

## Durchflusszytometrische Analyse von $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Patienten mit infektiöser Mononukleose

Maria Elisabeth Bach

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der  
Technischen Universität München zur Erlangung einer  
Doktorin der Medizin (Dr. med.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Uta Behrends
2. Priv.-Doz. Dr. Andreas Moosmann

Die Dissertation wurde am 27.09.2023 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 05.06.2024  
angenommen.

## **Veröffentlichung**

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt präsentiert:

**01/09/2021 – 04/09/2021**

**6th European Congress of Immunology (ECI)** in

Belgrad, Serbien; Virtual Meeting

Poster-Präsentation: „Analysis of  $\gamma\delta$  T-cells in young patients with infectious mononucleosis”

## Inhaltsverzeichnis

<b>Veröffentlichung</b>	<b>2</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Das Epstein-Barr-Virus</b>	<b>9</b>
1.1.1 Infektiöse Mononukleose	10
1.1.2 EBV-Infektionszyklus	11
<b>1.2 Mechanismen und Komponenten des menschlichen Immunsystems</b>	<b>12</b>
1.2.1 Entwicklung und Differenzierung der T-Lymphozyten	13
1.2.2 Humane $\gamma\delta$ -T-Zellen	15
1.2.2.1 Oberflächenmoleküle auf humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen	16
1.2.2.2 Antigene und Antigenerkennung von humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen	17
1.2.2.3 Immunologische Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen	19
<b>1.3 Immunantwort der T-Zellen auf eine EBV-Infektion</b>	<b>20</b>
1.3.1 CD8+ und CD4+ T-Zellen im Kontext einer EBV-Infektion	21
1.3.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen im Zusammenhang mit EBV	22
<b>1.4 Durchflusszytometrie als Methode zur Charakterisierung humaner <math>\gamma\delta</math>-T-Zellen</b>	<b>23</b>
<b>2 Problemstellung</b>	<b>25</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Material und Spender</b>	<b>26</b>
3.1.1 Geräte	26
3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Equipment	27
3.1.3 Reagenzien, Stammlösungen und Puffer	27
3.1.4 Zytokine und Kommerzielle Kits	28
3.1.5 Antikörper	28
3.1.6 Blutspender	30
3.1.7 Software und Datenbanken	32
<b>3.2 Methoden</b>	<b>33</b>
3.2.1 Allgemeiner Umgang mit Zellen und Antikörpern	33
3.2.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut	33
3.2.3 Kryokonservierung von Zellen	33
3.2.4 Handhabung und Vorbereitung der Zellen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie	33
3.2.5 Zellkultur zur Aktivierung von T-Zellen	34
3.2.6 Titrationsen der für die <i>Multicolor</i> -Färbung verwendeten Antikörper	34
3.2.7 Kompensationskontrollen	37
3.2.8 Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie	37
3.2.9 Handhabung und Analyse des Probenmaterials	38

3.2.10	Datenerhebung im Rahmen der IMMUC-Studie	39
3.2.11	Statistische Auswertungen	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung einer <i>Multicolor</i>-Färbung zur durchflusszytometrischen Analyse humaner <math>\gamma\delta</math>-T-Zellen im Kontext einer IM</b>	<b>41</b>
4.1.1	Analyse der Interferenzen zwischen dem anti- $\gamma\delta$ -TCR- und dem anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper	41
4.1.2	Evaluierung verschiedener anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper in Bezug auf ihre Färbereigenschaften	44
4.1.3	Testung verschiedener anti-V $\delta$ 1-TCR- und anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper in Bezug auf ihre Färbereigenschaften	46
4.1.4	Auswahl von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffkombinationen zur durchflusszytometrischen Analyse humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen	48
4.1.5	Evaluierung vier verschiedener Antikörper zur Beurteilung des Differenzierungsstatus	50
4.1.6	Etablierung einer <i>Multicolor</i> -Färbung zur Analyse der Differenzierung humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen	51
4.1.7	Testung weiterer Antikörper zur Phänotypisierung humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen	55
4.1.8	Etablierung einer <i>Multicolor</i> -Färbung zur Analyse der Aktivierung und Zytotoxizität humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen	58
<b>4.2</b>	<b>Analyse der <math>\gamma\delta</math>-T-Zellen bei einer pädiatrischen Kohorte mit Infektiöser Mononukleose im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe</b>	<b>62</b>
4.2.1	Auswirkungen einer Ruhephase über Nacht ( <i>Resting</i> ) auf die Vitalität der Lymphozyten	64
4.2.2	Häufigkeit der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen, sowie der CD8+ und CD4+ T-Zellen	65
4.2.2.1	Proben ohne Ruhephase	65
4.2.2.2	Proben mit Ruhephase	65
4.2.3	Aktivierungsstatus der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen im Vergleich mit CD8+ und CD4+ T-Zellen	69
4.2.3.1	Proben ohne Ruhephase	69
4.2.3.2	Proben mit Ruhephase	69
4.2.4	Differenzierungsstatus der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen im Vergleich mit CD8+ und CD4+ T-Zellen	72
4.2.5	Expression der funktionellen Marker CD16 und CX3CR1 auf den $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen	74
<b>4.3</b>	<b>Korrelation der Häufigkeit und Aktivierung der <math>\gamma\delta</math>-T-Zellsubgruppen sowie der CD8+ und CD4+ T-Zellen mit ausgewählten klinischen Parametern</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>80</b>
<b>5.1</b>	<b>Diskussion der Methodik</b>	<b>80</b>
5.1.1	Durchflusszytometrische Analysen humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen	80
5.1.2	Antikörper zur Charakterisierung und Phänotypisierung humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen	81
5.1.3	Auswirkungen einer Ruhephase über Nacht	84
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der durchflusszytometrisch erhobenen Daten</b>	<b>85</b>

5.2.1	Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen am T-Zellpool im peripheren Blut	85
5.2.1.1	Altersabhängige Unterschiede	85
5.2.1.2	Geographische Unterschiede	86
5.2.1.3	Unterschiede im Kontext einer EBV-Infektion und IM	86
5.2.2	Verteilung der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen im peripheren Blut	88
5.2.2.1	Altersabhängige Unterschiede	88
5.2.2.2	Geographische und individuelle Unterschiede	88
5.2.2.3	Unterschiede im Kontext einer EBV-Infektion und IM	89
5.2.3	Zusammenfassung: Anteile der $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subpopulationen im Kontext der IM	90
5.2.4	Bedeutung weiterer Oberflächenmarker auf $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer IM	90
5.2.4.1	Differenzierungsmarker	90
5.2.4.2	Aktivierungsmarker	92
5.2.4.3	Marker der zytotoxischen Aktivität	92
5.2.5	Korrelation der durchflusszytometrischen Daten mit klinischen Parametern	93
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
	<b>Zusätzliche Tabellen und Abbildungen</b>	<b>99</b>
	<b>IMMUC-Score</b>	<b>114</b>
	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>122</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>126</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>138</b>

Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich auf alle Geschlechter. Auf eine Doppelnennung und gegenderte Bezeichnungen wird zugunsten einer besseren Lesbarkeit verzichtet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Begriffe aus der englischen Sprache wurden durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet.

## Abkürzungsverzeichnis

A700	Alexa Fluor 700
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität ( <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> )
ADP	Adenosindiphosphat
AHB	Akute Hepatitis B
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen-presenting cell</i> )
APC-H7	Allophycocyanin H7 – Tandem-Konjugat
BL	Burkitt-Lymphom
BV	<i>Brilliant Violet</i>
CAEBV	Chronisch aktive EBV-Infektion ( <i>chronic active EBV infection</i> )
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
CF	<i>Cyanine-based fluorescent dyes</i>
CMIA	Chemiluminiszenz-basierter Mikropartikelimmunassay ( <i>chemiluminescent microparticle immunoassay</i> )
CMV	Zytomegalievirus ( <i>cytomegalovirus</i> )
Cy5	Cyanin 5
Cy7	Cyanin 7
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Frühes Antigen ( <i>early antigen</i> )
EBNA	Nukleäres EBV-Antigen ( <i>EBV nuclear antigen</i> )
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPCR	Endothelialer Protein C-Rezeptor ( <i>endothelial protein C receptor</i> )
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
FSC	Vorwärtsstreuung ( <i>forward scatter</i> )
GOT / AST	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase / Aspartat-Aminotransferase
GPT / ALT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase / Alanin-Aminotransferase
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HHV	Humanes Herpesvirus ( <i>human herpes virus</i> )
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HLA	Humanes Leukozyten Antigen ( <i>human leukocyte antigen</i> )
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
HMBPP	Hydroxymethylbutenlypyrophosphat
hMSH2	Humanes DNA-Mismatch Reparatur Protein-2
IL	Interleukin

IM	Infektiöse Mononukleose
IMMUC-Studie	Studie zur Infektiösen Mononukleose in München
IPP	Isopentenylpyrophosphat
KIR	Killerzell-Immunglobulinähnlicher-Rezeptor ( <i>killer cell-immunoglobulinlike receptor</i> )
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie ( <i>lymphoblastoid cell line</i> )
LDH	Laktatdehydrogenase
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität ( <i>median fluorescence intensity</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MIC-A	Protein A der MHC-Klasse-I-Kette ( <i>MHC class I chain-related protein A</i> )
MIC-B	Protein B der MHC-Klasse-I-Kette ( <i>MHC class I chain-related protein B</i> )
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2, Member D</i>
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen ( <i>natural killer cells</i> )
OMIP	Optimiertes multiparametrisches durchflusszytometrisches Panel ( <i>optimized multicolor immunofluorescence panel</i> )
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll
PO	<i>Pacific Orange</i>
PTLD	Postransplantations-lymphoproliferative Erkrankungen ( <i>post-transplant lymphoproliferative disorder</i> )
RPM	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
SSC	Seitstreuung ( <i>side scatter</i> )
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
ULBP	UL-16-bindendes Protein ( <i>UL-16 binding protein</i> )
VCA	Viruskapsidantigen ( <i>virus capsid antigen</i> )



## 1 Einleitung

Viren sind Infektionserreger, die sich im Inneren von Zellen vermehren. Außerhalb von Zellen verbreiten sie sich als Virionen, kleine organische Partikel, die aus einem genetischen Bauplan (DNA oder RNA), Proteinen und manchmal einer Lipidhülle bestehen. Sie existieren schon seit Millionen von Jahren, kommen fast überall auf der Erde vor und haben als Krankheitserreger auch die menschliche Evolution mitbeeinflusst.

Eine Vielzahl von Viren hat sich im Laufe der Zeit an den Menschen als Wirt und Erregerreservoir angepasst. Manchen davon gelingt es, der Überwachung durch das menschliche Immunsystem gut genug auszuweichen, um nach der Erstinfektion ein Leben lang im menschlichen Körper zu persistieren. Unter bestimmten Umständen wie z.B. durch Stress oder im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie können sie reaktivieren und auf weitere Empfänger übertragen werden. Ein Beispiel für ein solches Virus ist das zur Familie der Herpesviren zählende Epstein-Barr-Virus (EBV), das mit diversen Autoimmunerkrankungen und Malignomen in Verbindung gebracht wird (Young et al., 2004; Houen et al., 2020). Im Rahmen der Erstinfektion kann EBV das Krankheitsbild der Infektiösen Mononukleose (IM) mit zum Teil lebensbedrohlichen Komplikationen und/oder langwierigen Verläufen auslösen (Balfour et al., 2015; Dunmire et al., 2015; Dunmire et al., 2018).

Obwohl EBV bereits 1964 entdeckt wurde (Epstein et al., 1964) und seitdem Gegenstand der Forschung ist, existiert bisher keine schützende Impfung, medikamentöse Prävention oder spezifische Therapie der IM, und viele Fragen in Bezug auf die menschliche Immunantwort auf EBV sind noch ungeklärt.

### 1.1 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus, auch als humanes Herpesvirus-4 (HHV4) bezeichnet, ist ein weit verbreitetes DNA-Virus, das erstmals im Jahr 1964 von Michael A. Epstein und Yvonne M. Barr in den B-Zellen eines Patienten mit Burkitt-Lymphom entdeckt wurde (Epstein et al., 1964; Howley et al., 2021).

Studien zur Seroprävalenz von EBV lassen vermuten, dass 90-95 % der Weltbevölkerung mit EBV infiziert sind (Melbye et al., 1984; Balfour, Sifakis, et al., 2013; Winter et al., 2020). Während in entwickelten Ländern der Erkrankungsgipfel im jugendlichen Alter liegt und eine Durchseuchungsrate von über 95 % erst bei den über 30-jährigen erreicht wird, sind in Entwicklungsländern die meisten Kinder bereits mit drei bis vier Jahren infiziert (de-Thé et al., 1975; Winter et al., 2020; Howley et al., 2021).

Das Virus wird vorwiegend durch direkten Speichelkontakt übertragen, daneben möglicherweise auch als Schmier- oder Tröpfcheninfektion, sowie durch Bluttransfusionen oder Organtransplantationen (Howley et al., 2021). Das Virus infiziert die Epithelzellen des Oro- und Nasopharynx, sowie lokal vorhandene B-Lymphozyten, die sich im Bereich der lymphatischen Gewebe des Nasen-/Rachenraumes befinden (Hoagland, 1955; Young & Rickinson, 2004; Hislop et al., 2007; Howley et al., 2021).

Nach der Erstinfektion persistiert das Virus latent ein Leben lang in den B-Lymphozyten des Wirts (Young & Rickinson, 2004; Hislop et al., 2007), eine intermittierende Reaktivierung mit erneuter Virusreplikation ist jedoch möglich (Laichalk et al., 2005; Kerr, 2019; Howley et al., 2021). Insbesondere Personen, die eine immunsuppressive Therapie erhalten oder unter einer sonstigen Immundefizienz leiden, können mitunter aufgrund ihrer abgeschwächten Immunantwort die Vermehrung des Virus nicht ausreichend kontrollieren und haben somit im Vergleich zu Gesunden bzw. Immunkompetenten ein höheres Risiko EBV-assoziierte Erkrankungen wie beispielsweise lymphoproliferative Erkrankungen zu entwickeln, zum Beispiel eine posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) oder Lymphome (Young & Rickinson, 2004; Taylor et al., 2015; Howley et al., 2021).

EBV wird mit diversen Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematoses und rheumatoider Arthritis assoziiert (Houen & Trier, 2020; Bjornevik et al., 2023). Als onkogenes Virus kann es außerdem die Entwicklung diverser Malignome wie Burkitt- und Hodgkin-Lymphome, sowie Nasopharynxkarzinome begünstigen (Young & Rickinson, 2004; Taylor et al., 2015; Howley et al., 2021).

### 1.1.1 Infektiöse Mononukleose

Während die Erstinfektion mit EBV im frühen Kindesalter in den meisten Fällen asymptomatisch verläuft, kann eine verzögerte Erstinfektion im jugendlichen oder Erwachsenenalter in ca. 75 % der Fälle (Dunmire et al., 2015) zum Krankheitsbild der IM führen (Fleisher et al., 1979; Balfour et al., 2015; Dunmire et al., 2015).

Die IM ist auch unter den Namen Pfeiffersches Drüsenfieber oder *kissing disease* (Kusskrankheit) bekannt. Die Inkubationszeit ist äußerst variabel und beträgt bis zu sechs Wochen (Hoagland, 1955; Balfour et al., 2015; Dunmire et al., 2015). Die durchschnittliche Erkrankungsdauer liegt etwa bei 19 Tagen, einzelne Symptome können aber noch deutlich länger bestehen (Dunmire et al., 2018).

Zu den typischen Symptomen der IM zählen Lymphknotenschwellungen (in 50 % der Fälle generalisiert), eine Tonsillitis und/oder Pharyngitis, sowie Fieber (Horwitz et al., 1981; Balfour et al., 2015; Herold, 2020). Zudem tritt häufig eine Splenomegalie (rein klinisch beobachtete Splenomegalie in 15-65% der Fälle; ultrasonographisch ist diese fast immer darstellbar) und eine Beteiligung der Leber (laborchemisch nachgewiesene Hepatitis in ca. 75 % der Fälle, ikterische Hepatitis in 5-10 % der Fälle) auf (Luzuriaga et al., 2010; Dunmire et al., 2015). In ca. 3 % der Fälle zeigt sich ein petechiales Enanthem am harten Gaumen (Dunmire et al., 2015; Herold, 2020).

Im Blutbild ist typischerweise eine Lymphozytose zu finden. Die hierfür verantwortlichen Lymphozyten sind als atypische reaktive Zellen, sogenannte Pfeiffer-Zellen oder Virozyten, im Blutaussstrich zu erkennen (Herold, 2020). In der klinischen Chemie wird häufig (in ca. 75 % der Fälle) eine Erhöhung der Leberparameter (Glutamat-Pyruvat-Transaminase [GPT] / Alaninaminotransferase [ALT] und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase [GOT] / Aspartat-Aminotransferase [AST]<sup>1</sup>)

---

<sup>1</sup> GPT und GOT sind beides Enzyme des Aminosäurestoffwechsels und sind im Rahmen einer Leberzellschädigung erhöht nachweisbar. Die GPT ist leberzellspezifisch und hauptsächlich im

beobachtet (Rosalki et al., 1960; Mygind, 1976; Balfour et al., 2015; Dunmire et al., 2015).

Komplikationen treten insgesamt eher selten auf, können jedoch schwerwiegend und lebensbedrohlich sein (Dunmire et al., 2015). Im Verlauf der Erkrankung kann es beispielsweise zu einer Obstruktion der Atemwege, einer Milzruptur, einer Peri- oder Myokarditis und/oder einer Meningoenzephalitis kommen (Alpert et al., 1984; Dunmire et al., 2015). Aufgrund einer pathologisch gesteigerten Hämophagozytose kann sich eine infektassoziierte Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) mit Panzytopenie und Blutungen entwickeln (Herold, 2020). Eine postinfektiöse Müdigkeit kann auch noch Wochen und Monate nach Abklingen der akuten Symptome bestehen (Dunmire et al., 2015). Eine weitere Komplikation und gleichzeitig sehr seltene, überwiegend in Asien auftretende Verlaufsform der IM stellt die chronisch aktive EBV-Infektion (CAEBV) dar, die sich durch eine anhaltende Virusreplikation auszeichnet (Dunmire et al., 2015).

Für die Diagnostik gilt der serologische Antikörpernachweis als der Goldstandard. Hierbei werden IgM- und IgG-Antikörper gegen Viruskapsidantigen (VCA), EBV-Nuclear-Antigen-1 (EBNA-1) und Early Antigen (EA) bestimmt. Anhand des zeitlich unterschiedlichen Auftretens dieser Antikörper kann eine frische EBV-Infektion von einer zurückliegenden Infektion mit dem Virus unterschieden werden (Dunmire et al., 2015; Herold, 2020).

Die Therapie der IM ist rein symptomatisch und besteht aus körperlicher Schonung, Gabe von Flüssigkeit sowie Analgesie und Antipyrese (Dunmire et al., 2018). Eine spezifische Therapie oder eine Impfung zur Prävention der Infektion existiert bisher nicht (Rühl et al., 2020). Bei Komplikationen wie etwa *kissing tonsils* können Steroide eingesetzt werden (Rezk et al., 2015).

Immunkompetente haben in der Regel eine gute Prognose, während bei Menschen unter Immunsuppression oder mit Immundefizienz häufiger schwere und langwierige Verläufe auftreten können (Young & Rickinson, 2004; Dunmire et al., 2018). Vormalig Gesunde können auch ein protrahiertes postvirales Syndrom bis hin zum Vollbild einer/s Myalgischen Enzephalomyelitis/Chronischen Fatigue-Syndroms (ME/CFS) entwickeln (Ruiz-Pablos et al., 2021; Sepúlveda et al., 2022).

Bisher ist noch weitestgehend unklar, welche Faktoren neben dem Alter bei Erstinfektion und/oder einer Immunsuppression bzw. -schwäche einen schweren und/oder protrahierten Verlauf einer IM begünstigen können (Crawford et al., 2006; Balfour et al., 2015; Winter et al., 2020).

### **1.1.2 EBV-Infektionszyklus**

Um ursächliche Faktoren und Biomarker für einen schweren und/oder protrahierten Verlauf einer IM zu finden sowie die Erkrankung spezifischer behandeln zu können, ist ein detailliertes Verständnis des EBV-Infektionszyklus essenziell.

---

Zytoplasma lokalisiert, während die GOT vorwiegend in den Mitochondrien der Leberzellen, Muskelzellen und Erythrozyten vorkommt und daher auch bei Muskelschädigung und/oder einem Myokardinfarkt erhöht sein kann (Herold, 2020, pp. 514, 515).

Nach der oralen Übertragung des Virus im Rahmen der primären Infektion, werden nach gängiger Auffassung die Epithelzellen des Oro- und Nasopharynx sowie einige lokal vorhandene B-Lymphozyten infiziert (Hislop et al., 2007; Howley et al., 2021). Daraufhin findet innerhalb dieser Zellen die Virusreplikation statt und führt zu einer massiven Vermehrung und Ausscheidung des Virus in den Rachen. In diesem Stadium der lytischen Infektion können hohe Viruslasten im Speichel nachgewiesen werden (Hislop et al., 2007; Murphy et al., 2022).

Die mit EBV infizierten B-Lymphozyten entwickeln sich zu aktivierten und stark proliferierenden lymphoblastoiden Zellen. Diese durch EBV hervorgerufene Transformation der B-Zellen wird auch als Latenzstadium 3 bezeichnet (Young & Rickinson, 2004; Hislop et al., 2007; Taylor et al., 2015; Murphy et al., 2022).

Die starke Aktivierung und Proliferation der B-Zellen sowie die hohe Virusfreisetzung induzieren eine antigenspezifische Immunantwort, die zur Elimination der meisten mit EBV infizierten Zellen führt (Hislop et al., 2007; Howley et al., 2021; Murphy et al., 2022).

Einige infizierte B-Lymphozyten entziehen sich jedoch der Erkennung durch das Immunsystem, indem die Expression viraler Proteine herunterreguliert wird (Latenztyp 1 und 2) oder (nahezu) nicht mehr stattfindet (Latenztyp 0), und letztere treten in den Pool der B-Gedächtniszellen ein (Hislop et al., 2007). Auf diese Weise persistiert das Virus in einem Art Ruhestadium ein Leben lang im menschlichen Körper (Young & Rickinson, 2004; Hislop et al., 2007; Murphy et al., 2022).

Ein Übergang des latenten Stadiums der Infektion in die lytische Phase der Virusreplikation und eine damit verbundene erneute Virusausscheidung ist intermittierend möglich (Hislop et al., 2007; Kerr, 2019). Unter anderem kann solch eine Reaktivierung durch auf die B-Gedächtniszellen einwirkende Stimulationen durch Antigene und/oder Signale zur Plasmazelldifferenzierung hervorgerufen werden (Laichalk & Thorley-Lawson, 2005). Bei Immunkompetenten wird eine erneute Virusreplikation jedoch rasch durch die EBV-spezifische Immunantwort der T-Zellen unter Kontrolle gebracht (Young & Rickinson, 2004; Laichalk & Thorley-Lawson, 2005; Hislop et al., 2007; Parham, 2015).

Die verschiedenen Phasen der zellulären Infektion (mehrere Latenztypen und lytische Infektion) sowie das damit verbundene unterschiedliche Expressionsmuster an Antigenen zeigen, welche komplexe Mechanismen das Virus entwickelt hat, um sich der Erkennung durch das Immunsystem zu entziehen und sich vermehren zu können. Nur das aufeinander abgestimmte Zusammenspiel mehrerer Komponenten des menschlichen Immunsystems ermöglicht die kurz- und langfristige Kontrolle einer EBV-Infektion.

## **1.2 Mechanismen und Komponenten des menschlichen Immunsystems**

Zur Abwehr und Kontrolle von Infektionen, sowie als Reaktion auf Verletzungen und zelluläre Veränderungen, hat sich ein komplexes System aus verschiedenen Immunabwehrmechanismen und -komponenten entwickelt. Klassischerweise wird eine angeborene Immunantwort von einer adaptiven Immunantwort unterschieden.

Das angeborene Immunsystem löst innerhalb kürzester Zeit auf eine große Vielfalt an mikrobiellen und stressinduzierten Signalen eine unspezifische, oft inflammatorische Immunreaktion aus und stimuliert die Immunantwort des adaptiven Systems. Dieses reagiert verzögert, ermöglicht jedoch eine antigenspezifische Reaktion und bildet eine Gedächtnisfunktion aus, wodurch bei erneutem Kontakt zu dem Antigen eine effektive und schnelle Immunantwort eingeleitet werden kann. Beide Abwehrstrategien umfassen sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten, die im Rahmen der Immunantwort miteinander interagieren.

Zu den zellulären Hauptakteuren des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Zu ihren Hauptaufgaben gehören unter anderem die Erkennung und Phagozytose von Pathogenen, die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, sowie die Präsentation von Antigenen gegenüber den Zellen des adaptiven Immunsystems.

Die adaptive Immunantwort wird hauptsächlich durch B- und T-Zellen vermittelt, deren große Rezeptorvielfalt eine spezifische Immunreaktion erlaubt. B-Zellen differenzieren nach Kontakt mit einem Antigen zu Plasmazellen und bilden spezifische Antikörper. T-Zellen können zum einen als T-Helferzellen über die Sekretion von Zytokinen die Immunantwort vielfältig beeinflussen und modulieren, zum anderen als zytotoxische T-Zellen infizierte Zellen direkt eliminieren (Parham, 2015; Murphy et al., 2022).

Im Folgenden werden die Entwicklung und Differenzierung der T-Zellen genauer beschrieben.

### **1.2.1 Entwicklung und Differenzierung der T-Lymphozyten**

Im Laufe der T-Zell-Entwicklung wandern die T-Zell-Vorläufer aus dem Knochenmark in den Thymus, den Ort der T-Zell-Reifung, ein und entwickeln sich in verschiedene Subgruppen, die anhand der Expression bestimmter Rezeptoren und Oberflächenmoleküle sowie anhand funktioneller Eigenschaften unterschieden werden.

Relativ zu Beginn entstehen aus den Thymozyten zwei verschiedene T-Zelltypen,  $\alpha\beta$ - und  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die sich anhand der Expression der Polypeptidketten, aus denen sich ihr T-Zell-Rezeptor zusammensetzt, unterscheiden. Durch teils zufallsgesteuerte Genumlagerung der V-, D- und J-Gensegmente, die für die Ketten des TCR kodieren, entstehen im Thymus T-Zell-Rezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität.

Die Gruppe der  $\gamma\delta$ -T-Zellen besiedelt nach Reifung im Thymus vorwiegend periphere Gewebe und Schleimhäute und entwickelt sich weiter in verschiedene Subgruppen mit eigenen Effektorfunktionen und Gewebespezifitäten.

Die Gruppe der  $\alpha\beta$ -T-Zellen macht dagegen die Mehrheit der T-Zellen im peripheren Blut und den sekundären lymphatischen Organen aus. Reife  $\alpha\beta$ -T-Zellen werden anhand der Expression eines der beiden Korezeptoren, CD8 oder CD4, in zwei funktionell unterschiedliche Subgruppen unterteilt. CD8+ T-Zellen interagieren mit MHC-Klasse-I-Molekülen und differenzieren später zu zytotoxischen Effektor-T-Zellen, während CD4+ T-Zellen mit MHC-Klasse-II-Molekülen interagieren und ein breites Repertoire an Effektorfunktionen aufweisen.

Während ihrer Reifung im Thymus durchlaufen  $\alpha\beta$ -T-Zellen eine positive und negative Selektion, die zur Auswahl von selbsttoleranten und MHC-restringierten T-Zellen führt, die körpereigene Antigene von Fremdagenteinen unterscheiden können. Anschließend gelangen die reifen, aber naiven T-Zellen ins Blut und rezirkulieren zwischen dem Blut und den sekundären lymphatischen Organen, bis sie ihr spezifisches Antigen auf einer Antigen-präsentierenden Zelle binden. Dieser Prozess des primären Antigenkontakts, auch *Priming* genannt, erfordert die Interaktion des TCR mit dem spezifischen Antigen-MHC-Komplex sowie ein zusätzliches kostimulatorisches Signal, das durch CD28<sup>2</sup> auf der T-Zelle und kostimulierenden B7-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) vermittelt wird. Ein weiteres kostimulatorisches Signal wird durch das Oberflächenmolekül CD27<sup>3</sup> vermittelt.

Die Aktivierung der T-Zelle führt anschließend zur klonalen Expansion und der Differenzierung zu Effektor-T-Zellen, die die sekundären lymphatischen Organe verlassen, an den Ort der Entzündung wandern und nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen ihre Effektorfunktionen ausüben.

Nach Beseitigung des Pathogens durch das Immunsystem sterben die meisten Effektor-T-Zellen rasch ab. Einige Effektor-T-Zellen bleiben jedoch erhalten und differenzieren zu zirkulierenden Gedächtnis-T-Zellen, die bei erneutem Kontakt mit einem bereits bekannten Pathogen schnell und effektiv reagieren können (Parham, 2015; Murphy et al., 2022).

Gedächtnis-T-Zellen werden anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD45RA bzw. CD45RO<sup>4</sup> und des Chemokinrezeptors 7 (CCR7)<sup>5</sup>, von naiven T-Zellen unterschieden: Während naive T-Zellen beide Oberflächenmarker (CD45RA, CCR7) exprimieren, fehlt den T-Gedächtniszellen entweder CD45RA oder CCR7. Innerhalb der T-Gedächtniszellen werden daher verschiedene Subgruppen unterschieden: zentrale Gedächtnis-T-Zellen (TCM: CD45RA<sup>-</sup>, CCR7<sup>+</sup>) können ähnlich wie naive T-Zellen zwischen dem Blut und dem Lymphsystem zirkulieren, Effektorgedächtnis-T-Zellen (TEM) (CD45RA<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>) können schnell in entzündete Gewebe einwandern und zu Effektor-T-Zellen heranreifen. Terminal differenzierte T-Zellen (TEMRA)

---

<sup>2</sup> CD28 gehört zur Familie der Immunglobuline und bindet als costimulatorischer Rezeptor B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf antigen-präsentierenden Zellen (APCs).

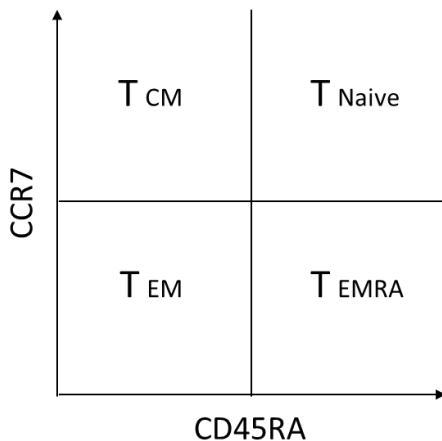
<sup>3</sup>CD27, ein Oberflächenmolekül aus der TNF-Rezeptor-Familie, wird konstitutiv von naiven T-Zellen exprimiert und vermittelt durch Bindung an seinen Liganden CD70 auf dendritischen Zellen ein weiteres starkes costimulatorisches Signal insbesondere in der frühen Aktivierungsphase der T-Zellen (Murphy & Weaver, 2018).

<sup>4</sup>Die Tyrosinphosphatase CD45 kann mit Hilfe ihrer zwei Isoformen CD45RA und -RO die Interaktion der T-Zellen mit den Zielzellen und die daraus folgende Signaltransduktion modulieren. Die Isoform CD45RA wird von naiven T-Zellen exprimiert. Bei der Entwicklung zu einer Effektor-T-Zelle, kommt es zu einem alternativen Spleißvorgang, wodurch statt der Isoform CD45RA die Isoform CD45RO auf den T-Gedächtniszellen und T-Effektorzellen exprimiert wird. CD45RO zeigt im Gegensatz zu CD45RA eine stärkere Interaktion mit dem T-Zellrezeptor und den Korezeptoren und verstärkt die Signaltransduktion nach der Bindung spezifischer Antigene.

<sup>5</sup>Chemokine und Chemokinrezeptoren spielen eine entscheidende Rolle in der Differenzierung der T-Zellen, da mit ihrer Hilfe die Migration (*Homing*) der naiven T-Zellen in die sekundären Lymphorgane gesteuert wird. Der Chemokinrezeptor 7 (CCR7), auch bekannt als CD197 bindet die Chemokine CCL19 und CCL21, die im sekundären Lymphgewebe von dendritischen Zellen und Stromazellen sezerniert und auf der Oberfläche von hochendothelialen Venolen gebunden werden. Durch diese Bindung werden die T-Zellen aus der Blut- oder Lymphbahn in die T-Zell-Zonen der sekundären Lymphorgane gelockt.

(CD45RA+, CCR7-) gelten als spät differenzierte T-Zellen, die kaum noch proliferieren (Sallusto et al., 1999; Champagne et al., 2001; Sallusto et al., 2004; Appay et al., 2008; Parham, 2015; Murphy et al., 2022). Die Einteilung in die vier verschiedenen Differenzierungsstadien ist in **Abbildung 1** dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit der Unterscheidung der Differenzierung bieten die zuvor beschriebenen kostimulatorischen Moleküle CD27 und CD28: T-Zellen, die beide Moleküle aufweisen, werden als naiv oder früh differenziert angesehen, während ein Fehlen dieser Moleküle auf ein späteres Differenzierungsstadium hinweist (Tomiyama et al., 2002; Parham, 2015).



**Abbildung 1: Einteilung der Differenzierung der T-Zellen anhand der Oberflächenmarker CD45RA und CCR7.**

Aus Studien von Sallusto et al. (Sallusto et al., 1999) und Champagne et al. (Champagne et al., 2001) entwickelte sich eine in der Literatur häufig angewandte Unterteilung in vier verschiedene T-Zell-Differenzierungsstadien, die als naive T-Zellen (CCR7+, CD45RA+), zentrale T-Gedächtniszellen (CCR7+, CD45RA-), Effektor-T-Gedächtniszellen (CCR7-, CD45RA-) und terminal differenzierte T-Zellen (CCR7-, CD45RA+) bezeichnet werden (Sallusto et al., 2004; Appay et al., 2008). In einigen Studien wird statt CCR7 und CD45RA die Expression von CD27 und CD45RA für diese Einteilung herangezogen (Dieli et al., 2003; Odaira et al., 2016; Davey et al., 2018; Sahir et al., 2020).

Im folgenden Abschnitt wird genauer auf die Charakteristika und die Funktion der T-Zellgruppe der  $\gamma\delta$ -T-Zellen eingegangen.

### 1.2.2 Humane $\gamma\delta$ -T-Zellen

Die meisten humanen  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind in den Geweben wie beispielsweise der Haut, der Leber, dem Gastrointestinaltrakt und dem Uterus zu finden, während sie nur einen kleinen Anteil (1-10 %) der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten ausmachen (Bonneville et al., 2010; Vantourout et al., 2013; Papadopoulou et al., 2020).

Individuelle Unterschiede in der Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen im peripheren Blut wurden beobachtet und ein Einfluss von Alter und Geschlecht auf ihre Häufigkeit beschrieben (Parker et al., 1990; Esin et al., 1996; Hviid et al., 2000; De Rosa et al., 2004; Caccamo et al., 2006; Michishita et al., 2011; Wistuba-Hamprecht et al., 2013; Wistuba-Hamprecht et al., 2015; Fonseca et al., 2020): Während im Nabelschnurblut nur wenige  $\gamma\delta$ -T-Zellen vorliegen, steigt ihre Anzahl nach Geburt bis etwa zum Alter von zwei Jahren an und nimmt danach allmählich ab (Parker et al., 1990; Argentati et al., 2002; Sandberg et al., 2006; Fonseca et al., 2020; Ravens et

al., 2020; Schultze-Florey et al., 2021). Die Abnahme der  $\gamma\delta$ -T-Zellen setzt sich bis ins hohe Lebensalter fort und ist bei Männern stärker ausgeprägt als bei Frauen (Argentati et al., 2002; Fonseca et al., 2020).

Zudem scheinen die geographische Herkunft und Ethnie die Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Subgruppen im peripheren Blut zu beeinflussen (Esin et al., 1996; Hviid et al., 2000; Cairo et al., 2010). Die ursächlichen Faktoren, die zu diesen Unterschieden führen, sind noch weitestgehend unbekannt.

### 1.2.2.1 Oberflächenmoleküle auf humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren einen  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor, der aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette besteht. Durch zufällige Genumlagerung der V-, D- und J-Gensegmente, die für die Ketten des TCR kodieren, können T-Zell-Rezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität entstehen. Anhand der Expression bestimmter V $\gamma$ - und V $\delta$ -Gensegmente des  $\gamma\delta$ -TCR werden verschiedene  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen unterschieden (Casorati et al., 1989; Vantourout & Hayday, 2013). Bei gesunden Erwachsenen zählen V $\delta$ 2 (meist in Kombination mit V $\gamma$ 9) und V $\delta$ 1 zu den am häufigsten exprimierten T-Zell-Rezeptorketten im peripheren Blut (Parker et al., 1990; De Rosa et al., 2004; Fonseca et al., 2020). In einigen Geweben z.B. in der Haut, der Leber oder dem Darm wurden dagegen besonders häufig  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einem  $\delta$ 1- oder  $\delta$ 3-TCR gefunden (Deusch et al., 1991; Bonneville et al., 2010).

Neben dem  $\gamma\delta$ -TCR weisen  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch den CD3-T-Zell-Rezeptorkomplex auf, der auf allen T-Zellen und Thymozyten vorkommt. Im Gegensatz zu den  $\alpha\beta$ -T-Zellen fehlen der Mehrheit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen (70 %) die Korezeptoren CD4 und CD8: Nur auf etwa 30 % der  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde CD8 nachgewiesen, meist in der CD8 $\alpha$ -Form, die ansonsten auf manchen NK-Zellen vorgefunden wird, einige wenige (< 1 %) exprimieren CD4 (Groh et al., 1989; Deusch et al., 1991; Kalyan et al., 2013).

Bisherige Studien vermuten, dass CD8-exprimierende  $\gamma\delta$ -T-Zellen sich in ihren funktionellen Eigenschaften von anderen  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen unterscheiden (Kadivar et al., 2016; Gaballa et al., 2019). Zudem können  $\gamma\delta$ -T-Zellen, wie nun bekannt, nicht nur CD8 $\alpha$ , sondern auch CD8 $\alpha\beta$  exprimieren (Kadivar et al., 2016). Die genaue Funktion von CD8 $\alpha$  oder CD8 $\alpha\beta$  auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Die zuvor im Rahmen der Differenzierung der  $\alpha\beta$ -T-Zellen beschriebenen Oberflächenmoleküle CD28, CD45RA bzw. -RO und CCR7 werden ebenfalls auf Subpopulationen von  $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert und gemeinsam mit CD27, einem weiteren kostimulatorischen Molekül, für die Unterscheidung in vier verschiedene Differenzierungsstadien, die denen der  $\alpha\beta$ -T-Zellen gleichen, verwendet (Eberl et al., 2002; Dieli et al., 2003; De Rosa et al., 2004; Ribot et al., 2013). Ob diese Oberflächenmoleküle auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine ähnliche Funktion wie auf  $\alpha\beta$ -T-Zellen besitzen, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Neben den T-Zell-Oberflächenmolekülen weisen  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch typische NK-Zell-Rezeptoren und Oberflächenmoleküle auf, was auf eine gewisse Ähnlichkeit in der Funktion dieser beiden Zelltypen hindeutet (Vantourout & Hayday, 2013). Beispielsweise exprimieren  $\gamma\delta$ -T-Zellen den NK-Zell-Rezeptor NKG2D (natural killer



group 2, member D), der diverse MHC-ähnliche Moleküle wie z.B. MIC-A, MIC-B und UL16-bindene Proteine (ULBPs) bindet, die im Rahmen von zellulärem Stress hochreguliert werden und somit ein „Warnsignal“ für pathogene Prozesse darstellen. Die Interaktion des NKG2D mit seinen Liganden kann zur Aktivierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen führen (Bauer et al., 1999; Chalupny et al., 2003; Kong et al., 2009; Bonneville et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013).

Auch der Fc $\gamma$ -Rezeptor-III (CD16)<sup>6</sup>, der die Antikörperabhängige-zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) vermittelt und häufig auf NK-Zellen vorkommt, wurde auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen und mit einer erhöhten zytotoxischen Aktivität der  $\gamma\delta$ -T-Zellen in Verbindung gebracht (Angelini et al., 2004).

Ein weiterer Marker, der mit zytotoxischen Effektorfunktionen assoziiert wird, ist der Chemokinrezeptor CX3CR1<sup>7</sup> (Nishimura et al., 2002; Böttcher et al., 2015). Eine Expression dieses Markers in Verbindung mit einer erhöhten Zytotoxizität wurde auch auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen beschrieben (Nishimura et al., 2002; Ryan et al., 2016; Davey et al., 2018).

Im Rahmen von diversen Infektionen wurde eine Hochregulation sogenannter „Aktivierungsmarker“ wie CD38<sup>8</sup>, CD69 oder HLA-DR<sup>9</sup> auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen beobachtet (De Paoli et al., 1990; Kabelitz et al., 1990; Dechanet et al., 1999).

### 1.2.2.2 Antigene und Antigenerkennung von humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen

Die Spezifität der einzelnen Subgruppen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und die Art und Weise, wie sie ihre Antigene erkennen, ist noch nicht vollständig geklärt. Die für die  $\alpha\beta$ -T-Zellen notwendige Präsentation der Antigene auf MHC-Komplexen, scheint jedoch für die  $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht relevant zu sein. Eine Interaktion mit verschiedenen MHC-ähnlichen

---

<sup>6</sup>CD16 bindet Antikörper der Klasse IgG auf Krankheitserregern und Zellen und löst daraufhin die Zerstörung der Krankheitserreger und Zellen aus. Diese Antikörperabhängige-zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) trägt wesentlich zur Immunabwehr von Bakterien und Viren bei.

<sup>7</sup>Der Chemokinrezeptor CX3CR1 wird unter anderem von aktivierten T-Zellen, Monozyten, neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, unreifen dendritischen Zellen, Mastzellen, Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen exprimiert. Er bindet das Chemokin CX3CL1, auch Fraktalkin genannt, das sowohl als membrangebundenes Adhäsionsmolekül auf Endothel- und Epithelzellen als auch als lösliches Molekül vorkommen kann und beeinflusst auf diese Weise unter anderem die Zelladhäsion- und -migration (Imai et al., 1997).

<sup>8</sup>CD38 ist ein Glykoprotein, das als Rezeptor sowie als Enzym fungieren kann. Als multifunktionales Enzym synthetisiert CD38 mit Hilfe von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>) ADP-Ribose und zyklische ADP-Ribose und nimmt auf diese Weise Einfluss auf den intrazellulären NAD<sup>+</sup>- und Calcium-Spiegel sowie damit verbundene Stoffwechselwege und Signaltransduktionen. Als Rezeptor bindet es CD31 und beeinflusst dadurch die Zelladhäsion (Malavasi et al., 2008; Kar et al., 2020). In der Literatur wird CD38 als Aktivierungsmarker für T-Zellen verwendet (Maecker et al., 2012).

<sup>9</sup>HLA-DR ist ein  $\alpha\beta$ -heterodimerer Oberflächenrezeptor und gehört zu den MHC-Klasse-II-Molekülen, von denen insgesamt fünf verschiedene Isotypen existieren: Die Isotypen HLA-DM und -DO kommen intrazellulär vor und sind an der Peptidbeladung der Isotypen HLA-DP,-DQ und -DR beteiligt, die mit ihrer extrazellulären Domäne mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen interagieren und diesen sowohl extrazelluläre, durch Endozytose aufgenommene als auch zytosolische Peptide präsentieren. MHC-Klasse-II-Oberflächenmoleküle kommen vorwiegend auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) vor. Als Reaktion auf eine Stimulation (der APC) beispielsweise durch Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) wird vermehrt HLA-DR exprimiert. T-Zellen exprimieren in ruhendem Zustand kein HLA-DR, jedoch nach Aktivierung (Maecker et al., 2012; Finak et al., 2016).

Molekülen ist allerdings häufig zu finden (Groh et al., 1998; Spada et al., 2000; Bonneville et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013).

Im Folgenden werden die Antigene und deren Erkennung (soweit bekannt) einzelner  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen genauer beschrieben.

$\delta 2^+$  T-Zellen weisen ein sehr spezifisches Antigenrepertoire auf: Sie erkennen besonders gut Phosphoantigene auf Zelloberflächen, darunter Hydroxymethylbutenylpyrophosphat (HMBPP), das bei der mevalonatunabhängigen Isoprenoid-Biosynthese in Bakterien und Parasiten entsteht und schon in sehr geringen Konzentrationen zu einer Aktivierung der  $\delta 2^+$  T-Zellen führen kann (Lang et al., 1995; Morita et al., 2007; Vantourout & Hayday, 2013).

Neben diesen mikrobiellen Phosphoantigenen werden auch körpereigene Phosphoantigene, wie Isopentenylpyrophosphat (IPP) ab einer bestimmten Konzentration von  $\delta 2^+$  T-Zellen erkannt (Morita et al., 1995; Vantourout & Hayday, 2013). Erhöhte Konzentrationen der körpereigenen Phosphoantigene liegen in infizierten Zellen und Tumorzellen, nicht aber in gesunden Zellen vor, und sind somit ein Warnzeichen für pathologische Vorgänge innerhalb der Zelle (Gober et al., 2003; Morita et al., 2007; Vantourout & Hayday, 2013).

Damit solch kleine Moleküle wie die Phosphoantigene durch den  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR erkannt werden können, ist eine Präsentation auf dem membranständigen Molekül CD277/Butyrophilin 3A1 notwendig (Morita et al., 1995; Harly et al., 2012; Vantourout & Hayday, 2013).

Als weiterer Ligand des  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR sowie des NKG2D wurde das UL16-bindende Protein 4 (ULBP4) entdeckt. Ein Molekül, das sowohl von Tumorzellen als auch von EBV-infizierten B-Zellen exprimiert wird (Kong et al., 2009). Auch hMSH2, ein humanes DNA-*Mismatch*-Reparatur-Protein, wurde als weiterer stress-induzierter und tumorassoziierter Ligand für  $\delta 2^+$  T-Zellen identifiziert (Y. Dai et al., 2012). Dieses Molekül wird auch auf EBV transformierten B-Zellen exprimiert (Y. M. Dai et al., 2018).  $\delta 2^+$  T-Zellen sind folglich in der Lage Stoffwechselprodukte von Pathogenen oder von metabolisch veränderten Zellen, oder stressinduzierte Rezeptorliganden, im Rahmen einer Infektion oder einer malignen Transformation wahrzunehmen, und sie können daraufhin eine Immunantwort induzieren und/oder stimulieren (Bonneville et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013).

Für die  $\delta 1^+$  T-Zellen sind vermutlich noch längst nicht alle Antigene bekannt, bisherige Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass sie verschiedenste MHC-ähnliche Moleküle identifizieren (Groh et al., 1998; Spada et al., 2000; Bai et al., 2012). Beispielsweise erkennen sie Stress-induzierte Moleküle wie Proteine der MHC-Klasse-I-Kette (MIC-A und MIC-B), die unter anderem in infizierten Zellen und Tumorzellen hochreguliert werden (Groh et al., 1998; Bonneville et al., 2010). Wie genau diese Moleküle erkannt werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine direkte Bindung durch den  $\gamma\delta$ -TCR sowie durch weitere Rezeptoren wie NKG2D wird angenommen (Wu et al., 2002; Kong et al., 2009; Xu et al., 2011; Correia et al., 2013).

Durch ihren TCR erkennen  $\delta 1^+$  T-Zellen außerdem mikrobielle Glykolipide, die von den MHC-Klasse-I-ähnlichen Molekülen CD1c und CD1d präsentiert werden, und

produzieren nach Kontakt mit einem Lipid-CD1-Komplex Granulysin und IFN- $\gamma$  (Spada et al., 2000; Sugita et al., 2000; Bai et al., 2012; Vantourout & Hayday, 2013). Zuletzt wurde sowohl eine Antigen-abhängige als auch eine Antigen-unabhängige Erkennung von CD1b (Reijneveld et al., 2020) und von MR1, einem weiteren MHC-I-ähnlichen Protein, durch  $\delta 1+$  T-Zellen beschrieben (Le Nours et al., 2019; Van Rhijn et al., 2021).

Über die Spezifität und Antigene weiterer  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen ist bisher nur wenig bekannt. Als Ligand der V $\gamma 8$ V $\delta 3$ -T-Zellen wurde unter anderem Annexin A2 identifiziert, das zur Familie der Phospholipid-bindenden Proteine gehört und unter oxidativem Stress auf Tumorzellen exprimiert wird (Marlin et al., 2017).

Ähnlich wie die  $\delta 1+$  T-Zellen erkennen  $\delta 3+$  T-Zellen auch MHC-ähnliche Moleküle: Nach Interaktion mit Glykolipiden, die auf CD1d-Molekülen präsentiert werden, zeigten einige  $\delta 3+$  T-Zellen eine vermehrte Zytokinproduktion, entwickelten zytotoxische Aktivität gegenüber CD1d+ Zellen und förderten die Reifung von dendritischen Zellen zu APCs (Mangan et al., 2013). Außerdem erkennen bestimmte  $\delta 3+$  T-Zellen das MHC-ähnliche Protein MR1, das Vitamin-B-Metaboliten bindet, die unter anderem von Bakterien produziert werden. Die Erkennung ist dabei unabhängig vom beladenen Antigen (Le Nours et al., 2019; Rice et al., 2021).

$\gamma\delta$ -T-Zellen, die den V $\gamma 4$ V $\delta 5$ -TCR exprimieren, erkennen ebenfalls Antigen-unabhängig ein weiteres MHC-ähnliches Molekül, den endotheliale Protein C-Rezeptor (EPCR), der auf Zytomegalievirus (CMV)-infizierten Endothelzellen und epithelialen Tumorzellen exprimiert wird (Willcox et al., 2012).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen ein vielfältiges Repertoire an molekularen Zielstrukturen erkennen, die in Zusammenhang mit Infektionen, zellulärem Stress und pathogenen Veränderungen stehen. Im Gegensatz zu  $\alpha\beta$ -T-Zellen scheinen sie auch einige Antigen-präsentierende Moleküle ohne die Anwesenheit eines Antigens zu erkennen.

### **1.2.2.3 Immunologische Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen**

$\gamma\delta$ -T-Zellen wird eine überbrückende Rolle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort zugeschrieben, da sie Eigenschaften beider Abwehrstrategien aufweisen (Bonneville et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013).

Für eine Zugehörigkeit zum angeborenen Immunsystem spricht die anatomische Verteilung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die meisten  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind in den Epithelien zu finden und können daher schnell auf Verletzungen, Infektionen und Zelldysregulationen reagieren. Die TCR-Diversität dieser gewebeständigen  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist gering, ihre Immunantwort dafür schnell und effektiv, da sie nicht auf eine Antigenprozessierung und -präsentation angewiesen sind. Ähnlich wie andere Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen sie ein breites Repertoire an stress-induzierten und mikrobiellen Antigenen wie MICA, MICB und ULBPs (Bonneville et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013).

Die Entstehung des TCR mittels VDJ-Rekombination und die dadurch mögliche hohe Diversität des TCR sowie die Anpassung des T-Zellrepertoires durch klonale

Expansion spricht dagegen für eine Zugehörigkeit zum adaptiven Immunsystem (Kazen et al., 2011; Vantourout & Hayday, 2013). Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch eine antigenspezifische Gedächtnisfunktion entwickeln. In Tierexperimenten konnten Mykobakterium-spezifische  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit Eigenschaften von Gedächtniszellen gefunden werden (Shen et al., 2002; Hogg et al., 2009; Vantourout & Hayday, 2013).

Auf humanen  $\gamma\delta$ -T-Zellen konnte die Expression typischer Gedächtniszellmarker wie beispielsweise CD45RO nachgewiesen werden (Eberl et al., 2002; Dieli et al., 2003). Die Funktion dieser Oberflächenmarker auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen, ist jedoch noch nicht komplett verstanden.

Aktivierete  $\gamma\delta$ -T-Zellen produzieren diverse Zytokine wie Interleukine, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und können auf diese Weise die Immunantwort modulieren. Sie entwickeln auch direkt zytotoxische Eigenschaften, indem sie durch die Freisetzung von Perforinen und Granzymen kranke und infizierte Zellen direkt lysieren (Dieli et al., 2001; Bonneville et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013).

Die Produktion diverser Chemokine ermöglicht  $\gamma\delta$ -T-Zellen die Interaktion mit weiteren Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und Neutrophilen, dendritischen Zellen, B-Zellen und  $\alpha\beta$ -T-Zellen sowie mit epithelialen Nachbarzellen (Bonneville et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen auch Eigenschaften von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) aufweisen: Sie exprimieren Moleküle der MHC-Klasse I und II sowie kostimulatorische Proteine und können Antigene aufnehmen, prozessieren und anschließend gegenüber  $\alpha\beta$ -T-Zellen präsentieren, und sogar eine Phagozytose von größeren Partikeln oder Bakterien wurde beschrieben (Brandes et al., 2005; Moser et al., 2006; Landmeier et al., 2009; Bonneville et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013).

Obwohl die Funktion und Spezifität der  $\gamma\delta$ -T-Zellen noch nicht komplett verstanden ist, gibt es klare Hinweise darauf, dass sie aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften an der Immunantwort auf verschiedene Pathogene wie Viren, Bakterien und Parasiten sowie bei der Erkennung von Zelldysregulationen und pathologischen Prozessen beteiligt sind (M. Ho et al., 1990; Kabelitz et al., 1990; Groh et al., 1998; Dechanet et al., 1999; Bonneville et al., 2010). Auch im Zusammenhang mit einer EBV-Infektion liefern diverse Studien Hinweise auf eine Beteiligung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen (De Paoli et al., 1990; Hassan et al., 1991; Hacker et al., 1992; Bhaduri-McIntosh et al., 2008; Macsween et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013; Xiang et al., 2014; Djaoud et al., 2017; Munz, 2017).

### **1.3 Immunantwort der T-Zellen auf eine EBV-Infektion**

Im Folgenden wird zuerst auf die Funktion der CD8+ und CD4+ T-Zellen bei der Kontrolle einer EBV-Infektion eingegangen und im Anschluss die Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Zusammenhang mit EBV näher betrachtet.

### 1.3.1 CD8+ und CD4+ T-Zellen im Kontext einer EBV-Infektion

Die akute EBV-Infektion induziert eine massiven Vermehrung EBV-spezifischer, aktivierter, zytotoxischer CD8+ T-Zellen, die EBV-infizierte Zellen erkennen, eliminieren und durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine die Immunantwort stimulieren können (Callan et al., 1998; Callan et al., 2000; Michelle D. Catalina et al., 2002; Hislop et al., 2002; Precopio et al., 2003; Hislop et al., 2007).

Die massive Proliferation der CD8+ T-Zellen tritt zeitgleich mit dem Beginn der Symptome einer IM auf und wird häufig zusammen mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine als Auslöser für die klinische Symptomentwicklung angesehen (Callan et al., 2000; Hislop et al., 2007; Balfour, Odumade, et al., 2013). Die IM wird daher auch als immunpathologische Erkrankung bezeichnet (Hislop et al., 2007; Balfour, Odumade, et al., 2013; Taylor et al., 2015).

Die spezifische Immunantwort der CD8+ T-Zellen richtet sich in der primären Reaktion vorwiegend gegen Proteine des lytischen Zyklus (M. D. Catalina et al., 2001; Hislop et al., 2002; Pudney et al., 2005; Hislop et al., 2007). Spezifische Immunantworten gegen latente Proteine sind dagegen deutlich geringer vorhanden (M. D. Catalina et al., 2001; Pudney et al., 2005; Woodberry et al., 2005; Hislop et al., 2007).

Nach der akuten Infektion nimmt sowohl die Zahl der Gesamt-CD8+ T-Zellen als auch die Anzahl der EBV-spezifischen CD8+ T-Zellen im peripheren Blut aufgrund der fehlenden Antigenstimulation rapide ab (Callan et al., 1998; Hislop et al., 2007; Balfour, Odumade, et al., 2013). EBV-spezifische CD8+ Gedächtnis-T-Zellen gegen lytische und latente Proteine sind bei gesunden Virusträgern weiterhin auf hohem Niveau nachweisbar (Tan et al., 1999; P. J. Dunne et al., 2002; Hislop et al., 2002; Woodberry et al., 2005; Hislop et al., 2007). Die meisten dieser spezifischen Gedächtniszellen sind nicht aktiviert, sondern weisen einen „ruhenden“ Phänotyp auf (Michelle D. Catalina et al., 2002; P. J. Dunne et al., 2002; Hislop et al., 2007).

Im Gegensatz zur massiven Expansion der EBV-spezifischen CD8+ T-Zellen, steigt die Anzahl der Gesamt-CD4+ T-Zellen sowie der EBV-spezifischen CD4+ T-Zellen im Verlauf der akuten Infektion im peripheren Blut nur minimal an und nimmt bei Eintritt der Rekonvaleszenz wieder ab (Maini et al., 2000; Amyes et al., 2003; Precopio et al., 2003; Woodberry et al., 2005; Hislop et al., 2007; Balfour, Odumade, et al., 2013). Spezifische Immunantworten der CD4+ T-Zellen wurden sowohl gegen lytische als auch gegen latente EBV-Proteine detektiert (Precopio et al., 2003; Woodberry et al., 2005; Hislop et al., 2007). EBV-spezifische CD4+ Gedächtnis-T-Zellen sind bei gesunden Virusträgern nachweisbar, jedoch mit einer deutlich geringeren Häufigkeit als EBV-spezifische CD8+ Gedächtniszellen (Amyes et al., 2003; Long et al., 2005; Hislop et al., 2007).

Insgesamt trägt sowohl die EBV-spezifische CD8+ als auch die EBV-spezifische CD4+ T-Zellantwort zur kurz- und langfristigen Kontrolle einer EBV-Infektion bei. Insbesondere die massive Expansion der EBV-spezifischen zytotoxischen CD8+ T-Zellen in der akuten Phase der Infektion weist darauf hin, dass sie in diesem Stadium eine tragende Rolle in der Kontrolle der Virusausbreitung und der Beseitigung virusinfizierter Zellen einnehmen.

### 1.3.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen im Zusammenhang mit EBV

Bisherige Studien liefern diverse Hinweise, dass neben den zuvor erwähnten CD8+ und CD4+ T-Zellen auch  $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Kontrolle einer EBV-Infektion und IM beteiligt sind: Zwei in-vivo Studien, die je zehn Patienten mit IM untersuchten, beobachteten einen Anstieg in der Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (De Paoli et al., 1990; Hassan et al., 1991). De Paoli et al. zeigten zusätzlich, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer IM aktiviert waren und, dass die erhöhte Anzahl der  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch noch vier Wochen nach der akuten Infektion bestand (De Paoli et al., 1990).

Eine spätere Studie, die die Auswirkungen einer IM bei Studenten analysierte, stellte erhöhte absolute Werte für  $\gamma\delta$ -T-Zellen zum Zeitpunkt der Diagnose und sogar bis zu fünf Monate danach im Vergleich zur Kontrollgruppe fest (Macswen et al., 2010).

Passend zu diesen Ergebnissen wurde von Zhong et al. eine vermehrte Expression des  $\gamma\delta$ -TCR, sowie des  $\delta 1$ - und  $\delta 2$ -TCR im Blut von Patienten mit IM beobachtet (Zhong et al., 2017). Zudem beschreiben Farnault et al. einen Fall einer EBV-Infektion nach Stammzelltransplantation, bei dem insbesondere  $\delta 1$ + T-Zellen die Infektion zu kontrollieren schienen (Farnault et al., 2013).

Des Weiteren zeigten Xiang et al. in einem humanisierten Mausmodell, dass durch die Zugabe von *ex vivo* mit Pamidronat-expandierten V $\gamma 9$ V $\delta 2$ -T-Zellen das Wachstum von Lymphomen aus lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) reduziert werden kann (Xiang et al., 2014). Dies könnte auf eine mögliche Tumorkontrolle von EBV-positiven Tumoren durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen hinweisen.

Neben diesen in-vivo Studien lassen die Beobachtungen aus *in vitro* Studien ebenfalls auf eine Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer EBV-Infektion schließen (Lam et al., 1990): Eine Proliferation und erhöhte zytotoxische Aktivität der  $\delta 1$ + T-Zellen wurde vor allem nach *in vitro* Stimulation mit B-LCLs sowie nach Stimulation mit einzelnen EBV-infizierten Burkitt-Lymphom-Zelllinien (BL-Zelllinien) (z.B. „Raji“) beobachtet (Qvigstad et al., 1990; Hacker et al., 1992; Orsini et al., 1993).

Dagegen reagierten  $\delta 2$ + T-Zellen mit einer Proliferation und erhöhten Zytotoxizität insbesondere auf die BL-Zelllinie „Daudi“, zeigten jedoch keine Reaktivität auf LCLs (Fisch et al., 1990; Qvigstad et al., 1990; Hacker et al., 1992). Spätere Studien stellten fest, dass in der BL-Zelllinie „Daudi“ der Mevalonat-Stoffwechsel hochreguliert wird und vermehrt phosphorylierte Metaboliten produziert werden, die wiederum von  $\delta 2$ + T-Zellen erkannt werden (Gober et al., 2003).

Somit liegen verschiedene Hinweise auf eine Interaktion verschiedener Typen von  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit verschiedenen EBV-infizierten Zellen oder EBV-Erkrankungen vor. Allerdings sind die Befunde teils widersprüchlich. Bisherige *in vivo* und *in vitro* Studien konnten nicht eindeutig klären, ob die Proliferation der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Rahmen einer EBV-Infektion eine indirekte Folge der generalisierten Immunreaktion ist, oder auf eine direkte Erkennung des Virus durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen zurückgeführt werden kann.

Um  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer EBV-Infektion zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Methode der Durchflusszytometrie angewandt. Die Grundlagen dieses Messverfahrens werden im folgenden Abschnitt kurz vorgestellt.

## 1.4 Durchflusszytometrie als Methode zur Charakterisierung humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen

Die Durchflusszytometrie wird auch als *fluorescence activated cell sorting* (FACS) bezeichnet, obwohl sie nicht unbedingt mit einer Sortierung von Zellen verbunden ist. Die Methode ermöglicht multiparametrische Analysen von vielen, einzelnen Zellen und/oder Partikeln in einer Suspension und ist damit ein in der Biologie und Medizin, insbesondere der Immunologie, häufig angewandtes Messverfahren zur Charakterisierung und Phänotypisierung von Zellen (Maecker et al., 2012; Finak et al., 2016).

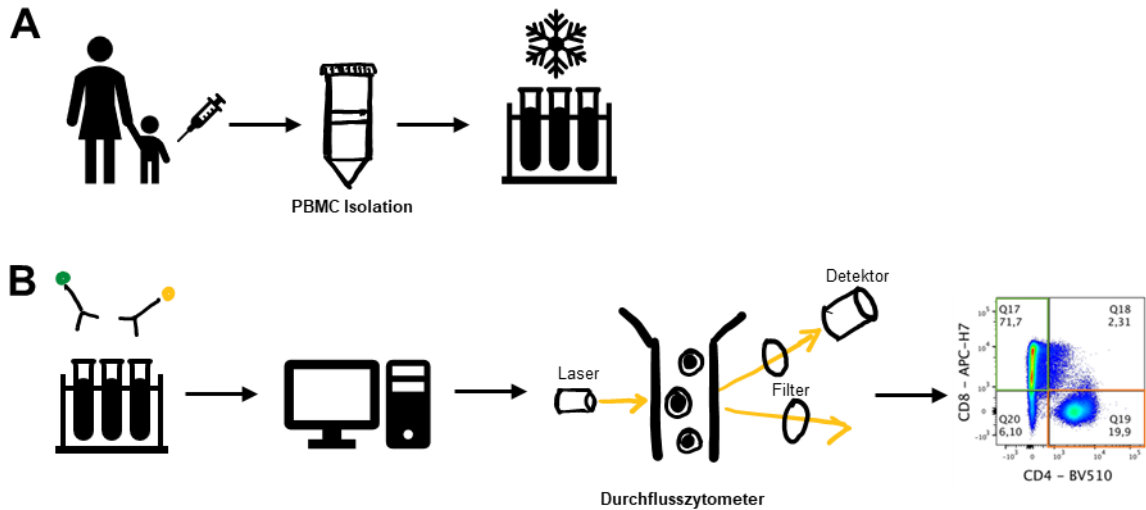
Die Technologie der Durchflusszytometrie beruht auf der Detektion von Streu- bzw. Fluoreszenzsignalen, die beim Passieren der einzelnen Zellen/Partikel durch einen, von einem Laser erzeugten Lichtstrahl entstehen. Anhand des gemessenen Streusignals können sowohl die Größe bzw. das Volumen als auch die Granularität einer Zelle beurteilt werden und auf diese Weise bereits eine Unterteilung in verschiedene Subpopulationen vorgenommen werden.

Zusätzlich kann die Fluoreszenz von Zellen in verschiedenen Bereichen des Spektrums ermittelt werden. Zuvor werden die Zellen typischerweise mit Antikörpern gefärbt, die für Moleküle von Interesse spezifisch sind und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Die Antikörper binden Oberflächenmoleküle auf der Zelle oder intrazelluläre Moleküle und erlauben somit eine Aussage über phänotypische und funktionelle Eigenschaften der Zelle (Givan, 2004; Maecker et al., 2012).

Neuere durchflusszytometrische Messgeräte ermöglichen durch die Verwendung mehrerer Laser unterschiedlicher Wellenlänge und durch den Einsatz verschiedener Filter (für das detektierte Emissionsspektrum) die gleichzeitige Detektion einer Vielzahl an unterschiedlichen Parametern (Maecker et al., 2012).

**Abbildung 2** zeigt die verschiedenen Schritte eines durchflusszytometrischen Experiments, von der Probengewinnung und -aufbereitung, bis hin zur Datenerfassung und -analyse.

Die Methode der Durchflusszytometrie zur Charakterisierung humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde bereits in verschiedenen Situationen angewandt und diverse multiparametrische *Panels* etabliert und publiziert (Dechanet et al., 1999; Wistuba-Hamprecht et al., 2014; Sahir et al., 2020; Barros-Martins et al., 2022).



**Abbildung 2: Arbeitsschritte eines durchflusszytometrischen Experiments.**

(A) Nach der Blutentnahme wird das Vollblut für die durchflusszytometrischen Analysen vorbereitet und die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation daraus isoliert. Die isolierten Zellen wurden in dieser Arbeit zunächst kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt aufgetaut und mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt (B). Für die Messung des Probenmaterials am Durchflusszytometer, werden zunächst die Geräteeinstellungen angepasst. Anschließend wird die Probe mit den darin enthaltenen Zellen vom Gerät vermessen und ein Datensatz erstellt, der mittels spezieller Computerprogramme ausgewertet werden kann. Anhand der gemessenen Parameter können einzelne Zelltypen und Subtypen identifiziert, Aussagen über ihre Differenzierung, Aktivierung, Funktion und weitere Merkmale getroffen werden.



## 2 Problemstellung

Obwohl bisherige Ergebnisse diverse Hinweise auf eine Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer EBV-Infektion und IM liefern (De Paoli et al., 1990; Hassan et al., 1991; Hacker et al., 1992; Bhaduri-McIntosh et al., 2008; Macsween et al., 2010; Xiang et al., 2014; Djaoud et al., 2017; Munz, 2017), bleibt weiterhin unklar, welche Antigene die Proliferation der  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der akuten Phase der Infektion stimulieren und welche protektive oder pathogene Rolle sie einnehmen. Des Weiteren liegen nur begrenzte Informationen über die zeitabhängige Induktion sowie die Differenzierung von  $\gamma\delta$ -T-Zell-Subgruppen im Kontext einer IM vor.

Als Methode zur Analyse der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen im Kontext einer IM wurde die Durchflusszytometrie gewählt. Da bisher nur wenige etablierte durchflusszytometrische *Multicolorpanels* zur Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen und deren Subgruppen existieren und die Färbung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie ihrer Subpopulationen nur mittels eines aufwendigen Färbeprotokolls möglich zu sein scheint (Wistuba-Hamprecht et al., 2014; Beucke et al., 2020), war es Ziel dieser Arbeit die Färbeeigenschaften der Antikörper gegen den  $\gamma\delta$ -TCR und seine Subgruppen zu analysieren und ein *Multicolorpanel* zur Untersuchung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Patienten mit IM zu entwickeln, um anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle anschließend Rückschlüsse auf die Funktion und Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen ziehen zu können.

Zu den weiteren Zielen dieser Arbeit gehörte daher, die Häufigkeit und den Phänotyp der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen bei Patienten mit/nach einer IM und einer gesunden Kontrollgruppe durchflusszytometrisch zu bestimmen und die gewonnenen Daten im Anschluss mit klinischen Parametern einer IM in Bezug zu setzen, um auf diese Weise weitere Informationen über die Beteiligung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immunantwort auf eine EBV-Infektion und IM zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Fragestellungen behandelt:

1. Gelingt es, das aufwendige Färbeprotokoll der  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu vereinfachen? Wie könnte ein multiparametrisches *Panel* zur durchflusszytometrischen Analyse von  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Patienten mit IM aussehen?
2. Wie entwickeln sich  $\gamma\delta$ -T-Zellantworten im zeitlichen Verlauf bei IM? Gibt es bei Patienten mit/nach einer IM und Gesunden Unterschiede in der Häufigkeit und dem Phänotyp der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen?
3. Gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen klinischen Parametern einer IM (Schwere und Dauer der Erkrankung, Ausprägung der Symptome, Laborparameter) und der Häufigkeit und/oder dem Phänotyp der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen?

### 3 Material und Methoden

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien, angewandten Methoden und das untersuchte Probenmaterial.

#### 3.1 Material und Spender

##### 3.1.1 Geräte

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte**

Gerät	Hersteller
Brutschrank/Inkubator (Serien-Nr. 12-21394)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Durchflusszytometer LSR-Fortessa	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Freezer -80°C	Telstar (Terrassa, Spanien)
Kühlschrank 2-8°C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 25 Inverse	Zeiss (Jena, Deutschland)
Sicherheitswerkbank der Stufe II, Laminar Flow Hood	BDK (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Tischzentrifuge/Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortexmischer Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Zentrifuge Rotanta 46RC	Hettich (Bäch, Schweiz)
Zentrifuge Rotanta 460R	
Zentrifuge Rotina 38R	

**Tabelle 2** gibt einen Überblick über die technischen Spezifitäten des Durchflusszytometers „LSR Fortessa“ von Becton Dickinson (BD, 2016), mit dem die Proben gemessen wurden. Die Liste beinhaltet diejenigen Fluoreszenzfarbstoffe, die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden.

**Tabelle 2: Technische Spezifitäten des Durchflusszytometers LSR-Fortessa von BD (BD, 2016)**

In der folgenden Tabelle sind nur die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe aufgelistet.

Laser [nm]	Laser-Stärke [mW]	Laser-Typ	Fluorochrome	Exzitation [nm]	Emission [nm]
355	20	UV	blue fluorescent	355	450/50
405	50	Violet	BV510	405	525/50
			BV605	405	605/12
			PB	405	450/50
488	50	Blue	FITC	488	530/30
561	50	Yellow-Green	PE	561	585/15
			PE-Cy5	561	670/30
			PE-Cy7	561	780/60
			PE-CF594	561	610/20
640	40	Red	A700	640	730/45
			APC-H7	640	780/60
			APC	640	670/14

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Equipment

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien und weiteres Equipment**

Material	Name und/oder Größe	Hersteller
Eppendorfgefäße	Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
FACS-Röhrchen	Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Corning GmbH (Corning, USA)
Gefäß (konisch)	Falcon 50 ml Polypropylen Conical Tube	Corning GmbH (Corning, USA)
Handschuhe	Kimtech Purple Nitrile	Kimberly-Clark Professional (Koblenz Rheinhafen, Deutschland)
Kryoröhrchen	1,8 ml	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Neubauer Zählkammer		Marienfeld-Superior (Lauda Königshofen, Deutschland)
Pasteur-Pipetten	3 ml	Ratiolab (Dreieich, Deutschland)
Pipetten	Pipetman Classic, 20, 200, 1000 µl	Gilson (Middleton, USA)
Pipettenspitzen	Diamond Tower Pack Pack 100, 200, 1000µl	Gilson (Middleton, USA)
Pipettierhilfe	Pipetboy 2 acu	Integra Biosciences GmbH (Fernwald, Deutschland)
Plastikpipetten	Cellstar 5, 10 oder 25 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zellkultur Multiwellplatte	24-Well-Platte	Corning GmbH (Corning, USA)
Zellsieb	Falcon 100µm Nylon	Corning GmbH (Corning, USA)

### 3.1.3 Reagenzien, Stammlösungen und Puffer

In **Tabelle 4** sind die im Rahmen der Experimente verwendeten Reagenzien aufgelistet **Tabelle 5** gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der Stammlösungen und Puffer.

**Tabelle 4: Reagenzien und Stammlösungen**

Substanz	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FACS-Lösungen (Clean, Flow)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FCS)	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Heparin-Natrium 5000 IE/ml	Rotexmedica (Trittau, Deutschland)
Pancoll/Ficoll	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Phosphat Buffer Saline (PBS)	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI 1640	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Stammlösungen und Puffer**

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Einfriermedium	50% FCS, 40% Stammmedium, 10% DMSO
FACS-Puffer	PBS, 2% FCS
Stammmedium	RPMI 1640 mit 7,5% FCS

### 3.1.4 Zytokine und Kommerzielle Kits

In **Tabelle 6** sind das für die Aktivierung der T-Zellen verwendete Zytokin (IL-2) und das für die Unterscheidung der „lebenden“ von den „toten“ Zellen verwendete Lebend-/Tot-Farbstoffkit aufgelistet.

**Tabelle 6: Zytokine und kommerzielle Kits**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Rekombinantes humanes Interleukin-2	Novartis (Nürnberg, Deutschland)
Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit; blue fluorescent	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

### 3.1.5 Antikörper

Die Spezifitäten und weiteren Eigenschaften aller Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in **Tabelle 7** aufgelistet.

**Tabelle 7: Spezifitäten und Eigenschaften der verwendeten Antikörper**

Spezifität	Klon	Konjugat	Hersteller	Isotyp	Katalog-Nr.
αβ-TCR	IP26	APC	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG1, κ	306717
γδ-TCR	11F2	PE	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	mouse IgG1, κ	130-113-504
γδ-TCR	11F2	PE-Cy7	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	Mouse BALB/c IgG <sub>1</sub>	655410
γδ-TCR	B1	PE	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG1, κ	331209
Vδ1-TCR	REA173	FITC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	recombinant human IgG1	130-118-362
Vδ1-TCR	TS8.2	FITC	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	Mouse IgG1	TCR2730
Vδ2-TCR	REA771	APC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	recombinant human IgG1	130-111-011
Vδ2-TCR	B6	FITC	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG1, κ	331405
Vδ2-TCR	B6	PerCP	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG1, κ	331410
Vδ2-TCR	B6	APC	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG1, κ	331417
CD3	UCHT-1	A700	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	Mouse BALB/c IgG <sub>1</sub> , κ	561027
CD3	OKT3	purified	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG2a, κ	317302
CD4	OKT4	BV510	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG2b, κ	317444
CD8	SK1	APC-H7	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	Mouse BALB/c IgG <sub>1</sub> , κ	560179
CD14	MφP9	PE-CF594	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	Mouse BALB/c IgG <sub>2b</sub> , κ	562335
CD16	3G8	BV605	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG1, κ	302039
CD27	O323	BV605	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG1, κ	302830
CD28	CD28.2	PE-Cy5	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	Mouse C3H x BALB/c IgG <sub>1</sub> , κ	555730
CD38	HIT2	PE-Cy5	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG1, κ	303508
CD45RA	HI100	PB	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG2b, κ	304123
CCR7	G043H7	PE-Cy7	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG2a, κ	353226
CX3CR1	2A9-1	PE-Cy7	BioLegend (San Diego, USA)	Rat IgG2b, κ	341611
HLA-DR	L243	PB	BioLegend (San Diego, USA)	Mouse IgG2a, κ	307624

### 3.1.6 Blutspender

Zur Analyse der humanen Immunantwort bei IM wurde den Patienten, die im Rahmen der Infektiöse Mononukleose München (IMMUC) -Studie der Kinderklinik München Schwabing unter der Leitung von Prof. Dr. med. Uta Behrends rekrutiert wurden, peripher Blut abgenommen. Die Aufarbeitung des Vollbluts zur Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurde teilweise von Mitarbeitern der Immunmonitoring Unit der Technischen Universität München (TUM) und teilweise von Mitarbeitern der Abteilung für Genvektoren (AGV) des Helmholtz Zentrums München (HMGU), Großhadern durchgeführt.

Die IMMUC-Studie sowie die Untersuchungen an humanem Material wurden von der Ethikkommission des Klinikums Rechts der Isar (MRI) der TUM geprüft und genehmigt (interne Projektnummer: 112/14).

**Tabelle 8** gibt einen Überblick über das Alter, das Geschlecht, die Herkunft, sowie die im Rahmen der IMMUC-Studie berechneten klinischen Scores (Cmax, Smax, Pmax Total) der 36 Patienten mit IM, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. „Cmax“ entspricht der maximalen Komplexität [1-28], entsprechend der maximalen Anzahl von pathologischen Befunden, „Smax“ gibt den maximalen Schweregrad der einzelnen Veränderungen [1-5] an und „Pmax“ entspricht der maximalen Protraktion der einzelnen Veränderungen (0 = keine Protraktion; 1 = Pathologie bis T1; 2 = Pathologie bis T6). Die genaue Berechnung der IMMUC-Scores ist im Anhang dargestellt.

**Tabelle 8: Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit Infektiöser Mononukleose (n=36)**

Patienten-ID	Alter	Geschlecht (1=m, 2=w)	Ethnie (1= kaukasisch, 2= nicht kaukasisch, 3= unklar)	Klinische Scores		
				Cmax Total (1-28)	Smax Total (1-5)	Pmax Total (0-2)
EP-A007	7	1	1	14	3	2
EP-A034	14	2	1	10	1	0
EP-A035	10	2	1	12	2	1
EP-A036	16	2	1	8	3	2
EP-A037	16	2	1	15	3	1
EP-A038	9	2	1	10	1	0
EP-A043	15	1	3	7	2	0
EP-A046	16	2	1	9	2	2
EP-A052	4	2	1	7	2	1
EP-A055	16	2	1	13	3	1
EP-A056	7	1	1	12	2	0
EP-A064	11	2	1	12	2	1
EP-A066	23	1	1	11	2	0
EP-A070	11	2	1	6	1	1
EP-A071	5	1	1	9	2	1
EP-A077	23	2	1	11	3	1
EP-A083	8	1	1	12	1	0
EP-A088	8	1	1	8	1	1
EP-A097	16	2	3	10	2	1
EP-A099	19	1	1	6	2	1
EP-A101	26	1	1	13	3	1
EP-A104	14	2	1	8	2	1
EP-A107	16	2	1	15	3	0
EP-A146	14	2	1	18	3	2
EP-A148	17	1	1	15	2	1
EP-A149	3	2	1	12	2	1
EP-A162	4	1	2	13	2	2
EP-A163	10	1	1	15	4	2
EP-A164	9	1	3	5	3	0
EP-A166	17	1	1	13	3	1
EP-A167	7	1	1	9	2	0
EP-A169	15	2	1	16	3	1
EP-A176	18	1	3	15	2	2
EP-A180	7	2	1	10	2	1
EP-A191	15	2	1	11	3	2
EP-A192	12	2	1	12	2	2
<b>Median (Min-Max)</b>	<b>14 (3-26)</b>	<b>16m, 20w</b>	<b>31x kaukasisch, 1x nicht kaukasisch; 4x unklar</b>	<b>11 (5-18)</b>	<b>2 (1-4)</b>	<b>1 (0-2)</b>

Als Kontrollgruppe standen freiwillige gesunde erwachsene Spender der Abteilung für Genvektoren (AGV) des HMGU in Großhadern zur Verfügung. Die gesunden Spender wurden für diese Arbeit mittels eines Zahlencodes pseudonymisiert. Ihr Alter, das Geschlecht, die Herkunft sowie der EBV-Status zum Zeitpunkt der Blutentnahme sind in **Tabelle 9** aufgelistet.

**Tabelle 9: Eigenschaften der gesunden erwachsenen Kontrollen (n=15)**

Spender-ID	Alter	Geschlecht (1=m, 2=w)	Ethnie (1= kaukasisch, 2= nicht-kaukasisch)	EBV-Status (1= positiv, 2= negativ)
K-0105	25	2	1	1
K-0113	47	1	1	2
K-0124	26	2	1	1
K-0502	22	2	1	1
K-0506	31	2	1	1
K-1004	55	2	1	1
K-1013	56	1	1	1
K-1505	30	2	1	1
K-1826	56	1	1	1
K-1902	28	2	1	1
K-1918	30	2	1	1
K-1914	51	2	1	1
K-1925	57	2	1	1
K-2313	32	2	1	2
K-2503	31	1	2	1
<b>Median (Min-Max)</b>	<b>31 (22- 57)</b>	<b>4m, 11w</b>	<b>14x kaukasisch, 1x nicht kaukasisch</b>	<b>13x positiv, 2x negativ</b>

### 3.1.7 Software und Datenbanken

**Tabelle 10** gibt einen Überblick über die zur Datenauswertung und -darstellung verwendeten Computerprogramme.

**Tabelle 10: Computerprogramme zur Auswertung und Darstellung der Daten**

Programm	Hersteller
EndNote X8	Alfasoft GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
FACS Diva 6.2	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
FlowJo 10.7.1	TreeStar Inc. (Ashland, USA)
Microsoft Excel 2016	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Word 2016	Microsoft (Redmond, USA)
Prism 6.0	GraphPad Software (La Jolla, USA)



## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Allgemeiner Umgang mit Zellen und Antikörpern**

Die Isolierung von PBMCs aus Vollblut sowie deren Weiterverarbeitung, der Auftauprozess von kryokonserviertem Material und die Vorbereitung der Antikörper für den Färbeprozess erfolgte mit sterilen Geräten an einer Sicherheitswerkbank der Stufe II (*Laminar Flow Hood*). Der sich anschließende Färbeprozess und die dazugehörigen Waschschriffe wurden unter unsterilen Bedingungen durchgeführt.

### **3.2.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut**

Zur Isolierung von PBMCs wurde peripher venöses Blut von den Spendern abgenommen und mit einem Gerinnungshemmer (Heparin oder EDTA) vermischt. Je 15 ml des Vollblutes wurden daraufhin in bereits vorbereitete 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon) mit je 10 ml PBS verdünnt und anschließend vorsichtig mit 10-13 ml Ficoll/Pancoll (Trennmedium) unterschichtet. Im nächsten Schritt wurden die Zentrifugenröhrchen für 25-30 Minuten bei Raumtemperatur mit  $1000 \times g$  (2000 Umdrehungen pro Minute, RPM) sowie einer Beschleunigung und Abbremsung mit langsamster Einstellung zentrifugiert. Auf diese Weise wurde das Vollblut anhand der Dichte in unterschiedliche Schichten aufgeteilt: Erythrozyten und Granulozyten kommen am Boden des Gefäßes zum Liegen, die PBMCs bilden dagegen eine Schicht im Grenzbereich von Ficoll-Lösung und Blutplasma.

Im nächsten Schritt wurde zuerst ein Teil des Plasmas abpipettiert und verworfen, um daraufhin vorsichtig die Suspension mit PBMCs abzapfen zu können und in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen zu überführen. 10 ml dieser Zellsuspension wurden darauf erneut mit 40 ml PBS verdünnt und bei Raumtemperatur und  $400 \times g$  (1500 RPM) für 8min zentrifugiert, um die Suspension weiter aufzureinigen. Durch die Zentrifugation bildete sich am Boden des Falcons ein Zellpellet. Dieses wurde nach dem Abgießen der überstehenden Flüssigkeit erneut in PBS suspendiert und mit  $400 \times g$  (1500 RPM) für 8min zentrifugiert. Dieser Prozess der Aufreinigung wurde noch weitere drei Mal durchgeführt.

### **3.2.3 Kryokonservierung von Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in Einfriermedium suspendiert und je 1-1,5 ml der Suspension in ein beschriftetes Kryokonservierungsröhrchen mit einem maximalen Volumen von 1,8 ml überführt. Anschließend wurden die Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bis zur weiteren Verwendung auf flüssigem Stickstoff gelagert.

### **3.2.4 Handhabung und Vorbereitung der Zellen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie**

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden ausschließlich zuvor kryokonservierte PBMCs verwendet. Diese wurden entweder direkt nach dem Auftauen gefärbt und unmittelbar nach der Färbung am Durchflusszytometer gemessen oder bereits einen Tag vor der Färbung aufgetaut, einer Ruhephase über

Nacht von 16-20 Stunden unterzogen, am nächsten Tag gefärbt und direkt im Anschluss gemessen.

Zum Auftauen wurden die kryokonservierten PBMCs in Stammmedium (etwa 25 ml pro aufzutauendem Aliquot) langsam und vorsichtig suspendiert und anschließend bei Raumtemperatur und  $400 \times g$  (1500 RPM) für 10min zentrifugiert. Das, durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 5 ml PBS und 2 % FCS suspendiert und anschließend die Lebendzellzahl mikroskopisch mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension mit 10  $\mu$ l Trypanblau verdünnt. Von dieser verdünnten repräsentativen Lösung wurden wiederum 10  $\mu$ l auf die Zählkammer aufgetragen und am Mikroskop die mit Trypanblau angefärbten Zellen gezählt, anschließend auf das Gesamtvolumen umgerechnet (50 Zellen =  $1 \times 10^6$  /ml) und die Gesamtzellzahl bestimmt.

Für die Ruhephase über Nacht (*Resting*) wurden die Zellen nach oben beschriebenem Auftauprozess und Zentrifugation in 5-10 ml Stammmedium suspendiert. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung eines Zellsiebes in ein neues 50 ml-Falcon überführt und die Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wie oben angegeben ermittelt. Daraufhin wurden die PBMCs auf eine Menge von etwa  $2 \times 10^6$  Zellen/ml Stammmedium in 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt.

Die 50 ml-Zentrifugenröhrchen wurden mit leicht geöffnetem Deckel für 16-20 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in den Inkubator gestellt. Nach dieser Ruhephase über Nacht wurde am nächsten Tag erneut die Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zellen für den Färbeprozess vorbereitet.

Dieser Prozess der Ruhephase über Nacht wurde sowohl von Mitarbeitern der Immunmonitoring Unit der TUM als auch von der Autorin dieser Arbeit am HMGU in Großhadern durchgeführt.

### 3.2.5 Zellkultur zur Aktivierung von T-Zellen

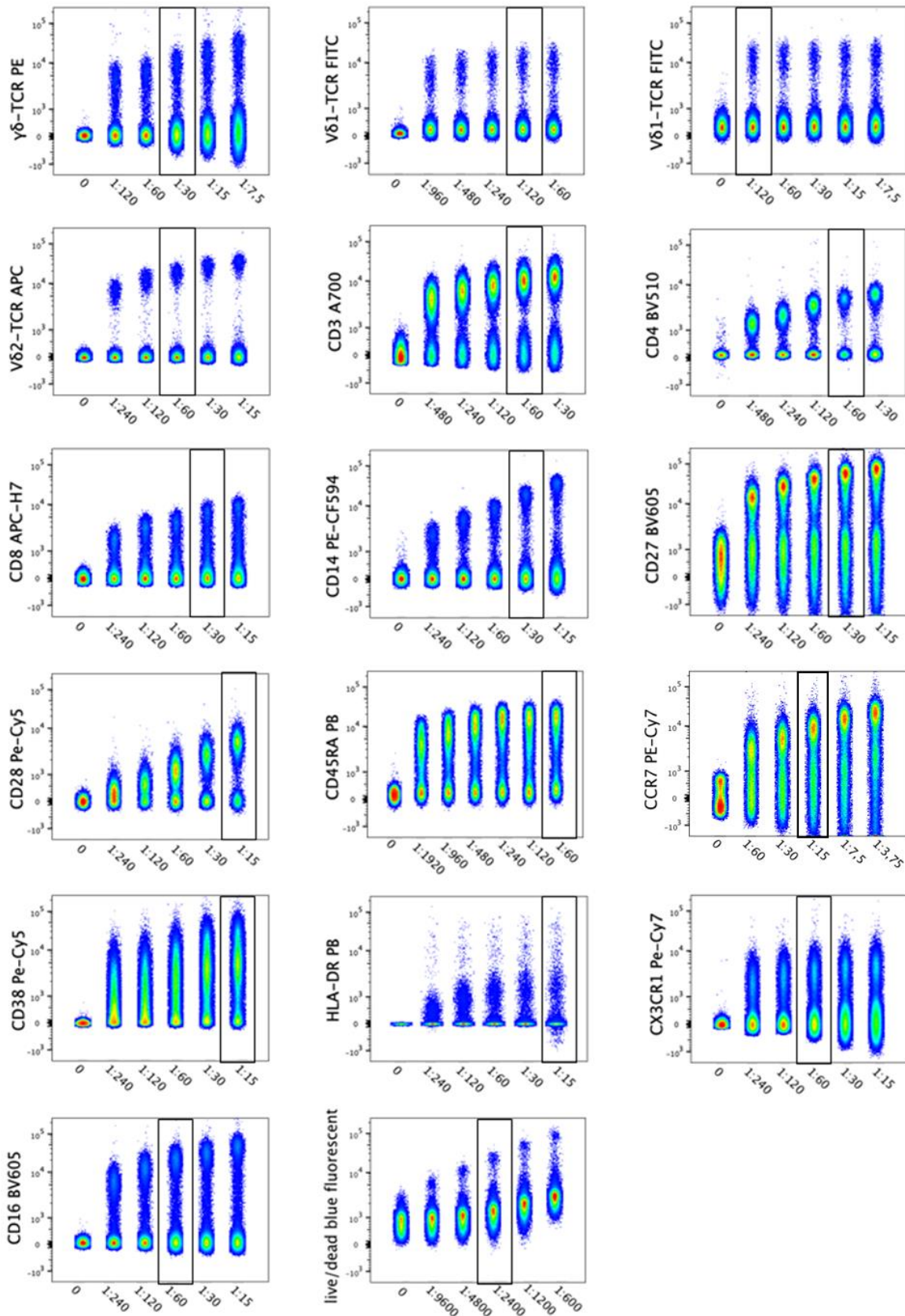
Zur Titration der im *Panel* enthaltenen Antikörper gegen Aktivierungsmarker wurden aktivierte T-Zellen von gesunden erwachsenen Spendern benötigt. Hierfür wurden zuvor kryokonservierte PBMCs nach oben beschriebenem Protokoll aufgetaut und die Lebendzellzahl ermittelt. Anschließend wurden den in Stammmedium suspendierten PBMCs 50 ng/ml anti-CD3-Antikörper und 50 U/ml IL2 hinzugefügt und die Suspension in eine 24-Well-Platte überführt. Nach 48-stündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  wurden die Zellen bei Raumtemperatur und  $400 \times g$  (1500 RPM) für 10 min zentrifugiert. Das dadurch entstandene Zellpellet wurde in 5 ml Stammmedium suspendiert und die Lebendzellzahl unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Um die aktivierten T-Zellen für spätere Analysen nutzen zu können, wurden sie nach oben erwähntem Protokoll kryokonserviert.

### 3.2.6 Titrationsen der für die *Multicolor*-Färbung verwendeten Antikörper

**Abbildung 3** zeigt die Titrationsen aller Antikörper, die für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *Panel* verwendet wurden. Die Titrationsen wurden an PBMCs von gesunden Spendern durchgeführt und etwa 300.000 Zellen in 30  $\mu$ l FACS-Puffer je Titrationsschritt verwendet. Für die Titration der Antikörper gegen die

Aktivierungsmarker wurden die PBMCs der gesunden Spender zuvor aktiviert. Für die Titration des Totzellen-Farbstoff-Kits wurden etwa 300.000 Zellen in 300 µl reinem PBS verwendet.

Zur Auswahl einer geeigneten Verdünnung wurden verschiedene Kriterien bewertet: die Trennung der Positiv- von der Negativpopulation, die Intensitätsverteilung der Hintergrundfärbung und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI). Ziel war es hierbei mit der gewählten Konzentration, eine möglichst scharfe Trennung der Populationen zu erzielen und gleichzeitig eine zunehmende unspezifische Hintergrundfärbung bei Verwendung höherer Konzentrationen des Antikörpers zu vermeiden



**Abbildung 3: Titrations der Antikörper, die für die in dieser Arbeit entwickelten Panel verwendet wurden.**

Die hier abgebildeten Titrations zeigen Lymphozyten, die aufgrund ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung eingegrenzt wurden mit Ausnahme der Titration des Antikörpers gegen den Monozytenmarker CD14 (hier sind Lymphozyten und Monozyten gezeigt). Die schwarze Umrandung zeigt jeweils, welche Verdünnungen (x-Achse) für die *Multicolor*-Färbungen ausgewählt wurde.

### 3.2.7 Kompensationskontrollen<sup>10</sup>

Um Überschneidungen in den Emissionsspektra (*Spillover*) der Fluorochrome kompensieren zu können, werden Einzelfärbungen mit allen, in einem *Multicolor*-Experiment verwendeten fluoreszenzmarkierten Reagenzien (Antikörper sowie Lebend/Tot-Farbstoff) benötigt. Die Proben wurden einzeln in das Durchflusszytometer eingelesen und zur Berechnung einer Kompensationsmatrix verwendet, die anschließend auf die gemessene Vielfarbfärbung angewandt wurde. Die Kompensationsmatrix enthält für jede Zweierkombination von Farbstoffen (A, B) zwei Korrekturfaktoren (für  $A \rightarrow B$  und  $B \rightarrow A$ ).

Für die Einzelfärbungen bzw. Kompensationskontrollen können *Beads* (kleine Partikel, die mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern beladen werden können) oder Zellen verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PBMCs von gesunden Spendern für die Kompensationskontrollen verwendet. Hierfür wurden die kryokonservierten PBMCs aufgetaut, auf die gleiche Weise wie in der späteren Vielfarbanalyse behandelt und jeweils mit einem, der im *Panel* vorkommenden Farbstoffe einzeln gefärbt.

Die einzelnen Kompensationskontrollen wurden vor der Messung der *Multicolor*-Färbung in das Durchflusszytometer eingelesen und daraus in einem automatisierten Prozess direkt eine Kompensationsmatrix von der Software (BD FACS Diva) berechnet, die anschließend auf die *Multicolor*-Färbung angewandt wurde. Aufgrund von möglichen Schwankungen in der Sensitivität des Durchflusszytometers, wurde eine berechnete Kompensationsmatrix nur für Proben, die am selben Tag, direkt hintereinander gemessen wurden, verwendet. Für Messungen am Folgetag wurden neue Kompensationskontrollen erstellt und eine neue Kompensationsmatrix berechnet.

### 3.2.8 Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden PBMCs mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern gefärbt. Hierfür wurden die Zellen aufgetaut, in FACS-Puffer (PBS, 2% FCS) suspendiert, und die Lebendzellzahl mit Hilfe von Trypanblau lichtmikroskopisch ermittelt. Die je Färbung benötigten lebenden Zellen wurden auf eine geeignete Menge an Reaktionsgefäßen mit einem maximalen Volumen von 1,5 ml verteilt. Anschließend wurden die Zellen für drei Minuten bei 4°C und 800 × g (3000 RPM) zentrifugiert.

Nach Abnahme des Flüssigkeitsüberstandes wurde die, für die Zellzahl im Reaktionsgefäß berechnete Menge an Antikörper(n) und FACS-Puffer hinzugefügt. Die für die Färbungen verwendeten Verdünnungen der jeweiligen Antikörper sind in **Abbildung 3** dargestellt.

---

<sup>10</sup> Unter Kompensation versteht man die rechnerische Korrektur von Überschneidungen in den Emissionsspektra der Fluoreszenzfarbstoffe. Die Kompensation wird von der Software des Durchflusszytometers basierend auf den Einzelfärbungen aller, im Rahmen einer Färbung verwendeten, Fluoreszenzfarbstoffe berechnet.

Für die Kompensationskontrollen (Einzelfärbungen) wurden 300.000-400.000 Zellen jeweils eines gesunden Spenders in 30 µl FACS-Puffer (Antikörper) bzw. in PBS (*Live/Dead*) gefärbt. Für die *Multicolor*-Färbungen wurden 1-2 Millionen Zellen eines gesunden Spenders bzw. eines IM-Patienten in 150 µl FACS-Puffer verwendet.

Für die Färbung der Zellen mit dem Lebend/Tot-Farbstoff-Kit wurden diese, wie im Protokoll des Herstellers angegeben, mit reinem PBS verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Alle anderen Färbungen wurden mit FACS-Puffer verdünnt und für 20 min auf Eis inkubiert.

Bei Verwendung des anti- $\gamma\delta$ -TCR- und anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörpers in einer gemeinsamen Färbung, wurden die Zellen in einem ersten Schritt nur mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper gefärbt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper sowie weitere für die Färbung benötigte Antikörper ohne einen dazwischenliegenden Waschschrift hinzugefügt und erneut für 20 Minuten auf Eis inkubiert.

Alle Zellsuspensionen wurden nach der Inkubationszeit mit 800-1000 µl FACS-Puffer verdünnt und bei 4°C und 800 × *g* (3000 RPM) für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette entfernt, das Zellpellet in 150-200 µl FACS-Puffer suspendiert und in beschriftete FACS-Röhrchen überführt.

Die *Multicolor*-Färbungen wurden nach Inkubation mit allen Antikörpern und dem daran anschließenden Waschschrift noch in einem weiteren Arbeitsschritt mit dem Totzellen-Farbstoff-Kit für 30 Minuten auf Eis inkubiert, im Anschluss erneut zentrifugiert und ebenfalls in beschriftete FACS-Röhrchen überführt.

Während des gesamten Färbeprozesses wurden die Zellen, soweit möglich, auf Eis und im Dunkeln gelagert. Die Messung am Durchflusszytometer LSR Fortessa fand direkt im Anschluss an den Färbeprozess statt.

### 3.2.9 Handhabung und Analyse des Probenmaterials

Da im Rahmen der IMMUC-Studie verschiedene experimentelle Analysen mit dem Probenmaterial der IM-Patienten durchgeführt wurden, stand für dieses Teilprojekt der Studie auch nur ein Teil des gesamten Probenmaterials zur Verfügung.

Zusätzlich wurde das limitierte Probenmaterial teilweise für mehrere Experimente gleichzeitig verwendet und stand für die hier beschriebenen Analysen daher in der Regel nur nach einer Ruhephase über Nacht zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher auch die Auswirkungen einer solchen Ruhephase auf die Zellen analysiert und einzelne Proben vor und nach einer Ruhephase gemessen und die Ergebnisse verglichen (4.2.1).

Aufgrund von geringen Zellzahlen war es nicht immer möglich, eine Färbung mit beiden in dieser Arbeit etablierten *Panels* (Differenzierungs-*Panel* und Aktivierungs-*Panel*) durchzuführen. Daher wurden manche Proben nur mit einem der beiden *Panel* gefärbt.

**Tabelle 16 (s. Anhang)** gibt einen detaillierten Überblick über das gemessene Probenmaterial der IM-Patienten sowie die weitere Handhabung (mit oder ohne Ruhephase über Nacht; verwendetes *Panel*).

Da im Rahmen der Studie keine gesunde pädiatrische Kontrollgruppe zur Verfügung stand, diente eine Gruppe von 15 gesunden, erwachsenen Spendern (Altersmedian: 31 Jahre) als Kontrolle. In **Tabelle 17 (s. Anhang)** ist die Anzahl der gemessenen gesunden Kontrollproben aufgelistet nach angewandtem *Panel* sowie der Handhabung der Zellen (mit oder ohne Ruhephase über Nacht) dargestellt. Für die Experimente zur Entwicklung der durchflusszytometrischen *Panel* wurden, soweit nicht anders vermerkt, nur PBMCs von gesunden Spendern verwendet.

### 3.2.10 Datenerhebung im Rahmen der IMMUC-Studie

Ziel der IMMUC-Studie ist es, Biomarker und ursächliche Faktoren für einen komplizierten und/oder protrahierten Verlauf einer IM zu finden. Hierfür wurden insgesamt 200 Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene im Alter von 0-39 Jahren mit IM in Krankenhäusern und privaten Arztpraxen in München rekrutiert. Von diesen 200 Patienten mit IM wurden 36 Patienten in dieses Projekt eingeschlossen.

Im Verlauf der Erkrankung wurde den Patienten mehrmals Blut für virologische und immunologische Analysen abgenommen

Für den Einschluss in die Studie musste eines der typischen IM-Symptome (Tonsillopharyngitis, Lymphadenopathie, Fieber  $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$  oder Müdigkeit) innerhalb von 28 Tagen vor der Rekrutierung vorliegen. Zu den virologischen Einschlusskriterien zählte eine EBV-Viruslast (positives PCR-Ergebnis in Zellfraktion/Plasma) und/oder [EBV VCA IgM und/oder EBV VCA IgG positiv im CMIA (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*)] sowie EBNA-1  $\leq 1$  im EBV-Immunoblot und negatives EBNA-1-IgG in mindestens einem serologischen Test an TR/T0a.

Zu den Ausschlusskriterien der Studie zählten ein Alter von  $\geq 39$  Jahren, eine Schwangerschaft, eine Transfusion, eine Chemo- und/oder Radiotherapie und/oder andere systemische immunsuppressive Therapien in den zurückliegenden 12 Monaten vor Rekrutierung sowie die Ablehnung der Teilnahme an der Studie.

Den Patienten der IMMUC-Studie wurde an vordefinierten Tagen nach dem anamnestisch erfragten Symptombeginn Blut abgenommen: zum Zeitpunkt der Diagnose, sofern diese weniger als 28 Tage nach Symptombeginn gestellt wurde (TR), ein bis sieben Tage nach Diagnose (T0a), etwa einen Monat nach Symptombeginn (T1, definiert als 28  $\pm$  7 Tage) und fünf bis sieben Monate nach Symptombeginn (T6). Bei einigen Patienten war es aus organisatorischen Gründen nicht möglich, die vordefinierten Zeitpunkte einzuhalten, sodass sich zusätzliche Zeitpunkte ergaben: T2 zwischen 35 und 55 Tagen nach Symptombeginn, sowie T8 für Blutabnahmen über sieben Monate nach Symptombeginn.

In dieser Arbeit wurden die oben beschriebenen Zeitpunkte TR und T0a gemeinsam ausgewertet, da bei den hier untersuchten Patienten beide Blutentnahmen unter 27 Tagen nach Symptombeginn stattfanden. Die Zeitpunkte T1 und T2 wurden ebenfalls gemeinsam analysiert, da nur bei wenigen Patienten die Blutentnahme deutlich später als 35 Tage stattfand. Zusätzlich erschien aufgrund der geringen Probenzahl in diesem Projekt eine Aufteilung in mehr als drei verschiedene Zeitpunkte nicht sinnvoll.

### **3.2.11 Statistische Auswertungen**

Die statistischen Analysen wurden mittels GraphPad Prism 6.0 durchgeführt. Die jeweils durchgeführten statistischen Tests sind in den Abbildungslegenden angegeben. Für Vergleiche immunologischer oder klinischer Parameter zwischen gesunden Spendern und IM-Patienten oder zwischen verschiedenen Zeitpunkten nach IM wurde in der Regel ein zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test (nicht-parametrisch) verwendet. In einigen Fällen wurden zudem Analysen der Korrelation verschiedener klinischer Parameter untereinander oder mit der Zeit durchgeführt. In diesen Fällen wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient – ein nicht-parametrisches Maß für eine Rangkorrelation – und zugehörige p-Werte berechnet. Alle angegebenen p-Werte wurden, soweit nicht anders vermerkt, ohne Korrektur für multiples Testen (z.B. Bonferroni-Korrektur) berechnet. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant aufgefasst.



## 4 Ergebnisse

Um die Immunantwort humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie deren Subpopulationen ( $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$ ,  $\delta 1-\delta 2-$ ) im Kontext einer EBV-Infektion und IM besser beurteilen zu können, wurden im ersten Teil dieses Projekts zwei multiparametrische *Panel* zur durchflusszytometrischen Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen entwickelt (s. 41). Anschließend wurden Proben einer pädiatrischen Kohorte mit IM (zu verschiedenen Zeitpunkten nach Symptombeginn) sowie Proben einer gesunden Kontrollgruppe anhand der zwei etablierten, durchflusszytometrischen *Panel* analysiert (s. 62) und mit ausgewählten klinischen Parametern, die im Rahmen der IMMUC-Studie erhoben wurden, korreliert (s. 4.3).

### 4.1 Etablierung einer *Multicolor*-Färbung zur durchflusszytometrischen Analyse humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer IM

Zur Etablierung eines multiparametrischen *Panel*s für die durchflusszytometrische Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen, waren verschiedene Schritte notwendig (Maecker et al., 2004; Mahnke et al., 2007): Als erstes erfolgte die Analyse der Färbereigenschaften der anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper und der Antikörper gegen  $\gamma\delta$ -TCR-Subgruppen (in diesem Projekt: anti-V $\delta 1$ - und anti-V $\delta 2$ -TCR) sowie die Auswahl geeigneter Klone und Fluoreszenzfarbstoffkombinationen. Als nächster Schritt stand die Auswahl weiterer Antikörper zur Phänotypisierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und die Kombination mit passenden Fluoreszenzfarbstoffen an. Es folgte die Evaluierung der ausgewählten Antikörper, die Testung des multiparametrischen *Panel*s an gesunden Spendern und die Entwicklung einer *Gating*-Methode<sup>11</sup> für spätere Analysen. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte genauer beschrieben.

#### 4.1.1 Analyse der Interferenzen zwischen dem anti- $\gamma\delta$ -TCR- und dem anti-V $\delta 2$ -TCR-Antikörper

In einem publizierten multiparametrischen *Panel* zur durchflusszytometrischen Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden störende Interferenzen bei der gleichzeitigen Färbung mit einem anti- $\gamma\delta$ -TCR- und einem anti-V $\delta 2$ -TCR-Antikörper beobachtet und die Ursache hierfür in der direkten Konjugation mit den Fluoreszenzfarbstoffen gesehen. Für die gleichzeitige Färbung mit beiden Antikörpern wurde daher in dieser Publikation die Verwendung eines unkonjugierten anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpers in Kombination mit einem sekundären Antikörper empfohlen (Wistuba-Hamprecht et al., 2014).

In der eigenen Arbeit wurde die Vermutung aufgestellt, dass Antikörper, die gegen das gleiche Molekül (den  $\gamma\delta$ -TCR) gerichtet sind, sich in ihrer Bindung unabhängig vom Konjugatfarbstoff gegenseitig stören oder inhibieren könnten, und, dass solche Interferenzen durch eine sequenzielle Färbung verhindert werden könnten. Diese Hypothese wurde untersucht, indem die gleichzeitige Färbung beider Antikörper (**Abbildung 4B**) mit zwei möglichen sequenziellen Färbungen (Vorinkubation mit anti-

<sup>11</sup> *Gating* ist eine Methode zum Auswerten der Durchflusszytometrie, die die Auswahl und Analyse einzelner Zellgruppen ermöglicht.

V $\delta$ 2-TCR-Antikörper [**Abbildung 4A**] und Vorinkubation mit anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper [**Abbildung 4C**]) verglichen wurde. Hierfür wurden je zwei informative Konzentrationen der beiden Antikörper ausgewählt (1:15 und 1:60). Die separaten Titrationen der beiden verwendeten Antikörper sind in **Abbildung 5** dargestellt.

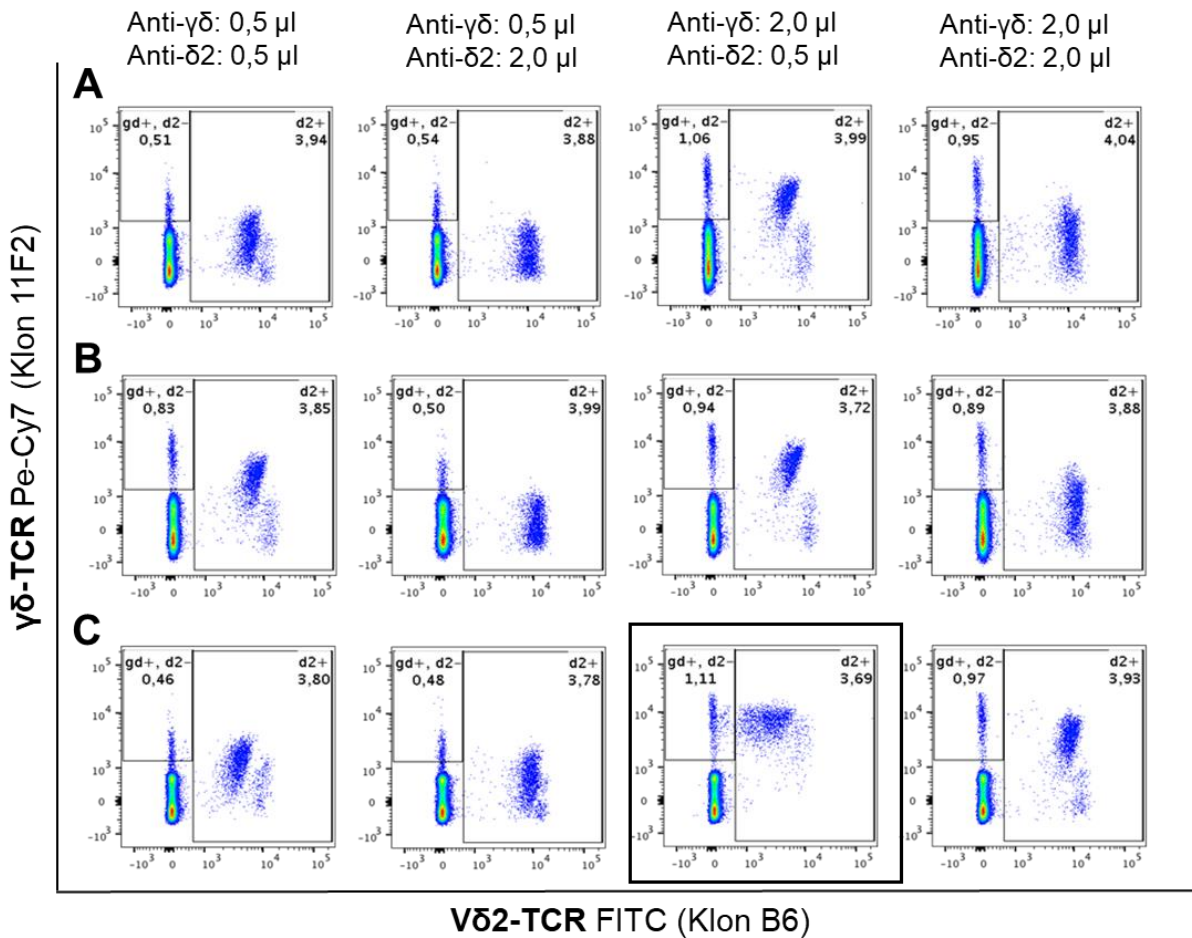
**Abbildung 4** zeigt, dass die kombinierte Färbung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen in PBMC mit beiden Antikörpern sowohl durch die Reihenfolge der Hinzugabe der Antikörper als auch durch die verwendeten Konzentrationen beeinflusst wird. Bei Verwendung von hohen Konzentrationen des anti-V $\delta$ 2-Antikörpers (hier: 1:15) wurde die Färbeintensität der  $\delta$ 2+ T-Zellen mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper abgeschwächt. Besonders ausgeprägt war dieses Phänomen, wenn die Konzentration des anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörpers höher war als die des anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpers. In diesem Fall wurden die  $\delta$ 2+ T-Zellen kaum noch mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper gefärbt (**s. Abbildung 4 B, 2. Spalte**).

Bei Verwendung einer höheren Konzentration des anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpers im Vergleich zum anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper wurden die  $\delta$ 2+ T-Zellen mehrheitlich mit beiden Antikörpern gefärbt (**s. Abbildung 4, 3. Spalte**).

Unter diesen Voraussetzungen wurde die homogenste anti- $\gamma\delta$ -Färbung bei einer verzögerten Zugabe des anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörpers erzielt, da nun auch eine Nebenpopulation mit besonders hoher  $\delta$ 2-TCR-Expression mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper reagierte (**s. Abbildung 4C, schwarze Umrandung**) und somit klar wurde, dass es sich bei beiden Populationen um  $\delta$ 2-positive  $\gamma\delta$ -T-Zellen handelte.

Sowohl bei Vorinkubation mit dem anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper (**s. Abbildung 4A, 3. Spalte**) als auch bei der gleichzeitigen Färbung (**s. Abbildung 4B, 3. Spalte**) war die Färbeintensität der  $\delta$ 2+ T-Zellen im  $\gamma\delta$ + Bereich im Vergleich zur Vorinkubation mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper (**s. Abbildung 4C, 3. Spalte**) reduziert.

Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass nicht die direkte Konjugation mit den Fluoreszenzfarbstoffen (Wistuba-Hamprecht et al., 2014), sondern die Reihenfolge der Hinzugabe der Antikörper das Färbeergebnis beeinflusst. Durch Vorinkubation mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper und anschließende gleichzeitige Hinzugabe aller anderen Antikörper, einschließlich des anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörpers, gelang eine ungestörte Färbung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Zusätzlich ist dieses Verfahren einfacher in der Handhabung und schont die Zellen, da es zusätzliche Wasch- und Zentrifugationsschritte, die bei Verwendung eines unkonjugierten Antikörpers notwendig sind, vermeidet.



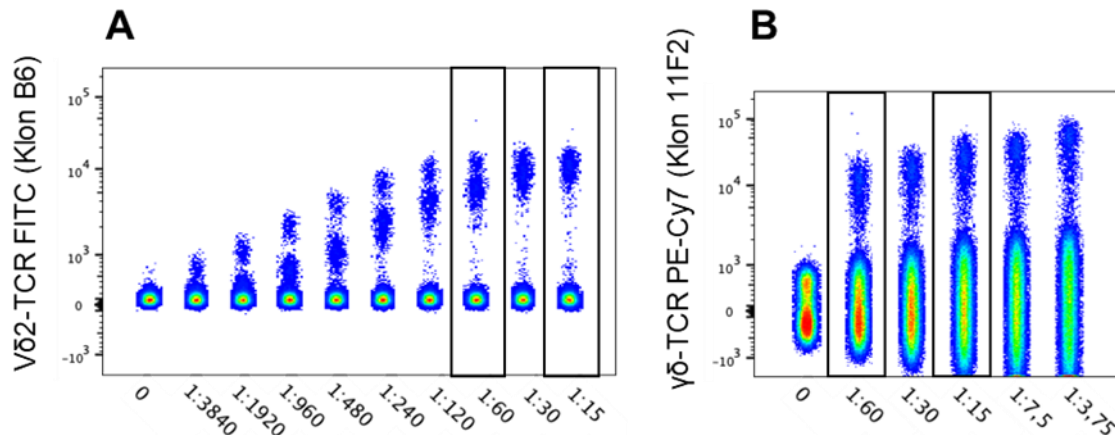
**Abbildung 4: Analyse der Interferenzen der kombinierten Färbung mit einem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper und einem anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper.**

**A:** Vorfärbung mit dem anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper und anschließende Färbung mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper.

**B:** Gleichzeitige Färbung mit dem anti-V $\delta$ 2-TCR- und dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper.

**C:** Vorfärbung mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper und anschließende Färbung mit dem anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper. Die schwarze Umrandung zeigt das „beste“ Färberegebnis in diesem Experiment. Je Färbung wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen der beiden Antikörper verwendet (s. Beschriftung oben). In allen drei Abbildungen sind anhand der Vorwärts-/Seitwärtsstreuung eingegrenzte Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der Lymphozyten an.

Beschriftung im Bild: gd+, d2- =  $\gamma\delta$ +,  $\delta$ 2-; d2+ =  $\delta$ 2+.



**Abbildung 5: (A) Titration des anti-Vδ2-TCR-Antikörpers (Klon B6) konjugiert mit FITC. (B) Titration des anti-γδ-TCR-Antikörpers (Klon 11F2) konjugiert mit PE-Cy7.**

Die Verdünnungen (x-Achse), die für das in **Abbildung 4** gezeigte Experiment verwendet wurden, sind schwarz umrandet. Beide Abbildungen zeigen anhand der Vorwärts-/Seitwärtsstreuung eingegrenzte Lymphozyten.

**A:** Bei geringeren Konzentrationen des anti-Vδ2-TCR-Antikörpers ist eine Aufspaltung der Positivpopulation in zwei Subpopulationen zu erkennen. Dieses Phänomen ist bei höheren Konzentrationen nicht mehr zu beobachten. Ab einer Konzentration von 1:120 ist die Positivpopulation deutlich von der Negativpopulation abzugrenzen.

**B:** Bei der Färbung mit dem anti-γδ-TCR-Antikörper sind bei allen hier getesteten Verdünnungen Zellen im Übergangsbereich zwischen der Positiv- und der Negativpopulation zu beobachten. Dennoch zeichnet sich bereits bei niedrigen Konzentrationen eine deutliche positive Population ab. Bei Verwendung von höheren Konzentrationen ist eine erhöhte Hintergrundfärbung der Negativpopulation zu beobachten.

#### 4.1.2 Evaluierung verschiedener anti-γδ-TCR-Antikörper in Bezug auf ihre Färbeeigenschaften

Nach der Analyse der Interferenzen zwischen dem anti-γδ-TCR-Antikörper und dem anti-Vδ2-TCR-Antikörper wurde die vereinfachte Färbemethode (Vorinkubation mit dem anti-γδ-TCR-Antikörper und anschließende Hinzugabe weiterer Antikörper) in einem *Multicolor*-Experiment getestet. Hierfür wurde ein anti-γδ-TCR- und ein anti-Vδ2-TCR-Antikörper mit einem anti-αβ-TCR-, einem anti-CD3-, einem anti-CD4- und einem anti-CD14-Antikörper kombiniert.

Für den anti-γδ-TCR-Antikörper wurden zwei verschiedene Klone verglichen, der Klon B1 konjugiert mit PE und der Klon 11F2 konjugiert mit PE und konjugiert mit PE-Cy7. Alle verwendeten Antikörper wurden vor Durchführung des Experiments austitriert, um eine geeignete Konzentration für die Verwendung im *Multicolor*-Experiment auszuwählen. Die Titrationen der anti-γδ-TCR-Antikörper und des anti-Vδ2-TCR-Antikörpers sind in **Abbildung 6** dargestellt.

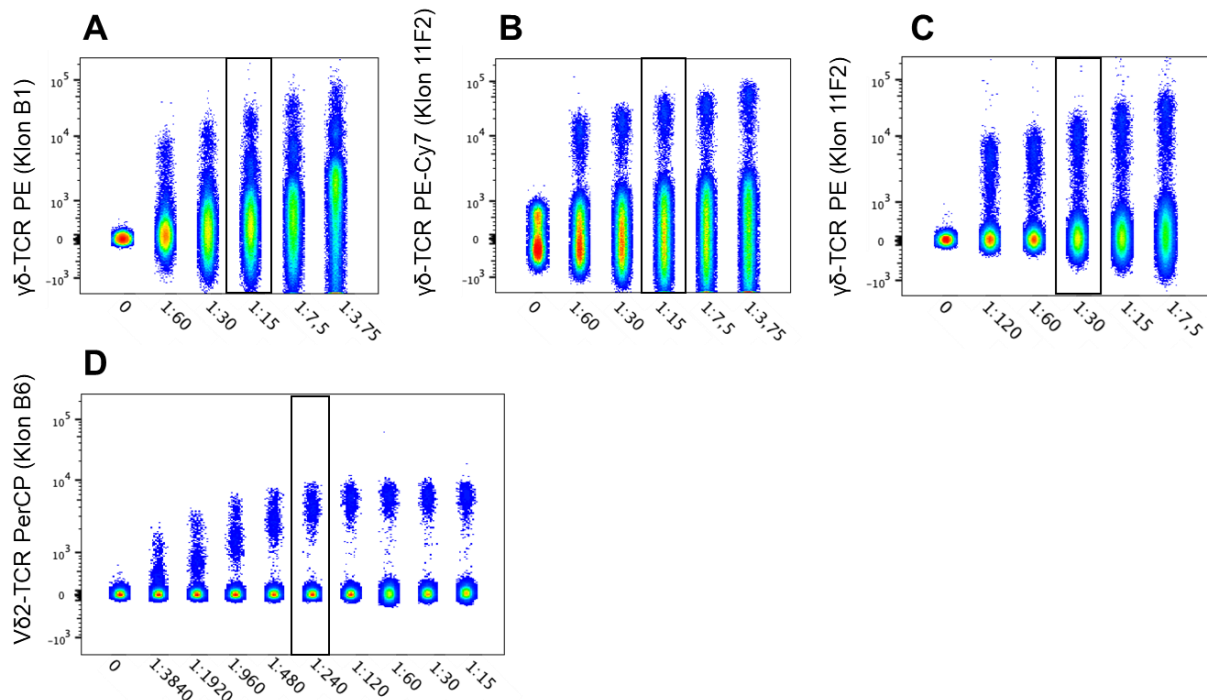
Sowohl in der Titration (**Abbildung 6ABC**) als auch in der *Multicolor*-Färbung (**Abbildung 7**) wies der Klon 11F2 konjugiert mit PE den geringsten Hintergrund im Vergleich zu dem Klon B1 konjugiert mit PE und dem Klon 11F2 konjugiert mit PE-Cy7 auf.

Die γδ<sup>+</sup> Population war von der γδ<sup>-</sup> Population unter Verwendung des Klons 11F2 (unabhängig vom Konjugat) im Vergleich zum Klon B1 insbesondere in den Titrationen (**s. Abbildung 6ABC**) und zum Teil auch in der *Multicolor*-Färbung (**Abbildung 7ABC**) besser abzugrenzen.

In der *Multicolor*-Färbung zeigte sich unter Verwendung des Klons 11F2 (**Abbildung 7BC**) eine Zweiteilung der  $\delta 2$ -T-Zellen, in eine kleine  $\gamma\delta^-$  und eine größere  $\gamma\delta^+$  Population. Diese trat nicht bei dem Klon B1 auf. Es könnte sich bei der kleineren  $\gamma\delta^-$  Population um „tote“ Zellen gehandelt haben, da diese Population bei späteren Experimenten, die auf „lebende“ Zellen ge-*gated* wurden, nicht mehr auftrat.

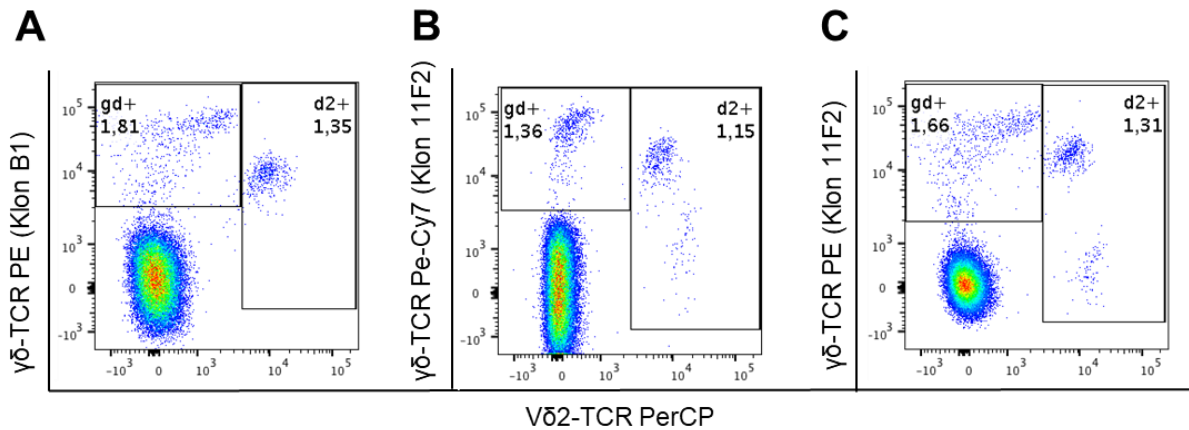
Die Verbreiterung des  $\gamma\delta^+$  Population in **Abbildung 7A und C** bei Verwendung des Klons B1 und des Klons 11F2 war vermutlich auf die hohe notwendige Kompensation zwischen den hier aufgetragenen Fluorochromen PE und PerCP zurückzuführen.

Für weitere Analysen wurde der anti- $\gamma\delta$ -TCR-Klon 11F2 konjugiert mit PE verwendet, da dieser den geringsten Hintergrund der hier getesteten anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper aufwies und eine klare Trennung der  $\gamma\delta^+$  von der  $\gamma\delta^-$  T-Zellpopulation ermöglichte. Aufgrund von Überschneidungen in den Emissionsspektren von PE und PerCP sowie den daraus resultierenden Kompensationsartefakten wurde im weiteren Verlauf diese Projekts PerCP nicht weiter als Konjugatfarbstoff für den anti-V $\delta 2$ -TCR-Antikörper verwendet.



**Abbildung 6:** Titration drei verschiedener anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper (Klon B1 konjugiert mit PE (A) und Klon 11F2 konjugiert mit PE-Cy7 (B) und PE (C)) und des anti-V $\delta 2$ -TCR-Antikörpers (Klon B6) konjugiert mit PerCP (D).

Die schwarze Umrandung markiert die jeweilige, im Kombinatorik-Experiment (**Abbildung 7**) verwendete Verdünnung (x-Achse). Alle Abbildungen zeigen anhand der Vorwärts-/Seitwärtsstreuung eingegrenzte Lymphozyten. Für den anti-V $\delta 2$ -TCR-Antikörper ergab sich ab einer Verdünnung von 1:240 eine klar abgrenzbare positive Population (D).



**Abbildung 7: Evaluierung zwei verschiedener Klone (B1 und 11F2) des anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpers.** Der Klon 11F2 wurde in Kombination mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen analysiert (**B** und **C**). Zusätzlich wurde in diesem Evaluierungsexperiment ein anti-CD3-, anti-CD4-, anti-CD14-, sowie anti-V $\delta$ 2-TCR- (Klon B6) und ein anti- $\alpha\beta$ -TCR-Antikörper (Klon IP26) mitgefärbt, um die Verwendung der anti- $\gamma\delta$ -TCR-Klone im Rahmen eines kleinen *Multicolor*-Experiments zu evaluieren. Es wurde jeweils mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper vorinkubiert und anschließend die weiteren Antikörper hinzugefügt. Alle Abbildungen wurden auf Lymphozyten und CD3+ ge-gatet. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der Lymphozyten und CD3+ an.

Beschriftung im Bild: gd+ =  $\gamma\delta$ +; d2+ =  $\delta$ 2+; ab-, gd+ =  $\alpha\beta$ -,  $\gamma\delta$ +

#### 4.1.3 Testung verschiedener anti-V $\delta$ 1-TCR- und anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper in Bezug auf ihre Färbeeigenschaften

Nach der Evaluierung eines geeigneten anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpers, wurden als nächstes verschiedene anti-V $\delta$ 1-TCR- und anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper getestet und hierbei jeweils die bisher verwendeten murinen Antikörper mit einem neueren humanen Antikörper verglichen. Alle Antikörper wurden vor Verwendung in einem *Multicolor*-Experiment austitriert, um eine geeignete Verdünnung zum Färben auszuwählen (**Abbildung 8**).

Da in einem vorherigen Experiment bei gleichzeitiger Verwendung von PE als Konjugatfarbstoff für den anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper und PerCP als Konjugatfarbstoff für den anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper (**Abbildung 7A und C**) die notwendige Kompensation zu einer störenden Populationsverbreiterung der  $\gamma\delta$ + Population geführt hatte, wurde nun der bisher verwendete murine anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper Klon B6 mit dem humanen Klon REA771 (beide konjugiert mit APC) verglichen. Bei der gleichzeitigen Verwendung von PE und APC trat dabei keine Verbreiterung der  $\gamma\delta$ + Population auf, da diese beiden Fluorochrome geringere Überschneidungen in ihren Emissionsspektren aufweisen (**Abbildung 9**).

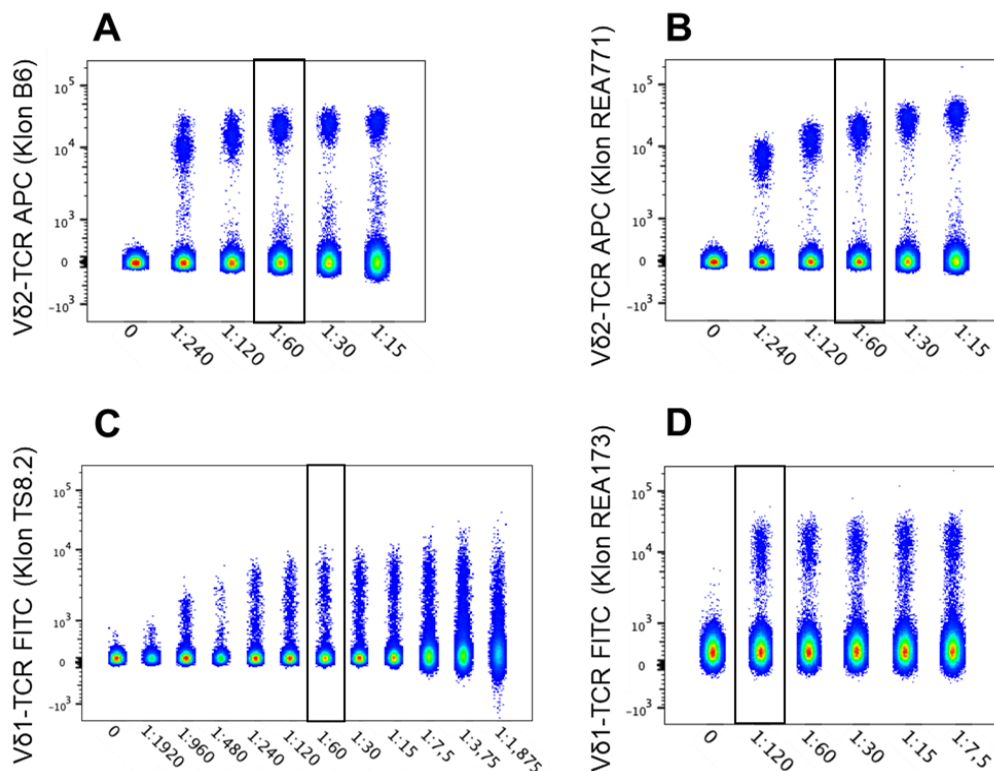
Bei Verwendung des Klons B6 zeigte sich eine Aufspaltung der  $\delta$ 2+ Population in zwei kleinere Subpopulationen (**Abbildung 9**). Diese war auch in den Titrationen bei niedrigen Konzentrationen zu erkennen (**Abbildung 8A und Abbildung 6D**). Bei Verwendung des Klons REA771 ergab sich dagegen eine einheitliche Färbung der  $\delta$ 2+ T-Zellen (**Abbildung 8B und Abbildung 9**). Es handelte sich möglicherweise, um zwei  $\delta$ 2+ T-Zellsubpopulationen, die nur mit dem B6-Antikörper unterschieden werden konnten und möglicherweise einen unterschiedlichen TCR exprimierten. Allerdings

ergab die Literatur hier keine weiteren Hinweise zur Erklärung des Phänomens. Somit wurde dieser Frage hier nicht weiter nachgegangen.

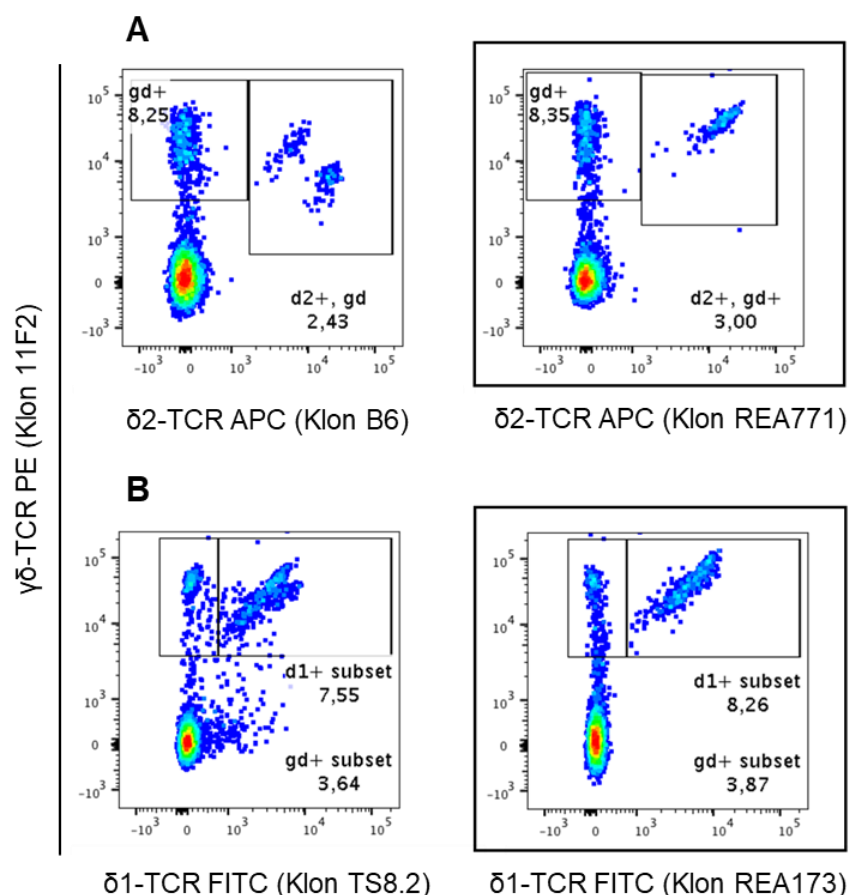
Aufgrund der besseren Kompensierbarkeit von PE und APC im Vergleich zu PE und PerCP wurde für weitere Analysen APC als Konjugatfarbstoff für den anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper verwendet. Da mit dem Klon REA771 eine einheitliche Färbung aller  $\delta$ 2+ T-Zellen gelang, wurde dieser für weitere Analysen dem Klon B6 vorgezogen.

Als anti-V $\delta$ 1-TCR-Antikörper wurde der bisher verwendete murine Klon TS8.2 mit dem humanen Klon REA173 verglichen (**Abbildung 8C und D, Abbildung 9B**). Als Konjugatfarbstoff wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) beibehalten, da dieser Fluoreszenzfarbstoff aufgrund geringer Überschneidung in den Emissionsspektra gut mit PE und APC kombinierbar war.

In der Titration war eine klare Abgrenzung der Positiv- von der Negativpopulation bei Verwendung des anti-V $\delta$ 1-TCR-Antikörpers Klon TS8.2 aufgrund eines fließenden Übergangs kaum möglich. Dagegen war die Positivpopulation in der Titration des Klons REA173 bei geringen Konzentrationen gut von der negativen Population abgrenzbar. Bei Verwendung höherer Konzentrationen schien sie jedoch direkt aus der Negativen hervorzugehen (**Abbildung 8C und D**). In der *Multicolor*-Färbung zeigte sich unter Verwendung des Klons REA731 ein klareres Bild mit besserer Trennung der  $\delta$ 1+ Population von den  $\gamma\delta$ + T-Zellen (**Abbildung 9B**). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde entschieden, den Klon REA173 für weitere Analysen zu verwenden.



**Abbildung 8: Titration zweier verschiedener anti-V $\delta$ 2-TCR- (AB) und anti-V $\delta$ 1-TCR-Antikörper (CD).** Die schwarzen Umrandungen markieren die, in den Kombinatorik-Experimenten verwendeten Verdünnungen (x-Achse). Alle Abbildungen zeigen anhand der Vorwärts-/Seitwärtsstreuung eingegrenzte Lymphozyten.



**Abbildung 9: Evaluierung verschiedener anti-Vδ2-TCR- (A) und anti-Vδ1-TCR-Antikörper (B) in Kombination mit dem anti-γδ-TCR-Klon 11F2 konjugiert mit PE.**

Die schwarze Umrandung markiert die Klone, die für die weiteren Analysen verwendet wurden. In diesem Experiment wurde zusätzlich ein anti-CD3- und anti-CD4-Antikörper zur besseren Abgrenzung der T-Zellen verwendet und jeweils mit dem anti-γδ-TCR-Antikörper vorinkubiert. Die Abbildungen zeigen CD3+ und CD4- Lymphozyten. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der CD3+ und CD4- Lymphozyten an.

Beschriftung im Bild: gd+ = γδ+; d2+, gd+ = δ2+, γδ+; d1+ = δ1+

#### 4.1.4 Auswahl von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffkombinationen zur durchflusszytometrischen Analyse humaner γδ-T-Zellen

Im Anschluss an die Etablierung einer vereinfachten Färbemethode der γδ-T-Zellen und ihrer Subgruppen sowie der Evaluierung verschiedener anti-γδ-TCR-, anti-Vδ2-TCR- und anti-Vδ1-TCR-Antikörper, wurde eine Liste mit Oberflächenmarkern erstellt, die für die durchflusszytometrische Analyse humaner γδ-T-Zellen im Kontext einer IM relevant und interessant waren (**Tabelle 11**). Diese beinhaltet Oberflächenmarker zur Charakterisierung von T-Zellen (CD3, CD4, CD8), Marker zur Abgrenzung von anderen Zellgruppen (z.B. CD14), sowie Marker, die eine Aussage über die Funktion und den Phänotyp ermöglichen. Darunter befanden sich Marker zur Beurteilung der Differenzierung (CD45RA, CCR7, CD27, CD28) und der Aktivierung (CD38, HLA-DR), sowie zur Beurteilung der zytotoxischen Aktivität (CD16, CX3CR1).

Bei der Erstellung der Antikörperliste und der Wahl der jeweiligen Klone wurden bereits publizierte multiparametrische *Panel* sowie Empfehlungen zur durchflusszytometrischen Analyse von humanen T-Zellen und insbesondere γδ-T-Zellen als Anregung verwendet (Angelini et al., 2004; Maecker et al., 2012; Wistuba-



Hamprecht et al., 2014; Finak et al., 2016; Davey et al., 2018; Barros-Martins et al., 2022).

Die Kombination mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte basierend auf Empfehlungen aus der Literatur (Wistuba-Hamprecht et al., 2014), anhand eigener Experimente sowie mit Hilfe von speziellen Spektrum-Analysatoren von BioLegend und Becton Dickinson (BD, s. a.; BioLegend, s. a. ), die eine Einschätzung der Überschneidungen in den Emissionsspektren (*Spillover*) der Fluoreszenzfarbstoffe erlauben.

Hierbei wurde versucht schwach exprimierte Oberflächenmoleküle, wenn möglich, mit starken Fluoreszenzfarbstoffen zu kombinieren.

Zur Unterscheidung der „lebenden“ von den „toten“ Zellen wurde ein spezielles Totzellen-Farbstoff-Kit (*LIVE/DEAD blue fluorescent*) verwendet, welches vom UV-Laser angeregt wird und daher nur zu geringen Interferenzen mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen führte.

Vor der Verwendung im Rahmen einer *Multicolor*-Färbung wurden alle Antikörper austitriert, um eine geeignete Konzentration zum Färben herauszufinden (vgl. 3.2.6).

**Tabelle 11: Verschiedene Oberflächenmarker zur durchflusszytometrischen Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen**

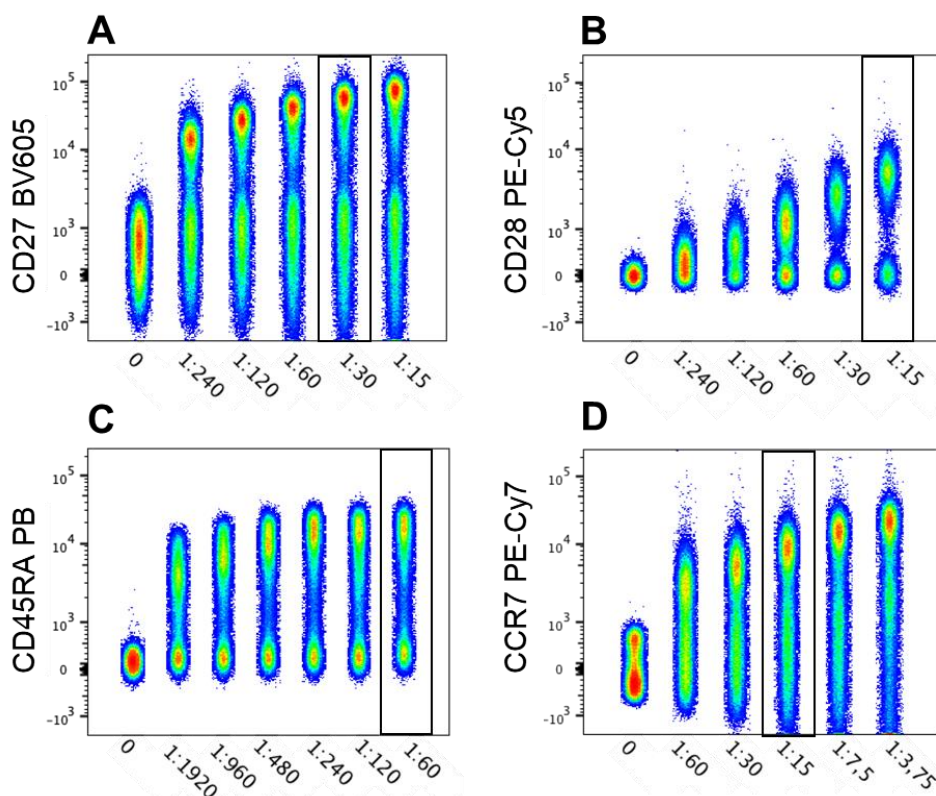
Oberflächenmarker-Kategorie	Bedeutung	Spezifitäten
<b><math>\gamma\delta</math>-T-Zell-Marker</b>	Identifizierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subpopulationen	$\gamma\delta$ -TCR, V $\delta$ 1-TCR, V $\delta$ 2-TCR
<b>T-Zell-Marker</b>	Identifizierung aller T-Zellen (CD3+) sowie Unterscheidung in CD4+ und CD8+ T-Zellen	CD3, CD4, CD8
<b>Oberflächenmarker für andere Zellgruppen</b>	Abgrenzung der $\gamma\delta$ -T-Zellen von Monozyten, B-Zellen, $\alpha\beta$ -T-Zellen	z.B. CD14, CD19, $\alpha\beta$ -TCR
<b>Totzellen-Marker</b>	Ausschluss von „toten“ Zellen; Unterscheidung zwischen lebenden und „toten“ Zellen	
<b>Differenzierungsmarker</b>	Beurteilung der Differenzierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subpopulationen	CD27, CD28, CD45RA, CCR7
<b>Aktivierungsmarker</b>	Beurteilung der Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subpopulationen	CD38, HLA-DR
<b>Funktionelle Marker</b>	Beurteilung einer zytotoxischen Aktivität der $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subpopulationen	CD16, CX3CR1

#### 4.1.5 Evaluierung vier verschiedener Antikörper zur Beurteilung des Differenzierungsstatus

Zur Beurteilung des Differenzierungsstatus von T-Zellen werden in der Literatur häufig vier verschiedene Oberflächenmoleküle verwendet: CD27, CD28, CD45RA und CCR7 (Tomiya et al., 2002; Sallusto et al., 2004). Ziel dieser Arbeit war es unter anderem die Antikörper gegen diese vier Oberflächenmoleküle in ein gemeinsames *Panel* zu integrieren.

Hierfür wurde in der eigenen Arbeit anhand der Titrations der Antikörper (**Abbildung 10**) eine geeignete Konzentration zum Färben ausgewählt und diese anschließend in Kombination mit bisher verwendeten Antikörpern an gesunden Spendern in einer *Multicolor*-Färbung getestet (**Abbildung 11**).

Hierbei fiel auf, dass aufgrund von Überschneidungen in den Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe und daraus resultierender Kompensationsartefakte eine klare Abgrenzung der Populationen nicht immer möglich war. Insbesondere der anti-CD27-Antikörper, der bereits in den Titrations eine hohe Hintergrundfärbung aufgewiesen hatte, erschwerte das *Gating* der Differenzierungsmarker. Aufgrund einer begrenzten Anzahl an Fluoreszenzfarbstoffkombinationen wurde in der eigenen Arbeit entschieden die bereits getroffene Auswahl beizubehalten.



**Abbildung 10: Titrations der vier verschiedenen Differenzierungsmarker CD27 (A), CD28 (B), CD45RA (C) und CCR7 (D).**

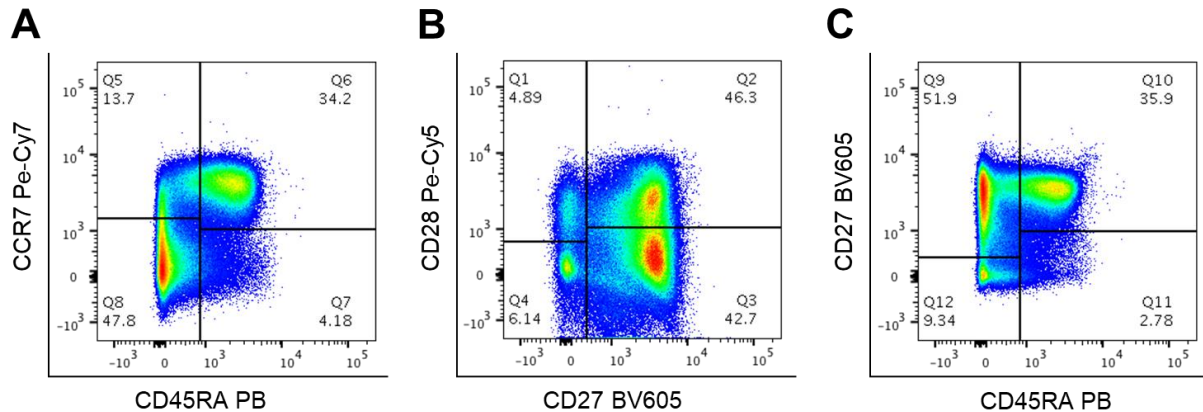
**A:** Der anti-CD27-Antikörper konjugiert mit BV605 führte in der Titration unabhängig von der verwendeten Konzentration zu einem hohen Hintergrundsignal. Dennoch zeigte sich eine deutliche Positivpopulation.

**B:** Der anti-CD28-Antikörper konjugiert mit PE-Cy5 zeigte nur eine geringe Hintergrundfärbung und eine gute Trennschärfe bei einer Verdünnung von 1:15.

**C:** Der anti-CD45RA-Antikörper konjugiert mit PB zeigte eine geringe Hintergrundfärbung und eine klare Trennung der Positiv- von der Negativpopulation ab einer Verdünnung von 1:240.

**D:** Der anti-CCR7-Antikörper wies bei allen getesteten Verdünnungen eine hohe Hintergrundfärbung auf. Eine abgrenzbare positive Population zeigte sich bei einer Verdünnung von 1:15.

Die schwarzen Umrandungen zeigen, die im Rahmen der *Multicolor*-Färbung verwendeten Verdünnungen (x-Achse). Alle Abbildungen zeigen anhand der Vorwärts/Seitwärtsstreuung eingegrenzte Lymphozyten.



**Abbildung 11: Evaluierung der Differenzierungsmarker im Rahmen eines *Multicolor*-Experiments (hier: CD3+, CD14- T-Zellen).**

In allen drei Abbildungen sind CD3+, CD14- T-Zellen dargestellt. Um diese einzugrenzen, wurde auf Lymphozyten in der Vorwärts-/Seitwärtsstreuung, lebende Zellen, Single Cells und CD14-, CD3+ *gated*. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der CD14-, CD3+ an. Zusätzlich zu den bereits erwähnten Antikörpern wurden jeweils ein anti- $\gamma\delta$ -TCR-, anti-V $\delta$ 1-, anti-V $\delta$ 2-, anti-CD4- und ein anti-CD8-Antikörper mitgefärbt.

#### 4.1.6 Etablierung einer *Multicolor*-Färbung zur Analyse der Differenzierung humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen

Im Anschluss an die Evaluierung der  $\gamma\delta$ -T-Zell-Marker und der vier Differenzierungsmarker, wurden diese in einem gemeinsamen *Panel* mit allgemeinen T-Zell-Markern (CD3, CD4 und CD8), einem Marker zum Ausschluss von Monozyten und einem Lebend/Tot-Farbstoff kombiniert. Daraus entstand ein 14-parametrisches, 12-farbiges durchflusszytometrisches *Panel*, das eine Aussage über den Differenzierungsstatus der  $\gamma\delta$ -T-Zellen anhand der Expression vier verschiedener Oberflächenmarker (CD27, CD28, CD45RA, CCR7) ermöglichte.

**Tabelle 12** listet alle im „Differenzierungs-*Panel*“ verwendeten Antikörper mit ihren Eigenschaften auf. Für alle im *Panel* verwendeten Oberflächenmarker wurden FMO-Kontrollen (Weglassen je eines Antikörpers aus der Gesamtkombination) zur Optimierung der Kompensation sowie als Hilfestellung für das *Gating* angefertigt.

Tabelle 12: Eigenschaften der im „Differenzierungs-Panel“ enthaltenen Antikörper

Spezifität	Klon	Konjugat	Anbieter	Exzitation (nm)	Emission (nm)
Live/Dead		Blue fluorescent	Invitrogen	355	450/50
$\gamma\delta$ -TCR	11F2	PE	Miltenyi	561	585/15
V $\delta$ 1-TCR	REA173	FITC	Miltenyi	488	530/30
V $\delta$ 2-TCR	REA771	APC	Miltenyi	640	670/14
CD3	UCHT-1	A700	BD	640	730/45
CD4	OKT4	BV510	BioLegend	405	525/50
CD8	SK1	APC-H7	BD	640	780/60
CD14	M $\phi$ P9	PE-CF594	BD	561	610/20
CD27	O323	BV605	BioLegend	405	605/12
CD28	CD28.2	PE-Cy5	BD	561	670/30
CD45RA	HI100	PB	BioLegend	405	450/50
CCR7	G043H7	PE-Cy7	BioLegend	561	780/60

Das *Panel* wurde an PBMCs von gesunden Spendern getestet und eine *Gating*-Strategie für spätere Analysen des Differenzierungsstatus der  $\gamma\delta$ -T-Zellen entwickelt (**Abbildung 12, Abbildung 13**). Hierfür wurde zuerst ein fünfeckiges Lymphozyten-*Gate* angewandt und mit Hilfe des *Live/Dead*-Farbstoffes die „lebenden“ Zellen von den „toten“ Zellen abgegrenzt. Anschließend wurde eine Dublettenkontrolle durchgeführt und anhand der Expression des T-Zellmarkers CD3 sowie der fehlenden Expression von CD14 die T-Zellen ausgewählt. Die als CD3+, CD14- definierten T-Zellen konnten nun weiter anhand des Vorkommens der T-Zellmarker CD4 und CD8 unterschieden werden.

Zur Identifikation der  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden die CD3+, CD14- T-Zellen auf CD4-Negativität und  $\gamma\delta$ -TCR-Positivität hin untersucht. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind in diesem *Gating*-Beispiel folglich als  $\gamma\delta$ + und CD4- definiert.

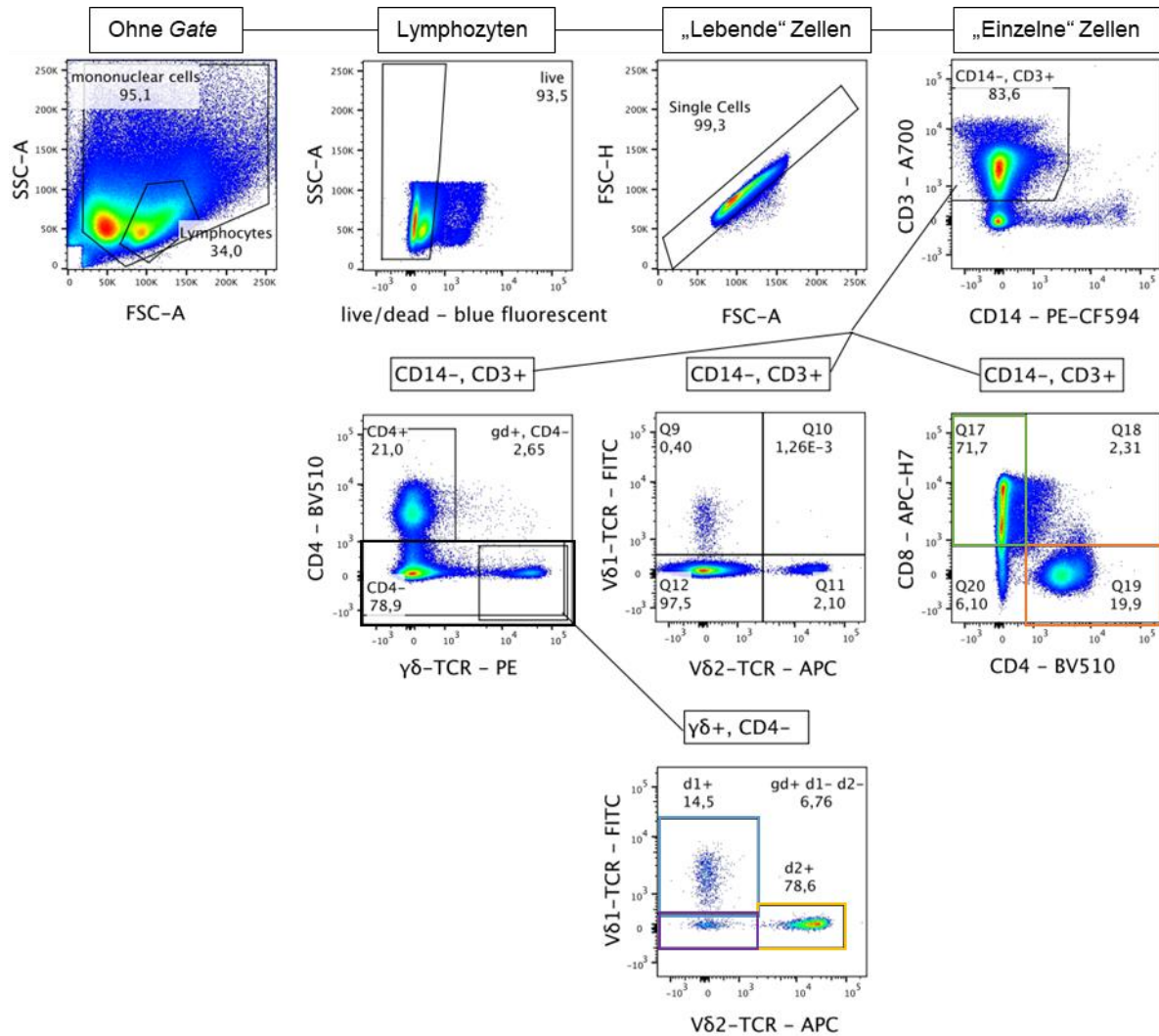
Die Population der  $\gamma\delta$ + T-Zellen wurde daraufhin auf die Expression der Subgruppenmarker ( $\delta$ 1+ und  $\delta$ 2+) analysiert. Dabei teilte sich die Population der  $\gamma\delta$ + T-Zellen in drei Untergruppen auf: eine  $\delta$ 1+, eine  $\delta$ 2+ und eine  $\delta$ 1-,  $\delta$ 2- Population, die weder den  $\delta$ 1-TCR noch den  $\delta$ 2-TCR exprimiert. Diese wurden anschließend als  $\gamma\delta$ + $\delta$ 1- $\delta$ 2- bezeichnet.

Diese drei Subpopulationen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden auf die Expression der Differenzierungsmarker CD27, CD28, CD45RA und CCR7 untersucht. In der eigenen Arbeit wurde die Kombination aus CD27 versus CD28, CCR7 versus CD45RA und CD27 versus CD45RA für alle  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und für die CD4+ und CD8+ T-Zellen im Vergleich analysiert.

Da die  $\gamma\delta$ -Subpopulationen zum Teil nur wenige Zellen enthielten, eignete sie sich in diesen Fällen nicht zur Anpassung eines *Gates* für die Analyse der Differenzierungsmarker. Zur Lösung dieser Problematik wurde ein kumulatives CD4-*Gate* verwendet, anhand dessen die *Gates* für die Differenzierungsmarker optimal ausgerichtet und daraufhin auf die  $\gamma\delta$ -Subpopulationen sowie CD4+ und CD8+ T-

Zellen übertragen werden konnten. Die CD4<sup>-</sup> Zellpopulation wurde als Referenzpopulation ausgewählt, da sie eine große Vielfalt an T-Zellen, insbesondere auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen enthielt und sich somit für die Anpassung der Gates der  $\gamma\delta$ -T-Zellen eignete.

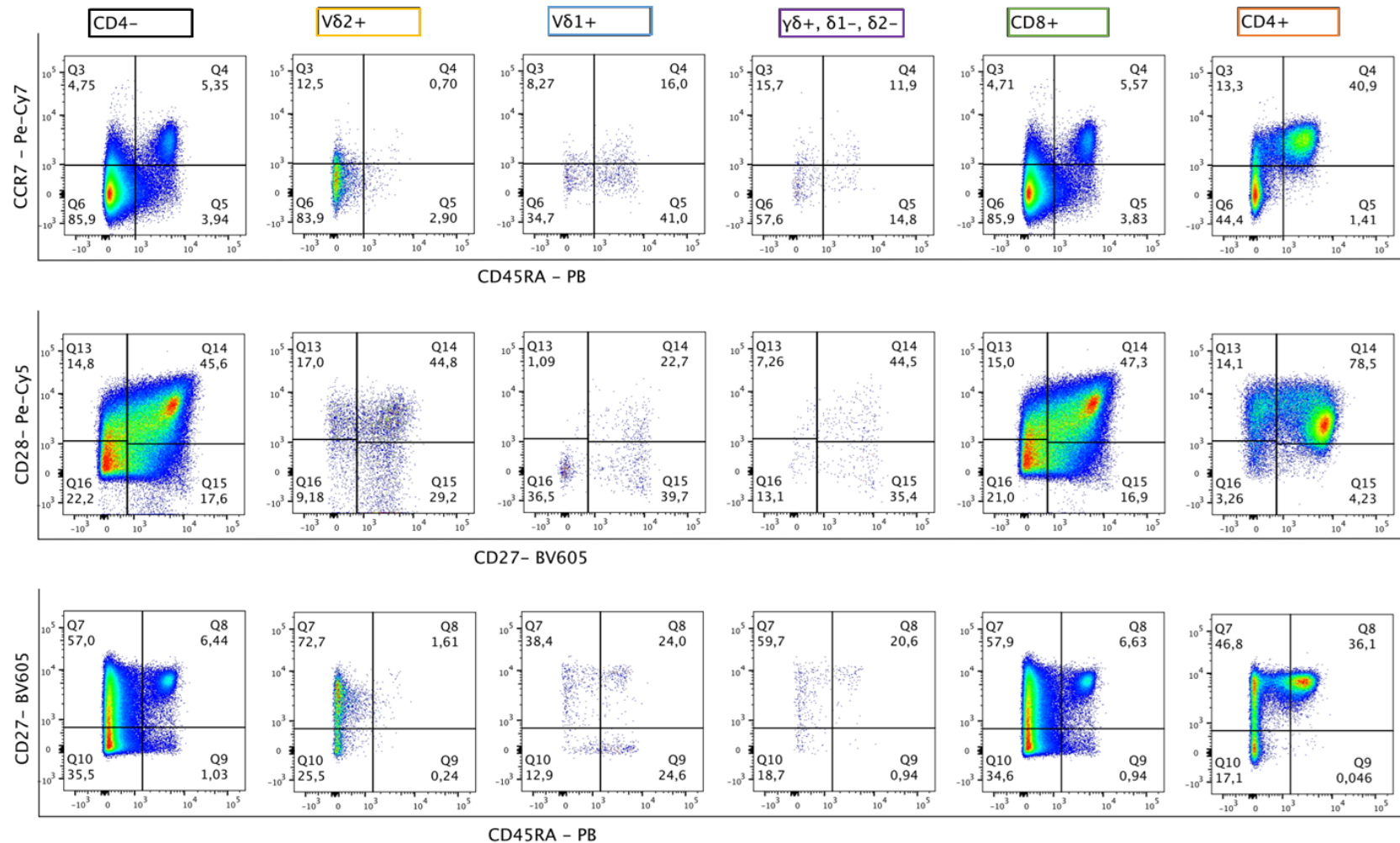
Die in den folgenden Abbildungen dargestellte *Gating*-Methode wurde für alle späteren Analysen der Patientenproben und der gesunden Kontrollproben verwendet.



**Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung der *Gating*-Methode einer Patientenprobe (hier: IM-EP-A038-01) mit dem Differenzierungs-Panel.**

Das fünfeckige, kleine, anhand der Vorwärts-/Seitwärtsstreuung eingegrenzte Lymphozyten-Gate wurde wie in der Abbildung dargestellt und im Text beschrieben *ge-gatet*. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der darüber genannten Population an. Das anschließende *Gating* der Differenzierungsmarker ist in **Abbildung 13** dargestellt. Die Zellgruppen, die weiter auf die Expression der Differenzierungsmarker untersucht wurden, sind hier farblich umrande

## Ergebnisse



**Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung des Gatings der Differenzierungsmarker anhand der Färbung einer Patientenprobe (hier: IM-EP-A038-01).** Als Referenzpopulation zur Anpassung der Gates für die Differenzierungsmarker wurde ein kumulatives CD4- Gate gewählt. Die in jeder Spalte gezeigten T-Zell-Subpopulationen sind darüber notiert. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der darüber genannten Population an. Das Gating der Subpopulationen wurde durchgeführt wie in **Abbildung 12** dargestellt.

#### 4.1.7 Testung weiterer Antikörper zur Phänotypisierung humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen

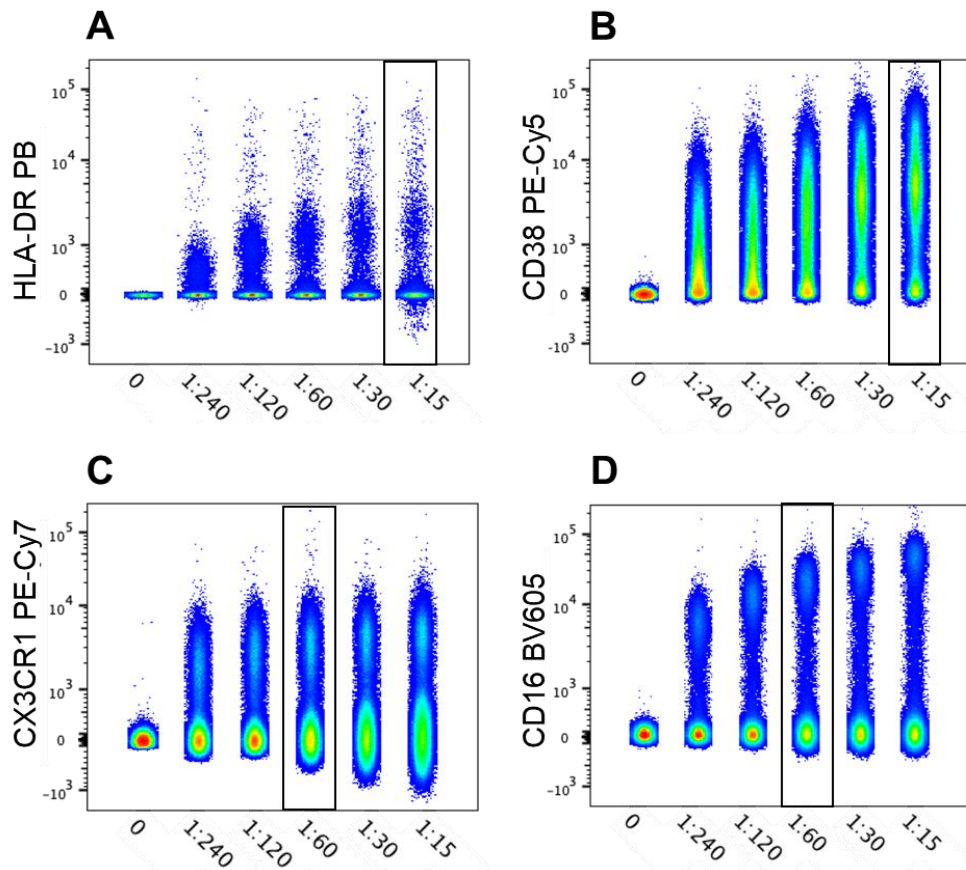
Um neben der Differenzierung auch die Aktivierung und weitere funktionelle Eigenschaften von  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer IM beurteilen zu können, wurden zwei Aktivierungsmarker getestet, CD38 und HLA-DR, sowie zwei weitere Marker, die im Zusammenhang mit zytotoxischer Aktivität stehen, CD16 und CX3CR1 (Nishimura et al., 2002; Angelini et al., 2004; Böttcher et al., 2015), für die Verwendung im Rahmen eines *Multicolorpanels*.

Da eine Integration dieser vier Marker in das bisherige *Panel* und die damit verbundene Hinzunahme weiterer vier Konjugatfarbstoffe zu große Schwierigkeiten mit der Kompensation erwarten ließ, wurde stattdessen ein neues *Panel* konzipiert, in dem die vier weiter oben gezeigten Differenzierungsmarker durch die vier Marker für Aktivierung oder zytotoxische Aktivität ersetzt wurden. Auf diese Weise konnte bereits getestete Kombination der Fluoreszenzfarbstoffe beibehalten werden.

Um eine geeignete Konzentration zum Färben auszuwählen, wurden alle vier Antikörper austitriert (**Abbildung 14**) und anschließend im Rahmen eines *Multicolor-Experiments* mit den bisher verwendeten Antikörpern getestet (**Abbildung 15, Abbildung 16**).

Die Färbung mit dem anti-CD38-Antikörper wies im *Multicolor-Experiment* eine hohe Hintergrundfärbung auf. In der Kombination mit HLA-DR gelang jedoch die Identifizierung aktivierter Zellen (**Abbildung 18, Abbildung 15**).

Das *Gating* der CX3CR1+ Population erwies sich als schwierig, da diese lediglich als „Mütze“ auf der negativen Population zu erkennen war. Auch die CD16+ Population ging fließend aus der CD16- Population hervor, dennoch schien hier eine Abgrenzung möglich (**Abbildung 16**).



**Abbildung 14: Titrationen des anti-HLA-DR-Antikörpers (A), des anti-CD38-Antikörpers (B), des anti-CX3CR1-Antikörpers (C) und des anti-CD16-Antikörpers (D).**

**A:** Der anti-HLA-DR-Antikörper (Klon L243) wies eine geringe Hintergrundfärbung auf. Die HLA-DR+ Population ist nur schwach zu erkennen, bei einer Verdünnung von 1:15 jedoch einigermaßen gut abgrenzbar.

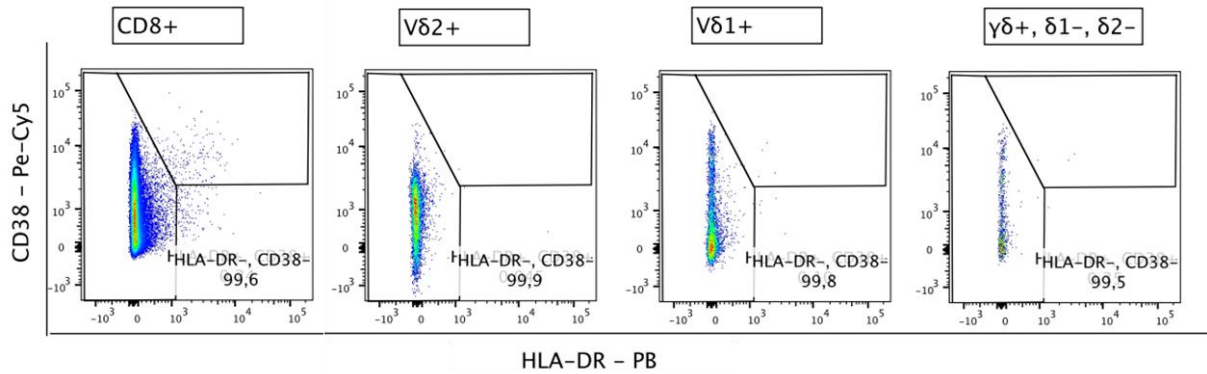
**B:** Der anti-CD38-Antikörper (Klon HIT2) zeigte in der Titration bei Verwendung von geringen Konzentrationen des Antikörpers eine schlechte Abgrenzbarkeit der positiven von der negativen Population. Diese verbesserte sich jedoch bei Verwendung höherer Konzentrationen.

**C:** Bei der Titration des anti-CX3CR1-Antikörpers (Klon 2A9-1) fiel auf, dass die positive Zellpopulation bei geringen Konzentrationen des Antikörpers fließend aus der negativen Zellpopulation hervorzugehen schien. Unter Verwendung höherer Konzentrationen des Antikörpers verbesserte sich die Trennschärfe, während gleichzeitig die Hintergrundfärbung zunahm. Bei einer Verdünnung von 1:60 war eine gute Abgrenzbarkeit der Positiv- von der Negativpopulation bei akzeptabler Hintergrundfärbung gegeben.

**D:** Die Titration des anti-CD16-Antikörpers (Klon 3G8) zeigte einen fließenden Übergang der CD16+ aus der CD16- Population. Bei einer Verdünnung von 1:60 wurde eine ausreichend starke Färbung erzielt.

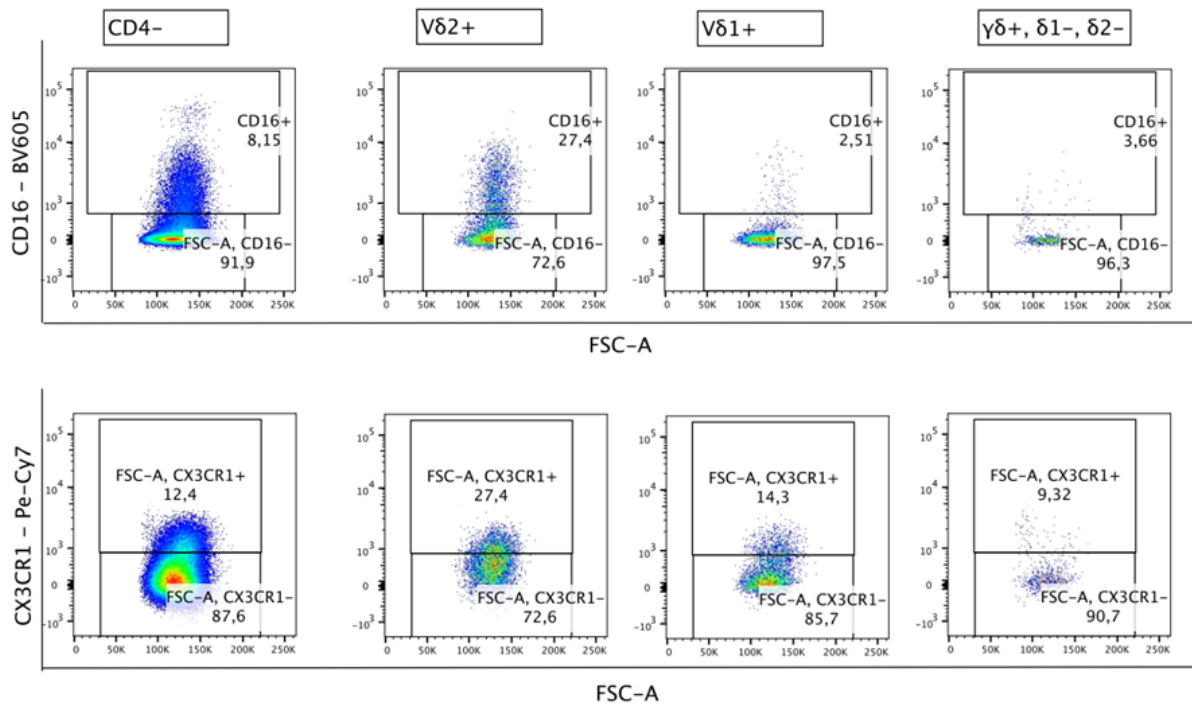
Alle Abbildungen zeigen anhand der Vorwärts-/Seitwärtsstreuung eingegrenzte Lymphozyten. Die in den *Multicolor*-Färbungen verwendeten Verdünnungen (x-Achse) sind schwarz umrandet.





**Abbildung 15: Evaluierung der zwei Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR in einem *Multicolor*-Experiment.**

Es wurde wie folgt *ge-gated*: Lymphozyten → „lebende“ Zellen → Dublettenkontrolle → CD3+, CD14- → γδ- → CD8+ bzw. CD3+, CD14- → γδ+, CD4- → δ1+, δ2+, γδ+δ1-δ2-. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der darüber genannten Population an. Im Experiment wurden jeweils ein anti-γδ-TCR-, anti-Vδ1-, anti-Vδ2-, anti-CD3-, anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD14-, anti-CD16- und ein anti-CX3CR1-Antikörper sowie ein Lebend/Tot-Farbstoff mitgefärbt.



**Abbildung 16: Evaluierung von CD16 und CX3CR1 im Rahmen eines *Multicolor*-Experiments.**

Es wurde wie folgt *ge-gated*: Lymphozyten → „lebende“ Zellen → Dublettenkontrolle → CD3+, CD14- → CD4- bzw. γδ+, CD4- → δ1+, δ2+, γδ+δ1-δ2-. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der darüber genannten Population an. Im Experiment wurden zusätzlich jeweils ein anti-γδ-TCR-, anti-Vδ1-, anti-Vδ2-, anti-CD3-, anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD14-, anti-CD38- und ein anti-HLA-DR-Antikörper sowie ein Lebend/Tot-Farbstoff mitgefärbt.

#### 4.1.8 Etablierung einer *Multicolor*-Färbung zur Analyse der Aktivierung und Zytotoxizität humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen

Nach der Evaluierung geeigneter Antikörper zur Beurteilung der Aktivierung und funktioneller Eigenschaften der  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden die vier Differenzierungsmarker gegen HLA-DR, CD38, CD16 und CX3CR1 ausgetauscht. Dadurch entstand ein weiteres multiparametrisches *Panel*, das „Aktivierungs-*Panel*“.

In **Tabelle 13** sind alle im Aktivierungs-*Panel* verwendeten Antikörper mit ihren Eigenschaften dargestellt.

**Tabelle 13: Eigenschaften der im Aktivierungs-*Panel* verwendeten Antikörper**

Spezifität	Klon	Konjugat	Anbieter	Exzitation (nm)	Emission (nm)
Live/Dead		Blue fluorescent	Invitrogen	355	450/50
$\gamma\delta$ -TCR	11F2	PE	Miltenyi	561	585/15
V $\delta$ 1-TCR	REA173	FITC	Miltenyi	488	530/30
V $\delta$ 2-TCR	REA771	APC	Miltenyi	640	670/14
CD3	UCHT-1	A700	BD	640	730/45
CD4	OKT4	BV510	BioLegend	405	525/50
CD8	SK1	APC-H7	BD	640	780/60
CD14	M $\phi$ P9	PE-CF594	BD	561	610/20
HLA-DR	L243	PB	BioLegend	405	450/50
CD38	HIT2	PE-Cy5	BioLegend	561	670/30
CX3CR1	2A9-1	PE-Cy7	BioLegend	561	780/60
CD16	3G8	BV605	BioLegend	405	605/12

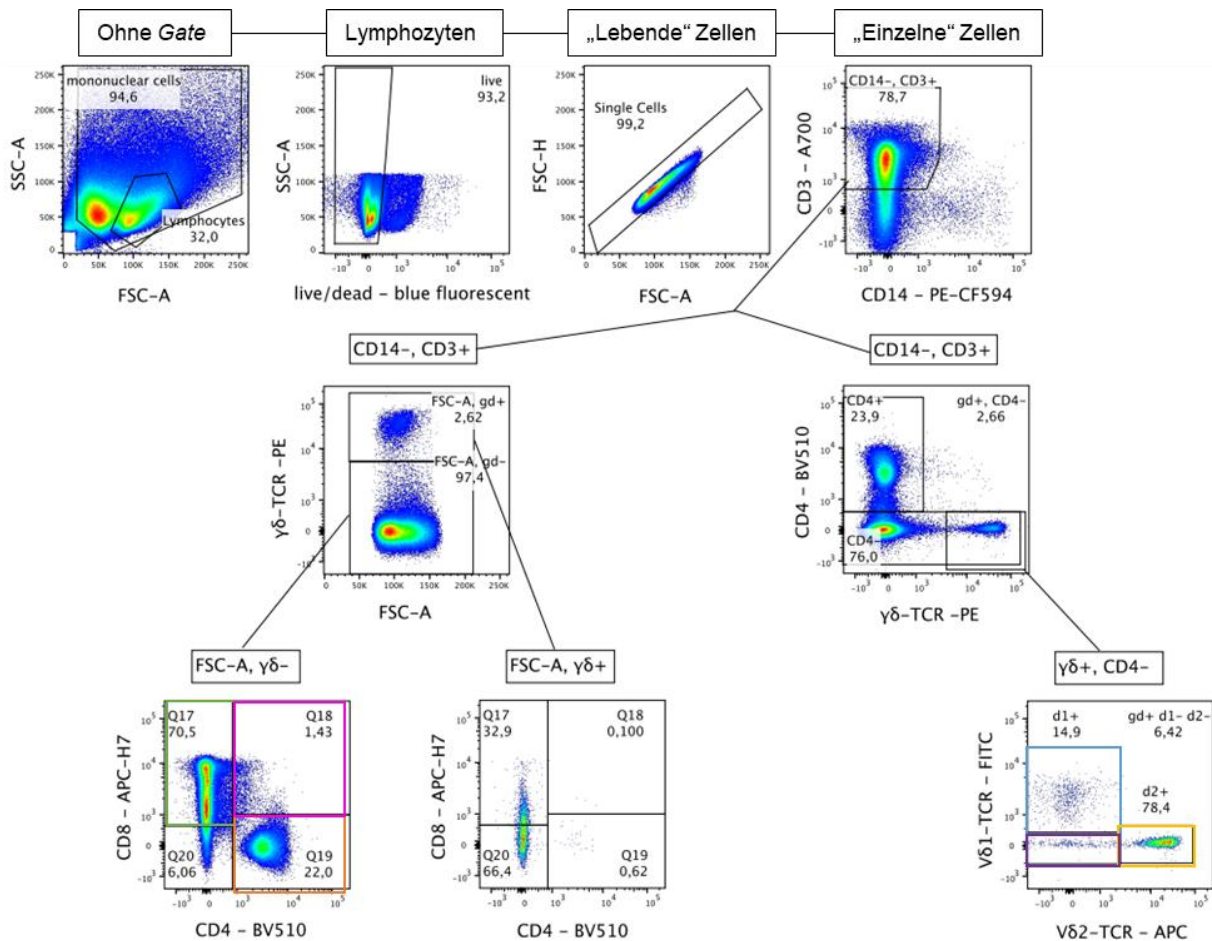
Das *Panel* wurden an PBMCs von gesunden Spendern getestet und anhand dieser Färbungen eine *Gating*-Methode für spätere Analysen der neu hinzugefügten Marker auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen entwickelt (**Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19**). Aus dem fünfeckigen Lymphozyten-*Gate* wurden zuerst die lebenden Zellen ausgewählt und anschließend eine Dublettenkontrolle durchgeführt. Daraufhin wurde anhand der Expression des Markers CD3 und unter Ausschluss des Monozytenmarkers CD14 auf T-Zellen, definiert als CD14<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>, *ge-gatet*. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden wie bereits oben erwähnt als  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> und CD4<sup>-</sup> definiert und weiter in die Subpopulationen  $\delta$ 1<sup>+</sup>;  $\delta$ 2<sup>+</sup>;  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> $\delta$ 1<sup>-</sup> $\delta$ 2<sup>-</sup> untergliedert.

Zusätzlich zu der bereits oben beschriebenen *Gating*-Methode wurden die CD3<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup> T-Zellen in eine  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> sowie eine  $\gamma\delta$ <sup>-</sup> Subgruppe unterteilt. Innerhalb der  $\gamma\delta$ <sup>-</sup> Subgruppe wurden die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgewählt, um sie auf die Expression von CD38, HLA-DR, CD16 und CX3CR1 zu untersuchen.

Um die Expression der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR vergleichbar auswerten zu können, wurden ein gemeinsames *Gate* auf der Basis von allen T-Zellen (CD3<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>) gewählt und auf die verschiedenen Zellpopulationen ( $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen) übertragen.

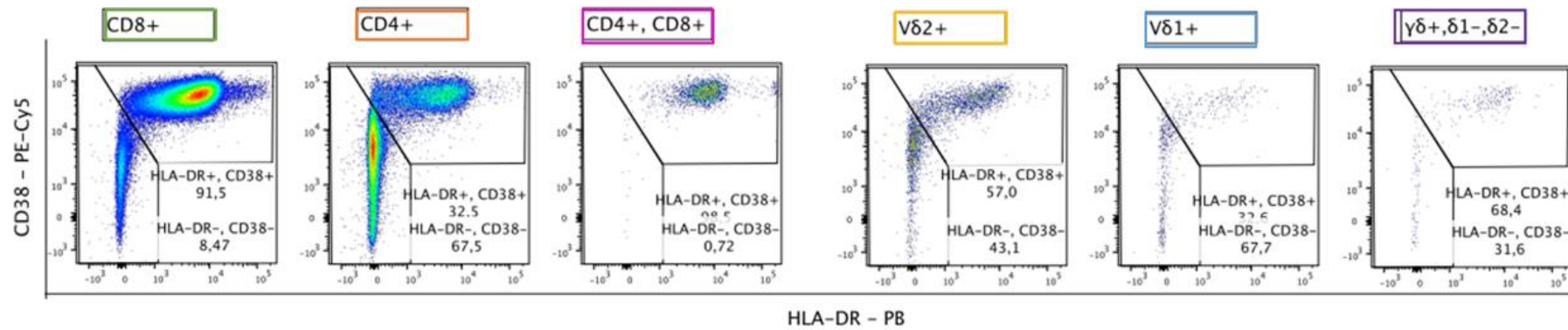
Zur optimalen Anpassung eines *Gates* für die Analyse von CD16 und CX3CR1 wurde wie bei den Differenzierungsmarkern beschrieben eine kumulative T-Zellgruppe (CD4-) verwendet, da die  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen aufgrund der zu geringen Zellzahl nicht für das *Gating* herangezogen werden konnten. Das mittels der CD4- Population gefundene *Gate* wurde anschließend auf die  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen übertragen und zur Analyse genutzt.

Für CX3CR1 konnte wegen des fließenden Übergangs zwischen CX3CR1+ und CX3CR1- Population nur annäherungsweise die Grenze zwischen diesen beiden Populationen festgelegt werden.



**Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung der *Gating*-Methode der Färbung eines IM-Patienten (hier: IM-EP-A038-01) mit dem Aktivierungs-Panel.**

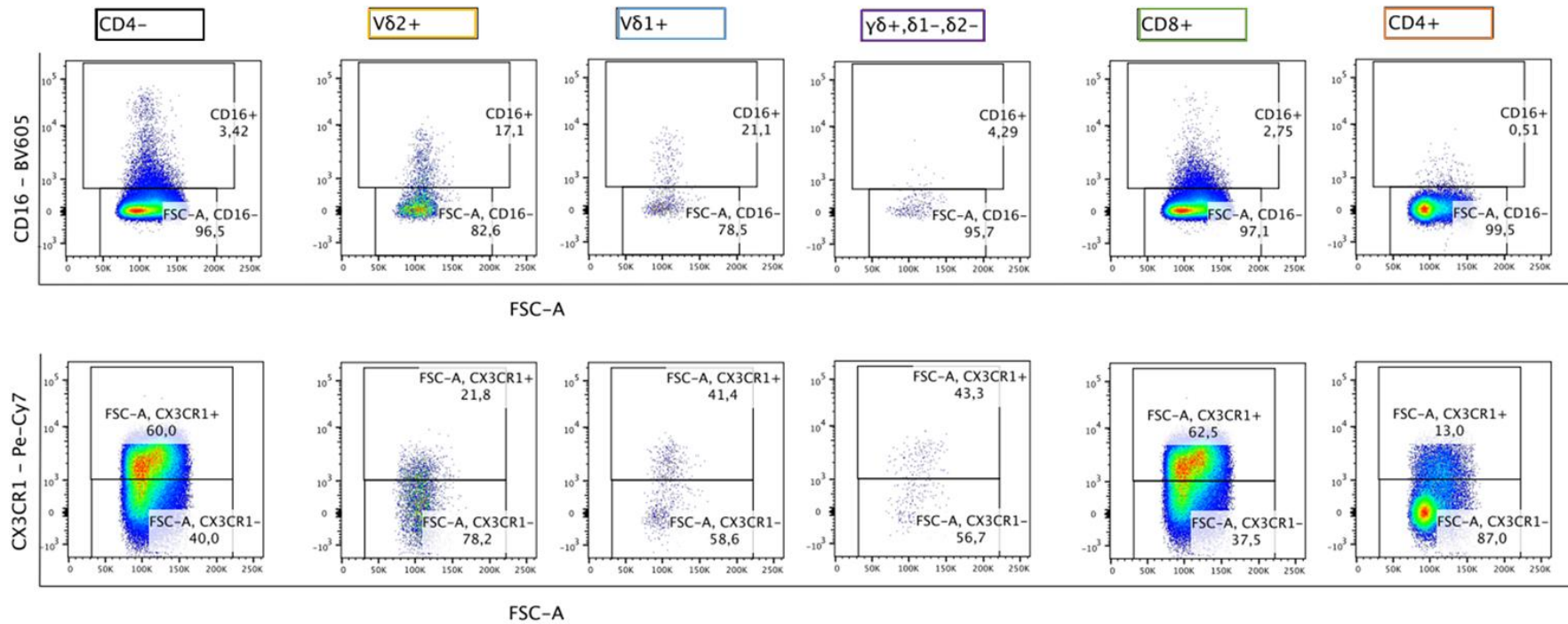
Die oberste Reihe entspricht der bereits für das Differenzierungs-Panel entwickelten *Gating*-Strategie (Lymphozyten → lebende Zellen → Dublettenkontrolle → CD14-, CD3+ →  $\gamma\delta+$ , CD4- →  $\delta1+$ ,  $\delta2+$ ,  $\gamma\delta+\delta1-\delta2-$ ). Zusätzlich wurden die T-Zellen (CD3+, CD14-) hier in eine  $\gamma\delta+$  und eine  $\gamma\delta-$  Subgruppe unterteilt, um anschließend innerhalb der  $\gamma\delta-$ -Subgruppe die CD4+ und CD8+ T-Zellen auf die Expression von CD38, HLA-DR, CD16 und CX3CR1 hin untersuchen zu können (s. **Abbildung 18 und Abbildung 19**). Die farbigen Umrandungen markieren die einzelnen Subgruppen, die auf die Expression dieser Marker weiter analysiert wurden. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der darüber genannten Population an.



**Abbildung 18: Analyse der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR anhand der Färbung eines IM-Patienten (hier: IM-EP-A038-01).**

Für eine einheitliche Analyse der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR wurde das *Gate* auf alle CD3+, CD14- T-Zellen angepasst (nicht dargestellt) und anschließend auf die T-Zellsubgruppen (CD8+; CD4+; CD4+CD8+) und die  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen ( $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) übertragen und ausgewertet. Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der darüber genannten Population an. Das dieser Abbildung vorausgehende *Gating* ist in **Abbildung 17** dargestellt.

## Ergebnisse



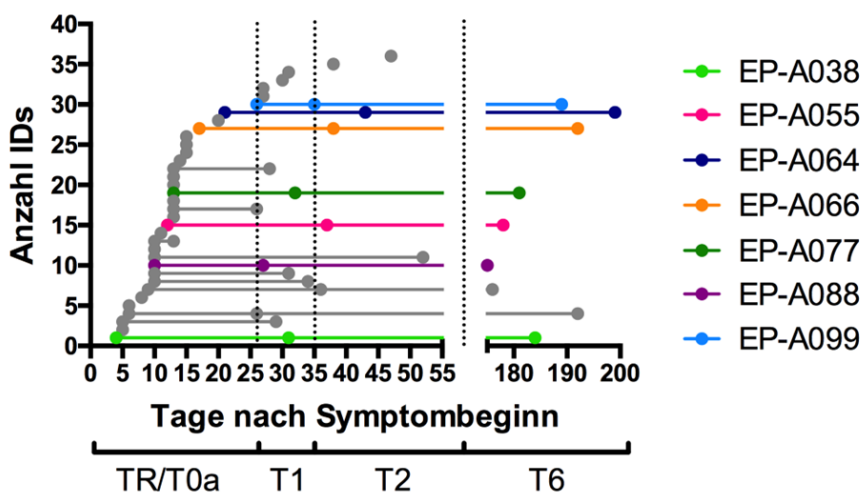
**Abbildung 19: Analyse von CD16 und CX3CR1 anhand der Färbung einer Probe eines IM-Patienten (hier: IM-EP-A038-01) mit dem Aktivierungs-Panel.** Die Zahlen geben die prozentualen Häufigkeiten der rechteckig markierten Populationen innerhalb der darüber genannten Population an. Das dieser Abbildung vorausgehende *Gating* ist in **Abbildung 17** dargestellt.

## 4.2 Analyse der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei einer pädiatrischen Kohorte mit infektiöser Mononukleose im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe

Im zuvor beschriebenen ersten Teil dieser Arbeit stand die Untersuchung der Färbereigenschaften von Antikörpern gegen den  $\gamma\delta$ -TCR und seine Subgruppen sowie die Etablierung von zwei multiparametrischen *Panel* zur durchflusszytometrischen Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Fokus. Dabei gelang es, die Färbemethode der  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu vereinfachen, störende Interferenzen bei der gleichzeitigen Färbung mit bestimmten Antikörpern zu umgehen und zwei 14-parametrische und 12-farbige *Panel* zur durchflusszytometrischen Analyse der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen zu entwickeln.

Beide *Panel* wurden im zweiten Teil dieser Arbeit verwendet, um die Häufigkeit und den Phänotyp der  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei einer pädiatrischen Kohorte mit IM, einer Teilkohorte der IMMUC-Studie, und einer gesunden, erwachsenen Kontrollgruppe zu untersuchen.

Im Rahmen der IMMUC-Studie wurde den Patienten mit IM zu vordefinierten Zeitpunkten Blut abgenommen (**Abbildung 20**) und eine große Anzahl klinischer und labortechnischer Parameter erhoben.



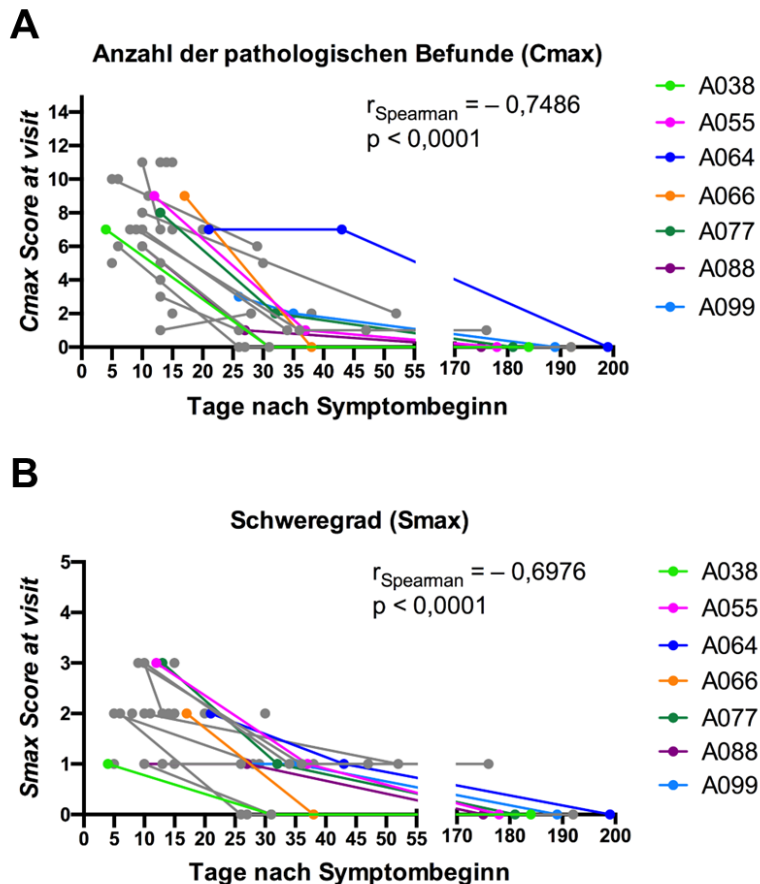
**Abbildung 20:** Zeitpunkte der Blutentnahmen der 36 Patienten mit IM, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Von sieben, die in dieser Arbeit untersuchten Patienten konnten drei verschiedene Zeitpunkte (ohne Ruhephase über Nacht) gemessen werden. Die IDs dieser sieben Patienten sind farblich hervorgehoben.

Anhand von Anzahl, Schweregrad und Dauer von pathologischen Befunden (getestet wurden 28 Parameter, darunter 19 klinische Symptome und neun Laborwerte) wurden drei klinische Scores definiert: „Cmax“ (maximale Komplexität [1-28], entsprechend der maximalen Anzahl von pathologischen Befunden), „Smax“ (maximaler Schweregrad der einzelnen Veränderungen [1-5]) und „Pmax“ (maximale Protraktion der einzelnen Veränderungen: 0 = keine Protraktion; 1 = Pathologie bis T1; 2 = Pathologie bis T6). Der Cmax und Smax-Score wurden bei jedem Studienbesuch (*at visit*) erhoben, sowie

die maximalen Werte für den gesamten Krankheitsverlauf als Gesamtscore (Cmax, Smax und Pmax Total) erhoben.

**Abbildung 21** zeigt die klinischen Scores Cmax (maximale Anzahl auffälliger Parameter zum Zeitpunkt der Studienvisite) (**A**) und Smax (maximaler Schweregrad zum Zeitpunkt der Studienvisite) (**B**) der in dieser Arbeit untersuchten 36 Patienten im Verlauf der IM. Etwa sechs Monate nach Symptombeginn waren alle, außer einem, der hier analysierten Patienten symptomfrei.



**Abbildung 21: (A) Maximale Anzahl der pathologischen Befunde (Complexity = Cmax, Werte von 1-28) zum Zeitpunkt der Studienvisite (at visit) mit Blutentnahme und (B) des maximalen Schweregrades (Severity = Smax, Werte von 1-5) zum Zeitpunkt der Studienvisite (at visit) mit Blutentnahme der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Patienten (n = 36).**

Patienten, von denen Proben von drei Studienzeitpunkten vorhanden waren und deren Proben keiner Ruhephase über Nacht unterzogen wurden, sind farblich hervorgehoben. Korrelationskoeffizienten wurden für  $x < 50$  Tage nach Spearman berechnet und sind mit den zugehörigen p-Werten in der Grafik angegeben.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben der Patienten mit IM wurden teilweise nach dem Auftauen und vor der durchflusszytometrischen Analyse über Nacht in Standardmedium kultiviert, d.h. einer Ruhephase über Nacht unterzogen, da dies für parallel durchzuführende Analysen der T-Zellspezifität mit spezifischer Antigenstimulation (die in dieser Arbeit nicht gezeigt sind) als notwendig erachtet wurde. Im Folgenden werden zuerst die Auswirkungen solch einer Ruhephase und

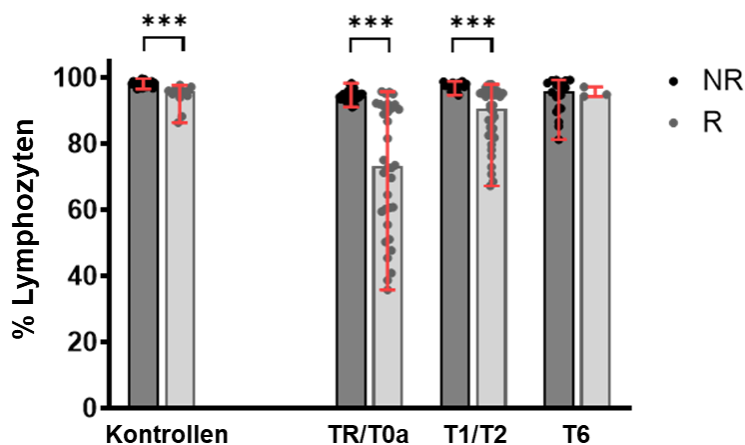
anschließend die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen genauer beschrieben.

#### 4.2.1 Auswirkungen einer Ruhephase über Nacht (*Resting*) auf die Vitalität der Lymphozyten

Um die Auswirkungen einer Ruhephase über Nacht zu analysieren, erfolgte ein Vergleich des durchflusszytometrisch gemessenen Anteils vitaler Lymphozyten in Proben, die einer Ruhephase über Nacht unterzogen wurden, mit dem Anteil vitaler Lymphozyten in Proben ohne Ruhephase über Nacht.

Unterschieden wurde zusätzlich in Proben von gesunden Spendern und Proben von Patienten mit IM, sowie innerhalb der Proben der Patienten mit IM bezüglich der verschiedenen Zeitpunkte im Verlauf der Erkrankung. Diese Unterscheidung wurde durchgeführt, da vermutet wurde, dass im Stadium der akuten IM (TR/T0a) mehr aktivierte Zellen vorliegen, die besonders sensibel und vulnerabel auf eine Ruhephase über Nacht reagieren könnten.

Sowohl für den Zeitpunkt TR/T0a, den Zeitpunkt T1/T2 als auch für die gesunden Kontrollen ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der durchflusszytometrisch bestimmten Vitalität der Lymphozyten mit und ohne Ruhephase über Nacht ( $p < 0,001$  berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test) (**Abbildung 22**). Der Unterschied war im akuten Stadium der IM, zum Zeitpunkt TR/T0a, am stärksten ausgeprägt: Der Median des Anteils vitaler Zellen lag bei den Proben ohne Ruhephase bei 94,5 % [91,1-98,3 %], bei den Proben mit Ruhephase lag der Median bei 73,1 % [35,8-95,8 %]. Analysen zur Expression der Aktivierungsmarker auf Zellen mit und ohne Ruhephase über Nacht zeigten, dass insbesondere die aktivierten Zellen durch eine Ruhephase über Nacht starben (s. 69).



**Abbildung 22: Auswirkungen einer Ruhephase über Nacht auf die Vitalität der Lymphozyten.**

NR = ohne Ruhephase über Nacht; R = mit Ruhephase über Nacht. \*\*\* bedeutet  $p < 0,001$ .

Alle gemessenen Proben wurden auf Lymphozyten und „lebende“ Zellen *ge-gatet*. Die Prozentangaben geben den durchflusszytometrisch bestimmten Anteil an vitalen Lymphozyten wieder. Die Höhe der Balken entspricht dem Median. In Rot ist die Spannweite abgebildet. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. Anzahl der Proben: Gesunde Kontrollen NR  $n=21$ ; Gesunde Kontrollen R  $n=14$ ; TR/T0a NR  $n=34$ , TR/T0a R  $n=34$ ; T1/T2 NR  $n=18$ , T1/T2 R  $n=33$ ; T6 NR  $n=18$ , T6 R  $n=3$ .



#### 4.2.2 Häufigkeit der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen, sowie der CD8+ und CD4+ T-Zellen

Nun wurde die relative Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen und von CD4+ und CD8+ T-Zellen in peripheren Blutzellen im Verlauf der IM an drei Zeitpunkten ermittelt. Die Werte wurden mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Diese Analysen wurden getrennt für Proben mit und ohne eine Ruhephase über Nacht durchgeführt. In **Abbildung 23** ist der Anteil dieser T-Zellpopulationen an den Lymphozyten, in **Abbildung 24** ihr Anteil an den CD3+ T-Zellen gezeigt.

##### 4.2.2.1 Proben ohne Ruhephase

Im Falle der Proben ohne Ruhephase war in der akuten Phase der Erkrankung (TR/T0a) der Anteil der gesamten CD3+ T-Zellen an den Lymphozyten erhöht (Median: 80 %) gegenüber den gesunden Kontrollen (Median: 68 %) (**Abbildung 23A**). Der Anteil der CD8+ T-Zellen an den CD3+ T-Zellen war stark erhöht (Median: 56 %) gegenüber den Kontrollen (Median: 23 %) (**Abbildung 24A**). Dagegen waren CD4+ T-Zellen an TR/T0a erniedrigt (Median: 30 %) gegenüber der Kontrollgruppe (Median: 72 %) (**Abbildung 24A**). Zu den späteren Zeitpunkten nach IM (T1/T2 und T6) bewegten sich diese Anteile wieder in Richtung der Werte bei den gesunden Spendern.

Auch der Anteil aller  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie jeder der hier untersuchten Subgruppen ( $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) an den CD3+ T-Zellen lag zum Zeitpunkt TR/T0a deutlich über dem Niveau der gesunden Kontrollgruppe (Median der Gesamt- $\gamma\delta$ -T-Zellen: 3 %), und der  $\gamma\delta$ -T-Zellanteil stieg von TR/T0a (Median 6 %) über T1/T2 (Median 9 %) nach T6 (Median 10 %) weiter an. Das gleiche galt für jede der drei Subpopulationen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen.

In **Abbildung 25** sind die Verläufe der relativen Häufigkeiten von  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen bei den individuellen IM-Patienten dargestellt. Eine zusätzliche Übersicht über die Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen bezogen auf alle  $\gamma\delta$ -T-Zellen findet sich in **Tabelle 26**.

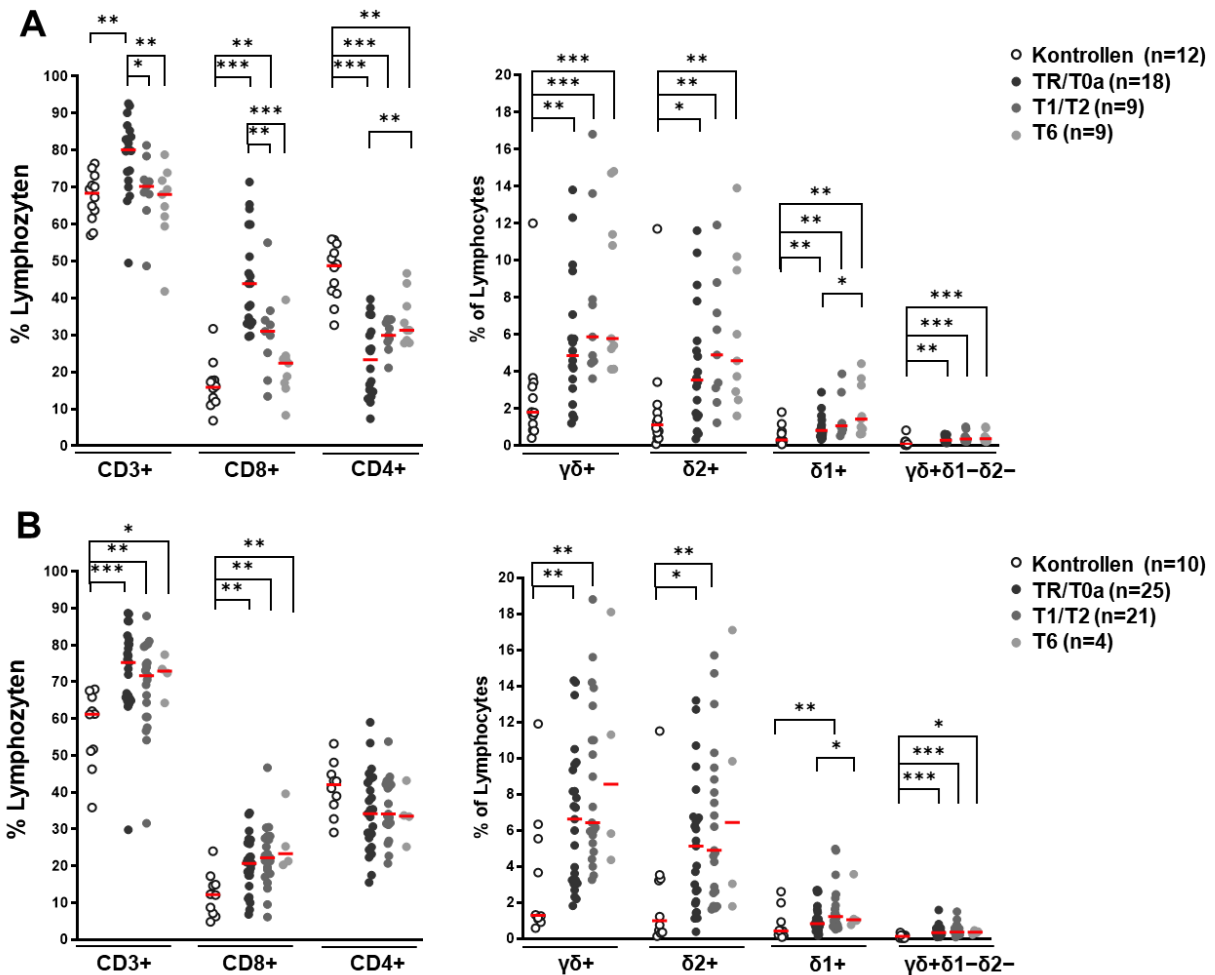
Innerhalb der gesunden Kontrollgruppe wies eine Spenderin (26 Jahre, weiblich, positiver EBV-Status) im Vergleich zur restlichen Kohorte eine deutlich höhere Anzahl an  $\gamma\delta$ -T-Zellen und insbesondere  $\delta 2+$  T-Zellen auf. Dies könnte auf individuelle Unterschiede in der Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und der Subgruppen hindeuten.

##### 4.2.2.2 Proben mit Ruhephase

Im Gegensatz zu den Proben ohne Ruhephase war der Anteil der Gesamt-T-Zellen sowie der CD8+ T-Zellen bei den Proben mit einer Ruhephase zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung (TR/T0a) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nur leicht erhöht (Median der CD8+: 28 % vs. 19 %) und der Anteil der CD4+-T-Zellen leicht erniedrigt (Median 49 % vs. 76 %) (**Abbildung 23B**, **Abbildung 24B**). Ein Trend in Richtung der Werte der gesunden Spender war zu den späteren Zeitpunkten (T1/T2 und T6) nicht zu erkennen, vielmehr blieben die Anteile der CD8+ und CD4+ T-Zellen über alle Zeitpunkte hinweg etwa auf demselben Niveau.

Dagegen war der Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen zum Zeitpunkt TR/T0a etwas stärker erhöht (Median der Gesamt- $\gamma\delta$ -T-Zellen: 8 % an TR/T0a vs. 3 % bei

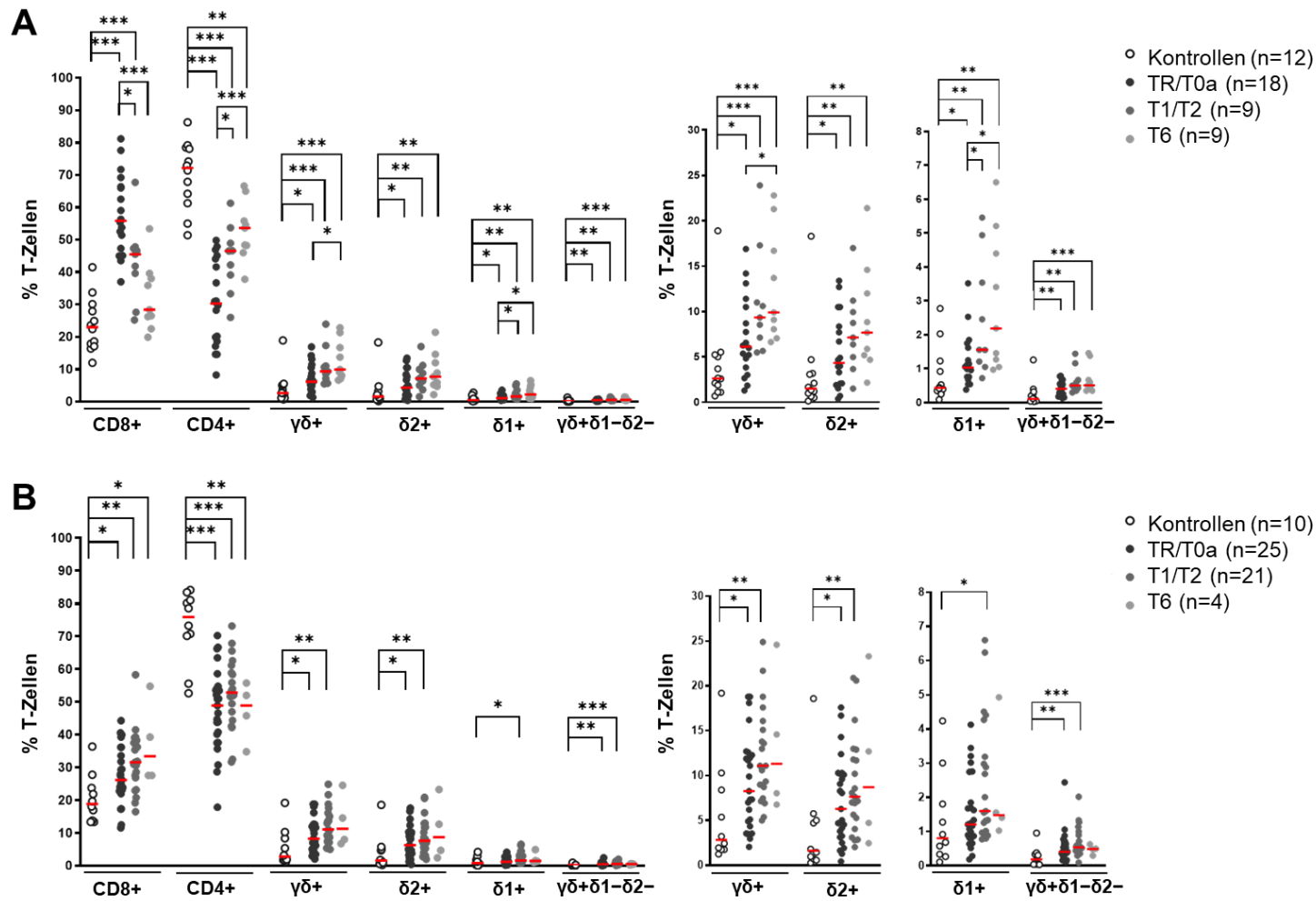
gesunden Spendern) als bei den Proben ohne Ruhephase und zeigte ebenfalls einen Anstieg zum späteren Zeitpunkt (Median der Gesamt- $\gamma\delta$ -T-Zellen an T1/T2: 11 %). Zusammenfassend könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass die IM zu einem anhaltenden Anstieg der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen in der hier untersuchten Kohorte führte.



**Abbildung 23: Häufigkeiten der T-Zellen (CD3+, CD4+ und CD8+) sowie der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen als Anteil der gemessenen Lymphozyten bei IM-Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten (TR/T0a, T1/T2, T6) und bei einer gesunden Kontrollgruppe.**

**A:** Ohne Ruhephase über Nacht. **B:** Mit Ruhephase über Nacht.

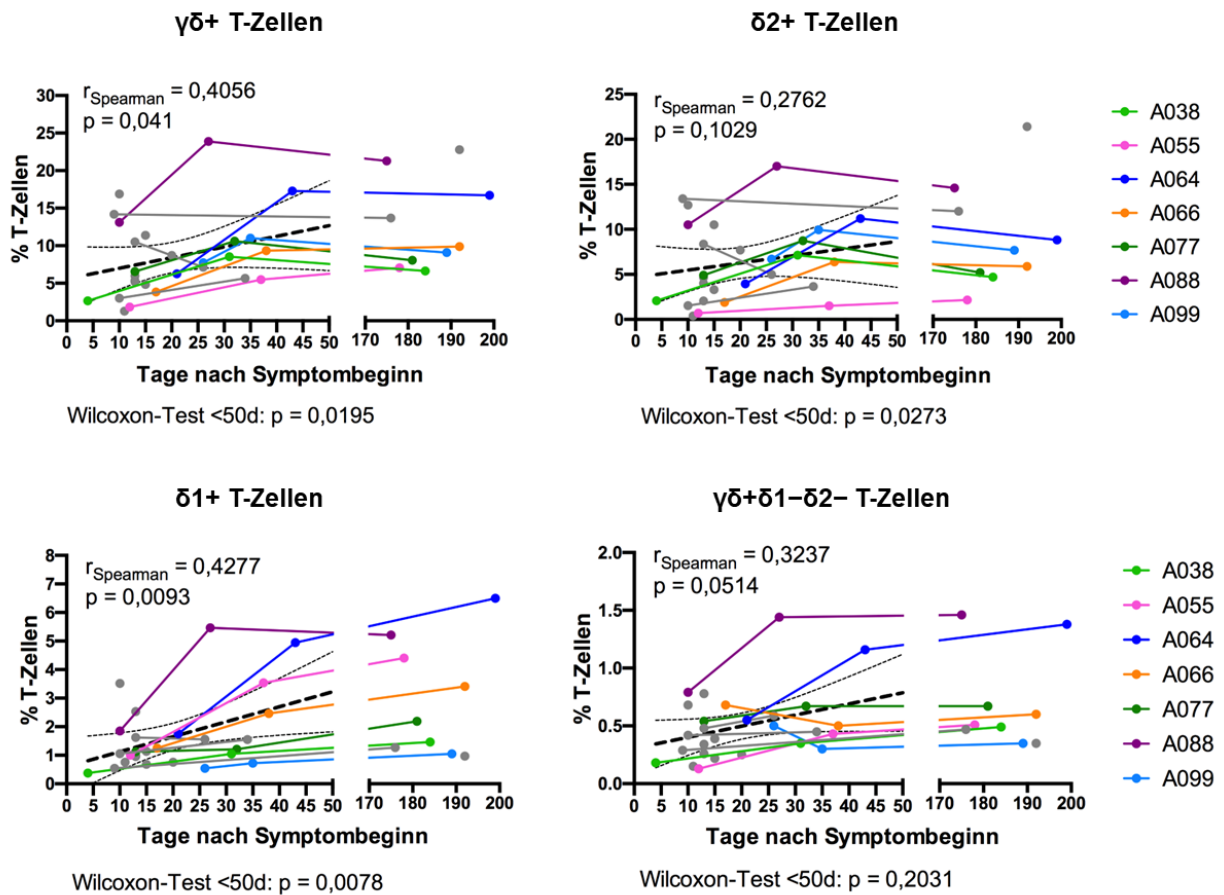
Der Median der einzelnen Zellpopulationen ist als rote Linie eingezeichnet. Signifikante Unterschiede sind symbolisch gekennzeichnet (\* bedeutet  $p < 0,05$ ; \*\* bedeutet  $p < 0,01$ , \*\*\* bedeutet  $p < 0,001$ ) gekennzeichnet. Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. Eine Übersicht über die berechneten p-Werte sowie die Mediane mit Spannweite ist im Anhang in **Tabelle 18**, **Tabelle 19**, **Tabelle 20** und **Tabelle 21** zu finden.



**Abbildung 24: Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen sowie der CD4+ und CD8+ T-Zellen als Anteil der Gesamt-T-Zellen bei IM-Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten (TR/T0a, T1/T2 und T6) und bei einer gesunden Kontrollgruppe (Kontrollen).**

**A:** Ohne Ruhephase über Nacht. **B:** Mit Ruhephase über Nacht.

Der Median ist als rote Linie eingezeichnet. Signifikante Unterschiede sind symbolisch gekennzeichnet (\* bedeutet  $p < 0,05$ ; \*\* bedeutet  $p < 0,01$ , \*\*\* bedeutet  $p < 0,001$ ). Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. Die berechneten p-Werte, sowie die Mediane mit Spannweite sind in **Tabelle 22, Tabelle 23, Tabelle 24 und Tabelle 25** im Anhang aufgelistet.



**Abbildung 25: Verläufe der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen bei den einzelnen Patienten im Verlauf der IM.**

Die hier dargestellten Anteile beziehen sich auf CD3+ T-Zellen. Alle hier dargestellten Proben wurden direkt nach dem Auftauen gefärbt und analysiert (ohne eine Ruhephase über Nacht). IM-Patienten, von denen drei Zeitpunkte verfügbar waren, sind farblich hervorgehoben. Patienten mit einem oder zwei verfügbaren Zeitpunkten sind in grau gezeigt. Die Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman berechnet und sind mit den zugehörigen p-Werten in den Grafiken eingetragen. Für zusätzliche gepaarte Analysen („Anstieg versus Abfall“) innerhalb der ersten 50 Tage wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt. Die jeweiligen Regressionsgeraden (für  $x < 50$  Tage) sind als schwarze gestrichelte Linien mit den entsprechenden Konfidenzintervallen eingezeichnet.

### 4.2.3 Aktivierungsstatus der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen im Vergleich mit CD8+ und CD4+ T-Zellen

Zur Beurteilung der Aktivierung der T-Zellen wurde die Expression der beiden Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR auf den Subgruppen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ( $\delta 2+$ ,  $\delta 1+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) im Vergleich mit CD8+ und CD4+ T-Zellen untersucht.

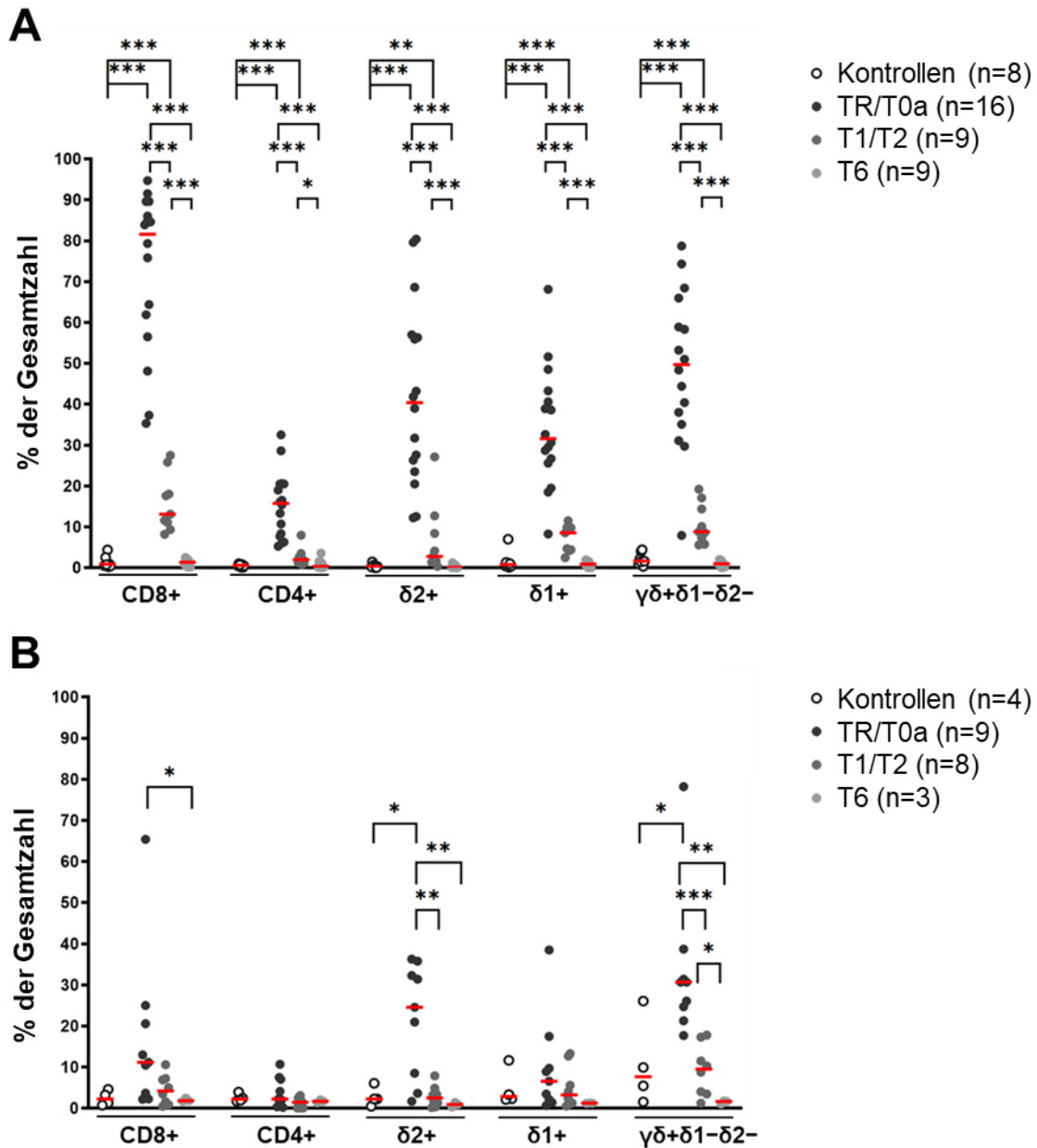
#### 4.2.3.1 Proben ohne Ruhephase

Im Falle der Proben ohne Ruhephase über Nacht waren zum ersten Zeitpunkt (TR/T0a) die  $\delta 2$ -T-Zellen mit einem Median von 40 %, die  $\delta 1+$  T-Zellen mit einem Median von 32 % und die  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen mit einem Median von 50 % doppelt positiv für CD38 und HLA-DR (**Abbildung 26A**).

Alle drei untersuchten  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen wiesen damit in der akuten Phase der Erkrankung eine höhere Koexpression der beiden Aktivierungsmarker auf als die CD4+ T-Zellen (Median: 16 %), jedoch eine niedrigere Koexpression als die CD8+ T-Zellen (Median: 82 %). Bereits zum nächsten beobachteten Zeitpunkt (T1/T2) war der Anteil aktivierter T-Zellen in allen untersuchten T-Zellpopulationen stark gesunken, besonders bei CD4+ und  $\delta 2+$  T-Zellen, während CD8+ T-Zellen,  $\delta 1+$  T-Zellen und  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen noch etwas häufiger Aktivierungsmarker exprimierten. Zum Zeitpunkt T6 lag die Expression der beiden Aktivierungsmarker unter zwei Prozent für die CD8+ T-Zellen und unter einem Prozent für alle weiteren Subgruppen. Die individuelle Expression der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR im Verlauf der Erkrankung der IM-Patienten ist in **Abbildung 27** dargestellt.

#### 4.2.3.2 Proben mit Ruhephase

Im Falle der Proben, die einer Ruhephase über Nacht unterzogen wurden, waren zum Zeitpunkt TR/T0a nur 25 % der  $\delta 2+$  T-Zellen, 7 % der  $\delta 1+$  T-Zellen und 31 % der  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen aktiviert (**Abbildung 26B**). Somit waren in allen drei  $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen weniger aktivierte Zellen nachweisbar als in Proben ohne Ruhephase. Auch bei den CD8+ T-Zellen fiel dieser Effekt stark ins Gewicht: Von diesen exprimierten im Median nur noch 11 % CD38 und HLA-DR (ohne Ruhephase: 82 %). Bei den CD4+ T-Zellen waren im Median 2,3 % aktiviert (ohne Ruhephase: 16 %). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass insbesondere aktivierte T-Zellen während einer Ruhephase über Nacht absterben und von der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse nicht mehr erfasst werden können. Da in dieser Arbeit insbesondere diese aktivierten Zellen von Interesse waren, wurde für weitere Auswertungen der Fokus auf die Analyse der Proben ohne Ruhephase über Nacht gelegt.

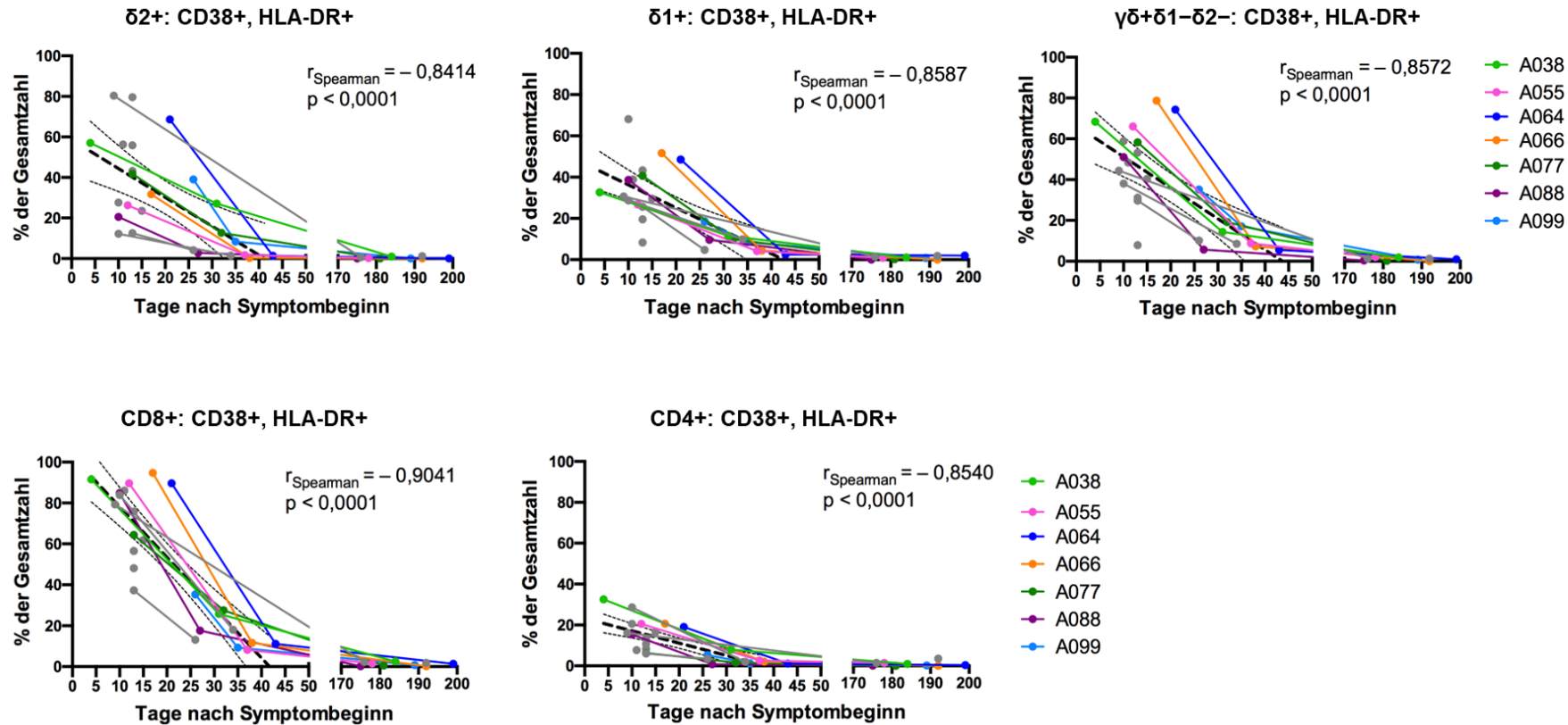


**Abbildung 26: Koexpression der Aktivierungsmarker (CD38 und HLA-DR) auf CD8+ und CD4+ T-Zellen sowie innerhalb der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen ( $\delta 2+$ ,  $\delta 1+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ).**

**A:** Ohne Ruhephase über Nacht. **B:** Nach einer Ruhephase über Nacht.

Der Median ist als rote Linie dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet und signifikante Ergebnisse symbolisch gekennzeichnet (\* bedeutet  $p < 0,05$ ; \*\* bedeutet  $p < 0,01$ , \*\*\* bedeutet  $p < 0,001$ ). Die genauen berechneten p-Werte sowie Mediane mit Spannweite sind in **Tabelle 27**, **Tabelle 28**, **Tabelle 29** und **Tabelle 30** im Anhang aufgelistet

## Ergebnisse



**Abbildung 27: Koexpression der Aktivierungsmarker, CD38 und HLA-DR, im Verlauf der IM auf den  $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen und auf den CD8+ und CD4+ T-Zellen bei den einzelnen IM-Patienten.**

Die hier dargestellten Proben wurden direkt nach dem Auftauen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (ohne Ruhephase über Nacht). Patienten, von denen drei Zeitpunkte verfügbar waren, sind farblich hervorgehoben. Die Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman berechnet und sind zusammen mit den berechneten p-Werten in den Grafiken angegeben. Die Regressionsgeraden sind als gestrichelte schwarze Linien mit den zugehörigen Konfidenzintervallen für alle Datenpunkte unter 50 Tagen eingezeichnet.

#### 4.2.4 Differenzierungsstatus der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen im Vergleich mit CD8+ und CD4+ T-Zellen

Der Differenzierungsstatus der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen sowie der CD8+ und CD4+ T-Zellen wurde anhand der Expression der Marker CD45RA, CCR7, CD27 und CD28<sup>12</sup> beurteilt (**Abbildung 28**).

Innerhalb der  $\delta 2^+$  T-Zellen zeigte sich im Gegensatz zu den anderen untersuchten T-Zellsubgruppen zu allen Zeitpunkten der IM und bei gesunden Spendern eine Dominanz des CD45RA-CCR7- Effektor-/Effektor-Gedächtnis-Phänotyps (**Abbildung 28A**).

Bei den  $\delta 1^+$  T-Zellen,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen und CD8+ T-Zellen traten vorübergehend mehr Zellen mit einem CD45RA-CCR7- sowie einem CD27+CD45RA- Phänotyp zu den frühen Zeitpunkten der IM (TR/T0a und T1/T2) auf. Zellen mit einem CD45RA+CCR7- Phänotyp waren zu diesen frühen Zeitpunkten vermindert (**Abbildung 28A**).

T-Zellen mit einem naiven (CD45RA+CCR7+) oder früh differenzierten (CD27+CD45RA+) Phänotyp waren unter den  $\delta 1^+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ , CD8+ und CD4+ T-Zellen zu allen Zeitpunkten der IM und bei gesunden Spendern häufiger als unter den  $\delta 2^+$  T-Zellen.

Bei der Analyse der CD27/CD28-Expression waren die Unterschiede zwischen der akuten IM und späteren Zeitpunkten innerhalb der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen gering (**Abbildung 28C**).

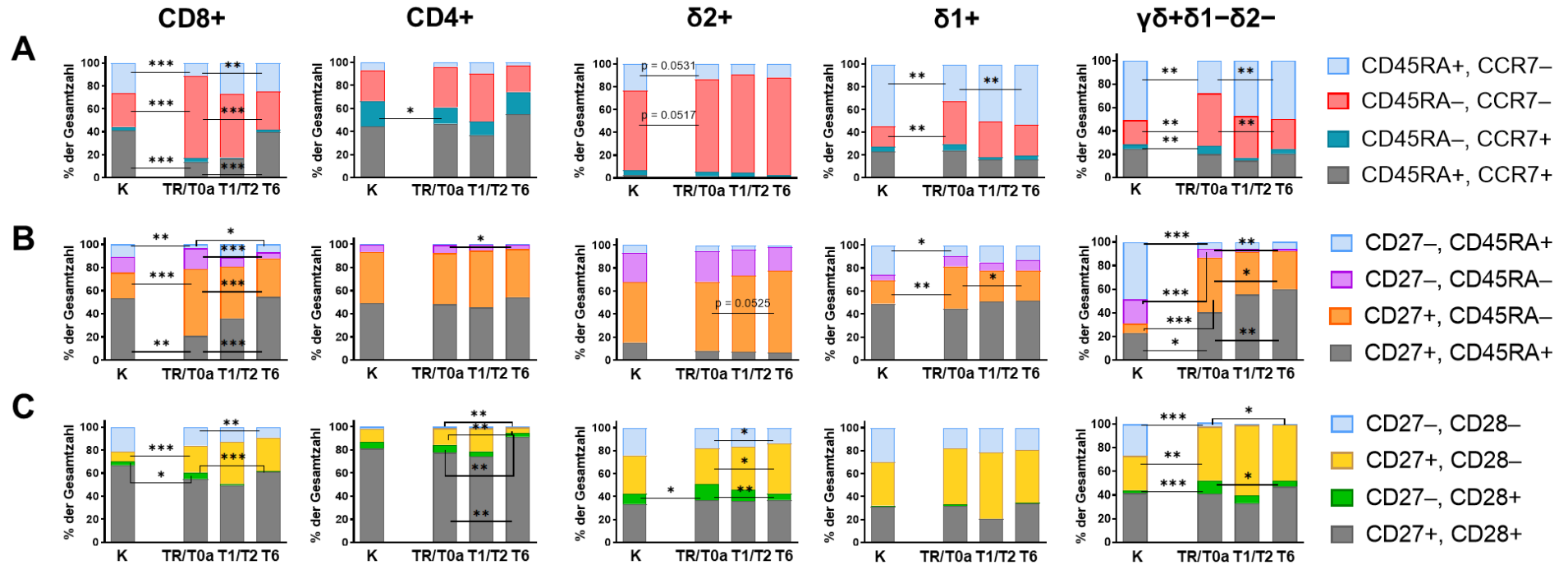
Im Allgemeinen zeigten  $\delta 1^+$  und  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen ein ähnliches Differenzierungsmuster (**Abbildung 28A-C**), das durch einen höheren Anteil sowohl naiver als auch terminal-differenzierter Untergruppen (CD45RA+ mit oder ohne CD27 bzw. CCR7) gekennzeichnet war. Im Gegensatz dazu wurden die  $\delta 2^+$  T-Zellen von intermediären Untergruppen dominiert (CD45RA-CD27+ und CD45RA-CCR7-).

Im Verlauf der IM (von TR/T0a bis T6) sowie im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe wurden einige signifikante Veränderungen im Differenzierungsstatus der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen beobachtet. Die Effektgröße dieser Veränderungen war jedoch meist begrenzt und es ergab sich aus diesen Analysen kein auffälliges Muster.

---

<sup>12</sup> Anhand der Expression von CD45RA und CCR7 werden T-Zellen in naive (CD45RA+, CCR7+), zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA-, CCR7+), Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA-, CCR7-) und terminal differenzierte T-Zellen (CD45RA+, CCR7-) unterschieden (Sallusto et al., 2004; Appay et al., 2008). T-Zellen, die CD27 und CD28 exprimieren gelten als früh differenziert, während T-Zellen, denen diese Oberflächenmoleküle fehlen, als spät differenziert angesehen werden (Tomiya et al., 2002) (s. 1.2.1).





**Abbildung 28: Expression der Differenzierungsmarker auf  $\delta 2+$ ,  $\delta 1+$  und  $\gamma\delta+ \delta 1- \delta 2-$  T-Zellen im Vergleich mit  $CD8+$  und  $CD4+$  T-Zellen.**

**A:** Expression von CD45RA und CCR7. **B:** Expression von CD27 und CD45RA. **C:** Expression von CD27 und CD28.

K= gesunde Kontrollen, n=12; TR/T0a: n=18; T1/T2: n=9; T6: n=9.

Die abgebildete Analyse wurde nur für Proben ohne Ruhephase über Nacht durchgeführt. P-Werte wurden für die gesunden Kontrollen versus TR/T0a und für TR/T0a versus T6 mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet und signifikante Ergebnisse symbolisch gekennzeichnet (\* bedeutet  $p < 0,05$ ; \*\* bedeutet  $p < 0,01$ , \*\*\* bedeutet  $p < 0,001$ ). Die genauen berechneten p-Werte sind in **Tabelle 31** im Anhang aufgelistet.

#### 4.2.5 Expression der funktionellen Marker CD16 und CX3CR1 auf den $\gamma\delta$ -Zellsubgruppen

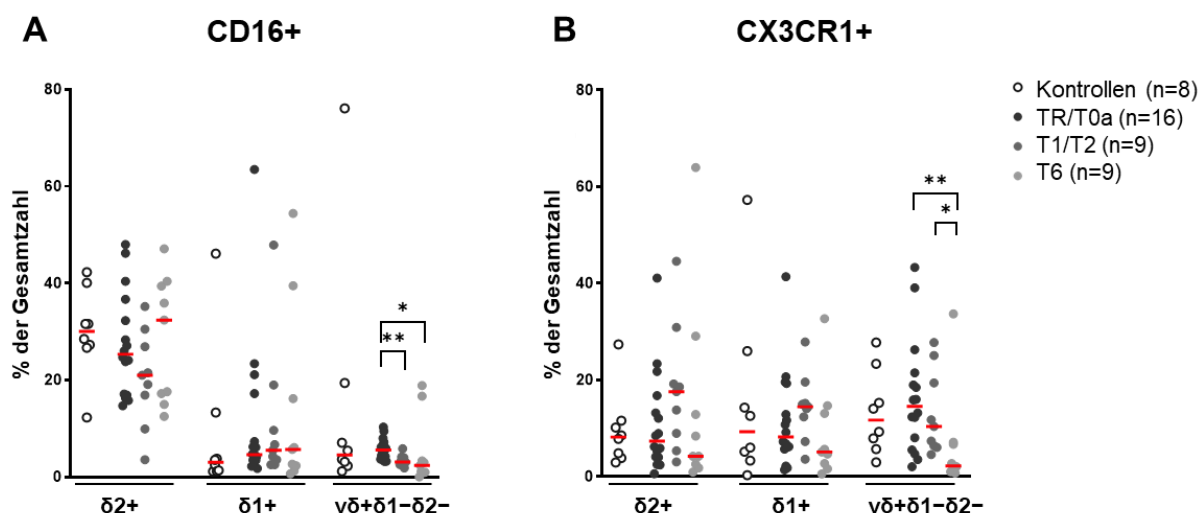
Zur weiteren Klärung der funktionellen Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen wurde die Expression von CX3CR1 als Marker für eine potenzielle zytotoxische Funktion und CD16 (Fc $\gamma$ RIII) als Marker für eine Beteiligung an der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) analysiert.

Im Median wiesen 21-32 % der  $\delta 2+$  T-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach IM sowie bei den gesunden Spendern eine Expression von CD16 auf. Hierbei zeigte sich kein Trend in der Expression dieses Markers zu einem bestimmten Zeitpunkt nach IM (**Abbildung 29A**). Im Gegensatz dazu waren im Median nur 5-6 % der  $\delta 1+$  T-Zellen und 2-6 % der  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen zu allen Zeitpunkten nach IM und bei den gesunden Kontrollen positiv für CD16. Innerhalb der  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen fiel eine statistisch signifikante Abnahme der CD16+ Zellen von TR/T0a nach T1/T2 und T6 auf (5,5 % an TR/T0a; 3,1 % an T1/T2 und 2,4 % an T6;  $p=0,002$  für TR/T0a vs. T1/T2 und  $p=0,03$  für TR/T0a vs. T6).

Innerhalb der  $\delta 1+$  T-Zellen zeigten einige Spender sowohl unter den IM-Patienten als auch unter den gesunden Kontrollen einen auffallend hohen Anteil von CD16+ Zellen, der ein Mehrfaches des Medians betrug. Die Patientin IM-EP-A055 (16 Jahre) stach dabei besonders hervor: Sie hatte zu jedem der drei Zeitpunkte den höchsten CD16+ Anteil an den  $\delta 1+$  T-Zellen aller Patienten (64 % zur TR/T0a, 48 % zu T1/T2 und 55 % zu T6). Zudem wies diese Patientin auch die höchsten Werte für Leberenzyme aller in dieser Arbeit untersuchten Patienten zu TR/T0a auf (**Abbildung 30**). Es bleibt zu klären, ob diese beiden Beobachtungen zusammenhängen könnten.

CX3CR1 wurde von 7-15 % der  $\gamma\delta$ -Zellsubgruppen zu dem Zeitpunkt TR/T0a und bei gesunden Spendern exprimiert (**Abbildung 29B**). Eine leichte, jedoch nicht statistisch signifikante Zunahme der CX3CR1+ Zellen zeigte sich für die  $\delta 2+$  und  $\delta 1+$  T-Zellen zum Zeitpunkt T1/T2 (15-18 %) gegenüber dem früheren und späteren Zeitpunkt nach IM. Zum Zeitpunkt T6 war die mediane Expression auf den  $\gamma\delta$ -Zellsubgruppen insgesamt reduziert (2-5 %). Für die Untergruppe der  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen war die Abnahme von TR/T0a nach T6 statistisch signifikant (14,6 % auf 2,2 %;  $p=0,006$ ).

Insgesamt wurde in der eigenen Arbeit bei den  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen eine Abnahme von Markern, die mit zytotoxischen Funktionen in Verbindung gebracht werden, von der akuten Phase der IM zu späteren Zeitpunkten beobachtet.



**Abbildung 29: Expression der Oberflächenmoleküle CD16 (A) und CX3CR1 (B) auf den  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen bei IM-Patienten und gesunden Kontrollen.**

Der Median ist als rote Linie dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet und sind symbolisch gekennzeichnet (\* bedeutet  $p < 0.05$ ; \*\* bedeutet  $p < 0.01$ , \*\*\* bedeutet  $p < 0.001$ ). Die hier dargestellten Analysen wurden ausschließlich für Proben ohne Ruhephase über Nacht durchgeführt. Genaue Angaben zu den p-Werten sowie zu Medianen mit Spannweite sind in **Tabelle 32**, **Tabelle 33** und **Tabelle 34** im Anhang aufgelistet.

### 4.3 Korrelation der Häufigkeit und Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen sowie der CD8+ und CD4+ T-Zellen mit ausgewählten klinischen Parametern

In abschließenden Analysen wurden die zuvor gewonnenen durchflusszytometrischen Daten (insbesondere die Häufigkeit und die Aktivierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen) in Bezug zu ausgewählten, im Rahmen der IMMUC-Studie erhobenen, klinischen und laborchemischen Parametern gesetzt. Das Ziel hierbei war, die Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer IM näher zu charakterisieren. Aufgrund der geringeren Aussagekraft der Ergebnisse, die nach einer Ruhephase der aufgetauten PBMCs über Nacht gewonnen wurden, wurden für die folgenden Analysen nur Ergebnisse von Proben ohne eine solche Ruhephase verwendet.

Korreliert wurden die klinischen Gesamtscores Cmax Total (maximale Anzahl an pathologischen Befunden über alle Zeitpunkte hinweg), Smax Total (maximaler Schweregrad über alle Zeitpunkte hinweg) und Pmax (maximale Protraktion) mit dem Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen an CD3+ T-Zellen zu den drei untersuchten Zeitpunkten (**Abbildung 31**, **Abbildung 32** und **Abbildung 33** im Anhang). Bei diesen Analysen wurden keine statistisch signifikanten Zusammenhänge beobachtet. Es zeigte sich lediglich ein leichter Trend einer inversen Korrelation des Anteils der  $\delta 2+$  T-Zellen (an CD3+ T-Zellen) zum Zeitpunkt TR/T0a mit Cmax Total und Cmax at visit (**Abbildung 31**, **Tabelle 14**).

Des Weiteren wurde eine explorative Suche nach Zusammenhängen zwischen dem Anteil (% von CD3+) und der Aktivierung der T-Zellsubgruppen (CD8+, CD4+ T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen) zum Zeitpunkt TR/T0a mit dem Alter der Patienten und weiteren ausgewählten klinischen und laborchemischen Parametern zum selben

Untersuchungszeitpunkt, die im Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion stehen, durchgeführt (**Tabelle 14, Tabelle 15**).

Ohne Korrektur für multiples Testen ergab sich ein negativer signifikanter Zusammenhang für die Häufigkeit der  $\delta 1+$  T-Zellen (% von CD3+) an TR/T0a mit dem Blutspiegel des Leberenzym GPT (U/l) zum selben Zeitpunkt ( $p= 0,022$ ). Des Weiteren wurden drei positive signifikante Zusammenhänge für die Häufigkeit der aktivierten (CD38 und HLA-DR exprimierenden) CD8+ T-Zellen (% von CD3+) an TR/T0a mit dem klinischen Score *Cmax at visit* ( $p= 0,035$ ), der Körpertemperatur (gemessen in °C) ( $p= 0,045$ ) und dem Serumferritinspiegel (gemessen in ng/ml) ( $p= 0,023$ ) zum selben Zeitpunkt beobachtet. Nach Bonferroni-Korrektur ( $n= 45$  Tests) waren diese Zusammenhänge jedoch nicht signifikant (**Tabelle 14, Tabelle 15**).

Nach Korrektur für multiples Testen blieben nur noch zwei Zusammenhänge hoch signifikant: Die inverse Korrelation der Häufigkeit (% von CD3+) der  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen an TR/T0a mit den Blutwerten der Leberenzyme GOT (U/l) ( $p= 0,01$  nach Bonferroni-Korrektur) und GPT (U/l) ( $p= 0,00068$  nach Bonferroni-Korrektur). Der Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen und jedem der Leberenzyme wird durch eine Exponentialfunktion gut modelliert (**Abbildung 30**). Dieser unerwartete Befund könnte auf eine spezifische Rolle von  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen beim Schutz vor entzündlichen Leberschäden im Kontext einer IM hindeuten.

## Ergebnisse

**Tabelle 14: Korrelation der Häufigkeiten der CD8+ und CD4+ T-Zellen und der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen ( $\delta 2+$ ,  $\delta 1+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) an TR/T0a mit ausgewählten klinischen Parametern zum selben Zeitpunkt.**

Die Häufigkeit der einzelnen Subgruppen wurde auf die CD3+ T-Zellen bezogen. P-Werte, die nahe oder unter 0,05 liegen sind farblich hervorgehoben. P-Werte, die auch nach Bonferroni-Korrektur (x45 bei 45 Tests) noch signifikant sind, wurden rot markiert. Stichprobengröße n = 18.

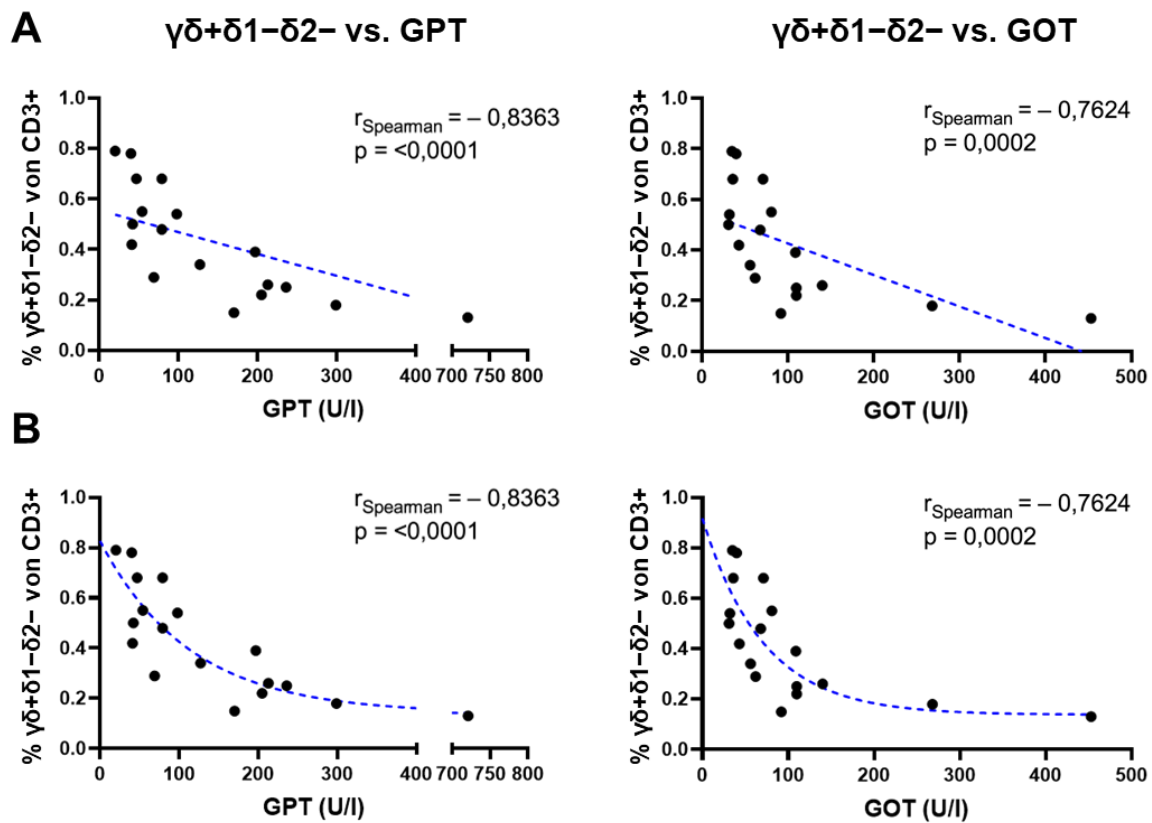
% CD3+		Alter	Cmax at visit	Smax at visit	Körpertemperatur (°C)	CRP (mg/dl)	Ferritin (ng/ml)	Kreatinin (mg/dl)	GPT (U/l)	GOT (U/l)
CD8+	r (Spearman)	0,014	0,22	0,058	0,35	0,27	0,31	0,085	-0,053	0,071
	95% CI	-0,47 bis 0,49	-0,29 bis 0,63	-0,43 bis 0,52	-0,26 bis 0,77	-0,24 bis 0,66	-0,19 bis 0,69	-0,41 bis 0,54	-0,52 bis 0,44	-0,42 bis 0,53
	P (two-tailed)	<b>0,95</b>	<b>0,39</b>	<b>0,82</b>	<b>0,23</b>	<b>0,28</b>	<b>0,20</b>	<b>0,74</b>	<b>0,84</b>	<b>0,78</b>
CD4+	r (Spearman)	-0,11	-0,24	-0,16	-0,35	-0,23	-0,23	-0,16	0,082	-0,070
	95% CI	-0,56 bis 0,39	-0,65 bis 0,27	-0,59 bis 0,35	-0,76 bis 0,27	-0,64 bis 0,28	-0,64 bis 0,28	-0,59 bis 0,34	-0,41 bis 0,54	-0,53 bis 0,42
	P (two-tailed)	<b>0,66</b>	<b>0,33</b>	<b>0,53</b>	<b>0,23</b>	<b>0,37</b>	<b>0,36</b>	<b>0,52</b>	<b>0,75</b>	<b>0,78</b>
$\delta 2+$	r (Spearman)	0,057	-0,46	-0,22	-0,35	-0,26	-0,40	-0,18	-0,23	-0,18
	95% CI	-0,43 bis 0,52	-0,77 bis 0,021	-0,63 bis 0,29	-0,76 bis 0,27	-0,66 bis 0,25	-0,74 bis 0,093	-0,61 bis 0,32	-0,64 bis 0,28	-0,61 bis 0,32
	P (two-tailed)	<b>0,82</b>	<b>0,054</b>	<b>0,37</b>	<b>0,24</b>	<b>0,30</b>	<b>0,097</b>	<b>0,47</b>	<b>0,37</b>	<b>0,47</b>
$\delta 1+$	r (Spearman)	-0,31	-0,13	-0,03	0,11	0,017	-0,32	-0,30	-0,54	-0,33
	95% CI	-0,69 bis 0,19	-0,57 bis 0,37	-0,50 bis 0,45	-0,48 bis 0,63	-0,47 bis 0,49	-0,67 bis 0,18	-0,68 bis 0,21	-0,81 bis -0,078	-0,70 bis 0,18
	P (two-tailed)	<b>0,21</b>	<b>0,62</b>	<b>0,89</b>	<b>0,72</b>	<b>0,95</b>	<b>0,19</b>	<b>0,23</b>	<b>0,022</b>	<b>0,19</b>
$\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$	r (Spearman)	-0,11	-0,35	-0,23	-0,012	0,11	-0,45	-0,16	-0,84	-0,76
	95% CI	-0,56 bis 0,39	-0,71 bis 0,15	-0,63 bis 0,29	-0,57 bis 0,55	-0,39 bis 0,56	-0,76 bis 0,039	-0,59 bis 0,34	-0,94 bis -0,60	-0,91 bis -0,45
	P (two-tailed)	<b>0,65</b>	<b>0,15</b>	<b>0,39</b>	<b>0,97</b>	<b>0,67</b>	<b>0,062</b>	<b>0,52</b>	<b>0,000015</b>	<b>0,00023</b>

## Ergebnisse

**Tabelle 15: Korrelation der Aktivierung der CD8+ und CD4+ T-Zellen und der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen ( $\delta 2+$ ,  $\delta 1+$ ,  $\gamma\delta 1-\delta 2-$ ) an TR/T0a mit ausgewählten klinischen Parametern zum selben Zeitpunkt.**

Die Aktivierung der T-Zellen wurde anhand der Ko-Expression der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR bestimmt. P-Werte, die nahe oder unter 0,05 liegen sind farblich hervorgehoben. Stichprobengröße n = 16.

% CD3+		Alter	Cmax at visit	Smax at visit	Körpertemperatur (°C)	CRP (mg/dl)	Ferritin (ng/ml)	Kreatinin (mg/dl)	GPT (U/l)	GOT (U/l)
CD8+ CD38+ HLA-DR+	r (Spearman)	0,040	0,53	0,32	0,57	0,49	0,57	0,17	0,23	0,34
	95% CI	-0,48 bis 0,54	0,029 bis 0,82	-0,22 bis 0,71	-0,0069 bis 0,86	-0,029 bis 0,80	0,089 bis 0,84	-0,37 bis 0,62	-0,31 bis 0,66	-0,20 bis 0,72
	P (two-tailed)	<b>0,88</b>	<b>0,035</b>	<b>0,22</b>	<b>0,045</b>	<b>0,058</b>	<b>0,023</b>	<b>0,52</b>	<b>0,38</b>	<b>0,20</b>
CD4+ CD38+ HLA-DR+	r (Spearman)	-0,38	0,17	0,22	0,47	0,34	0,41	-0,22	0,073	0,39
	95% CI	-0,75 bis 0,16	-0,37 bis 0,62	-0,33 bis 0,65	-0,13 bis 0,82	-0,21 bis 0,72	-0,13 bis 0,76	-0,66 bis 0,32	-0,45 bis 0,56	-0,15 bis 0,75
	P (two-tailed)	<b>0,14</b>	<b>0,53</b>	<b>0,42</b>	<b>0,11</b>	<b>0,20</b>	<b>0,12</b>	<b>0,40</b>	<b>0,79</b>	<b>0,14</b>
$\delta 2+$ CD38+ HLA-DR+	r (Spearman)	0,35	0,26	0,16	-0,019	0,16	0,25	0,40	0,25	0,16
	95% CI	-0,20 bis 0,73	-0,29 bis 0,67	-0,38 bis 0,62	-0,58 bis 0,55	-0,38 bis 0,62	-0,30 bis 0,67	-0,13 bis 0,76	-0,30 bis 0,67	-0,38 bis 0,61
	P (two-tailed)	<b>0,19</b>	<b>0,34</b>	<b>0,55</b>	<b>0,95</b>	<b>0,56</b>	<b>0,36</b>	<b>0,12</b>	<b>0,35</b>	<b>0,56</b>
$\delta 1+$ CD38+ HLA-DR+	r (Spearman)	0,26	0,35	0,29	0,25	0,43	0,31	0,17	0,019	-0,041
	95% CI	-0,28 bis 0,68	-0,19 bis 0,70	-0,25 bis 0,70	-0,37 bis 0,71	-0,10 bis 0,77	-0,23 bis 0,71	-0,37 bis 0,63	-0,49 bis 0,52	-0,54 bis 0,48
	P (two-tailed)	<b>0,32</b>	<b>0,18</b>	<b>0,27</b>	<b>0,42</b>	<b>0,098</b>	<b>0,24</b>	<b>0,51</b>	<b>0,95</b>	<b>0,88</b>
$\gamma\delta 1-\delta 2-$ CD38+ HLA-DR+	r (Spearman)	0,33	0,47	0,31	0,40	0,41	0,39	0,33	0,27	0,17
	95% CI	-0,22 bis 0,72	-0,04 bis 0,79	-0,04 bis 0,79	-0,22 bis 0,78	-0,12 bis 0,76	-0,15 bis 0,75	-0,21 bis 0,72	-0,27 bis 0,68	-0,37 bis 0,63
	P (two-tailed)	<b>0,21</b>	<b>0,063</b>	<b>0,23</b>	<b>0,18</b>	<b>0,11</b>	<b>0,14</b>	<b>0,21</b>	<b>0,31</b>	<b>0,52</b>



**Abbildung 30:** Korrelation der  $\gamma\delta+\delta1-\delta2-$  T-Zellen (% CD3+) an TR/T0a mit dem Serumspiegel der Leberenzyme GPT und GOT zu demselben Zeitpunkt. Stichprobengröße  $n=18$ .

**A:** Darstellung der Korrelation als Regressionsgerade ( $R^2$  für GPT = 0,44;  $R^2$  für GOT = 0,37).

**B:** Darstellung der Korrelation als Exponentialfunktion ( $R^2$  für GPT = 0,70;  $R^2$  für GOT = 0,57).

Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) wurden nach Spearman berechnet und mit den zugehörigen  $p$ -Werten in die Grafiken eingetragen.

## 5 Diskussion

Durch ihre vielfältigen Eigenschaften tragen  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowohl zur angeborenen als auch adaptiven Immunantwort bei. Sie sind unter anderem an der Reaktion auf verschiedene Pathogene, an der Kontrolle von zellulären und tumorösen Veränderungen sowie an der Homöostase des Immunsystems beteiligt (M. Ho et al., 1990; Kabelitz et al., 1990; Groh et al., 1998; Dechanet et al., 1999; Bonneville et al., 2010; Vantourout & Hayday, 2013; Silva-Santos et al., 2015).

Eine Proliferation von  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde im Zusammenhang mit diversen Pathogenen wie Plasmodium falciparum, Mycobacterium tuberculosis, Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) und CMV beobachtet (M. Ho et al., 1990; Kabelitz et al., 1990; Goerlich et al., 1991; De Maria et al., 1992; Dechanet et al., 1999; Poccia et al., 2005). Einige Studien deuten auch auf eine Rolle von  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext der EBV-Infektion und IM hin (De Paoli et al., 1990; Hassan et al., 1991; Hacker et al., 1992; Bhaduri-McIntosh et al., 2008; Macsween et al., 2010; Xiang et al., 2014; Djaoud et al., 2017; Munz, 2017). Es konnte jedoch bisher nicht geklärt werden, welche protektive oder pathogene Rolle sie hierbei einnehmen.

Um zur Klärung offener Fragen im Kontext der IM beizutragen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei multiparametrische *Panel* zur durchflusszytometrischen Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen ( $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) entwickelt. Beide *Panel* wurden zur Untersuchung der Häufigkeit und des Phänotyps der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen im Kontext einer EBV-Infektion bei einer pädiatrischen Kohorte zu verschiedenen Zeitpunkten nach IM und einer gesunden Kontrollgruppe angewandt. Besonders auffällige Beobachtungen dieser Analysen wurden im Anschluss in Bezug zu ausgewählten klinischen und laborchemischen Parametern gesetzt, die im Rahmen der IMMUC-Studie erhoben wurden.

### 5.1 Diskussion der Methodik

Im Folgenden werden zuerst methodische Vorgehensweisen in diesem Projekt diskutiert und dabei auf die Entwicklung einer *Multicolor*-Färbung zur Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die Auswahl geeigneter Antikörper, sowie auf die Auswirkungen unterschiedlicher Vorbehandlung der Zellen (Ruhephase über Nacht) näher eingegangen. Im Anschluss werden die durchflusszytometrisch gewonnenen Daten in Bezug zu Ergebnissen aus der Literatur gesetzt.

#### 5.1.1 Durchflusszytometrische Analysen humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen

Da die Durchflusszytometrie eine geeignete Methode darstellt, um Zellen zu phänotypisieren (Maecker et al., 2012; Finak et al., 2016), wurden in dieser Arbeit zwei multiparametrische *Panel* zur durchflusszytometrischen Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer IM entwickelt.

Die Methode der Durchflusszytometrie zur Charakterisierung humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde von anderen Arbeitsgruppen sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten angewandt und multiparametrische *Panels* hierfür etabliert (Kabelitz et al., 1990; Dechanet et al., 1999; De Rosa et al., 2001; Wistuba-Hamprecht



et al., 2014; Liechti et al., 2019; Beucke et al., 2020; Hertoghs et al., 2020; Sahir et al., 2020; Barros-Martins et al., 2022).

In einer dieser Studien wurde festgestellt, dass bestimmte handelsübliche pan- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper für die Verwendung in einem *Multicolorpanel* ungeeignet schienen, da ihre Färbeintensität durch die gleichzeitige Färbung mit anti- $\delta 2$ -TCR-Antikörpern beeinträchtigt wurde (Wistuba-Hamprecht et al., 2014). Es wurde angenommen, dass die Ursache für die beeinträchtigte Färbung in der direkten Konjugation mit Fluoreszenzfarbstoffen lag, und die Verwendung eines unkonjugierten Antikörpers (anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper Klon 11F2) in Kombination mit einem sekundären Antikörper empfohlen. Das daraus resultierende mehrschrittige Färbeprotokoll, das eine erste Färbung mit dem unkonjugierten Antikörper, eine zweite Färbung mit dem sekundären Antikörper und schließlich die Färbung mit allen anderen Antikörpern vorsieht, wurde als Referenzverfahren (OMIP, *Optimized Multicolor Immunofluorescence Panel*) vorgeschlagen (Wistuba-Hamprecht et al., 2014).

In einer späteren Veröffentlichung, die sich ebenfalls mit den Problemen der durchflusszytometrischen Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen auseinandersetzte, wurde erneut von der Verwendung direkt konjugierter anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper abgeraten und die Verwendung eines biotinylierten anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpers mit sekundärer Streptavidin-PE-Färbung empfohlen (Beucke et al., 2020). In beiden zuvor beschriebenen Studien wurde jedoch eine mögliche direkte, gegenseitige Beeinflussung von Antikörpern, die gegen ähnliche Zielstrukturen gerichtet sind, nicht als alternative Erklärung für die suboptimale Färbung in Betracht gezogen. In früheren Studien, die sich mit der Durchflusszytometrie von humanen  $\gamma\delta$ -T-Zellen befassten, wurde die Kombination von Antikörpern gegen den  $\gamma\delta$ -TCR und seine Unterformen in einem gemeinsamen *Panel* häufig vermieden, zum Teil weil solche Probleme in Betracht gezogen wurden (Dechanet et al., 1999; De Rosa et al., 2001; Kenna et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde die Färbung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine direkte Konkurrenz zwischen dem anti- $\gamma\delta$ -TCR- und dem anti-V $\delta 2$ -TCR-Antikörper existierte, diese unabhängig vom konjugierten Fluoreszenzfarbstoff war und durch Vorinkubation mit einem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper und anschließende Hinzugabe der weiteren Antikörper (einschließlich des anti-V $\delta 2$ -TCR-Antikörpers) überwunden werden konnte. Auf diese Weise wurde die Verwendung eines unkonjugierten Antikörpers sowie das mehrschrittige Färbeprotokoll entbehrlich, und die *Multicolor*-Färbung erleichtert. Ein solches Vorgehen dürfte von Vorteil für zukünftige standardisierte Referenzprotokolle für das Immunmonitoring der  $\gamma\delta$ -T-Zellen sein.

### 5.1.2 Antikörper zur Charakterisierung und Phänotypisierung humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen

Um  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Subgruppen durchflusszytometrisch untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit die Färbereigenschaften verschiedener Antikörper und Klone zur Charakterisierung und Phänotypisierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen evaluiert und unterschiedliche Kombinationen von Fluoreszenzfarbstoffen getestet. Bei der Auswahl

der Antikörper, Klone und Fluorochrome orientierte ich mich an bereits publizierten *Panels* zur durchflusszytometrischen Analyse von T-Zellen, insbesondere  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Angelini et al., 2004; Maecker et al., 2012; Wistuba-Hamprecht et al., 2014; Böttcher et al., 2015; Finak et al., 2016).

Zur Bestimmung der Gesamtgruppe der  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden zwei verschiedene Klone des anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpers, der Klon B1 und der Klon 11F2, verglichen. Diese beiden Klone wurden bereits in der zuvor erwähnten Studie von Wistuba et al. miteinander verglichen und von der Verwendung des Klons B1 abgeraten, da dieser bei gleichzeitiger Verwendung eines anti-CD3-Antikörpers in derselben Färbung weniger T-Zellen färben und als  $\gamma\delta^+$  erkennen würde (Wistuba-Hamprecht et al., 2014). Stattdessen wurde die Verwendung des Klons 11F2 empfohlen (Wistuba-Hamprecht et al., 2014). In meinen Analysen erkannten dagegen beide Klone bei Vorinkubation mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper etwa gleich viele T-Zellen als  $\gamma\delta^+$ . Dies könnte darauf zurückgehen, dass durch Vorinkubation mit dem Antikörper-Klon B1 etwaige Interferenzen mit dem anti-CD3-Antikörper überwunden werden konnten.

Zur Identifizierung von  $\delta 2^+$  T-Zellen wurden in dieser Arbeit der murine Klon B6 von BioLegend und der humane Klon REA771 von Miltenyi miteinander verglichen. Eine andere Studie, die sich mit den Färbereigenschaften von Antikörpern gegen den anti- $\gamma\delta$ -TCR und seine Unterformen befasste, verglich den Klon B6 mit einem weiteren murinen Klon, dem Klon 123R3, und riet bei gleichzeitiger Verwendung mit einem direkt konjugierten anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper aufgrund geringerer Interferenzen zur Verwendung des Klons 123R3 (Beucke et al., 2020).

In den eigenen Analysen gelang sowohl unter Verwendung des Klons B6 als auch des Klons REA771 bei Vorinkubation mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper eine ungestörte Färbung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Bei Verwendung des Klons B6 zeigte sich jedoch teilweise eine Aufspaltung der  $\delta 2^+$  T-Zellen in zwei Subpopulationen unterschiedlicher Färbeintensität, während bei Verwendung des Klons REA771 nur eine homogene Population erkennbar war. Solch eine Aufspaltung der  $\delta 2^+$  T-Zellen zeigte sich auch in einzelnen Färbungen bei Wistuba et al. (Wistuba-Hamprecht et al., 2014).

Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die Subgruppe der  $\delta 2^+$  T-Zellen heterogen ist und, dass die unterschiedlichen Subpopulationen unterschiedlich stark von bestimmten Klonen gebunden wurden. Eine Heterogenität der  $\delta 2^+$  T-Zellen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Davey et al., 2018). Allerdings scheint nichts darüber bekannt zu sein, ob und wie sich, die mit Klon B6 manchmal unterscheidbaren Subpopulationen hinsichtlich TCR-Gebrauch, Funktion oder Spezifität unterscheiden. Daher wurde für die hier durchzuführenden Analysen dem Klon REA771 letztlich der Vorzug gegeben, um zu einem einfachen und klaren Färbesbild zu gelangen.

Zur Charakterisierung der  $\delta 1^+$  T-Zellen wurde der murine Klon TS8.2 von Thermo Fisher Scientific mit dem humanen Klon REA173 von Miltenyi jeweils in Kombination mit FITC verglichen und eine klarere Trennung der  $\delta 1^+$  von den  $\delta 1^-$  T-Zellen unter Verwendung des Klons REA173 erzielt. Dieser Klon wird auch von Beucke et al. aufgrund geringerer Interferenzen mit anderen Antikörpern für die durchflusszytometrische Analyse der  $\gamma\delta$ -T-Zellen empfohlen (Beucke et al., 2020).

Neben den Antikörpern zur Charakterisierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen enthalten beide in der eigenen Arbeit etablierten *Panel* Antikörper zur allgemeinen Klassifizierung von T-Zellen wie CD3 (Klon UCHT-1), CD4 (Klon OKT 4) und CD8 (Klon SK1). Diese Antikörper wurden bereits in anderen durchflusszytometrischen *Panels* zur Analyse humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen verwendet (Wistuba-Hamprecht et al., 2014; Hertoghs et al., 2020).

Um den Differenzierungsstatus der  $\gamma\delta$ -T-Zellen beurteilen zu können, wurden vier verschiedene Differenzierungsmarker (CD27, CD28, CCR7 und CD45RA) getestet. Bei gleichzeitiger Verwendung dieser Marker mit acht weiteren Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen zeigten sich Kompensationsschwierigkeiten aufgrund von starken Überschneidungen in den Emissionsspektren bestimmter Fluorochrome (u.a. APC und BV605 in Pe-Cy5). Zusätzlich wiesen CD27 konjugiert mit BV605 und CCR7 konjugiert mit Pe-Cy7 eine starke Hintergrundfärbung auf. Beide Aspekte erschwerten das *Gating* der Differenzierungsmarker. Probleme beim *Gating* einzelner der vier genannten Marker zeigten sich bereits in anderen Studien (De Rosa et al., 2001; De Rosa et al., 2004; Romero et al., 2007; Liechti & Roederer, 2019; Sahir et al., 2020; Barros-Martins et al., 2022), wodurch eine objektive Unterscheidung in vier verschiedene Subgruppen anhand dieser Marker erschwert war. Insbesondere bei der Färbung mit CCR7 war in einigen Studien wegen des gleitenden Übergangs zwischen negativen und positiven Zellen eine objektive Abgrenzung von negativen und positiven Zellen schwierig und schien in diesen Fällen mehr intuitiv als objektiv durchgeführt worden zu sein (De Rosa et al., 2004; Romero et al., 2007; Y. Wang et al., 2021). Dies führte zu Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit der Ergebnisse solcher Analysen der T-Zelldifferenzierung. Ihre quantitative Aussagekraft sollte daher nicht überbewertet werden. Vergleiche zwischen Proben, die mit einer einheitlichen Methode analysiert werden, blieben dennoch möglich.

Zur Beurteilung des Aktivierungsstatus wurden im eigenen *Panel* zwei Differenzierungsmarker gegen die Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR ausgetauscht. Beide wurden bereits in anderen *Panels* zur Beurteilung einer Aktivierung von T-Zellen verwendet. Diese Marker werden auch separat zu Definition aktivierter T-Zellen herangezogen, aber ihre Kombination dürfte die Spezifität dieser Definition erhöhen (Maecker et al., 2012; Hertoghs et al., 2020; Barros-Martins et al., 2022). In den eigenen Testfärbungen an gesunden Spendern gelang nur eine schwache Anfärbung insbesondere der HLA-DR+ T-Zellen. In einer anderen Studie, die Färbungen von CD38 und HLA-DR auf CD8+ T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen zeigten, fanden sich ähnliche Färbeergebnisse (Sahir et al., 2020).

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit zwei weitere Marker, CD16 und CX3CR1, evaluiert. Die Färbung mit dem anti-CD16-Antikörper zeigte einen fließenden Übergang zwischen der Positiv- und der Negativpopulation, eine Abgrenzung schien dennoch möglich. Ähnliche Färbeergebnisse wurden auch bei Wistuba et al. beobachtet (Wistuba-Hamprecht et al., 2014).

Bei der Färbung mit dem anti-CX3CR1-Antikörper war eine Abgrenzung der Positiv- von der Negativpopulation kaum möglich. Bei Böttcher et al. werden einzelne

Färbungen dieses Markers gezeigt, die ebenfalls nur schwer abgrenzbar sind (Böttcher et al., 2015), in anderen Studien, die ebenfalls mit diesem Marker färben, wurden keine Original-Färbungen abgebildet (Davey et al., 2018; Barros-Martins et al., 2022). Die Ergebnisse aus den Färbungen dieser Arbeit sind daher, ebenso wie bisher publizierte entsprechende Untersuchungen, mit Vorsicht zu betrachten. Eine Optimierung solcher Färbungen, etwa durch Entwicklung von Antikörpern gegen CX3CR1 mit intensiverer Färbequalität, scheint wünschenswert.

Zusammenfassend gelang es in den eigenen Analysen, die Färbemethode der  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu vereinfachen, störende Interferenzen bei der gleichzeitigen Färbung mit bestimmten Antikörpern zu umgehen und zwei 14-parametrische und 12-farbige *Panel* zur durchflusszytometrischen Analyse der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen zu entwickeln.

Überschneidungen in den Emissionsspektren der 12 Fluorochrome ließen sich jedoch nicht komplett vermeiden, sodass sich teilweise Kompensationsschwierigkeiten und daraus resultierende Probleme beim *Gating* ergaben, die die Aussagekraft einzelner Marker und Markerkombinationen einschränkten und den Vergleich mit Ergebnissen aus der Literatur erschwerten. Um trotz der *Gating*-Probleme einen Quervergleich der Färbeergebnisse innerhalb dieser Studie zu ermöglichen, wurden einheitliche *Gates* zur Auswertung aller Proben verwendet.

### 5.1.3 Auswirkungen einer Ruhephase über Nacht

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Ruhephase der Zellen in Kulturmedium über Nacht (*overnight resting*) analysiert. Diese Methode wird vor allem im Rahmen von intrazellulären Zytokinfärbungen angewandt, um antigenspezifische T-Zellen zu quantifizieren, da durch die Ruhephase Hintergrundsignale reduziert werden können, die als nicht-spezifisch interpretiert werden. Für diese Reduktion gibt es mehrere mögliche Gründe: die Begünstigung eines Absterbens von Zellen, die nach dem Auftauen teilweise nekrotisch oder apoptotisch sind und sich daher vermehrt nicht-spezifisch mit Antikörpern anfärben, und die Elimination von bereits im Ausgangsmaterial aktivierten Zellen, da diese gegenüber ruhenden Zellen stärker Apoptose-empfindlich sind. Somit soll eine klarere Trennung von lebenden und toten Zellen, eine reduzierte Hintergrundfärbung und eine höhere Spezifität erzielt werden (Lamoreaux et al., 2006; Kutscher et al., 2013).

Folglich führt die Ruhephase über Nacht zu einer verminderten Lebendzellzahl im Vergleich zu einer Messung ohne Ruhephase über Nacht (Owen et al., 2007; Kutscher et al., 2013; L. Wang et al., 2016). Dies zeigte sich auch in den eigenen Analysen und war zum ersten Zeitpunkt nach Symptombeginn (TR/T0a) besonders stark ausgeprägt. Studien, die sich mit der Immunantwort der T-Zellen auf eine akute EBV-Infektion befassen, zeigen, dass insbesondere in der akuten Phase der IM viele aktivierte, EBV-spezifische CD8<sup>+</sup> Effektorzellen vorliegen, die ohne stimulierendes Antigen rasch absterben (Callan et al., 1998; Hislop et al., 2007; Balfour, Odumade, et al., 2013).

Die eigenen Analysen zum Aktivierungsstatus der T-Zellen bei Proben mit und ohne Ruhephase über Nacht bestätigen, dass während einer Ruhephase über Nacht

insbesondere aktivierte T-Zellen absterben. Der Unterschied in der Aktivierung war besonders deutlich bei den CD8+ T-Zellen zu beobachten (Median der aktivierten T-Zellen ohne Ruhephase: 82 %; Median der aktivierten T-Zellen mit Ruhephase: 11 %). Auch innerhalb der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen war die Expression der Aktivierungsmarker nach einer Ruhephase über Nacht deutlich reduziert ( $\delta 1+$ : Median 32 % vs. 7 %;  $\delta 2+$ : 40 % vs. 25 %).

Diese Beobachtungen zeigen, dass insbesondere die im Rahmen des Krankheitsgeschehens *in vivo* aktivierten T-Zellen während der Ruhephase über Nacht recht weitgehend verloren gingen. Da aktivierte T-Zellen bei der Analyse eines akuten Krankheitsgeschehens von besonderem Interesse sind, erscheint eine Ruhephase über Nacht vor der Färbung in der Regel nicht sinnvoll. Daher wurde der Fokus in dieser Arbeit auf die weiterführende Analyse der Zellen ohne Ruhephase über Nacht gelegt, soweit diese verfügbar waren.

## 5.2 Diskussion der durchflusszytometrisch erhobenen Daten

Die im ersten Teil dieser Arbeit etablierten multiparametrischen *Panel* wurden im zweiten Teil des Projekts bei einer pädiatrischen Kohorte zu verschiedenen Zeitpunkten nach IM und bei einer gesunden erwachsenen Kontrollgruppe angewandt, um die relative Häufigkeit sowie den Phänotyp der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen ( $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) im peripheren Blut zu bestimmen. Im Folgenden werden die durchflusszytometrisch erhobenen Daten mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen und ihre Aussagekraft diskutiert.

### 5.2.1 Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen am T-Zellpool im peripheren Blut

Der mediane Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ T-Zellen lag in der hier untersuchten pädiatrischen Kohorte (medianes Alter: 14 Jahre [3-26]) an TR/T0a bei 6,1 % (1,3-16,9 %) und an T6 bei 9,9 % (6,6-22,8 %) und damit zu allen Zeitpunkten nach IM deutlich über dem medianen Anteil der gesunden erwachsenen Kontrollgruppe (medianes Alter: 31 Jahre [22-57]) von 2,6 % (0,7-18,9%) (s. **Tabelle 22**).

#### 5.2.1.1 Altersabhängige Unterschiede

Frühere Studien zeigten, dass die absolute und relative Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut abhängig vom Alter variieren kann und insbesondere direkt nach Geburt sowie bei Kleinkindern tendenziell mehr  $\gamma\delta$ -T-Zellen (absolut und relativ betrachtet) im peripheren Blut im Vergleich zu Erwachsenen zu erwarten sind (Parker et al., 1990; De Rosa et al., 2004; Sandberg et al., 2006; Ravens et al., 2020): Beispielsweise wird bei Parker et al ein Mittelwert von 10 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen (% CD3+) für Kinder im Alter von sechs Jahren angegeben, während Erwachsene in dieser Studie im Durchschnitt nur 5,7 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen (% CD3+) aufwiesen (Parker et al., 1990). Bei Ravens et al findet sich für gesunde europäische Kinder im Alter von 1-3,5 Jahren ein Median von circa 6-7 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+<sup>13</sup>, ein Vergleichswert für Erwachsene fehlt (Ravens et al., 2020). Absolute Werte für  $\gamma\delta$ -T-Zellen in verschiedenen Altersgruppen werden bei De Rosa et al und Sandberg et al beschrieben (De Rosa et

<sup>13</sup> Der Wert wurde aus der Grafik abgelesen, da eine genaue Angabe im Text fehlt.

al., 2004; Sandberg et al., 2006). Aufgrund dieser beobachteten altersabhängigen Dynamiken wäre eine gleichaltrige gesunde Kontrollgruppe am besten für einen Vergleich mit den eigenen Ergebnissen geeignet gewesen. Diese stand jedoch im Rahmen dieser Studie nicht zur Verfügung.

Um dennoch den beobachteten Unterschied zwischen Kindern mit IM und gesunden Erwachsenen besser einordnen zu können, werden in den folgenden Abschnitten die Daten dieser Arbeit mit Referenzwerten aus der Literatur für gesunde Kinder und Erwachsene sowie mit Referenzwerten für Patienten mit IM verglichen.

### 5.2.1.2 Geographische Unterschiede

Im peripheren Blut der gesunden erwachsenen Kontrollpersonen betrug der mediane Anteil aller  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ T-Zellen 2,6 %, wobei die Spanne von 0,7 % bis 18,9 % reichte. Ähnliche Häufigkeiten und Spannweiten für den Anteil aller  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ T-Zellen im peripheren Blut gesunder erwachsener Spender wurden in Studien aus Portugal, Spanien, Schweden und Deutschland berichtet (Esin et al., 1996; Andreu-Ballester et al., 2012; Wistuba-Hamprecht et al., 2015; Fonseca et al., 2020): Die medianen relativen Häufigkeiten in diesen Studien lagen zwischen 3,1 % (Andreu-Ballester et al., 2012) und 4,3 % (Fonseca et al., 2020). Ebenso wurden im peripheren Blut von gesunden erwachsenen Japanern ähnliche Häufigkeiten für  $\gamma\delta$ -T-Zellen beobachtet (Mittelwert: 3,9 %; eigene Berechnung anhand der absoluten Werte in der Referenz (Michishita et al., 2011); Median 4,5 % (Esin et al., 1996)).

Im Gegensatz dazu wurden bei gesunden, erwachsenen Kohorten aus der Türkei, Asien (ohne Japan) (Esin et al., 1996) oder Afrika (Hviid et al., 2000) höhere Anteile der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ T-Zellen (Türken: 9,3%, Asiaten: 9,2 % (Esin et al., 1996), Afrikaner: circa 9 %<sup>14</sup> (Hviid et al., 2000)) im peripheren Blut beschrieben.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Lebensbedingungen oder Ethnie das  $\gamma\delta$ -T-Zellrepertoire beeinflussen. Daher sind Referenzwerte für  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Subgruppen, die in Bewohnern einer bestimmten Region oder Ethnie erhoben werden, nicht weltweit anwendbar.

In der eigenen Studie wurde der Einfluss der Ethnie aufgrund der geringen Fallzahl nicht näher untersucht.

### 5.2.1.3 Unterschiede im Kontext einer EBV-Infektion und IM

Beim Vergleich der Anteile der  $\gamma\delta$ -T-Zellen (% CD3+) der pädiatrischen IM-Kohorte dieser Arbeit mit Referenzwerten aus der Literatur war festzustellen, dass die eigenen Werte an TR/T0a (6,2 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+) mit  $\gamma\delta$ -T-Zellhäufigkeiten von gesunden europäischen Kinderkohorten vergleichbar waren (etwa 6 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ T-Zellen) (Bertotto et al., 1997; Ravens et al., 2020)<sup>15</sup>.

Die zum Zeitpunkt T6 gemessenen Werte waren dagegen höher (9,9 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+) und ähneln Werten, die für Kinder mit anderen Infektionskrankheiten oder

<sup>14</sup> Der Wert wurde aus der Grafik abgelesen, da eine genaue Angabe im Text fehlt.

<sup>15</sup> In beiden Studien wurde die durchflusszytometrische Analyse der PBMCs ohne ein *overnight Resting* durchgeführt.

Entzündungsreaktionen berichtet wurden (Mittelwert circa 10 %<sup>16</sup>  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ T-Zellen (de Jong et al., 2017); Median circa 15 %<sup>17</sup>  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ (Ravens et al., 2020)<sup>18</sup>. Insgesamt betrachtet lag der Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen der pädiatrischen Kohorte zu allen Zeitpunkten nach IM deutlich über dem medianen Anteil der gesunden erwachsenen Kontrollgruppe (2,6 % von CD3+).

Zudem war ein kontinuierlicher Anstieg der Anteile der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und der hier untersuchten Subgruppen ( $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) an CD3+ T-Zellen von der akuten Phase der IM an bis hin zum Ende der Beobachtungsperiode, etwa sechs Monate nach Symptombeginn, zu erkennen. Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass der Anstieg der Anteile der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Verlauf der IM durch die gleichzeitige Kontraktion der CD8+ T-Zellen bedingt sein könnte. Eine Aussage über die Veränderung der absoluten Werte der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Verlauf der Erkrankung kann anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen nicht getroffen werden.

Bereits in früheren Studien wurden ebenfalls erhöhte relative und/oder absolute Werte für  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Patienten mit IM im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben (De Paoli et al., 1990; Hassan et al., 1991; Macsween et al., 2010), wie im Folgenden näher diskutiert wird.

Bei Hassan et al. wurden im Mittel 11,42 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen (bezogen auf CD3+ T-Zellen) bei zehn Patienten mit IM beschrieben, während die neun Personen der Kontrollgruppe im Mittel nur 3,26 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ T-Zellen aufwiesen (Hassan et al., 1991). Eine weitere Untersuchung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen nach der akuten Phase wurde in dieser Studie nicht durchgeführt.

Sowohl erhöhte relative als auch absolute Werte für  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich auch bei De Paoli et al, die zehn Patienten mit IM in der akuten Phase und bis zu vier Wochen danach untersuchten (Mittelwert der Patienten mit IM: 8,9 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen an Lymphozyten versus Mittelwert der Kontrollgruppe: 5,8 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen an Lymphozyten). In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen stellten De Paoli et al. in ihrer Studie ebenfalls einen Anstieg der Anteile der  $\gamma\delta$ -T-Zellen von der akuten Phase bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes fest (Mittelwert: 8,9 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der akuten Phase auf 15,4 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen vier Wochen später; Werte bezogen auf Lymphozyten). Die absoluten Zahlen für  $\gamma\delta$ -T-Zellen betreffend, zeigte sich in ihrer Studie eine Abnahme von der akuten Phase zum Ende der Beobachtungsperiode (De Paoli et al., 1990).

Die eigenen Ergebnisse bestätigen den von De Paoli et al. beobachteten Anstieg der Anteile der  $\gamma\delta$ -T-Zellen für eine größere und jüngere Kohorte sowie einen längeren Nachbeobachtungszeitraum.

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnten Macsween et al. bei 25 Studierenden (Alter: 18-27 Jahre) mit IM zeigen, dass die absolute Anzahl der  $\gamma\delta$ -T-Zellen zum Zeitpunkt

---

<sup>16</sup> Der Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ T-Zellen wurde aus der Grafik abgelesen, da eine genaue Angabe im Text fehlt.

<sup>17</sup> Der Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an CD3+ T-Zellen wurde aus der Grafik abgelesen, da eine genaue Angabe im Text fehlt.

<sup>18</sup> In beiden Studien wurde die durchflusszytometrische Analyse der PBMCs ohne ein *overnight Resting* durchgeführt.

der Diagnose sowie fünf oder mehr Monate nach Diagnose im Vergleich zur altersadaptierten Kontrollgruppe erhöht war (Macswen et al., 2010). Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen gab es in ihrer Studie jedoch keinen weiteren Anstieg der  $\gamma\delta$ -T-Zellen nach der Diagnose, was die absoluten Zahlen von  $\gamma\delta$ -T-Zellen betrifft. Hätte die Studie auch den Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an allen T-Zellen quantitativ ausgewertet, hätte sich vermutlich ein Anstieg des  $\gamma\delta$ -T-Zellanteils nach Erstdiagnose ergeben, denn danach kontrahierte sich das T-Zellkompartiment stärker als das Kompartiment der  $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Zusammenfassend scheint es, dass der in der eigenen Arbeit beobachtete höhere Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen möglicherweise die Folge eines anhaltenden, infektionsbedingten Anstiegs ist.

## 5.2.2 Verteilung der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen im peripheren Blut

### 5.2.2.1 Altersabhängige Unterschiede

Wie die Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist auch die Verteilung ihrer Subpopulationen einer altersabhängigen Dynamik unterworfen. Im Nabelschnurblut machen die  $\delta 1+$  T-Zellen noch etwa 50 % und die  $\delta 2+$  T-Zellen nur circa 25-30 % der  $\gamma\delta$ -T-Zellen aus (Parker et al., 1990; Sandberg et al., 2006). Bereits kurz nach Geburt verändert sich diese Verteilung, sodass bei gesunden erwachsenen Europäern die  $\delta 2+$  T-Zellen mit etwa 60-95 % der  $\gamma\delta$ -T-Zellen gegenüber den  $\delta 1+$  T-Zellen mit etwa 5-40 % (bezogen auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen) überwiegen (Parker et al., 1990; Sandberg et al., 2006). Bei der in dieser Arbeit untersuchten pädiatrischen Kohorte mit IM lag der mediane Anteil der  $\delta 2+$  T-Zellen bei 76 % (30-94 %) an TR/T0a und 69 % (31-94 %) an T6 (bezogen auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen). Der mediane Anteil der  $\delta 1+$  T-Zellen lag bei 18 % (4-59 %) an TR/T0a und 25 % (4-62 %) an T6 (bezogen auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen). Diese Werte passen zu der Verteilung wie sie bei Kindern dieser Altersgruppe beschrieben wurde (Parker et al., 1990; Sandberg et al., 2006). Ähnliche Werte zeigten sich auch bei der gesunden erwachsenen Kontrollgruppe (Median der  $\delta 2+$  T-Zellen: 68 % [20-97 %]; Median der  $\delta 1+$  T-Zellen: 26 % [2-75 %] bezogen auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen).

### 5.2.2.2 Geographische und individuelle Unterschiede

Zuvor beschriebene geographische bzw. ethnische Unterschiede in der Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen spiegeln sich auch in der Verteilung der Subpopulationen wider: Der bei Hviid et al. beobachtete höhere Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei gesunden, erwachsenen Afrikanern im Vergleich zu gesunden, erwachsenen Europäern scheint durch einen höheren Anteil der  $\delta 1+$  T-Zellen (%  $\gamma\delta$ -T-Zellen) bedingt zu sein (Hviid et al., 2000)<sup>19</sup> Cairo et al. fanden heraus, dass Afroamerikaner einen geringeren Anteil  $\delta 2+$  T-Zellen als kaukasische Amerikaner hatten (Median 1,18% versus 3,71% bezogen auf Lymphozyten) (Cairo et al., 2010).

Passend zu anderen europäischen Studien (Wistuba-Hamprecht et al., 2015; Fonseca et al., 2020) wies die Mehrheit, der in dieser Arbeit untersuchten gesunden Spender eine Dominanz der  $\delta 2+$  T-Zellen unter den  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut auf (Median:

<sup>19</sup> Anteil der  $\delta 1+$  T-Zellen bei Europäern unter 1 % der CD3+ T-Zellen, bei Afrikanern circa 4 % (beide Werte wurden aus der Grafik entnommen, genaue Angaben fehlen im Text).



68 % [20-97 %]), während  $\delta 1+$  T-Zellen im Median nur 26 % (2-75 %) ausmachten (vgl. **Tabelle 26**).

Eine Spenderin der hier untersuchten gesunden Kontrollgruppe wies im Vergleich zu den anderen gesunden Erwachsenen einen deutlich höheren Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen (18,9 % der CD3+ T-Zellen) und insbesondere der  $\delta 2+$  T-Zellen auf (97 % der  $\gamma\delta$ -T-Zellen). Eine Lymphopenie lag bei dieser Spenderin nicht vor.

Für den Anteil der  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen an allen  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut zeigten sich dagegen unterschiedliche Daten: In der eigenen Studie lag der Anteil dieser doppelt negativen Subgruppe bei 5 % [1-24%], dagegen war er bei einer portugiesischen Studie mit 9,2 % [0-52 %] (Fonseca et al., 2020) und bei einer deutschen Studie mit etwa 20 % (Wistuba-Hamprecht et al., 2015) höher. In den FACS-Analysen der letztgenannten Publikation war der Übergang zwischen  $\delta 1+$  und  $\delta 1-$  T-Zellen manchmal fließend (Wistuba-Hamprecht et al., 2015), sodass es sein kann, dass individuell unterschiedliche Färbemethoden zu beobachteten Unterschieden in den jeweiligen Anteilen beitrugen, ohne dass tatsächlich biologische Unterschiede zu Grunde lagen.

Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass starke individuelle Unterschiede in der Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen bestehen. Dies lässt vermuten, dass neben der Herkunft bzw. Ethnie weitere Faktoren die Häufigkeit und das  $\gamma\delta$ -T-Zellrepertoire beeinflussen.

### 5.2.2.3 Unterschiede im Kontext einer EBV-Infektion und IM

Die eigenen Analysen zeigen, dass die Anteile der  $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$  und  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen in der akuten Phase der IM im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht waren. Zudem zeigte sich auch in allen drei in dieser Arbeit untersuchten Subgruppen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ( $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) ein Anstieg der Anteile (% CD3+) von der akuten Phase der IM bis hin zum Ende der Beobachtungsperiode.

Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von De Paoli et al. überein, die bei zehn Patienten mit IM nicht nur einen Anstieg der Anteile der  $\gamma\delta$ -T-Zellen, sondern auch der  $\delta 1+$  T-Zellen (0,65 % auf 1,9 % bezogen auf Lymphozyten) von der akuten Phase der IM bis zum Ende ihrer Beobachtungsperiode (vier Wochen später) feststellten (De Paoli et al., 1990).

In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, fanden Zhong et al. im Blut von IM-Patienten sowohl eine erhöhte Genexpression des  $\gamma\delta$ -TCR, als auch des  $\delta 1-$  und  $\delta 2-$ -TCR (Zhong et al., 2017). Zudem beobachteten Farnault et al. in einem klinischen Fall einer EBV-Infektion nach Stammzelltransplantation, eine absolute und relative (% CD3+) Zunahme der  $\gamma\delta$ -T-Zellen, sowie insbesondere eine relative Zunahme der  $\delta 2-$ -T-Zellen im peripheren Blut (Farnault et al., 2013).

Im Gegensatz zu den eigenen Beobachtungen wurde bei Djaoud et al. kein Unterschied in den absoluten Zahlen für  $\delta 1+$  und  $\delta 2+$  T-Zellen bei 17 Kindern mit IM im Vergleich zur Kontrollgruppe beschrieben. Sie stellten jedoch fest, dass sowohl in der Kontrollgruppe als auch unter den Kindern mit IM einzelne Personen erhöhte absolute und relative Werte (% von Lymphozyten) für  $\delta 2+$  T-Zellen aufwiesen, die bei

den betroffenen Kindern mit IM auch noch sechs Monate nach der akuten Phase erhöht nachweisbar waren (Djaoud et al., 2017).

### **5.2.3 Zusammenfassung: Anteile der $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subpopulationen im Kontext der IM**

Zusammenfassend lassen die zuvor diskutierten Ergebnisse vermuten, dass die IM zu einem anhaltenden Anstieg des Anteils der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen ( $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) führt. Es bleibt jedoch unklar, warum die IM so einen langfristigen Effekt auf die relative Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Subgruppen hat, obwohl die meisten Patienten sechs Monate nach Beginn der Erkrankung bereits symptomfrei waren. Künftige Studien könnten anhand einer noch längeren Nachbeobachtungsperiode untersuchen, ob sich die Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen zu einem späteren Zeitpunkt normalisiert.

### **5.2.4 Bedeutung weiterer Oberflächenmarker auf $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer IM**

Neben der Analyse der anteiligen Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei IM-Patienten im Vergleich mit Gesunden wurde in dieser Arbeit auch der Differenzierungs- und Aktivierungsstatus sowie die zytotoxische Aktivität der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle beurteilt. Im Folgenden wird auf die Bedeutung der untersuchten Oberflächenmarker genauer eingegangen und ihre Aussagekraft diskutiert.

#### **5.2.4.1 Differenzierungsmarker**

Zur Beurteilung der Differenzierung wurde die Expression der in der Literatur hierfür häufig verwendeten Oberflächenmoleküle CD27, CD28, CCR7 und CD45RA (Sallusto et al., 1999; Appay et al., 2008) auf CD8+ und CD4+ T-Zellen und auf den  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen analysiert.

Die Funktion dieser Oberflächenmoleküle auf humanen  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist noch nicht gut untersucht und nicht vollständig verstanden. Bisherige Studien konnten jedoch zeigen, dass der *Homing*-Rezeptor für die sekundären Lymphorgane, CCR7, auch auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen vorkommt und für deren Migration relevant ist (Reinhardt et al., 2014). Die Oberflächenmoleküle CD27 und CD28 fungieren in der Aktivierung und Differenzierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen als Kostimulatoren (Ribot & Silva-Santos, 2013; Ribeiro et al., 2015). Dabei scheint insbesondere die Bindung von CD27 an seinen Liganden CD70 eine entscheidende Rolle in der Differenzierung und Aktivierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu spielen (deBarros et al., 2011). Diese Beobachtung ist im Kontext einer EBV-Infektion von besonderem Interesse, da ein Mangel an CD27 mit einer verminderten Immunkontrolle des Virus assoziiert ist (van Montfrans et al., 2012; Deng et al., 2021).

Ähnlich wie  $\alpha\beta$ -T-Zellen werden  $\gamma\delta$ -T-Zellen anhand der Expression von CCR7, CD45RA, CD27 und CD28 verschiedenen Differenzierungsstadien zugeteilt (Eberl et al., 2002; Dieli et al., 2003): Dabei nehmen einige Studien eine ganz ähnliche Einteilung wie bei  $\alpha\beta$ -T-Zellen vor (Dieli et al., 2003; Pitard et al., 2008; Odaira et al., 2016) und unterscheiden naive  $\gamma\delta$ -T-Zellen (CD45RA+, CD27+, CCR7+), zentrale

Gedächtniszellen (CD45RA<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>), Effektorzellen (CD45RA<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>) und terminal differenzierte  $\gamma\delta$ -T-Zellen (CD45RA<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>) (Dieli et al., 2003). Davey et al. konzentrieren sich dagegen vor allem auf die Expression von CD27 und unterscheiden naive  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die stark CD27 exprimieren von Effektor- $\gamma\delta$ -T-Zellen, die nur wenig oder gar kein CD27 aufweisen (Davey et al., 2017).

In den eigenen Analysen wiesen  $\delta 1^+$  und  $\gamma\delta^+\delta 1^-\delta 2^-$  T-Zellen bei Gesunden und IM-Patienten ein ähnliches Differenzierungsmuster auf, das durch einen höheren Anteil sowohl naiver als auch terminal-differenzierter Untergruppen gekennzeichnet war, während  $\delta 2^+$  T-Zellen stärker von intermediären Untergruppen dominiert waren und kaum naive Zellen aufwiesen.

Phänotypische Unterschiede von  $\delta 1^+$  und  $\delta 2^+$  T-Zellen wurden bereits in anderen Studien nachgewiesen (De Rosa et al., 2001; Re et al., 2005; Caccamo et al., 2006; Davey et al., 2018; Fonseca et al., 2020). In einigen dieser Studien fiel insbesondere eine unterschiedliche Expression von CD45RA und CD28 auf  $\delta 1^+$  und  $\delta 2^+$  T-Zellen auf (De Rosa et al., 2001; Davey et al., 2018; Fonseca et al., 2020). Insgesamt wurde in diesen Studien passend zu den eigenen Beobachtungen eine Dominanz von naiven und terminal-differenzierten Phänotypen innerhalb der  $\delta 1^+$  T-Zellen (De Rosa et al., 2001) und von intermediären/Effektor-Phänotypen innerhalb der  $\delta 2^+$  T-Zellen beschrieben (Re et al., 2005; Caccamo et al., 2006; Kallemeijn et al., 2017). Unterschiede zwischen  $\delta 1^+$  und  $\delta 2^+$  T-Zellen zeigen sich auch im zeitlichen Verlauf: Die Abnahme der naiven Untergruppen von Geburt bis ins Erwachsenenalter ist bei den  $\delta 2^+$  T-Zellen stärker ausgeprägt als bei den  $\delta 1^+$  T-Zellen, sodass nach dem ersten Lebensjahr kaum noch naive  $\delta 2^+$  T-Zellen im Blut nachzuweisen sind (De Rosa et al., 2004).

Bei der Analyse der Differenzierungsmarker im Kontext der IM fiel in dieser Arbeit eine vorübergehende Vermehrung von Zellen mit einem Effektor-Phänotyp (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> bzw. CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) zu den frühen Zeitpunkten der IM bei den  $\delta 1^+$ ,  $\gamma\delta^+\delta 1^-\delta 2^-$  und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf, während sich bei den  $\delta 2^+$  T-Zellen keine Veränderung im Phänotyp zeigte.

Ein Effektor-Phänotyp (CD45RA<sup>-</sup>RO<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>) der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der akuten Phase der EBV-Infektion wurde bereits in diversen Studien beschrieben (Callan et al., 1998; Michelle D. Catalina et al., 2002; Hislop et al., 2002; Y. Wang et al., 2021).

Veränderungen im Phänotyp der  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden dagegen bisher vor allem im Kontext einer CMV- oder HIV-Infektion beobachtet (De Rosa et al., 2001; Pitard et al., 2008; Davey et al., 2018). Beispielsweise wurde im Rahmen einer CMV-Infektion eine Veränderung des Phänotyps der  $\delta 1^+$  T-Zellen von vorwiegend naiven (CD27<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>) hin zu Effektor/Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD27<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>) festgestellt (Pitard et al., 2008).

Über den Phänotyp der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen im Kontext einer IM ist jedoch nur wenig bekannt. Farnault et al. beschreiben einen klinischen Fall einer EBV-Infektion nach Stammzelltransplantation, bei dem  $\delta 1^+$  T-Zellen vermutlich zur Kontrolle der Infektion beitragen. Sie beobachteten eine relative Zunahme dieser Zellen im Blut, sowie eine

Aktivierung und veränderte funktionelle Eigenschaften. Die hier beschriebenen  $\delta 1+$  T-Zellen zeichneten sich dabei in Übereinstimmung mit den eigenen Beobachtungen überwiegend durch einen CD45RA<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup> Phänotyp aus (Farnault et al., 2013). Möglicherweise könnte dies darauf hindeuten, dass  $\delta 1+$  T-Zellen im Rahmen einer EBV-Infektion von naiven zu Effektor-T-Zellen differenzieren. Dabei bleibt jedoch unklar, ob diese Differenzierung spezifisch durch ein EBV-Antigen verursacht oder durch andere Komponenten des Immungeschehens ausgelöst wird.

#### 5.2.4.2 Aktivierungsmarker

Zur Beurteilung des Aktivierungsstatus der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer IM wurde die Koexpression der beiden Oberflächenmoleküle CD38 und HLA-DR untersucht. Eine vermehrte Expression dieser Marker auf T-Zellen wurden bereits im Kontext verschiedener Infektionen nachgewiesen (Kestens et al., 1992; H. N. Ho et al., 1993; Z. Wang et al., 2018) und als Zeichen einer Aktivierung angesehen (Maecker et al., 2012; Finak et al., 2016).

In der eigenen Arbeit wurde eine erhöhte Expression beider Marker auf CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sowie auf allen hier untersuchten  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen in der akuten Phase der IM beobachtet. Bereits zum nächsten untersuchten Zeitpunkt lagen nur noch wenige aktivierte Zellen vor.

Diese Ergebnisse stimmen mit diversen früheren Studien überein, die eine Aktivierung sowohl der CD8<sup>+</sup> als auch der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der akuten Phase der IM anhand der vermehrten Expression beider oder eines der beiden Marker feststellten (Callan et al., 1998; Amyes et al., 2003; Balfour, Odumade, et al., 2013; Y. Wang et al., 2021).

Eine vermehrte Expression dieser beiden Marker auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde von De Paoli et al. beschrieben: In ihrer Studie an zehn IM-Patienten untersuchten sie diese Marker jedoch nur auf allen  $\gamma\delta$ -T-Zellen und nicht auf einzelnen Subgruppen (De Paoli et al., 1990). Die eigenen Analysen bestätigen diese Beobachtung und zeigen zusätzlich, dass  $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$  und  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen in der akuten Phase der IM aktiviert waren.

Es bleibt jedoch zu klären, ob die Aktivierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen während der akuten Infektion Zeichen einer direkten Beteiligung an der Immunantwort oder die Folge einer indirekten Immunreaktion ist.

#### 5.2.4.3 Marker der zytotoxischen Aktivität

Neben den Differenzierungs- und Aktivierungsmarkern wurde die Expression zwei weiterer Oberflächenmoleküle, CD16 und CX3CR1, auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihren Subgruppen untersucht.

CD16 ist ein typischer NK-Zellrezeptor, der an der ADCC beteiligt ist (Murphy et al., 2022). Der Chemokinrezeptor CX3CR1 bindet das Chemokin CX3CL1, auch Fraktalkin genannt, und beeinflusst dadurch unter anderem die Zelladhäsion und -migration (Imai et al., 1997; Murphy et al., 2022). Neueren Studien zufolge ist die Expression von CX3CR1 auf Lymphozyten mit zytotoxischen Effektorfunktionen assoziiert (Nishimura et al., 2002; Böttcher et al., 2015).

Eine Expression dieser Rezeptoren wurde auch auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen beschrieben (Lafont et al., 2001; Nishimura et al., 2002; Angelini et al., 2004; Couzi et al., 2012; Ryan et al., 2016): Angelini et al. fanden heraus, dass CD16<sup>+</sup>  $\delta 2+$  T-Zellen eine höhere

zytotoxische Aktivität aufwiesen als CD16<sup>-</sup>  $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen (Angelini et al., 2004). In einer anderen Studie wurde beobachtet, dass CD16<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T-Zellen häufig CX3CR1 koexprimieren (Ryan et al., 2016). Eine Expression dieses Markers in Verbindung mit einer erhöhten Zytotoxizität wurde auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Gesunden (Nishimura et al., 2002; Ryan et al., 2016) und im Rahmen einer CMV-Infektion (Davey et al., 2018) beschrieben.

In den eigenen Analysen war die CD16-Expression insgesamt betrachtet bei  $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen häufiger als bei  $\delta$ 1<sup>+</sup> T-Zellen (21-32 % versus 5-6 %). Einzelne Spender, sowohl unter den Gesunden als auch unter den IM-Patienten, wiesen besonders hohe Anteile CD16-positiver  $\delta$ 1<sup>+</sup> T-Zellen auf. Im Gegensatz zu den eigenen Analysen fanden Fonseca et al. keine Unterschiede in der Expression dieses Markers auf  $\delta$ 1<sup>+</sup> und  $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen, eine hohe individuelle Varianz in der CD16-Expression bei gesunden Spendern ist jedoch auch in ihrer Studie zu erkennen (Fonseca et al., 2020).

$\delta$ 1<sup>+</sup> und  $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen zeigten in den eigenen Analysen keine signifikanten Veränderungen in der Expression der beiden Marker von der akuten Phase der IM zu späteren Zeitpunkten oder im Vergleich zu Gesunden. Für die Untergruppe der  $\gamma\delta$ + $\delta$ 1<sup>-</sup> $\delta$ 2<sup>-</sup> T-Zellen wurde in dieser Arbeit dagegen eine statistisch signifikante Abnahme beider Marker von TR/T0a nach T6 festgestellt.

Diese Beobachtung könnte möglicherweise auf eine Herunterregulation dieser Oberflächenmoleküle auf  $\gamma\delta$ + $\delta$ 1<sup>-</sup> $\delta$ 2<sup>-</sup> T-Zellen während der Rekonvaleszenz und folglich eine Abnahme der zytotoxischen Aktivität von der akuten Phase der IM zu späteren Zeitpunkten hinweisen.

Zusammenfassend zeigen die phänotypischen Analysen, dass alle drei  $\gamma\delta$ -Zellsubgruppen ( $\delta$ 1<sup>+</sup>,  $\delta$ 2<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ + $\delta$ 1<sup>-</sup> $\delta$ 2<sup>-</sup>) in der akuten Phase der IM aktiviert waren. Bei den  $\delta$ 1<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ + $\delta$ 1<sup>-</sup> $\delta$ 2<sup>-</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen trat eine vorübergehende Vermehrung von Zellen mit einem Effektor-Phänotyp (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> bzw. CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) in der akuten Phase der IM auf, während sich bei den  $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen keine Veränderung im Phänotyp zeigte. Für die  $\gamma\delta$ + $\delta$ 1<sup>-</sup> $\delta$ 2<sup>-</sup> T-Zellen wurde eine relative Abnahme der Oberflächenmoleküle CD16 und CX3CR1, die im Zusammenhang mit einer zytotoxischen Aktivität stehen, beobachtet.

Eine Beteiligung der zwei Hauptsubgruppen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ( $\delta$ 1<sup>+</sup> und  $\delta$ 2<sup>+</sup> T-Zellen) an der Immunantwort auf eine EBV-Infektion wurde bereits in früheren *in vitro* und *in vivo* Studien vermutet (Fisch et al., 1990; Lam et al., 1990; Farnault et al., 2013; Djaoud et al., 2017; Zhong et al., 2017). Die eigenen Analysen liefern hierfür zusätzliche Hinweise und deuten insbesondere auf eine Beteiligung einer dritten  $\gamma\delta$ -Zellsubgruppe ( $\gamma\delta$ + $\delta$ 1<sup>-</sup> $\delta$ 2<sup>-</sup>) hin, deren Rolle im Kontext einer EBV-Infektion bisher noch wenig erforscht ist. Zukünftige Studien könnten sich damit auseinandersetzen, ob es sich bei dieser Subgruppe um  $\delta$ 3<sup>+</sup> T-Zellen handelt, wodurch diese aktiviert werden und welche genaue Funktion sie im Rahmen der EBV-Infektion spielen.

### **5.2.5 Korrelation der durchflusszytometrischen Daten mit klinischen Parametern**

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde eine explorative Suche nach Zusammenhängen zwischen durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnissen und im Rahmen der

IMMUC-Studie erhobenen klinischen Parametern durchgeführt. Hierfür wurde die Häufigkeit und der Aktivierungsstatus der T-Zellsubgruppen im akuten Stadium der IM mit dem Alter der Patienten sowie der maximalen Anzahl an pathologischen Befunden (Cmax), dem maximalen Schweregrad (Smax) und der maximalen Protraktion der pathologischen Befunde (Pmax), sowie den absoluten Werten der Körpertemperatur und ausgewählten laborchemischen Parametern (CRP, Ferritin, Kreatinin, GPT und GOT) zum Zeitpunkt TR/T0a korreliert.

In der frühen Phase der Infektion (TR/T0a) korrelierte der Anteil der aktivierten CD8+ T-Zellen positiv mit der Körpertemperatur ( $p=0,045$ ) und dem Serumferritinspiegel ( $p=0,023$ ).

Bereits in einer früheren Studie wurden signifikante Zusammenhänge zwischen aktivierten CD8+ T-Zellen und klinischen Parametern bei IM beschrieben: Bei Wang et al. korrelierte der Anteil der HLA-DR+ CD8+ T-Zellen positiv mit der Viruslast, sowie den Blutspiegeln für Leberenzyme und der Laktatdehydrogenase (LDH), einem Marker für Zellschäden (Y. Wang et al., 2021).

Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen wurden in den eigenen Analysen nur noch zwei hochsignifikante Zusammenhänge gefunden: Die Häufigkeit der  $\gamma\delta+ \delta 1- \delta 2-$  T-Zellsubgruppe an TR/T0a korrelierte invers mit den Blutspiegeln der Leberenzymen GOT und GPT, die bei Erhöhung im Blut auf einen Leberzellschaden hinweisen.

In dieser Arbeit wurde vermutet, dass es sich bei der Subgruppe der  $\gamma\delta+ \delta 1- \delta 2-$  um  $\delta 3+$  T-Zellen handelte, da diese nach den  $\delta 2+$  und  $\delta 1+$  T-Zellen die dritthäufigste Subgruppe der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut darstellen (Peyrat et al., 1995). Um diese Vermutung zu bestätigen, wäre jedoch ein spezifischer anti- $\delta 3$ -TCR-Antikörper notwendig gewesen, der im Rahmen dieses Projektes nicht zur Verfügung stand.

$\delta 3+$  T-Zellen machen insgesamt nur einen geringen Anteil der im Blut zirkulierenden Lymphozyten aus (Peyrat et al., 1995), kommen dagegen deutlich häufiger in der Leber (Kenna et al., 2004; Hunter et al., 2018) und im Darm (M. R. Dunne et al., 2013) vor. Über ihre Funktion und Spezifität ist bisher nur wenig bekannt. Eine Erkennung von Annexin A2, einem Phospholipid-bindenden Protein, das unter oxidativem Stress auf Tumorzellen exprimiert wird (Marlin et al., 2017), sowie von MHC-ähnlichen Molekülen wie CD1d (Mangan et al., 2013) und MR1 (Rice et al., 2021) wurde beschrieben.

Der hier beobachtete Befund der inversen Korrelation zwischen der relativen Häufigkeit der  $\gamma\delta+ \delta 1- \delta 2-$  T-Zellen im peripheren Blut und der Höhe der Leberenzymwerte könnte auf eine protektive Funktion dieser, vermutlich  $\delta 3+$   $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppe bei entzündlichen Leberschäden im Kontext einer IM hindeuten. Es konnte allerdings nicht untersucht werden, ob diese Korrelation etwa dadurch zustande kam, dass  $\gamma\delta+ \delta 1- \delta 2-$  T-Zellen bei Patienten mit erhöhten Leberenzymen vermehrt in die Leber rekrutiert und aus dem Blut abgezogen wurden, oder, ob im Gegenteil solche Patienten in beiden Kompartimenten niedrige Zahlen von  $\gamma\delta+ \delta 1- \delta 2-$  T-Zellen aufwiesen. Im ersten Fall könnten diese T-Zellen eine schützende oder schädliche Funktion zukommen, im zweiten Fall wäre eine schützende Funktion wahrscheinlicher.

Die Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde bereits mehrfach im Zusammenhang mit verschiedenen Lebererkrankungen und entzündlichen Prozessen in der Leber untersucht, und Hinweise sowohl für protektive als auch pathogene Effekte gefunden (Hammerich et al., 2014; Rajoriya et al., 2014; X. Wang et al., 2018). Die genaue Funktion und Beteiligung der einzelnen  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen wird jedoch noch kontrovers diskutiert und ist insbesondere für die Subgruppe der  $\delta 3+$  T-Zellen bisher noch wenig erforscht.

Im Kontext von viralen Lebererkrankungen wurde die Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen insbesondere bei Hepatitis C und B untersucht: Tseng et al. analysierten die Expression des  $\gamma\delta$ -TCR auf T-Zelllinien, die sie durch *in vitro* Stimulation aus Leberbiopsien generierten und fanden mehr  $\gamma\delta$ -T-Zellen in Hepatitis-C-Virus (HCV) positiven und Hepatitis-B-Virus (HBV) positiven Leberbiopsien im Vergleich zu Leberbiopsien mit nicht-viraler Hepatitis oder von Gesunden (Tseng et al., 2001).

In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass bei Patienten mit chronischer Hepatitis C ein erhöhter Anteil an  $\delta 1+$  T-Zellen in der Leber im Vergleich zum peripheren Blut vorliegt (Agrati et al., 2001). Die Mehrheit der intrahepatischen  $\delta 1+$  T-Zellen wies einen Effektor-Phänotyp auf (CD62L<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>), während im Blut viele naive  $\delta 1+$  T-Zellen gefunden wurden. Sowohl intrahepatische als auch periphere  $\delta 1+$  T-Zellen waren im Rahmen der Infektion aktiviert (Agrati et al., 2001). Diese Ergebnisse deuten insbesondere auf eine Beteiligung der  $\delta 1+$  T-Zellen im Kontext einer Hepatitis C hin.

Die Ergebnisse einer Studie, die sich mit  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Hepatitis B befasst, lassen dagegen eine spezifische Rolle der  $\delta 2+$  T-Zellen vermuten: Bei Chen et al. wurden erniedrigte Anteile an  $\delta 2+$  T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit chronischer Hepatitis B im Vergleich zu Gesunden beobachtet. Diese korrelierten zudem negativ mit verschiedenen Leberwerten (GOT, GPT und Bilirubin). Die peripheren Anteile aller  $\gamma\delta$ -T-Zellen und der  $\delta 1+$  T-Zellen waren dagegen nicht statistisch signifikant verändert. Asymptomatische Träger wiesen den niedrigsten Anteil an CD45RO<sup>+</sup>  $\delta 2+$  T-Zellen im Vergleich zu Gesunden und chronisch Infizierten auf (Chen et al., 2008).

In einer anderen Studie, die sich ebenfalls mit der Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Hepatitis B befasst, wurde dagegen auch eine verminderte Anzahl der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut und erhöhte Werte im Lebergewebe von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis B im Vergleich zu Gesunden festgestellt (Jia et al., 2019). Einzelne  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen wurden nicht analysiert. Ähnlich wie in den eigenen Analysen wurde eine vermehrte Expression typischer Aktivierungsmarker wie CD38 und HLA-DR auf den peripheren  $\gamma\delta$ -T-Zellen beschrieben. Zudem wurde eine inverse Korrelation der Anzahl der peripheren  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit dem Leberenzym GPT bei Patienten mit akuter Hepatitis B (AHB) beobachtet. Nach Rekonvaleszenz der AHB nahm die relative Häufigkeit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut wieder zu und die Aktivierung ab (Jia et al., 2019).

Zusammenfassend könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass im Rahmen von viralen Erkrankungen, die mit einer Beteiligung der Leber einhergehen, aktivierte  $\gamma\delta$ -T-Zellen in die Leber einwandern oder in diese rekrutiert werden und dort als Effektor-T-Zellen am Infektionsgeschehen teilnehmen und möglicherweise spezifische

Funktionen ausüben. Es bleibt jedoch unklar, welche genaue Funktion die  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Subgruppen in der Leber übernehmen.

Um den Zusammenhang zwischen  $\delta 3+$  T-Zellen und entzündlichen Leberschäden insbesondere im Kontext einer IM zu klären, sollte sich weitere Forschung mit der Häufigkeit, Spezifität und Funktion der  $\delta 3+$  T-Zellen und deren Funktion im Rahmen von akuten viralen Lebererkrankungen befassen.



## Zusammenfassung

Weltweit sind über 90 % der Bevölkerung mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert, einem Herpesvirus, das nach Infektion lebenslang in den B-Zellen des Wirts persistiert und mit verschiedenen Tumor- und Autoimmunerkrankungen assoziiert ist.

Die Erstinfektion mit EBV in der frühen Kindheit verläuft in den meisten Fällen subklinisch, während eine Erstinfektion im jugendlichen und frühen Erwachsenenalter häufig zur Infektiösen Mononukleose (IM) führt, einer in der Regel selbstlimitierenden Erkrankung mit typischen Symptomen wie Lymphadenopathie, Tonsillopharyngitis und Fieber. In seltenen Fällen kann es zu schweren und langwierigen Verläufen einer IM mit akuten und/oder langfristigen Komplikationen wie einer Atemwegsobstruktion, einer Milzruptur, einer Hepatitis, einer Myokarditis und/oder einem chronisch postviralen Syndrom kommen. Eine spezifische Therapie zur Behandlung oder Vorbeugung einer Infektion mit EBV existiert derzeit nicht. Auch Risikofaktoren und Ursachen für schwere und/oder langwierige Krankheitsverläufe der IM sind weitgehend unklar.

Eine Minderheit der T-Zellen beim Menschen exprimieren einen  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor und werden  $\gamma\delta$ -T-Zellen genannt. Diverse Studien liefern Hinweise darauf, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen, denen eine besondere Rolle in der Immunabwehr und -kontrolle verschiedener Infektionen und in der Homöostase des Immunsystems zugeschrieben wird, mit EBV interagieren und an der Immunantwort auf EBV beteiligt sind. Die spezifische Funktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer EBV-Infektion konnte bisher jedoch nicht geklärt werden.

Um  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext der IM zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei multiparametrische *Panel* zur durchflusszytometrischen Analyse drei verschiedener  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen ( $\delta 1+$ ,  $\delta 2+$ ,  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) basierend auf einer vereinfachten Färbemethode der  $\gamma\delta$ -T-Zellen entwickelt und anschließend bei einer pädiatrischen Kohorte mit IM und einer gesunden Kontrollgruppe angewandt. Von der pädiatrischen Kohorte mit IM waren Blutproben von bis zu drei Zeitpunkten im Verlauf der Erkrankung verfügbar, sodass eine longitudinale Analyse der  $\gamma\delta$ -T-Zellen von der akuten Phase bis zu etwa sechs Monaten nach Erkrankungsbeginn möglich war. Außerdem bot sich im Rahmen der IMMUC-Studie die Möglichkeit, die durchflusszytometrisch gewonnenen Daten mit einer umfangreichen und detaillierten Sammlung an klinischen Parametern zu korrelieren.

Die Analysen zeigten, dass alle in dieser Arbeit untersuchten  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen in der akuten Phase der IM aktiviert waren und zwar in höherem Maße als CD4+ T-Zellen, aber geringer als CD8+ T-Zellen. Zu den frühen Zeitpunkten nach IM im Vergleich zu späteren Zeitpunkten wies ein erhöhter Anteil der  $\delta 1+$  und der  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen (% von  $\gamma\delta$ -T-Zellen) einen Effektor-Phänotyp auf. Der jeweilige Anteil der drei untersuchten  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen an den CD3+ T-Zellen lag zu allen Zeitpunkten nach IM über dem Niveau der gesunden Kontrollgruppe und stieg im Gegensatz zu dem Anteil der CD4+ und CD8+ T-Zellen von der akuten Phase der Erkrankung zu späteren Zeitpunkten weiter an.

Bei der Korrelation der relativen Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen im akuten Stadium der IM mit den klinischen Parametern fiel ein hoch signifikanter und

unerwarteter Befund auf: Der Anteil der  $\gamma\delta^{+}\delta 1^{-}\delta 2^{-}$  T-Zellen korrelierte invers mit den Blutspiegeln der hepatischen Transaminasen GPT und GOT und könnte damit auf eine spezifische Rolle dieser T-Zellsubgruppe bei entzündlichen Leberschäden im Kontext einer IM hindeuten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zwar nicht alle offenen Fragen in Bezug auf die spezifische Funktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen im Kontext einer IM klären, sie liefern jedoch weitere Hinweise für eine Beteiligung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an zellulären Immunantworten im Kontext der EBV-Erstinfektion und rücken insbesondere die Rolle eine bisher wenig erforschten Subgruppe der  $\gamma\delta$ -T-Zellen in den Vordergrund.

## Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

**Tabelle 16: Übersicht über das gemessene Probenmaterial der IM-Patienten**

Das gemessene Probenmaterial ist hier aufgelistet nach den Patienten-IDs, dem Zeitpunkt der Blutentnahme, der Handhabung der Zellen (mit oder ohne Ruhephase über Nacht) und dem verwendeten *Panel*.

Patienten-ID	Zeitpunkt (TR/T0a <= 26d, T1 = 26-35d; T2 = 35-55d, T6 = 5-7 Monate)	Vorgehensweise (NR = ohne Ruhephase über Nacht; R = mit Ruhephase über Nacht)	Panel (D = Differenzierungs-Panel, A = Aktivierungs-Panel)
EP-A007	TR	NR	D
		R	A
	T1	NR	D
		R	A
		NR	D
		R	A
EP-A034	T1	R	D
EP-A035	TR	R	D
EP-A036	TR	NR	D
		R	A
	T2	R	D
		R	A
	T6	NR	D
		R	A
EP-A037	TR	R	D
EP-A038	TR	NR	D
		R	A
	T1	NR	D
		R	A
	T6	NR	D
		R	A
EP-A043	TR	R	D
EP-A046	T2	R	D
EP-A052	TR	R	D
EP-A055	TR	NR	D
		R	A
	T2	NR	D
		R	A
		NR	D
		R	A

Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

	T6	NR	D
			A
		R	D
			A
<b>EP-A056</b>	TR	R	D
	T1	R	D
	T6	NR	D
		R	A
<b>EP-A064</b>	TR	NR	D
			A
		R	D
			A
	T2	NR	D
			A
		R	D
			A
T6	NR	D	
	A		
<b>EP-A066</b>	TR	NR	D
			A
		R	D
			A
	T2	NR	D
			A
		R	D
			A
T6	NR	D	
	A		
<b>EP-A070</b>	TR	NR	D
			A
		R	D
			A
	T1	NR	D
			A
		R	D
			A
<b>EP-A071</b>	TR	R	D
<b>EP-A077</b>	TR	NR	D
			A
		R	D
			A
	T1	NR	D
			A
		R	D
			A
T6	NR	D	
	A		
<b>EP-A083</b>	TR	R	D
	T1	R	D
<b>EP-A088</b>	TR	NR	D
			A
		R	D
			A
	T1	NR	D

Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

			A
		R	D
			A
	T6	NR	D
			A
<b>EP-A097</b>	TR	R	D
	T2	R	D
		NR	D
	TR		A
		R	D
			A
<b>EP-A099</b>		NR	D
	T1		A
		R	D
			A
	T6	NR	D
			A
<b>EP-A101</b>	TR	R	D
<b>EP-A104</b>	T1	R	D
<b>EP-A107</b>	TR	R	D
			D
<b>EP-A146</b>	T0a	NR	A
		NR	D
<b>EP-A148</b>	T0a	R	D
		NR	D
<b>EP-A149</b>	T0a		D
		R	D
<b>EP-A162</b>	TR	R	D
	T1	R	D
<b>EP-A163</b>	T0a	NR	D
			A
<b>EP-A164</b>	T0a	NR	D
			A
	TR	R	D
<b>EP-A166</b>	T0a	NR	D
			A
<b>EP-A167</b>	T1	R	D
			D
<b>EP-A169</b>	T0a	NR	A
<b>EP-A176</b>	TR	R	D
			D
<b>EP-A180</b>	T0a	NR	A
	T1	R	D
<b>EP-A191</b>	T1	R	D
<b>EP-A192</b>	T2	R	D
<b>Gesamt</b>		<b>72x NR, 68x R</b>	<b>55x A, 87x D</b>

**Tabelle 17: Übersicht über die gemessenen gesunden Kontrollproben**

Die Kontrollproben sind hier aufgelistet nach Spender-*ID*, Handhabung der Zellen (mit und ohne Ruhephase über Nacht), sowie verwendetem *Panel*.

<b>Spender-<i>ID</i></b>	<b>Vorgehensweise (NR = Ohne Ruhephase über Nacht; R = mit Ruhephase über Nacht)</b>	<b><i>Panel</i> (D = Differenzierungs-<i>Panel</i>, A = Aktivierungs-<i>Panel</i>)</b>
<b>K-0105</b>	NR	D
	NR	A
<b>K-0113</b>	NR	D
	R	D
<b>K-0124</b>	NR	D
		A
	R	D
<b>K-0502</b>		A
	NR	D
	R	D
<b>K-0506</b>	NR	D
	R	D
<b>K-1004</b>	NR	D
<b>K-1013</b>	R	D
		A
<b>K-1505</b>	NR	D
		A
<b>K-1826</b>	NR	D
		A
	R	D
<b>K-1902</b>		A
	NR	D
	R	D
<b>K-1918</b>	NR	D
	R	D
<b>K-1914</b>	R	D
<b>K-1925</b>	R	D
<b>K-2313</b>	NR	D
		A
<b>K-2503</b>	NR	D
		A
<b>Gesamt</b>	<b>20x NR, 14x R</b>	<b>22x D, 12x A</b>

**Tabelle 18: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf die Anzahl der durchflusszytometrisch bestimmten Lymphozyten) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.**

NR= ohne Ruhephase über Nacht.

NR	Kontrollen (n=12)		TR/T0a (n=18)		T1/T2 (n=9)		T6 (n=9)	
	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)
CD3+	68,35 (57-76,4)	67,23 (1,9)	80,1 (49,5-92,6)	78,27 (2,5)	70,2 (48,7-81,3)	69,17 (3,1)	68 (41,8-78,8)	65,56 (3,6)
CD8+	15,9 (6,8-31,7)	16,15 (1,8)	43,9 (29,6-71,4)	45,63 (3,2)	31 (13,4-55)	30,62 (4)	22,4 (8,3-39,5)	21,47 (2,8)
CD4+	48,75 (32,7-55,9)	46,98 (2,2)	23,3 (7,4-39,7)	23,19 (2,4)	29,9 (21,1-34,3)	29,77 (1,4)	31,3 (27,8-46,7)	34,3 (2,3)
$\gamma\delta$ +	1,8 (0,4-12)	2,77 (0,9)	4,85 (1,2-13,8)	5,6 (0,9)	5,86 (3,6-16,8)	7,69 (1,5)	5,78 (4,1-14,8)	8,48 (1,5)
$\delta$ 2+	1,11 (0,1-11,7)	2,09 (0,9)	3,54 (0,4-11,6)	4,3 (0,8)	4,89 (1,2-11,9)	5,45 (1,1)	4,57 (1,6-13,9)	6,09 (1,4)
$\delta$ 1+	0,3 (0,1-1,8)	0,52 (0,1)	0,82 (0,3-2,9)	0,98 (0,2)	1,06 (0,5-3,9)	1,77 (0,5)	1,42 (0,6-4,4)	1,94 (0,5)
$\gamma\delta$ + $\delta$ 1- $\delta$ 2-	0,08 (0-0,8)	0,16 (0,1)	0,29 (0,1-0,6)	0,33 (0)	0,35 (0,2-1)	0,46 (0,1)	0,37 (0,2-1)	0,46 (0,1)

**Tabelle 19: P-Werte für die Unterschiede in den Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen sowie der CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen (bezogen auf alle Lymphozyten) zwischen den Zeitpunkten nach IM sowie im Vergleich mit der Kontrollgruppe.**

Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. NR= ohne Ruhephase über Nacht. K= gesunde Kontrollen.

P-Werte, NR % von Lymphozyten	K vs TR/T0a	K vs T1/T2	K vs T6	TR/T0a vs T1/T2	TR/T0a vs T6	T1/T2 vs T6
CD3+	0,0019	0,43	0,92	0,023	0,0030	0,44
CD8+	<0,000001	0,0026	0,085	0,0085	0,000027	0,077
CD4+	<0,000001	0,000048	0,0017	0,11	0,0086	0,40
$\gamma\delta$ +	0,0058	0,00046	0,00030	0,19	0,11	0,80
$\delta$ 2+	0,022	0,0055	0,0024	0,40	0,27	0,86
$\delta$ 1+	0,0048	0,0030	0,0030	0,082	0,048	0,80
$\gamma\delta$ + $\delta$ 1- $\delta$ 2-	0,0020	0,00049	0,00072	0,27	0,26	0,98

**Tabelle 20: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle Lymphozyten) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.**

R= mit Ruhephase über Nacht.

R	Kontrollen (n=10)		TR/T0a (n=25)		T1/T2 (n=21)		T6 (n=4)	
	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)
CD3+	61,25 (35,9-68)	57,12 (3,3)	75,3 (29,8-88,7)	72,89 (2,5)	71,7 (31,6-87,9)	69,01 (2,8)	72,95 (64,3-77,4)	71,9 (2,8)
CD8+	12,2 (4,8-24)	12,19 (1,8)	20,7 (6,8-34,4)	20,24 (1,5)	22,2 (6,1-46,7)	22,52 (1,9)	23,3 (20,3-39,6)	26,63 (4,5)
CD4+	42,05 (29,1-53,2)	41,1 (2,2)	34,2 (15,5-59)	34,48 (2,2)	34,1 (20,7-53,8)	35,94 (1,8)	33,55 (25,2-43,2)	33,88 (3,7)
$\gamma\delta$ +	1,29 (0,6-11,9)	3,37 (1,1)	6,62 (1,8-14,3)	6,68 (0,8)	6,42 (3,3-18,8)	8,54 (1)	8,56 (4,4-18,1)	9,9 (3,1)
$\delta$ 2+	0,99 (0,1-11,5)	2,48 (1,1)	5,12 (0,4-13,2)	5,17 (0,7)	4,89 (1,6-15,7)	6,38 (0,9)	6,44 (1,8-17,1)	7,94 (3,5)
$\delta$ 1+	0,43 (0,1-2,6)	0,76 (0,3)	0,82 (0,2-2,7)	1,12 (0,2)	1,22 (0,5-5)	1,68 (0,3)	1,05 (0,8-3,6)	1,61 (0,7)
$\gamma\delta$ + $\delta$ 1- $\delta$ 2-	0,12 (0-0,3)	0,13 (0)	0,32 (0,1-1,6)	0,38 (0,1)	0,36 (0,1-1,5)	0,47 (0,1)	0,35 (0,2-0,5)	0,35 (0,1)

**Tabelle 21: P-Werte für die Unterschiede in den Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen sowie der CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen (bezogen auf alle Lymphozyten) zwischen den Zeitpunkten nach IM sowie im Vergleich mit der Kontrollgruppe.**

Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. R= mit Ruhephase über Nacht. K= gesunde Kontrollen.

P-Werte, R % von Lymphozyten	K vs TR/T0a	K vs T1/T2	K vs T6	TR/T0a vs T1/T2	TR/T0a vs T6	T1/T2 vs T6
CD3+	0,00055	0,0099	0,014	0,22	0,56	0,91
CD8+	0,0043	0,0011	0,0080	0,35	0,25	0,55
CD4+	0,063	0,14	0,24	0,63	0,97	0,87
$\gamma\delta$ +	0,0082	0,0018	0,054	0,14	0,28	0,80
$\delta$ 2+	0,013	0,0042	0,14	0,37	0,48	0,70
$\delta$ 1+	0,055	0,0064	0,076	0,095	0,34	>0,99
$\gamma\delta$ + $\delta$ 1- $\delta$ 2-	0,00086	0,000016	0,014	0,12	0,84	0,63



**Tabelle 22: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle T-Zellen) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.**

NR= ohne Ruhephase über Nacht.

NR	Kontrollen (n=12)		TR/T0a (n=18)		T1/T2 (n=9)		T6 (n=9)	
% von CD3+	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)
CD8+	23,00 (12,0-41,5)	23,84 (8,4)	55,85 (37,0-81,2)	57,83 (12,4)	45,5 (25,2-67,7)	43,23 (12,4)	28,4 (19,9-53,4)	32,27 (10,5)
CD4+	72,15 (51,4-86,3)	70,03 (10,4)	30,3 (8,2-49,8)	30,29 (13,4)	46,5 (26,0-61,3)	44,17 (10,5)	53,6 (37,8-66,6)	52,88 (9,1)
$\gamma\delta$ +	2,63 (0,7-18,9)	4,21 (4,9)	6,13 (1,3-16,9)	7,19 (4,5)	9,34 (5,5-23,9)	10,99 (6,0)	9,90 (6,6-22,8)	12,80 (6,2)
$\delta$ 2+	1,51 (0,14-18,39)	3,16 (4,9)	4,33 (0,4-13,4)	5,52 (4,1)	7,13 (1,5-17,0)	7,84 (4,5)	7,68 (2,2-21,4)	9,16 (6,0)
$\delta$ 1+	0,44 (0,09-2,8)	0,81 (0,82)	1,03 (0,4-3,5)	1,25 (0,8)	1,56 (0,7-5,5)	2,50 (1,8)	2,19 (0,97-6,5)	2,94 (2,0)
$\gamma\delta$ + $\delta$ 1- $\delta$ 2-	0,11 (0,04-1,3)	0,24 (0,34)	0,405 (0,13-0,8)	0,42 (0,2)	0,5 (0,3-1,4)	0,65 (0,4)	0,51 (0,35-1,5)	0,70 (0,4)

**Tabelle 23: P-Werte für die Unterschiede der Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle CD3+ T-Zellen) zwischen den einzelnen Zeitpunkten nach IM und der gesunden Kontrollgruppe.**

Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. NR= ohne Ruhephase über Nacht. K= gesunde Kontrollen.

P-Werte, NR % von CD3+	K vs TR/T0a	K vs T1/T2	K vs T6	TR/T0a vs T1/T2	TR/T0a vs T6	T1/T2 vs T6
CD8+	<0,000001	0,00066	0,058	0,013	0,000041	0,053
CD4+	<0,000001	0,000054	0,0018	0,019	0,000081	0,11
$\gamma\delta$ +	0,017	0,00066	0,00031	0,076	0,012	0,67
$\delta$ 2+	0,030	0,0043	0,0018	0,23	0,074	0,73
$\delta$ 1+	0,024	0,0043	0,0013	0,039	0,012	0,82
$\gamma\delta$ + $\delta$ 1- $\delta$ 2-	0,0038	0,0013	0,00060	0,13	0,10	0,68

**Tabelle 24: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle CD3+ T-Zellen) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.**

R= mit Ruhephase über Nacht.

R	Kontrollen (n=10)		TR/T0a (n=25)		T1/T2 (n=21)		T6 (n=4)	
% CD3+	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)
CD8+	18,90 (13,4-36,4)	20,53 (7,3)	26,20 (11,6-44,3)	27,60 (8,6)	31,6 (16,5-58,3)	32,03 (9,4)	33,45 (27,6-54,8)	37,33 (12,8)
CD4+	75,95 (52,7-84,2)	73,02 (11,1)	48,90 (17,9-70,3)	47,70 (12,6)	52,9 (31,7-73,2)	52,83 (10,6)	48,9 (34,8-55,8)	47,10 (9,2)
$\gamma\delta$ +	2,83 (1,3-19,2)	5,57 (5,7)	8,28 (2,1-18,8)	9,29 (5,1)	11,1 (5,0-24,9)	12,15 (5,4)	11,32 (6,8-24,6)	13,51 (8,2)
$\delta 2$ +	1,62 (0,3-18,6)	3,99 (5,5)	6,28 (0,4-17,6)	7,18 (4,8)	7,64 (2,0-20,9)	8,97 (5,5)	8,72 (2,5-23,3)	10,8 (9,4)
$\delta 1$ +	0,81 (0,1-4,2)	1,32 (1,3)	1,21 (0,2-4,1)	1,56 (1,1)	1,6 (0,8-6,6)	2,48 (1,8)	1,49 (1,0-5,0)	2,23 (1,8)
$\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$	0,19 (0,04-1,0)	0,26 (0,3)	0,41 (0,1-2,4)	0,54 (0,5)	0,54 (0,1-2,0)	0,69 (0,4)	0,49 (0,3-0,6)	0,48 (0,1)

**Tabelle 25: P-Werte für die Unterschiede der Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle CD3+ T-Zellen) zwischen den einzelnen Zeitpunkten nach IM und der gesunden Kontrollgruppe.**

Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. R= mit Ruhephase über Nacht.

P-Werte, R % von CD3+	K vs TR/T0a	K vs T1/T2	K vs T6	TR/T0a vs T1/T2	TR/T0a vs T6	T1/T2 vs T6
CD8+	0,023	0,0019	0,022	0,16	0,13	0,50
CD4+	0,000007	0,00014	0,0080	0,17	0,98	0,37
$\gamma\delta$ +	0,022	0,0020	0,072	0,080	0,30	>0,99
$\delta 2$ +	0,034	0,0026	0,11	0,31	0,48	0,97
$\delta 1$ +	0,34	0,025	0,19	0,068	0,37	0,92
$\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$	0,0063	0,00032	0,076	0,11	0,89	0,38

**Tabelle 26: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der  $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen (bezogen auf alle  $\gamma\delta$ -T-Zellen) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.**

NR= ohne Ruhephase über Nacht.

NR	Kontrollen (n=12)		TR/T0a (n=18)		T1/T2 (n=9)		T6 (n=9)	
	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)	Median (Min-Max)	Mittelwert (SD)
$\delta 2+$	67,45 (19,5-97,1)	62,83 (28)	75,85 (29,6-94,2)	68,97 (19,7)	69,15 (27,6-90,7)	69,12 (17)	68,7 (30,6-94,2)	68,09 (19,5)
$\delta 1+$	25,9 (1,6-74,9)	29,97 (24,3)	17,75 (3,8-58,7)	23,46 (16,4)	23,9 (6,6-64,6)	24,68 (15,9)	24,5 (4,3-62,3)	26,01 (17,8)
$\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$	4,67 (1-24,1)	7,17 (7,3)	6,6 (2-17,7)	7,51 (4,4)	6,45 (2,8-8,3)	6,18 (1,7)	6,83 (1,5-8,3)	5,86 (2,4)

**Tabelle 27: Median mit Maximum und Minimum zur Expression der Aktivierungsmarker.**

NR= ohne Ruhephase über Nacht.

CD38+, HLA-DR+ (NR)	Kontrollen (n=12)			TR/T0a (n=18)			T1/T2 (n=9)			T6 (n=9)		
	% der Gesamtzahl	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	max
CD8+	<b>0,85</b>	4,35	0,24	<b>81,60</b>	94,70	35,30	<b>13,10</b>	27,50	8,19	<b>1,36</b>	2,52	0,19
CD4+	<b>0,61</b>	1,00	0,10	<b>15,75</b>	32,50	5,26	<b>1,98</b>	7,96	0,78	<b>0,35</b>	3,55	0,02
$\delta 2+$	<b>0,34</b>	1,46	0,04	<b>40,40</b>	80,40	12,20	<b>2,75</b>	27,10	0,32	<b>0,08</b>	1,22	0,00
$\delta 1+$	<b>0,76</b>	6,99	0,10	<b>31,60</b>	68,10	8,25	<b>8,54</b>	11,50	2,45	<b>0,88</b>	1,95	0,00
$\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$	<b>1,64</b>	4,40	0,35	<b>49,70</b>	78,70	7,91	<b>8,82</b>	19,20	5,57	<b>0,95</b>	2,03	0,00

**Tabelle 28: P-Werte zur Expression der Aktivierungsmarker berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test.**

NR= ohne Ruhephase über Nacht.

P-Werte CD38+, HLA-DR+ (NR)	K vs. TR/T0a	K vs. T1/T2	K vs. T6	TR/T0a vs. T1/T2	TR/T0a vs. T6	T1/T2 vs. T6
CD8+	0,000003	0,000082	0,96	<0,000001	<0,000001	0,000041
CD4+	0,000003	0,00037	0,96	0,000012	<0,000001	0,024
$\delta 2+$	0,000003	0,0025	0,36	0,000044	<0,000001	0,000288
$\delta 1+$	0,000003	0,00099	0,96	0,000019	<0,000001	0,000041
$\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$	0,000003	0,000082	0,093	0,000029	<0,000001	0,000041

**Tabelle 29: Median mit Minimum und Maximum zur Expression von CD38 und HLA-DR.**

R= mit Ruhephase über Nacht.

CD38+, HLA-DR+ (R)	Kontrollen (n=4)			TR/T0a (n=9)			T1/T2 (n=8)			T6 (n=3)		
	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	max	Min
<b>CD8+</b>	<b>2,28</b>	4,63	0,78	<b>11,20</b>	65,40	2,19	<b>4,26</b>	10,6	0,50	<b>1,86</b>	2,46	1,67
<b>CD4+</b>	<b>2,22</b>	3,96	1,76	<b>2,30</b>	10,70	0,23	<b>1,50</b>	3,12	0,06	<b>1,71</b>	2,06	1,36
<b>δ2+</b>	<b>2,29</b>	6,08	0,50	<b>24,60</b>	36,30	1,70	<b>2,56</b>	7,91	0,19	<b>0,94</b>	1,46	0,32
<b>δ1+</b>	<b>2,84</b>	11,70	2,15	<b>6,58</b>	38,50	0,70	<b>3,25</b>	13,30	0,56	<b>1,27</b>	1,31	1,21
<b>γδ+δ1-δ2-</b>	<b>7,71</b>	26,10	1,59	<b>30,70</b>	78,20	17,70	<b>9,55</b>	17,80	1,27	<b>1,65</b>	1,81	1,07

**Tabelle 30: P-Werte zur Expression von CD38 und HLA-DR berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test.**

R= mit Ruhephase über Nacht.

P-Werte CD38+, HLA-DR+ (R)	K vs. TR/T0a	K vs. T1/T2	K vs. T6	TR/T0a vs. T1/T2	TR/T0a vs. T6	T1/T2 vs. T6
<b>CD8+</b>	0,050	0,37	>0,99	0,046	0,036	0,63
<b>CD4+</b>	0,83	0,15	0,23	0,11	0,48	0,78
<b>δ2+</b>	0,034	0,93	0,23	0,0037	0,0091	0,28
<b>δ1+</b>	0,71	>0,99	0,057	0,42	0,064	0,30
<b>γδ+δ1-δ2-</b>	0,020	>0,99	0,23	0,00017	0,0091	0,048

Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

Tabelle 31: P-Werte für die Analyse der Differenzierungsmarker (berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test).

P-Werte (NR)									
T-Zellpopulation	Differenzierungsmarker	K vs. TR/T0a	TR/T0a vs. T6	Differenzierungsmarker	K vs. TR/T0a	TR/T0a vs. T6	Differenzierungsmarker	K vs. TR/T0a	TR/T0a vs. T6
CD8+	CD45RA+, CCR7+	0,00019	0,000029	CD27+, CD45RA+	0,0011	0,000041	CD27+, CD28+	0,079	0,27
	CD45RA-, CCR7+	0,97	0,40	CD27+, CD45RA-	0,000012	0,000041	CD27+, CD28-	0,028	0,000003
	CD45RA-, CCR7-	0,000027	0,000041	CD27-, CD45RA-	0,16	0,00077	CD27-, CD28+	0,000002	0,046
	CD45RA+, CCR7-	0,00079	0,0010	CD27-, CD45RA+	0,0031	0,046	CD27-, CD28-	0,81	0,0072
CD4+	CD45RA+, CCR7+	0,88	0,27	CD27+, CD45RA+	0,62	0,32	CD27+, CD28+	0,27	0,0024
	CD45RA-, CCR7+	0,047	0,12	CD27+, CD45RA-	0,98	0,60	CD27+, CD28-	0,60	0,046
	CD45RA-, CCR7-	0,16	0,07	CD27-, CD45RA-	0,55	0,041	CD27-, CD28+	0,19	0,0075
	CD45RA+, CCR7-	0,35	0,57	CD27-, CD45RA+	0,26	0,77	CD27-, CD28-	0,17	0,0041
δ2+	CD45RA+, CCR7+	0,15	0,68	CD27+, CD45RA+	0,35	0,68	CD27+, CD28+	0,52	0,73
	CD45RA-, CCR7+	0,79	0,08	CD27+, CD45RA-	0,52	0,05	CD27+, CD28-	0,042	0,0054
	CD45RA-, CCR7-	0,052	0,95	CD27-, CD45RA-	0,32	0,07	CD27-, CD28+	0,66	0,027
	CD45RA+, CCR7-	0,053	0,54	CD27-, CD45RA+	0,27	0,32	CD27-, CD28-	0,57	0,045
δ1+	CD45RA+, CCR7+	0,93	0,23	CD27+, CD45RA+	0,58	0,32	CD27+, CD28+	0,59	0,70
	CD45RA-, CCR7+	0,23	0,18	CD27+, CD45RA-	0,0044	0,018	CD27+, CD28-	0,50	0,09
	CD45RA-, CCR7-	0,0043	0,12	CD27-, CD45RA-	0,88	0,91	CD27-, CD28+	0,13	0,85
	CD45RA+, CCR7-	0,0027	0,0035	CD27-, CD45RA+	0,024	0,32	CD27-, CD28-	0,20	0,90
γδ+δ1-δ2-	CD45RA+, CCR7+	0,49	0,82	CD27+, CD45RA+	0,010	0,0015	CD27+, CD28+	0,79	0,30
	CD45RA-, CCR7+	0,0076	0,066	CD27+, CD45RA-	0,000002	0,011	CD27+, CD28-	0,00013	0,023
	CD45RA-, CCR7-	0,0013	0,018	CD27-, CD45RA-	0,00064	0,0072	CD27-, CD28+	0,0027	0,60
	CD45RA+, CCR7-	0,0036	0,00059	CD27-, CD45RA+	<0,000001	0,82	CD27-, CD28-	0,000021	0,019

**Tabelle 32: Mediane mit Minimum und Maximum zur Expression von CD16 und CX3CR1 auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen**

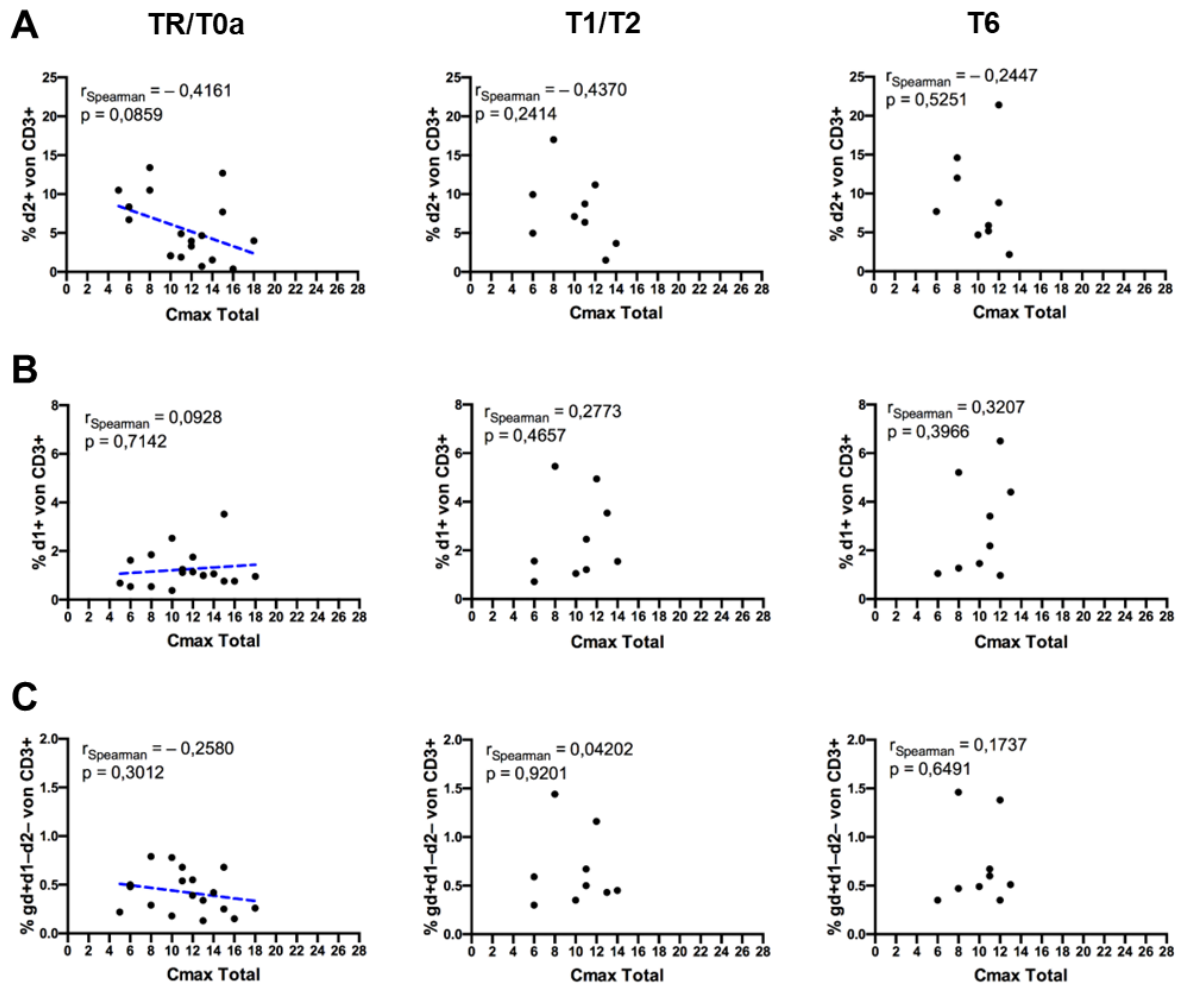
% von $\gamma\delta$ -Subpopulation	$\delta 2+$				$\delta 1+$				$\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$			
	Kontrolle	TR/T0a	T1/T2	T6	Kontrolle	TR/T0a	T1/T2	T6	Kontrolle	TR/T0a	T1/T2	T6
<b>CD16+</b>	30.05 (12.3-42.3)	25.35 (14.7-48.0)	21.00 (3.6-35.2)	32.4 (12.5-47.1)	3.02 (1.2-46.1)	4.59 (1.8-63.5)	5.51 (2.5-47.9)	5.69 (0.7-54.4)	4.56 (1.2-76.1)	5.53 (3.2-10.3)	3.09 (1.9-5.9)	2.39 (0.0-18.9)
<b>CX3CR1+</b>	8.22 (2.9-27.4)	7.35 (0.6-41.1)	17.60 (3.1-44.6)	4.23 (0.9-64.0)	9.33 (0.4-57.3)	8.24 (1.4-41.4)	14.50 (3.6-27.9)	5.12 (0.6-32.7)	11.71 (3.0-27.8)	14.55 (2.1-43.3)	10.40 (4.6-27.8)	2.20 (0.8-33.7)

**Tabelle 33: P-Werte zur Expression von CD16 auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen** (berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test)

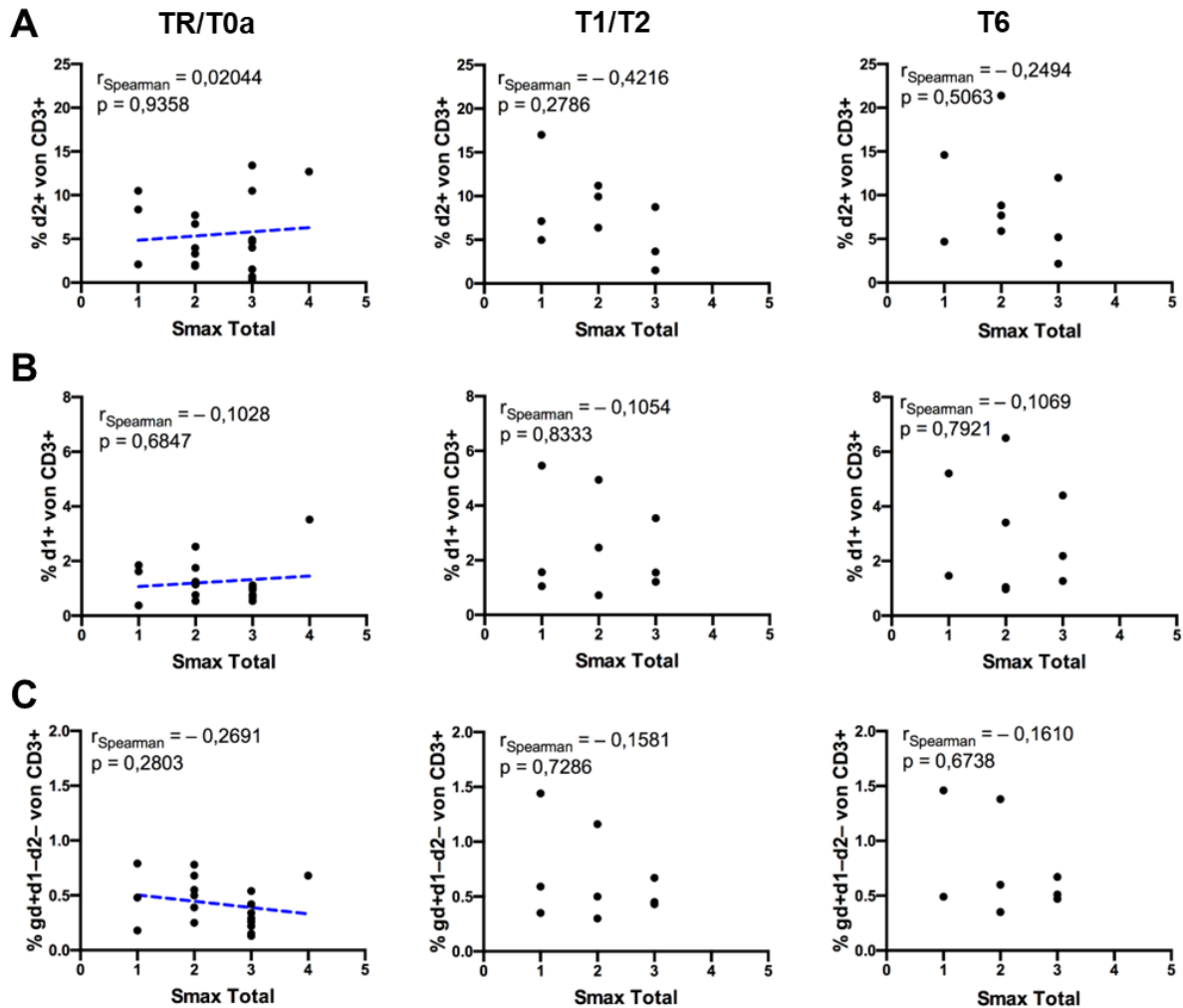
P-Werte (NR)	K vs. TR/T0a	TR/T0a vs. T6	TR/T0a vs. T1/T2	T1/T2 vs. T6
$\delta 2+$		0,37	0,81	0,23
$\delta 1+$		0,14	0,68	0,89
$\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$		0,53	0,032	0,0018

**Tabelle 34: P-Werte zur Expression von CX3CR1 auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen** (berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test)

P-Werte (NR)	K vs. TR/T0a	TR/T0a vs. T6	TR/T0a vs. T1/T2	T1/T2 vs. T6
$\delta 2+$		0,98	0,72	0,11
$\delta 1+$		>0,99	0,28	0,14
$\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$		0,70	0,0055	0,64

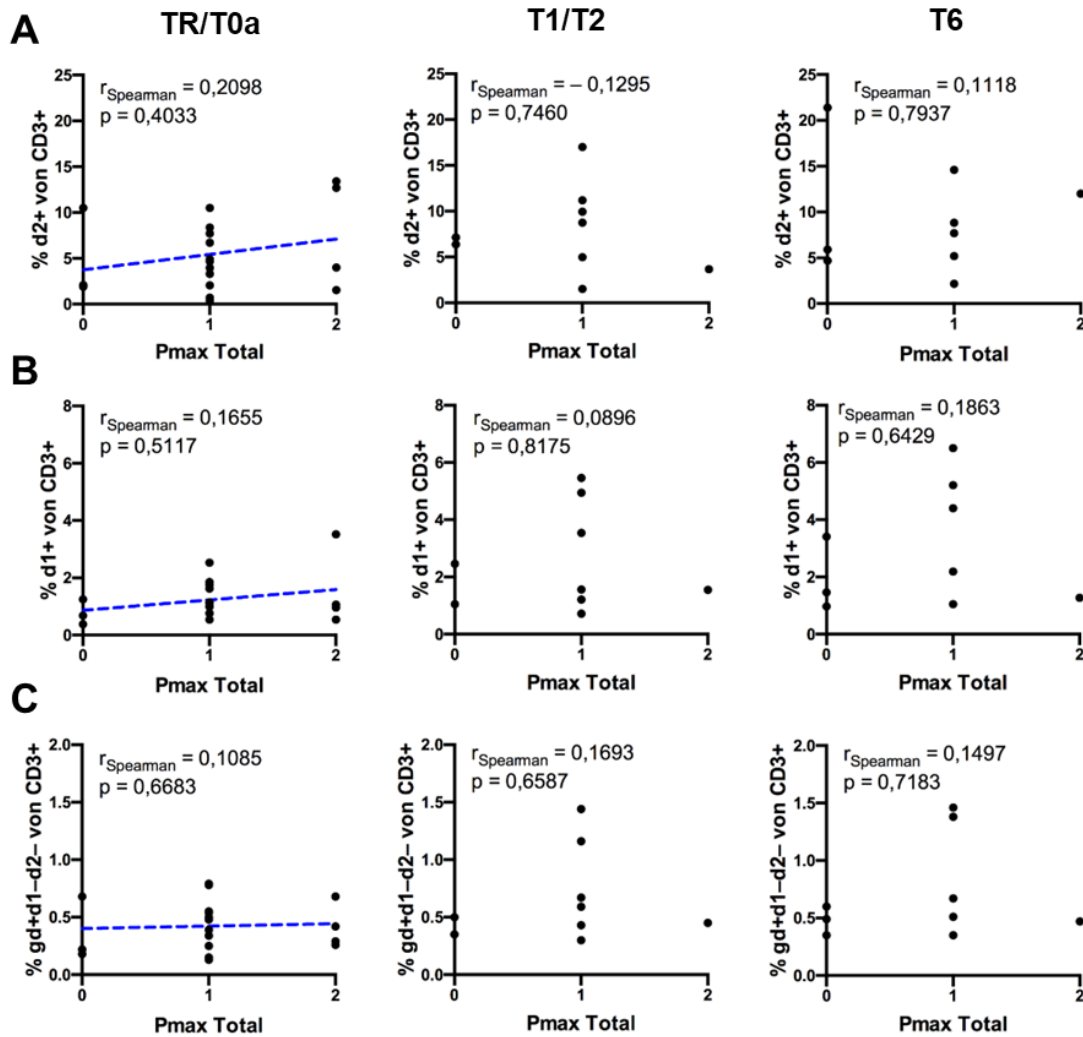


**Abbildung 31: Korrelation des Gesamtscores Cmax (maximale Anzahl pathologischer Befunde) über alle Zeitpunkte hinweg mit dem Anteil der  $\delta 2+$  T-Zellen (A),  $\delta 1+$  T-Zellen (B) und  $\gamma \delta + \delta 1 - \delta 2-$  T-Zellen (C) (bezogen auf die Gesamtzahl CD3+ T-Zellen) zu den drei analysierten Zeitpunkten. Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman für alle Zeitpunkte berechnet und mit den zugehörigen p-Werten in den einzelnen Grafiken abgebildet. Aufgrund einer zu geringen Anzahl an Datenpunkten wurde für die Zeitpunkte T1/T2 und T6 keine Regressionsgerade eingezeichnet. Für TR/T0a ist die Regressionsgerade als blau-gestrichelte Linie dargestellt.**



**Abbildung 32: Korrelation des Gesamtscores Smax (Schweregrad) über alle Zeitpunkte hinweg mit dem Anteil der  $\delta 2+$  T-Zellen (A), der  $\delta 1+$  T-Zellen (B) und der  $\gamma\delta + \delta 1 - \delta 2 -$  T-Zellen (C) (bezogen auf die Gesamtzahl der CD3+ T-Zellen) zu den drei analysierten Zeitpunkten (TR/T0a, T1/T2, T6). Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman für alle Zeitpunkte berechnet und mit den zugehörigen p-Werten in den einzelnen Grafiken abgebildet. Aufgrund einer zu geringen Anzahl an Datenpunkten wurde für die Zeitpunkte T1/T2 und T6 keine Regressionsgerade eingezeichnet. Für TR/T0a ist die Regressionsgerade als blau-gestrichelte Linie dargestellt.**





**Abbildung 33: Korrelation des Gesamtscores Pmax (maximale Protraktion) mit dem Anteil der  $\delta 2+$  T-Zellen (A), der  $\delta 1+$  T-Zellen (B) und der  $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$  T-Zellen (C) (bezogen auf die Gesamtzahl der CD3+ T-Zellen) zu den drei analysierten Zeitpunkten (TR/T0a, T1/T2, T6).** Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman für alle Zeitpunkte berechnet und mit den zugehörigen p-Werten in den einzelnen Grafiken abgebildet. Aufgrund einer zu geringen Anzahl an Datenpunkten wurde für die Zeitpunkte T1/T2 und T6 keine Regressionsgerade eingezeichnet. Für TR/T0a ist die Regressionsgerade als blau-gestrichelte Linie dargestellt.

# IMMUC-Score



**IMMUC Score**

Patient ID: EP- .... ..

**Maximal IM complexitiy (C<sub>max</sub>):** “number of affected sites” (not included in Stage)

**Maximal IM severity (S<sub>max</sub>):** Mild (s1), moderate (s2), severe (s3), very severe (s4), lethal (s5)

**Maximal IM protraction (P<sub>max</sub>):** short (p0), mild at T1 (p1), mild at T6 (p2), moderate at T1 (p3), moderate at T6 (p4), (very) severe at T1 (p5), (very) severe at T6 (p6)

(P<sub>neu</sub>): s0 at T1+T6 (p0), s1-5 at T1 + s0 at T6 (p1), s1-5 at T6 (p2) (except s1 for 03. Lymphadenopathy and/or 05. splenomegaly)

**Comment:** S<sub>max</sub>: Findings *must not be present at this extent* before IM onset

P<sub>max</sub>: Findings *have to be related to* IM

**Max. Clinical Score (Clin<sub>max</sub>):**

c \_\_\_ s \_\_\_ p \_\_\_      c \_\_\_ s \_\_\_ p \_\_\_      P<sub>neu</sub> \_\_\_

**Max. Laboratory Score (Lab<sub>max</sub>):**

T1: c \_\_\_ s \_\_\_ p \_\_\_      T6: c \_\_\_ s \_\_\_ p \_\_\_

**Max. IM Score (IM<sub>max</sub>):**

c \_\_\_ s \_\_\_ p \_\_\_      c \_\_\_ s \_\_\_ p \_\_\_

Stage:  I    a  
 II    a    b  
T1    III    a    b    c  
 IV    a    b    c    d  
 V    a

Stage:  I    a  
 II    a    b  
T6    III    a    b    c  
 IV    a    b    c    d  
 V    a

Stage	Grade <sub>max</sub>
I mild	
a	s1
II moderate	
a	s2
b	p1
III severe	
a	s3
b	p2
c	p3
IV very severe	
a	s4
b	p4
c	p5
d	p6
V lethal	
a	s5

**Missing visits:**  T0a    T1    T6    T5-7 (attach \* at Score and Stage)

**Missing values:**  T \_\_\_

**Comments:** \_\_\_\_\_

Clinical Score – Tab. 1																				
Clin <sub>max</sub>																				
Datum																				
Name of investigating IMMUC team member																				
Visit (ID-)														C <sub>max</sub>	S <sub>max</sub>	P <sub>max</sub>				
Visit Location																				
Time point (T)	To	t-0	0	t-0a	0a	0b	t-1	1	2	3	4	5	t-6	6	6*	7	≥8			
Date																				
Days after Tonset (To)																				
Initials of Investigator																				
01. Fever																				
T1																				
T6, final*																				
No	s0																			
≥ 38.5 – 39.4°C	s1																			
≥ 39.5°C	s2																			
Antibiotics*																				
No information	sx																			
Comments																				
02. Fatigue																				
T1																				
T6, final*																				
No	s0																			
Can walk alone	s1																			
Assisted walking, →T6: reduced education/work/club sports	s2																			
Can not walk	s3																			
No information	sx																			
Comments																				

IMMUC-Score

Patient ID: EP- .... ..

																Clinical Score – Tab. 2				
Time point (T)	To	t-0	0	t-0a	0a	0b	t-1	1	2	3	4	5	t-6	6	6*	7	≥8	C <sub>max</sub>	S <sub>max</sub>	P <sub>max</sub>
<b>03. Lymphadenopathy</b>																T1				
																T6, final*				
No	s0																			
Enlarged nodes	s1																			
Painful nodes																				
Movement locally impaired	s2																			
Antibiotics*																				
CT/MRT	s3																			
Biopsy (BMP/ LN)	s4																			
No information	sx																			
Comments																				
<b>04. Tonsillopharyngitis</b>																T1				
																T6, final*				
No	s0																			
Sore throat, pain killers	s1																			
Snoring/upper respiratory tract obstruction																				
„Tonsillitis“																				
Antibiotics*	s2																			
Steroids	s3																			
Oxygen supply																				
Tonsillotomy	s4																			
No information	sx																			
Comments																				
<b>05. Splenomegaly</b>																T1				
																T6, final*				
No	s0																			
Ultras. >100-119%, not palp.	s1																			
Palpable																				
Ultras. >120%	s2																			
Rupture	s4																			
Surgery																				
No information	sx																			
Comments																				
<b>06. Facial edema</b>																T1				
																T6, final*				
No	s0																			
No visual impairment	s1																			
Partial visual impairment	s2																			
Antihistamines																				
Antibiotics due to lid phlegmon																				
Complete visual impairment	s3																			
Steroids																				
No information	sx																			
Comments																				

Patient ID: EP- .... ..

Clinical Score – Tab. 3																	C <sub>max</sub>	S <sub>max</sub>	P <sub>max</sub>		
Time point (T)	To	t-0	0	t-0a	0a	0b	t-1	1	2	3	4	5	t-6	6	6*	7	≥8				
<b>07. Exanthema</b>																					
T1																					
T6, final*																					
No	s0																				
Maculopapulous w/o Aminop.	s1																				
Maculopapulous post Aminop.																					
Aphthae	s2																				
Itching a/o pain																					
Antihistamines																					
Local steroids																					
Erythema nodosum	s3																				
Bullae																					
Steroids																					
Biopsy	s4																				
Necrosis																					
No information	sx																				
Comments																					
<b>08. Bleeding, Treatment of bleeding or anemia</b>																					
T1																					
T6, final*																					
No	s0																				
nose bleeding (≤10min)	s1																				
Hematoma (≤10cm)																					
Petechiae	s2																				
Hematoma (>10cm)																					
Cyclocapr. acid as anticoagulans																					
nose bleeding (>10min a/o >3x/d)	s3																				
Oral blood bullae																					
Steroids	s4																				
„Evans syndr.“																					
Organ bleeding																					
Rituximab																					
Transfusion	sx																				
Plasmapheresis																					
No information																					
Comments																					
<b>09. Thrombembolism</b>																					
T1																					
T6, final*																					
No	s0																				
Prophylactic anticoagulation	s2																				
Extremities	s3																				
Organs, CNS	s4																				
No information	sx																				
Comments																					
<b>10. Cardiovascular</b>																					
T1																					
T6, final*																					
No	s0																				
Vertigo	s1																				
„Karditis“	s3																				
ECG pathology																					
ECHO pathology																					
Med. treat. for arrhythmia, art. Hypotension a/o heart failure etc.	s4																				

## IMMUC-Score

No information	sx																					
Comments																						

**Patient ID:** EP- ....

Clinical Score – Tab. 4																					
Time point (T)	To	t-0	0	t-0a	0a	0b	t-1	1	2	3	4	5	t-6	6	6*	7	≥8	C <sub>max</sub>	S <sub>max</sub>	P <sub>max</sub>	
<b>11. Other airways</b>																		T1			
																		T6, final*			
No	s0																				
Otitis	s1																				
Rhinitis																					
Hoarseness																					
Cough																					
Stress-related mild dyspnoe	s2																				
Parotitis																					
Swollen a/o tender tongue																					
Antibiotics*																					
Local steroids	s3																				
Oxygen supply																					
Steroids																					
X-ray thorax																					
"Pneumonia"	s4																				
CT thorax																					
Paracentesis/ear ventilation tube/ adenoidectomy																					
Thoracic drainage																					
Mech. ventilation	sx																				
No information																					
Comments																					
<b>12. Hepatic failure</b>																		T1			
																		T6, final*			
No	s0																				
Drugs a/o diet for hepatic failure	s4																				
No information	sx																				
Comments																					
<b>13. Other gastrointestinal</b>																		T1			
																		T6, final*			
No	s0																				
Abdominal pain	s1																				
Nausea, vomiting																					
Watery diarrhea	s2																				
Melaena a/o Hematemesis																					
Antiemetics																					
Weight loss >10%, possibly not only EBV																					
Weight loss >10%	s3																				
"acute abdomen, pancreatitis, appendic., ileus"																					
Abdominal X-ray, CT/MRT																					
Antibiotics*																					
Endoscopy	s4																				
Surgery																					
No information	sx																				
Comments																					

IMMUC-Score

Patient ID: EP- .... ..

																	Clinical Score – Tab. 5			
Time point (T)	To	t-0	0	t-0a	0a	0b	t-1	1	2	3	4	5	t-6	6	6*	7	≥8	C <sub>max</sub>	S <sub>max</sub>	P <sub>max</sub>
<b>14. Urogenital</b>																	T1			
																	T6, final*			
No	s0																			
Dysuria	s1																			
Genital ulcer	s2																			
Gross hematuria																				
Antibiotics*	s3																			
"Nephrot. syndr."																				
"Nephritis"																				
Nephrol. drug treatment	s4																			
Dialysis																				
Renal biopsy	sx																			
No information																				
Comments																				
<b>15. Neurological</b>																	T1			
																	T6, final*			
No	s0																			
Headache	s1																			
Meningism	s2																			
Lumbar puncture																				
Antibiotics*	s3																			
Seizure																				
Documented meningitis																				
Neurolog. drug 1x	s4																			
CT/MRT																				
EEG, NLG, EP																				
Neurolog. drug > 1x																				
"Encephalitis"	sx																			
"Neuritis"																				
No information																				
Comments																				
<b>16. Musculoskeletal</b>																	T1			
																	T6, final*			
No	s0																			
Body aches	s1																			
Painkillers for body aches	s2																			
Joint swelling																				
Joint ultrasound	s3																			
Pain-related immobilisation																				
No information	sx																			
Comments																				
<b>17. Imminent or treatment for HLH</b>																	T1			
																	T6, final*			
No	s0																			
4 of 8 criteria fulfilled	s3																			
Steroids																				
Other HLHdrug(s)	s4																			
Stem cell Tx																				
No information	sx																			
Comments																				

# IMMUC-Score

Patient ID: EP- .... ..

Clinical Score – Tab. 5																				
Time point (T)	To	t-0	0	t-0a	0a	0b	t-1	1	2	3	4	5	t-6	6	6*	7	≥8	C <sub>max</sub>	S <sub>max</sub>	P <sub>max</sub>
<b>18. Resuscitation</b>																				
T1																				
T6, final*																				
No	s0																			
Yes, alive	s4																			
Yes, dead	s5																			
No information	sx																			
Comments																				
<b>19. Hospitalization</b>																				
T1																				
T6, final*																				
No	s0																			
Normal ward < 8d	s2																			
Normal ward ≥8d a/o intermediate care unit	s3																			
ICU	s4																			
No information	sx																			
Comments																				

IMMUC-Score

Patient ID: EP- .... ..

Laboratory Score – Tab. 1																	c	s	p		
Time point (T)	To	t-0	0	t-0a	0a	0b	t-1	1	2	3	4	5	t-6	6	6*	7	≥8	Lab <sub>max</sub>	C <sub>max</sub>	S <sub>max</sub>	P <sub>max</sub>
<b>20. Lymphocytosis</b>																					
																	T1				
																	T6, final*				
No	s0																				
≥ 1,5x normal (%)	s1																				
No information	sx																				
Comments																					
<b>21. Neutropenia</b>																					
																	T1				
																	T6, final*				
No	s0																				
1.0 - 1.49 G/l	s1																				
0.5 - 0.99 G/l	s2																				
< 0.5 G/l	s3																				
No information	sx																				
Comments																					
<b>22. Anemia</b>																					
																	T1				
																	T6, final*				
No	s0																				
9.0 - 10.0 g/dl	s1																				
7.0 - 8.9 g/dl	s2																				
5.0 - 6.9 g/dl	s3																				
< 5 g/dl	s4																				
RPI >3																					
RPI <2																					
No information	sx																				
Comments																					
<b>23. Thrombocytopenia</b>																					
																	T1				
																	T6, final*				
No	s0																				
50 - 149 G/l	s1																				
30 - 49 G/l	s2																				
10 - 29 G/l	s3																				
< 10 G/l	s4																				
No information	sx																				
Comments																					
<b>24. Hyperferritinemia</b>																					
																	T1				
																	T6, final*				
No	s0																				
≥ 100 ug/l > n.	s1																				
≥ 500 - 999 ug/l	s2																				
≥ 1000 - 4999 ug/l	s3																				
≥ 5000 ug/l	s4																				
No information	sx																				
Comments																					
<b>25. Hepatitis, Cholangitis</b>																					
																	T1				
																	T6, final*				
No	s0																				
GPT u/o GOT	s1																				
2,0 - 9,9 x normal																					
GPT u/o GOT	s2																				
10,0 - 19,9 x n.																					
GPT u/o GOT	s3																				
≥20,0 x n.																					
Amm. ↑, CHE ↓	s4																				
u/o Quick < 50%																					
No information	sx																				
Comments																					



IMMUC-Score

Patient ID: EP- ....

															Laboratory Score – Tab. 1					
Time point (T)	To	t-0	0	t-0a	0a	0b	t-1	1	2	3	4	5	t-6	6	6*	7	≥8	C <sub>max</sub>	S <sub>max</sub>	P <sub>max</sub>
<b>26. Nephropathy*</b>																				
																		T1		
																		T6, final*		
No	s0																			
Crea ↑ ≤ 0,2 mg/dl over norm	s1																			
Crea ↑ > 0,2 mg/dl over n., but < 1,5 mg/dl (<10a)	s2																			
Crea ↑ ≥ 0,2 mg/dl over n., but < 2,0 mg/dl (≥10a)																				
Crea ↑ ≥ 1,5 mg/dl (<10a)	s3																			
Crea ≥ 2,0 mg/dl (≥10a)																				
No information	sx																			
Comments																				
<b>27. Crp elevation (with symptomatic EBV-IM)</b>																				
																		T6, final*		
No	s0																			
> 10 – 99 mg/l	s1																			
100 – 199 mg/l	s2																			
Antibiotics * 2°Crp elevation																				
≥ 200 mg/l	s3																			
No information	sx																			
Comments																				
<b>28. Additional HLH markers</b>																				
																		T1		
																		T6, final*		
Not done	s0																			
sCD25 ≥2.4 kU/ml only	s3																			
NK cell activity decreased only																				
Hemophagocytosis is detected in bone marrow, spinal fluid a/o lymph node only	s4																			
NK cell activity absent only																				
All three s3																				
Comments																				

\* Cystatin C level has to be elevated over normal together with creatinine elevation to indicate nephropathy.

**Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung 1: Einteilung der Differenzierung der T-Zellen anhand der Oberflächenmarker CD45RA und CCR7. ....	15
Abbildung 2: Arbeitsschritte eines durchflusszytometrischen Experiments. ....	24
Abbildung 3: Titrationsen der Antikörper, die für die in dieser Arbeit entwickelten Panel verwendet wurden. ....	36
Abbildung 4: Analyse der Interferenzen der kombinierten Färbung mit einem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper und einem anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörper. ....	43
Abbildung 5: (A) Titration des anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörpers (Klon B6) konjugiert mit FITC. (B) Titration des anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpers (Klon 11F2) konjugiert mit PE-Cy7. ....	44
Abbildung 6: Titration drei verschiedener anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper (Klon B1 konjugiert mit PE (A) und Klon 11F2 konjugiert mit PE-Cy7 (B) und PE (C)) und des anti-V $\delta$ 2-TCR-Antikörpers (Klon B6) konjugiert mit PerCP (D). ....	45
Abbildung 7: Evaluierung zwei verschiedener Klone (B1 und 11F2) des anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpers. ....	46
Abbildung 8: Titration zwei verschiedener anti-V $\delta$ 2-TCR- (AB) und anti-V $\delta$ 1-TCR-Antikörper (CD). ....	47
Abbildung 9: Evaluierung verschiedener anti-V $\delta$ 2-TCR- (A) und anti-V $\delta$ 1-TCR-Antikörper (B) in Kombination mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Klon 11F2 konjugiert mit PE. ....	48
Abbildung 10: Titrationsen der vier verschiedenen Differenzierungsmarker CD27 (A), CD28 (B), CD45RA (C) und CCR7 (D). ....	50
Abbildung 11: Evaluierung der Differenzierungsmarker im Rahmen eines Multicolor-Experiments (hier: CD3+, CD14- T-Zellen). ....	51
Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung der Gating-Methode einer Patientenprobe (hier: IM-EP-A038-01) mit dem Differenzierungs-Panel. ....	53
Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung des Gatings der Differenzierungsmarker anhand der Färbung einer Patientenprobe (hier: IM-EP-A038-01). ....	54
Abbildung 14: Titrationsen des anti-HLA-DR-Antikörpers (A), des anti-CD38-Antikörpers (B), des anti-CX3CR1-Antikörpers (C) und des anti-CD16-Antikörpers (D). ....	56
Abbildung 15: Evaluierung der zwei Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR in einem Multicolor-Experiment. ....	57
Abbildung 16: Evaluierung von CD16 und CX3CR1 im Rahmen eines Multicolor-Experiments. ....	57
Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung der Gating-Methode der Färbung eines IM-Patienten (hier: IM-EP-A038-01) mit dem Aktivierungs-Panel. ....	59
Abbildung 18: Analyse der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR anhand der Färbung eines IM-Patienten (hier: IM-EP-A038-01). ....	60
Abbildung 19: Analyse von CD16 und CX3CR1 anhand der Färbung einer Probe eines IM-Patienten (hier: IM-EP-A038-01) mit dem Aktivierungs-Panel. ....	61
Abbildung 20: Zeitpunkte der Blutentnahmen der 36 Patienten mit IM, die in dieser Arbeit untersucht wurden. ....	62
Abbildung 21: (A) Maximale Anzahl der pathologischen Befunde (Complexity = Cmax, Werte von 1-28) zum Zeitpunkt der Studiervisite (at visit) mit Blutentnahme und (B) des maximalen Schweregrades (Severity = Smax, Werte von 1-5) zum Zeitpunkt der Studiervisite (at visit) mit Blutentnahme der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Patienten (n = 36). ....	63
Abbildung 22: Auswirkungen einer Ruhephase über Nacht auf die Vitalität der Lymphozyten. ....	64

Abbildung 23: Häufigkeiten der T-Zellen (CD3+, CD4+ und CD8+) sowie der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen als Anteil der gemessenen Lymphozyten bei IM-Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten (TR/T0a, T1/T2, T6) und bei einer gesunden Kontrollgruppe. ...	66
Abbildung 24: Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen sowie der CD4+ und CD8+ T-Zellen als Anteil der Gesamt-T-Zellen bei IM-Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten (TR/T0a, T1/T2 und T6) und bei einer gesunden Kontrollgruppe (Kontrollen).....	67
Abbildung 25: Verläufe der $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihrer Subgruppen bei den einzelnen Patienten im Verlauf der IM.....	68
Abbildung 26: Koexpression der Aktivierungsmarker (CD38 und HLA-DR) auf CD8+ und CD4+ T-Zellen sowie innerhalb der $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen ( $\delta 2+$ , $\delta 1+$ , $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ).....	70
Abbildung 27: Koexpression der Aktivierungsmarker, CD38 und HLA-DR, im Verlauf der IM auf den $\gamma\delta$ -T-Zellsubpopulationen und auf den CD8+ und CD4+ T-Zellen bei den einzelnen IM-Patienten.....	71
Abbildung 28: Expression der Differenzierungsmarker auf $\delta 2+$ , $\delta 1+$ und $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ T-Zellen im Vergleich mit CD8+ und CD4+ T-Zellen.....	73
Abbildung 29: Expression der Oberflächenmoleküle CD16 (A) und CX3CR1 (B) auf den $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen bei IM-Patienten und gesunden Kontrollen. ....	75
Abbildung 30: Korrelation der $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ T-Zellen (% CD3+) an TR/T0a mit dem Serumspiegel der Leberenzyme GPT und GOT zu demselben Zeitpunkt. Stichprobengröße n=18.....	79
Abbildung 31: Korrelation des Gesamtscores Cmax (maximale Anzahl pathologischer Befunde) über alle Zeitpunkte hinweg mit dem Anteil der $\delta 2+$ T-Zellen (A), $\delta 1+$ T-Zellen (B) und $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ T-Zellen (C) (bezogen auf die Gesamtzahl CD3+ T-Zellen) zu den drei analysierten Zeitpunkten. ....	111
Abbildung 32: Korrelation des Gesamtscores Smax (Schweregrad) über alle Zeitpunkte hinweg mit dem Anteil der $\delta 2+$ T-Zellen (A), der $\delta 1+$ T-Zellen (B) und der $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ T-Zellen (C) (bezogen auf die Gesamtzahl der CD3+ T-Zellen) zu den drei analysierten Zeitpunkten (TR/T0a, T1/T2, T6). ....	112
Abbildung 33: Korrelation des Gesamtscores Pmax (maximale Protraktion) mit dem Anteil der $\delta 2+$ T-Zellen (A), der $\delta 1+$ T-Zellen (B) und der $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ T-Zellen (C) (bezogen auf die Gesamtzahl der CD3+ T-Zellen) zu den drei analysierten Zeitpunkten (TR/T0a, T1/T2, T6). ....	113
.....	
Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte.....	26
Tabelle 2: Technische Spezifitäten des Durchflusszytometers LSR-Fortessa von BD (BD, 2016).....	26
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien und weiteres Equipment .....	27
Tabelle 4: Reagenzien und Stammlösungen .....	27
Tabelle 5: Zusammensetzung der Stammlösungen und Puffer.....	27
Tabelle 6: Zytokine und kommerzielle Kits.....	28
Tabelle 7: Spezifitäten und Eigenschaften der verwendeten Antikörper .....	29
Tabelle 8: Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit Infektiöser Mononukleose (n=36).....	31
Tabelle 9: Eigenschaften der gesunden erwachsenen Kontrollen (n=15) .....	32
Tabelle 10: Computerprogramme zur Auswertung und Darstellung der Daten .....	32
Tabelle 11: Verschiedene Oberflächenmarker zur durchflusszytometrischen Analyse humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen .....	49
Tabelle 12: Eigenschaften der im „Differenzierungs-Panel“ enthaltenen Antikörper.....	52

Tabelle 13: Eigenschaften der im Aktivierungs-Panel verwendeten Antikörper.....	58
Tabelle 14: Korrelation der Häufigkeiten der CD8+ und CD4+ T-Zellen und der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen ( $\delta 2+$ , $\delta 1+$ , $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) an TR/T0a mit ausgewählten klinischen Parametern zum selben Zeitpunkt. ....	77
Tabelle 15: Korrelation der Aktivierung der CD8+ und CD4+ T-Zellen und der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen ( $\delta 2+$ , $\delta 1+$ , $\gamma\delta+\delta 1-\delta 2-$ ) an TR/T0a mit ausgewählten klinischen Parametern zum selben Zeitpunkt. ....	78
Tabelle 16: Übersicht über das gemessene Probenmaterial der IM-Patienten.....	99
Tabelle 17: Übersicht über die gemessenen gesunden Kontrollproben .....	102
Tabelle 18: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf die Anzahl der durchflusszytometrisch bestimmten Lymphozyten) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. ....	103
Tabelle 19: P-Werte für die Unterschiede in den Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen sowie der CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen (bezogen auf alle Lymphozyten) zwischen den Zeitpunkten nach IM sowie im Vergleich mit der Kontrollgruppe.....	103
Tabelle 20: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle Lymphozyten) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. ....	104
Tabelle 21: P-Werte für die Unterschiede in den Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen sowie der CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen (bezogen auf alle Lymphozyten) zwischen den Zeitpunkten nach IM sowie im Vergleich mit der Kontrollgruppe.....	104
Tabelle 22: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle T-Zellen) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. ....	105
Tabelle 23: P-Werte für die Unterschiede der Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle CD3+ T-Zellen) zwischen den einzelnen Zeitpunkten nach IM und der gesunden Kontrollgruppe.....	105
Tabelle 24: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle CD3+ T-Zellen) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. ....	106
Tabelle 25: P-Werte für die Unterschiede der Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen und der CD8+ und CD4+ T-Zellen (bezogen auf alle CD3+ T-Zellen) zwischen den einzelnen Zeitpunkten nach IM und der gesunden Kontrollgruppe.....	106
Tabelle 26: Median mit Minimum und Maximum sowie Mittelwert mit Standardabweichung für die Häufigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellsubgruppen (bezogen auf alle $\gamma\delta$ -T-Zellen) bei den IM-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.....	107
Tabelle 27: Median mit Maximum und Minimum zur Expression der Aktivierungsmarker. ...	107
Tabelle 28: P-Werte zur Expression der Aktivierungsmarker berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test. ....	107
Tabelle 29: Median mit Minimum und Maximum zur Expression von CD38 und HLA-DR...	108
Tabelle 30: P-Werte zur Expression von CD38 und HLA-DR berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test. ....	108
Tabelle 31: P-Werte für die Analyse der Differenzierungsmarker (berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test). ....	109
Tabelle 32: Mediane mit Minimum und Maximum zur Expression von CD16 und CX3CR1 auf $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	110

Tabelle 33: P-Werte zur Expression von CD16 auf $\gamma\delta$ -T-Zellen (berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test) .....	110
Tabelle 34: P-Werte zur Expression von CX3CR1 auf $\gamma\delta$ -T-Zellen (berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test) .....	110

## Literaturverzeichnis

### Zeitschriftenartikel

- Agrati, C., D'Offizi, G., Narciso, P., Abrignani, S., . . . Poccia, F. (2001). Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons. *Mol Med*, 7(1), 11-19. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1949990/pdf/11474123.pdf>
- Alpert, G., & Fleisher, G. R. (1984). Complications of infection with Epstein-Barr virus during childhood: a study of children admitted to the hospital. *Pediatr Infect Dis*, 3(4), 304-307. doi:10.1097/00006454-198407000-00005
- Amyes, E., Hatton, C., Montamat-Sicotte, D., Gudgeon, N., . . . Callan, M. F. C. (2003). Characterization of the CD4+ T Cell Response to Epstein-Barr Virus during Primary and Persistent Infection. *Journal of Experimental Medicine*, 198(6), 903-911. doi:10.1084/jem.20022058
- Andreu-Ballester, J. C., Garcia-Ballesteros, C., Benet-Campos, C., Amigó, V., . . . Ballester, F. (2012). Values for  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: assessment by age and gender. *Cytometry B Clin Cytom*, 82(4), 238-244. doi:10.1002/cyto.b.21020
- Angelini, D. F., Borsellino, G., Poupot, M., Diamantini, A., . . . Battistini, L. (2004). Fc $\gamma$ RIII discriminates between 2 subsets of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood*, 104(6), 1801-1807. doi:10.1182/blood-2004-01-0331
- Appay, V., van Lier, R. A., Sallusto, F., & Roederer, M. (2008). Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*, 73(11), 975-983. doi:10.1002/cyto.a.20643
- Argentati, K., Re, F., Donnini, A., Tucci, M. G., . . . Provinciali, M. (2002). Numerical and functional alterations of circulating gammadelta T lymphocytes in aged people and centenarians. *J Leukoc Biol*, 72(1), 65-71. Retrieved from <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1189/jlb.72.1.65?download=true>
- Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Chaudhary, V., . . . Bendelac, A. (2012). The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant V $\delta$ 1 TCR. *Eur J Immunol*, 42(9), 2505-2510. doi:10.1002/eji.201242531
- Balfour, H. H., Jr., Dunmire, S. K., & Hogquist, K. A. (2015). Infectious mononucleosis. *Clin Transl Immunology*, 4(2), e33. doi:10.1038/cti.2015.1
- Balfour, H. H., Jr., Odumade, O. A., Schmeling, D. O., Mullan, B. D., . . . 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., . . . 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
- Barros-Martins, J., Bruni, E., Fichtner, A. S., Cornberg, M., . . . Prinz, I. (2022). OMIP-084: 28-color full spectrum flow cytometry panel for the comprehensive analysis of human  $\gamma\delta$  T cells. *Cytometry A*. doi:10.1002/cyto.a.24564
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., . . . Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428), 727-729. doi:10.1126/science.285.5428.727
- Bertotto, A., De Benedictis, F. M., Vagliasindi, C., Radicioni, M., . . . Vaccaro, R. (1997). Gamma delta T cells are decreased in the blood of children with Bordetella pertussis infection. *Acta Paediatr*, 86(1), 114-115. doi:10.1111/j.1651-2227.1997.tb08844.x
- Beucke, N., Wesch, D., Oberg, H. H., Peters, C., . . . Wistuba-Hamprecht, K. (2020). Pitfalls in the characterization of circulating and tissue-resident human  $\gamma\delta$  T cells. *J Leukoc Biol*, 107(6), 1097-1105. doi:10.1002/jlb.5ma1219-296r

- Bhaduri-McIntosh, S., Rotenberg, M. J., Gardner, B., Robert, M., . . . Miller, G. (2008). Repertoire and frequency of immune cells reactive to Epstein-Barr virus-derived autologous lymphoblastoid cell lines. *Blood*, *111*(3), 1334-1343. doi:10.1182/blood-2007-07-101907
- Bjornevik, K., Münz, C., Cohen, J. I., & Ascherio, A. (2023). Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. *Nature reviews. Neurology*, *19*(3), 160-171. doi:10.1038/s41582-023-00775-5
- Bonneville, M., O'Brien, R. L., & Born, W. K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*, *10*(7), 467-478. doi:10.1038/nri2781
- Böttcher, J. P., Beyer, M., Meissner, F., Abdullah, Z., . . . Knolle, P. A. (2015). Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. *Nat Commun*, *6*, 8306. doi:10.1038/ncomms9306
- Brandes, M., Willmann, K., & Moser, B. (2005). Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*, *309*(5732), 264-268. doi:10.1126/science.1110267
- Caccamo, N., Dieli, F., Wesch, D., Jomaa, H., . . . Eberl, M. (2006). Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells. *J Leukoc Biol*, *79*(4), 663-666. doi:10.1189/jlb.1105640
- Cairo, C., Armstrong, C. L., Cummings, J. S., Deetz, C. O., . . . Pauza, C. D. (2010). Impact of age, gender, and race on circulating  $\gamma\delta$  T cells. *Hum Immunol*, *71*(10), 968-975. doi:10.1016/j.humimm.2010.06.014
- Callan, M. F., Fazou, C., Yang, H., Rostron, T., . . . 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
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., . . . Rickinson, A. B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med*, *187*(9), 1395-1402. doi:10.1084/jem.187.9.1395
- Casorati, G., De Libero, G., Lanzavecchia, A., & Migone, N. (1989). Molecular analysis of human gamma/delta+ clones from thymus and peripheral blood. *J Exp Med*, *170*(5), 1521-1535. doi:10.1084/jem.170.5.1521
- Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Bak, K. R., & Luzuriaga, K. (2001). Differential evolution and stability of epitope-specific CD8(+) T cell responses in EBV infection. *J Immunol*, *167*(8), 4450-4457. doi:10.4049/jimmunol.167.8.4450
- Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Brody, R. M., & Luzuriaga, K. (2002). Phenotypic and Functional Heterogeneity of EBV Epitope-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology*, *168*(8), 4184-4191. doi:10.4049/jimmunol.168.8.4184
- Chalupny, N. J., Sutherland, C. L., Lawrence, W. A., Rein-Weston, A., . . . Cosman, D. (2003). ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun*, *305*(1), 129-135. doi:10.1016/s0006-291x(03)00714-9
- Champagne, P., Ogg, G. S., King, A. S., Knabenhans, C., . . . Pantaleo, G. (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*, *410*(6824), 106-111. doi:10.1038/35065118
- Chen, M., Zhang, D., Zhen, W., Shi, Q., . . . Ren, H. (2008). Characteristics of circulating T cell receptor gamma-delta T cells from individuals chronically infected with hepatitis B virus (HBV): an association between V(delta)2 subtype and chronic HBV infection. *J Infect Dis*, *198*(11), 1643-1650. doi:10.1086/593065
- Correia, D. V., Lopes, A., & Silva-Santos, B. (2013). Tumor cell recognition by  $\gamma\delta$  T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors. *Oncoimmunology*, *2*(1), e22892. doi:10.4161/onci.22892
- Couzi, L., Pitard, V., Sicard, X., Garrigue, I., . . . Dechanet-Merville, J. (2012). Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa). *Blood*, *119*(6), 1418-1427. doi:10.1182/blood-2011-06-363655

- Crawford, D. H., Macsween, K. F., Higgins, C. D., Thomas, R., . . . Swerdlow, A. J. (2006). A cohort study among university students: identification of risk factors for Epstein-Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. *Clin Infect Dis*, 43(3), 276-282. doi:10.1086/505400
- Dai, Y., Chen, H., Mo, C., Cui, L., . . . He, W. (2012). Ectopically expressed human tumor biomarker MutS homologue 2 is a novel endogenous ligand that is recognized by human  $\gamma\delta$  T cells to induce innate anti-tumor/virus immunity. *J Biol Chem*, 287(20), 16812-16819. doi:10.1074/jbc.M111.327650
- Dai, Y. M., Liu, H. Y., Liu, Y. F., Zhang, Y., . . . He, W. (2018). EBV transformation induces overexpression of hMSH2/3/6 on B lymphocytes and enhances gammadeltaT-cell-mediated cytotoxicity via TCR and NKG2D. *Immunology*. doi:10.1111/imm.12920
- Davey, M. S., Willcox, C. R., Hunter, S., Kasatskaya, S. A., . . . Willcox, B. E. (2018). The human V $\delta$ 2(+) T-cell compartment comprises distinct innate-like V $\gamma$ 9(+) and adaptive V $\gamma$ 9(-) subsets. *Nat Commun*, 9(1), 1760. doi:10.1038/s41467-018-04076-0
- Davey, M. S., Willcox, C. R., Joyce, S. P., Ladell, K., . . . Willcox, B. E. (2017). Clonal selection in the human V $\delta$ 1 T cell repertoire indicates  $\gamma\delta$  TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nat Commun*, 8, 14760. doi:10.1038/ncomms14760
- de-Thé, G., Day, N. E., Geser, A., Lavoué, M. F., . . . Zavadova, H. (1975). Sero-epidemiology of the Epstein-Barr virus: preliminary analysis of an international study - a review. *IARC Sci Publ (1971)*(11 Pt 2), 3-16.
- de Jong, S. E., Asscher, V. E. R., Wammes, L. J., Wiria, A. E., . . . Yazdanbakhsh, M. (2017). Longitudinal study of changes in  $\gamma\delta$  T cells and CD4(+) T cells upon asymptomatic malaria infection in Indonesian children. *Sci Rep*, 7(1), 8844. doi:10.1038/s41598-017-09099-z
- De Maria, A., Ferrazin, A., Ferrini, S., Ciccone, E., . . . Moretta, L. (1992). Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*, 165(5), 917-919. doi:10.1093/infdis/165.5.917
- De Paoli, P., Gennari, D., Martelli, P., Cavarzerani, V., . . . Santini, G. (1990). Gamma delta T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis*, 161(5), 1013-1016. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2324529>
- De Rosa, S. C., Andrus, J. P., Perfetto, S. P., Mantovani, J. J., . . . Roederer, M. (2004). Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J Immunol*, 172(3), 1637-1645. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1637
- De Rosa, S. C., Mitra, D. K., Watanabe, N., Herzenberg, L. A., . . . Roederer, M. (2001). Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells express distinct surface markers and might be developmentally distinct lineages. *J Leukoc Biol*, 70(4), 518-526. Retrieved from <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1189/jlb.70.4.518?download=true>
- deBarros, A., Chaves-Ferreira, M., d'Orey, F., Ribot, J. C., . . . Silva-Santos, B. (2011). CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human  $\gamma\delta$  peripheral blood lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 41(1), 195-201. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.201040905>
- Dechanet, J., Merville, P., Lim, A., Retiere, C., . . . Moreau, J. F. (1999). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest*, 103(10), 1437-1449. doi:10.1172/JCI5409
- Deng, Y., Chatterjee, B., Zens, K., Zdimerova, H., . . . Münz, C. (2021). CD27 is required for protective lytic EBV antigen-specific CD8+ T-cell expansion. *Blood*, 137(23), 3225-3236. doi:10.1182/blood.2020009482
- Deusch, K., Lüling, F., Reich, K., Classen, M., . . . Pfeffer, K. (1991). A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *Eur J Immunol*, 21(4), 1053-1059. doi:10.1002/eji.1830210429
- Dieli, F., Poccia, F., Lipp, M., Sireci, G., . . . Salerno, A. (2003). Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med*, 198(3), 391-397. doi:10.1084/jem.20030235



- Dieli, F., Troye-Blomberg, M., Ivanyi, J., Fournié, J. J., . . . Salerno, A. (2001). Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis*, *184*(8), 1082-1085. doi:10.1086/323600
- Djaoud, Z., Guethlein, L. A., Horowitz, A., Azzi, T., . . . Parham, P. (2017). Two alternate strategies for innate immunity to Epstein-Barr virus: One using NK cells and the other NK cells and gammadelta T cells. *J Exp Med*, *214*(6), 1827-1841. doi:10.1084/jem.20161017
- 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
- Dunmire, S. K., Verghese, P. S., & Balfour, H. H., Jr. (2018). Primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol*, *102*, 84-92. doi:10.1016/j.jcv.2018.03.001
- Dunne, M. R., Elliott, L., Hussey, S., Mahmud, N., . . . Feighery, C. F. (2013). Persistent changes in circulating and intestinal  $\gamma\delta$  T cell subsets, invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in children and adults with coeliac disease. *PLoS One*, *8*(10), e76008. doi:10.1371/journal.pone.0076008
- Dunne, P. J., Faint, J. M., Gudgeon, N. H., Fletcher, J. M., . . . Akbar, A. N. (2002). Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood*, *100*(3), 933-940. doi:10.1182/blood-2002-01-0160
- Eberl, M., Engel, R., Beck, E., & Jomaa, H. (2002). Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell Immunol*, *218*(1-2), 1-6. doi:10.1016/s0008-8749(02)00519-1
- Epstein, M. A., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet*, *1*(7335), 702-703. doi:10.1016/s0140-6736(64)91524-7
- Esin, S., Shigematsu, M., Nagai, S., Eklund, A., . . . Grunewald, J. (1996). Different percentages of peripheral blood gamma delta + T cells in healthy individuals from different areas of the world. *Scand J Immunol*, *43*(5), 593-596. doi:10.1046/j.1365-3083.1996.d01-79.x
- Farnault, L., Gertner-Dardenne, J., Gondois-Rey, F., Michel, G., . . . Olive, D. (2013). Clinical evidence implicating gamma-delta T cells in EBV control following cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*, *48*(11), 1478-1479. doi:10.1038/bmt.2013.75
- Finak, G., Langweiler, M., Jaimes, M., Malek, M., . . . McCoy, J. P. (2016). Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Sci Rep*, *6*, 20686. doi:10.1038/srep20686
- Fisch, P., Malkovsky, M., Kovats, S., Sturm, E., . . . et al. (1990). Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science*, *250*(4985), 1269-1273. doi:10.1126/science.1978758
- Fleisher, G., Henle, W., Henle, G., Lennette, E. T., . . . Biggar, R. J. (1979). Primary Infection with Epstein-Barr Virus in Infants in the United States: Clinical and Serologic Observations. *The Journal of Infectious Diseases*, *139*(5), 553-558. doi:10.1093/infdis/139.5.553
- Fonseca, S., Pereira, V., Lau, C., Teixeira, M. D. A., . . . Lima, M. (2020). Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Series of Healthy Caucasian Portuguese Adults and Comprehensive Review of the Literature. *Cells*, *9*(3). doi:10.3390/cells9030729
- Gaballa, A., Arruda, L. C. M., Rådestad, E., & Uhlin, M. (2019). CD8(+)  $\gamma\delta$  T Cells Are More Frequent in CMV Seropositive Bone Marrow Grafts and Display Phenotype of an Adaptive Immune Response. *Stem Cells Int*, *2019*, 6348060. doi:10.1155/2019/6348060
- Givan, A. L. (2004). Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*, *263*, 1-32. doi:10.1385/1-59259-773-4:001

- Gober, H. J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., . . . De Libero, G. (2003). Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*, 197(2), 163-168. doi:10.1084/jem.20021500
- Goerlich, R., Häcker, G., Pfeffer, K., Heeg, K., . . . Wagner, H. (1991). Plasmodium falciparum merozoites primarily stimulate the V gamma 9 subset of human gamma/delta T cells. *Eur J Immunol*, 21(10), 2613-2616. doi:10.1002/eji.1830211045
- Groh, V., Porcelli, S., Fabbi, M., Lanier, L. L., . . . Brenner, M. B. (1989). Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med*, 169(4), 1277-1294. doi:10.1084/jem.169.4.1277
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., & Spies, T. (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*, 279(5357), 1737-1740. doi:10.1126/science.279.5357.1737
- Hacker, G., Kromer, S., Falk, M., Heeg, K., . . . Pfeffer, K. (1992). V delta 1+ subset of human gamma delta T cells responds to ligands expressed by EBV-infected Burkitt lymphoma cells and transformed B lymphocytes. *J Immunol*, 149(12), 3984-3989. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/149/12/3984.full.pdf>
- Hammerich, L., & Tacke, F. (2014). Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 5(2), 107-113. doi:10.4291/wjgp.v5.i2.107
- Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigné, C. M., . . . Scotet, E. (2012). Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human  $\gamma\delta$  T-cell subset. *Blood*, 120(11), 2269-2279. doi:10.1182/blood-2012-05-430470
- Hassan, J., Feighery, C., Bresnihan, B., & Whelan, A. (1991). ELEVATED T CELL RECEPTOR  $\gamma\delta$ + T CELLS IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS. *British Journal of Haematology*, 77(2), 255-256. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1991.tb07990.x>
- Hertoghs, N., Schwedhelm, K. V., Stuart, K. D., McElrath, M. J., . . . De Rosa, S. C. (2020). OMIP-064: A 27-Color Flow Cytometry Panel to Detect and Characterize Human NK Cells and Other Innate Lymphoid Cell Subsets, MAIT Cells, and  $\gamma\delta$  T Cells. *Cytometry Part A*, 97(10), 1019-1023. doi:<https://doi.org/10.1002/cyto.a.24031>
- Hislop, A. D., Annels, N. E., Gudgeon, N. H., Leese, A. M., . . . Rickinson, A. B. (2002). Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med*, 195(7), 893-905. doi:10.1084/jem.20011692
- 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
- Ho, H. N., Hultin, L. E., Mitsuyasu, R. T., Matud, J. L., . . . Giorgi, J. V. (1993). Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens. *J Immunol*, 150(7), 3070-3079. Retrieved from <https://www.jimmunol.org/content/150/7/3070.long>
- Ho, M., Webster, H. K., Tongtawe, P., Pattanapanyasat, K., . . . Weidanz, W. P. (1990). Increased gamma delta T cells in acute Plasmodium falciparum malaria. *Immunol Lett*, 25(1-3), 139-141. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2149360>
- Hoagland, R. J. (1955). The transmission of infectious mononucleosis. *Am J Med Sci*, 229(3), 262-272. doi:10.1097/00000441-195503000-00003
- Hogg, A. E., Worth, A., Beverley, P., Howard, C. J., . . . Villarreal-Ramos, B. (2009). The antigen-specific memory CD8+ T-cell response induced by BCG in cattle resides in the CD8+gamma/deltaTCR-CD45RO+ T-cell population. *Vaccine*, 27(2), 270-279. doi:10.1016/j.vaccine.2008.10.053
- Horwitz, C. A., Henle, W., Henle, G., Goldfarb, M., . . . 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.
- Houen, G., & Trier, N. H. (2020). Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 11, 587380. doi:10.3389/fimmu.2020.587380

- Hunter, S., Willcox, C. R., Davey, M. S., Kasatskaya, S. A., . . . Willcox, B. E. (2018). Human liver infiltrating  $\gamma\delta$  T cells are composed of clonally expanded circulating and tissue-resident populations. *J Hepatol*, *69*(3), 654-665. doi:10.1016/j.jhep.2018.05.007
- Hviid, L., Akanmori, B. D., Loizon, S., Kurtzhals, J. A., . . . Behr, C. (2000). High frequency of circulating gamma delta T cells with dominance of the v(delta)1 subset in a healthy population. *Int Immunol*, *12*(6), 797-805. doi:10.1093/intimm/12.6.797
- Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., . . . Yoshie, O. (1997). Identification and Molecular Characterization of Fractalkine Receptor CX3CR1, which Mediates Both Leukocyte Migration and Adhesion. *Cell*, *91*(4), 521-530. doi:10.1016/S0092-8674(00)80438-9
- Jia, Z.-H., Li, Y.-Y., Wang, J.-Y., Zhang, J.-Y., . . . Wu, X. (2019). Activated  $\gamma\delta$  T cells exhibit cytotoxicity and the capacity for viral clearance in patients with acute hepatitis B. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, *202*, 40-48. doi:10.1016/j.clim.2019.03.005
- Kabelitz, D., Bender, A., Schondelmaier, S., Schoel, B., . . . Kaufmann, S. H. (1990). A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein. *J Exp Med*, *171*(3), 667-679. doi:10.1084/jem.171.3.667
- Kadivar, M., Petersson, J., Svensson, L., & Marsal, J. (2016). CD8 $\alpha\beta$ +  $\gamma\delta$  T Cells: A Novel T Cell Subset with a Potential Role in Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol*, *197*(12), 4584-4592. doi:10.4049/jimmunol.1601146
- Kallemijn, M. J., Boots, A. M. H., van der Klift, M. Y., Brouwer, E., . . . Langerak, A. W. (2017). Ageing and latent CMV infection impact on maturation, differentiation and exhaustion profiles of T-cell receptor gammadelta T-cells. *Sci Rep*, *7*(1), 5509. doi:10.1038/s41598-017-05849-1
- Kalyan, S., & Kabelitz, D. (2013). Defining the nature of human  $\gamma\delta$  T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol*, *10*(1), 21-29. doi:10.1038/cmi.2012.44
- Kar, A., Mehrotra, S., & Chatterjee, S. (2020). CD38: T Cell Immuno-Metabolic Modulator. *Cells*, *9*(7), 1716. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/7/1716>
- Kazen, A. R., & Adams, E. J. (2011). Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(29), E332-340. doi:10.1073/pnas.1105105108
- Kenna, T., Golden-Mason, L., Norris, S., Hegarty, J. E., . . . Doherty, D. G. (2004). Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol*, *113*(1), 56-63. doi:10.1016/j.clim.2004.05.003
- Kerr, J. R. (2019). Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol*, *72*(10), 651-658. doi:10.1136/jclinpath-2019-205822
- Kestens, L., Vanham, G., Gigase, P., Young, G., . . . Bach, B. A. (1992). Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *AIDS*, *6*(8), 793-797. doi:10.1097/00002030-199208000-00004
- Kong, Y., Cao, W., Xi, X., Ma, C., . . . He, W. (2009). The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. *Blood*, *114*(2), 310-317. doi:10.1182/blood-2008-12-196287
- Kutscher, S., Dembek, C. J., Deckert, S., Russo, C., . . . Bauer, T. (2013). Overnight resting of PBMC changes functional signatures of antigen specific T- cell responses: impact for immune monitoring within clinical trials. *PLoS One*, *8*(10), e76215. doi:10.1371/journal.pone.0076215
- Lafont, V., Liautard, J., Liautard, J. P., & Favero, J. (2001). Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol*, *166*(12), 7190-7199. doi:10.4049/jimmunol.166.12.7190

- 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, V., DeMars, R., Chen, B. P., Hank, J. A., . . . Sondel, P. M. (1990). Human T cell receptor-gamma delta-expressing T-cell lines recognize MHC-controlled elements on autologous EBV-LCL that are not HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, or -DP. *J Immunol*, *145*(1), 36-45. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/145/1/36.full.pdf>
- Lamoreaux, L., Roederer, M., & Koup, R. (2006). Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure. *Nat Protoc*, *1*(3), 1507-1516. doi:10.1038/nprot.2006.268
- Landmeier, S., Altvater, B., Pscherer, S., Juergens, H., . . . Rossig, C. (2009). Activated human gammadelta T cells as stimulators of specific CD8+ T-cell responses to subdominant Epstein Barr virus epitopes: potential for immunotherapy of cancer. *J Immunother*, *32*(3), 310-321. doi:10.1097/CJI.0b013e31819b7c30
- Lang, F., Peyrat, M. A., Constant, P., Davodeau, F., . . . Bonneville, M. (1995). Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol*, *154*(11), 5986-5994. Retrieved from <https://www.jimmunol.org/content/154/11/5986.long>
- Le Nours, J., Gherardin, N. A., Ramarathinam, S. H., Awad, W., . . . Rossjohn, J. (2019). A class of  $\gamma\delta$  T cell receptors recognize the underside of the antigen-presenting molecule MR1. *Science*, *366*(6472), 1522-1527. doi:10.1126/science.aav3900
- Liechti, T., & Roederer, M. (2019). OMIP-060: 30-Parameter Flow Cytometry Panel to Assess T Cell Effector Functions and Regulatory T Cells. *Cytometry Part A*, *95*(11), 1129-1134. doi:<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23853>
- Long, H. M., Haigh, T. A., Gudgeon, N. H., Leen, A. M., . . . Taylor, G. S. (2005). CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Virol*, *79*(8), 4896-4907. doi:10.1128/jvi.79.8.4896-4907.2005
- Luzuriaga, K., & Sullivan, J. L. (2010). Infectious mononucleosis. *N Engl J Med*, *362*(21), 1993-2000. doi:10.1056/NEJMcp1001116
- Macswen, K. F., Higgins, C. D., McAulay, K. A., Williams, H., . . . Crawford, D. H. (2010). Infectious Mononucleosis in University Students in the United Kingdom: Evaluation of the Clinical Features and Consequences of the Disease. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(5), 699-706. doi:10.1086/650456
- Maecker, H. T., Frey, T., Nomura, L. E., & Trotter, J. (2004). Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A*, *62*(2), 169-173. doi:10.1002/cyto.a.20092
- Maecker, H. T., McCoy, J. P., & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*, *12*(3), 191-200. doi:10.1038/nri3158
- Mahnke, Y. D., & Roederer, M. (2007). Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med*, *27*(3), 469-485, v. doi:10.1016/j.cll.2007.05.002
- Maini, M. K., Gudgeon, N., Wedderburn, L. R., Rickinson, A. B., . . . Beverley, P. C. (2000). Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J Immunol*, *165*(10), 5729-5737. doi:10.4049/jimmunol.165.10.5729
- Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., . . . Aydin, S. (2008). Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*, *88*(3), 841-886. doi:10.1152/physrev.00035.2007
- Mangan, B. A., Dunne, M. R., O'Reilly, V. P., Dunne, P. J., . . . Doherty, D. G. (2013). Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human V $\delta$ 3 T cells. *J Immunol*, *191*(1), 30-34. doi:10.4049/jimmunol.1300121

- Marlin, R., Pappalardo, A., Kaminski, H., Willcox, C. R., . . . Déchanet-Merville, J. (2017). Sensing of cell stress by human  $\gamma\delta$  TCR-dependent recognition of annexin A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(12), 3163-3168. doi:10.1073/pnas.1621052114
- Melbye, M., Ebbesen, P., Levine, P. H., & Bennike, T. (1984). Early primary infection and high Epstein-Barr virus antibody titers in Greenland Eskimos at high risk for nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, *34*(5), 619-623. doi:10.1002/ijc.2910340506
- Michishita, Y., Hirokawa, M., Guo, Y. M., Abe, Y., . . . Sawada, K. (2011). Age-associated alteration of  $\gamma\delta$  T-cell repertoire and different profiles of activation-induced death of V $\delta$ 1 and V $\delta$ 2 T cells. *Int J Hematol*, *94*(3), 230-240. doi:10.1007/s12185-011-0907-7
- Morita, C. T., Beckman, E. M., Bukowski, J. F., Tanaka, Y., . . . Brenner, M. B. (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*, *3*(4), 495-507. doi:10.1016/1074-7613(95)90178-7
- Morita, C. T., Jin, C., Sarikonda, G., & Wang, H. (2007). Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev*, *215*, 59-76. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x
- Moser, B., & Brandes, M. (2006). Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol*, *27*(3), 112-118. doi:10.1016/j.it.2006.01.002
- Munz, C. (2017). Epstein-Barr Virus-Specific Immune Control by Innate Lymphocytes. *Front Immunol*, *8*, 1658. doi:10.3389/fimmu.2017.01658
- Mygind, N. (1976). Serial serum enzyme studies in infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis*, *8*(3), 139-142. doi:10.3109/inf.1976.8.issue-3.02
- Nishimura, M., Umehara, H., Nakayama, T., Yoneda, O., . . . Imai, T. (2002). Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J Immunol*, *168*(12), 6173-6180. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/168/12/6173.full.pdf>
- Odaira, K., Kimura, S. N., Fujieda, N., Kobayashi, Y., . . . Kakimi, K. (2016). CD27(-)CD45(+)  $\gamma\delta$  T cells can be divided into two populations, CD27(-)CD45(int) and CD27(-)CD45(hi) with little proliferation potential. *Biochem Biophys Res Commun*, *478*(3), 1298-1303. doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.115
- Orsini, D. L., Res, P. C., Van Laar, J. M., Muller, L. M., . . . Koning, F. (1993). A subset of V delta 1+ T cells proliferates in response to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines in vitro. *Scand J Immunol*, *38*(4), 335-340. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3083.1993.tb01735.x>
- Owen, R. E., Sinclair, E., Emu, B., Heitman, J. W., . . . Norris, P. J. (2007). Loss of T cell responses following long-term cryopreservation. *J Immunol Methods*, *326*(1-2), 93-115. doi:10.1016/j.jim.2007.07.012
- Papadopoulou, M., Sanchez Sanchez, G., & Vermijlen, D. (2020). Innate and adaptive  $\gamma\delta$  T cells: How, when, and why. *Immunol Rev*, *298*(1), 99-116. doi:<https://doi.org/10.1111/imr.12926>
- Parker, C. M., Groh, V., Band, H., Porcelli, S. A., . . . Brenner, M. B. (1990). Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med*, *171*(5), 1597-1612. doi:10.1084/jem.171.5.1597
- Peyrat, M. A., Davodeau, F., Houde, I., Romagné, F., . . . et al. (1995). Repertoire analysis of human peripheral blood lymphocytes using a human V delta 3 region-specific monoclonal antibody. Characterization of dual T cell receptor (TCR) delta-chain expressors and alpha beta T cells expressing V delta 3J alpha C alpha-encoded TCR chains. *J Immunol*, *155*(6), 3060-3067. Retrieved from <https://www.jimmunol.org/content/155/6/3060.long>
- Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., . . . Déchanet-Merville, J. (2008). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*, *112*(4), 1317-1324. doi:10.1182/blood-2008-01-136713

- Poccia, F., Agrati, C., Martini, F., Capobianchi, M. R., . . . Malkovsky, M. (2005). Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect*, 7(3), 518-528. doi:10.1016/j.micinf.2004.12.009
- Precopio, M. L., Sullivan, J. L., Willard, C., Somasundaran, M., . . . Luzuriaga, K. (2003). Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. *J Immunol*, 170(5), 2590-2598. doi:10.4049/jimmunol.170.5.2590
- 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
- Qvigstad, E., Bosnes, V., Lundin, K. E., & Thorsby, E. (1990). Specificity of two subsets of cytotoxic human gamma delta T-cell clones. *Scand J Immunol*, 32(2), 129-135. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3083.1990.tb02902.x>
- Rajoriya, N., Fergusson, J. R., Leithead, J. A., & Klenerman, P. (2014). Gamma Delta T-lymphocytes in Hepatitis C and Chronic Liver Disease. *Front Immunol*, 5, 400. doi:10.3389/fimmu.2014.00400
- Ravens, S., Fichtner, A. S., Willers, M., Torkornoo, D., . . . Prinz, I. (2020). Microbial exposure drives polyclonal expansion of innate gammadelta T cells immediately after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(31), 18649-18660. doi:10.1073/pnas.1922588117
- Re, F., Poccia, F., Donnini, A., Bartozzi, B., . . . Provinciali, M. (2005). Skewed representation of functionally distinct populations of Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes in aging. *Exp Gerontol*, 40(1-2), 59-66. doi:10.1016/j.exger.2004.09.008
- Reijneveld, J. F., Ocampo, T. A., Shahine, A., Gully, B. S., . . . Van Rhijn, I. (2020). Human  $\gamma\delta$  T cells recognize CD1b by two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(37), 22944-22952. doi:10.1073/pnas.2010545117
- Reinhardt, A., Ravens, S., Fleige, H., Haas, J. D., . . . Prinz, I. (2014). CCR7-mediated migration in the thymus controls  $\gamma\delta$  T-cell development. *Eur J Immunol*, 44(5), 1320-1329. doi:10.1002/eji.201344330
- Rezk, E., Nofal, Y. H., Hamzeh, A., Aboujaib, M. F., . . . Al Hammad, M. F. (2015). Steroids for symptom control in infectious mononucleosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015(11), Cd004402. doi:10.1002/14651858.CD004402.pub3
- Ribeiro, S. T., Ribot, J. C., & Silva-Santos, B. (2015). Five Layers of Receptor Signaling in gammadelta T-Cell Differentiation and Activation. *Front Immunol*, 6, 15. doi:10.3389/fimmu.2015.00015
- Ribot, J. C., & Silva-Santos, B. (2013). Differentiation and activation of gammadelta T Lymphocytes: Focus on CD27 and CD28 costimulatory receptors. *Adv Exp Med Biol*, 785, 95-105. doi:10.1007/978-1-4614-6217-0\_11
- Rice, M. T., von Borstel, A., Chevour, P., Awad, W., . . . Gully, B. S. (2021). Recognition of the antigen-presenting molecule MR1 by a V $\delta$ 3(+)  $\gamma\delta$  T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(49). doi:10.1073/pnas.2110288118
- Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M. J., . . . Rufer, N. (2007). Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*, 178(7), 4112-4119. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4112
- Rosalki, S. B., Jones, T. G., & Verney, A. F. (1960). Transaminase and liver-function studies in infectious mononucleosis. *Br Med J*, 1(5177), 929-932. doi:10.1136/bmj.1.5177.929
- Rühl, J., Leung, C. S., & Münz, C. (2020). Vaccination against the Epstein-Barr virus. *Cell Mol Life Sci*, 77(21), 4315-4324. doi:10.1007/s00018-020-03538-3
- Ruiz-Pablos, M., Paiva, B., Montero-Mateo, R., Garcia, N., . . . Zabaleta, A. (2021). Epstein-Barr Virus and the Origin of Myalgic Encephalomyelitis or Chronic Fatigue Syndrome. *Front Immunol*, 12, 656797. doi:10.3389/fimmu.2021.656797
- Ryan, P. L., Sumaria, N., Holland, C. J., Bradford, C. M., . . . Pennington, D. J. (2016). Heterogeneous yet stable Vdelta2(+) T-cell profiles define distinct cytotoxic effector

- potentials in healthy human individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(50), 14378-14383. doi:10.1073/pnas.1611098113
- Sahir, F., Mateo, J. M., Steinhoff, M., & Siveen, K. S. (2020). Development of a 43 color panel for the characterization of conventional and unconventional T-cell subsets, B cells, NK cells, monocytes, dendritic cells, and innate lymphoid cells using spectral flow cytometry. *Cytometry A*. doi:10.1002/cyto.a.24288
- Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 22, 745-763. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., . . . Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708-712. doi:10.1038/44385
- Sandberg, Y., Almeida, J., Gonzalez, M., Lima, M., . . . Langerak, A. W. (2006). TCRgammadelta+ large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCRgammadelta+ T-cells. *Leukemia*, 20(3), 505-513. doi:10.1038/sj.leu.2404112
- Schultze-Florey, C. R., Chukhno, E., Goudeva, L., Blasczyk, R., . . . Odak, I. (2021). Distribution of major lymphocyte subsets and memory T-cell subpopulations in healthy adults employing GLP-conforming multicolor flow cytometry. *Leukemia*, 35(10), 3021-3025. doi:10.1038/s41375-021-01348-5
- Sepúlveda, N., Malato, J., Sotzny, F., Grabowska, A. D., . . . Scheibenbogen, C. (2022). Revisiting IgG Antibody Reactivity to Epstein-Barr Virus in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome and Its Potential Application to Disease Diagnosis. *Front Med (Lausanne)*, 9, 921101. doi:10.3389/fmed.2022.921101
- Shen, Y., Zhou, D., Qiu, L., Lai, X., . . . Chen, Z. W. (2002). Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science*, 295(5563), 2255-2258. doi:10.1126/science.1068819
- Silva-Santos, B., Serre, K., & Norell, H. (2015).  $\gamma\delta$  T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*, 15(11), 683-691. doi:10.1038/nri3904
- Spada, F. M., Grant, E. P., Peters, P. J., Sugita, M., . . . Brenner, M. B. (2000). Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med*, 191(6), 937-948. doi:10.1084/jem.191.6.937
- Sugita, M., & Brenner, M. B. (2000). T lymphocyte recognition of human group 1 CD1 molecules: implications for innate and acquired immunity. *Semin Immunol*, 12(6), 511-516. doi:10.1006/smim.2000.0277
- Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., . . . Callan, M. F. (1999). A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol*, 162(3), 1827-1835. Retrieved from <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/162/3/1827.full.pdf>
- 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
- Tomiyama, H., Matsuda, T., & Takiguchi, M. (2002). Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol*, 168(11), 5538-5550. doi:10.4049/jimmunol.168.11.5538
- Tseng, C. T., Miskovsky, E., Houghton, M., & Klimpel, G. R. (2001). Characterization of liver T-cell receptor gammadelta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections. *Hepatology*, 33(5), 1312-1320. doi:10.1053/jhep.2001.24269
- van Montfrans, J. M., Hoepelman, A. I., Otto, S., van Gijn, M., . . . Tesselaar, K. (2012). CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *J Allergy Clin Immunol*, 129(3), 787-793.e786. doi:10.1016/j.jaci.2011.11.013

- Van Rhijn, I., & Le Nours, J. (2021). CD1 and MR1 recognition by human  $\gamma\delta$  T cells. *Mol Immunol*, 133, 95-100. doi:10.1016/j.molimm.2020.12.008
- Vantourout, P., & Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*, 13(2), 88-100. doi:10.1038/nri3384
- Wang, L., Huckelhoven, A., Hong, J., Jin, N., . . . Schmitt, A. (2016). Standardization of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells through a resting process for clinical immunomonitoring--Development of an algorithm. *Cytometry A*, 89(3), 246-258. doi:10.1002/cyto.a.22813
- Wang, X., & Tian, Z. (2018).  $\gamma\delta$  T cells in liver diseases. *Front Med*, 12(3), 262-268. doi:10.1007/s11684-017-0584-x
- Wang, Y., Luo, Y., Tang, G., Ouyang, R., . . . Hou, H. (2021). HLA-DR Expression Level in CD8(+) T Cells Correlates With the Severity of Children With Acute Infectious Mononucleosis. *Front Immunol*, 12, 753290. doi:10.3389/fimmu.2021.753290
- Wang, Z., Zhu, L., Nguyen, T. H. O., Wan, Y., . . . Kedzierska, K. (2018). Clonally diverse CD38(+)HLA-DR(+)CD8(+) T cells persist during fatal H7N9 disease. *Nat Commun*, 9(1), 824. doi:10.1038/s41467-018-03243-7
- Willcox, C. R., Pitard, V., Netzer, S., Couzi, L., . . . Déchanet-Merville, J. (2012). Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human  $\gamma\delta$  T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol*, 13(9), 872-879. doi:10.1038/ni.2394
- Winter, J. R., Jackson, C., Lewis, J. E., Taylor, G. S., . . . Stagg, H. R. (2020). Predictors of Epstein-Barr virus serostatus and implications for vaccine policy: A systematic review of the literature. *J Glob Health*, 10(1), 010404. doi:10.7189/jogh.10.010404
- Wistuba-Hamprecht, K., Frasca, D., Blomberg, B., Pawelec, G., . . . Derhovanessian, E. (2013). Age-associated alterations in gammadelta T-cells are present predominantly in individuals infected with Cytomegalovirus. *Immun Ageing*, 10(1), 26. doi:10.1186/1742-4933-10-26
- Wistuba-Hamprecht, K., Haehnel, K., Janssen, N., Demuth, I., . . . Pawelec, G. (2015). Peripheral blood T-cell signatures from high-resolution immune phenotyping of  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T-cells in younger and older subjects in the Berlin Aging Study II. *Immun Ageing*, 12, 25. doi:10.1186/s12979-015-0052-x
- Wistuba-Hamprecht, K., Pawelec, G., & Derhovanessian, E. (2014). OMIP-020: phenotypic characterization of human gammadelta T-cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry A*, 85(6), 522-524. doi:10.1002/cyto.a.22470
- Woodberry, T., Suscovich, T. J., Henry, L. M., Davis, J. K., . . . Brander, C. (2005). Differential targeting and shifts in the immunodominance of Epstein-Barr virus--specific CD8 and CD4 T cell responses during acute and persistent infection. *J Infect Dis*, 192(9), 1513-1524. doi:10.1086/491741
- Wu, J., Groh, V., & Spies, T. (2002). T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J Immunol*, 169(3), 1236-1240. doi:10.4049/jimmunol.169.3.1236
- Xiang, Z., Liu, Y., Zheng, J., Liu, M., . . . Tu, W. (2014). Targeted activation of human Vgamma9Vdelta2-T cells controls epstein-barr virus-induced B cell lymphoproliferative disease. *Cancer Cell*, 26(4), 565-576. doi:10.1016/j.ccr.2014.07.026
- Xu, B., Pizarro, J. C., Holmes, M. A., McBeth, C., . . . Strong, R. K. (2011). Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(6), 2414-2419. doi:10.1073/pnas.1015433108
- Young, L. S., & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4(10), 757-768. doi:10.1038/nrc1452
- Zhong, H., Hu, X., Janowski, A. B., Storch, G. A., . . . Xu, J. (2017). Whole transcriptome profiling reveals major cell types in the cellular immune response against acute and chronic active Epstein-Barr virus infection. *Sci Rep*, 7(1), 17775. doi:10.1038/s41598-017-18195-z



### **Bücher**

- Herold, G. u. M. (2020). *Innere Medizin*. Köln: Herold, Gerd.
- Howley, P. M., Knipe, D. M., Cohen, J. L., Damania, B., . . . Cohen, J. I. (2021). *Fields Virology: DNA Viruses*: Wolters Kluwer.
- Murphy, K. M., Weaver, C., & Berg, L. (2022). *Janeway's Immunobiology* (10 ed.): W.W. Norton.
- Parham, P. (2015). *The immune system* (4 ed.). New York: Garland Science.

### **Internetseiten**

- BD. (2016). BD LSRFortessa™ Cell Analyzer Technical Specifications. Retrieved from 13. Dezember 2020  
[https://static.bdbiosciences.com/documents/BD\\_LSRFortessa\\_tech\\_specs2.pdf](https://static.bdbiosciences.com/documents/BD_LSRFortessa_tech_specs2.pdf)
- BD. (s. a.). BD Spectrum Viewer. Retrieved from 31. August 2022  
<https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/bd-spectrum-viewer>
- BioLegend. (s. a. ). Spectra Analyzer. Retrieved from 31. August 2022  
<https://www.biolegend.com/en-us/spectra-analyzer>

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Betreuerin und Doktormutter Prof. Dr. Uta Behrends, die mir als Leiterin der IMMUC-Studie dieses spannende Projekt anvertraut und durch die Bereitstellung der finanziellen Mittel und die Planung der logistischen Umsetzung, eine Durchführung dieses Projekt ermöglicht hat. Mit größtem persönlichem Engagement und fachlicher Expertise hat sie diese Arbeit betreut und begleitet.

Ebenso gebührt meinem Zweitbetreuer und Mentor PD Dr. Andreas Moosmann ein ganz besonderer Dank für die herzliche Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe, die Unterstützung mit seiner wissenschaftlichen Erfahrung, seinem Fachwissen, seinen kritischen und differenzierten Betrachtungen und nicht zuletzt für sein ganz besonderes persönliches Engagement. Die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene werden mir stets als bereichernder Austausch in Erinnerung bleiben.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der IMMUC-Studie, insbesondere Katrin Gerrer, für die stets hilfsbereite Auskunft und die Bereitstellung wichtiger Informationen, der Immunmonitoring Gruppe der TUM, insbesondere Dr. Tanja Bauer, Dr. Nina Körber und Christoph Richter für Ihre kritischen Anregungen und die Bereitstellung des Probenmaterials und PD Dr. Josef Mautner und Prof. Dr. Elfriede Nößner für Ihre fachliche Expertise und Ihre persönliche Unterstützung.

Hiermit möchte ich mich auch bei allen Spenderinnen und Spendern bedanken, die sich bereit erklärt haben, ihr Blut für Forschungszwecke zur Verfügung zu stellen.

Außerdem möchte ich mich bei dem Helmholtz Zentrum München für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie die Nutzung der vor Ort zur Verfügung stehenden Infrastruktur und bei der Technischen Universität München für die Förderung durch ein breites Angebot an fachlichen und überfachlichen Qualifizierungsveranstaltungen und die Einbindung in das akademische Umfeld bedanken.

Ein herzlicher Dank geht außerdem an die Kolleginnen und Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe (Wiebe, Alex, Clemens, Alina und Tanja), der Arbeitsgruppe von Josef Mautner (Julia, Dinesh, Doris und Grit) sowie den Kolleginnen und Kollegen aus den Nachbararbeitsgruppen für die vielen nützlichen Tipps, fachlichen Ratschläge und die stets angenehme und wertschätzende Arbeitsatmosphäre bedanken. Ein besonderer Dank geht dabei an meine Mitdoktorandin Ramona, die mich nicht nur während des gemeinsamen Vollzeitjahres im Labor immer wieder unterstützt und motiviert hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die während des Studiums und der Promotion immer für mich da waren und mich stets mit viel Einfühlungsvermögen sowie Humor begleitet und motiviert haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen beiden Schwestern Magdalena und Lucia und meinem Freund Christoph, die mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung und enormen Rückhalt das Studium und die Umsetzung dieser Dissertation überhaupt erst ermöglicht haben.