kryokonservierung sind. Lugthart et al. beobachteten eine deutliche Zunahme des

Anteils der CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen bei Patient:innen nach Stammzelltransplantation in kryokonservierten Zellen im Vergleich zu frischen PBMC (Lugthart, van Ostaijen-ten Dam, van Tol, Lankester, & Schilham, 2015). Auch Mark et al. konnten eine Abnahme in der Expression von CD16 auf NK-Zellen nach Kryokonservierung feststellen. Zusätzlich kam es in der von Mark et al. untersuchten Kohorte zu einer deutlichen Reduktion der NK-Zellvermittelten Zytotoxizität durch das Einfrieren der Zellen (Mark et al., 2020). Eine Rolle der CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen in der NK-Zellantwort auf eine akute symptomatische EBV-Primärinfektion ist unbestritten. So konnten Azzi et al. zeigen, dass die früh-differenzierten NK-Zellen während der frühen EBV-IM im Vergleich zu den anderen NK-Subpopulationen vermehrt proliferierten und lytisch infizierte B-Zellen erkennen konnten (Azzi et al., 2014). Allerdings ist in Anbetracht der verzerrenden Wirkung des Einfrierprozesses eine Überschätzung des Effektes denkbar. Um eine möglichst valide *in vitro* Analyse der NK-Zellantwort während der akuten EBV-IM zu ermöglichen, wäre daher die Verwendung frischer PBMC besser geeignet. Wichtig bei der Betrachtung der Expression von NKG2A wäre außerdem eine klare Differenzierung zwischen CD16⁺ und CD16⁻ NK-Zellen, um eine Falschzuordnung der NKG2A⁺ NK-Zellen zu vermeiden. Zusätzlich sollte im Rahmen des *Gatings* ein Ausschluss CD14-positiver Zellen erfolgen, um CD56-positive Monozyten möglichst nicht mit in die Analyse einzuschließen (vgl. Kapitel 4.2).

Der mit rund 80 Prozent der NK-Zellen weitaus größte Anteil innerhalb der von mir untersuchten Kohorte waren die CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen. Während der frühen EBV-IM blieb die Frequenz dieser NK-Subpopulation stabil. Von v1 zu v2 nahm die Expression des terminalen Differenzierungsmarkers CD57 signifikant zu, woraus man schließen konnte, dass eine EBV-Infektion die terminale Differenzierung von NK-Zellen anregte. Man geht davon aus, dass der Marker CD57 neben der terminalen NK-Zelldifferenzierung auch als eine Art NK-Zell Gedächtnismarker fungiert (Min-Oo & Lanier, 2014), daher könnte man davon ausgehen, dass diese NK-Zell-Subpopulation langfristig an der Kontrolle der EBV-Infektion beteiligt ist. Bei Patient:innen mit PTLD, die keine suffiziente Immunantwort auf eine latente EBV-Infektion haben, war die Frequenz der CD57⁺ NK-Zellen im Vergleich zu Patient:innen mit EBV-IM deutlich geringer (Lam et al., 2020). Insbesondere bei Patient:innen, die über lange Zeit Symptome einer EBV-IM aufweisen, könnte diese NK-Zell-Subpopulation dementsprechend relevant sein.

4.5 Vorkommen von CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen während der frühen EBV-IM

Bei der Analyse der NK-Zell-Subpopulationen fiel auf, dass in der IMMUC-Pilotkohorte der zweitgrößte Anteil der NK-Zellen aus CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen bestand. Diese Subpopulation wird auch vermehrt im Rahmen anderer viraler Infektionen beobachtet. Zuerst fiel bei Analysen von NK-Zellen HIV-infizierter Patient:innen auf, dass CD56⁻ NK-Zellen deutlich häufiger nachweisbar waren als bei gesunden Kontrollproband: innen (Hu et al., 1995). Auch im Rahmen chronischer Hepatitis C-Infektionen traten

CD56⁺ NK-Zellen gehäuft auf, insbesondere bei therapierefraktären Krankheitsverläufen (Björkström, Ljunggren, & Sandberg, 2010; Gonzalez et al., 2009). In Bezug auf die CD56⁺ NK-Zellen während einer Infektion mit EBV ist bisher wenig bekannt. Eine deutliche Zunahme dieser NK-Subpopulation wurde bei Patient:innen, die an dem endemischen, EBV-assoziierten Burkitt-Lymphom erkrankt waren, festgestellt. Vor allem bei Patient:innen mit einer hohen EBV-Last war die Frequenz der CD56⁺ NK-Zellen deutlich höher als bei gesunden Kindern (Forconi et al., 2018). In einer anderen Untersuchung der CD56⁺ NK-Zellen bei EBV/CMV-Ko-Infizierten über sechzig Jährigen wurde ebenfalls eine erhöhte Frequenz im Vergleich zu jüngeren Kontrollproband:innen festgestellt. Bei den älteren Proband:innen war die CD56⁺ NK-Zellfrequenz vor allem bei einer Ko-Infektion mit CMV erhöht, bei den Jüngeren machte eine zusätzliche Infektion mit CMV keinen Unterschied (Müller-Durovic, Grählert, Devine, Akbar, & Hess, 2019). Auch bei EBV-assoziiierter PTLD lagen die CD56⁺ NK-Zellen in höheren Frequenzen vor als bei Gesunden (Wiesmayr et al., 2012).

Die bisherige Datenlage zur Frequenz der CD56⁺ NK-Zellen bei gesunden Kindern ist allerdings noch dürftig, da in den oben genannten Studien entweder erwachsene Kontrollproband:innen analysiert wurden oder die Kohorten gesunder Kontrollproband:innen klein waren (weniger als zehn untersuchte Kinder). Daher ist eine genaue Einordnung der Frequenz CD56⁺ NK-Zellen während der frühen EBV-IM schwierig. Forconi et al. sahen bei kaukasischen Erwachsenen Frequenzen von CD56⁺ NK-Zellen von weniger als fünf Prozent. Bei gesunden kenianischen EBV-seropositiven Kindern machten die CD56⁺ NK-Zellen dagegen bis zu zehn Prozent der NK-Zellen aus, ähnlich wie in der von mir untersuchten Kohorte (Forconi et al., 2020). In Burkitt-Lymphom Endemiegebieten wie Kenia erfolgt eine Durchseuchung mit EBV meist bereits innerhalb der ersten beiden Lebensjahre (Piriou et al., 2012). Man kann also davon ausgehen, dass die Kontrollkohorte von Forconi et al. bereits mit EBV durchseucht war. Lässt man den Aspekt der ethnischen Herkunft hier außer Acht wäre also davon auszugehen, dass nach einer Infektion mit EBV die Frequenz der CD56⁺ NK-Zellen auch nach Abklingen der lytischen Infektion während der Latenzphase stabil blieb. Das wurde von meiner Beobachtung gestützt, dass es in der IMMUC-Pilotkohorte zwar von v1 zu v2 zu einer leichten Abnahme der Frequenz kam, diese aber nur sehr gering ausgeprägt war, und die Frequenz der CD56⁺ NK-Zellen während der frühen EBV-IM im Median weitestgehend stabil blieb.

In der von mir untersuchten Kohorte fiel außerdem auf, dass das Alter moderat negativ mit der Frequenz der CD56⁺ NK-Zellen korrelierte. Dies passte zu den Beobachtungen von Jacobson et al., die besonders hohe Frequenzen dieser NK-Subpopulation im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener beschrieben (Jacobson et al., 2013). Bei Frühgeborenen fiel auf, dass Kinder, die eine *late-onset* Sepsis entwickelten, niedrigere Frequenzen von CD56⁺ NK-Zellen hatten als gesunde Frühgeborene (Bochennek et al., 2016). Da eine EBV-Infektion im jüngeren Kindesalter meist asymptomatisch erfolgt,

könnten höhere Frequenzen von CD56⁻ NK-Zellen in diesen Kindern zur Kontrolle der EBV-Infektion beitragen. Eine detaillierte Analyse der Funktion von CD56⁻ NK-Zellen im Rahmen einer EBV-IM wäre daher interessant. Bisher liegen nur wenige Daten zur Funktion dieser NK-Zell-Subpopulation vor. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass es sich eher um eine NK-Zell-Subpopulation handelt, die in ihrer antiviralen Funktionalität eingeschränkt ist, da in Untersuchungen zu HIV und CMV gezeigt werden konnte, dass sowohl die zytotoxische Funktion als auch die Fähigkeit zur Zytokin-Ausschüttung im Vergleich zu den anderen NK-Zell-Subpopulationen verringert war (Mavilio et al., 2005; Müller-Durovic et al., 2019). Neuere Untersuchungen stellten diese Sichtweise jedoch in Frage. In HIV-Infizierten wurde gezeigt, dass CD56⁻ NK-Zellen vermehrt IL-10 und TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor β , *Transforming growth factor β*) exprimierten und so eine verminderte Produktion von IFN- γ durch CD8 T-Zellen bewirkten. Die Autoren schlossen daraus, dass diese NK-Zell-Subpopulation vor allem eine regulatorische Funktion einnahm (Ma et al., 2019). Ein Zusammenhang zwischen der Frequenz der CD56⁻ NK-Zellen und der Expression von IFN- γ durch EBV-spezifische CD8 T-Zellen bestand in der von mir untersuchten Kohorte nicht, allerdings wäre auch hier eine Analyse der gesamten IMMUC-Kohorte im Hinblick auf diese Korrelation interessant. Weitere Erkenntnisse von Forconi et al. stellten ebenfalls die Darstellung der CD56⁻ NK-Zellen als dysfunktionale Zellfraktion in Frage. Basierend auf Erkenntnissen aus der bereits oben genannten EBV-BL-Kohorte, postulierten sie, dass zwar die direkte Zytotoxizität der CD56⁻ NK-Zellen vermindert war, dass das zytotoxische Potential dieser Subpopulation jedoch, anders als bei den CD56^{dim} NK-Zellen, in erster Linie auf einer antikörpervermittelten Zytotoxizität beruhte (Forconi et al., 2020). Dies könnte auch im Hinblick der Funktion im Rahmen einer akuten Infektion mit EBV interessant sein, da in einer Fallstudie eine Defizienz in der antikörpervermittelten Zytotoxizität (ADCC) von NK-Zellen mit einer CAEBV in Zusammenhang gebracht wurde (Pérez-Portilla et al., 2020). Die NK-Zellvermittelte ADCC führte im Rahmen einer EBV-Infektion vor allem zur Lyse lytisch EBV-infizierter B-Zellen und trug so zur Immunkontrolle der Infektion bei (López-Montañés et al., 2017).

Zusammenfassend ließ sich also feststellen, dass CD56⁻ NK-Zellen auch im Rahmen einer EBV-Primärinfektion vermehrt im peripheren Blut nachweisbar waren. Diese Frequenzzunahme begann bereits während der frühen Phase der EBV-IM und blieb im Rahmen der latenten Infektion auf einem ähnlichen Niveau. In Bezug auf die Funktion der CD56⁻ NK-Zellen während chronischer viraler Infektionen besteht noch weitestgehend Unklarheit. Möglicherweise sind CD56⁻ NK-Zellen im Rahmen einer EBV-Infektion jedoch nicht wie bisher angenommen als dysfunktional zu sehen, sondern erfüllen im Gegenteil eine immunregulatorische Rolle und führen mittels NK-vermittelter ADCC zu einer besseren Kontrolle der EBV-Infektion. Eine detailliertere Analyse dieser NK-Zell-Subpopulation in Bezug auf ihre Funktionalität während einer EBV-Infektion wäre der nächste Schritt, um diese

Hypothese zu überprüfen. Interessant wäre auch eine Betrachtung der Frequenz der CD56⁻ NK-Zellen bei asymptomatischer EBV-Primärinfektion, bzw. eine Analyse innerhalb einer gesunden pädiatrischen Kohorte.

4.6 HLA-DR wurde vor allem auf früh-differenzierten und CD56⁻ NK-Zellen exprimiert

HLA-DR gehört zur Untergruppe der MHC-II Moleküle und wurde initial als Aktivierungsmarker auf T-Zellen beschrieben (Linardopoulos, Corrigall, & Panayi, 1992; Salgado et al., 2002). Neben T-Zellen können aber auch NK-Zellen im Zuge einer Aktivierung, z.B. im Rahmen unterschiedlicher Infektionen, HLA-DR exprimieren (Benlahrech et al., 2009; Evans et al., 2011; Kust et al., 2021). Während es immer wieder neue Erkenntnisse zu HLA-DR⁺ NK-Zellen bei HIV-Infektion oder im autoinflammatorischen Setting gibt, ist bisher wenig zum Vorkommen während Infektionen mit Herpesviren bekannt, insbesondere gibt es noch keine Daten zu HLA-DR⁺ NK-Zellen bei einer Infektion mit EBV (Luo et al., 2017; Ng et al., 2009; Rinaldi et al., 2006; Yano, Endoh, Nomoto, Sakai, & Rifai, 1996).

Bei gesunden Erwachsenen lag die Frequenz der HLA-DR⁺ NK-Zellen im Bereich zwischen Null und 37 Prozent. Diese zum Teil sehr hohen Frequenzen könnten mit einer latenten CMV-Infektion der gesunden Proband:innen erklärbar sein, da bei einer Infektion mit CMV die Frequenz der HLA-DR⁺ NK-Zellen im peripheren Blut im Vergleich zu CMV-Seronegativen Personen erhöht war (Costa-García et al., 2019; Erokhina et al., 2021). Daher gingen die Autor:innen davon aus, dass bei gesunden Personen ohne CMV-Co-Infektion der Anteil der HLA-DR⁺ NK-Zellen eher im einstelligen Prozentbereich lag (Erokhina et al., 2018). Erokhina et al. analysierten in einer Gruppe 30 gesunder Proband:innen die Expression von HLA-DR auf NK-Zellen. Auffällig war hier, dass vor allem unreife CD56^{bright} NK-Zellen HLA-DR exprimierten (Erokhina et al., 2018). In der von mir untersuchten Kohorte wurde HLA-DR dagegen vor allem auf CD56^{dim} CD16⁻ und CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen exprimiert, also zwei NK-Subpopulationen die mutmaßlich eine zentrale Rolle in der Immunantwort auf EBV spielen. Insbesondere an v1 war die Frequenz der HLA-DR⁺ NK-Zellen erhöht und nahm an v2 in beiden NK-Subpopulationen signifikant ab. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte die ungleiche Proliferation verschiedener NK-Subpopulationen bei bestimmten viralen Infektionen sein. In der von Erokhina et al. untersuchten Kohorte fiel auf, dass in einer Proband:innengruppe mit besonders hohen Frequenzen HLA-DR-positiver NK-Zellen (HLA-DR-Expression auf mehr als fünf Prozent der NK-Zellen) im Gegensatz zu der Vergleichsgruppe vor allem CD56^{dim} CD57⁺, also terminal differenzierte NK-Zellen HLA-DR exprimierten (Erokhina et al., 2018). Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, war das die NK-Subpopulation, die bei einer Infektion mit CMV bevorzugt proliferierte (Lopez-Vergès et al., 2011). Costa-Garcia et al. stellten außerdem fest, dass diese NK-Subpopulation bei CMV-Infizierten deutlich häufiger HLA-DR exprimierten als bei gesunden Vergleichspersonen. Die Expression von HLA-DR war dabei unabhängig von der NK-Zellreifung und Expression anderer Aktivierungsmarker (Costa-García et

al., 2019). Man könnte im Umkehrschluss aus dieser Beobachtung schließen, dass auch bei einer Infektion mit EBV die Expression von HLA-DR vor allem bei den bevorzugt proliferierenden NK-Subpopulationen, wie beispielsweise den CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen hochreguliert wird. Die Stimuli, die im inflammatorischen Setting zu einer Expression von HLA-DR auf NK-Zellen führen, sind noch nicht vollständig untersucht. Zytokine wie z.B. IL-2 schienen hier einen Einfluss zu haben, oder auch die Interaktion mit anderen Immunzellen (Chaput et al., 2013; Erokhina et al., 2018; Evans et al., 2011; Loyon et al., 2016). Man könnte also vermuten, dass jene Faktoren, die zu einer NK-Zellproliferation im Rahmen inflammatorischer Prozesse führten, auch die Expression von HLA-DR auf NK-Zellen begünstigten.

Die Funktion dieser HLA-DR⁺ NK-Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Expression von HLA-DR schien mit einer vermehrten Ausschüttung von IFN- γ und einer erhöhten proliferativen Kapazität einherzugehen (Evans et al., 2011; Streltsova et al., 2019; Yano et al., 1996). Zusätzlich konnten HLA-DR⁺ NK-Zellen Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und so eine T-Zellantwort induzieren (Burt et al., 2008; Costa-García et al., 2019; Voynova et al., 2015). In der von mir untersuchten Kohorte fiel auf, dass die Frequenz der CD56^{dim} CD16⁻ HLA-DR⁺ NK-Zellen vor allem an v1 negativ mit der EBV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz nach Stimulation mit BZLF1 korrelierte. Zusätzlich fiel ein moderat positiver Zusammenhang der EB-VLP stimulierten CD8 T-Zellen auf. Insbesondere die positive Korrelation zu den EBV-spezifischen CD8 T-Zellen könnte von Interesse sein. Denn die EBV-spezifischen CD8-T-Zellen expandierten mit dem Beginn der EBV-IM typischen Symptomatik (Hislop, 2015). Hohe Frequenzen von HLA-DR⁺ NK-Zellen, die vor allem zu Beginn der frühen EBV-IM vorlagen, könnten dementsprechend eine Expansion des CD8 T-Zellkompartimentes begünstigen und so zur Entwicklung von Symptomen einer EBV-IM beitragen. Eine detaillierte Analyse dieser NK-Zell-Subpopulation und eine Korrelation zu Krankheitsschwere wäre im Rahmen der Analyse der gesamten IMMUC-Kohorte interessant, da auch die HLA-DR⁺ NK-Zellen möglicherweise ein Biomarker für die Schwere einer EBV-IM darstellen könnten.

4.7 Zusammenfassung: NK-Zellantwort während der frühen EBV-IM

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Analyse der NK-Zellantwort während der frühen EBV-IM in der Pilot-Kohorte der IMMUC-Studie vergleichbare Ergebnisse erzielte, wie sie zum Teil bereits in anderen Studien zu diesem Thema erhoben wurden. Dies ließ darauf schließen, dass die verwendete Methodik für die zu Grunde gelegte Fragestellung valide war. Zusätzlich wurden durch die detaillierte Analyse neuer Oberflächenmarker, bisher im Kontext einer EBV-Infektion nicht untersuchter NK-Zell-Subpopulationen und der Korrelation zur EBV-spezifischen T-Zellantwort vielversprechende neue Ansätze gefunden, die richtungsweisend für die Identifikation neuer Biomarker zur Einschätzung des Verlaufes einer EBV-IM sein könnten.

Bei der Verarbeitung des Zellmaterials fiel auf, dass eine Analyse frischer PBMC Vorteile gegenüber kryokonserviertem Material hatte, da einzelne NK-Subpopulationen in kryokonservierten Proben in Frequenz und Funktion zum Teil verändert waren. Vor allem bei den sogenannten *early-differentiated* NK-Zellen könnte eine Kryokonservierung falsch-hohe Frequenzen und eine Überschätzung der zytotoxischen Funktion bewirken. Auch zeigten die Analysen, dass ein Ausschluss CD14-positiver Zellen vor dem NK-Zell-*Gating* sinnvoll wäre, um CD56-positive Monozyten nicht in die Analyse der NK-Zellen miteinzubeziehen.

Bezüglich der Identifikation möglicher Biomarker für einen schweren bzw. protrahierten Verlauf der EBV-IM wurden mehrere NK-Subpopulationen identifiziert, auf die bei der Analyse der gesamten IMMUC-Kohorte ein besonderes Augenmerk gelegt werden sollte. Zum einen fiel eine negative Korrelation der CD56^{bright} NK-Zellen zur EBV-spezifischen CD8 T-Zellantwort auf, was möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Hyperinflammation im Rahmen einer EBV-IM hatte. Zum anderen fiel eine erhöhte Frequenz von CD56⁻ NK-Zellen während der frühen EBV-IM auf. Die funktionelle Bedeutung dieser Expansion ist allerdings noch unklar. Ein protektiver Effekt insbesondere in Bezug auf die Protraktion einer EBV-IM wäre beispielsweise denkbar. Zu guter Letzt wäre auch eine detaillierte Analyse der HLA-DR⁺ NK-Zellen interessant, da vermutlich vor allem die stärker proliferierenden NK-Subpopulationen diesen Marker exprimierten und die Frequenz von HLA-DR⁺ NK-Zellen zum Teil positiv mit der Frequenz EBV-spezifischer CD8 T-Zellen korrelierte. Möglicherweise könnten diese HLA-DR⁺ NK-Zellen ein Marker für die Entwicklung schwererer Symptome während einer EBV-IM sein.

4.8 Frequenz der EBV-spezifischen T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM

Neben den stellvertretend für die angeborene Immunantwort untersuchten NK-Zellen, wurden auch die EBV-spezifischen T-Zellen stellvertretend für die adaptive Immunantwort während einer EBV-Infektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Im Rahmen von Primärinfektionen mit EBV kommt es zum Teil zu gravierenden Änderungen im T-Zellkompartiment der infizierten Personen (Rickinson et al., 2014). Insbesondere die zytotoxischen CD8 T-Zellen expandierten im Rahmen der EBV-IM zum Teil massiv und führten einerseits zu einer effizienten Kontrolle der Infektion, andererseits aber auch zu einer Hyperinflammation, die sich negativ auf den Krankheitsverlauf auswirkte (Rickinson et al., 2014; Taylor et al., 2015). Bei der Analyse der IMMUC-Pilotkohorte fiel auf, dass sich die Frequenzen EBV-spezifischer T-Zellen bereits während der frühen EBV-IM deutlich veränderten. Während der ersten zwei Monate nach Symptombeginn nahm die Frequenz EBV-spezifischer CD4 T-Zellen zu, während die Frequenz der CD8 T-Zellen abnahm. Dies passte zu früheren Beobachtungen, dass EBV-spezifische CD8 T-Zellen erst wenige Tage vor Beginn der IM-typischen Symptome expandierten und innerhalb von ca. 50 Tagen nach Symptombeginn wieder auf das Niveau vor der EBV-Infektion fielen (Balfour, Odumade,

et al., 2013; Dunmire, Grimm, et al., 2015). Die erhöhte Frequenz CD8-positiver T-Zellen bei gleichzeitig verminderter CD4 T-Zellfrequenz spiegelte sich in einem inversen CD4/CD8-Verhältnis wider. Dieses war bei gesunden Proband:innen in der Regel größer als 1 (Luz Correa et al., 2014). In der von mir untersuchten Kohorte dagegen war das CD4/CD8-Verhältnis in den meisten Fällen (ca. 78 Prozent) kleiner als 1, was auf eine Störung im T-Zellkompartiment während der EBV-IM hindeutete und von anderen Gruppen ebenfalls beschrieben wurde (Sulik, Oldak, Kroten, Lipska, & Radziwon, 2014). Schon an v2 normalisierten sich die Frequenz der CD8 T-Zellen und das CD4/CD8-Verhältnis meist wieder. In wenigen Fällen zeigte sich keine abnehmende Tendenz der CD8 T-Zellzahlen und das CD4/CD8-Verhältnis blieb auch im weiteren Verlauf der EBV-IM kleiner als 1. Auffällig war dies vor allem bei einer Person, welche an v2 weiterhin ein CD4/CD8-Verhältnis deutlich unter 1 (0,39) aufwies. Bemerkenswert war hier, dass die betroffene Person einen besonders schweren Krankheitsverlauf und letztendlich eine HLH entwickelte. Passend zu dieser Beobachtung ist in der Literatur beschrieben, dass ein vermindertes CD4/CD8-Verhältnis unter anderem mit einer verfrühten Immunoseneszenz bei Infektionen mit HIV assoziiert war und ein längerfristig bestehendes inverses CD4/CD8-Verhältnis mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einherging (Khan et al. 2002; Sainz et al., 2013). Aufgrund der kleinen Größe der IMMUC-Pilotkohorte konnte nur eine Tendenz festgestellt werden, aber bei der Auswertung der gesamten IMMUC-Kohorte wäre eine Korrelation des CD4/CD8-Verhältnisses mit der Krankheitsschwere möglicherweise aufschlussreich.

Wie bereits erwähnt, gehen die Änderungen im T-Zellkompartiment vor allem von einer massiven CD8 T-Zellexpansion aus (Rickinson et al., 2014). Am ersten Studienzeitpunkt machten die CD8-positiven T-Zellen in der von mir untersuchten Kohorte einen Anteil von bis zu 75 Prozent der CD3 T-Zellen aus. Eine solche Zunahme der Frequenz EBV-spezifischer CD8 T-Zellen konnte bei Personen mit einer asymptomatischen EBV-Primärinfektion dagegen nicht beobachtet werden (Silins et al., 2001). Interessant ist, dass lediglich in der sehr frühen Phase der Infektion (v1) in der untersuchten Kohorte ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen Δv_{onset} und der Frequenz der CD8 T-Zellen festzustellen war, an v2 bereits nicht mehr. Direkt nach Symptombeginn schien innerhalb eines Tages bereits eine deutliche Reduktion der CD8-T-Zellfrequenz stattzufinden, im späteren Verlauf hingegen schritt die Abnahme der CD8 T-Zellfrequenz langsamer voran. Ein ähnlicher Effekt war auch bei der Korrelation der CD8 T-Zellfrequenz zur Viruslast ersichtlich. Während die Viruslast in Zellfraktion und Plasma an v1 signifikant positiv mit der CD8 T-Zellfrequenz korrelierte, war dies an v2 nicht der Fall. Die positive Korrelation von Viruslast und CD8 T-Zellfrequenz wurde auch bei Untersuchungen zur EBV-Primärinfektion amerikanischer College-Studenten festgestellt (Balfour, Odumade, et al., 2013). Die Beobachtung, dass vor allem kurz nach Symptombeginn deutliche Änderungen der EBV-Last und im CD8 T-Zellkompartiment stattfanden, wurde in einer Studie zur Inkubationszeit einer primären EBV-Infektion bestätigt (Dunmire, Grimm, et al., 2015). Hier wurde gezeigt, dass sowohl die EBV-Last als

auch die CD8 T-Zellfrequenz mit Beginn der Symptome zunächst stark anstiegen und innerhalb der ersten 50 Tage nach Symptombeginn deutlich abfielen (Dunmire, Grimm, et al., 2015). In der IMMUC-Pilotkohorte fand im Median bereits nach zwölf Tagen eine deutliche Reduktion von CD8 T-Zellzahl und Viruslast statt. Wenn man davon ausgehen darf, dass die Symptomschwere mit der CD8 T-Zellfrequenz bzw. Viruslast in der frühen Phase der EBV-IM einhergeht (Balfour, Odumade, et al., 2013), wäre es gegebenenfalls möglich, anhand der Daten einer größeren Kohorte Grenzwerte für CD8 T-Zellfrequenz bzw. Viruslast zu definieren, bei deren Überschreitung ein schwererer oder prolongierter Verlauf der EBV-IM zu erwarten ist. Eine detaillierte Analyse mit der Fragestellung, ob hohe CD8 T-Zellfrequenzen zu Beginn der Symptomatik eine Auswirkung auf die Krankheitsschwere haben, oder ob dieser Effekt erst bei anhaltend hohen CD8 T-Zellfrequenzen im Krankheitsverlauf beobachtbar ist, wäre bei Betrachtung der gesamten IMMUC-Kohorte von Interesse. Sollte sich die Theorie bestätigen, könnte man die Erkenntnisse in das Therapieregime bei Patient:innen mit schwerem Krankheitsverlauf einfließen lassen und gegebenenfalls frühzeitig eine immunmodulatorische Therapie beginnen.

4.9 Gesamtzytokinexpression EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation mit BZLF1, EBNA3A und EB-VLP

Um eine detaillierte Analyse der EBV-spezifischen T-Zellen zu ermöglichen, wurden anschließend die EBV-reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen identifiziert, indem die Gesamtzytokinexpression nach Stimulation mit unterschiedlichen EBV-Antigenen (*T-activated* BZLF1 und EBNA3A, sowie EB-VLP) mittels Durchflusszytometrie-basierter Analyse bestimmt wurde.

In der im Rahmen meiner Doktorarbeit untersuchten Kohorte wurde bestätigt, dass sowohl durch *T-activated* Proteine als auch EB-VLP zuverlässig eine CD4 und CD8 T-Zellantwort hervorgerufen wurde (Barabas et al., 2008; Körber, Behrends, Protzer, & Bauer, 2020; Ruiss et al., 2011). Mit EB-VLP wurde die höchste *response rate* (min. 72 %) innerhalb der Kohorte erreicht, d.h. bei mindestens 72 % der untersuchten Patient:innen eine EBV-spezifische T-Zellantwort detektiert. In der Kombination der drei EBV-Stimulationsantigene erreichte man eine T-Zellantwort in nahezu allen Patient:innen der Kohorte. Der höchste Anteil reaktiver Patient:innen wurde durch eine Kombination von EB-VLP mit BZLF1 erlangt. Interessanterweise brachte eine Kombination aller drei Antigene keinen Vorteil gegenüber der Kombination von EB-VLP und BZLF1 in Bezug auf die *response rate*. Nach Stimulation mit EBNA3A war bei weniger als der Hälfte der untersuchten Patient:innen eine CD4 oder CD8 T-Zellantwort detektierbar, weshalb dieses Antigen allein nicht zum Monitoring der T-Zellantwort während der frühen EBV-IM geeignet war. Für zukünftige Analysen wäre angesichts der mittels der IMMUC-Pilotkohorte erhobenen Daten im Falle einer geringen Zellzahl nach Aufbereitung der

Patient:innenproben eine Stimulation mit EB-VLP als alleinigem Stimulations-Antigen vorstellbar, da eine sehr gute *response rate* erreicht wurde.

Bei Betrachtung der individuellen Frequenzen der CD4 und CD8 T-Zellantworten nach Stimulation mit BZLF1, EBNA3A und EB-VLP wurde erkennbar, dass durch EB-VLP nicht nur die höchste *response rate*, sondern auch im Median die höchste Gesamtzytokinexpression hervorgerufen wurde. Die Gesamtzytokinexpression nach Stimulation mit EBNA3A war lediglich bei vereinzelt Patient:innen nennenswert. Dies passte zur Beobachtung von Lam et al., dass eine EBNA3A-spezifische T-Zellantwort bei IM-Patient:innen in der Regel erst ca. drei Monate nach Infektion nachweisbar war (Lam et al., 2018). Betrachtete man dagegen die EB-VLP spezifische T-Zellantwort, fiel auf, dass bereits am ersten Studienzeitpunkt die Gesamtzytokinexpression im Vergleich zu den anderen beiden Stimulationsantigenen ein hohes Niveau hatte. Eine sehr frühe Immunantwort nach Stimulation mit EB-VLP konnte auch *ex vivo* festgestellt werden, wo bereits fünf Tage nach Infektion der Zellkultur auffiel, dass EB-VLP-spezifische T-Zellen eine Infektion von B-Zellen mit EBV effektiver reduzierten als die zum Vergleich verwendeten gp350-spezifischen T-Zellen (van Zyl et al., 2018). Im Unterschied zu den Analysen von van Zyl et al., die nach Stimulation mit EB-VLP vor allem eine CD4 T-Zellantwort und nur in geringerem Ausmaß eine CD8 T-Zellantwort auf EB-VLP beobachteten, war die Gesamtzytokinexpression von CD4 und CD8 T-Zellen in der von mir untersuchten Kohorte ähnlich hoch. Eine Erklärung hierfür wäre, dass van Zyl et al. die T-Zellantwort anhand der Expression von IFN- γ beurteilten. Betrachtete man die Funktionalität der EB-VLP-spezifischen CD4 bzw. CD8 T-Zellen in der von mir untersuchten Kohorte, wurde ersichtlich, dass zwar die CD4 T-Zellen zu einem Großteil IFN- γ exprimierten, die CD8 T-Zellen jedoch in ähnlichem Ausmaß IL-2 und TNF. Bei alleiniger Betrachtung von IFN- γ schienen die CD4 T-Zellen dementsprechend eine höhere Gesamtzytokinexpression nach Stimulation mit EB-VLP aufzuweisen, was die Relevanz eines Monitorings von mehr als einem Zytokin zur besseren Beurteilung der Immunantwort unterstrich.

Während die Gesamtzytokinexpression nach Stimulation mit EB-VLP bereits am ersten Studienzeitpunkt vergleichsweise hoch war, zeigte sich nach Stimulation mit BZLF1 eine signifikante Zunahme der Gesamtzytokinexpression BZLF1-reaktiver CD8 T-Zellen vom ersten zum zweiten Studienzeitpunkt. Bei den BZLF1-spezifischen CD4 T-Zellen änderte sich die Höhe der Gesamtzytokinexpression im Verlauf der frühen EBV-IM dagegen kaum. Diese Beobachtung stand im Kontrast zu T-Zellanalysen bei EBV-IM Patient:innen von Scherrenburg et al., die die höchste Expression von IFN- γ bei CD4 T-Zellen nach Stimulation mit einem BZLF1-Peptidpool sahen (Scherrenburg et al., 2008). Dieser Unterschied könnte der Tatsache geschuldet sein, dass Scherrenburg et al. die T-Zellen vor der Analyse expandierten, was zu einer höheren Gesamtzytokinexpression führte als bei T-Zellen ohne vorherige Expansion (Piriou et al., 2005;

Scherrenburg et al., 2008). Zusätzlich wurde auch bei Scherrenburg et al. lediglich die Expression von IFN- γ berücksichtigt, was den Unterschied zu den Daten IMMUC Pilot-Kohorte ebenfalls erklären könnte.

Ein erschwerender Faktor beim Immunmonitoring einer EBV-IM ist die variable Genexpression während einer EBV-Infektion (vgl. Kapitel 1.2.3). EB-VLP schienen ein angemessenes Stimulationsantigen zu liefern, um bereits in der akuten bzw. sehr frühen Infektionsphase EBV-spezifische T-Zellen zu identifizieren, während BZLF1-spezifische T-Zellantworten meist am zweiten Studienzeitpunkt im Median 32 Tage nach Symptombeginn detektierbar waren. Nach Stimulation mit EBNA3A war nur bei vereinzelt Patient:innen während des untersuchten Zeitraums eine Zytokinexpression detektierbar. Dies passte zu Untersuchungen von Scherrenburg et al. und Lam et al., in denen erst im späteren Infektionsverlauf eine Zunahme EBNA3A-reaktiver T-Zellen festgestellt werden konnte (Lam et al. 2018; Scherrenburg et al., 2008). Insgesamt wurde durch die Erkenntnisse aus der IMMUC-Pilotkohorte die Relevanz eines differenzierten Immunmonitorings deutlich. Vor allem wurde klar, dass ein Monitoring der IFN- γ -Antwort allein für eine Analyse der CD8 T-Zellantwort nicht ausreichend war und nur durch die Bestimmung verschiedener Zytokine ein differenziertes Immunmonitoring möglich ist.

4.10 Analyse der Funktionalität EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM

Zusätzlich zur Höhe der Gesamtzytokinexpression der EBV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen wurde auch die Qualität der T-Zellantwort in Bezug auf die Funktionalität bzw. Fähigkeit der T-Zellen zur Expression verschiedener Zytokine analysiert. Häufig exprimierten T-Zellen nach Konfrontation mit einem Antigen nur ein Zytokin. Ein kleinerer Anteil der T-Zellen ist dagegen grundsätzlich polyfunktional, was bedeutet, dass er nach Stimulation mit einem Antigen zwei oder mehr Zytokine exprimiert. Diese polyfunktionalen T-Zellen nehmen eine besondere Rolle in der Immunantwort ein, da man davon ausgeht, dass diese zu einer effektiveren Immunkontrolle führen, beispielsweise im Rahmen einer HIV- Infektion (Betts et al., 2006). Auch bei einer Infektion mit EBV schienen polyfunktionale T-Zellen maßgeblich zu einer effektiven Immunkontrolle beizutragen (Ning et al., 2011). Ning et al. gingen davon aus, dass insbesondere in der langfristigen Kontrolle der EBV-Infektion polyfunktionale T-Zellen relevant waren, da bei Patient:innen mit PTLD, die keine suffiziente Immunantwort gegen EBV aufwiesen deutlich weniger polyfunktionale T-Zellen nachweisbar waren als bei EBV-Seropositiven gesunden Vergleichspersonen (Ning et al., 2011). Bei immunsupprimierten Patient:innen nach Lebertransplantation verhinderten polyfunktionale T-Zellen effektiv die Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion (Carvalho-Gomes et al., 2022). Die Autoren sahen eine prospektive Analyse der polyfunktionalen T-Zellen bei immunsupprimierten Patient:innen als

adäquates Mittel zur Einschätzung des Risikos für eine Reaktivierung latenter Infektionen an (Carvalho-Gomes et al., 2022).

In der im Rahmen meiner Doktorarbeit untersuchten Kohorte war der höchste Anteil polyfunktionaler T-Zellen nach Stimulation mit EBNA3A detektierbar. Allerdings basierte diese Beobachtung auf wenigen EBNA3A-reaktiven Patient:innen, die einen hohen Anteil polyfunktionaler T-Zellen aufwiesen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Patient:innen die bereits früh im Verlauf der EBV-IM reaktive T-Zellen gegenüber EBNA3A aufwiesen eine effektivere, da polyfunktionale T-Zellantwort gegen EBV etablieren konnten. In einer Untersuchung polyfunktionaler T-Zellantworten während einer Infektion mit EBV von Lam et al. rief eine Stimulation mit EBNA3A ebenfalls die höchste Frequenz polyfunktionaler T-Zellen hervor. Allerdings wurde dieser Effekt erst zwölf Monate nach Infektion mit EBV beobachtet und nicht bereits in der Frühphase (Lam et al., 2018). Bei Untersuchung der gesamten IMMUC-Kohorte könnten aufgrund der deutlich größeren Patient:innenanzahl weitere Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob alle Patient:innen, die bereits früh reaktiv gegenüber einer Stimulation mit EBNA3A sind, einen großen Anteil polyfunktionaler T-Zellen aufweisen und ob dies eventuell einen protektiven Effekt in Bezug auf die Schwere oder Protraktion der Erkrankung hat.

Unabhängig vom Stimulationsantigen konnte man in der IMMUC-Pilotkohorte eine Abnahme des Anteils polyfunktionaler CD4 und CD8 T-Zellen an der Gesamtzytokinexpression von v1 zu v2 beobachten. Im Falle der CD4 T-Zellen ging diese anteilmäßige Abnahme meist mit einer Abnahme der Zahl der Patient:innen einher, die polyfunktionale CD4 T-Zellen aufwiesen. Betrachtete man dagegen die CD8 T-Zellen fiel auf, dass nach Stimulation mit BZLF1 und EB-VLP zwar im Mittel der Anteil bi- und trifunktionaler Zellen abnahm, aber an v2 deutlich mehr Patient:innen polyfunktionale CD8 T-Zellen aufwiesen als am ersten Studienzeitpunkt, was die mittlere Abnahme in der Frequenz erklärte. Dies bedeutete, dass die meisten Patient:innen der untersuchten Kohorte innerhalb eines Monats nach Symptombeginn eine polyfunktionale CD8 T-Zellantwort etablierten. Dass der Anteil polyfunktionaler CD8 T-Zellen während des späteren Verlaufs einer EBV-Infektion zunahm, wurde auch in anderen Studien beobachtet (Lam et al., 2018). Ob es einen Zusammenhang zwischen einem späten Auftreten polyfunktionaler CD8 T-Zellen und der Schwere der Symptomatik der EBV-IM gibt, ist bisher allerdings nicht klar.

Zur Einschätzung der Funktionalität der EBV-spezifischen T-Zellen und der Qualität der T-Zellantwort wurden die Zytokinexpressionsmuster der EBV-spezifischen T-Zellen nach Stimulation mit BZLF1, EBNA3A und EB-VLP analysiert. Es konnte bereits bei verschiedenen Infektionskrankheiten, wie z.B. der viszeralen Leishmaniose oder COVID-19 eine Korrelation bestimmter Zytokinexpressionsprofile mit dem Verlauf bzw. der Schwere der Erkrankung festgestellt werden (Boyd et al., 2015; Ling et al., 2021; Rodrigues et al., 2021; Seder, Darrah & Roederer, 2008). In der IMMUC-Pilotkohorte zeigte sich, dass

die Zytokinexpressionsmuster nach Stimulation mit EB-VLP und BZLF1 ähnlich waren. Das Zytokinexpressionsmuster EBV-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit EBNA3A dagegen wies Unterschiede zu den anderen Stimulationsantigenen auf.

Das häufigste Expressionsprofil bifunktionaler CD4 T-Zellen nach Stimulation mit EB-VLP und BZLF1 in der IMMUC-Pilotkohorte war eine Koexpression von IFN- γ und TNF. Es konnte gezeigt werden, dass die Koexpression dieser beiden Zytokine, verglichen zur Expression eines der beiden Zytokine allein, zu einer verbesserten zytotoxischen Funktionalität bei Infektionen mit *Leishmania major* und *Mycobacterium tuberculosis* führte (Kamboj et al., 2020; Rodrigues et al., 2021). Auch schienen polyfunktionale T-Zellen mehr IFN- γ zu produzieren als T-Zellen, die nur IFN- γ exprimierten (Seder et al., 2008). In Bezug auf die T-Zelldifferenzierung nach Kontakt mit einem Antigen, konnte man IFN- γ - und TNF-exprimierende Zellen als Effektor-Gedächtniszellen einordnen, die vor allem zytotoxische Funktionen innehatten. Sie entstanden nach anhaltender Stimulation mit einem Antigen aus zentralen T-Gedächtniszellen (Seder et al., 2008). Auch die monofunktionalen CD4 T-Zellen exprimierten nach Stimulation mit BZLF1 und EB-VLP hauptsächlich IFN- γ , während die monofunktionalen CD8 T-Zellen neben IFN- γ in ähnlichem Maße IL-2 und TNF exprimierten. Wie bereits in Kapitel 4.9 diskutiert, war daher für eine Beurteilung der EBV-spezifischen CD8 T-Zellantwort ein Monitoring von IFN- γ als einzigem Zytokin nicht ausreichend.

Auch in Bezug auf die Qualität der T-Zellantwort ist grundsätzlich eine Analyse von mindestens drei Zytokinen sinnvoll (Seder et al., 2008). So zeigten Untersuchungen bei Patient:innen mit symptomatischer *Leishmania infantum chagasi* Infektion eine protektive Funktion IL-2 bzw. IL-2/TNF-koexprimierender CD8 T-Zellen vor allem im frühen Krankheitsverlauf (Barbosa Santos et al., 2017). Monofunktionale TNF-exprimierende CD8 T-Zellen dagegen waren bei brasilianischen Patient:innen, die an Lepra erkrankt waren, mit einer schwereren Symptomatik und einer stärkeren Inflammation assoziiert (Silva et al., 2019). Dementsprechend wäre bei Untersuchung der gesamten IMMUC-Kohorte interessant, ob die Expression von IL-2 bzw. TNF eventuell auch bei einer Infektion mit EBV Einfluss auf die Krankheitsschwere hat. In der IMMUC-Pilotkohorte zeichnete sich bereits ab, dass vor allem die Analyse EBV-spezifischer CD8 T-Zellen diesbezüglich aufschlussreich sein könnte.

Bei Betrachtung der EBNA3A-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellantwort fielen vor allem bifunktionale TNF und IL-2 koexprimierende CD4 und CD8 T-Zellen auf. Auch die monofunktionalen CD8 T-Zellen exprimierten vor allem IL-2. Dieser IL-2 exprimierende Phänotyp wurde häufig nach Impfungen beobachtet oder bei Infektionen, bei denen längerfristig ein Pathogen mit niedrigem Infektionslevel überdauerte (Seder et al., 2008). Diese T-Zellen, wie auch CD4 und CD8 T-Zellen die TNF und IL-2 koexprimierten, wurden zu den zentralen Gedächtniszellen gezählt, die zur Etablierung einer langfristigen Immunantwort beitragen konnten (Seder et al., 2008; Wherry et al., 2003). Besonders

TNF- und IL-2-positive CD8 T-Zellen übten langfristig einen verbesserten Schutz gegenüber systemischen Virusinfektionen aus, als CD8 Effektor-Gedächtniszellen (Seder et al., 2008; Wherry et al., 2003). Diese T-Zellsubpopulation war daher insbesondere zur Generierung eines lange überdauernden Immunschutzes wichtig und ein geeigneter Marker, um den Erfolg potenzieller Impfstoffe zu überprüfen (Seder et al., 2008). Ob es in der IMMUC-Pilotkohorte einen Zusammenhang zwischen ΔV_{onset} und dem Anteil EBNA3A-reaktiver T-Zellen gab, war aufgrund der geringen Anzahl reaktiver Patient:innen nicht festzustellen. In der Auswertung der gesamten IMMUC-Kohorte wäre interessant, ob die Reaktivität gegenüber EBNA3A vor allem bei Patient:innen auftritt, bei denen V_{onset} bereits länger zurückliegt als bei anderen, wie nach den Erkenntnissen von Lam et al. zu vermuten wäre (Lam et al., 2018). Wenn das Auftreten EBNA3A-spezifischer T-Zellen nicht mit dem zeitlichen Abstand zum Symptombeginn korreliert, stellt sich die Frage, ob die EBV-IM bei Patient:innen milder verläuft, die bereits früh im Verlauf der Erkrankung EBNA3A-spezifische T-Zellen nachweisbar sind.

Zusammenfassend fielen bei Betrachtung der T-Zellfunktionalität im Verlauf der frühen EBV-IM vor allem die Unterschiede zwischen den durch die unterschiedlichen Stimulationsantigene hervorgerufenen Zytokinexpressionsprofilen auf. Nach Stimulation mit BZLF1 und EB-VLP lag vor allem ein Effektor-Gedächtnis Phänotyp vor. Betrachtete man jedoch die durch EBNA3A induzierte Zytokinexpression, zeigte sich, dass die Stimulation mit EBNA3A bereits in der frühen Phase der Infektion eine wirksame T-Gedächtniszellantwort gegen EBV bewirken konnte. Aufgrund der geringen Kohortengröße konnte man lediglich von einer Tendenz sprechen, die aber sicherlich ein interessanter Aspekt bei der Analyse der gesamten IMMUC-Kohorte wäre. Trotz der geringen *response-rate* nach Stimulation mit EBNA3A war ein Monitoring mit diesem Stimulationsantigen demnach essenziell, um ein differenziertes Bild der Immunantwort auf EBV zu erhalten.

Auch in Hinblick auf die Entwicklung eines EBV-Impfstoffs könnten diese Erkenntnisse relevant sein. Bisherige Untersuchungen zur Entwicklung einer Impfung gegen EBV basierten häufig auf dem viralen Hüllprotein gp350 oder lytischen EBV-Proteinen (Elliott et al., 2008; Sokal et al., 2007). Auch VLP-basierte EBV-Impfstoffe enthielten lange Zeit keine latenten EBV-Antigene. Neuere Anstrengungen, das latente Antigen EBNA1, das allerdings erst sehr spät im EBV-Lebenszyklus exprimiert wird, in EB-VLPs zu integrieren, zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse *in vitro*. EB-VLP, die EBNA1 enthielten, riefen eine effektivere T-Zellantwort hervor, die in humanisierten Mäusen die Infektion von B-Zellen verhinderten und die EBV-Last im peripheren Blut deutlich reduzierte (Rühl et al., 2020; van Zyl et al., 2018). Bisher boten jedoch alle oben genannten Modelle für einen EBV-Impfstoff keinen ausreichenden Schutz vor einer Infektion (Rühl et al., 2020). Eine Impfung gegen EBV sollte im besten Fall in der lytischen Phase der Infektion vor einer symptomatische Primärinfektion schützen und langfristig eine T-Zellantwort gegen EBV etablieren, um die latente EBV-Infektion zu kontrollieren und

möglichen Folgeerkrankungen bestmöglich vorbeugen. Eine Kombination von EB-VLP mit EBNA3A als sich ergänzende Stimulationsantigene wäre sowohl für ein differenziertes Immunmonitoring als auch als kombinierte Antigene für eine Impfung gegen EBV sinnvoll. Die sehr gute *response-rate* vor allem zytotoxischer T-Effektorzellen durch eine Stimulation mit EB-VLP würde durch EBNA3A ergänzt werden, das zwar eine geringere *response-rate* induzierte, aber den für einen Impferfolg relevanten T-Gedächtnisphänotyp triggerte.

4.11 Zusammenfassung: CD4 und CD8 T-Zellantwort während der frühen EBV-IM

Auch in der IMMUC Pilot-Kohorte war eine deutliche Veränderung im T-Zellkompartiment während der frühen EBV-IM beobachtbar. Dies spiegelte sich zum einen in einer erhöhten Frequenz CD8-positiver T-Zellen und zum anderen in einem verminderten CD4/CD8 Verhältnis wider. Bereits innerhalb von ca. zwei Wochen nach Symptombeginn kam es zu einem raschen Abfall der CD8 T-Zellzahlen, der am ersten Studienzeitpunkt noch signifikant mit Δv_{onset} korrelierte, am zweiten Studienzeitpunkt aber keinen nennenswerten Zusammenhang zeigte. Ein ähnliches Bild ergab sich bei Betrachtung der EBV-Last. Eine erste Fragestellung für die große IMMUC-Kohorte könnte dementsprechend sein, ob erhöhte CD8 T-Zellzahlen über einen Zeitraum von ca. zwölf Tagen nach Symptombeginn hinaus eventuell mit einem prolongierten bzw. schweren Krankheitsverlauf korrelieren. Darüber hinaus wäre es interessant, ob es möglich wäre, anhand der in der IMMUC-Kohorte gewonnenen Erkenntnisse einen *cut-off* für die CD8 T-Zellfrequenz zu definieren, der das Risiko für einen schweren bzw. prolongierten Verlauf anzeigen kann.

Bei der Analyse anhand verschiedener EBV-Stimulationsantigene wurde festgestellt, dass eine Stimulation mit EB-VLP zu einer CD4 und CD8 T-Zellantwort in vergleichbarer Höhe führte, wobei monofunktionale CD4 T-Zellen vor allem von IFN- γ exprimierten, monofunktionale CD8 T-Zellen dagegen sowohl IFN- γ als auch TNF und IL-2. Insbesondere beim Monitoring EBV-spezifischer CD8 T-Zellen war daher eine Analyse von mehr als einem Zytokin notwendig, um die CD8 T-Zellantwort besser darstellen zu können. Nach Stimulation mit EB-VLP kam es außerdem bereits an v1 zu einer vergleichsweise hohen Gesamtzytokinexpression, nach Stimulation mit BZLF1 erst an v2. Nach Stimulation mit EBNA3A wiesen nur vereinzelte Patient:innen EBV-spezifische T-Zellen auf. Daraus ließ sich schließen, dass für ein Immunmonitoring in der frühen Phase der EBV-IM EB-VLP gut geeignet waren, da sie bereits sehr früh eine EBV-spezifische T-Zellantwort detektierten.

Es ließ sich bei der Analyse der IMMUC-Pilotkohorte außerdem feststellen, dass die meisten Patient:innen im Verlauf der ersten zwei Monate nach Symptombeginn der EBV-IM polyfunktionale CD8 T-Zellen entwickelten. Während die höchste *response-rate* nach Stimulation mit EB-VLP und BZLF1 erreicht wurde, fiel auf, dass wenige Patient:innen gegenüber EBNA3A bereits in der frühen Infektionsphase reaktive T-Zellen aufwiesen. Diese waren häufig polyfunktional und wiesen einen T-

Gedächtnisphänotyp auf, der einen langfristigen Immunschutz bewirken kann (Seder et al., 2008). Eine interessante Fragestellung bei der Betrachtung der gesamten IMMUC-Kohorte wäre demnach, ob eine EBV-IM bei Patient:innen, bei denen früh EBNA3A-reaktive T-Zellen nachweisbar sind, milder verläuft, und ob diese Patient:innen einen besseren Schutz vor einer Reaktivierung einer latenten EBV-Infektion haben.

In der Zusammenschau lässt sich sagen, dass ein optimiertes Immunmonitoring der EBV-IM in Bezug auf *response-rate* und langfristigen Immunschutz vermutlich durch eine Kombination von EB-VLP und EBNA3A als Stimulationsantigenen erreicht wird. So wird sowohl eine effektive zytotoxische Immunreaktion durch Stimulation mit EB-VLP erreicht als auch eine langfristige T-Gedächtnisantwort durch Stimulation mit EBNA3A. Dies macht die Kombination aus Stimulationsantigenen auch als potenziellen Kandidaten für eine EBV-Impfung interessant.

5 Literaturverzeichnis

- Abbott, R. J. M., Quinn, L. L., Leese, A. M., Scholes, H. M., Pachnio, A., & Rickinson, A. B. (2013). CD8+ T Cell Responses to Lytic EBV Infection: Late Antigen Specificities as Subdominant Components of the Total Response. *The Journal of Immunology*, *191*(11), 5398-5409. doi:10.4049/jimmunol.1301629
- Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*, *9*. doi:10.3389/fimmu.2018.01869
- Adhikary, D., Behrends, U., Boerschmann, H., Pfunder, A., Burdach, S., Moosmann, A., . . . Mautner, J. (2007). Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy. *PLoS One*, *2*(7), e583. doi:10.1371/journal.pone.0000583
- Adhikary, D., Behrends, U., Feederle, R., Delecluse, H. J., & Mautner, J. (2008). Standardized and highly efficient expansion of Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cells by using virus-like particles. *J Virol*, *82*(8), 3903-3911. doi:10.1128/jvi.02227-07
- Ahmed, N., & Gottschalk, S. (2009). How to design effective vaccines: lessons from an old success story. *Expert Rev Vaccines*, *8*(5), 543-546. doi:10.1586/erv.09.26
- Airas, L., Saraste, M., Rinta, S., Elovaara, I., Huang, Y. H., & Wiendl, H. (2008). Immunoregulatory factors in multiple sclerosis patients during and after pregnancy: relevance of natural killer cells. *Clin Exp Immunol*, *151*(2), 235-243. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03555.x
- Alfieri, C., Tanner, J., Carpentier, L., Perpète, C., Savoie, A., Paradis, K., . . . Joncas, J. (1996). Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood*, *87*(2), 812-817.
- Amyes, E., Hatton, C., Montamat-Scotte, D., Gudgeon, N., Rickinson, A. B., McMichael, A. J., & Callan, M. F. (2003). Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med*, *198*(6), 903-911. doi:10.1084/jem.20022058
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., & Stein, H. (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood*, *85*(3), 744-750.
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetyncck, S., Stewart, C. A., . . . Vivier, E. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, *25*(2), 331-342. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013
- Annels, N. E., Callan, M. F., Tan, L., & Rickinson, A. B. (2000). Changing patterns of dominant TCR usage with maturation of an EBV-specific cytotoxic T cell response. *J Immunol*, *165*(9), 4831-4841. doi:10.4049/jimmunol.165.9.4831
- Arai, A., Nogami, A., Imadome, K., Kurata, M., Murakami, N., Fujiwara, S., & Miura, O. (2012). Sequential monitoring of serum IL-6, TNF- α , and IFN- γ levels in a CAEBV patient treated by plasma exchange and immunochemotherapy. *Int J Hematol*, *96*(5), 669-673. doi:10.1007/s12185-012-1170-2
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2010). 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: epidemiological evidence. *Clin Exp Immunol*, *160*(1), 120-124. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04121.x
- Azzi, T., Lünemann, A., Murer, A., Ueda, S., Béziat, V., Malmberg, K.-J., . . . Nadal, D. (2014). Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood*, *124*(16), 2533-2543. doi:10.1182/blood-2014-01-553024
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M., & Thorley-Lawson, D. A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, *9*(3), 395-404. doi:10.1016/s1074-7613(00)80622-6
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., . . . Barrell, B. G. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, *310*(5974), 207-211. doi:10.1038/310207a0

- Balfour, H. H., Jr., Odumade, O. A., Schmeling, D. O., Mullan, B. D., Ed, J. A., Knight, J. A., . . . Hogquist, K. A. (2013). Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students. *J Infect Dis*, *207*(1), 80-88. doi:10.1093/infdis/jis646
- Balfour, H. H., Jr., Sifakis, F., Sliman, J. A., Knight, J. A., Schmeling, D. O., & Thomas, W. (2013). Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among individuals aged 6-19 years in the United States and factors affecting its acquisition. *J Infect Dis*, *208*(8), 1286-1293. doi:10.1093/infdis/jit321
- Barabas, S., Gary, R., Bauer, T., Lindner, J., Lindner, P., Weinberger, B., . . . Deml, L. (2008). Urea-mediated cross-presentation of soluble Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *PLoS Pathog*, *4*(11), e1000198. doi:10.1371/journal.ppat.1000198
- Barbosa Santos, M. L., Nico, D., de Oliveira, F. A., Barreto, A. S., Palatnik-de-Sousa, I., Carrillo, E., . . . Palatnik-de-Sousa, C. B. (2017). Leishmania donovani Nucleoside Hydrolase (NH36) Domains Induce T-Cell Cytokine Responses in Human Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, *8*
- Benlahrech, A., Donaghy, H., Rozis, G., Goodier, M., Klavinskis, L., Gotch, F., & Patterson, S. (2009). Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon γ Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways. *Sensors (Basel)*, *9*(1), 386-403. doi:10.3390/s90100386
- Betts, M. R., Exley, B., Price, D. A., Bansal, A., Camacho, Z. T., Teaberry, V., . . . Ferrari, G. (2005). Characterization of functional and phenotypic changes in anti-Gag vaccine-induced T cell responses and their role in protection after HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(12), 4512-4517. doi:10.1073/pnas.0408773102
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., . . . Koup, R. A. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, *107*(12), 4781-4789. doi:10.1182/blood-2005-12-4818
- Biron, C. A., Byron, K. S., & Sullivan, J. L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med*, *320*(26), 1731-1735. doi:10.1056/nejm198906293202605
- Björkström, N. K., Ljunggren, H. G., & Sandberg, J. K. (2010). CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol*, *31*(11), 401-406. doi:10.1016/j.it.2010.08.003
- Björkström, N. K., Svensson, A., Malmberg, K. J., Eriksson, K., & Ljunggren, H. G. (2011). Characterization of natural killer cell phenotype and function during recurrent human HSV-2 infection. *PLoS One*, *6*(11), e27664. doi:10.1371/journal.pone.0027664
- Blake, N., Lee, S., Redchenko, I., Thomas, W., Steven, N., Leese, A., . . . Rickinson, A. (1997). Human CD8+ T cell responses to EBV EBNA1: HLA class I presentation of the (Gly-Ala)-containing protein requires exogenous processing. *Immunity*, *7*(6), 791-802. doi:10.1016/s1074-7613(00)80397-0
- Bochennek, K., Fryns, E., Wittekindt, B., Buxmann, H., Quaiser, A., Fischer, D., . . . Huenecke, S. (2016). Immune cell subsets at birth may help to predict risk of late-onset sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Early Hum Dev*, *93*, 9-16. doi:10.1016/j.earlhumdev.2015.10.018
- Booth, C., Gilmour, K. C., Veys, P., Gennery, A. R., Slatter, M. A., Chapel, H., . . . Gaspar, H. B. (2011). X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. *Blood*, *117*(1), 53-62. doi:10.1182/blood-2010-06-284935
- Bornkamm, G. W., Behrends, U., & Mautner, J. (2006). The infectious kiss: newly infected B cells deliver Epstein-Barr virus to epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(19), 7201-7202. doi:10.1073/pnas.0602077103
- Borza, C. M., & Hutt-Fletcher, L. M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, *8*(6), 594-599. doi:10.1038/nm0602-594

- Bottino, C., Falco, M., Parolini, S., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Sivori, S., . . . Moretta, A. (2001). NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med*, *194*(3), 235-246. doi:10.1084/jem.194.3.235
- Boyd, A., Almeida, J. R., Darrah, P. A., Sauce, D., Seder, R. A., Appay, V., . . . Larsen, M. (2015). Pathogen-Specific T Cell Polyfunctionality Is a Correlate of T Cell Efficacy and Immune Protection. *PLoS One*, *10*(6), e0128714. doi:10.1371/journal.pone.0128714
- Brenchley, J. M., Karandikar, N. J., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Crotty, L. E., . . . Koup, R. A. (2003). Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*, *101*(7), 2711-2720. doi:10.1182/blood-2002-07-2103
- Burt, B. M., Plitas, G., Nguyen, H. M., Stableford, J. A., Bamboat, Z. M., & Dematteo, R. P. (2008). Circulating HLA-DR(+) natural killer cells have potent lytic ability and weak antigen-presenting cell function. *Hum Immunol*, *69*(8), 469-474. doi:10.1016/j.humimm.2008.06.009
- Callan, M. F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J. D., Moss, P. A., Gillespie, G. M., . . . McMichael, A. J. (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med*, *2*(8), 906-911. doi:10.1038/nm0896-906
- Callan, M. F., Fazou, C., Yang, H., Rostron, T., Poon, K., Hatton, C., & McMichael, A. J. (2000). CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J Clin Invest*, *106*(10), 1251-1261. doi:10.1172/jci10590
- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. D., De Francesco, M. A., Fiorentini, S., . . . Turano, A. (1997). Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*, *27*(1), 71-76. doi:10.1002/(sici)1097-0320(19970101)27:1<71::aid-cyto9>3.0.co;2-o
- Carvalho-Gomes, Â., Cubells, A., Pallarés, C., Corpas-Burgos, F., Berenguer, M., Aguilera, V., & López-Labrador, F. X. (2022). Cytomegalovirus specific polyfunctional T-cell responses expressing CD107a predict control of CMV infection after liver transplantation. *Cell Immunol*, *371*, 104455. doi:10.1016/j.cellimm.2021.104455
- Cederberg, L. E., Rabinovitch, M. D., Grimm-Geris, J. M., Schmeling, D. O., Filtz, E. A., Condon, L. M., & Balfour, H. H., Jr. (2019). Epstein-Barr Virus DNA in Parental Oral Secretions: A Potential Source of Infection for Their Young Children. *Clin Infect Dis*, *68*(2), 306-312. doi:10.1093/cid/ciy464
- Cerwenka, A., & Lanier, L. L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*, *1*(1), 41-49. doi:10.1038/35095564
- Chan, A., Hong, D.-L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A. D., Buckley, C. D., . . . Bowness, P. (2007). CD56^{bright}; Human NK Cells Differentiate into CD56^{dim}; Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. *The Journal of Immunology*, *179*(1), 89. doi:10.4049/jimmunol.179.1.89
- Chaput, N., Flament, C., Locher, C., Desbois, M., Rey, A., Rusakiewicz, S., . . . Zitvogel, L. (2013). Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2: HLA-DR(+) NK cell levels correlate with disease outcome. *Oncoimmunology*, *2*(2), e23080. doi:10.4161/onci.23080
- Chesnokova, L. S., Nishimura, S. L., & Hutt-Fletcher, L. M. (2009). Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins $\alpha\beta 6$ or $\alpha\beta 8$. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(48), 20464. doi:10.1073/pnas.0907508106
- Chien, Y. C., Chen, J. Y., Liu, M. Y., Yang, H. I., Hsu, M. M., Chen, C. J., & Yang, C. S. (2001). Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Engl J Med*, *345*(26), 1877-1882. doi:10.1056/NEJMoa011610
- Chijioke, O., Muller, A., Federle, R., Barros, M. H., Krieg, C., Emmel, V., . . . Munz, C. (2013). Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection. *Cell Rep*, *5*(6), 1489-1498. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.041
- Cichocki, F., Grzywacz, B., & Miller, J. S. (2019). Human NK Cell Development: One Road or Many? *Frontiers in Immunology*, *10*(2078). doi:10.3389/fimmu.2019.02078
- Clute, S. C., Watkin, L. B., Cornberg, M., Naumov, Y. N., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., . . . Selin, L. K. (2005). Cross-reactive influenza virus-specific CD8+ T cells contribute to lymphoproliferation in

- Epstein-Barr virus–associated infectious mononucleosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(12), 3602-3612. doi:10.1172/JCI25078
- Cohen, L., Manion, L., & Morrison, K. (2018). Data analysis and reporting: Descriptive statistics. In *Research Methods in Education* (8th ed., pp. 753-776): Routledge.
- Cohen, L., Keegan, A., Melanson, S. E. F., & Walt, D. R. (2019). Impact of clinical sample handling and processing on ultra-low level measurements of plasma cytokines. *Clin Biochem*, *65*, 38-44. doi:10.1016/j.clinbiochem.2019.01.001
- Colonna, M., Nakajima, H., & Cella, M. (1999). Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells. *J Leukoc Biol*, *66*(5), 718-722. doi:10.1002/jlb.66.5.718
- Condon, L. M., Cederberg, L. E., Rabinovitch, M. D., Liebo, R. V., Go, J. C., Delaney, A. S., . . . Balfour, H. H., Jr. (2014). Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among Minnesota children: effects of race/ethnicity and family environment. *Clin Infect Dis*, *59*(4), 501-508. doi:10.1093/cid/ciu342
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, *22*(11), 633-640. doi:10.1016/s1471-4906(01)02060-9
- Costa-García, M., Ataya, M., Moraru, M., Vilches, C., López-Botet, M., & Muntasell, A. (2019). Human Cytomegalovirus Antigen Presentation by HLA-DR+ NKG2C+ Adaptive NK Cells Specifically Activates Polyfunctional Effector Memory CD4+ T Lymphocytes. *Frontiers in Immunology*, *10*(687). doi:10.3389/fimmu.2019.00687
- Crough, T., Burrows, J. M., Fazou, C., Walker, S., Davenport, M. P., & Khanna, R. (2005). Contemporaneous fluctuations in T cell responses to persistent herpes virus infections. *Eur J Immunol*, *35*(1), 139-149. doi:10.1002/eji.200425548
- De Paschale, M., & Clerici, P. (2012). Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World journal of virology*, *1*(1), 31–43. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.31>
- de-Thé, G., Day, N. E., Geser, A., Lavoué, M. F., Ho, J. H., Simons, M. J., . . . Zavadova, H. (1975). Sero-epidemiology of the Epstein-Barr virus: preliminary analysis of an international study - a review. *IARC Sci Publ*(11 Pt 2), 3-16.
- Di Vito, C., Mikulak, J., & Mavilio, D. (2019). On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Frontiers in Immunology*, *10*(1812). doi:10.3389/fimmu.2019.01812
- Dowd, J. B., Palermo, T., Brite, J., McDade, T. W., & Aiello, A. (2013). Seroprevalence of Epstein-Barr virus infection in U.S. children ages 6-19, 2003-2010. *PLoS One*, *8*(5), e64921. doi:10.1371/journal.pone.0064921
- Dunmire, S. K., Grimm, J. M., Schmeling, D. O., Balfour, H. H., & Hogquist, K. A. (2015). The Incubation Period of Primary Epstein-Barr Virus Infection: Viral Dynamics and Immunologic Events. *PLoS Pathog*, *11*(12), e1005286. doi:10.1371/journal.ppat.1005286
- Dunmire, S. K., Hogquist, K. A., & Balfour, H. H. (2015). Infectious Mononucleosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, *390*(Pt 1), 211-240. doi:10.1007/978-3-319-22822-8_9
- Elliott, S. L., Suhrbier, A., Miles, J. J., Lawrence, G., Pye, S. J., Le, T. T., Rosenstengel, A., Nguyen, T., Allworth, A., Burrows, S. R., Cox, J., Pye, D., Moss, D. J., & Bharadwaj, M. (2008). Phase I trial of a CD8+ T-cell peptide epitope-based vaccine for infectious mononucleosis. *Journal of virology*, *82*(3), 1448–1457. <https://doi.org/10.1128/JVI.01409-07>
- Epstein, M. A., Henle, G., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1965). Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*, *121*, 761-770. doi:10.1084/jem.121.5.761
- Epstein, M. A., & Achong, B. G. (1967). Formal discussion: immunologic relationships of the herpes-like EB virus of cultured Burkitt lymphoblasts. *Cancer research*, *27*(12), 2489-2493.
- Epstein, M. A. (2015). Why and How Epstein-Barr Virus Was Discovered 50 Years Ago. *Curr Top Microbiol Immunol*, *390*(Pt 1), 3-15. doi:10.1007/978-3-319-22822-8_1
- Erokhina, S. A., Streltsova, M. A., Kanevskiy, L. M., Telford, W. G., Sapozhnikov, A. M., & Kovalenko, E. I. (2018). HLA-DR(+) NK cells are mostly characterized by less mature phenotype and high functional activity. *Immunol Cell Biol*, *96*(2), 212-228. doi:10.1111/imcb.1032

- Erokhina, S. A., Streltsova, M. A., Kanevskiy, L. M., Grechikhina, M. V., Sapozhnikov, A. M., & Kovalenko, E. I. (2021). HLA-DR-expressing NK cells: Effective killers suspected for antigen presentation. *J Leukoc Biol*, *109*(2), 327-337. doi:10.1002/jlb.3ru0420-668rr
- Evans, J. H., Horowitz, A., Mehrabi, M., Wise, E. L., Pease, J. E., Riley, E. M., & Davis, D. M. (2011). A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *Eur J Immunol*, *41*(7), 1924-1933. doi:10.1002/eji.201041180
- Faulkner, G. C., Burrows, S. R., Khanna, R., Moss, D. J., Bird, A. G., & Crawford, D. H. (1999). X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *Journal of Virology*, *73*(2), 1555-1564. doi:10.1128/JVI.73.2.1555-1564.1999
- Ferlazzo, G., & Carrega, P. (2012). Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Frontiers in Immunology*, *3*(347). doi:10.3389/fimmu.2012.00347
- Ferre, A. L., Hunt, P. W., McConnell, D. H., Morris, M. M., Garcia, J. C., Pollard, R. B., . . . Shacklett, B. L. (2010). HIV controllers with HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 alleles have strong, polyfunctional mucosal CD4+ T-cell responses. *J Virol*, *84*(21), 11020-11029. doi:10.1128/jvi.00980-10
- Fischer, F., Mücke, J., Werny, L., Gerrer, K., Linnerbauer, S., Riedel, I., Geisberger, J., Bodenhausen, M., Schulte-Hillen, L., Hoffmann, D., Protzer, U., Mautner, J., Behrends, U., Bauer, T., Körber, N. (2023). Evaluation of novel Epstein-Barr virus-derived antigen formulations for monitoring virus-specific T cells in pediatric patients with infectious mononucleosis. Manuscript submitted for publication, Fachbereich Virologie, Technische Universität München, München, Deutschland
- Forconi, C. S., Cosgrove, C. P., Saikumar-Lakshmi, P., Nixon, C. E., Foley, J., Ong'echa, J. M., . . . Moormann, A. M. (2018). Poorly cytotoxic terminally differentiated CD56(neg)CD16(pos) NK cells accumulate in Kenyan children with Burkitt lymphomas. *Blood Adv*, *2*(10), 1101-1114. doi:10.1182/bloodadvances.2017015404
- Forconi, C. S., Oduor, C. I., Oluoch, P. O., Ong'echa, J. M., Münz, C., Bailey, J. A., & Moormann, A. M. (2020). A New Hope for CD56(neg)CD16(pos) NK Cells as Unconventional Cytotoxic Mediators: An Adaptation to Chronic Diseases. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*, 162. doi:10.3389/fcimb.2020.00162
- Freud, A. G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H. C., Ferketich, A. K., Nuovo, G. J., . . . Caligiuri, M. A. (2005). A Human CD34(+) Subset Resides in Lymph Nodes and Differentiates into CD56brightNatural Killer Cells. *Immunity*, *22*(3), 295-304. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.013
- Freud, A. G., Mundy-Bosse, B. L., Yu, J., & Caligiuri, M. A. (2017). The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*, *47*(5), 820-833. doi:10.1016/j.immuni.2017.10.008
- Fujiwara, S., Kimura, H., Imadome, K.-i., Arai, A., Kodama, E., Morio, T., . . . Wakiguchi, H. (2014). Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatrics International*, *56*(2), 159-166. doi:10.1111/ped.12314
- Gaucher, D., Therrien, R., Kettaf, N., Angermann, B. R., Boucher, G., Filali-Mouhim, A., . . . Sékaly, R. P. (2008). Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med*, *205*(13), 3119-3131. doi:10.1084/jem.20082292
- Gonzalez, V. D., Falconer, K., Bjorkstrom, N. K., Blom, K. G., Weiland, O., Ljunggren, H. G., . . . 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*(10), 6612-6618. doi:10.4049/jimmunol.0901437
- Green, M., & Michaels, M. G. (2013). Epstein-Barr Virus Infection and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *American Journal of Transplantation*, *13*(s3), 41-54. doi:10.1111/ajt.12004
- Grimm, J. M., Schmeling, D. O., Dunmire, S. K., Knight, J. A., Mullan, B. D., Ed, J. A., . . . Balfour, H. H., Jr. (2016). Prospective studies of infectious mononucleosis in university students. *Clin Transl Immunology*, *5*(8), e94-e94. doi:10.1038/cti.2016.48

- Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., & López-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, *104*(12), 3664-3671. doi:10.1182/blood-2004-05-2058
- Hammerschmidt, W. (2015). The Epigenetic Life Cycle of Epstein-Barr Virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, *390*(Pt 1), 103-117. doi:10.1007/978-3-319-22822-8_6
- Hatton, O. L., Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S. M., & Martinez, O. M. (2014). The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res*, *58*(2-3), 268-276. doi:10.1007/s12026-014-8496-1
- Hatton, O. L., Strauss-Albee, D. M., Zhao, N. Q., Haggadone, M. D., Pelpola, J. S., Krams, S. M., . . . Blish, C. A. (2016). NKG2A-Expressing Natural Killer Cells Dominate the Response to Autologous Lymphoblastoid Cells Infected with Epstein-Barr Virus. *Frontiers in Immunology*, *7*(607). doi:10.3389/fimmu.2016.00607
- Henle, G., & Henle, W. (1966). Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol*, *91*(3), 1248-1256. doi:10.1128/jb.91.3.1248-1256.1966
- Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H., & Henle, G. (1967). Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science*, *157*(3792), 1064-1065. doi:10.1126/science.157.3792.1064
- Henle, G., Henle, W., & Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *59*(1), 94-101. doi:10.1073/pnas.59.1.94
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., & Rickinson, A. B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*, *25*, 587-617. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141553
- Hislop, A. D., Palendira, U., Leese, A. M., Arkwright, P. D., Rohrlach, P. S., Tangye, S. G., . . . Rickinson, A. B. (2010). Impaired Epstein-Barr virus-specific CD8+ T-cell function in X-linked lymphoproliferative disease is restricted to SLAM family-positive B-cell targets. *Blood*, *116*(17), 3249-3257. doi:10.1182/blood-2009-09-238832
- Hislop, A. D. (2015). Early virological and immunological events in Epstein-Barr virus infection. *Curr Opin Virol*, *15*, 75-79. doi:10.1016/j.coviro.2015.08.002
- Hjalgrim, H., Friborg, J., & Melbye, M. (2007). The epidemiology of EBV and its association with malignant disease. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, & K. Yamanishi (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Horowitz, A., Strauss-Albee, D. M., Leipold, M., Kubo, J., Nemat-Gorgani, N., Dogan, O. C., . . . Blish, C. A. (2013). Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med*, *5*(208), 208ra145. doi:10.1126/scitranslmed.3006702
- Horwitz, C. A., Henle, W., Henle, G., Goldfarb, M., Kubic, P., Gehrz, R. C., . . . Krivit, W. (1981). Clinical and laboratory evaluation of infants and children with Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis: report of 32 patients (aged 10-48 months). *Blood*, *57*(5), 933-938.
- Hu, P. F., Hultin, L. E., Hultin, P., Hausner, M. A., Hirji, K., Jewett, A., . . . Giorgi, J. V. (1995). Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16+CD56+ cells and expansion of a population of CD16dimCD56- cells with low lytic activity. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, *10*(3), 331-340.
- Hurt, C., & Tamaro, D. (2007). Diagnostic evaluation of mononucleosis-like illnesses. *Am J Med*, *120*(10), 911.e911-918. doi:10.1016/j.amjmed.2006.12.011
- Iannello, A., Debbeche, O., Samarani, S., & Ahmad, A. (2008). Antiviral NK cell responses in HIV infection: I. NK cell receptor genes as determinants of HIV resistance and progression to AIDS. *J Leukoc Biol*, *84*(1), 1-26. doi:10.1189/jlb.0907650
- Jacobson, A., Bell, F., Lejarcegui, N., Mitchell, C., Frenkel, L., & Horton, H. (2013). Healthy Neonates Possess a CD56-Negative NK Cell Population with Reduced Anti-Viral Activity. *PLoS One*, *8*(6), e67700. doi:10.1371/journal.pone.0067700

- Javier, R. T., & Butel, J. S. (2008). The history of tumor virology. *Cancer research*, *68*(19), 7693-7706. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3301
- Jayasooriya, S., de Silva, T. I., Njie-jobe, J., Sanyang, C., Leese, A. M., Bell, A. I., . . . Flanagan, K. L. (2015). Early virological and immunological events in asymptomatic Epstein-Barr virus infection in African children. *PLoS Pathog*, *11*(3), e1004746. doi:10.1371/journal.ppat.1004746
- Jie, H. B., & Sarvetnick, N. (2004). The role of NK cells and NK cell receptors in autoimmune disease. *Autoimmunity*, *37*(2), 147-153. doi:10.1080/0891693042000196174
- Jud, A., Kotur, M., Berger, C., Gysin, C., Nadal, D., & Lünemann, A. (2017). Tonsillar CD56brightNKG2A+ NK cells restrict primary Epstein-Barr virus infection in B cells via IFN- γ . *Oncotarget*, *8*(4), 6130-6141. doi:10.18632/oncotarget.14045
- Kamboj, D., Gupta, P., Basil, M. V., Mohan, A., Guleria, R., Bhatnagar, A., . . . Mitra, D. K. (2020). Improved Mycobacterium tuberculosis clearance after the restoration of IFN- γ (+) TNF- α (+) CD4(+) T cells: Impact of PD-1 inhibition in active tuberculosis patients. *Eur J Immunol*, *50*(5), 736-747. doi:10.1002/eji.201948283
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., & Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, *319*(6055), 675-678. doi:10.1038/319675a0
- Kasamon, Y. L., & Ambinder, R. F. (2005). AIDS-Related Primary Central Nervous System Lymphoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *19*(4), 665-687. doi:10.1016/j.hoc.2005.05.004
- Keating, S., Prince, S., Jones, M., & Rowe, M. (2002). The lytic cycle of Epstein-Barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class I and class II molecules. *J Virol*, *76*(16), 8179-8188. doi:10.1128/jvi.76.16.8179-8188.2002
- Kenney, S. C., & Mertz, J. E. (2014). Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol*, *26*, 60-68. doi:10.1016/j.semcancer.2014.01.002
- Khan, G., Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., & Thorley-Lawson, D. A. (1996). Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity*, *5*(2), 173-179. doi:10.1016/s1074-7613(00)80493-8
- Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J. A., Sinclair, A. J., . . . Moss, P. A. (2002). Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol*, *169*(4), 1984-1992. doi:10.4049/jimmunol.169.4.1984
- Kimura, H., Hoshino, Y., Kanegane, H., Tsuge, I., Okamura, T., Kawa, K., & Morishima, T. (2001). Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood*, *98*(2), 280-286. doi:10.1182/blood.v98.2.280
- Körber, N., Behrends, U., Protzer, U., & Bauer, T. (2020). Evaluation of T-activated proteins as recall antigens to monitor Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus-specific T cells in a clinical trial setting. *J Transl Med*, *18*(1), 242. doi:10.1186/s12967-020-02385-x
- Kust, S. A., Streltsova, M. A., Panteleev, A. V., Karpina, N. L., Lyadova, I. V., Sapozhnikov, A. M., & Kovalenko, E. I. (2021). HLA-DR-Positive NK Cells Expand in Response to Mycobacterium Tuberculosis Antigens and Mediate Mycobacteria-Induced T Cell Activation. *Frontiers in Immunology*, *12*(1531). doi:10.3389/fimmu.2021.662128
- Laichalk, L. L., & Thorley-Lawson, D. A. (2005). Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol*, *79*(2), 1296-1307. doi:10.1128/jvi.79.2.1296-1307.2005
- Lam, J. K. P., Hui, K. F., Ning, R. J., Xu, X. Q., Chan, K. H., & Chiang, A. K. S. (2018). Emergence of CD4+ and CD8+ Polyfunctional T Cell Responses Against Immunodominant Lytic and Latent EBV Antigens in Children With Primary EBV Infection. *Front Microbiol*, *9*(416). doi:10.3389/fmicb.2018.00416
- Lam, J. K. P., Azzi, T., Hui, K. F., Wong, A. M. G., McHugh, D., Caduff, N., . . . Chiang, A. K. S. (2020). Co-infection of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Diminishes the Frequency of CD56dimNKG2A+KIR- NK Cells and Contributes to Suboptimal Control of EBV in

- Immunosuppressed Children With Post-transplant Lymphoproliferative Disorder. *Frontiers in Immunology*, 11(1231). doi:10.3389/fimmu.2020.01231
- Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., & Phillips, J. H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 136(12), 4480-4486.
- Lee, J., Zhang, T., Hwang, I., Kim, A., Nitschke, L., Kim, M., . . . Kim, S. (2015). Epigenetic modification and antibody-dependent expansion of memory-like NK cells in human cytomegalovirus-infected individuals. *Immunity*, 42(3), 431-442. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.013
- Lennon, P., Crotty, M., & Fenton, J. E. (2015). Infectious mononucleosis. *BMJ*, 350, h1825. doi:10.1136/bmj.h1825
- Lerner, A. M., Ariza, M. E., Williams, M., Jason, L., Beqaj, S., Fitzgerald, J. T., . . . Glaser, R. (2012). Antibody to Epstein-Barr Virus Deoxyuridine Triphosphate Nucleotidohydrolase and Deoxyribonucleotide Polymerase in a Chronic Fatigue Syndrome Subset. *PLoS One*, 7(11), e47891. doi:10.1371/journal.pone.0047891
- Lin, J. C., Wang, W. Y., Chen, K. Y., Wei, Y. H., Liang, W. M., Jan, J. S., & Jiang, R. S. (2004). Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med*, 350(24), 2461-2470. doi:10.1056/NEJMoa032260
- Linardopoulos, S., Corrigan, V., & Panayi, G. S. (1992). Activation of HLA-DR and interleukin-6 gene transcription in resting T cells via the CD2 molecule: relevance to chronic immune-mediated inflammation. *Scand J Immunol*, 36(3), 469-477. doi:10.1111/j.1365-3083.1992.tb02962.x
- Ling, L., Chen, Z., Lui, G., Wong, C. K., Wong, W. T., Ng, R. W. Y., . . . Chan, P. K. S. (2021). Longitudinal Cytokine Profile in Patients With Mild to Critical COVID-19. *Front Immunol*, 12, 763292. doi:10.3389/fimmu.2021.763292
- Linnerbauer, S., Behrends, U., Adhikary, D., Witter, K., Bornkamm, G. W., & Mautner, J. (2014). Virus and Autoantigen-Specific CD4+ T Cells Are Key Effectors in a SCID Mouse Model of EBV-Associated Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders. *PLoS Pathog*, 10(5), e1004068. doi:10.1371/journal.ppat.1004068
- Lo, Y. M., Chan, L. Y., Lo, K. W., Leung, S. F., Zhang, J., Chan, A. T., . . . Huang, D. P. (1999). Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer research*, 59(6), 1188-1191.
- Long, H. M., Leese, A. M., Chagoury, O. L., Connerty, S. R., Quarcoopome, J., Quinn, L. L., . . . Rickinson, A. B. (2011). Cytotoxic CD4+ T Cell Responses to EBV Contrast with CD8 Responses in Breadth of Lytic Cycle Antigen Choice and in Lytic Cycle Recognition. *The Journal of Immunology*, 187(1), 92-101. doi:10.4049/jimmunol.1100590
- Long, H. M., Chagoury, O. L., Leese, A. M., Ryan, G. B., James, E., Morton, L. T., . . . Rickinson, A. B. (2013). MHC II tetramers visualize human CD4+ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. *J Exp Med*, 210(5), 933-949. doi:10.1084/jem.20121437
- Longnecker, R. M., Kieff, E., & Cohen, J. I. (2013). Epstein Barr Virus. In B. Fields, Knipe, D., Howley, P. (Ed.), *Fields Virology* (6th ed., Vol. 2, pp. 1898 - 1959). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- López-Montañés, M., Alari-Pahissa, E., Sintes, J., Martínez-Rodríguez, J. E., Muntasell, A., & López-Botet, M. (2017). Antibody-Dependent NK Cell Activation Differentially Targets EBV-Infected Cells in Lytic Cycle and Bystander B Lymphocytes Bound to Viral Antigen-Containing Particles. *The Journal of Immunology*, 199(2), 656-665. doi:10.4049/jimmunol.1601574
- Lopez-Vergès, S., Milush, J. M., Pandey, S., York, V. A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., . . . Lanier, L. L. (2010). CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*, 116(19), 3865-3874. doi:10.1182/blood-2010-04-282301
- Lopez-Vergès, S., Milush, J. M., Schwartz, B. S., Pando, M. J., Jarjoura, J., York, V. A., . . . Lanier, L. L. (2011). Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human

- cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(36), 14725-14732. doi:10.1073/pnas.1110900108
- Lossius, A., Johansen, J. N., Torkildsen, Ø., Vartdal, F., & Holmøy, T. (2012). Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis—association and causation. *Viruses*, 4(12), 3701-3730. doi:10.3390/v4123701
- Loyon, R., Picard, E., Mauvais, O., Queiroz, L., Mougey, V., Pallandre, J. R., . . . Borg, C. (2016). IL-21-Induced MHC Class II+ NK Cells Promote the Expansion of Human Uncommitted CD4+ Central Memory T Cells in a Macrophage Migration Inhibitory Factor-Dependent Manner. *J Immunol*, 197(1), 85-96. doi:10.4049/jimmunol.1501147
- Lucia, M. B., Rutella, S., Rumi, C., & Cauda, R. (1997). Lack of correlation between HLA-DR and CD25 "activation" related antigens on CD16+ NK cells in HIV infection. *Eur J Histochem*, 41 Suppl 2, 31-32.
- Lünemann, A., Vanoaica, L. D., Azzi, T., Nadal, D., & Münz, C. (2013). A Distinct Subpopulation of Human NK Cells Restricts B Cell Transformation by EBV. *The Journal of Immunology*, 191(10), 4989-4995. doi:10.4049/jimmunol.1301046
- Lugthart, G., van Ostaijen-ten Dam, M. M., van Tol, M. J., Lankester, A. C., & Schilham, M. W. (2015). CD56(dim)CD16⁻ NK cell phenotype can be induced by cryopreservation. *Blood*, 125(11), 1842-1843. doi:10.1182/blood-2014-11-610311
- Lunemann, S., Malone, D. F., Hengst, J., Port, K., Grabowski, J., Deterding, K., . . . Wedemeyer, H. (2014). Compromised function of natural killer cells in acute and chronic viral hepatitis. *J Infect Dis*, 209(9), 1362-1373. doi:10.1093/infdis/jit561
- Luo, Z., Li, Z., Martin, L., Hu, Z., Wu, H., Wan, Z., . . . Jiang, W. (2017). Increased Natural Killer Cell Activation in HIV-Infected Immunologic Non-Responders Correlates with CD4+ T Cell Recovery after Antiretroviral Therapy and Viral Suppression. *PLoS One*, 12(1), e0167640. doi:10.1371/journal.pone.0167640
- Luz Correa, B., Ornaghi, A. P., Cerutti Muller, G., Engroff, P., Pestana Lopes, R., Gomes da Silva Filho, I., . . . Bauer, M. E. (2014). The inverted CD4:CD8 ratio is associated with cytomegalovirus, poor cognitive and functional states in older adults. *Neuroimmunomodulation*, 21(4), 206-212. doi:10.1159/000356827
- Luzuriaga, K., & Sullivan, J. L. (2010). Infectious mononucleosis. *The New England journal of medicine*, 362(21), 1993–2000. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1001116>
- Ma, M., Yin, X., Zhao, X., Guo, C., Zhu, X., Liu, T., . . . Jiang, Y. (2019). CD56–CD16+ NK cells from HIV-infected individuals negatively regulate IFN-γ production by autologous CD8+ T cells. *J Leukoc Biol*, 106(6), 1313-1323. doi:10.1002/JLB.3A0819-171RR
- Macedo, C., Donnenberg, A., Popescu, I., Reyes, J., Abu-Elmagd, K., Shapiro, R., . . . Metes, D. (2005). EBV-specific memory CD8+ T cell phenotype and function in stable solid organ transplant patients. *Transpl Immunol*, 14(2), 109-116. doi:10.1016/j.trim.2005.02.001
- Mamessier, E., Pradel, L. C., Thibult, M. L., Drevet, C., Zouine, A., Jacquemier, J., . . . Olive, D. (2013). Peripheral blood NK cells from breast cancer patients are tumor-induced composite subsets. *J Immunol*, 190(5), 2424-2436. doi:10.4049/jimmunol.1200140
- Mandal, A., & Viswanathan, C. (2015). Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 8(2), 47-55. doi:10.1016/j.hemonc.2014.11.006
- Mark, C., Czerwinski, T., Roessner, S., Mainka, A., Hörsch, F., Heublein, L., . . . Voskens, C. J. (2020). Cryopreservation impairs 3-D migration and cytotoxicity of natural killer cells. *Nature Communications*, 11(1), 5224. doi:10.1038/s41467-020-19094-0
- Mautner, J., & Bornkamm, G. W. (2012). The role of virus-specific CD4+ T cells in the control of Epstein-Barr virus infection. *Eur J Cell Biol*, 91(1), 31-35. doi:10.1016/j.ejcb.2011.01.007
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., . . . Fauci, A. S. (2005). Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 2886-2891. doi:10.1073/pnas.0409872102

- McKenzie, J., & El-Guindy, A. (2015). Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 391, 237-261. doi:10.1007/978-3-319-22834-1_8
- Michel, T., Poli, A., Cuapio, A., Briquemont, B., Iserentant, G., Ollert, M., & Zimmer, J. (2016). Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol*, 196(7), 2923-2931. doi:10.4049/jimmunol.1502570
- Middeldorp, J. M. (2015). Epstein-Barr Virus-Specific Humoral Immune Responses in Health and Disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 391, 289-323. doi:10.1007/978-3-319-22834-1_10
- Miller, G. (1982). Immortalization of human lymphocytes by Epstein-Barr virus. *The Yale journal of biology and medicine*, 55(3-4), 305-310.
- Min-Oo, G., & Lanier, L. L. (2014). Cytomegalovirus generates long-lived antigen-specific NK cells with diminished bystander activation to heterologous infection. *J Exp Med*, 211(13), 2669-2680. doi:10.1084/jem.20141172
- Montaldo, E., Del Zotto, G., Della Chiesa, M., Mingari, M. C., Moretta, A., De Maria, A., & Moretta, L. (2013). Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*, 83(8), 702-713. doi:10.1002/cyto.a.22302
- Müller-Durovic, B., Grähler, J., Devine, O. P., Akbar, A. N., & Hess, C. (2019). CD56-negative NK cells with impaired effector function expand in CMV and EBV co-infected healthy donors with age. *Aging (Albany NY)*, 11(2), 724-740. doi:10.18632/aging.101774
- Murphy, K. M., Mowat, A., & Janeway, C. (2012a). The humoral immune response. In *Janeway's immunobiology* (8th ed., pp. 387 - 428). London [u.a.]: Garland Science.
- Murphy, K. M., Mowat, A., & Janeway, C. (2012b). An introduction to immunobiology and innate immunity. In *Janeway's immunobiology* (8th ed., pp. 1 - 75). London [u.a.]: Garland Science.
- Murphy, K. M., Mowat, A., & Janeway, C. (2012c). T cell mediated immunity. *Janeway's immunobiology* (8th ed., pp 335 - 386). London [u.a.]: Garland Science.
- Murphy, K. M., Mowat, A., & Janeway, C. (2012d). The major histocompatibility complex and its function. In *Janeway's immunobiology* (8th ed., pp. 217 - 237). London [u.a.]: Garland Science.
- Murphy, K. M., Mowat, A., & Janeway, C. (2012e). T cell mediated immunity. In *Janeway's immunobiology* (8th ed., pp. 335 - 386). London [u.a.]: Garland Science.
- Nagy, N., & Klein, E. (2010). Deficiency of the proapoptotic SAP function in X-linked lymphoproliferative disease aggravates Epstein-Barr virus (EBV) induced mononucleosis and promotes lymphoma development. *Immunol Lett*, 130(1-2), 13-18. doi:10.1016/j.imlet.2010.01.002
- Naluyima, P., Eller, M. A., Laeyendecker, O., Quinn, T. C., Serwadda, D., Sewankambo, N. K., . . . Sandberg, J. K. (2014). Impaired natural killer cell responses are associated with loss of the highly activated NKG2A(+)CD57(+)CD56(dim) subset in HIV-1 subtype D infection in Uganda. *Aids*, 28(9), 1273-1278. doi:10.1097/qad.0000000000000286
- Navas, A., Giraldo-Parra, L., Prieto, M. D., Cabrera, J., & Gómez, M. A. (2019). Phenotypic and functional stability of leukocytes from human peripheral blood samples: considerations for the design of immunological studies. *BMC Immunol*, 20(1), 5. doi:10.1186/s12865-019-0286-z
- Neuhierl, B., Feederle, R., Adhikary, D., Hub, B., Geletneky, K., Mautner, J., & Delecluse, H. J. (2009). Primary B-cell infection with a deltaBALF4 Epstein-Barr virus comes to a halt in the endosomal compartment yet still elicits a potent CD4-positive cytotoxic T-cell response. *J Virol*, 83(9), 4616-4623. doi:10.1128/jvi.01613-08
- Ng, S. C., Plamondon, S., Al-Hassi, H. O., English, N., Gellatly, N., Kamm, M. A., . . . Stagg, A. J. (2009). A novel population of human CD56+ human leucocyte antigen D-related (HLA-DR+) colonic lamina propria cells is associated with inflammation in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*, 158(2), 205-218. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04012.x
- Ning, R. J., Xu, X. Q., Chan, K. H., & Chiang, A. K. S. (2011). Long-term carriers generate Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4(+) and CD8(+) polyfunctional T-cell responses which show immunodominance hierarchies of EBV proteins. *Immunology*, 134(2), 161-171. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03476.x

- Nguyen, S., Béziat, V., Roos-Weil, D., & Vieillard, V. (2011). Role of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation: myth or reality? *J Innate Immun*, 3(4), 383-394. doi:10.1159/000323935
- Ogembo, J. G., Kannan, L., Ghiran, I., Nicholson-Weller, A., Finberg, R. W., Tsokos, G. C., & Fingerroth, J. D. (2013). Human Complement Receptor Type 1/CD35 Is an Epstein-Barr Virus Receptor. *Cell Reports*, 3(2), 371-385. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.023
- Packard, T. A., & Cambier, J. C. (2013). B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Rep*, 5, 40. doi:10.12703/p5-40
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., & Münz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, 307(5709), 593-596. doi:10.1126/science.1104904
- Papewalis, C., Jacobs, B., Baran, A. M., Ehlers, M., Stoecklein, N. H., Willenberg, H. S., . . . Schott, M. (2011). Increased numbers of tumor-lysing monocytes in cancer patients. *Mol Cell Endocrinol*, 337(1-2), 52-61. doi:10.1016/j.mce.2011.01.020
- Pappworth, I. Y., Wang, E. C., & Rowe, M. (2007). The Switch from Latent to Productive Infection in Epstein-Barr Virus-Infected B Cells Is Associated with Sensitization to NK Cell Killing. *Journal of Virology*, 81(2), 474-482. doi:10.1128/jvi.01777-06
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 118(12), 3030-3044. doi:10.1002/ijc.21731
- Pérez-Portilla, A., Moraru, M., Blázquez-Moreno, A., Kolb, P., Bravo García-Morato, M., Ranganath, T., . . . Reyburn, H. T. (2020). Identification of the first cases of complete CD16A deficiency: Association with persistent EBV infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(4), 1288-1292. doi:10.1016/j.jaci.2019.11.049
- Phillips, J. H., Le, A. M., & Lanier, L. L. (1984). Natural killer cells activated in a human mixed lymphocyte response culture identified by expression of Leu-11 and class II histocompatibility antigens. *J Exp Med*, 159(4), 993-1008. doi:10.1084/jem.159.4.993
- Piriou, E., Asito, A. S., Sumba, P. O., Fiore, N., Middeldorp, J. M., Moormann, A. M., . . . Rochford, R. (2012). Early age at time of primary Epstein-Barr virus infection results in poorly controlled viral infection in infants from Western Kenya: clues to the etiology of endemic Burkitt lymphoma. *J Infect Dis*, 205(6), 906-913. doi:10.1093/infdis/jir872
- Price, A. M., & Luftig, M. A. (2014). Dynamic Epstein-Barr virus gene expression on the path to B-cell transformation. *Adv Virus Res*, 88, 279-313. doi:10.1016/b978-0-12-800098-4.00006-4
- Pudney, V. A., Leese, A. M., Rickinson, A. B., & Hislop, A. D. (2005). CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med*, 201(3), 349-360. doi:10.1084/jem.20041542
- Purtilo, D. T., Grierson, H. L., Davis, J. R., & Okano, M. (1991). The X-linked lymphoproliferative disease: from autopsy toward cloning the gene 1975-1990. *Pediatr Pathol*, 11(5), 685-710. doi:10.3109/15513819109065466
- Quinn, L. L., Zuo, J., Abbott, R. J., Shannon-Lowe, C., Tierney, R. J., Hislop, A. D., & Rowe, M. (2014). Cooperation between Epstein-Barr virus immune evasion proteins spreads protection from CD8+ T cell recognition across all three phases of the lytic cycle. *PLoS Pathog*, 10(8), e1004322. doi:10.1371/journal.ppat.1004322
- Rickinson, A. B. (2014). Co-infections, inflammation and oncogenesis: future directions for EBV research. *Semin Cancer Biol*, 26, 99-115. doi:10.1016/j.semcancer.2014.04.004
- Rickinson, A. B., Long, H. M., Palendira, U., Munz, C., & Hislop, A. D. (2014). Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol*, 35(4), 159-169. doi:10.1016/j.it.2014.01.003
- Rinaldi, L., Gallo, P., Calabrese, M., Ranzato, F., Luise, D., Colavito, D., . . . Leon, A. (2006). Longitudinal analysis of immune cell phenotypes in early stage multiple sclerosis: distinctive patterns characterize MRI-active patients. *Brain*, 129(Pt 8), 1993-2007. doi:10.1093/brain/awl179
- Rodrigues, L. S., Barreto, A. S., Bomfim, L. G. S., Gomes, M. C., Ferreira, N. L. C., da Cruz, G. S., . . . de Almeida, R. P. (2021). Multifunctional, TNF- α and IFN- γ -Secreting CD4 and CD8 T Cells and

- CD8(High) T Cells Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol*, 12, 773983. doi:10.3389/fimmu.2021.773983
- Roederer, M., Nozzi, J. L., & Nason, M. C. (2011). SPICE: Exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry Part A*, 79A(2), 167-174. doi:10.1002/cyto.a.21015
- Rölle, A., Halenius, A., Ewen, E. M., Cerwenka, A., Hengel, H., & Momburg, F. (2016). CD2-CD58 interactions are pivotal for the activation and function of adaptive natural killer cells in human cytomegalovirus infection. *Eur J Immunol*, 46(10), 2420-2425. doi:10.1002/eji.201646492
- Roingard, P. (2008). Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biol Cell*, 100(8), 491-501. doi:10.1042/bc20070173
- Rühl, J., Leung, C. S., & Münz, C. (2020). Vaccination against the Epstein-Barr virus. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(21), 4315–4324. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03538-3>
- Ruiss, R., Jochum, S., Wanner, G., Reisbach, G., Hammerschmidt, W., & Zeidler, R. (2011). A virus-like particle-based Epstein-Barr virus vaccine. *J Virol*, 85(24), 13105-13113. doi:10.1128/jvi.05598-11
- Sainz, T., Serrano-Villar, S., Díaz, L., Tomé, M. I. G., Gurbindo, M. D., de José, M. I., . . . Muñoz-Fernández, M. Á. (2013). The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *AIDS (London, England)*, 27(9), 1513–1516. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835faa72>
- Salgado, F. J., Lojo, J., Fernández-Alonso, C. M., Viñuela, J., Cordero, O. J., & Nogueira, M. (2002). Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells. *Immunol Cell Biol*, 80(2), 138-147. doi:10.1046/j.1440-1711.2002.01055.x
- Scherrenburg, J., Piriou, E. R. W. A. N., Nanlohy, N. M., & van Baarle, D. (2008). Detailed analysis of Epstein-Barr virus-specific CD4+ and CD8+ T cell responses during infectious mononucleosis. *Clin Exp Immunol*, 153(2), 231-239. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03699.x
- Seder, R. A., Darrah, P. A., & Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 8(4), 247-258. doi:10.1038/nri2274
- Serti, E., Chepa-Lotrea, X., Kim, Y. J., Keane, M., Fryzek, N., Liang, T. J., . . . Rehermann, B. (2015). Successful Interferon-Free Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection Normalizes Natural Killer Cell Function. *Gastroenterology*, 149(1), 190-200.e192. doi:10.1053/j.gastro.2015.03.004
- Shannon-Lowe, C. D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A. B., & Delecluse, H. J. (2006). Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 7065-7070. doi:10.1073/pnas.0510512103
- Shannon-Lowe, C., & Rowe, M. (2014). Epstein Barr virus entry; kissing and conjugation. *Curr Opin Virol*, 4, 78-84. doi:10.1016/j.coviro.2013.12.001
- Silins, S. L., Sherritt, M. A., Silleri, J. M., Cross, S. M., Elliott, S. L., Bharadwaj, M., . . . Misko, I. S. (2001). Asymptomatic primary Epstein-Barr virus infection occurs in the absence of blood T-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load. *Blood*, 98(13), 3739-3744. doi:10.1182/blood.V98.13.3739
- Silva, P. H. L., Santos, L. N., Mendes, M. A., Nery, J. A. C., Sarno, E. N., & Esquenazi, D. (2019). Involvement of TNF-Producing CD8(+) Effector Memory T Cells with Immunopathogenesis of Erythema Nodosum Leprosum in Leprosy Patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 100(2), 377-385. doi:10.4269/ajtmh.18-0517
- Snow, A. L., Marsh, R. A., Krummey, S. M., Roehrs, P., Young, L. R., Zhang, K., . . . Lenardo, M. J. (2009). Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin Invest*, 119(10), 2976-2989. doi:10.1172/jci39518
- Sokal, E. M., Hoppenbrouwers, K., Vandermeulen, C., Moutschen, M., Léonard, P., Moreels, A., . . . Denis, M. (2007). Recombinant gp350 Vaccine for Infectious Mononucleosis: A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate the Safety, Immunogenicity,

- and Efficacy of an Epstein- Barr Virus Vaccine in Healthy Young Adults. *J Infect Dis*, 196(12), 1749-1753. doi:10.1086/523813
- Streltsova, M. A., Erokhina, S. A., Kanevskiy, L. M., Grechikhina, M. V., Kobzyeva, P. A., Lee, D. A., . . . Kovalenko, E. I. (2019). Recurrent Stimulation of Natural Killer Cell Clones with K562 Expressing Membrane-Bound Interleukin-21 Affects Their Phenotype, Interferon- γ Production, and Lifespan. *Int J Mol Sci*, 20(2). doi:10.3390/ijms20020443
- Strowig, T., Brilot, F., Arrey, F., Bougras, G., Thomas, D., Muller, W. A., & Münz, C. (2008). Tonsillar NK Cells Restrict B Cell Transformation by the Epstein-Barr Virus via IFN- γ ? *PLoS Pathog*, 4(2), e27. doi:10.1371/journal.ppat.0040027
- Sugaya, N., Kimura, H., Hara, S., Hoshino, Y., Kojima, S., Morishima, T., . . . Kuzushima, K. (2004). Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T cells in patients with chronic active EBV infection. *J Infect Dis*, 190(5), 985-988. doi:10.1086/423285
- Sulik, A., Oldak, E., Kroten, A., Lipska, A., & Radziwon, P. (2014). Epstein-Barr virus effect on frequency of functionally distinct T cell subsets in children with infectious mononucleosis. *Adv Med Sci*, 59(2), 227-231. doi:10.1016/j.advms.2014.04.003
- Sumaya, C. V., & Ench, Y. (1986). Epstein-Barr virus infections in families: the role of children with infectious mononucleosis. *J Infect Dis*, 154(5), 842-850. doi:10.1093/infdis/154.5.842
- Sundström, Y., Nilsson, C., Lilja, G., Kärre, K., Troye-Blomberg, M., & Berg, L. (2007). The Expression of Human Natural Killer Cell Receptors in Early Life. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2-3), 335-344. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01980.x
- Sutton, R. N. (1972). The EB virus in relation to infectious mononucleosis. *Journal of clinical pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)*, 6, 58-64.
- Takahashi, E., Kuranaga, N., Satoh, K., Habu, Y., Shinomiya, N., Asano, T., . . . Hayakawa, M. (2007). Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16- CD56dim NK Cells but also from CD16- CD56dim NK cells. *Scand J Immunol*, 65(2), 126-138. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01883.x
- Tangye, S. G. (2014). XLP: clinical features and molecular etiology due to mutations in SH2D1A encoding SAP. *J Clin Immunol*, 34(7), 772-779. doi:10.1007/s10875-014-0083-7
- Taylor, G. S., Long, H. M., Brooks, J. M., Rickinson, A. B., & Hislop, A. D. (2015). The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu Rev Immunol*, 33, 787-821. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112326
- Thomas, R., Low, H. Z., Kniesch, K., Jacobs, R., Schmidt, R. E., & Witte, T. (2012). NKG2C deletion is a risk factor of HIV infection. *AIDS research and human retroviruses*, 28(8), 844-851. doi:10.1089/AID.2011.0253
- Thorley-Lawson, D. A., & Babcock, G. J. (1999). A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. *Life Sci*, 65(14), 1433-1453. doi:10.1016/s0024-3205(99)00214-3
- Thorley-Lawson, D. A., Hawkins, J. B., Tracy, S. I., & Shapiro, M. (2013). The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Current opinion in virology*, 3(3), 227-232. doi:10.1016/j.coviro.2013.04.005
- Trottier, H., Buteau, C., Robitaille, N., Duval, M., Tucci, M., Lacroix, J., & Alfieri, C. (2012). Transfusion-related Epstein-Barr virus infection among stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study in children. *Transfusion*, 52(12), 2653-2663. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03611.x
- Tugizov, S. M., Berline, J. W., & Palefsky, J. M. (2003). Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med*, 9(3), 307-314. doi:10.1038/nm830
- Van Acker, H. H., Capsomidis, A., Smits, E. L., & Van Tendeloo, V. F. (2017). CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Frontiers in Immunology*, 8, 892-892. doi:10.3389/fimmu.2017.00892
- van Zyl, D. G., Tsai, M. H., Shumilov, A., Schneidt, V., Poirey, R., Schlehe, B., Fluhr, H., Mautner, J., & Delecluse, H. J. (2018). Immunogenic particles with a broad antigenic spectrum stimulate

- cytolytic T cells and offer increased protection against EBV infection ex vivo and in mice. *PLoS pathogens*, 14(12), e1007464. doi.org/10.1371/journal.ppat.1007464
- Verghese, P. S., Schmeling, D. O., Knight, J. A., Matas, A. J., & Balfour, H. H., Jr. (2015). Valganciclovir administration to kidney donors to reduce the burden of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus transmission during transplantation. *Transplantation*, 99(6), 1186-1191. doi:10.1097/tp.0000000000000490
- Voynova, E. N., Skinner, J., & Bolland, S. (2015). Expansion of an atypical NK cell subset in mouse models of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 194(4), 1503-1513. doi:10.4049/jimmunol.1402673
- Wherry, E. J., Teichgräber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., . . . Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*, 4(3), 225-234. doi:10.1038/ni889
- Wiesmayr, S., Webber, S. A., Macedo, C., Popescu, I., Smith, L., Luce, J., & Metes, D. (2012). Decreased Nkp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLD. *Eur J Immunol*, 42(2), 541-550. doi:10.1002/eji.201141832
- Williams, H., McAulay, K., Macsween, K. F., Gallacher, N. J., Higgins, C. D., Harrison, N., . . . Crawford, D. H. (2005). The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *British Journal of Haematology*, 129(2), 266-274. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05452.x
- Williams, L. R., Quinn, L. L., Rowe, M., & Zuo, J. (2016). Induction of the Lytic Cycle Sensitizes Epstein-Barr Virus-Infected B Cells to NK Cell Killing That Is Counteracted by Virus-Mediated NK Cell Evasion Mechanisms in the Late Lytic Cycle. *Journal of Virology*, 90(2), 947-958. doi:10.1128/jvi.01932-15
- Yano, N., Endoh, M., Nomoto, Y., Sakai, H., & Rifai, A. (1996). Increase of HLA-DR-positive natural killer cells in peripheral blood from patients with IgA nephropathy. *Hum Immunol*, 49(1), 64-70. doi:10.1016/0198-8859(96)00057-2
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D., & Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(12), 3806-3810. doi:10.1073/pnas.81.12.3806
- Young, L. S., Yap, L. F., & Murray, P. G. (2016). Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nature Reviews Cancer*, 16(12), 789-802. doi:10.1038/nrc.2016.92
- Yuan, J., Cahir-McFarland, E., Zhao, B., & Kieff, E. (2006). Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication. *J Virol*, 80(5), 2548-2565. doi:10.1128/jvi.80.5.2548-2565.2006

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme EBV-infizierter Lymphomzellen (Epstein, 2015); S. 14

Abbildung 2: Differenzierungsstufen reifer NK-Zellen; S. 24

Abbildung 3: Reaktivität EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen gegenüber lytischen und latenten Virusantigenen (Taylor et al., 2015); S. 29

Abbildung 4: Dynamik der Antikörperantwort auf EBV bei Primärinfektion, in der Rekonvaleszenzzeit und bei chronischer Viruspersistenz bzw. Reaktivierung (Middeldorp, 2015); S. 32

Abbildung 5: Auftrennung der Blutbestandteile mittels Pancoll-Trennlösung; S. 38

Abbildung 6: *Gating*-Strategie für die Analyse von NK-Zellen; S. 44

Abbildung 7: NK-Zellfrequenz im Verlauf der frühen EBV-IM; S. 45

Abbildung 8: Frequenz von CD56^{bright} CD16⁻ (A) und CD56^{bright} CD16⁺ NK-Zellen (B) im Verlauf der frühen EBV-IM; S. 46

Abbildung 9: Frequenz von CD56^{dim} CD16⁻ und CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM; S. 48

Abbildung 10: Anteil CD57⁺ NK-Zellen an CD56^{dim} CD16⁻ und CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM; S. 48

Abbildung 11: Frequenz der CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen und Expression von CD57 an v1 und v2, S. 49

Abbildung 12: Expression von HLA-DR auf den verschiedenen NK-Zellsubpopulationen an v1 und v2; S. 50

Abbildung 13: *Gating*-Strategie für die Analyse EBV-spezifischer T-Zellen; S. 50

Abbildung 14: Frequenz EBV-spezifischer CD3, CD4 und CD8 T-Zellen, sowie CD4/CD8-Verhältnis im Verlauf der frühen EBV-IM; S. 55

Abbildung 15: Gesamtzytokinexpression EBV-spezifischer T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM; S. 57

Abbildung 16: Funktionalität EBV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen im Krankheitsverlauf nach Stimulation mit BZLF1 und EBNA3A sowie mit EB-VLP; S. 59

Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung EBV-spezifischer mono- und polyfunktionaler CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation mit T-*activated* Proteinen und EB-VLP an v1 und v2; S. 61

Abbildung 18: Anteil EBV-spezifischer mono- und polyfunktionaler CD4 T-Zellen nach Stimulation mit T-*activated* Proteinen und EB-VLP an v1 und v2; S. 63

Abbildung 19: Anteil EBV-spezifischer mono- und polyfunktionaler CD8 T-Zellen nach Stimulation mit T-*activated* Proteinen und EB-VLP an v1 und v2; S. 64

Tabelle 1: Einschlusskriterien für die IMMUC-Studie; S. 37

Tabelle 2: Beschreibung der Patient:innenkohorte; S. 42

Tabelle 3: Korrelation der CD56^{bright} NK-Zellen zur Frequenz der EBV-spezifischen CD4- und CD8-T-Zellen; S. 47

Tabelle 4: Korrelation der HLA-DR⁺ CD56^{dim} CD16⁻ und CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen zur Frequenz der EBV-spezifischen CD4- und CD8-T-Zellen; S. 51

Tabelle 5: Korrelationen ausgewählter NK-Zellparameter mit Δv_{onset} und Alter der Patient:innen; S. 52

Tabelle 6: Anteil reaktiver Patient:innen innerhalb der untersuchten Kohorte; S. 58

Tabelle 7: Korrelation der EBV-spezifischen T-Zellfrequenz mit klinischen und virologischen Parametern am Beispiel BZLF1-stimulierter Proben; S. 66

Tabelle S1: Korrelation der NK-Zellen, bzw. der NK-Subpopulationen zu klinischen und virologischen Parametern; S. 104

Tabelle S2: Frequenz EBV-spezifischer CD3, CD4 und CD8 T-Zellen im Verlauf der akuten EBV-IM; S. 108

Tabelle S3: Korrelation der EBV-spezifischen T-Zellfrequenz mit klinischen und virologischen Parametern; S. 110

7 Anhang

Tabelle S1: Korrelation der NK-Zellen, bzw. der NK-Subpopulationen zu klinischen und virologischen Parametern

Spearman-Korrelation	Δv_{onset} [Tage]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
NK-Zellfrequenz [NK/ μ l Vollblut]	-0,6042	0,0007***	-0,1556	0,4577
NK-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	-0,0203	0,9183	0,0084	0,9675
CD56 ^{bright} CD16 ⁻ [% der NK-Zellen]	0,2673	0,1692	0,2084	0,3069
CD56 ^{bright} CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	0,1518	0,4406	0,0365	0,8595
CD56 ^{dim} CD16 ⁻ [% der NK-Zellen]	0,0489	0,8050	-0,1121	0,5857
CD56 ^{dim} CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	-0,3295	0,0869	0,0519	0,8011
CD56 ⁻ CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	-0,1963	0,3168	-0,0723	0,7255
Spearman-Korrelation	Δv_{onset} [Tage]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
CD57 ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁻]	0,1212	0,5388	0,0172	0,9336
CD57 ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	0,1151	0,5596	0,4036	0,0409*
CD57 ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁻]	0,1458	0,4591	-0,0103	0,9600
CD57 ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁺]	0,1573	0,4240	0,3202	0,1108
CD57 ⁺ [% CD56 ⁻ CD16 ⁺]	0,3847	0,0432*	0,4710	0,0151*
Spearman-Korrelation	Δv_{onset} [Tage]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁻]	-0,2349	0,2289	0,2240	0,2712
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	-0,3950	0,0375*	0,2773	0,1702
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁻]	-0,3772	0,0479*	-0,0216	0,9166
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁺]	-0,2805	0,1482	0,1650	0,4207
HLA-DR ⁺ [% CD56 ⁻ CD16 ⁺]	-0,2372	0,2243	0,1697	0,4072

Spearman-Korrelation	Alter [Jahre]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
NK-Zellfrequenz [NK/ μ l Vollblut]	-0,3731	0,0505	-0,1982	0,3423
NK-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	0,1985	0,3111	-0,0274	0,8944
CD56 ^{bright} CD16 ⁻ [% der NK-Zellen]	-0,1560	0,4279	0,1197	0,5603
CD56 ^{bright} CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	-0,2374	0,2239	0,1385	0,4999
CD56 ^{dim} CD16 ⁻ [% der NK-Zellen]	-0,1278	0,2655	-0,1367	0,5054
CD56 ^{dim} CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	0,1744	0,3749	-0,0455	0,8254
CD56 ⁻ CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	-0,5750	0,0014**	-0,5356	0,0048**
Spearman-Korrelation	Alter [Jahre]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
CD57 ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁻]	-0,1616	0,4113	-0,1350	0,5108
CD57 ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	-0,1161	0,5563	0,3378	0,0915
CD57 ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁻]	0,3360	0,0805	0,2022	0,3218
CD57 ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁺]	0,1060	0,5913	0,0340	0,8463
CD57 ⁺ [% CD56 ⁻ CD16 ⁺]	0,1431	0,4675	0,0234	0,9096
Spearman-Korrelation	Alter [Jahre]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁻]	-0,1476	0,4534	-0,4454	0,0226*
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	-0,1942	0,3222	-0,4126	0,0362*
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁻]	-0,1699	0,3874	-0,3817	0,0543
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁺]	-0,2189	0,2630	-0,3243	0,1061
HLA-DR ⁺ [% CD56 ⁻ CD16 ⁺]	-0,1135	0,5654	-0,2742	0,1752

Spearman-Korrelation	Viruslast Zellfraktion [IU/10 ⁵]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
NK-Zellfrequenz [NK/μl Vollblut]	0,3243	0,0922	0,2777	0,1889
NK-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	-0,0753	0,7034	-0,3250	0,1129
CD56 ^{bright} CD16 ⁻ [% der NK-Zellen]	0,0096	0,9614	0,1363	0,5159
CD56 ^{bright} CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	-0,0320	0,8715	0,0340	0,8747
CD56 ^{dim} CD16 ⁻ [% der NK-Zellen]	0,0635	0,7482	0,2932	0,1550
CD56 ^{dim} CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	0,1588	0,4196	0,1356	0,5180
CD56 ⁻ CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	0,2447	0,2095	0,2144	0,3034
Spearman-Korrelation	Viruslast Zellfraktion [IU/10 ⁵]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
CD57 ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁻]	-0,0262	0,8946	-0,2122	0,3194
CD57 ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	-0,1110	0,5738	-0,1831	0,3917
CD57 ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁻]	-0,3324	0,0840	-0,0819	0,6972
CD57 ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁺]	-0,0713	0,7184	-0,0050	0,9815
CD57 ⁺ [% CD56 ⁻ CD16 ⁺]	-0,4157	0,0278*	-0,2834	0,1699
Spearman-Korrelation	Viruslast Zellfraktion [IU/10 ⁵]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁻]	-0,0128	0,9485	0,0190	0,9296
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	0,0532	0,7879	0,1077	0,6163
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁻]	0,3249	0,0916	0,2816	0,1727
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁺]	0,1785	0,3636	0,1095	0,6104
HLA-DR ⁺ [% CD56 ⁻ CD16 ⁺]	0,2108	0,2817	0,3483	0,0880

Spearman-Korrelation	Viruslast Plasma [IU/ml]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
NK-Zellfrequenz [NK/ μ l Vollblut]	0,4077	0,0313*	n.m.	n.m.
NK-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	-0,1547	0,4319	n.m.	n.m.
CD56 ^{bright} CD16 ⁻ [% der NK-Zellen]	-0,3159	0,1015	n.m.	n.m.
CD56 ^{bright} CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	-0,2147	0,2726	n.m.	n.m.
CD56 ^{dim} CD16 ⁻ [% der NK-Zellen]	-0,1538	0,4346	n.m.	n.m.
CD56 ^{dim} CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	-0,1377	0,4847	n.m.	n.m.
CD56 ⁻ CD16 ⁺ [% der NK-Zellen]	0,0425	0,8299	n.m.	n.m.
Spearman-Korrelation	Viruslast Plasma [IU/ml]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
CD57 ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁻]	0,0054	0,9782	n.m.	n.m.
CD57 ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	0,3474	0,0701	n.m.	n.m.
CD57 ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁻]	-0,0315	0,8736	n.m.	n.m.
CD57 ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁺]	-0,0989	0,6165	n.m.	n.m.
CD57 ⁺ [% CD56 ⁻ CD16 ⁺]	-0,0088	0,9647	n.m.	n.m.
Spearman-Korrelation	Viruslast Plasma [IU/ml]			
	v1		v2	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁻]	-0,1480	0,4522	n.m.	n.m.
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{bright} CD16 ⁺]	0,0309	0,8759	n.m.	n.m.
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁻]	0,2554	0,1896	n.m.	n.m.
HLA-DR ⁺ [% CD56 ^{dim} CD16 ⁺]	0,1857	0,3440	n.m.	n.m.
HLA-DR ⁺ [% CD56 ⁻ CD16 ⁺]	0,3317	0,0847	n.m.	n.m.

r = Spearman r ; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$, n.m. = nicht möglich

Tabelle S2: Frequenz EBV-spezifischer CD3, CD4 und CD8 T-Zellen im Verlauf der frühen EBV-IM

Patient	v1											
	CD3 [% der vitalen Lymphozyten]				CD4 [% der CD3 T-Zellen]				CD8 [% der CD3 T-Zellen]			
	BZLF1	EBNA3A	EB-VLP	Unstim	BZLF1	EBNA3A	EB-VLP	Unstim	BZLF1	EBNA3A	EB-VLP	Unstim
EP-A001	82,3	80,8	83,4	82,2	28,8	28,2	24,4	28,5	49,6	49,2	55,8	49,5
EP-A004	68,1	69,0	70,1	68,4	33,9	33,8	32,9	35,1	29,7	36,6	30,0	38,2
EP-A007	68,2	67,0	76,9	66,7	39,6	39,9	28,0	40,0	52,3	52,2	66,3	54,2
EP-A037	84,5	84,0	89,3	85,2	20,0	20,2	13,0	23,1	61,9	61,8	73	66,6
EP-A042	78,9	78,3	80,3	78,4	41,4	40,4	37,6	41,5	38,9	38,8	42,3	40,6
EP-A056	85,8	85,6	87,0	85,5	22,2	21,9	18,5	23,1	59,5	59,9	66,4	61,9
EP-A071	84,1	83,5	84,0	83,8	40,5	40,0	36,3	40,3	37,2	37,9	39,1	38,0
EP-A083	89,3	89,0	90,5	89,1	14,7	14,2	11,7	16,1	68,0	69,2	72,4	69,2
EP-A087	86,6	85,9	87,7	86,6	44,8	44,0	42,0	45,4	35,9	35,9	39,6	37,6
EP-A092	86,6	86,1	88,5	86,4	11,9	12,4	9,38	14,8	72,3	70,4	76,4	74,1
EP-A096	85,0	83,4	87,9	83,2	8,8	9,09	8,91	14,2	70,40	68,5	72,1	70,0
EP-A099	75,2	73,6	78,5	74,2	29,1	27,5	26,7	31,2	49,5	49,7	53,1	49,4
EP-A100	82,2	82,2	86,3	81,9	32,5	30,9	20,0	34,7	54,1	54,4	66,7	58,9
EP-A101	84,4	85,5	89,2	87,6	11,1	11,9	8,1	16,3	75,3	78,2	83,6	83,5
EP-A104	73,7	72,7	80,5	74,2	18,9	17,1	11,5	21,6	67,3	66,1	78,5	71,0
EP-A106	82,7	82,4	85,8	83,1	20,3	22,2	18,0	27,8	56,7	59,0	69,1	60,8
EP-A107	82,5	82,1	87,9	81,3	11,2	12,8	10,3	20,6	72,2	70,5	77,6	73,0
EP-A258	83,0	82,8	86,6	83,4	16,7	17,5	13,4	19,4	69,6	68,1	72,8	71,8

Patient	v2											
	CD3 [% der vitalen Lymphozyten]				CD4 [% der CD3 T-Zellen]				CD8 [% der CD3 T-Zellen]			
	BZLF1	EBNA3A	EB-VLP	Unstim	BZLF1	EBNA3A	EB-VLP	Unstim	BZLF1	EBNA3A	EB-VLP	Unstim
EP-A001	79,6	78,8	79,0	79,5	44,0	44,2	47,2	45,7	39,9	40,9	40,1	40,7
EP-A004	75,5	74,3	76,8	75,3	38,6	38,3	39,7	40,0	34,5	33,8	34,3	36,2
EP-A007	64,8	64,9	69,0	64,7	56,7	55,8	54,4	57,8	31,5	32,7	35,6	32,5
EP-A037	86,0	85,0	86,1	85,6	54,1	54,1	54,4	55,6	27,4	27,4	26,6	28,5
EP-A042	76,4	75,7	78,1	75,9	51,6	51,0	51,7	52,1	26,2	26,5	27,0	26,5
EP-A056	81,4	79,8	82,4	81,3	43,1	42,6	43,1	43,3	31,4	31,8	32,0	31,6
EP-A071	83,9	82,9	83,6	83,5	45,4	44,8	44,6	45,0	32,4	32,4	31,9	31,9
EP-A083	78,7	78,1	78,7	78,3	56,2	56,0	54,3	57,9	26,1	26,1	27,5	27,3
EP-A087	83,5	82,7	83,6	83,3	48,7	48,4	44,7	49,3	32,4	32,4	35,4	33,7
EP-A092	74,6	74,8	75,6	74,8	45,5	45,0	45,2	46,3	33,2	33,2	33,5	33,6
EP-A096	80,1	78,7	82,2	79,6	28,4	27,1	28,0	29,8	33,1	34,3	36,6	36,3
EP-A099	70,6	70,2	72,9	70,5	31,4	31,6	32,9	34,7	42,7	44,5	41,4	44,2
EP-A100	79,4	79,2	80,7	79,1	56,4	55,4	51,8	57,2	31,2	31,3	31,8	32,9
EP-A101	84,8	82,0	85,3	84,0	51,1	50,1	51,3	53,2	40,1	40,7	40,6	41,2
EP-A104	75,0	73,9	77,6	75,1	42,1	41,0	43,8	48,0	40,7	42,1	40,7	44,7
EP-A106	71,5	71,7	75,6	72,4	44,1	47,5	46,9	47,3	26,2	31,1	28,2	31,6
EP-A107	77,8	76,9	80,2	77,7	35,3	37,1	39,5	43,1	37,2	41,0	43,8	43,3
EP-A258	94,6	94,4	94,8	94,0	25,4	25,9	22,0	26,2	65,0	64,4	68,0	66,5

Tabelle S3: Korrelation der EBV-spezifischen T-Zellfrequenz mit klinischen und virologischen Parametern

Spearman-Korrelation	Δv_{onset}			
	v1		v2	
CD4 und CD8 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4 BZLF1	0,3461	0,1594	-0,0776	0,7597
CD8 BZLF1	-0,5109	0,0303*	0,2443	0,3286
CD4/CD8 BZLF1	0,4435	0,0652	-0,1065	0,6740
CD4 EBNA3A	0,3959	0,1039	-0,0827	0,7442
CD8 EBNA3A	-0,5275	0,0245*	0,1940	0,4405
CD4/CD8 EBNA3A	0,4000	0,1000	-0,1065	0,6740
CD4 EB-VLP	0,4819	0,0429*	0,0331	0,8962
CD8 EB-VLP	-0,5347	0,0222*	0,1427	0,5721
CD4/CD8 EB-VLP	0,5596	0,0157*	-0,1489	0,5554
CD3 T-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD3 BZLF1	-0,1001	0,6928	0,1830	0,4672
CD3 EBNA3A	-0,1554	0,5380	0,1375	0,5863
CD3 EB-VLP	-0,2431	0,3310	0,1071	0,6722

Spearman-Korrelation	Alter			
	v1		v2	
CD4 und CD8 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4 BZLF1	-0,4252	0,0786	-0,4231	0,0802
CD8 BZLF1	0,3566	0,1464	0,5973	0,0089**
CD4/CD8 BZLF1	-0,4148	0,0870	-0,5572	0,0163*
CD4 EBNA3A	-0,4054	0,0951	-0,4345	0,0716
CD8 EBNA3A	0,3306	0,1803	0,5778	0,0120*
CD4/CD8 EBNA3A	-0,4272	0,0770	-0,5572	0,0163*
CD4 EB-VLP	-0,3649	0,1365	-0,3297	0,1815
CD8 EB-VLP	0,3534	0,1502	0,5447	0,0194*
CD4/CD8 EB-VLP	-0,3150	0,2030	-0,5458	0,0191*
CD3 T-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD3 BZLF1	-0,1383	0,5841	0,2994	0,2275
CD3 EBNA3A	-0,1684	0,5041	0,2037	0,4174
CD3 EB-VLP	0,1217	0,6305	0,3111	0,2088

Spearman-Korrelation	Viruslast Zellfraktion [IU/10 ⁵]			
	v1		v2	
CD4 und CD8 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4 BZLF1	-0,3944	0,1053	0,1840	0,4796
CD8 BZLF1	0,5503	0,0180*	-0,1255	0,6312
CD4/CD8 BZLF1	-0,4966	0,0360*	0,1019	0,6972
CD4 EBNA3A	-0,4347	0,0714	0,1384	0,5964
CD8 EBNA3A	0,5348	0,0222*	-0,1179	0,6522
CD4/CD8 EBNA3A	-0,4812	0,0432*	0,1019	0,6972
CD4 EB-VLP	-0,4368	0,0699	0,0358	0,8916
CD8 EB-VLP	0,3986	0,1014	-0,0046	0,9861
CD4/CD8 EB-VLP	-0,5348	0,0222*	0,0259	0,9216
CD3 T-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD3 BZLF1	0,3554	0,1478	-0,1642	0,5288
CD3 EBNA3A	0,3118	0,2078	-0,0806	0,7585
CD3 EB-VLP	0,4143	0,0874	-0,1225	0,6396

Spearman-Korrelation	Viruslast Plasma [IU/ml]			
	v1		v2	
CD4 und CD8 T-Zellen [% der CD3 T-Zellen]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD4 BZLF1	-0,4385	0,0687	n.m.	n.m.
CD8 BZLF1	0,6159	0,0065**	n.m.	n.m.
CD4/CD8 BZLF1	-0,5025	0,0336*	n.m.	n.m.
CD4 EBNA3A	-0,4264	0,0776	n.m.	n.m.
CD8 EBNA3A	0,6071	0,0075**	n.m.	n.m.
CD4/CD8 EBNA3A	-0,4870	0,0404*	n.m.	n.m.
CD4 EB-VLP	-0,4319	0,0735	n.m.	n.m.
CD8 EB-VLP	0,5355	0,0220*	n.m.	n.m.
CD4/CD8 EB-VLP	-0,5190	0,0273*	n.m.	n.m.
CD3 T-Zellen [% der vitalen Lymphozyten]	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD3 BZLF1	0,3577	0,1450	n.m.	n.m.
CD3 EBNA3A	0,3945	0,1052	n.m.	n.m.
CD3 EB-VLP	0,4531	0,0590	n.m.	n.m.

r = Spearman *r*; ** = *p* < 0,01; * = *p* < 0,05, n.m. = nicht möglich

8 Danksagung

Ich danke meiner Familie. Vor allem Rike, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit Rat und Tat bei der Korrektur dieser Arbeit (und überhaupt im Leben) zur Seite stand. Du bist die allerbeste Schwester, die man sich nur vorstellen kann. Ich danke meinen Eltern, die mich immer in meinen Vorhaben unterstützt haben und trotz aller Höhen und Tiefen immer für mich da waren. Ich danke meinen Großeltern, die immer uneingeschränkt und bedingungslos an mich geglaubt haben.

Ich danke Uta, die trotz ihrer zahllosen Projekte immer ansprechbar und eine große Unterstützung war, wenn es ernst wurde. Ich danke Tanja, Nina, Josef, Andreas und Elfriede, für Korrekturen, kritischen Input und konstruktives Feedback. Ich danke Matt und dem gesamten Weitzman-Labor für die tollen Erlebnisse und unglaublich lehrreichen Monate, die ich in Philadelphia verbringen durfte.

Ich danke den Klinik- und Laborkolleg:innen, insbesondere Jonas, Anni, Martin und Felix für die Inspiration, für den emotionalen Support und die gute Zeit, die wir gemeinsam hatten.

Und nicht zuletzt danke ich Mirko, ohne den ich vermutlich mittlerweile mehrere Nervenzusammenbrüche erlitten hätte. Du hast mich aufgebaut, wenn es mir schlecht ging, du hast mich motiviert, wenn ich aufgeben wollte. Ich bin jeden Tag dankbar für jede Sekunde mit dir.

Ohne euch alle würde es diese Arbeit nicht geben. Vielen Dank für alles!