

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Ermittlung des diagnostischen und therapeutischen Potenzials eines HLA-restringierten,
CMV-spezifischen IgG-Antikörper-Repertoires an Patientenproben**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2026

vorgelegt von: Milena Petersen

geb. am 26.05.2000 in Düsseldorf

Tag der Promotion: 13.07.2026

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: PD Dr. med. Moritz Bewarder, Prof. Dr. Martina Sester

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	5
1.1 Deutsch	5
1.2 Englisch	7
2. EINLEITUNG	8
2.1 Zytomegalievirus (CMV).....	8
2.2 CMV-Genom	9
2.3 CMV-Lebenszyklus	9
2.4 Übertragungsweg und Infektion	10
2.5 Antivirale Therapie	12
2.6 CMV induzierte Immunantworten	12
2.6.1 Angeborenes Immunsystem	12
2.6.2 Natürliche Killerzellen	13
2.6.3 Dendritische Zellen	13
2.6.4 Erworbenes Immunsystem	14
2.6.5 Lymphozyten.....	14
2.6.6 Antigenrezeptoren von Lymphozyten.....	14
2.6.7 T-Zellrezeptor.....	14
2.6.8 T-Zellrezeptor ähnlicher Antikörper.....	15
2.6.9 T- Lymphozyten.....	16
2.6.10 T-Helferzellen.....	17
2.6.11 Zytotoxische T-Zellen	17
2.6.12 Einleitung der Apoptose durch Zytotoxische T-Zellen	18
2.6.13 B-Lymphozyten und ihre Aktivierung durch TH2-Helferzellen.....	18
2.6.14 Zytokine.....	19
2.7 Antigenpräsentation.....	19
2.7.1 MHC-Moleküle	19
2.7.2 MHC-I-Moleküle.....	20
2.7.3 Transport der Peptidfragmente und Beladung der MHC-I-Moleküle	20
2.7.4 MHC-II-Moleküle	20
2.8 Bisherige Ergebnisse und Vorarbeiten.....	22
2.8.1. Zielsetzung der Promotion.....	22
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Laborgeräte	23
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.3 Chemikalien und Sonstiges	24
3.1.4 Medien	24
3.1.5 Antikörper und Peptide.....	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Identifizierung des HLA-Status der Patienten	26
3.2.2 Isolierung Natürlicher Killerzellen	26
3.2.3 Produktion von biotinylierten Fabs.....	26
3.2.4 Tetramer-Färbung.....	27

3.2.5 Durchflusszytometrische Analysen	28
3.2.6 Herstellung von CMV-spezifischen IgG-TCR-ähnlichen Antikörpern	28
3.2.7 Fc-Modifikationen der Antikörper	28
3.2.8 Testung der zytotoxischen Aktivität.....	29
4. ERGEBNISSE.....	30
4.1 Tetramerbindung.....	30
4.1.1 Tetramerbindung in CMV-positiven Patienten mit passendem HLA-Status	30
4.1.2 Longitudinale Messung der Tetramer-Bindung mit abnehmender Viruslast.....	37
4.1.3 Kontrollpersonen	44
4.1.4 Ergebnisse der Durchflusszytometrie	54
4.2 Zytotoxizitäts-Assays	55
4.2.1 Zytotoxizitäts-Assays an PBMCs mit passendem HLA-Status.....	55
4.2.2 Zytotoxizitäts-Assay an PBMCs mit unpassendem HLA-Status	60
4.2.3 Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays	62
5. DISKUSSION.....	63
5.1 Potenziale und Limitationen HLA-restringierter TCR-ähnlicher Antikörper	63
5.2 Evaluation des diagnostischen Potenzials anhand der Ergebnisse der Durchflusszytometrie	64
5.3 Evaluation der therapeutischen Wirksamkeit mittels Zytotoxizitäts-Assays	65
5.4 Übertragbarkeit des Therapieprinzips.....	66
5.4.1 Populationsspezifische Relevanz.....	66
5.4.2 Weitere virale Zielstrukturen	67
5.4.3 Immunonkologische Perspektiven	69
5.5 Klinische Umsetzung TCR- basierter Immuntherapien am Beispiel Tebentafusp.....	70
5.6 Perspektiven für weiterführende Untersuchungen	71
5.7 Zusammenfassung der Erkenntnisse	72
6. LITERATURVERZEICHNIS	74
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	82
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	84
9. TABELLENVERZEICHNIS.....	87
10. PUBLIKATION.....	88
11. DANKSAGUNG	89
12. LEBENSLAUF	90

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsch

Das Zytomegalievirus, auch Humanes Herpesvirus 5, gehört zur Familie der Herpesviren und persistiert nach der Primärinfektion lebenslang im Körper. Bei immunsupprimierten Patienten, insbesondere nach allogener Stammzell- oder Organtransplantation, stellen CMV-Reaktivierungen eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität dar. Die etablierten antiviralen Medikamente Ganciclovir und Valganciclovir sind in ihrem therapeutischen Erfolg durch Resistenzentwicklungen, Myelosuppression und ein komplexes Nebenwirkungsprofil limitiert.

Ziel dieser Arbeit war es, das diagnostische und therapeutische Potenzial eines HLA-restringierten, Zytomegalievirus-spezifischen Antikörperrepertoires in Patientenproben zu ermitteln. In vorangegangenen Projekten wurden mithilfe der Phage-Display-Technologie Antikörperfragmente (Fabs) generiert, die Zytomegalievirus-Peptide erkennen, welche im Komplex mit den MHC-Klasse-I-Molekülen HLA-A*0101, HLA-A*0201 und HLA-B*0702 auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Untersucht wurden die drei repräsentativen Antikörper A6 (HLA-A*0101), C1 (HLA-A*0201) und C7 (HLA-B*0702).

Für die diagnostische Anwendung wurden die Antikörper im Fab-Format als Tetramere eingesetzt und in frischen Blutproben von Zytomegalievirus-infizierten Patienten sowie gesunden Kontrollpersonen mittels Durchflusszytometrie getestet. Die Tetramere zeigten eine spezifische Bindung an Lymphozyten von Patienten mit CMV-Infektion und passendem HLA-Status, während in Kontrollproben (passender HLA-Status und keine Infektion oder CMV-Infektion aber nicht passender HLA-Status) keine Bindung nachweisbar war. Longitudinale Messungen zeigten eine Abnahme der Affinität der Tetramere parallel zur Reduktion der Viruslast und verdeutlichen damit das Potenzial für deren diagnostischen Einsatz. Das therapeutische Potenzial wurde in Zytotoxizitäts-Assays mit Fc-optimierten IgG-Vollantikörpern überprüft. Hierbei induzierten die Antikörper C1 (HLA-A*0201) und C7 (HLA-B*0702) in peripheren mononukleären Zellen von Zytomegalievirus-positiven, HLA-kompatiblen Patienten eine spezifische Lyse infizierter Zellen. In Zytomegalievirus-negativen, HLA-kompatiblen Kontrollproben war eine Lyse nur nach kombinierter Zugabe von Zytomegalievirus-Peptid und Antikörper nachweisbar, während bei einem Zytomegalievirus-positiven Patienten ohne passendes HLA-Allel keine spezifische Lyse beobachtet werden konnte.

TCR-ähnliche Antikörper können also sowohl diagnostisch zur Identifikation Zytomegalievirus-infizierter Zellen als auch therapeutisch zur gezielten Elimination dieser Zellen eingesetzt werden. Durch die Entwicklung eines HLA-diversen Antikörperrepertoires ließe sich die klinische Anwendbarkeit potenziell erweitern. Damit bieten TCR-ähnliche Antikörper einen innovativen Ansatz

zur Prävention und Behandlung Zytomegalievirus-assoziierten Komplikationen bei immunsupprimierten Patienten.

1.2 Englisch

Determination of the Diagnostic and Therapeutic Potential of an HLA-Restricted, CMV-Specific IgG Antibody Repertoire in Patient Samples

Human cytomegalovirus, also known as human herpesvirus 5, belongs to the family of herpesviruses and persists lifelong in the host after primary infection. In immunosuppressed patients, particularly following allogeneic stem cell or solid organ transplantation, reactivations of cytomegalovirus represent a major cause of morbidity and mortality. The established antiviral drugs ganciclovir and valganciclovir are limited in their therapeutic efficacy by the emergence of resistant strains, myelosuppression, and a complex profile of adverse effects.

The aim of this study was to investigate the diagnostic and therapeutic potential of an HLA-restricted, cytomegalovirus-specific antibody repertoire in patient samples. In preceding projects, antibody fragments (Fabs) were generated by phage display technology that recognize cytomegalovirus-derived peptides presented in complex with the MHC class I molecules HLA-A*0101, HLA-A*0201 and HLA-B*0702. Three representative antibodies were analyzed: A6 (HLA-A*0101), C1 (HLA-A*0201), and C7 (HLA-B*0702).

For diagnostic evaluation, the antibodies were applied in the Fab format as tetramers and tested by flow cytometry on fresh blood samples from cytomegalovirus-infected patients and healthy controls. The tetramers specifically bound to lymphocytes of CMV-infected patients carrying the respective HLA allele, while no binding was observed in control samples. Longitudinal measurements demonstrated a decrease in tetramer binding in parallel with the reduction of viral load, thereby highlighting the potential of Fab tetramers for monitoring cytomegalovirus reactivation.

Therapeutic potential was assessed in cytotoxicity assays using Fc-optimized full-length IgG antibodies. In these experiments, the antibodies C1 (HLA-A*0201) and C7 (HLA-B*0702) induced specific, HLA-dependent lysis of infected target cells in peripheral blood mononuclear cells from cytomegalovirus-positive, HLA-compatible patients. In cytomegalovirus-negative, HLA-compatible controls, lysis was only observed after combined addition of peptide and antibody, whereas no specific lysis was detected in a cytomegalovirus-positive patient lacking the corresponding HLA allele.

These findings demonstrate that T-cell receptor-like antibodies could be employed both diagnostically for the identification of cytomegalovirus-infected cells and therapeutically for their targeted elimination. The development of a modular, HLA-diverse antibody repertoire may further broaden clinical applicability. Thus, T-cell receptor-like antibodies indicate a promising novel approach for the prevention and treatment of cytomegalovirus-associated complications in immunosuppressed patients.

2. Einleitung

2.1 Zytomegalievirus (CMV)

Das Zytomegalievirus (CMV), auch als Humanes Herpesvirus 5 (HHV-5) bezeichnet, gehört zu der Familie der Betaherpesviren und ist ein behülltes DNA-Virus [19,33]. Bis zu 90% der Weltbevölkerung sind mit dem Zytomegalievirus infiziert [33]. Die Primärinfektion verläuft bei immunkompetenten Personen meist asymptomatisch. In einigen Fällen kann sie jedoch eine Mononukleose ähnliche Symptomatik mit hohem Fieber, zervikaler Lymphadenopathie, Pharyngitis sowie Hepato- und Splenomegalie hervorrufen [55,71].

Nach abgelaufener Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang latent im menschlichen Organismus und kann reaktiviert werden. Latenz bezeichnet in diesem Zusammenhang einen Zustand, in dem das Virusgenom in replikationsfähiger Form persistiert, ohne dass infektiöse Viruspartikel gebildet werden [30]. Die Kontrolle der viralen Replikation nach Primärinfektion und bei Reaktivierung erfolgt überwiegend durch CD8⁺-zytotoxische T-Zellen. Diese erkennen virusinfizierte Zellen über prozessierte CMV-Antigenfragmente, die in MHC-I-Komplexen auf der Zelloberfläche präsentiert werden, und initiieren eine gezielte zelluläre Immunantwort [18]. Reaktivierungen treten insbesondere bei einer geschwächten T-Zell-vermittelten Immunität auf, wie sie im Rahmen immunsuppressiver Therapien nach allogener Stammzelltransplantation oder solider Organtransplantation sowie bei Immundefiziten im Verlauf einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) beobachtet werden können. Die Reaktivierung des Virus kann in diesen Fällen schwerwiegende klinische Komplikationen hervorrufen. Dazu zählen insbesondere CMV-assoziierte Pneumonien, Hepatitiden und Enzephalitiden [18,36]. Insbesondere bei HIV-positiven Patienten mit einer stark verminderten CD4⁺-T-Zell-Zahl wurden zudem weitere Komplikationen wie CMV-assoziierte Retinitiden oder Polyradikulopathien beschrieben [27,66,86,92]. Aufgrund der Vielzahl der potenziell auftretenden Komplikationen, führt die CMV-Reaktivierung bei diesen Patienten zu einer erheblichen Erhöhung der Morbidität und Mortalität und somit zu einer Verschlechterung der Prognose von Transplantationen und HIV-Infektionen [36,37,62,86].

Die hohe weltweite Durchseuchung mit CMV, die potenziell gravierenden Komplikationen bei Reaktivierung sowie die komplexen Interaktionen des Virus mit dem Immunsystem verdeutlichen die medizinische Relevanz gezielter Therapiekonzepte zur Eindämmung der Folgeschäden. Die nachfolgenden Kapitel befassen sich mit den genetischen, virologischen und immunologischen Grundlagen des Zytomegalievirus, die das Verständnis aktueller sowie zukünftiger diagnostischer und therapeutischer Strategien erleichtern sollen.

2.2 CMV-Genom

Das Zytomegalievirus verfügt mit etwa 235 Kilobasen über das größte Genom der acht humanen Herpesvirusspezies. Es besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA (dsDNA)-Helix und lässt sich in zwei Segmente unterteilen: ein langes Segment (U_L) und ein kurzes Segment (U_S). Diese Bezeichnungen stehen jeweils für ‚einzigartig lang‘ (unique long U_L) beziehungsweise ‚einzigartig kurz‘ (unique short U_S). Durch intramolekulare Rekombination an der Verbindungsstelle ergeben sich so vier isomere Genomstränge. Im Zentrum der U_L -Region befindet sich die Ausgangsstelle (oriLyt) für die Genomreplikation während des lytischen Vermehrungszyklus. Die Erbinformation setzt sich aus neun Gruppen eng miteinander verwandter Gene zusammen, welche in ihrer Summe etwa 26% des Genoms ausmachen. Wichtige Vertreter dieser Gene sind UL4 und US6, die für die Glycoproteinfamilien gp48 und gcII/ gp47 bis gcII/gp52 codieren [18,70].

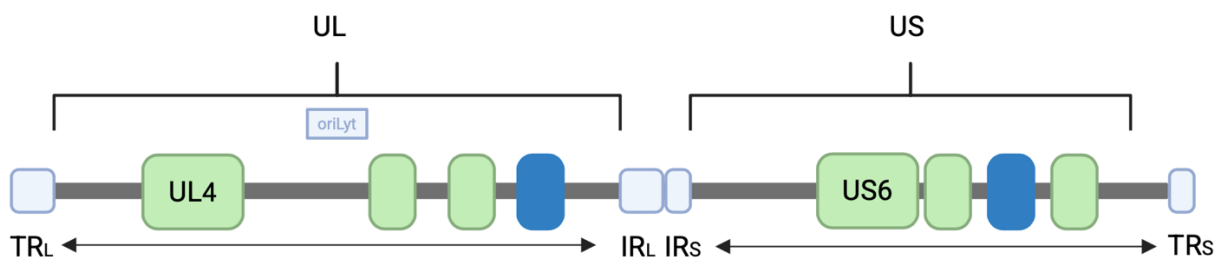


Abbildung 1: Schematische Darstellung des CMV-Genoms. Das Genom ist in zwei Abschnitte unterteilt: die unique short-Region (US) auf der rechten und die unique long-Region (UL) auf der linken Seite. An den Übergängen zwischen diesen Bereichen befinden sich interne Wiederholungssequenzen (IR), welche die vier isomeren Genomstränge darstellen, die durch intramolekulare Rekombination entstehen. Die terminalen Wiederholungssequenzen (TR) flankieren die Genomenden. Die Orientierung der genomischen Abschnitte ist durch Pfeile am unteren Rand der Abbildung dargestellt. Der Replikationsursprung (oriLyt) liegt zentral in der UL-Region. Exemplarisch sind die Gene UL4 und US6 eingezeichnet. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt und modifiziert nach [69].

2.3 CMV-Lebenszyklus

Der Lebenszyklus des CMV besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden Phasen, die von der initialen Anheftung an die Wirtszelle bis zur Freisetzung reifer Virionen reichen. Der Zyklus beginnt mit einer komplexen Anheftungskaskade, die durch virale Glykoproteine wie gB sowie gH/gL-Komplexe und deren Interaktion mit verschiedenen zellulären Oberflächenrezeptoren vermittelt wird. Die Nukleokapside gelangen entweder durch direkte Fusion mit der Zellmembran oder über endozytische Mechanismen in das Zytoplasma. Nach dem Eintritt erfolgt der Transport zum Zellkern. Dort

freigesetzte virale DNA vermittelt die Expression der Frühgene IE-1 und IE-2, welche unter anderem die Einleitung der viralen Replikation initiieren. Es folgt die Assemblierung der Kapside im Zellkern sowie die Verpackung der replizierten DNA. Anschließend durchlaufen die Kapside eine primäre Umhüllung an der inneren Kernmembran und werden in das Zytoplasma transportiert, wo die sekundäre Umhüllung im ER–Golgi-Kompartiment erfolgt. Schließlich werden die reifen viralen Nachkommen durch Exozytose freigesetzt [18,70,100].

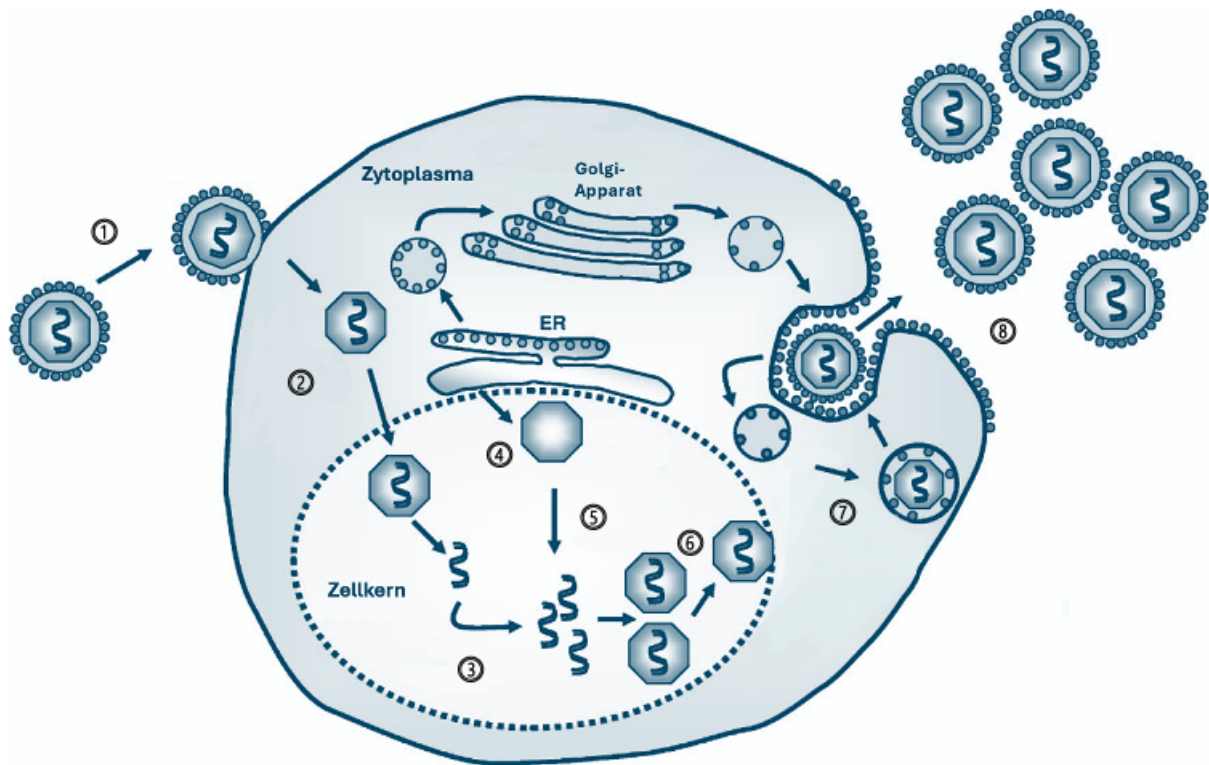


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus des Zytomegalievirus. (1) Anheftung über virale Glykoproteine an zelluläre Rezeptoren und Penetration durch Fusion oder Endozytose, (2) Eintritt ins Zytoplasma mit Transport zum Zellkern und Freisetzung der DNA, (3) DNA-Replikation im Zellkern und Translation viraler Proteine im Zytoplasma, (4) Assemblierung der Kapside im Zellkern, (5) Verpackung der viralen DNA, (6) primäre Umhüllung und Austritt aus dem Zellkern, (7) sekundäre Umhüllung im ER–Golgi-Kompartiment und (8) Freisetzung reifer Virionen durch Exozytose. Die Abbildung wurde modifiziert und erweitert nach [18].

2.4 Übertragungsweg und Infektion

Das Zytomegalievirus wird vor allem durch den Kontakt mit infektiösen Körperflüssigkeiten wie Tränenflüssigkeit, Speichel, Urin oder Genitalsekreten während des Sexualkontakts übertragen. Eine Transmission ist zudem über Blutprodukte, Organtransplantate sowie über Muttermilch während der Stillperiode möglich. Die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von der Mutter auf das Kind über Muttermilch beträgt hierbei etwa 35 %. Nach einer Primärinfektion liegt die Inkubationszeit zwischen drei und sechs Wochen [70,106]. Die CMV-Infektion gliedert sich in eine akute und latente Phase.

Während der akuten Phase gelten Schleimhaut- und Drüsenepithelzellen als primäre Einbeziehungsweise Austrittspforten des Virus. Darüber hinaus werden weitere Zelltypen befallen, unter anderem Bindegewebszellen, glatte Muskelzellen, Gefäßendothelzellen sowie organspezifische Zellen wie Hepatozyten in der Leber, alveoläre Epithelzellen in der Lunge und neuronale Zellen in der Netzhaut und im Gehirn. Aufgrund dieser weitreichenden Ausbreitung etabliert das Virus eine systemische Infektion, was die häufig multiplen Organmanifestationen bei Reaktivierung erklärt. Es kommt ebenfalls zum Befall hämatopoetischer Stammzellen, die als Vorläufer sowohl der myeloiden als auch der lymphoiden Zelllinien dienen. Dadurch wird sowohl während der akuten Phase eine ausgeprägte Immunantwort hervorgerufen als auch während der latenten Phase eine lebenslange, unbegrenzte Persistenz ermöglicht [18,70,87].

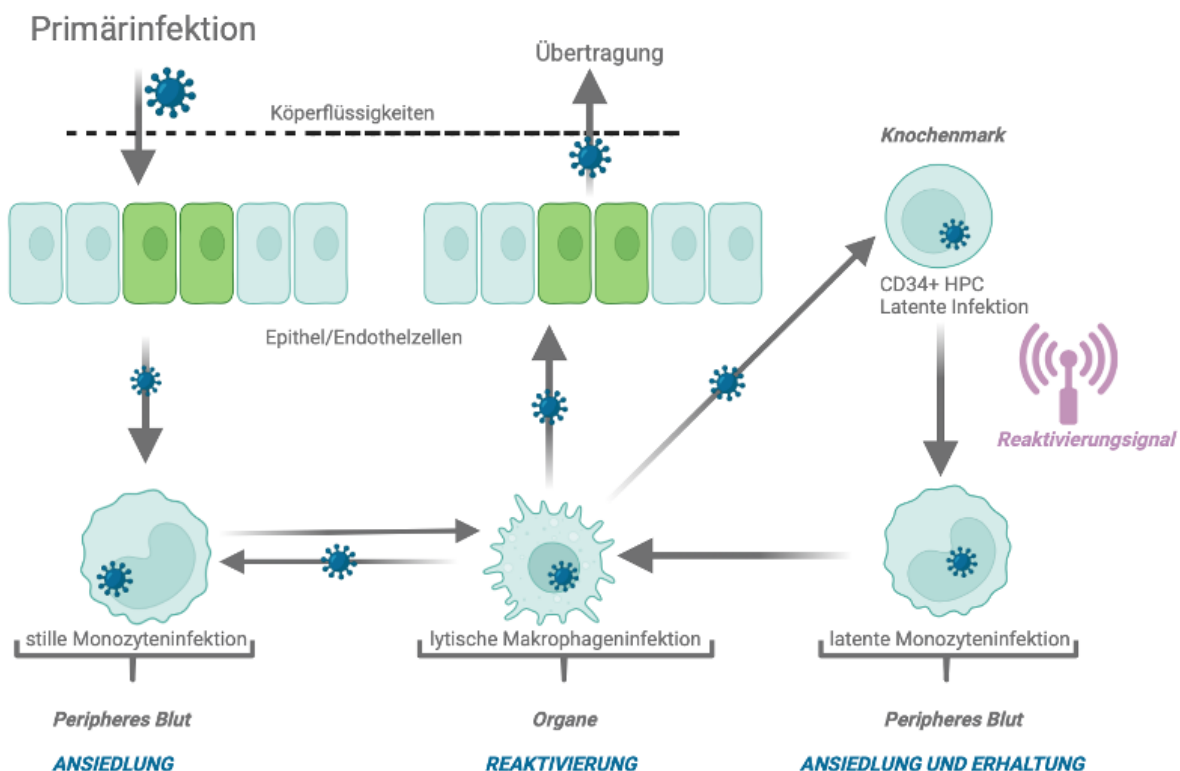


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs einer CMV. Die Abbildung zeigt schematisch den Verlauf einer CMV-Infektion von der Primärinfektion bis zur Reaktivierung. Oben links beginnt die Darstellung mit der Primärinfektion, bei der CMV über infektiöse Körperflüssigkeiten auf Epithel- bzw. Endothelzellen übertragen wird. Nach dieser initialen Infektion breitet sich das Virus in Richtung peripheres Blut aus und infiziert dort Monozyten, was zu einer stillen Infektion führt und zur Etablierung einer latenten Viruspräsenz beiträgt. Ein Teil der infizierten Monozyten kann sich in Makrophagen differenzieren (zentral unten), die das Virus über das Blut in verschiedene Organe transportieren und dort eine lytische Infektion hervorrufen (organassoziierte CMV-Infektion). Rechts oben in der Abbildung wird die Infektion von CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPCs) im Knochenmark dargestellt, in denen das Virus eine latente Infektion etabliert. Durch bestimmte Reaktivierungssignale können diese latenten HPCs entlang der myeloischen Zelllinie erneut differenzieren und Monozyten bzw. Makrophagen generieren (rechts unten), welche wiederum replikationsfähiges Virus produzieren. Diese Zellen tragen sowohl zur erneuten peripheren Virusausbreitung als auch zur Aufrechterhaltung des Infektionsreservoirs bei.

Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt und modifiziert nach [87].

2.5 Antivirale Therapie

Ansätze zur Reduktion CMV-assoziiierter Komplikationen nach Transplantationen konzentrieren sich entweder auf die Überwachung der Infektion mit präemptiver Therapie oder auf eine primär prophylaktische Behandlung. Nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation kann prophylaktisch der CMV-Terminase-Inhibitor Letemovir eingesetzt werden. Klinische Studien belegen zudem die Wirksamkeit von Letemovir bei Hochrisiko-Patienten nach Nierentransplantation [37,52,59,65]. Nach Herz- bzw. Lungentransplantationen wird eine prophylaktische Therapie mit Ganciclovir oder dessen oral verfügbarem Prodrug Valganciclovir empfohlen [37,46,52]. Trotz des Risikos einer Myelosuppression und der möglichen Entwicklung arzneimittelresistenter Stämme gelten Ganciclovir und Valganciclovir im Falle einer manifesten CMV-Infektion nach hämatopoetischer Stammzell- oder solider Organtransplantation weiterhin als Mittel der ersten Wahl [37,46,52]. Als Zweitlinientherapeutika stehen derzeit Foscarnet, Cidofovir sowie der ATP-kompetitive pUL97-Inhibitor Maribavir zur Verfügung [51,52,98]. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit des Transfers CMV-spezifischer T-Zellen vom Spender oder von Dritten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Obwohl diese Therapieform grundsätzlich durch die Lagerung der T-Zellen in Zellbanken umsetzbar ist, ist sie nach wie vor mit erheblichen logistischen Herausforderungen verbunden [57].

2.6 CMV induzierte Immunantworten

2.6.1 Angeborenes Immunsystem

Beim Eindringen pathogener Mikroorganismen, zu denen auch Viren zählen, reagiert der menschliche Organismus zunächst mit einer unspezifischen Immunantwort, die durch das angeborene Immunsystem ausgelöst wird, sofern der Erreger nicht bereits durch physikalische Barrieren wie Haut oder Schleimhaut abgewehrt wurde [49]. Ein wesentliches Merkmal des angeborenen Immunsystems ist das Fehlen eines immunologischen Gedächtnisses. Die unspezifische Immunantwort wird sowohl durch humorale als auch durch zelluläre Bestandteile initiiert. Zu den humoralen Bestandteilen zählen unter anderem das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme und Zytokine. Zu den zellulären Bestandteilen gehören beispielsweise Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [43,48,49,73].

Zur Erkennung potenzieller Bedrohungen durch eingedrungene Pathogene nutzt das angeborene Immunsystem sogenannte Mustererkennungsrezeptoren, sogenannte *pattern recognition receptors*, (PRRs), wie etwa Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Diese membrangebundenen Rezeptoren sind entweder an der Zelloberfläche oder in intrazellulären Vesikeln lokalisiert. Sie erkennen konservierte, pathogen-assoziierte molekulare Strukturen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), beispielsweise doppelsträngige virale RNA. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Freisetzung

von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6). In der Folge werden sowohl lokale Entzündungsprozesse als auch systemische Abwehrmechanismen ausgelöst. Lokale Vasodilatation und chemotaktische Signale erleichtern die Einwanderung von Leukozyten in das betroffene Gewebe, was unter anderem zu Fieber sowie zur vermehrten Produktion von akute-Phase-Proteinen führt [43,48,49,73].

2.6.2 Natürliche Killerzellen

Ein zentraler zellulärer Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind die NK-Zellen. Sie entsprechen ungefähr 10% der peripheren Lymphozyten im Blut und ähneln morphologisch großen granulierten Lymphozyten. Im Gegensatz zu T-Zellen erkennen sie ihre Zielzellen ohne vorherige Sensibilisierung und unabhängig von der Präsentation durch MHC-Komplex [28,49,73].

NK-Zellen haben keinen Antigen-spezifischen Rezeptor, sondern eine Vielzahl aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren, deren kombinierte Signale die zytotoxische Reaktion regulieren. Eine immunologische Verknüpfung zwischen NK-Zellen und Zielzellen entsteht beispielsweise durch die Bindung von LFA-1 auf der NK-Zelle an ICAM-1 oder ICAM-2 auf der Zielzelle [48,73,83].

Aktivierende Rezeptoren erkennen häufig sogenannte Stressmoleküle auf virusinfizierten oder transformierten Zellen. Ihre Aktivierung führt zur Freisetzung von Zytokinen wie Interferon- γ und zur Exozytose zytotoxischer Granula, wodurch die betroffene Zielzelle eliminiert wird. Inhibitorische Rezeptoren reagieren dagegen auf die Präsenz von MHC-Klasse-I-Molekülen und verhindern eine Aktivierung, solange diese ausreichend exprimiert sind. Fehlt die MHC-I-Expression, wie es bei vielen virusinfizierten oder malignen Zellen der Fall ist, dominiert das aktivierende Signal, was zur zytotoxischen Aktivierung der NK-Zelle führt [18,28,72,82].

NK-Zellen werden durch die Oberflächenproteine CD16 und CD56 identifiziert. Die Abwesenheit von CD3 ermöglicht ihre Abgrenzung gegenüber NKT-Zellen, die den T-Lymphozyten zugeordnet werden [28,49].

2.6.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen befinden sich in nicht ausdifferenzierter Form in allen peripheren Geweben. Über Pinozytose prüfen sie kontinuierlich die Flüssigkeit des Extrazellularraums auf Antigene [48,49]. Nach dem Eindringen eines Pathogens reifen sie zu antigenpräsentierenden Zellen heran. Dabei wird das aufgenommene Antigen prozessiert und über MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert [8,48,49]. Zudem exprimieren sie kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86. Nach ihrer Migration in die Lymphknoten und dem Übertritt in die T-Zell-Zone aktivieren sie dort naive T-Zellen. Da dendritische Zellen parallel zur angeborenen Immunantwort die Aktivierung des adaptiven

Immunsystems einleiten, gelten sie als zentrales Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem [48,49,73,78].

2.6.4 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene Immunsystem folgt der angeborenen Immunabwehr, reagiert hochspezifisch auf Pathogene und zeichnet sich durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Dieses Gedächtnis ermöglicht bei erneuter Exposition gegenüber demselben Erreger eine beschleunigte sowie effektivere Immunantwort [48,49,73,78]. Die zentralen zellulären Bestandteile der adaptiven Immunabwehr sind die B- und T-Lymphozyten. Die von B-Zellen produzierten Antikörper stellen die humorale Komponente dar [48].

2.6.5 Lymphozyten

Der Körper eines erwachsenen Menschen verfügt über ungefähr 10^{12} Lymphozyten, wobei täglich etwa 1% neugebildet wird. Es wird zwischen einer T- und B-Zelllinie unterschieden. Die Lymphopoese beider Zelllinien findet in den primär lymphatischen Organen statt [12,49,73]. Vorläuferzellen beider Zelllinien entspringen dem Knochenmark. Während B-Zellen dort den Großteil ihrer Entwicklung durchlaufen, wandern die T-Zelllinien in das Gewebe des Thymus ein und differenzieren sich dort zu reifen T-Lymphozyten [12,48,49,73,78].

2.6.6 Antigenrezeptoren von Lymphozyten

Die Erkennung von Pathogenen durch Lymphozyten erfolgt über einen spezifischen Antigenrezeptor auf ihrer Zelloberfläche [48,49,70]. Diese Rezeptoren werden an den Ribosomen produziert und anschließend über das raue endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert [48]. T-Lymphozyten exprimieren den T-Zell-Rezeptor (TCR) und B-Lymphozyten die B-Zell-Rezeptoren (BCR). Jeder Lymphozyt besitzt nur eine spezifische Rezeptorvariante, sodass alle Lymphozyten gemeinsam über ein umfassendes Repertoire von Rezeptoren verfügen. Trifft ein T-Lymphozyt auf ein Antigen, das seinem TCR entspricht, wird er aktiviert und differenziert sich zu einem funktionsfähigen Effektor-T-Lymphozyten. Dabei entstehen verschiedene Subtypen, die in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden. Nach Bindung eines passenden Antigens an den BCR differenziert sich der B-Lymphozyt zu einer Plasmazelle, die als Effektorzelle große Mengen an Antikörpern produziert. Diese Antikörper stellen die sezernierte Form des ursprünglichen B-Zell-Rezeptors dar [48,49,70].

2.6.7 T-Zellrezeptor

Der TCR ist ein Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Kette, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Jede Kette gliedert sich in eine extrazelluläre, eine transmembranäre sowie

eine kurze intrazelluläre Einheit. Der extrazelluläre Anteil umfasst eine variable und eine konstante Region, wobei die variable Region die N-terminale Antigenbindungsstelle bildet [48].

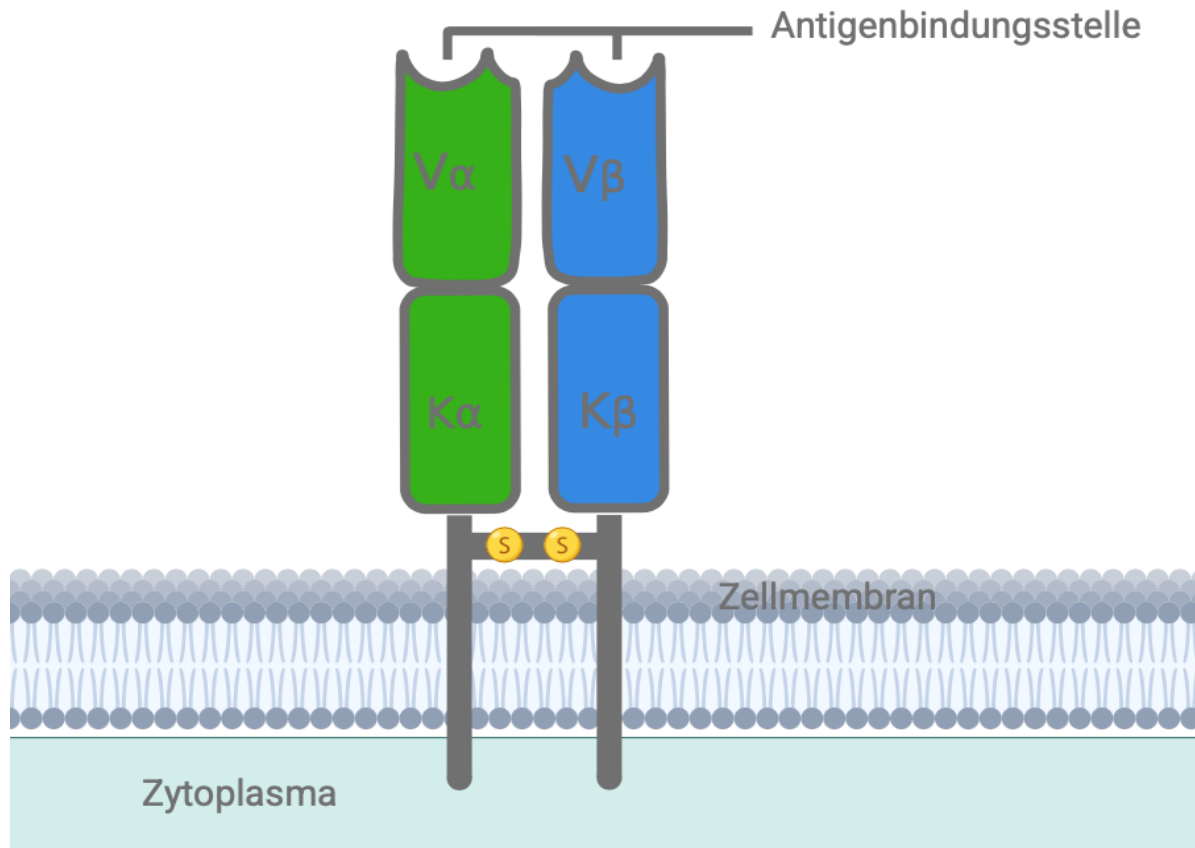


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur des T-Zellrezeptors. Die Abbildung zeigt schematisch die Struktur des TCR. Oben ist die Antigenbindungsstelle zu erkennen, bestehend aus den variablen Regionen der α - und β -Kette ($V\alpha$, $V\beta$). Darunter befinden sich die konstanten Regionen. Auf der linken Seite erkennbar die α -Kette und auf der rechten Seite die β -Kette ($K\alpha$, $K\beta$). Die Disulfidbrücke, die beide Ketten miteinander verbindet, ist gelb dargestellt. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com und modifiziert nach [48].

2.6.8 T-Zellrezeptor ähnlicher Antikörper

Zellen, die eine maligne Transformation oder eine Virusinfektion durchlaufen haben, präsentieren auf ihren MHC-Klasse-I-Molekülen Peptide, die von den entsprechenden Tumorantigenen oder viralen Proteinen stammen. Diese Peptide werden vom TCR erkannt, der über Aktivierung zytotoxischer $CD8^+$ -T-Zellen, die betroffenen Zellen gezielt eliminiert. Krankheitsspezifische MHC-Peptid-Komplexe stellen daher ein vielversprechendes Ziel für neue immuntherapeutische Ansätze dar [15,20,23,76].

Obwohl TCRs eine hohe Spezifität aufweisen, verfügen sie über eine vergleichsweise geringe intrinsische Affinität zu MHC-Peptid-Komplexen. Werden die TCRs in hochaffine, lösliche

Antikörpermoleküle umgewandelt, spricht man von T-Zell-Rezeptor-ähnlichen Antikörpern [20]. Diese sind in der Lage, die spezifische Zerstörung von Tumor- und virusinfizierten Zellen zu vermitteln [13,14,85]. Auch im Rahmen der Diagnostik können sie dazu verwendet werden, die Präsenz spezifischer T-Zell-Epitope oder MHC-Peptid-Komplexe mithilfe gängiger Methoden wie Durchflusszytometrie und Immunhistochemie nachzuweisen [15,20,23]. In der Krebsdiagnostik könnten sie dafür eingesetzt werden, die Expression spezifischer tumorassoziierter MHC-Peptid-Komplexe auf der Oberfläche von Tumorzellen oder Metastasen zu bestimmen [44,76].

Antikörper mit der MHC-restriktiven Spezifität von T-Zellen sind bislang jedoch selten [15,20,23,76]. Dies liegt nicht zuletzt an den grundlegenden Unterschieden in der Antigenerkennung durch T- und B-Zellen [48,49,73,78]. Während B-Zellen native Antigene unabhängig von MHC-Molekülen erkennen, sind TCRs ausschließlich in der Lage, intrazellulär verarbeitete lineare Peptidantigene im Kontext von MHC-Molekülen zu binden [7,8,34,48,49,73,75,78]. T-Zellen werden bereits im Thymus darauf selektiert, Antigenpeptide nur in Verbindung mit MHC-Klasse-I- oder -II-Molekülen zu erkennen [73,89]. Diese spezifische Restriktion stellt eine zentrale Hürde für die Entwicklung von TCR-ähnlichen Antikörpern dar und verdeutlicht die Herausforderung, Antikörper mit der MHC-restriktiven Spezifität von T-Zellen zu generieren, und warum sie sich nicht einfach durch herkömmliche B-Zell-Hybridomatechniken herstellen lassen [15,20,23,44].

2.6.9 T- Lymphozyten

Im Folgenden wird auf die Entwicklung und Reifung der T-Zellen näher eingegangen, die im Zentrum der zellulären Immunabwehr stehen. Die aus dem Knochenmark eingewanderten T-Lymphozyten sammeln sich zunächst im äußeren Rindenbereich des Thymus. Das Thymusgewebe stimuliert ihre Vermehrung und Differenzierung [49,73,89,93].

Während des Reifungsprozesses werden die Membranproteine CD4 und CD8 exprimiert, die eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunabwehr tragen [7,43,89]. Noch im Thymusgewebe kommt es zu einer Selektion der T-Lymphozyten, nur etwa 2 % der ursprünglich gebildeten T-Lymphozyten bleiben als selbst-tolerante Zellen bestehen, die restlichen Zellen werden durch Apoptose und Makrophagen eliminiert [43,73].

Es wird differenziert zwischen einer positiven und einer negativen Selektion. Die positive Selektion findet an den kortikalen Epithelzellen des Thymus statt. Hierbei überleben nur die T-Zellen, welche mit ihrem T-Zell Rezeptor die MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Proteine der Epithelzellen erkennen und binden. Die negative Selektion erfolgt an Makrophagen und dendritischen Zellen. Diese prüfen durch Oberflächenpräsentation körpereigener Proteine die Autoreaktivität der T-Zellen. Autoreaktive T-Zellen werden hierdurch identifiziert und eliminiert [43].

Nur T-Zellen, die beide Selektionsschritte erfolgreich durchlaufen haben, verlassen den Thymus als reife, naive T-Lymphozyten. Diese tragen einen T-Zell-Rezeptor und exprimieren entweder das Oberflächenmolekül CD4 zur Interaktion mit MHC-Klasse-II-Proteinen oder CD8 zur Interaktion mit MHC-Klasse-I-Proteinen [43,73,89].

Die naiven T-Zellen zirkulieren anschließend im Blut, wobei sie ungefähr 80 % der Lymphozytenpopulation im Blut ausmachen. Ihre Aktivierung findet an den interdigitierenden dendritischen Zellen der Lymphknoten statt. T-Zellen erkennen die ihnen präsentierten Komplexe aus Antigenpeptidfragment und MHC-Klasse-II-Protein, induzieren daraufhin die Expression von sowohl IL-2-Rezeptoren als auch IL-2 selbst. Diese Expression führt zu einer klonalen Expansion der spezifischen T-Zellen [43,78,93].

2.6.10 T-Helferzellen

Es wird zwischen T-Helferzellen 1 (TH1) und T-Helferzellen 2 (TH2) unterschieden. Ihre Differenzierung erfolgt in Abhängigkeit vom durch dendritische Zellen präsentierten Antigen. TH1-Zellen interagieren bevorzugt mit Makrophagen, indem sie MHC-Klasse-II-Proteine auf deren Oberfläche erkennen und diese Zellen aktivieren. Bei Vorliegen eines Pathogens wird dieses zunächst von Makrophagen phagozytiert und im Phagosom abgetötet. Anschließend fusioniert das Phagosom mit einem Lysosom, wobei ein Phagolysosom entsteht. Die dort entstehenden Peptidfragmente der abgebauten Pathogene werden an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden und zur Zelloberfläche transportiert. Dort können TH1-Zellen den Antigen-MHC-Komplex über ihren T-Zell-Rezeptor sowie das Korezeptorprotein CD4 erkennen. Die Erkennung führt zur Expression des CD40-Liganden und zur Sekretion von Interferon- γ , was die Makrophagen aktiviert. Zusätzlich wird Interleukin-2 (IL-2) freigesetzt, um die klonale Expansion der TH1-Zellen zu fördern. Aktivierte Makrophagen setzen daraufhin toxische Substanzen wie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) frei, um Pathogene effektiv abzutöten. Im Gegensatz dazu erkennen TH2-Zellen bevorzugt MHC-Klasse-II-gebundene Antigene auf B-Zellen [43].

2.6.11 Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen entstehen aus naiven CD8-T-Zellen nach ihrer Aktivierung durch professionelle antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen. Ihre Hauptfunktion ist die gezielte Elimination von Zellen, die aufgrund einer Infektion oder malignen Transformation eine potenzielle Bedrohung für den menschlichen Körper darstellen. Hierzu erkennen sie mit ihrem T-Zell-Rezeptor Antigenpeptide, die im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche pathogener Zellen präsentiert werden [43,73,89]. Die bereits erklärte Selektion im Thymus gewährleistet, dass diese T-Zellen nur auf körperfremde oder krankheitsspezifische Peptide reagieren. Nach erfolgreicher Antigenerkennung wird in der Zielzelle der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert, auf die im Folgenden näher eingegangen wird [43,89].

2.6.12 Einleitung der Apoptose durch Zytotoxische T-Zellen

Nach Antigenerkennung erfolgt die kalziumabhängige Exozytose zytotoxischer Granula, die Effektormoleküle wie Perforin, Granzym A, Granzym B und Granulysin enthalten. Perforin induziert die Porenbildung in der Plasmamembran der Zielzelle, wodurch Granzyme in das Zytosol gelangen. Dort aktivieren sie Caspasen und schädigen Mitochondrien, was zur Verstärkung der apoptotischen Signalweiterleitung führt [73,105].

Granzym A löst Apoptose caspasenunabhängig über mitochondriale Schädigung aus. Granzym B spaltet substratspezifisch hinter Asparaginsäureresten und aktiviert Caspase-3, die eine proteolytische Caspase-Kaskade initiiert. Dabei wird ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) gespalten, was zur Freisetzung und Aktivierung der caspase-aktivierten Desoxyribonuklease (CAD) führt. Granzym B aktiviert darüber hinaus den intrinsischen, mitochondrienvermittelten Apoptoseweg durch Spaltung des Proapoptosefaktors BID sowie durch Caspase-3. Dies resultiert in einer Schädigung der äußeren Mitochondrienmembran und in der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum, das als proapoptotischer Signalverstärker fungiert [73,91].

Granulysin trägt zusätzlich durch antimikrobielle Wirkung zur Induktion der Apoptose bei. Nach erfolgtem Zelltod exponieren die betroffenen Zellen Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, wodurch sie als apoptotisch erkannt und von Phagozyten aufgenommen und degradiert werden [73,97].

2.6.13 B-Lymphozyten und ihre Aktivierung durch TH2-Helferzellen

B-Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Stammzellen im Knochenmark. Sie produzieren spezifische Antikörper, die in die Plasmamembran eingebettet werden und dort als BCRs fungieren. Wie bei den T-Lymphozyten werden zunächst autoreaktive B-Zellen durch Apoptose eliminiert. Die verbleibenden etwa 10 % der B-Zellen migrieren anschließend in die Lymphfollikel der sekundären lymphatischen Organe [43].

Erkennt der B-Zell-Rezeptor ein passendes Antigen, wird dieses vollständig durch Endozytose aufgenommen, in Lysosomen in Peptidfragmente abgebaut, an MHC-Klasse-II-Proteine gebunden und schließlich auf der Zelloberfläche präsentiert [43].

Die Produktion löslicher Antikörper durch die B-Zelle erfordert den Kontakt mit einer passenden TH2-Zelle. Deren T-Zell-Rezeptor erkennt den präsentierten Antigen-MHC-II-Komplex, woraufhin ein sogenanntes T-B-Konjugat entsteht. Durch die Interaktion von CD40 auf der B-Zelle mit dem CD40-Liganden der TH2-Zelle exprimiert die B-Zelle Rezeptoren für Interleukine wie IL-4, IL-5 und IL-6, die von der TH2-Zelle sezerniert werden. Dies führt zur klonalen Expansion der B-Zelle [43].

Im Zuge dieser Aktivierung erfolgt ein Klassenwechsel der Antikörper, auch Isotypwechsel genannt. Die Art des gebildeten Antikörperisotyps wird durch DNA-Rekombination und das Zytokinmilieu bestimmt. Eine hohe IL-4-Konzentration führt bevorzugt zur Produktion von IgE, während Interferon- γ die Expression von IgG2 oder IgG3 begünstigt. Die Bildung von IgA wird primär durch das Zytokin TGF- β induziert. Der produzierte Antikörper wird zunächst in membranständiger Form exprimiert. Bei erneutem Antigenkontakt löst eine intrazelluläre Signalkaskade eine alternative RNA-Prozessierung aus, wodurch eine mRNA für die sezernierte Form des Antikörpers gebildet wird [43].

2.6.14 Zytokine

Da Zytokine in immunologischen Signalwegen eine zentrale Rolle spielen, werden sie im folgenden Abschnitt separat betrachtet. Nach einer viralen Infektion der Zielzellen kommt es zur vermehrten Ausschüttung von Typ-I-Interferonen, insbesondere Interferon- α . Diese Freisetzung erfolgt durch die Bindung der Viren an intrazelluläre Rezeptoren wie TLR-3, -7, -8, -9, RLR, MDA-5 und STING sowie durch die Stimulation prädendritischer Zellen (prä-DZ2) über Toll-like-Rezeptoren (TLRs) [88,90].

Aktivierte Typ-I-Interferone stimulieren außerdem die Interferonrezeptoren umliegender Zellen. Interferone hemmen die Zellproliferation einerseits durch die Induktion der RNA-abhängigen Proteinkinase PKR, die den Initiationsfaktor eIF-2 phosphoryliert und dadurch die virale Proteinbiosynthese blockiert. Andererseits regen sie die Ribonukleasen an, die den Abbau viraler RNA einleiten, indem sie die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthase induzieren, welche zur Polymerisation von Adeninnukleotiden führt. Darüber hinaus fördern Typ-I-Interferone die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen, erhöhen die Expression von MHC-I-Molekülen und unterstützen die Differenzierung von B-Zellen [84,88].

2.7 Antigenpräsentation

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert, können T-Zellen nicht direkt freie Antigene erkennen, sondern benötigen Zellen, die Peptidfragmente erzeugen und diese an ihrer Oberfläche einem T-Zell-Rezeptor präsentieren. Dieser Vorgang wird als Antigenpräsentation bezeichnet und ermöglicht die frühzeitige Elimination einer infizierten Zelle durch zytotoxische T-Zellen. Zelltypen, die Antigenpräsentation durchführen, werden als professionelle antigenpräsentierende Zellen zusammengefasst und umfassen unter anderem dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen [8,34,43,83].

2.7.1 MHC-Moleküle

Die Grundlage für die Antigenpräsentation bilden MHC-Moleküle. Diese werden durch Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes kodiert und gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Sie entstehen im rauen endoplasmatischen Retikulum und dienen der Präsentation antigener

Peptidfragmente auf der Zelloberfläche [48]. Die hohe Vielfalt der MHC-Moleküle ist Ausdruck eines ausgeprägten genetischen Polymorphismus. Es werden zwei Arten von MHC-Molekülen unterschieden: MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II. MHC-Klasse-I-Moleküle werden durch die Gene HLA-A, HLA-B und HLA-C kodiert, während MHC-Klasse-II-Moleküle durch HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ repräsentiert werden [48,73]. Sie verfügen über kleine strukturelle Unterschiede in ihren Untereinheiten, ähneln sich jedoch deutlich in ihrer Gesamtstruktur. Charakteristisch ist das Vorhandensein einer Peptidbindungsstelle auf der Moleküloberfläche, in der das präsentierte Antigen verankert wird. MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren Peptide aus dem Zellinneren (endogene Peptide) und sind damit für die Aktivierung von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen zuständig. MHC-Klasse-II-Moleküle hingegen präsentieren extrazellulär aufgenommene Peptide (exogene Peptide) und werden von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt [7,8,34,49].

2.7.2 MHC-I-Moleküle

Nahezu alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC-Klasse-I-Moleküle und präsentieren intrazelluläre Antigene. MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer größeren α -Kette, die membrangebunden ist und auf Chromosom 6 kodiert wird, sowie aus einer kleineren β 2-Mikroglobulin-Kette, die auf Chromosom 15 kodiert ist. Die Peptidbindungsstelle wird durch die α 1- und α 2-Domäne gebildet, während die α 3-Domäne und das β 2-Mikroglobulin der strukturellen Stabilisierung dienen. Wie bereits erläutert, erkennen CD8⁺-T-Zellen ausschließlich Peptide, die im Kontext von MHC-I präsentiert werden [8,43,48,49,70].

2.7.3 Transport der Peptidfragmente und Beladung der MHC-I-Moleküle

Die für MHC-I relevanten Peptidfragmente werden in verschiedenen Schritten bereitgestellt. Zunächst werden die zu degradierenden Proteine mit Ubiquitin markiert. Dann erfolgt der proteasomale Abbau, anschließend Transport ins endoplasmatische Retikulum vermittelt durch den TAP-Komplex, ein Heterodimer, welches aus TAP-1 und TAP-2 besteht. Dort binden die Peptide an die bereitgestellten MHC-I-Moleküle, wobei Chaperonproteine wie Calnexin und Tapasin eine zentrale Rolle spielen. Tapasin unterstützt unter anderem das sogenannte Peptid-Editing, bei dem nur solche Peptide ausgewählt werden, die eine stabile Interaktion mit dem MHC-Komplex eingehen können. Nach erfolgreicher Beladung gelangen die Komplexe über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche und stehen dort für die Erkennung durch T-Zellen bereit [8,81,83,95].

2.7.4 MHC-II-Moleküle

MHC-Klasse-II-Moleküle befinden sich ausschließlich auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen [48]. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Kette und sind Heterodimere. Die Aufnahme der Antigene erfolgt über verschiedene Mechanismen wie Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose. Durch pH-Ansäuerung entsteht ein Milieu, in welchem die Proteasen

aktiviert werden, die die Antigene in kleine Fragmente spalten. Nach Bildung der MHC-II-Moleküle im endoplasmatischen Retikulum gehen sie einen Komplex mit der invarianten Kette li (CD74) ein. Die Kette li setzt sich aus drei identischen Proteinen zusammen, stabilisiert den MHC-II-Komplex und blockiert seine Antigenbindungsgrube, um sie vor vorzeitiger Beladung zu schützen. Die Präsentation dieser Komplexe an CD4-positive T-Helferzellen ist ein essenzieller Schritt zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort [8,83].

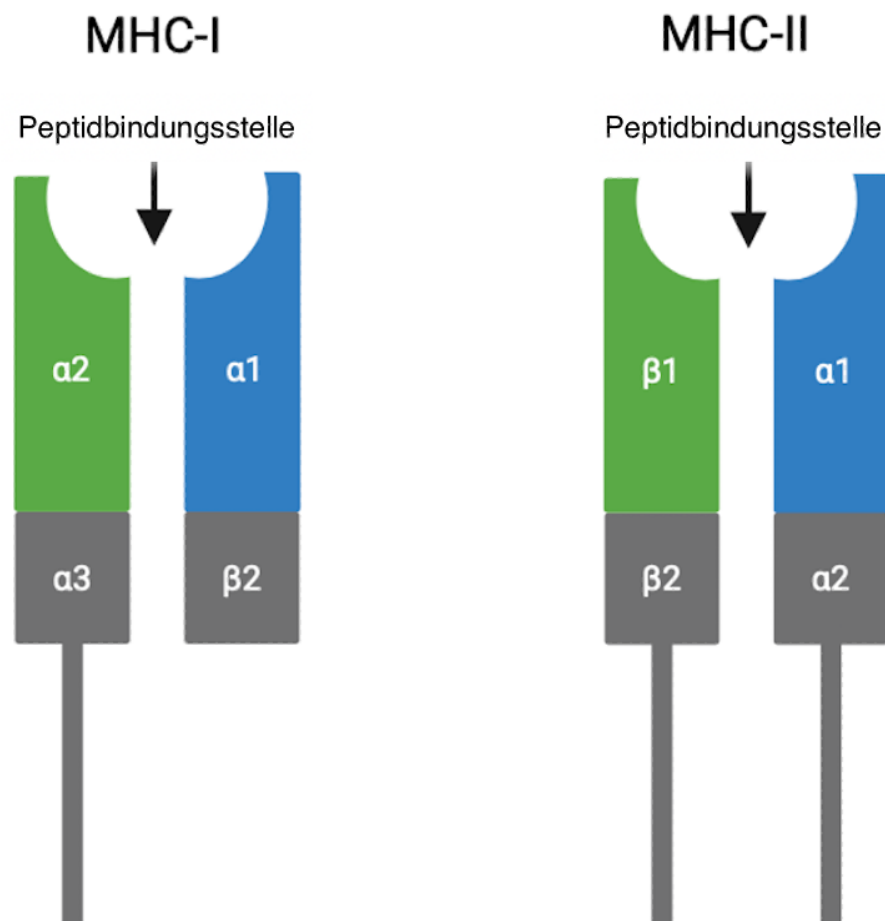


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus von MHC-I- und MHC-II-Molekülen aus Seitenansicht. **MHC-Klasse-I-Molekül (links):** Das MHC-Klasse-I-Molekül lässt sich in verschiedene Untereinheiten unterteilen: Oben links ist die grüne $\alpha 2$ -Untereinheit abgebildet, die gemeinsam mit der blauen $\alpha 1$ -Untereinheit rechts im Bild die Peptidbindungsstelle bildet. Unterhalb der $\alpha 2$ - und $\alpha 1$ -Untereinheiten befinden sich die $\alpha 3$ - und $\beta 2$ -Mikroglobulin-Untereinheiten. **MHC-Klasse-II-Molekül (rechts):** Das MHC-II-Molekül besteht aus mehreren Untereinheiten: Oben links ist grün die $\beta 1$ -Untereinheit abgebildet, die gemeinsam mit der blauen $\alpha 1$ -Untereinheit rechts im Bild die Peptidbindungsstelle bildet. Darunter sind jeweils die $\beta 2$ - und $\alpha 2$ -Untereinheiten zu erkennen. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com und modifiziert nach [7,73].

2.8 Bisherige Ergebnisse und Vorarbeiten

Vor Beginn dieser Promotionsarbeit wurden im Rahmen vorangegangener Forschungsprojekte ein HLA-restringiertes, CMV-spezifisches Antikörperrepertoire entwickelt, das auf die häufigsten HLA-Allele in der europäischen Bevölkerung ausgerichtet ist. Mithilfe bioinformatischer Datenbanken wurden die prävalentesten Allele identifiziert, woraufhin eine Fokussierung auf HLA-A*0101, *HLA-A*0201* und HLA-B*0702 erfolgte. Außerdem wurden mittels Phage-Display-Technologie Antikörperfragmente (Fabs) generiert, welche CMV-Peptide binden können, die von den genannten HLA-Molekülen präsentiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Fabs sowohl mit zuvor CMV-infizierten Fibroblasten spezifisch interagieren als auch eine antigenspezifische Zytotoxizität in HLA-kompatiblen, mit CMV-Peptiden beladenen Zelllinien auslösen [4,5].

2.8.1. Zielsetzung der Promotion

Die im Rahmen vorangegangener Forschungsprojekte entwickelten CMV-spezifischen Antikörper lieferten die Grundlage für das experimentelle Konzept dieser Promotionsarbeit. Ziel war es, die Translation CMV-spezifischer, TCR-ähnlicher Antikörper in die klinische Anwendung voranzutreiben. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Antikörper im Fab-Format als Tetramere erzeugt und an frischen Blutproben von CMV-infizierten Patienten sowie gesunden Kontrollpersonen getestet. Um die Fähigkeit zur Induktion zellulärer Zytotoxizität zu überprüfen, wurden zusätzlich Cytotoxicity Assays durchgeführt, bei denen CMV-spezifische IgG-Vollantikörper mit modifizierten Fc-Regionen sowie zuvor isolierte NK-Zellen verwendet wurden. Auf diese Weise konnte sowohl das diagnostische als auch das therapeutische Potenzial der Antikörper umfassend bewertet werden. Die zur Zielerreichung eingesetzte experimentelle Methodik sowie die dafür verwendeten Materialien werden im folgenden Kapitel beschrieben.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Firma
BD FACSCanto™ Flow Cytometer	BD Biosciences (Heidelberg, D)
HERAsafe HSP18 Sicherheitswerkbank (Hood)	Heraeus (Hanau, D)
Neubauer-Zählkammer	Eppendorf (Hamburg, D)
VARIOSKAN LUX	Thermo Scientific (Dreieich, D)
Unitron Mikroskop	INFORNS
Inkubatorofen (30 °C)	Memmert
Cooling Centrifuge Z 383 K	Hermle
Biofuge Pico Heraeus Centrifuge	Heraeus
Autoklav V-75	Systec GmbH & Co. KG
Pipette (P1000, P100, P10)	Eppendorf Research
CO ₂ -Inkubator HERAcell 240	Kendro

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Reagenzgefäße	Sarstedt
Flow Cytometry Tubes (75×12 mm, PS)	Sarstedt
Vasco® Nitril blue Untersuchungshandschuhe, unsteril	B. Braun
Pipettenspitzen (P1000, P100, P10)	Sarstedt
Mikroplatten Standard R	Sarstedt

3.1.3 Chemikalien und Sonstiges

Tabelle 3: Chemikalien und Sonstiges

Name	Firma
Streptavidin RPE	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7)	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Cytotoxicity Detection Kit Plus	Roche/Sigma-Aldrich Chemie GmbH
NK-Zell-Isolierungs-Kit	Miltenyi Biotech GmbH (Bergisch Gladbach, D)
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Roche/Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glucose 40% (100 ml)	SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG
EDTA-free-Proteinaseinhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Gibco™ Bacto™ Trypton	Thermo Fisher Scientific
Yeast Extract Powder	Thermo Fisher Scientific
Ampicillin-ratiopharm® 5,0 g	Ratiopharm ®
Biotin	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Talon™ Metal Affinity Resin	Clontech Laboratories, Inc.
Imidazol	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
BD FACSFlow™ Trägerflüssigkeit	BD Biosciences (Heidelberg, D)
BD FAC™ Lysing Solution (10x Konzentrat)	BD Biosciences (Heidelberg, D)

3.1.4 Medien

Für die Herstellung von einem Liter 2 x TY wurden 16g Tryptone, 10g Yeast und 5g NaCl gemischt und anschließend autoklaviert. Für die Herstellung von 2 x TY-AG-Medium wurden 2 x TY nach dem Autoklavieren 100µg/ml Ampicillin sowie 2% Glucose zugesetzt.

3.1.5 Antikörper und Peptide

3.1.5.1 CMV-Peptide

Tabelle 4: CMV-Peptide

HLA-Allel	A*0101	A*0201	B*0702
Allel-Häufigkeit [%]	15,10%	26,70%	12,00%
CMV-Peptid	YSEHPTFTSQY	NLVPMVATV	TPRVTGGGAM
CMV-Protein	pp65	pp65	pp65

Darstellung modifiziert nach [6].

3.2 Methoden

3.2.1 Identifizierung des HLA-Status der Patienten

Eine HLA-Typisierung der Patienten erfolgte bereits im Vorfeld im Rahmen der Vorbereitung auf eine Stammzell- oder Organtransplantation. Die Ermittlung des HLA-Status der gesunden Kontrollpersonen wurde entweder aus bereits bestehenden Unterlagen des Deutschen Knochenmarkspenderregisters (DKMS) entnommen oder, sofern keine Typisierung vorlag, durch hergestellte HLA-spezifische Antikörper mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.2 Isolierung Natürlicher Killerzellen

Aus dem Blut der Testpersonen wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Die Isolation der NK-Zellen aus PBMCs erfolgte magnetisch einen Tag vor Durchführung des Zytotoxizitäts-Assays gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung des humanen CD56⁺/CD16⁺ Isolations-Kits (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). Eine zusätzliche Aktivierung der Zellen wurde nicht durchgeführt. Die Reinheit der isolierten NK-Zellpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung entsprechender Antikörper (Miltenyi) überprüft. Dabei wurde ein Anteil an CD16⁺-Zellen zwischen 90 % und 98 % ermittelt. Die durchschnittliche Vitalität der isolierten NK-Zellen lag bei 99 %.

3.2.3 Produktion von biotinylierten Fabs

3.2.3.1 Expression

Um Tetramere für die Bindungsversuche herzustellen, mussten zunächst biotinylierte Fab-Antikörper produziert werden. Hierfür wurde eine Bakterienkultur verwendet, die sowohl das Antikörper-kodierende Plasmid sowie eine BirA Sequenz enthielt. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG, welches an den Repressor LacR bindet. Durch diese Bindung wird die Wechselwirkung mit dem Operator inhibiert und ein *lac*-Operon aktiviert. Die BirA Sequenz ermöglicht bei Zugabe von Biotin während der Expression die Herstellung biotinylierter Fab Antikörper, die in das Periplasma transportiert werden. Durch korrekte Faltung und Ausbildung von Disulfidbrücken erhält der Antikörper seine Funktionsfähigkeit.

Zur Gewinnung der Fabs wurden die TG1-Klone, die das Antikörper-kodierende Plasmid enthielten, gepickt und in 50 ml 2 x TY-AG-Medium über Nacht bei 30°C und 170 U/min inkubiert. Am Folgetag wurde die Kultur in 1:100 in 2 x TY-AG-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 0,1% Glukose) inokuliert und bei 37°C und 270 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 geschüttelt. Anschließend wurden 1 mM IPTG sowie 50 µg/ml Biotin zugesetzt und für 4 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach Ablauf der Induktionszeit erfolgte ein 15-minütiges Zentrifugieren bei 4600 U/min und eine sorgfältige Entfernung des

Überstands. Für den bestmöglichen Ertrag wurde das entstandene Pellet über Nacht bei -20 °C eingefroren, da durch das Einfrieren Löcher in der Bakterienmembran entstehen, welche das Herauslösen der FABs aus dem Periplasma deutlich erleichtern.

Zur weiteren Aufarbeitung der Bakterienpellets wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut und mit jeweils 8 ml eisgekühltem EDTA-free-Proteinaseinhibitor-Cocktail behandelt. Die Suspension wurde in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß gefüllt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zentrifugengefäße wurden anschließend mit je 8,8 ml TS/H₂O_{dest} (Mischungsverhältnis 1:3) gespült und zu der Bakteriensuspension hinzugegeben. Weitere 30 Minuten Eisinkubation führten zu einem osmotischen Kälteschock, der in einer Lyse der bakteriellen Zellwand resultierte. Nach Zentrifugation der Suspension bei 14.000 x g und 4°C für 15 Minuten, konnte der Überstand, welcher die biotinylierten Fab-Antikörper enthielt, zur Aufreinigung weiterverarbeitet werden.

3.2.3.2 Aufreinigung

Die Aufreinigung der Fab-Antikörper erfolgte mittels Talons®-Resins. Die Antikörper wurden in einem Gefäß mit 50 ml PBS (pH 8) gewaschen und bei 320 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der zuvor bei der Expression gewonnene Überstand wurde auf das Talon®-Pellet gegeben und die Suspension für eine Stunde bei 4°C auf dem Rolltisch inkubiert. Die Fab-Antikörper banden nun mittels des Histidin-Tags an die Co²⁺-Ionen der Talon®-Resins. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Suspension erneut für 3 Minuten bei 320 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach mehrmaligem Waschen (einmal mit 50 ml PBS pH 8/0,1 % Tween 20 für 10 Minuten bei 4 °C, anschließend 2–3-mal mit PBS pH 8) wurden die Talon®-Resins mit 1-2 ml 100 mM Imidazol in PBS pH 8 resuspendiert und 1-2 Minuten inkubiert. Da Imidazol eine höhere Affinität hat, kommt es so zur Verdrängung des Histidins aus der Bindung zum Co²⁺. Die so gewonnene Fraktion wurde zweifach dialysiert.

3.2.3.3 Tetramerisierung von biotinylierten Fabs

Zur Tetramerisierung wurde biotinylierte Fab-Monomere über zehn Zeitintervalle Streptavidin-PE zugesetzt. Die Zugabe des Streptavidin-PE erfolgte alle 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach jeder Zugabe wurde vorsichtig durchgemischt. Zwischen den Zugaben wurden die Reaktionsansätze im Dunkeln inkubiert. Die eingesetzten Absolutmengen der biotinylierten Monomere variierten zwischen 5-10 µl, bei einem molekularen Verhältnis von 4:1 (Fab-Monomer zu Streptavidin-PE).

3.2.4 Tetramer-Färbung

Für die Tetramer-Färbung wurden jeweils 100 µl EDTA-Blut eines akut CMV-Infizierten oder eines Kontrollprobanden mit 1 µg Tetramer in einem FACS-Röhrchen für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 2 ml FACS Lysing Solution hinzugegeben, um zum einen die Erythrozyten zu lysieren und zum anderen die Leukozyten im Dunkeln zu fixieren. Nach einer 10-

minütigen Inkubationszeit wurden die Probenröhrchen bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Danach erfolgte die Entfernung des Überstands, die Waschung des Zellpellets mit FACSFlow sowie eine erneute Zentrifugation. Das resultierende Zellpellet wurde abschließend in 200-300 µl FACSFlow resuspendiert.

3.2.5 Durchflusszytometrische Analysen

Im Rahmen der Durchflusszytometrie (FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*) wurden die Zellen in einer Einzelzellsuspension perlschnurartig innerhalb eines Flüssigkeitsstroms an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Die genaue Ablenkung des Laserstrahls durch die Zellen wurde dabei durch Detektoren ermittelt, sodass Aussagen über Oberflächenstruktur, Größe und Granulierung der Zellen getroffen werden konnten. Durch präzise Bestrahlung wurden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes zunächst auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach Bestrahlung des Lasers gaben die Elektronen in Form von Photonen Energie ab, bevor sie wieder auf ihr ursprüngliches Niveau abfielen. Ein Photodetektor ermittelte die emittierte Photonenkonzentration, wodurch sich proportional eine Mengenbestimmung der fluoreszenzgebundenen Tetramere ableiten ließ. Die Analyse der durchflusszytometrischen Ergebnisse wurde mit einem BD FACSCanto unter Verwendung der Software FlowJo™ v10.10 durchgeführt. Wenn möglich, wurden mindestens 10⁴ Zellen analysiert. Eine fokussierte Betrachtung der Lymphozyten wurde in Histogrammen dargestellt. Eine positive Tetramer-Bindung wurde als Rechtsverschiebung der Kurve im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar.

3.2.6 Herstellung von CMV-spezifischen IgG-TCR-ähnlichen Antikörpern

Zur Herstellung der Antikörper wurden die variablen Regionen von CMV-spezifischen TCR-ähnlichen Fab-Antikörpern unter Verwendung von Restriktionsenzymen in einen pSFI-Expressionsvektor kloniert. Dieser pSFI-Expressionsvektor enthielt die konstanten Regionen der schweren und leichten Kette eines IgG1-Antikörpers. Der Vektor mit der gewählten Zielinformation wurde mittels Transfektion in HEK293T-Zellen eingebracht. Die im Zellkulturüberstand enthaltenen Antikörper wurden über den integrierten Flag-Tag gereinigt. Die Konzentration der Antikörper wurde durch photometrische Messung ermittelt und zusätzlich in einem Coomassie-Gel kontrolliert.

3.2.7 Fc-Modifikationen der Antikörper

Vor Durchführung der Cytotoxicity Assays wurden drei Aminosäuren (S239D, A330L, I332E) der CH2-Region von IgG1-CMV-spezifischen Antikörpern mittels gerichteter Mutagenese (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) modifiziert [21,56,77]. Die modifizierten C1- und C7-Antikörper wurden in Konzentrationen von 0,0001 µg/ml bis 0,01 µg/ml (C1, C1nm) bzw. von 0,001 µg/ml bis 0,01 µg/ml (C7, C7nm) verwendet.

3.2.8 Testung der zytotoxischen Aktivität

Zur Untersuchung der antikörpervermittelten zellulären Toxizität (ADCC) wurden PBMC von gesunden Spendern und von Patienten mit aktiver CMV-Infektion als Zielzellen (Targets) verwendet. Aufgrund des geschwächten Immunsystems der Patienten und der dementsprechend reduzierten Anzahl der zur Verfügung stehenden Lymphozyten wurden zuvor natürliche Killerzellen (NK) von gesunden Probanden isoliert und als Effektorzellen für die Assays zur antikörperabhängigen zellvermittelten Toxizität eingesetzt. Die Zielzellen wurden entweder im unbehandelten nativen Zustand belassen oder mit Kontrollpeptiden beziehungsweise mit HLA-kompatiblen CMV-Peptid (15 µg/ml) beladen und über Nacht inkubiert.

Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit den entsprechenden HLA/CMV-spezifischen IgG-Konstrukten inkubiert (1µg/ml) oder unbehandelt verwendet. Anschließend wurden jeweils 10.000 NK-Effektorzellen und Zielzellen pro Well in 96-Well-U-Boden-Platten gemeinsam bei 37 °C für 4 Stunden inkubiert. Das Effektor-zu-Zielzellen-Verhältnis (E:T) betrug dabei je nach verfügbarer Zellzahl 3:1 bis 5:1. Alle Versuche wurden im 96-Well-Format und in Triplikaten durchgeführt, um die statistische Relevanz zu berechnen.

Die NK-Zell-vermittelte ADCC (Lyserate) wurde durch die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) aus den Zielzellen beurteilt. Die Überstände wurden auf ihren LDH-Gehalt mittels ELISA (Cytotoxicity Detection Kit Plus, Roche/Sigma-Aldrich Chemie GmbH) entsprechend den Herstelleranweisungen analysiert. Als Referenzwerte wurden das Maximum, ermittelt durch die vollständige Lyse, und das Minimum, ermittelt durch die Spontan-Lyse, verwendet.

Auf Grundlage der zuvor beschriebenen Methodik wurden die experimentellen Untersuchungen dieser Promotionsarbeit durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse werden im folgenden Kapitel systematisch dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Tetramerbindung

Insgesamt wurde das periphere Blut von neun Patienten mit CMV-Infektion und passendem HLA-Typ und 18 Kontrollpersonen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

4.1.1 Tetramerbindung in CMV-positiven Patienten mit passendem HLA-Status

Das periphere Blut von neun CMV-positiven, transplantierten und HLA-typisierten Patienten wurde auf die Bindung CMV-spezifischer Tetramere mittels Durchflusszytometrie untersucht. Alle eingeschlossenen Patienten exprimierten mindestens eines der restriktiven HLA-Allele. Eine Übersicht über die HLA-Typisierung sowie die jeweilige CMV-Viruslast der Patienten ist in Tabelle 5 dargestellt. Verwendet wurden die folgenden Tetramere:

1. **Tetramer A6**, restriktiv für **HLA-A*0101**
2. **Tetramer C1** restriktiv für **HLA-A*0201**
3. **Tetramer C7** restriktiv für **HLA-B*0702**

Das C1-Tetramer zeigte eine konsistente und ausgeprägte Bindung an Lymphozyten aller sechs HLA-A*0201-positiven Patienten (CMV1, 2, 3, 4, 7 und 9; Abbildungen 6-7).

Das A6-Tetramer detektierte ebenfalls eine spezifische, wenngleich geringere Bindung bei den drei HLA-A*0101-positiven Patienten (CMV5, 6 und 8; Abbildung 8).

Das C7-Tetramer band schwach, aber eindeutig an Lymphozyten des CMV-infizierten Patienten CMV6, der sowohl HLA-A*0101 als auch HLA-B*0702 exprimierte; Abbildung 8).

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind in Form von Histogrammen dargestellt. Die verwendeten Farben repräsentieren die jeweiligen Färbungen wie folgt:

- ❖ **Grau:** Negativ-Kontrolle (PE-Tetramer)
- ❖ **Grün:** A6-Tetramer
- ❖ **Rot:** C1-Tetramer
- ❖ **Blau:** C7-Tetramer

Tabelle 5: Übersicht der CMV-positiven Patienten mit mindestens einem kompatiblen HLA-Allel

Patienten - ID	Patienten HLA-Status	Viruslast in pB
CMV1	HLA-A*0201	700 IU/ml
CMV2	HLA-A*0201	130.000 IU/ml
CMV3	HLA-A*0201	2300 IU/ml
CMV4	HLA-A*0201	10.000 IU/ml
CMV5	HLA-A*01	4400 IU/ml
CMV6	HLA-A*01, HLA-B*07	4100 IU/ml
CMV7	HLA-A*0201	1.5 x 10 ⁶ IU/ml
CMV8	HLA-A*01	2200 IU/ml
CMV9	HLA-A*02	1400 IU/ml

Darstellung modifiziert nach [6].

4.1.1.1 HLA-A*0201-positive Patienten: Bindung an C1-Tetramer mit PE-Tetramer als Kontrolle

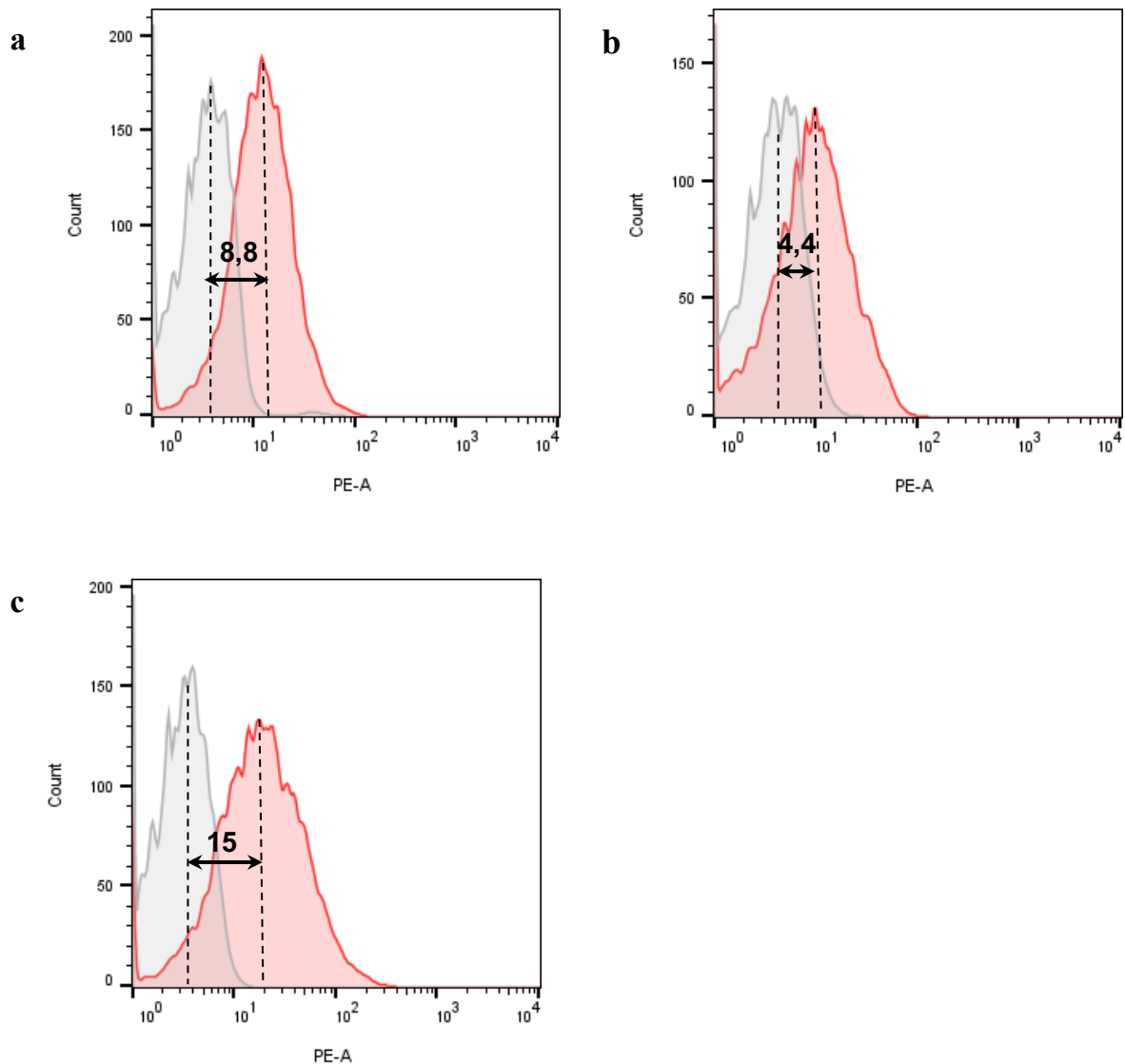


Abbildung 6: Durchflusszytometrie-Histogramme von HLA-A*0201-positiven Patienten CMV1 (a), CMV3 (b) und CMV4 (c). Dargestellt ist die Ereigniszahl (y-Achse) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Die graue Kurve zeigt das PE-Tetramer als Negativkontrolle, die rote Kurve das C1-Tetramer. Gestrichelte Linien markieren die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI), deren Differenz (Δ MFI) mit Pfeilen angegeben ist. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Die Durchflusszytometrie der drei HLA-A*0201-positiven Patienten zeigte eine unterschiedlich ausgeprägte Verschiebung der Fluoreszenzintensität (Abbildung 6). Die quantitative Auswertung (Tabelle 6) ergab bei Patient CMV1 mit einer Viruslast von 700 IU/ml ein Δ MFI von 8,8 (PE-Tetramer 2,8; C1-Tetramer 11,6). Für Patient CMV3 mit 2.300 IU/ml wurde ein Δ MFI von 4,4 bestimmt (PE-Tetramer 2,8; C1-Tetramer 7,2). Am deutlichsten war die spezifische Antikörperbindung bei Patient CMV4 mit 10.000 IU/ml ausgeprägt, bei dem ein Δ MFI von 15,0 gemessen wurde (PE-Tetramer 2,3;

C1-Tetramer 17,3). Damit bestätigt die tabellarische Analyse die in den Histogrammen sichtbare Zunahme der spezifischen C1-Tetramer-Bindung.

Tabelle 6: Viruslast und spezifische C1-Tetramer-Bindung (Δ MFI) bei den HLA-A*0201-positiven Patienten CMV1, CMV3, CMV4

Patienten-ID	Viruslast in pB	PE-Tetramer	C1-Tetramer	Delta MFI
CMV1	700 IU/ml	2,8	11,6	8,8
CMV3	2300 IU/ml	2,8	7,2	4,4
CMV4	10 000 IU/ml	2,3	17,3	15

Daten modifiziert nach [6].

4.1.1.2 HLA-A*0201-positive Patienten: Bindung an C1-Tetramer mit PE-Tetramer und zusätzlichen Kontroll-Tetrameren

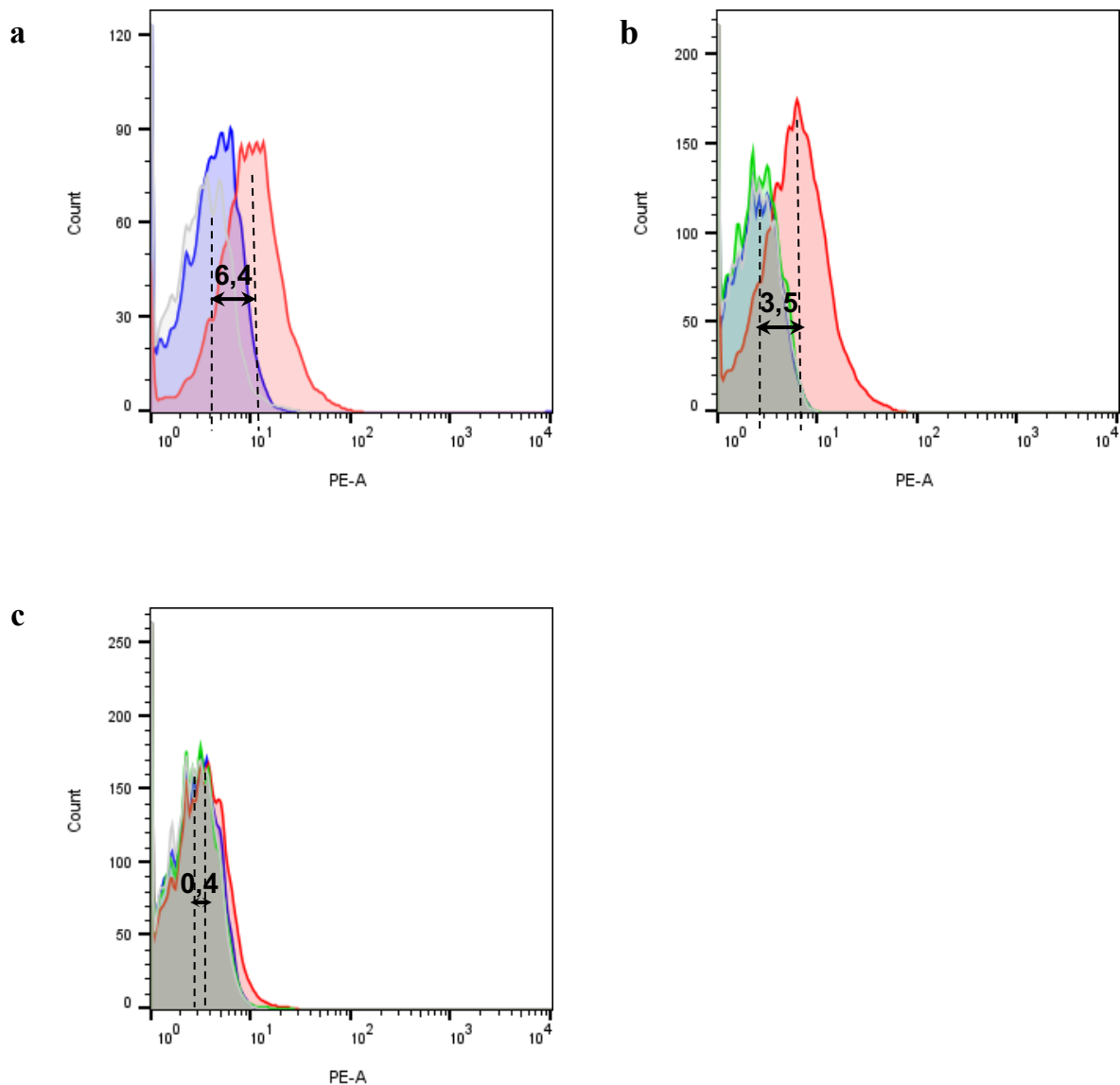


Abbildung 7: Durchflusszytometrie-Histogramme von HLA-A*0201-positiven Patienten CMV2 (a), CMV7 (b) und CMV9 (c). Aufgetragen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Die graue Kurve stellt die Negative Kontrolle (PE-Tetramer) dar. Die blaue Kurve zeigt das C7-Tetramer, die grüne Kurve das A6-Tetramer, und die rote Kurve repräsentiert das HLA-A*0201-kompatible C1-Tetramer. Gestrichelte Linien markieren die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI), deren Differenzen (Δ MFI) mit Pfeilen angegeben sind. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Die Durchflusszytometrie der drei HLA-A*0201-positiven Patienten zeigte eine unterschiedlich ausgeprägte Bindung des C1-Tetramers im Vergleich zur Negative Kontrolle sowie zu den Kontroll-Tetrameren A6 und C7 (Abbildung 7). Die quantitative Analyse (Tabelle 7) ergab bei Patient CMV2 mit 130.000 IU/ml ein Δ MFI von 6,4 (PE-Tetramer 3,1; C1-Tetramer 9,5). Bei Patient CMV7 mit 251.000 IU/ml wurde ein Δ MFI von 3,5 gemessen (PE-Tetramer 1,6; C1-Tetramer 5,1). Bei Patient CMV9 mit 1.400 IU/ml zeigte sich lediglich ein Δ MFI von 0,4 (PE-Tetramer 2,0; C1-Tetramer 2,4).

Damit bestätigt die tabellarische Analyse die in den Histogrammen sichtbare Variabilität der spezifischen C1-Tetramer-Bindung, die bei CMV2 und CMV7 deutlich ausgeprägt war, während sie bei CMV9 mit der niedrigeren Viruslast erwartungsgemäß geringer ausfiel.

Tabelle 7: Viruslast und spezifische C1-Tetramer-Bindung (Δ MFI) bei den HLA-A*0201-positiven Patienten CMV2, CMV7 und CMV9

Patienten-ID	Viruslast in pB	PE-Tetramer	A6-Tetramer	C1-Tetramer	C7-Tetramer	Delta MFI
CMV2	130.000 IU/ml	3,1	/	9,5	4	6,4
CMV7	251.000 IU/ml	1,6	1,7	5,1	1,6	3,5
CMV9	1400 IU/ml	2	2	2,4	2	0,4

Daten modifiziert nach [6].

4.1.1.3 HLA-A*01 und HLA-B*07-positive Patienten: Bindung an A6- und C7-Tetramer

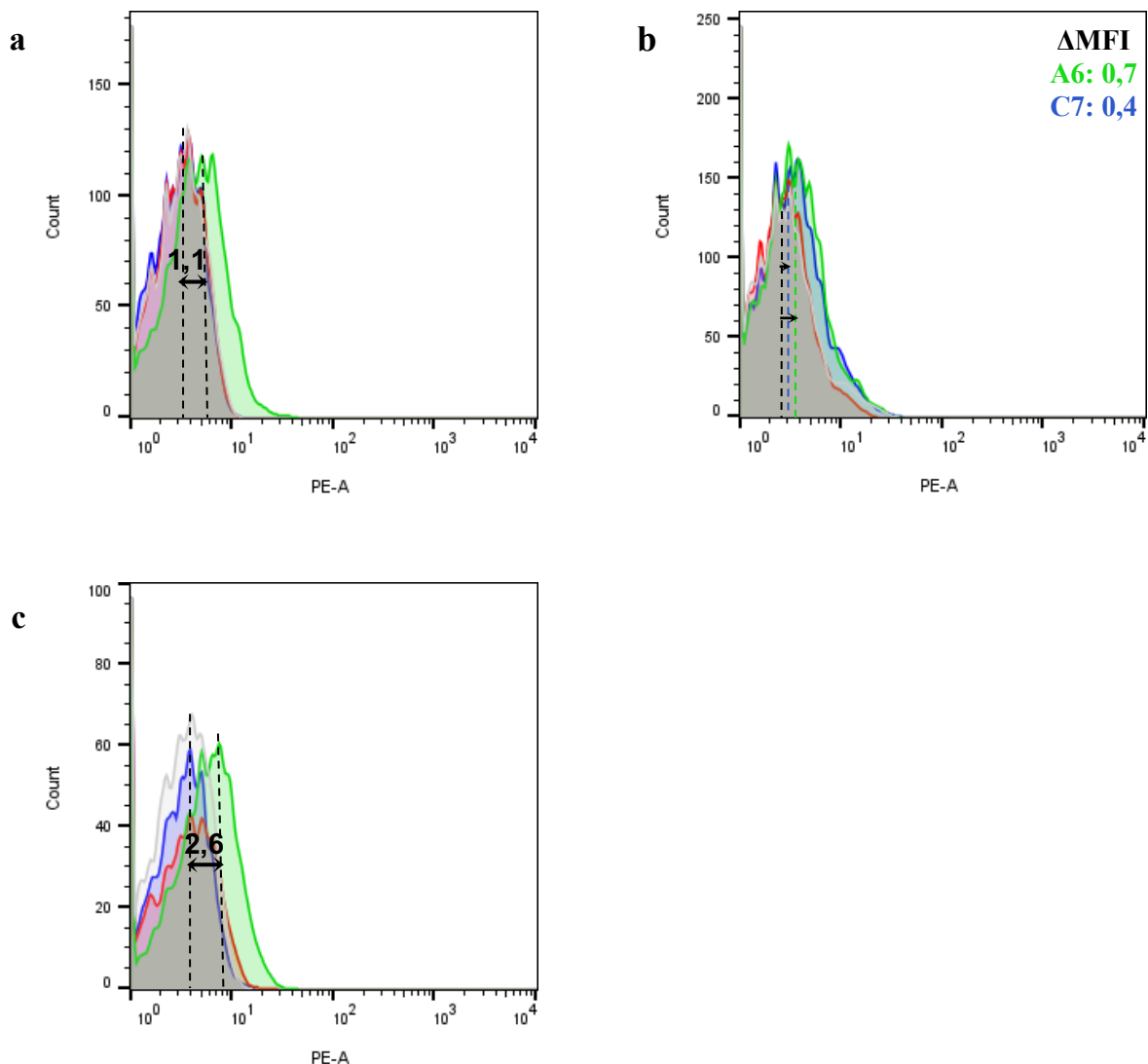


Abbildung 8: Durchflusszytometrie-Histogramme von HLA-A*0101 und HLA-B*0702-positiven Patienten CMV5 (a), CMV6 (b) und CMV8 (c). Die Histogramme zeigen die Ereigniszahl (y-Achse) in Relation zur Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Die graue Kurve zeigt das PE-Tetramer (Negativkontrolle). Die grüne Kurve stellt das A6-Tetramer dar (restriktiv für HLA-A*0101), die blaue Kurve das C7-Tetramer (restriktiv für HLA-B*0702), die rote Kurve das C1-Tetramer. Gestrichelte Linien markieren die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI); die Δ MFI-Werte sind bei CMV6 für A6 und C7 separat angegeben. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Die Analyse der HLA-A*0101/HLA-B*0702-positiven Patienten zeigte insgesamt geringe bis moderate Bindungen der spezifischen A6- und C7-Tetramere (Abbildung 8). Die quantitative Auswertung (Tabelle 8) ergab bei Patient CMV5 mit 4.400 IU/ml ein Δ MFI-A6 von 1,1 (PE-Tetramer 2,1; A6-Tetramer 3,2). Bei Patient CMV6 mit 4.100 IU/ml wurden aufgrund der Doppel-Positivität für HLA-A*0101 und HLA-B*0702 zwei Werte berechnet: Δ MFI-A6 = 0,7 (PE-Tetramer 2,1; A6-Tetramer 2,8) und Δ MFI-C7 = 0,4 (PE-Tetramer 2,1; C7-Tetramer 2,5). Für Patient CMV8 mit 2.200 IU/ml ergab sich ein Δ MFI-A6 von 2,6 (PE-Tetramer 2,5; A6-Tetramer 5,1). Das C1-Tetramer lag bei allen drei Patienten

auf dem Niveau der Negativkontrolle, was die HLA-Restriktion bestätigt und verdeutlicht, dass die Tetramere ausschließlich bei Vorliegen des passenden HLA-Moleküls binden. Damit bestätigen die tabellarischen Werte die in den Histogrammen sichtbare Variabilität der A6- und C7-Tetramer-Bindung, deren Δ MFI-Werte im Vergleich zu den C1-Tetramer-Bindungen bei HLA-A*0201-positiven Patienten geringer ausfielen (Abbildungen 6 und 7, Tabellen 6 und 7).

Tabelle 8: Viruslast und Tetramer-Bindung (Δ MFI) bei HLA-A*0101 und HLA-B*0702-positiven Patienten (CMV5, CMV6, CMV8).

Patienten-ID	Viruslast in pB	PE-Tetramer	A6-Tetramer	C1-Tetramer	C7-Tetramer	Delta MFI
CMV5	4400 IU/ml	2,1	3,2	2,1	2,1	1,1
CMV6	4100 IU/ml	2,1	2,8	2	2,5	A6: 0,7 C7: 0,4
CMV8	2200 IU/ml	2,5	5,1	2,6	2,7	2,6

Daten modifiziert nach [6].

4.1.2 Longitudinale Messung der Tetramer-Bindung mit abnehmender Viruslast

Bei den Patienten CMV1, CMV3 und CMV7 wurden serielle Messungen durchgeführt, um die Dynamik der Tetramer-Bindung in Abhängigkeit von der Viruslast zu untersuchen. Im Verlauf der anti-CMV-Therapie zeigte sich ein Rückgang der C1-Tetramer-Bindung parallel zur Abnahme der Viruslast. Diese Veränderungen waren sowohl in den Histogrammen in Form einer sukzessiv geringeren Rechtsverschiebung der roten Kurve als auch in den berechneten Δ MFI-Werten nachvollziehbar. Damit wurde ein Zusammenhang zwischen aktiver Infektion und detektierbarer Tetramer-Bindung sichtbar, der sich über den zeitlichen Verlauf quantifizieren und visuell darstellen ließ. Die Ergebnisse der einzelnen Patienten sind in den Abbildungen 9–11 sowie den Tabellen 9–11 aufgeführt.

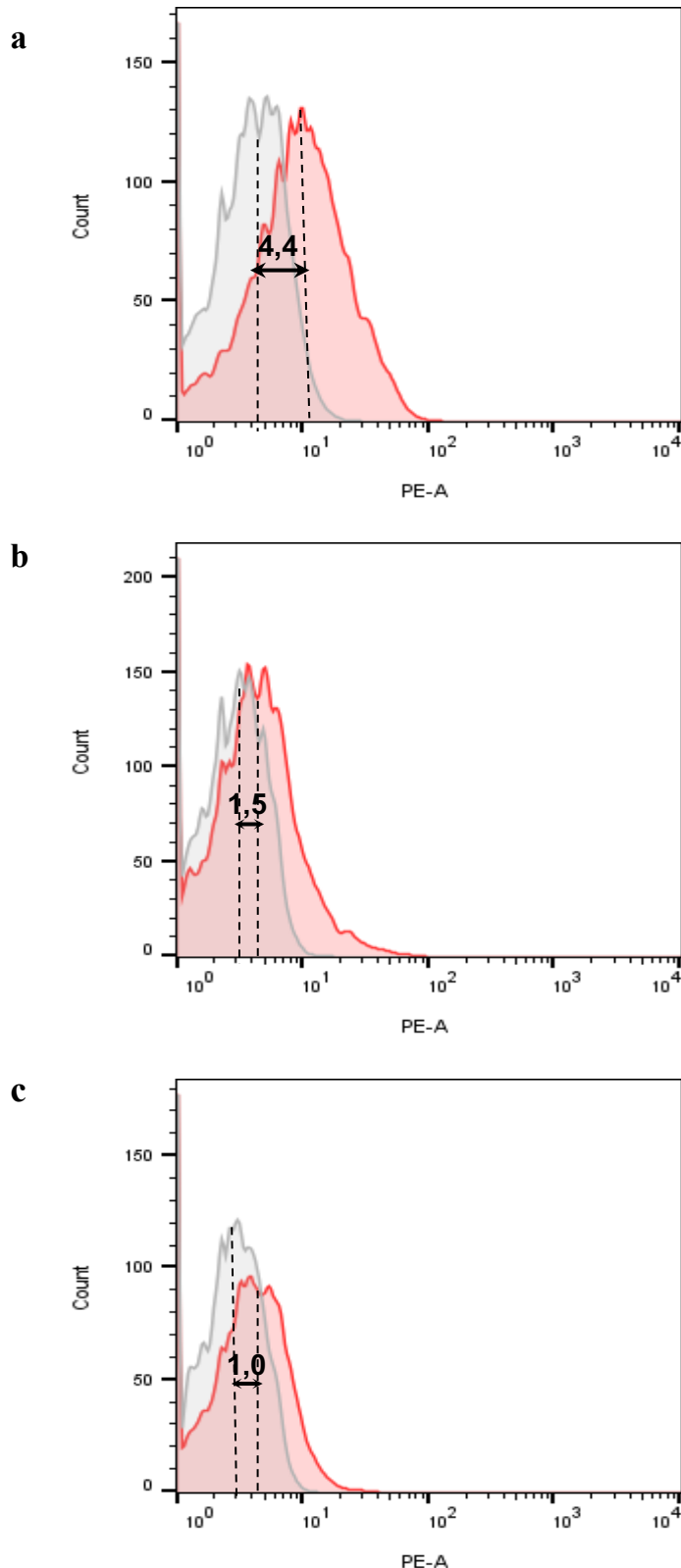


Abbildung 9: Longitudinale Messung der Tetramer-Bindung bei Patient CMV3 (HLA-A*0201). Aufgetragen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201-spezifisch). Dargestellt sind drei Zeitpunkte während abnehmender Viruslast: a) vor Beginn der Therapie, b) im Verlauf der Therapie, c) im weiteren Verlauf. Gestrichelte Linien markieren die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI); die Δ MFI-Werte sind durch Pfeile dargestellt. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Bei Patient CMV3 wurden drei serielle Messungen während abnehmender Viruslast durchgeführt (Abbildung 9). Die quantitative Analyse (Tabelle 9) ergab vor Beginn der Therapie (Zeitpunkt a, Viruslast 2.300 IU/ml) ein Δ MFI von 4,4 (PE-Tetramer 2,8; C1-Tetramer 7,2). Im Verlauf der Therapie (Zeitpunkt b, Viruslast 1.700 IU/ml) betrug das Δ MFI 1,5 (PE-Tetramer 2,2; C1-Tetramer 3,7). Dieser Rückgang war sowohl tabellarisch erkennbar als auch im Histogramm durch eine moderat abgeschwächte Rechtsverschiebung der roten Kurve sichtbar. Bei einer weiteren Abnahme der Viruslast auf 600 IU/ml (Zeitpunkt c) wurde ein Δ MFI von 1,0 gemessen (PE-Tetramer 2,1; C1-Tetramer 3,1), entsprechend einer deutlich reduzierten Rechtsverschiebung im Histogramm. Damit bestätigen die tabellarischen Werte die in den Histogrammen sichtbare, sukzessive Abnahme der C1-Tetramer-Bindung in Korrelation zum Rückgang der Viruslast.

Tabelle 9: Longitudinale Messung der Viruslast und C1-Tetramer-Bindung (Δ MFI) bei Patient CMV3 (HLA-A*0201-positiv).

Zeitpunkt	Patienten-ID	Viruslast in pB	PE-Tetramer	C1-Tetramer	Delta MFI
a = vor Beginn der Therapie	CMV3	2300 IU/ml	2,8	7,2	4,4
b = im Verlauf	CMV3	1700 IU/ml	2,2	3,7	1,5
c = im weiteren Verlauf	CMV3	600 IU/ml	2,1	3,1	1,0

Daten modifiziert nach [6].

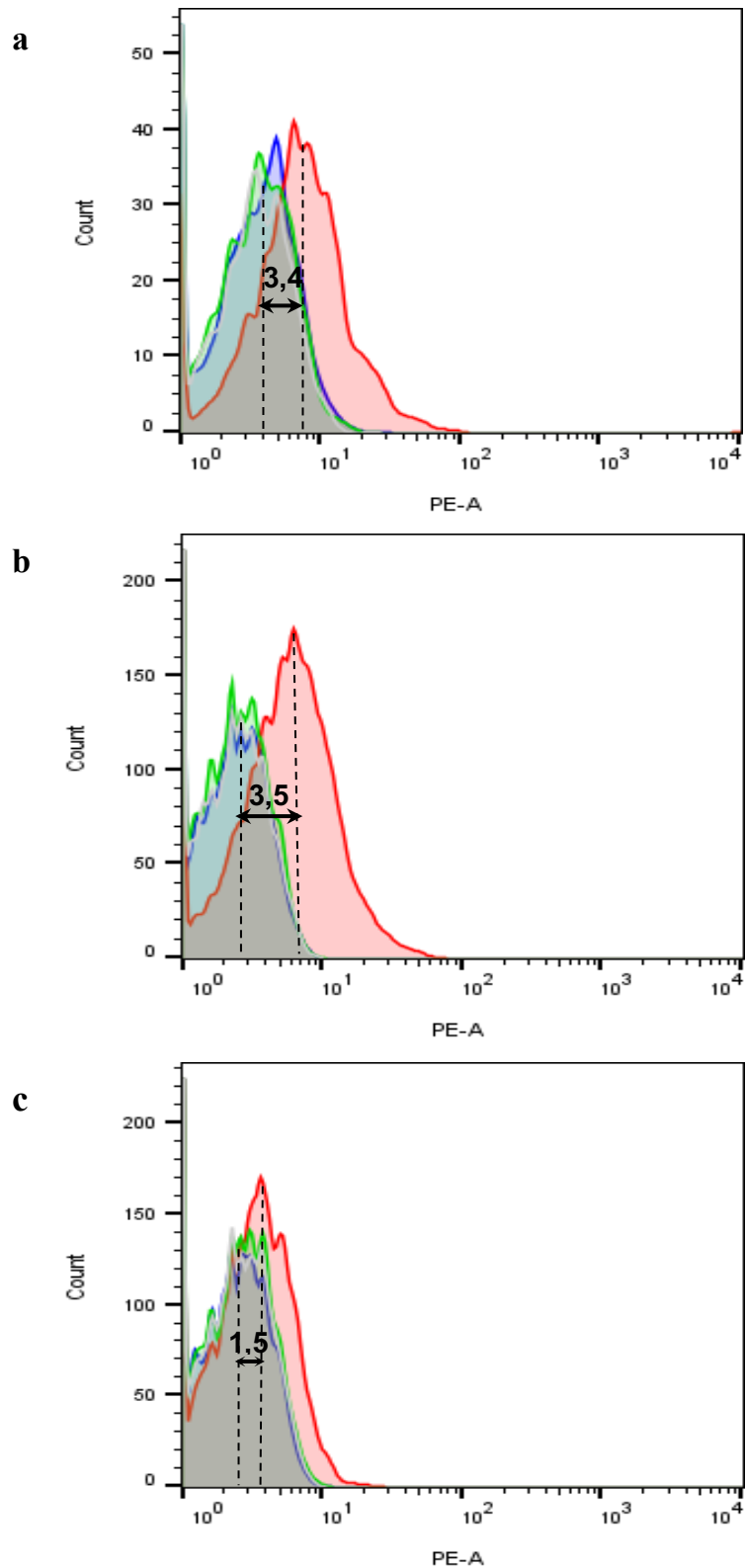


Abbildung 10: Longitudinale Messung der Tetramer-Bindung bei Patient CMV7 (HLA-A*0201). Auf den Histogrammen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A) aufgetragen. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201-spezifisch), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind drei Zeitpunkte während abnehmender Viruslast: a) vor Beginn der Therapie, b) im Verlauf, c) im weiteren Verlauf.

Gestrichelte Linien markieren die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI); die Δ MFI-Werte sind durch Pfeile dargestellt. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Bei Patient CMV7 wurden drei serielle Messungen während abnehmender Viruslast durchgeführt (Abbildung 10). Die quantitative Analyse (Tabelle 10) ergab vor Beginn der Therapie (Zeitpunkt a, Viruslast 1.500.000 IU/ml) ein Δ MFI von 3,4 (PE-Tetramer 2,4; C1-Tetramer 5,8). Im Verlauf der Therapie (Zeitpunkt b, Viruslast 251.000 IU/ml) betrug das Δ MFI 3,5 (PE-Tetramer 1,6; C1-Tetramer 5,1). Trotz des deutlichen Unterschieds in der Viruslast zeigte sich zwischen Zeitpunkt a und b keine Abnahme der Δ MFI. Bei einer weiteren Abnahme der Viruslast auf 3.500 IU/ml (Zeitpunkt c) wurde ein Δ MFI von 1,5 gemessen (PE-Tetramer 2,1; C1-Tetramer 3,6), entsprechend einer deutlich reduzierten Rechtsverschiebung im Histogramm.

Tabelle 10: Longitudinale Messung der Viruslast und C1-Tetramer-Bindung (Δ MFI) bei Patient CMV7 (HLA-A*0201-positiv)

Zeitpunkt	Patienten-ID	Viruslast in pB	PE-Tetramer	A6-Tetramer	C1-Tetramer	C7-Tetramer	Delta MFI
a = vor Beginn der Therapie	CMV7	1 500 000 IU/ml	2,4	2,6	5,8	2,6	3,4
b = im Verlauf	CMV7	251.000 IU/ml	1,6	1,7	5,1	1,6	3,5
c = im weiteren Verlauf	CMV7	3500 IU/ml	2,1	2,4	3,6	2,4	1,5

Daten modifiziert nach [6].

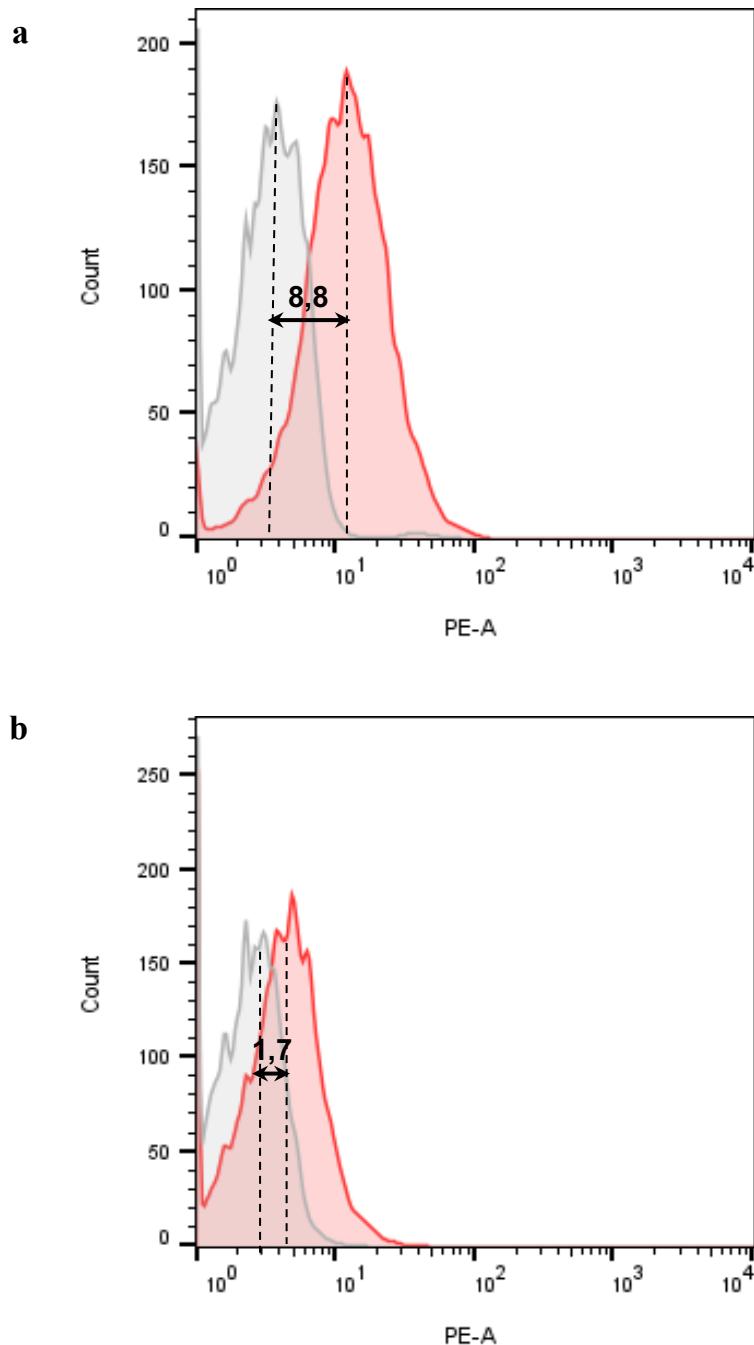


Abbildung 11: Longitudinale Messung der Tetramer-Bindung bei Patient CMV1 (HLA-A*0201). Dargestellt ist die Ereigniszahl (y-Achse) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201-spezifisch). Gezeigt sind zwei Zeitpunkte während abnehmender Viruslast: a) vor Beginn der Therapie, b) im Verlauf. Gestrichelte Linien markieren die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI); die Δ MFI-Werte sind durch Pfeile dargestellt. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Bei Patient CMV1 wurden zwei serielle Messungen während abnehmender Viruslast durchgeführt (Abbildung 11). Die quantitative Analyse (Tabelle 11) ergab vor Beginn der Therapie (Zeitpunkt a, Viruslast 700 IU/ml) ein Δ MFI von 8,8 (PE-Tetramer 2,8; C1-Tetramer 11,6). Im Verlauf der Therapie (Zeitpunkt b, Viruslast <450 IU/ml) betrug das Δ MFI 1,7 (PE-Tetramer 2,0; C1-Tetramer 3,7). Dieser Rückgang spiegelte sich auch im Histogramm wider, wo die Rechtsverschiebung der roten Kurve im

Verlauf deutlich geringer ausgeprägt war. Damit bestätigen die tabellarischen Werte die in den Histogrammen sichtbare Abnahme der C1-Tetramer-Bindung bei sinkender Viruslast.

Tabelle 11: Longitudinale Messung der Viruslast und C1-Tetramer-Bindung (Δ MFI) bei Patient CMV1 (HLA-A*0201-positiv)

Zeitpunkt	Patienten-ID	Viruslast in pB	PE-Tetramer	C1-Tetramer	Delta MFI
a = vor Beginn der Therapie	CMV1	700 IU/ml	2,8	11,6	8,8
b = im Verlauf	CMV1	<450 IU/ml	2	3,7	1,7

Daten modifiziert nach [6].

4.1.3 Kontrollpersonen

Zur Validierung der Tetramer-Bindung wurden Kontrollproben von CMV-positiven und -negativen Personen mit passendem sowie unpassendem HLA-Status herangezogen. Die Zuordnung der Probanden erfolgte gemäß der folgenden Einschlusskriterien:

1. CMV-positiv mit unpassendem HLA-Status (negativ für HLAA*0101, A*0201 und B*0702; siehe Tabelle 12).
2. CMV-negativ mit unpassendem HLA-Status (negativ für HLA- A*0101, A*0201 und B*0702; siehe Tabelle 13).
3. CMV-negativ mit passendem HLA-Status (positiv für HLA- A*0101 oder A*0201 oder B*0702 oder eine Kombination; siehe Tabelle 13).

In keiner der Kontrollproben konnte eine spezifische Bindung der Tetramere A6, C1 oder C7 an Lymphozyten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 12–15 und Tabellen 14–17 dargestellt. Eine Übersicht der eingeschlossenen Kontrollprobanden findet sich in den Tabellen 12 und 13. Die Farbzuordnung der Färbungen entspricht der in Kapitel 4.1.1 dargestellten Kodierung:

Grau = Negativkontrolle, Grün = A6-Tetramer, Rot = C1-Tetramer, Blau = C7-Tetramer.

Tabelle 12: CMV-positive Kontrollpersonen

Proband - ID	Patienten HLA-Status	CMV-Status
KP10	Unpassend	Positiv
KP11	Unpassend	Positiv
KP12	Unpassend	Positiv
KP13	Unpassend	Positiv
KP14	Unpassend	Positiv
KP15	Unpassend	Positiv
KP16	Unbekannt	Positiv
KP17	Unbekannt	Positiv
KP18	Unbekannt	Positiv

Daten modifiziert nach [6].

Tabelle 13: CMV-negative Kontrollpersonen

Proband - ID	Patienten HLA Status	CMV-Status
KP1	HLA-A*0201+	Negativ
KP2	HLA-A*0201+ HLA-A*0101+	Negativ
KP3	HLA -A*0201+	Negativ
KP4	Unpassend	Negativ
KP5	Unpassend	Negativ
KP6	Unpassend	Negativ
KP7	HLA-A*02+	Negativ
KP8	HLA-A*0101+	Negativ
KP9	HLA-B*07+	Negativ

Daten modifiziert nach [6].

4.1.3.1 CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast unter 5000 IU/ml

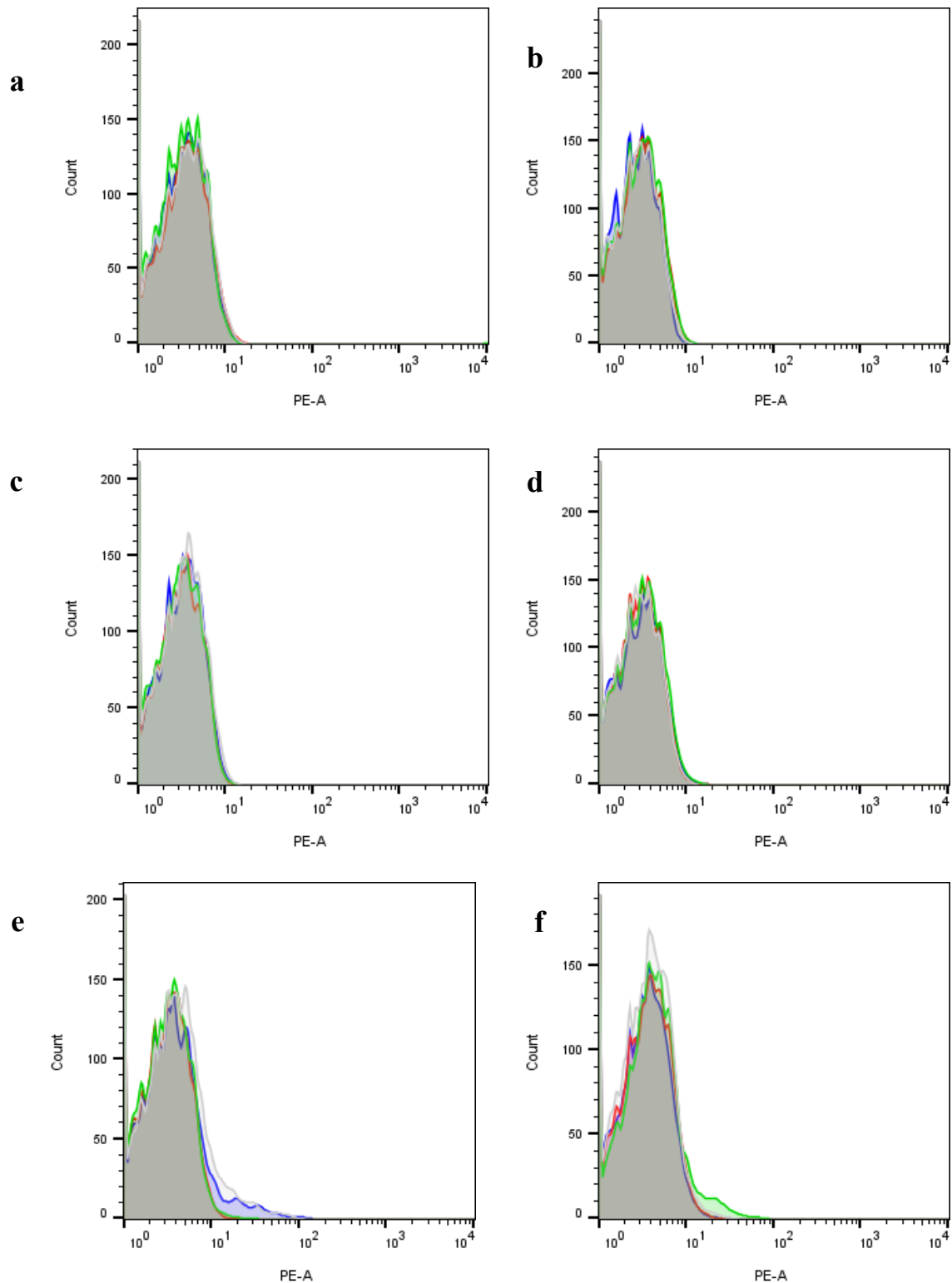


Abbildung 12: CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast <5000 IU/ml. Auf den Histogrammen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A) aufgetragen. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind sechs

Kontrollpersonen: a) KP10, b) KP11, c) KP13, d) KP14, e) KP15, f) KP16. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Bei den CMV-positiven Kontrollpersonen (Abbildung 12; KP10, KP11, KP13, KP14, KP15, KP16) ließ sich in keinem Fall eine spezifische Tetramer-Bindung nachweisen. Trotz Viruslasten zwischen 1.000 und 2.700 IU/ml (KP10: 2.200 IU/ml; KP11: 2.700 IU/ml; KP13: 2.600 IU/ml; KP14: 1.500 IU/ml; KP15: 1.000 IU/ml; KP16: 1.500 IU/ml) zeigten die Histogramme keine erkennbare Rechtsverschiebung. Die quantitative Analyse bestätigte dies; sämtliche MFI-Werte lagen im Bereich der Negativkontrolle (PE-Tetramer 2,0–2,8; A6, C1 und C7 jeweils 2,0–2,9). Entsprechend wurden in den Histogrammen keine Δ MFI-Werte dargestellt.

Tabelle 14: CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast <5000 IU/ml; MFI-Werte für PE-, A6-, C1- und C7-Tetramer

Proband-ID	Viruslast in pB	PE-Tetramer	A6-Tetramer	C1-Tetramer	C7-Tetramer
KP10	2200 IU/ml	2,4	2,5	2,4	2,4
KP11	2700 IU/ml	2	2,2	2,2	2
KP13	2600 IU/ml	2,4	2,3	2,2	2,3
KP14	1500 IU/ml	2,1	2,3	2,1	2,2
KP15	1000 IU/ml	2,8	2,2	2,2	2,7
KP16	1500 IU/ml	2,6	2,9	2,5	2,4

Daten modifiziert nach [6].

4.1.3.2 CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast über 5000 IU/ml

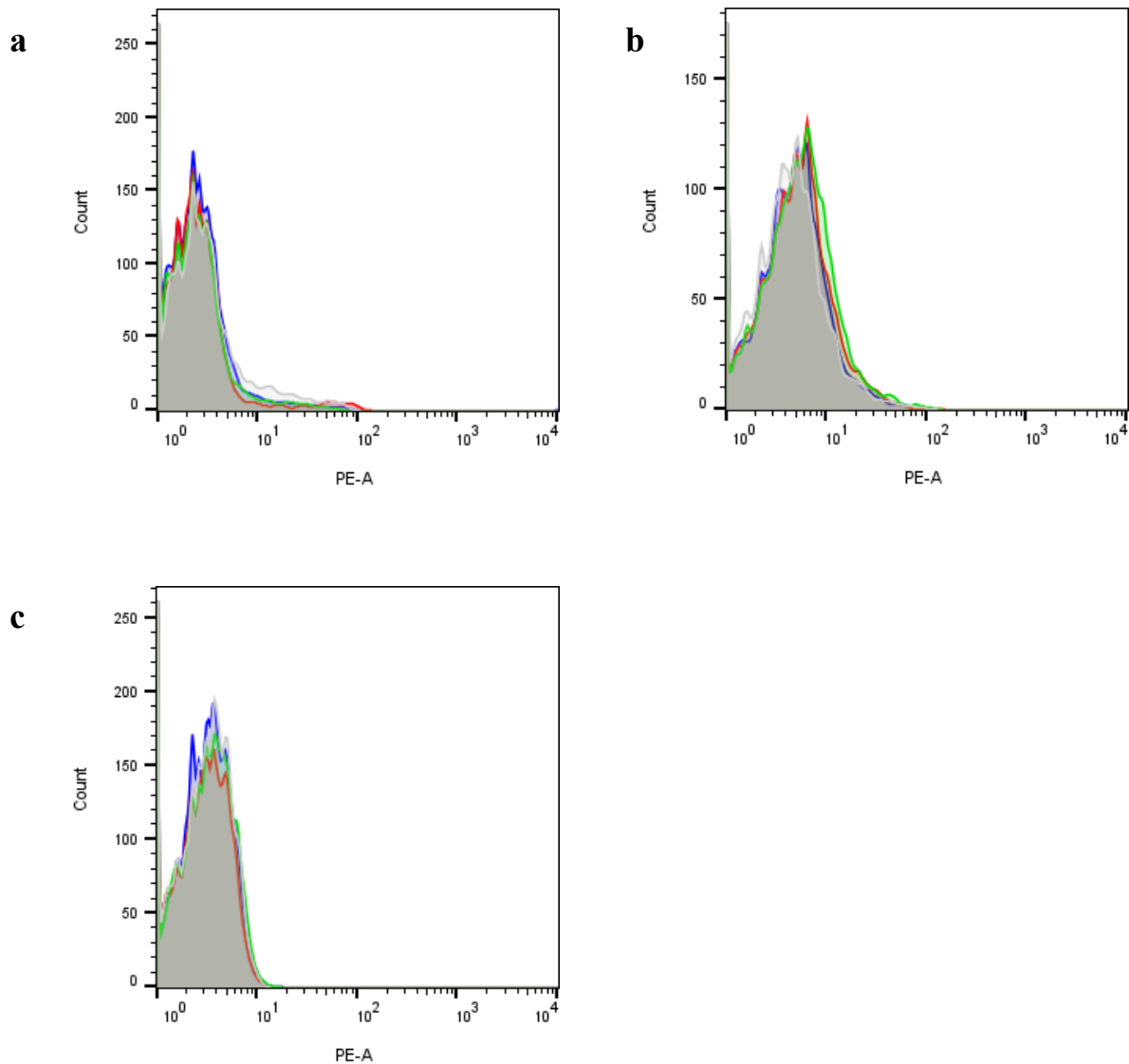


Abbildung 13: CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast >5000 IU/ml. Auf den Histogrammen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A) aufgetragen. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind drei Kontrollpersonen: a) KP12, b) KP17, c) KP18. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Bei den CMV-positiven Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslasten >5000 IU/ml (Abbildung 13; KP12, KP17, KP18) konnte ebenfalls keine spezifische Tetramer-Bindung nachgewiesen werden. Die Viruslasten lagen zwischen 8000 und 10 500 IU/ml (KP12: 9900 IU/ml; KP17: 10 500 IU/ml; KP18: 8000 IU/ml), dennoch zeigten die Histogramme keine Rechtsverschiebung der Kurven. Die quantitative Analyse (Tabelle 15) bestätigte dies; sämtliche MFI-Werte lagen im Bereich der Negativkontrolle (PE-Tetramer 2,3–3,8; A6, C1 und C7 jeweils 2,0–4,1). Entsprechend wurden in den Histogrammen keine Δ MFI-Werte dargestellt.

Tabelle 15: CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast >5000 IU/ml; MFI-Werte für PE-, A6-, C1- und C7-Tetramer

Proband-ID	Viruslast in pB	PE- Tetramer	A6- Tetramer	C1- Tetramer	C7- Tetramer
KP12	9900 IU/ml	2,3	2	2	2,1
KP17	10500 IU/ml	3,8	4,1	3,9	3,7
KP18	8000 IU/ml	2,5	2,6	2,3	2,4

Daten modifiziert nach [6].

4.1.3.3 CMV-negative Kontrollpersonen mit passendem HLA-Status

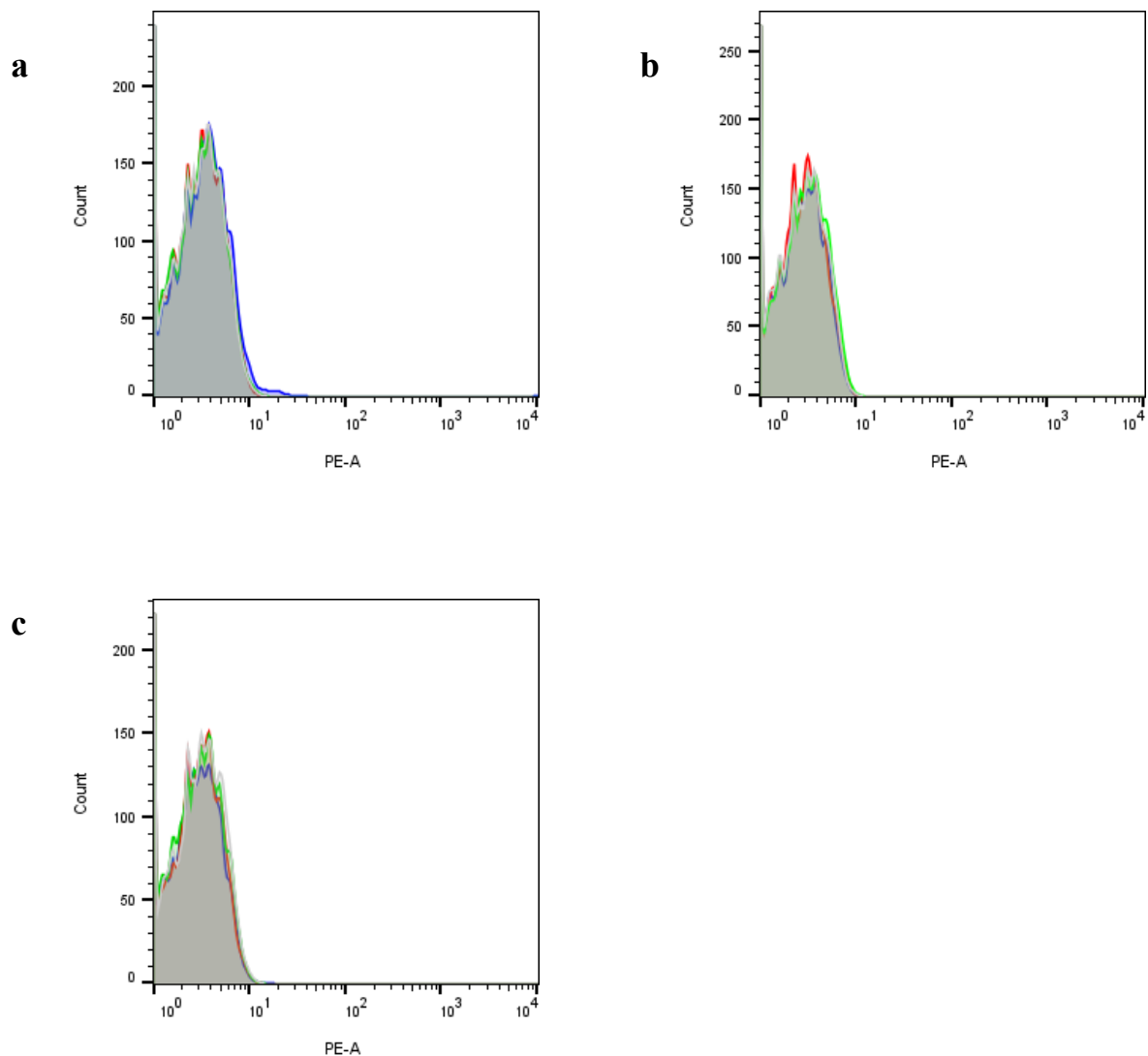


Abbildung 14: CMV-negative Kontrollpersonen mit passendem HLA-Status. Auf den Histogrammen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A) aufgetragen. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind drei Kontrollpersonen: a) KP1 (HLA-A*0201+), b) KP3 (HLA-A*0201+), c) KP8 (HLA-A*0101+). Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Bei den CMV-negativen Kontrollpersonen mit passendem HLA-Status (Abbildung 14; KP1 HLA-A*0201+, KP3 HLA-A*0201+, KP8 HLA-A*0101+) zeigte sich keine spezifische Bindung der Tetramere. Trotz vorhandener restriktiver HLA-Allele verliefen die Histogramme ohne erkennbare Rechtsverschiebung und die Tetramere A6, C1 sowie C7 lagen im Bereich der Negativkontrolle. Die quantitative Analyse (Tabelle 16) bestätigte dieses Ergebnis, sämtliche MFI-Werte bewegten sich zwischen 2,0 und 2,4. Entsprechend wurden in den Histogrammen keine Δ MFI-Werte dargestellt.

Tabelle 16: CMV-negative Kontrollpersonen mit passendem HLA-Status; MFI-Werte für PE-, A6-, C1- und C7-Tetramer

Proband-ID	PE-Tetramer	A6-Tetramer	C1-Tetramer	C7-Tetramer
KP1	2,2	2,2	2,4	2,2
KP3	2,1	2,2	2	2
KP8	2,1	2	2,1	2,2

Daten modifiziert nach [6].

4.1.3.4 CMV-negative Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status

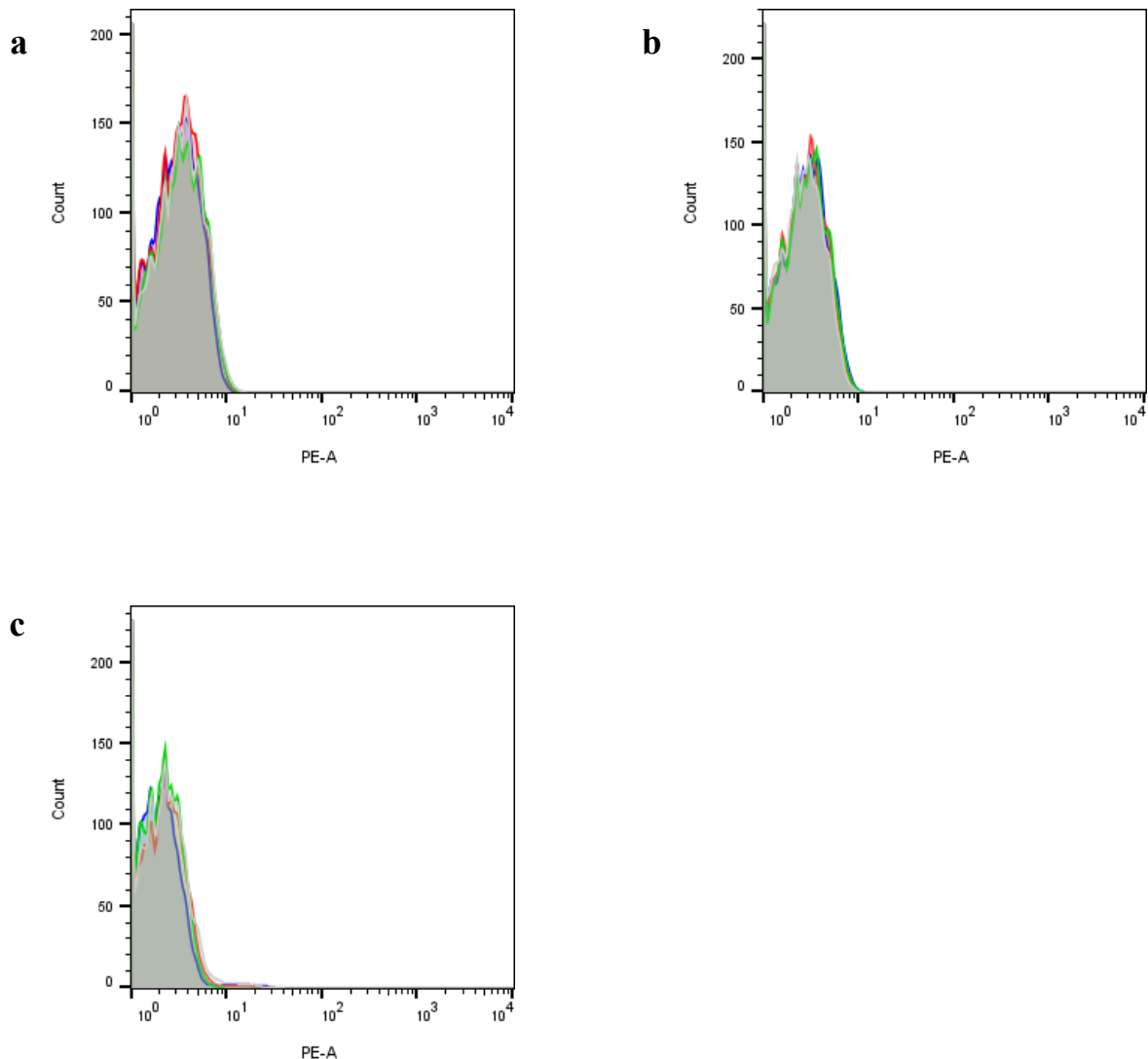


Abbildung 15: CMV-negative Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status. Die x-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität (PE-A), die y-Achse die jeweilige Ereigniszahl. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind drei Kontrollpersonen: a) KP4, b) KP5, c) KP6. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6].

Bei den CMV-negativen Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status (Abbildung 15; KP4, KP5, KP6) konnte erwartungsgemäß keine spezifische Tetramer-Bindung nachgewiesen werden. Die Histogramme zeigten keine Rechtsverschiebung, und die Werte aller Tetramere entsprachen der Negativkontrolle. Die quantitative Analyse (Tabelle 17) bestätigte dies; sämtliche MFI-Werte lagen im niedrigen Bereich zwischen 1,5 und 2,2. Entsprechend wurden in den Histogrammen keine Δ MFI-Werte dargestellt.

Tabelle 17: CMV-negative Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status; MFI-Werte für PE-, A6-, C1- und C7-Tetramer

Proband-ID	PE-Tetramer	A6-Tetramer	C1-Tetramer	C7-Tetramer
KP4	2,2	2,2	2,2	2
KP5	2	2	1,9	1,9
KP6	1,5	1,7	1,6	1,5

Daten modifiziert nach [6].

4.1.4 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Die durchgeführten Versuche mittels Durchflusszytometrie mit den CMV-spezifischen Tetrameren A6, C1 und C7 zeigten, dass eine spezifische Bindung an periphere Lymphozyten ausschließlich dann nachweisbar war, wenn sowohl eine CMV-Infektion vorlag als auch das korrespondierende HLA-Allel exprimiert wurde (Abbildungen 6–15, Tabellen 6–13).

Unter den verwendeten Tetrameren wies das C1-Tetramer (restriktiv für HLA-A*0201) durchgängig die stärkste Bindung auf (Abbildungen 6–11, Tabellen 6–7), gefolgt von A6 (HLA-A*0101) und C7 (HLA-B*0702), die eine spezifische, jedoch schwächere Fluoreszenzintensität zeigten (Abbildungen 8, 13–14, Tabellen 8, 15–16). Bei allen Versuchen, in denen das jeweils HLA spezifische Allel vorhanden war, konnte eine charakteristische Rechtsverschiebung der Fluoreszenzsignale in den Histogrammen beobachtet werden. Die quantitative Auswertung anhand der Δ MFI-Werte (Tabelle 6–17) bestätigte in allen Fällen die in den Histogrammen sichtbaren Unterschiede.

Bei den Kontrollpersonen (Abbildungen 12–15, Tabellen 14–17) konnte unabhängig vom Vorliegen einer CMV-Infektion in Abwesenheit eines passenden HLA-Allels keine spezifische Bindung der Tetramere detektiert werden. Ebenso zeigten CMV-negative Probanden trotz Vorhandenseins eines passenden HLA-Allels keine Tetramer-Bindung.

In den Verlaufsuntersuchungen bei den Patienten CMV1, CMV3 und CMV7 (Abbildungen 9–11, Tabellen 9–11), bei denen zu jeweils zwei bzw. drei Zeitpunkten Messungen durchgeführt wurden, zeigte sich parallel zur abnehmenden Viruslast eine sukzessive Reduktion der Tetramer-Bindung, erkennbar an einer zunehmend geringeren Rechtsverschiebung der Fluoreszenzsignale.

Insgesamt konnte in allen durchgeführten Versuchen mittels Durchflusszytometrie eine ausnahmslos hohe Spezifität der Tetramer-Bindung festgestellt werden, die sowohl die HLA-Restriktion als auch die Antigen-Spezifität zuverlässig abbildete.

4.2 Zytotoxizitäts-Assays

4.2.1 Zytotoxizitäts-Assays an PBMCs mit passendem HLA-Status

Zur Evaluierung des therapeutischen Potenzials der TCR-ähnlichen, CMV-spezifischen Antikörper A6, C1 und C7 wurden Zytotoxizitäts-Assays mit peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) von CMV-infizierten Patienten sowie allogenen NK-Zellen gesunder Spender durchgeführt. Die Zytotoxizitäts-Assays erfolgten mit einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1.

Die Balkendiagramme in den Abbildungen 16-19 zeigen die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays in folgender Anordnung (von links nach rechts):

1. **Nativ:** Unbehandelte PBMCs + NK-Zellen
2. **Nativ/C1 oder CMV/C7:** Unbehandelte PBMCs + C1- oder C7-Antikörper + NK-Zellen
3. **CMV:** PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen
4. **CMV/C1 oder CMV/C7:** PBMCs + CMV-Peptid + C1- oder C7-Antikörper + NK-Zellen

Die grünen Balken repräsentieren die Ergebnisse der gesunden Kontrollpersonen, die blauen Balken die Daten der CMV-infizierten Patienten. In den Kontrollproben (CMV-seronegative, HLA-angepasste Spender) führten weder die alleinige Antikörperzugabe noch die Beladung mit CMV-Peptiden zu einer relevanten Lyse (Säulen 2–3). Erst die kombinierte Zugabe von CMV-Peptid und Antikörpern (C1 oder C7) resultierte in einer messbaren Zytotoxizität mit Lyseraten zwischen 12 % und 70 % (grüne Säulen 4).

Bei den CMV-positiven Patienten wurde unter nativen Bedingungen sowie bei alleiniger Peptidbeladung keine relevante Lyse festgestellt (blaue Säulen 1 und 3). Die Zugabe der Antikörper (Säule 2) sowie die Kombination aus Peptidbeladung und Antikörper (Säule 4) führten hingegen zu spezifischer Zytotoxizität mit Lyseraten zwischen 5,8 % und 52,9 %.

CMV3

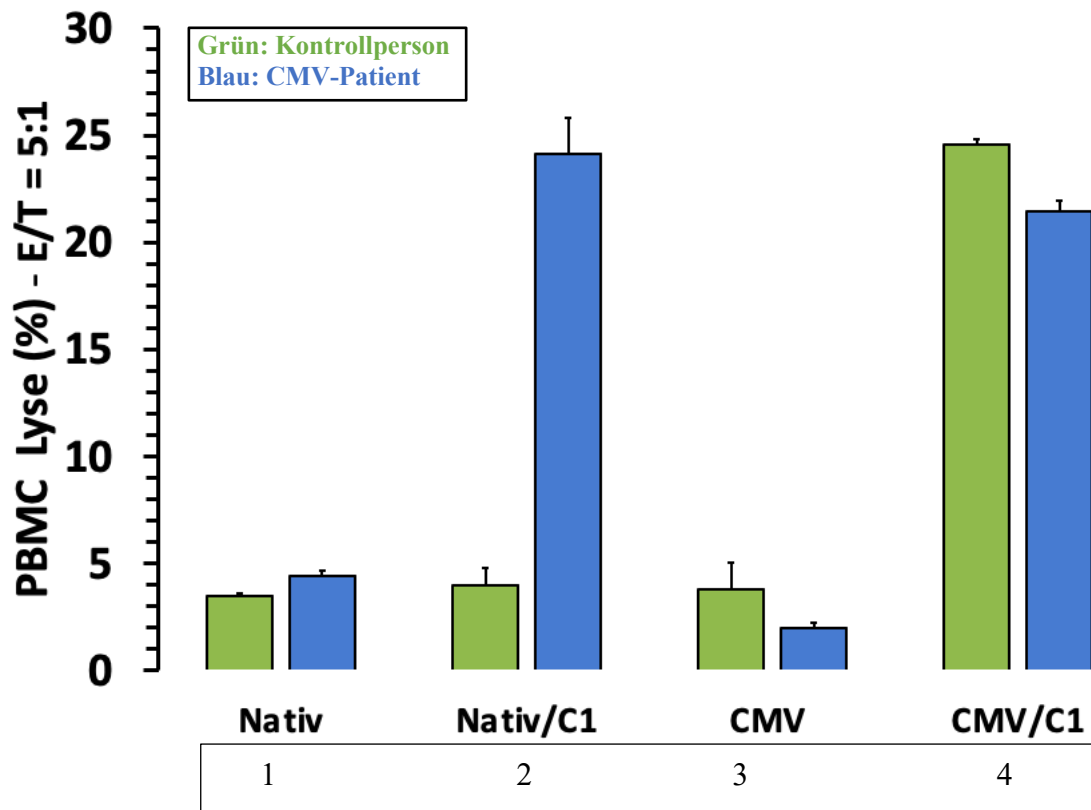


Abbildung 16: Zytotoxizitäts-Assay CMV3. Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-A*0201-positiven Patienten CMV3 und eines HLA-A*0201-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C1 (PBMCs + C1-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C1 (PBMCs + CMV-Peptid + C1-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: CMV3. Daten modifiziert nach [6].

Für die Ermittlung der zytotoxischen Wirkung wurden Lymphozyten des HLA-A*0201-positiven, CMV-infizierten Patienten CMV3 sowie eines HLA-A*0201-positiven, gesunden Spenders analysiert (Abbildung 16). Unter der nativen Bedingung (Säule 1) betrug die spontane Lyse 3,5 % beim gesunden Spender und 4,5 % beim Patienten. Nach Zugabe des C1-Antikörpers (Säule 2) blieb die Lyse beim gesunden Spender unverändert (3,5 %), während bei CMV3 ein deutlicher Anstieg auf 24 % beobachtet wurde. Die alleinige Zugabe des CMV-Peptids (Säule 3) induzierte weder beim Spender (3,7 %) noch beim Patienten (1,9 %) eine relevante Zunahme im Vergleich zur nativen Bedingung. Erst die kombinierte Behandlung mit C1-Antikörper und CMV-Peptid (Säule 4) führte zu einer spezifischen Lyse von 24,5 % beim gesunden Spender und 21,5 % beim Patienten. Damit demonstriert der Versuch eine C1-abhängige Verstärkung der zellulären Lyse mit Effektstärken bis zu 21 %.

CMV7

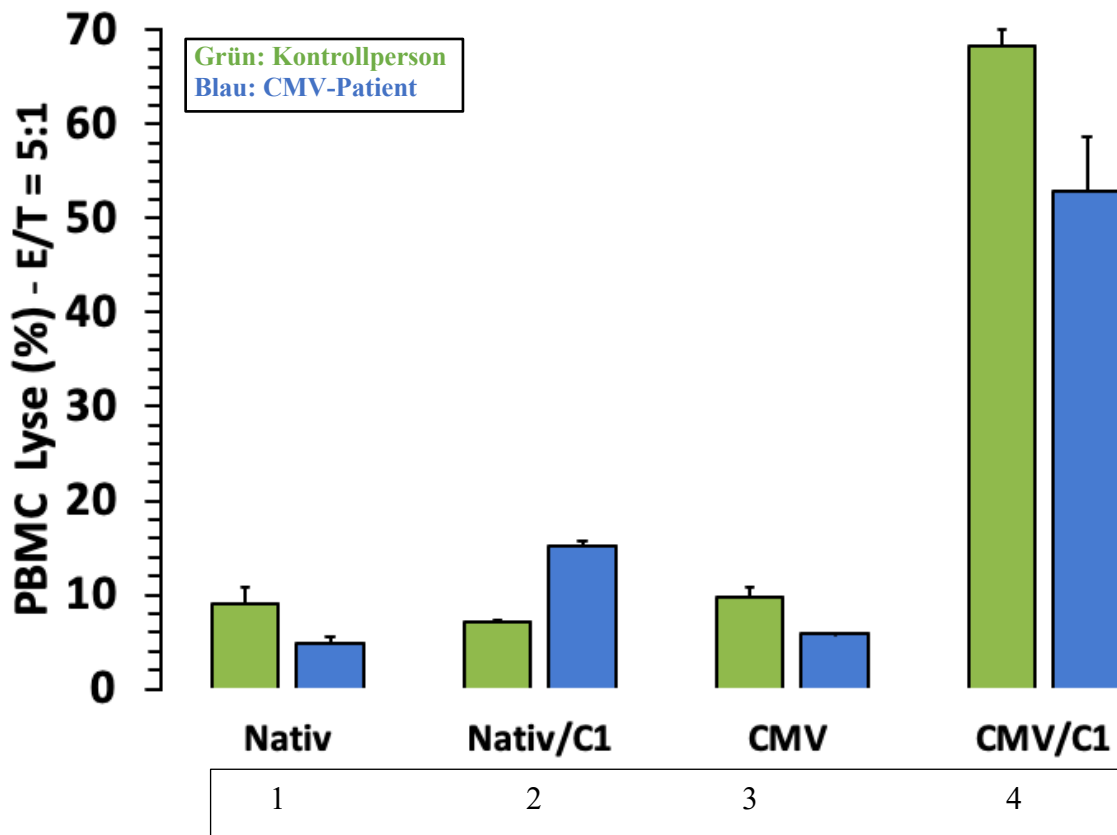


Abbildung 17: Zytotoxizitäts-Assay CMV7. Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-A*0201-positiven Patienten CMV7 und eines HLA-A*0201-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C1 (PBMCs + C1-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C1 (PBMCs + CMV-Peptid + C1-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: CMV7. Daten modifiziert nach [6].

Zur Untersuchung der C1-vermittelten Zytotoxizität wurden Lymphozyten des HLA-A*0201-positiven, CMV-infizierten Patienten CMV7 sowie eines HLA-A*0201-positiven, gesunden Spenders analysiert (Abbildung 17). Unter der nativen Bedingung (Säule 1) betrug die spontane Lyse 9 % beim Spender und 4,8 % beim Patienten. Nach Zugabe des C1-Antikörpers (Säule 2) blieb die Lyserate beim Spender unverändert, während bei den Patientenlymphozyten ein Anstieg auf 15 % beobachtet wurde. Die alleinige Zugabe von CMV-Peptid (Säule 3) führte weder beim Spender (9,8 %) noch beim Patienten (5,8 %) zu einer relevanten Erhöhung im Vergleich zur Spontanlyse. Erst die kombinierte Behandlung mit C1-Antikörper und CMV-Peptid (Säule 4) induzierte eine deutliche Zunahme der Lyse mit Raten von 68,3 % beim Spender und 52,9 % beim Patienten. Damit konnte eine durch den Antikörper C1 vermittelte Steigerung der zellulären Lyse um bis zu 51,3 % nachgewiesen werden.

CMV1

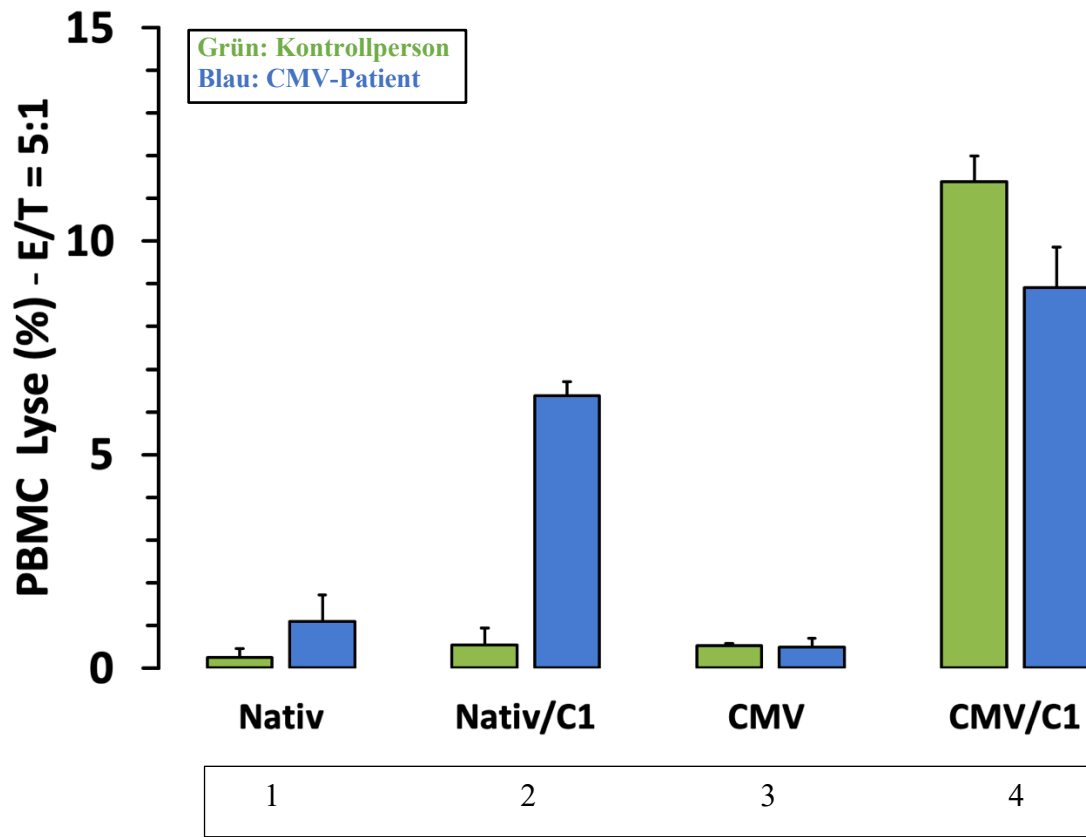


Abbildung 18: Zytotoxizitäts-Assay CMV1. Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-A*0201-positiven Patienten CMV1 und eines HLA-A*0201-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C1 (PBMCs + C1-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C1 (PBMCs + CMV-Peptid + C1-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: CMV1. Daten modifiziert nach [6].

Zur Analyse der C1-vermittelten Zytotoxizität wurden PBMCs des HLA-A*0201-positiven, CMV-infizierten Patienten CMV1 sowie eines HLA-A*0201-positiven, gesunden Spenders getestet (Abbildung 18). Unter der nativen Bedingung (Säule 1) betrug die spontane Lyse 0,25 % beim Spender und 1,1 % beim Patienten. Nach Zugabe des C1-Antikörpers (Säule 2) blieb die Lyse beim Spender unverändert, während bei den Patientenlymphozyten ein Anstieg auf 6,4 % beobachtet wurde. Die alleinige Beladung mit CMV-Peptid (Säule 3) führte weder beim Spender (0,5 %) noch beim Patienten (0,5 %) zu einer relevanten Veränderung gegenüber der Spontanlyse. Erst die kombinierte Behandlung mit C1-Antikörper und CMV-Peptid (Säule 4) resultierte in einer erhöhten Lyse von 11,4 % beim Spender und 8,9 % beim Patienten. Damit zeigte sich auch bei CMV1 eine durch den C1-Antikörper vermittelte Steigerung der zellulären Lyse.

CMV8

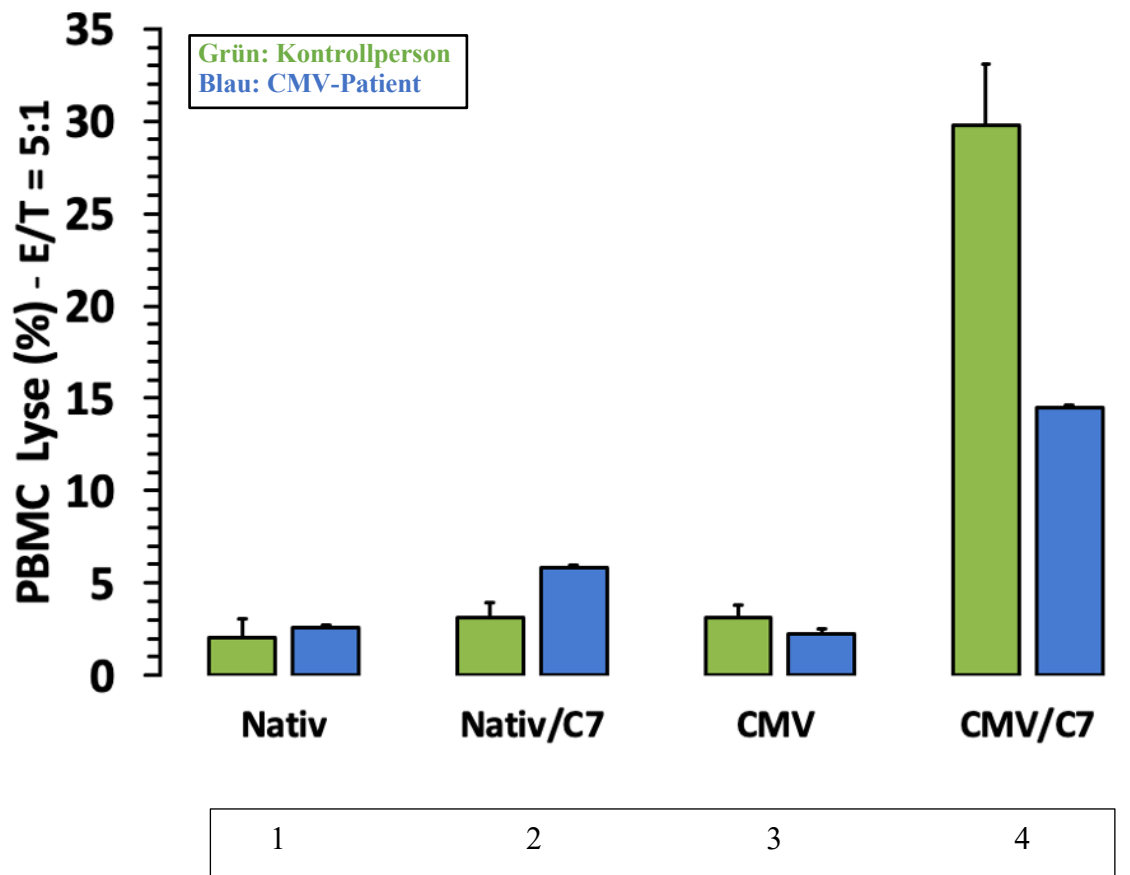


Abbildung 19: Zytotoxizitäts-Assay CMV8. Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-B*0702-positiven Patienten CMV8 und eines HLA-B*0702-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C7 (PBMCs + C7-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C7 (PBMCs + CMV-Peptid + C7-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: CMV8. Daten modifiziert nach [6].

Für die Ermittlung der C7-vermittelten Zytotoxizität wurden PBMCs des HLA-B*0702-positiven, CMV-infizierten Patienten CMV8 sowie eines HLA-kompatiblen gesunden Spenders getestet (Abbildung 19). Unter der nativen Bedingung (Säule 1) lag die spontane Lyse bei 2 % im Spender und 2,6 % im Patienten. Nach Zugabe des C7-Antikörpers (Säule 2) blieb die Lyserate beim Spender unverändert, während bei den Patientenlymphozyten ein Anstieg auf 5,8 % festgestellt wurde. Die alleinige Beladung mit CMV-Peptid (Säule 3) führte zu keiner relevanten Veränderung gegenüber der Spontanlyse (3,1 % beim Spender, 2,3 % beim Patienten). Die kombinierte Behandlung mit C7-Antikörper und CMV-Peptid (Säule 4) resultierte in einer deutlichen Erhöhung der zytotoxischen Aktivität mit Lyseraten von 30 % beim Spender und 14,5 % beim Patienten.

4.2.2 Zytotoxizitäts-Assay an PBMCs mit unpassendem HLA-Status

Der hier dargestellte Zytotoxizitäts-Assay wurde bereits vor Beginn der Promotionsarbeit durchgeführt, es liegen daher lediglich die Daten eines ADCC-Kontrollversuchs vor. Aufgrund der identischen Methodik wurde der Versuch in die Ergebnisdarstellung aufgenommen.

Wie in Kapitel 4.2.1 gezeigt, können TCR-ähnliche anti-CMV-Antikörper eine spezifische Zytotoxizität in PBMCs von CMV-infizierten Patienten mit passendem HLA-Status induzieren. Zur Überprüfung der HLA-Spezifität wurde ein Zytotoxizitäts-Assay mit PBMCs eines CMV-positiven Patienten ohne passendes HLA-Allel (CMVX) sowie mit PBMCs eines CMV-negativen, HLA-B*0702-positiven Spenders durchgeführt.

Das Balkendiagramm in Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse in der bereits bekannten Anordnung:

1. **Nativ:** Unbehandelte PBMCs + NK-Zellen
2. **Nativ/C7:** Unbehandelte PBMCs + C7-Antikörper + NK-Zellen
3. **CMV:** PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen
4. **CMV/C7:** PBMCs + CMV-Peptid + C7-Antikörper + NK-Zellen

Die grünen Säulen stellen die Ergebnisse der gesunden Kontrollperson dar, die blauen Säulen die des CMV-positiven, HLA-unpassenden Patienten CMVX. Die Kontrollperson ist CMV-negativ, trägt jedoch das HLA-B*0702-Allel.

Während beim gesunden Spender nach kombinierter Zugabe von CMV-Peptid und C7-Antikörper eine spezifische Lyse von 44,8 % induziert werden konnte (Säule 4, grün), wurde bei CMVX unter keiner Bedingung eine relevante Lyse beobachtet (Säulen 1–4, blau).

CMVX

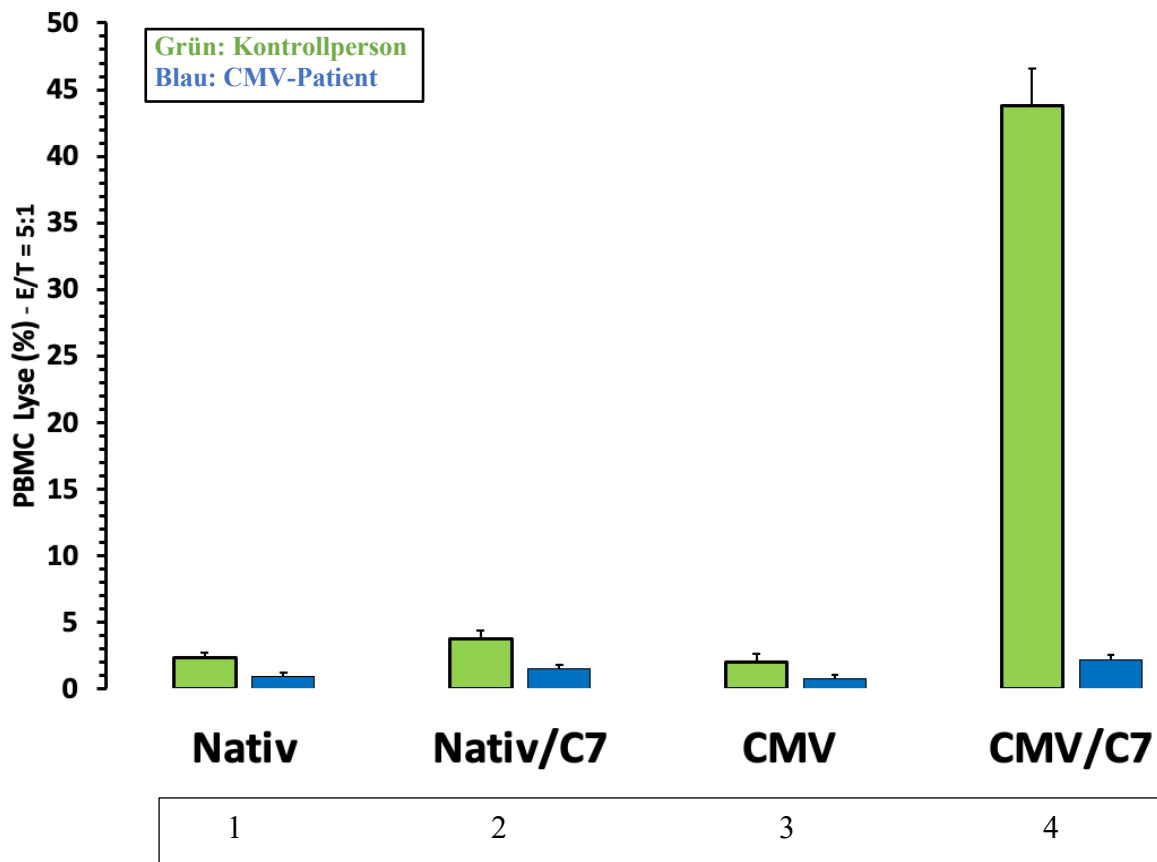


Abbildung 20: Zytotoxizitäts-Assay CMVX. Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-unpassenden, CMV-infizierten Patienten CMVX und eines HLA-B*0702-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C7 (PBMCs + C7-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C7 (PBMCs + CMV-Peptid + C7-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: Patient CMVX.

Bei der gesunden Kontrollperson lag die spontane Lyse im nativen Zustand bei 2,3 % (Säule 1). Nach Zugabe des C7-Antikörpers und NK-Zellen konnte keine relevante Veränderung festgestellt werden (Säule 2). Auch die alleinige Beladung mit CMV-Peptid führte mit 2,0 % zu keiner Abweichung von der Spontanlyse (Säule 3). Erst die kombinierte Behandlung mit CMV-Peptid und C7-Antikörper resultierte in einer spezifischen Lyse von 44,8 % (Säule 4). Damit konnte gezeigt werden, dass es zu keiner unkontrollierten und unspezifischen Lyse auch bei einem HLA-B*0702-positiven Spender allerdings ohne CMV-Infektion kommt.

Auch bei dem CMV-positiven Patienten CMVX mit unpassendem HLA-Status wurde unter keiner Bedingung eine unspezifische Lyse beobachtet (0,9 % nativ; 0,8–0,9 % nach C7-Antikörper und/oder CMV-Peptid; Säulen 1–4).

4.2.3 Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays

Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays mit PBMCs von CMV-infizierten Patienten mit passendem sowie unpassendem HLA-Status und CMV-negativen Kontrollpersonen sind in den Abbildungen 16–20 dargestellt.

Bei HLA-A*0201-positiven Patienten führte der Antikörper C1, und bei HLA-B*0702-positiven Patienten der Antikörper C7, zu einer spezifischen Steigerung der Lyseraten (Abbildungen 16–19, Säule 2, blau). Nach zusätzlicher Beladung der Zellen mit CMV-Peptid zeigte sich eine nochmals deutliche Zunahme der Lyse (Abbildungen 16–19, Säule 4, blau). Eine Ausnahme bildete Patient CMV3, bei dem die Lysewerte in Säule 2 und 4 vergleichbar waren.

Bei CMV-negativen, aber HLA-kompatiblen Kontrollpersonen konnte nach kombinierter Zugabe von Antikörper und CMV-Peptid eine Lyse beobachtet werden (Abbildungen 16–19, Säule 4, grün).

Bei dem CMV-positiven Patienten ohne passendes HLA-Allel (CMVX) wurde dagegen unter keiner Versuchsbedingung eine relevante Lyse festgestellt (Abbildung 20, blaue Säulen).

5. Diskussion

5.1 Potenziale und Limitationen HLA-restringierter TCR-ähnlicher Antikörper

Der ausgeprägte Polymorphismus des HLA-Systems mit mehreren tausend Allelvarianten stellt eine wesentliche Hürde für eine breite klinische Anwendung HLA/Peptid-gerichteter Therapien dar [15,44]. Damit der Therapieansatz für ein breites Patientenkollektiv relevant sein kann, müsste er mehrere HLA-Allele gleichzeitig adressieren. Hinzu kommt, dass die Herstellung TCR-ähnlicher Antikörper aktuell methodisch anspruchsvoll und zeitintensiv ist, was ihre klinische Verfügbarkeit zusätzlich einschränkt [15,20,44].

In der vorliegenden Arbeit wurden drei CMV-spezifischer Antikörper (A6, C1, C7), die auf die HLA-Allele A*0101, A*0201 und B*0702 ausgerichtet sind, umfassend auf ihr diagnostisches Potenzial sowie auf ihre mögliche therapeutische Wirksamkeit getestet (Abbildungen 6–20, Tabellen 6–17) [6]. Die gezielte Auswahl dieser Zielmoleküle erfolgte, da sie zu den am häufigsten vertretenen Allelen in Europa gehören und somit das Potenzial einer populationsspezifischen Erweiterung der therapeutischen Reichweite TCR-ähnlicher Antikörperformate bieten [106].

Angesichts der Grenzen bestehender antiviraler Therapien rücken neue immunologische Behandlungskonzepte zunehmend in den Fokus [51,52]. Trotz des Risikos ausgeprägter Myelosuppression und der Entwicklung arzneimittelresistenter Stämme gelten Ganciclovir und Valganciclovir weiterhin als Mittel der ersten Wahl bei manifester CMV-Infektion nach hämatopoetischer Stammzell- oder solider Organtransplantation [37,52,62]. Die Behandlung von Ganciclovir-resistenten CMV-Stämmen stellt weiterhin eine erhebliche Herausforderung dar und ist mit prognostisch ungünstigeren klinischen Verläufen assoziiert [37,51–53]. Mit Letemovir steht ein antivirales Medikament zur Verfügung, das prophylaktisch verabreicht werden kann [37,51–53]. Dennoch zeigen klinische Daten, dass CMV-Reaktivierungen nach allogener Stammzell- oder Organtransplantation weiterhin eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität darstellen [36,37,46,51,53]. Randomisierte Studien berichten von klinisch signifikanten CMV-Infektionen bei bis zu 37,5 % der Hochrisikopatienten unter Letemovir-Prophylaxe [65]. Retrospektive Daten deuten zudem darauf hin, dass nach Absetzen der prophylaktischen Therapie vermehrt CMV-Reaktivierungen auftreten und eine Assoziation mit erhöhter CMV-assoziiierter Mortalität besteht [53,60,98]. Dies verdeutlicht den weiterhin bestehenden Bedarf an innovativen immuntherapeutischen Ansätzen im Bereich der HLA/Peptid-gerichteten Strategien.

5.2 Evaluation des diagnostischen Potenzials anhand der Ergebnisse der Durchflussszytometrie

Die durchgeführten Färbeexperimente mit den tetramerisierten Fab-Antikörpern A6, C1 und C7 belegen, dass eine spezifische Detektion in-vivo CMV-infizierter Lymphozyten bei gegebener HLA-Kompatibilität möglich ist (Abbildungen 6–15, Tabellen 6–17). Trotz signifikanter Unterschiede in der zirkulierenden Viruslast zum Zeitpunkt der Messungen konnte in allen Fällen eine robuste und hochspezifische Färbung von CMV-infizierten Lymphozyten nachgewiesen werden (Abbildungen 6–11, Tabellen 6–13) [6].

Bei keiner der Kontrollpersonen ließ sich, unabhängig vom CMV-Status (wenn kein passender HLA-Status) oder dem Vorhandensein eines kompatiblen HLA-Allels (wenn keine CMV-Infektion), eine spezifische Tetramer-Bindung beobachten (Abbildungen 12–15, Tabellen 14–17). Damit konnte bestätigt werden, dass eine Bindung ausschließlich dann auftrat, wenn sowohl eine CMV-Infektion bestand als auch ein passendes HLA-Allel exprimiert wurde. Das differenzierte Bindungsverhalten zwischen Kontrollpersonen und Patienten erlaubt eine klare Abgrenzung zwischen infizierten und nicht infizierten Individuen und unterstreicht die diagnostische Spezifität des Ansatzes.

Darüber hinaus erlaubten Verlaufsanalysen bei drei Patienten (CMV1, CMV3, CMV7; Abbildungen 9–11, Tabellen 9–11) eine dynamische Bewertung des diagnostischen Potenzials. Vor Einleitung der antiviralen Therapie führten höhere Viruslasten zu deutlich intensiveren Färbungen im Vergleich zur laufenden Behandlung. Im Verlauf zeigte sich eine Reduktion der Tetramer-Bindung parallel zum Rückgang der Viruslast, die sowohl visuell in den Histogrammen als auch quantitativ anhand der Δ MFI-Werte nachvollzogen werden konnte. Bei Patient CMV7 lagen zum Zeitpunkt der drei Messungen folgende Viruslasten vor: a) 1.500.000 IU/ml, b) 251.000 IU/ml, c) 3.500 IU/ml. Auffällig war, dass die Δ MFI-Werte zwischen sehr hoher und hoher Viruslast nahezu unverändert blieben (a: 1.500.000 IU/ml, Δ MFI 3,4; b: 251.000 IU/ml, Δ MFI 3,5; Abbildung 10, Tabelle 10). Als Erklärung kommen ein lokaler Sättigungseffekt („ceiling“) oder ein präanalytischer Einfluss durch ein fortgeschrittenes Alter der Probe infrage. Gegen einen generellen Sättigungseffekt sprechen die übrigen Daten. So zeigten sich im weiteren Verlauf (b, c) eine kontinuierlich abnehmende Bindung, die mit dem Rückgang der Viruslast korrespondierte. Auch bei CMV3 sank die Δ MFI mit sinkender Viruslast sukzessive von 4,4 (2.300 IU/ml) auf 1,5 (1.700 IU/ml) und 1,0 (600 IU/ml) ab (Abbildung 9, Tabelle 9). Die klar nachweisbare Korrelation zwischen Viruslast und Färbeintensität zeigte sich aber nur innerhalb der Proben eines jeweiligen Patienten. Beim Vergleich zwischen Proben verschiedener Patienten konnte keine Korrelation zwischen Viruslast und Intensität der FACS-Färbung festgestellt werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse nicht nur die hohe Spezifität der Tetramer-Bindung bei gegebener HLA-Kompatibilität im Rahmen der Einmaldiagnostik, sondern auch das Potenzial dieser Methode für eine verlaufs begleitende immunologische Überwachung bei CMV-infizierten Patienten. Gleichzeitig

unterstreichen die Ergebnisse, dass eine präzise HLA-Typisierung eine zwingende Voraussetzung für die erfolgreiche diagnostische Anwendung TCR-ähnlicher Formate darstellt.

5.3 Evaluation der therapeutischen Wirksamkeit mittels Zytotoxizitäts-Assays

Die durchgeführten Zytotoxizitäts-Assays erlaubten eine differenzierte Bewertung der therapeutischen Wirksamkeit der in dieser Arbeit verwendeten CMV-spezifischen, TCR-ähnlichen IgG-Antikörperformate C1 und C7. Während sich die tetramerisierten Fab-Antikörper aufgrund ihrer höheren Sensitivität für diagnostische Fragestellungen eigneten, war für die Analyse funktioneller Effekte die Verwendung vollständiger IgG-Formate erforderlich.

Signifikante zytotoxische Effekte traten ausschließlich in PBMCs von CMV-positiven Patienten mit passendem HLA-Status auf (HLA-A*0201 für C1 und HLA-B*0702 für C7; Abbildungen 16–19, blaue Säulen). Für den C1-Antikörper ließen sich zytotoxische Effekte in PBMCs von drei verschiedenen HLA-A*0201-positiven Patienten („CMV1“, „CMV3“, „CMV7“) nachweisen, jeweils nur dann, wenn eine CMV-Infektion bestand oder eine Peptidbeladung mit dem entsprechenden Antigen vorgenommen wurde. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe des jeweiligen Antikörpers allein bereits eine spezifische Lyse induzieren konnte (Säule 2), die durch eine zusätzliche Peptidbeladung nochmals verstärkt wurde (Säule 4). Die gleichen Effekte zeigten für den C7-Antikörper mit den PBMCs eines HLA-B*0702-positiven, CMV-infizierten Patienten verzeichnet werden („CMV8“).

Auch in den Kontrollgruppen traten Effekte auf. Bei CMV-negativen, aber HLA-kompatiblen Spendern führte erst die kombinierte Zugabe von Antikörper und CMV-Peptid zu einer spezifischen Lyse (Abbildungen 16–19, Säule 4, grün). Dies verdeutlicht, dass eine CMV-Infektion funktionell durch eine Peptidbeladung simuliert werden kann, sofern das passende HLA-Molekül vorliegt. In Abwesenheit von Peptidbeladung oder bei inkompatiblen HLA-Status blieb eine Lyse aus (Abbildungen 16–20, Säulen 1–3, grün).

Besonders erkenntnisreich ist das Ergebnis bei dem CMV-positiven Patienten CMVX mit unpassendem HLA-Allel (Abbildung 20, blaue Säulen). Unter keiner Bedingung konnte eine relevante Lyse induziert werden, auch nicht nach kombinierter Zugabe von Peptid und Antikörper (Säule 4). Im Gegensatz dazu zeigte die HLA-kompatible Kontrollperson nach Peptidbeladung und Antikörperzugabe eine deutliche Lyse von 44,8 % (Abbildung 20, grün, Säule 4). Diese Beobachtung unterstreicht, dass eine CMV-Infektion funktionell durch eine Peptidbeladung simuliert werden kann und die HLA-Kompatibilität eine zwingende Voraussetzung für die Wirksamkeit TCR-ähnlicher Antikörper darstellt.

Neben den Effekten in den Patienten- und Kontrollgruppen sind auch methodische Aspekte zu diskutieren. Mit dem gewählten Effektor-zu-Target-Verhältnis (E:T) von 5:1 blieb die Spontanlyse

unbehandelter Zellen in den Ansätzen unter 3 %, was für eine relative Robustheit der Methode und die Spezifität der beobachteten Effekte spricht. Aus translationaler Perspektive ist die selektive Aktivität der Antikörper zu nennen. Eine Lyse wurde ausschließlich dann induziert, wenn sowohl die Bedingung der Peptidpräsentation als auch das passende HLA-Allel erfüllt waren. Diese doppelten Beobachtungen lassen vermuten, dass unspezifische Effekte gegenüber gesunden Zellen in nur geringem Maße auftreten. Daraus ließe sich konzeptionell ein möglicher Sicherheitsvorteil im Vergleich zu etablierten antiviralen Substanzen ableiten, die unabhängig von HLA und Virusantigen wirken und dadurch auch nicht infizierte Zellen beeinträchtigen können [37,52,53]. Ob sich dieser potenzielle Vorteil tatsächlich in präklinischen oder gar klinischen Studien bestätigen würde, bleibt offen und kann anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Die beobachtete HLA-Spezifität könnte den Ansatz für prophylaktische Anwendungen bei Hochrisikopatienten nach Organ- oder Stammzelltransplantation prinzipiell relevant machen. TCR-ähnliche Antikörper könnten in diesem Szenario konzeptionell eine Lücke zwischen unspezifischer antiviraler Medikation und komplexen T-Zell-basierten Immuntherapien adressieren. Gleichzeitig bleibt zu berücksichtigen, dass die getesteten Antikörper bislang nur eine stark begrenzte Anzahl von HLA-Allelen abdecken. Für eine breite klinische Anwendbarkeit wäre die Entwicklung eines diverseren Antikörperrepertoires erforderlich, wie es im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch mit A6, C1 und C7 angestrebt wurde.

Insgesamt bestätigen die hier erhobenen Daten das therapeutische Potenzial TCR-ähnlicher Antikörper im Kontext von CMV-Infektionen [6]. Ihre gezielte Wirksamkeit bei gleichzeitiger HLA-Spezifität macht sie zu einem vielversprechenden Instrument sowohl für therapeutische als auch prophylaktische Strategien im Kontext von Immunsuppression. Die Evaluation der potenziellen Übertragbarkeit dieses Ansatzes auf größere Patientenkollektive erfordert eine differenzierte Betrachtung populationsspezifischer HLA-Allel-Verteilungen, wie sie im Folgenden vorgenommen wird.

5.4 Übertragbarkeit des Therapieprinzips

5.4.1 Populationsspezifische Relevanz

Die Fokussierung auf die HLA-Allele A*0101, A*0201 und B*0702 (A6, C1, C7) erfolgte gezielt aufgrund ihres gehäuftten Auftretens in der europäischen Bevölkerung. Damit ergab sich eine theoretische Abdeckung von mehr als 50 % der europäischen Bevölkerung [107]. Die wiederholt erfolgreiche Bindung der Tetramere an Lymphozyten von CMV-positiven und HLA-kompatiblen Patienten bestätigt das Potenzial dieses populationsspezifischen Ansatzes (Abbildungen 16-20). Das in dieser Arbeit verfolgte Konzept, ein Antikörperrepertoire für mehrere häufige HLA-Allele zu entwickeln, bietet ein strategisches Modell, das auch auf andere Regionen der Welt übertragbar ist. Eine breitere klinische Anwendbarkeit erfordert die gezielte Entwicklung TCR-ähnlicher Antikörper für weitere Bevölkerungsgruppen. HLA-Datenbanken liefern hierfür die Grundlage, um regionale HLA-Verteilungen systematisch zu erfassen und therapeutische Formate populationsspezifisch anzupassen.

Datenbanken zeigen zum Beispiel ein gehäuftes Auftreten des HLA-Allels A24 in Ländern wie Kolumbien, Taiwan, Russland, Malaysia und Japan [108]. Das Allel HLA-C01 weist unter anderem eine Häufigkeit in China, Japan und Schottland [109]. DQB1*03 hingegen zeigt eine deutliche Relevanz für Bereiche Brasiliens, Mexikos, Vietnams, Malaysias und der Türkei [110]. Eine Übertragbarkeit auf größere Patientenkollektive erfordert daher die gezielte Anpassung an die jeweilige HLA-Verteilung innerhalb der Zielpopulation.

5.4.2 Weitere virale Zielstrukturen

Neben dem Potenzial zur Ausweitung der Zielpopulation ist auch die Übertragbarkeit der erhobenen Ergebnisse auf weitere virale Erkrankungen zu diskutieren. Hierzu zählen insbesondere andere Herpesviren wie das Varizella-Zoster-Virus (VZV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV).

VZV gehört zu den Alpha Herpesviren und verfügt wie CMV über eine doppelsträngige DNA [70]. Es befällt ebenfalls T-Zellen, Epithel- und Ganglienzellen. Die Primärinfektion mit dem Virus tritt typischerweise im Kindesalter in Form von Windpocken auf und persistiert anschließend lebenslang in neuronalen Ganglien. Im höheren Lebensalter oder bei Immunsuppression kann es zur Reaktivierung, etwa in Form von Zoster ophthalmicus oder Zoster oticus, kommen. Diese Reaktivierungen sind nicht nur mit erheblichen Beschwerden, sondern auch mit möglichen Folgeschäden wie dauerhafter Fazialisparese oder chronischer Post-Zoster-Neuralgie verbunden. Die Persistenz des Virus in neuronalen Ganglien bildet dabei die Grundlage für spätere Reaktivierungen [2,3,17,41,94,101,102].

Da VZV analog zu CMV intrazelluläre Peptidfragmente über MHC-I-Moleküle präsentiert, erscheint eine konzeptuelle Übertragbarkeit des hier untersuchten Ansatzes TCR-ähnlicher Antikörper auf VZV-infizierte Zellen aus immunologischer Sicht grundsätzlich möglich [69]. Entsprechende Antikörper könnten potenziell zur Detektion oder gezielten Elimination von infizierten Zellen beitragen. Insbesondere bei Risikopatienten unter immunsuppressiver Therapie könnten sich daraus neue präventive oder therapeutische Möglichkeiten ergeben.

Ein weiterer klinisch relevanter Vertreter der Herpesfamilie ist das Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4), mit dem mindestens 90 % der Weltbevölkerung infiziert sind [26,70]. Die Primärinfektion verläuft bei immunkompetenten Personen meist mild und manifestiert sich typischerweise im Jugend- oder jungen Erwachsenenalter als infektiöse Mononukleose [11,35]. Die Erkrankung präsentiert sich klinisch mit Fieber, Pharyngitis und Lymphadenopathie, wobei auch eine Beteiligung von Milz sowie eine milde Hepatitis mit Transaminasenerhöhung auftreten kann [10,26,32,40,45,64,74,80,96]. In seltenen Fällen kann es jedoch zu schwerwiegenden Verläufen mit Leberversagen kommen [67]. Langfristig kann eine EBV-Infektion zudem mit der Entwicklung eines chronischen Fatigue-Syndroms einhergehen, welches mit persistierender T-Zell-Aktivierung und systemischer Entzündungsreaktion assoziiert ist [29].

Für den Kontext dieser Arbeit besonders relevant ist die Fähigkeit von EBV zur Reaktivierung, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten. Bislang existieren keine etablierten, gezielten Therapieansätze zur Behandlung von EBV-Reaktivierungen. Diese Reaktivierungen stellen, analog zu CMV, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten, etwa im Rahmen hämato-onkologischer Therapien, eine klinisch relevante Herausforderung dar, die neue therapeutische Strategien erfordert [16,50,58,72,79].

Darüber hinaus ist EBV als onkogenes Virus mit verschiedenen malignen Erkrankungen assoziiert, darunter das Burkitt-Lymphom und das Nasopharynxkarzinom [32,35,70]. In einer aktuellen Studie wurden in EBV-assoziierten Tumoren virusspezifische Antigene identifiziert, insbesondere die latenten Membranproteine LMP1 und LMP2 sowie die nukleären Antigene der EBNA-Familie (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C und EBNA-LP). Diese gelten als tumorspezifische Zielstrukturen und erscheinen vielversprechend für den Einsatz in TCR-basierten Immuntherapien. Die Arbeitsgruppe isolierte insgesamt acht EBV-spezifische T-Zell-Rezeptoren (TCRs), die verschiedene immunodominante Peptid-MHC-Komplexe (pMHC) dieser Antigene erkannten, insbesondere von LMP1, LMP2A und EBNA3C. Die daraus generierten TCR-modifizierten T-Zellen zeigten nach Antigenkontakt eine funktionelle Immunantwort mit Sekretion von Interferon- γ sowie eine effektive Lyse EBV-assoziiierter Tumorzellen. Die Autoren sehen in diesen TCRs eine potenzielle Grundlage für die Etablierung einer therapeutischen TCR-Bibliothek zur gezielten Behandlung EBV-assoziiierter Erkrankungen [25].

Die beschriebenen Ansätze illustrieren, dass virale Peptid-MHC-Komplexe auf transformierten Zellen eine selektive Angriffsfläche für TCR-basierte Therapien darstellen können. Diese Mechanismen stehen im engen Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit untersuchten Konzept TCR-ähnlicher Antikörper, deren Anwendungsperspektive sich somit nicht nur auf CMV, sondern auch auf andere Herpesviren wie EBV ausweiten lässt [25,54].

Die Betrachtung von VZV und EBV bildet jedoch lediglich einen Bruchteil des Anwendungspotenzials HLA-restringierender Therapien ab, da die Bedeutung TCR-ähnlicher Antikörper bereits seit Jahren Anklang in der Forschung neuer zielgerichteter Krebstherapieansätze diskutiert wird [22]. Trotz herausragender Fortschritte stellt die gezielte Erkennung intrazellulärer Tumorantigene mit herkömmlichen Antikörpern nach wie vor eine erhebliche Herausforderung dar. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Peptid/MHC-Komplexe auf der Oberfläche von Tumorzellen zu erkennen, bieten TCR-ähnliche Antikörper einen vielversprechenden Mechanismus zur Induktion einer gezielten und effektiven Immunantwort gegen Tumorzellen. Verschiedene Tumormodelle im Bereich des Melanoms, der Leukämie sowie des Brust-, Darm- und Prostatakarzinoms eröffnen Perspektiven für einen breiten klinischen Einsatz dieser Therapieansätze [44,61].

5.4.3. Immunonkologische Perspektiven

Ein potenzielles Übertragungsfeld der durchgeführten Versuche besteht in der Therapieentwicklung des Zervixkarzinoms. Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde Gebärmutterhalskrebs im Jahr 2022 mit etwa 660.000 neuen Fällen diagnostiziert und war mit rund 350.000 Todesfällen weltweit das vierthäufigste Karzinom bei Frauen [22,111].

Die Hauptursache für Gebärmutterhalskrebs ist eine Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) [31]. Das Humane Papillomavirus (HPV) gehört zur Familie der Papillomaviridae und ist ein unbehülltes Virus mit doppelsträngiger, zirkulärer DNA [63]. Es existieren zahlreiche verschiedene HPV-Subtypen, wobei die Stämme HPV 16 und 18 die Hauptursache für etwa 70 % der weltweit diagnostizierten Gebärmutterhalskrebsfälle darstellen [9]. HPV 18 ist dabei eher mit Adenokarzinomen des Gebärmutterhalses assoziiert, während HPV 16 üblicherweise in Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen wird [103]. Die Onkogenität von HPV wird hauptsächlich durch die Onkoproteine E6 und E7 vermittelt. Das E6-Onkoprotein fördert die Zellproliferation, indem es die Funktion des Tumorsuppressorproteins p53 unterdrückt, welches normalerweise Apoptose und Zellzyklusarrest induziert [99,104]. Das E7-Onkoprotein inaktiviert das Retinoblastomprotein (Rb), einen Tumorsuppressor, was zu einer Zellimmortalisierung führt [99,104]. Trotz bestehender präventiver Maßnahmen wie HPV-Impfung und zytologischer Früherkennung bleiben Inzidenz und Sterblichkeitsrate von Gebärmutterhalskrebs weltweit hoch [31,39,111]. Dies unterstreicht den dringenden Bedarf an innovativen Behandlungsoptionen in Form von gezielten Therapiestrategien wie TCR-ähnlichen Antikörpern. TCR-ähnliche Antikörper könnten eine wichtige Rolle in der gezielten Therapie von Gebärmutterhalskrebs einnehmen. Im Kontext des Zervixkarzinoms besteht die Hoffnung, dass entsprechende Antikörper die von HPV induzierten onkogenen Peptide auf MHC-I-Molekülen detektieren und daraufhin verschiedene zelluläre Abwehrmechanismen aktivieren, um die Tumorzellen effektiv zu eliminieren [22].

Ein besonderes Augenmerk liegt außerdem auf der Forschung zu KRAS, einem der am häufigsten betroffenen Onkogene in humanen Tumoren. KRAS-Mutationen treten bei etwa jeder siebten Krebsart auf und gelten als vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung allel-spezifischer Therapien. Insbesondere KRAS^{G12C}-Inhibitoren haben bei Patienten mit KRAS^{G12C}-mutierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen klinische Anwendung gefunden und werden im kolorektalen Karzinom insbesondere in Kombinationsansätzen klinisch untersucht und eröffnen potenzielle therapeutische Optionen bei bislang schwer behandelbaren Mutationen [47].

Die KRAS^{G12V}-Mutation weist eine besonders hohe Inzidenz bei soliden Tumoren des Pankreas und Kolons auf. KRAS^{G12V}-Antigen-spezifische TCR-T-Zellen könnten daher insbesondere für das duktales Adenokarzinom des Pankreas einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellen, da es häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt weniger

als 9 %. Eine zielgerichtete Immuntherapie mit KRAS^{G12V}-spezifischen TCRs könnte somit potenziell das Überleben dieser Patientengruppe verlängern [1,47,82].

Präklinische Studien demonstrierten, dass KRASG12V-reaktive TCRs das mutierte Antigen in einem definierten HLA-Kontext erkennen und antitumorale Aktivität entfalten können [1]. Studien zur T-Zell-Gewinnung und -Expansion aus Pankreaskarzinomen unterstreichen zusätzlich die prinzipielle Umsetzbarkeit TCR-basierter Ansätze in diesem Zusammenhang [38,68]. Besonders eindrücklich belegt wurde dies in einer Studie, in der ein KRASG12V-spezifischer, MHC-Klasse-II-restriktiver TCR identifiziert wurde. CD4⁺ T-Zellen, die mit diesem TCR ausgestattet wurden, zeigten sowohl in vitro als auch im Xenotransplantat-Mausmodell eine signifikante antitumorale Wirksamkeit, sobald sie mit antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt kamen, die das G12V-Peptid exprimierten [1].

Trotz dieser vielversprechenden Ansätze bleibt die HLA-Restriktion eine zentrale Limitation, die die breite Anwendbarkeit dieser Therapien einschränkt. Die zuvor genannte Studie verdeutlicht dies am Beispiel ethnischer Unterschiede innerhalb der chinesischen Bevölkerung, welche die Übertragbarkeit einzelner TCR-Formate erheblich erschweren [1].

5.5 Klinische Umsetzung TCR- basierter Immuntherapien am Beispiel Tebentafusp

Um den Übergang von theoretischen Anwendungsmöglichkeiten zu bereits zugelassenen, klinisch etablierten Therapien zu vollziehen, soll im Folgenden Tebentafusp exemplarisch betrachtet werden. Tebentafusp wurde im Januar 2022 in den USA als neuartiger bispezifischer T-Zell-Rezeptor-CD3-Engager zugelassen, der spezifisch auf das gp100-Peptid im Kontext von HLA-A*0201 gerichtet ist. Entwickelt wurde der Wirkstoff von Immunocore zur Behandlung von nicht resezierbaren malignen Uveamelanomen. Der TCR-Arm von Tebentafusp erkennt HLA-A*0201-positive Uveamelanomzellen und vermittelt über die Bindung an CD3 die Aktivierung polyklonaler T-Zellen. Dies führt zur Freisetzung von Zytokinen und zytotoxischen Effektormolekülen, die eine direkte Lyse der Tumorzellen bewirken [24,42].

Eine offene Phase-3-Studie liefert über drei Jahre gesammelte Daten mit einer Mindestnachbeobachtungszeit von 36 Monaten zur Wirksamkeit und Sicherheit der Therapie. In diese Studie wurden HLA-A*0201-positive Patienten mit zuvor unbehandeltem, metastasiertem Uveamelanom eingeschlossen und im Verhältnis 2:1 randomisiert entweder mit Tebentafusp (Tebentafusp-Gruppe) oder mit einer Standardtherapie (Pembrolizumab, Ipilimumab oder Dacarbazin; Kontrollgruppe) behandelt. Die Wahl der Therapie in der Kontrollgruppe traf der behandelnde Arzt. Die Zuteilung erfolgte unter Berücksichtigung des Laktatdehydrogenase-Spiegels (LDH). Der primäre Endpunkt der Studie war das Gesamtüberleben. Behandlungsassoziierte Nebenwirkungen wurden überwiegend in der Anfangsphase der Behandlung beobachtet. Bei langfristiger Anwendung traten

keine neuen unerwünschten Ereignisse auf. Die häufigsten Nebenwirkungen in der Tebentafusp-Gruppe waren, in absteigender Häufigkeit, Exanthem, Fieber, Pruritus und Hypotonie. Ein Abbruch der Behandlung aufgrund unerwünschter Wirkungen erfolgte bei lediglich 2 % der Tebentafusp-Patienten und 5 % der Kontrollgruppe. Behandlungsassoziierte Todesfälle traten nicht auf. Im Ergebnis zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben von 21,6 Monaten in der Tebentafusp-Gruppe gegenüber 16,9 Monaten in der Kontrollgruppe. Nach drei Jahren waren noch 27 % der Patienten unter Tebentafusp-Behandlung am Leben, verglichen mit 18 % in der Kontrollgruppe. Damit demonstrierte Tebentafusp einen signifikanten Überlebensvorteil bei HLA-A*0201-positiven Patienten mit zuvor nicht behandeltem metastasiertem Uveamelanom [42].

Die klinische Zulassung von Tebentafusp markiert einen bedeutenden Meilenstein in der klinischen Translation TCR-basierter Immuntherapien und verdeutlicht das therapeutische Potenzial, intrazelluläre Antigene mittels MHC-vermittelter Präsentation gezielt nutzbar zu machen. Für die vorliegende Arbeit ist Tebentafusp nicht nur deshalb relevant, weil es das erste zugelassene TCR-basierte Arzneimittel darstellt, sondern auch, weil es auf dasselbe HLA-Allel abzielt, das im Zentrum der hier untersuchten C1-Antikörper steht. Der in dieser Arbeit eingesetzte C1-Antikörper erkennt CMV-spezifische Peptide im Kontext von HLA-A*0201 und zeigte *in vitro* sowohl eine hochspezifische Bindung als auch eine nachweisbare zytotoxische Wirksamkeit [6,42].

Damit greift die hier entwickelte Strategie konzeptionell das Prinzip von Tebentafusp auf, nämlich die gezielte, HLA-restringierte Immunantwort über TCR-ähnliche Moleküle zu induzieren. Gleichzeitig verweist Tebentafusp auf eine zentrale Limitation dieses Therapieprinzips, nämlich die zwingende Notwendigkeit einer HLA-Kompatibilität zwischen Therapeutikum und Zielzelle [24,42]. Um dieser Einschränkung zu begegnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Antikörper-Repertoire entwickelt, das gezielt mehrere häufige HLA-Allele adressiert. Neben dem C1-Antikörper, der gegen HLA-A*0201 gerichtet ist, wurden auch die Antikörper A6, gerichtet gegen HLA-A*0101, sowie C7, gerichtet gegen HLA-B*0702, eingesetzt [6]. Diese drei Zielmoleküle decken gemeinsam einen relevanten Anteil der europäischen Bevölkerung ab und ermöglichen somit eine breitere Anwendungsperspektive als eine ausschließlich auf HLA-A*0201 fokussierte Strategie [107]. Das Konzept eines modularen, HLA-diversen Antikörper-Repertoires bietet somit einen praxisnahen und translational relevanten Ansatz, um die Anwendbarkeit TCR-ähnlicher Plattformen über populationsspezifische Grenzen hinweg erheblich zu erweitern.

5.6 Perspektiven für weiterführende Untersuchungen

Die präsentierten Ergebnisse und Schlussfolgerungen basieren auf einer begrenzten Anzahl von Patienten- und Kontrollproben. Sie erlauben erste relevante Aussagen zur Bindungsspezifität und funktionellen Kapazität der untersuchten TCR-ähnlichen Antikörper, zeigen jedoch zugleich Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen auf, deren Umfang den Rahmen dieser Arbeit

überstiegen hätte. Für eine breitere Aussagekraft wäre die Einbeziehung einer größeren Kohorte sinnvoll, um potenzielle Variationen zwischen einzelnen Subgruppen systematisch erfassen zu können [53,62]. In diesem Zusammenhang könnte sich eine gezielte Charakterisierung der eingeschlossenen Patientengruppen als hilfreich erweisen. Insbesondere eine Differenzierung nach relevanten klinischen Merkmalen wie der jeweiligen Grunderkrankung, Art der Transplantation (z. B. Organ- oder Stammzelltransplantation), Alter oder allgemeinem Gesundheitszustand, würde zusätzliche Rückschlüsse auf den Einfluss immunologischer Rahmenbedingungen auf die Funktion und das Bindungsverhalten der Antikörper ermöglichen.

Auch im Hinblick auf die Zusammensetzung der Kontrollgruppe besteht Erweiterungspotenzial. In den vorliegenden Untersuchungen wurden gesunde Spender einbezogen, bei denen keine Hinweise auf eine CMV-Infektion oder -Reaktivierung bestanden. Langfristig erscheint die Durchführung einer prospektiven klinischen Studie mit aktiver Rekrutierung, standardisierter Serotypisierung und longitudinaler Verlaufsbeobachtung sinnvoll [53,62]. Ein solches Studiendesign würde es ermöglichen, die Dynamik der Antikörper unter kontrollierten Bedingungen zu erfassen und deren potenzielle diagnostische oder therapeutische Relevanz weiter einzuordnen.

5.7 Zusammenfassung der Erkenntnisse

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das diagnostische Potenzial CMV-spezifischer, TCR-ähnlicher Antikörper im Rahmen der durchgeführten Färbungsexperimente überzeugend demonstriert werden konnte. Die Antikörper zeigten wiederholt spezifisches Bindungsverhalten zur Differenzierung zwischen CMV-infizierten und nicht-infizierten Zielzellen, die CMV-infizierten Patienten entnommen wurden, was ihre Eignung für diagnostische Anwendungen unterstreicht. Darüber hinaus ließ sich ihr therapeutisches Potenzial bei Patienten mit mindestens einem der drei HLA-Allele A*0101, A*0201 oder B*0702 erkennen. Diese könnten entweder einzeln oder in Kombination bei multiplen HLA-Übereinstimmungen eingesetzt werden, wodurch eine potenziell gesteigerte Wirksamkeit erzielt werden könnte. Gleichzeitig zeigt sich, dass diese Anwendung lediglich einen begrenzten Ausschnitt aus dem breiteren Einsatzspektrum TCR-ähnlicher Antikörper darstellt. Die Variabilität möglicher Zielstrukturen und die Vielfalt an HLA-Typen eröffnen ein weites Feld zukünftiger diagnostischer und therapeutischer Entwicklungen.

Die in dieser Arbeit diskutierten Beispiele, von viralen Zielantigenen wie EBV, HPV und CMV bis hin zu onkogenen Mutationen wie KRAS^{G12V} und spezifischen Immuntherapeutika wie Tebentafusp, veranschaulichen eindrucksvoll das Potenzial TCR-ähnlicher Antikörper zur personalisierten und HLA-restringierten Immuntherapie. Insgesamt tragen die gewonnenen Erkenntnisse zur Vertiefung des

Verständnisses über TCR-ähnliche Antikörper bei und legen eine belastbare Grundlage für deren weiterführende präklinische und klinische Evaluation.

6. Literaturverzeichnis

1. Ai Q, Li F, Zou S, Zhang Z, Jin Y, Jiang L, Chen H, Deng X, Peng C, Mou N, Wen C, Shen B, Zhan Q (2023) Targeting KRASG12V mutations with HLA class II-restricted TCR for the immunotherapy in solid tumors. *Front Immunol* 14:
2. Aleksic SN, Budzilovich GN, Lieberman AN (1973) Herpes zoster oticus and facial paralysis (Ramsay Hunt syndrome). Clinico-pathologic study and review of literature. *J Neurol Sci* 20:149–159
3. Bader MS (2013) Herpes zoster: diagnostic, therapeutic, and preventive approaches. *Postgrad Med* 125:78–91
4. Bewarder M, Held G, Thurner L, Preuss KD, Carbon G, Bette B, Christofyllakis K, Felbel A, Kaddu-Mulindwa D, Murawski N, Stilgenbauer S, Neumann F (2019) Identification and Characterization of CMV-Specific, HLA-C*07:02 Restricted Antibodies. *Blood* 134:5616–5616
5. Bewarder M, Held G, Thurner L, Stilgenbauer S, Smola S, Preuss KD, Carbon G, Bette B, Christofyllakis K, Bittenbring JT, Felbel A, Hasse A, Murawski N, Kaddu-Mulindwa D, Neumann F (2020) Characterization of an HLA-restricted and human cytomegalovirus-specific antibody repertoire with therapeutic potential. *Cancer Immunol Immunother* 69:1535–1548
6. Bewarder M, Christofyllakis K, Petersen M, Held G, Smola S, Carbon G, Bette B, Link A, Kiefer M, Bittenbring JT, Kos IA, Lesan V, Kaddu-Mulindwa D, Thurner L, Neumann F (2024) Cytomegalovirus-Specific T-Cell-Receptor-like Antibodies Target In Vivo-Infected Human Leukocytes Inducing Natural Killer Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Int J Mol Sci* 25:12908
7. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:
8. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P (2013) Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31:
9. Braaten KP, Laufer MR (2008) Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol* 1:2–2
10. Canović P, Gajović O, Todorović Z, Mijailović Z (2006) Epstein-Barr virus hepatitis associated with icterus--a case report. *Med Pregl* 59:179–182
11. Carbary LJ (1975) Infectious mononucleosis: the kissing disease. *Nurs Care* 8:22–24
12. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001) The importance of immunological memory in fixing adaptive immunity in the genome.
13. Chaudhri G, Quah BJ, Wang Y, Tan AHY, Zhou J, Karupiah G, Parish CR (2009) T cell receptor sharing by cytotoxic T lymphocytes facilitates efficient virus control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14984–14989

14. Chen L, Dong L, Ma Y, Wang J, Qiao D, Tian G, Wang M (2021) An efficient method to identify virus-specific TCRs for TCR-T cell immunotherapy against virus-associated malignancies. *BMC Immunol* 22:65
15. Cohen CJ, Denkberg G, Lev A, Epel M, Reiter Y (2003) Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: New tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. *J Mol Recognit* 16:324–332
16. Coşkun O, Yazici E, Şahiner F, Karakaş A, Kiliç S, Tekin M, Artuk C, Yamanel L, Beşirbellioğlu BA (2017) Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus reactivation in the intensive care unit. *Med Klin Intensivmed Notfallmedizin* 112:239–245
17. Crabtree JA (1968) Herpes zoster oticus. *Laryngoscope* 78:1853–1878
18. Crough T, Khanna R (2009) Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev* 22:76–98
19. Czader M, Post K, Cheng L (2013) Detection of cytomegalovirus infection by quantitative polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 999:257–271
20. Dahan R, Reiter Y (2012) T-cell-receptor-like antibodies - generation, function and applications. *Expert Rev Mol Med* 14:
21. Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H (2006) Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem* 281:23514–23524
22. Dass SA, Selva Rajan R, Tye GJ, Balakrishnan V (2021) The potential applications of T cell receptor (TCR)-like antibody in cervical cancer immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother* 17:2981–2981
23. Denkberg G, Reiter Y (2006) Recombinant antibodies with T-cell receptor-like specificity: Novel tools to study MHC class I presentation. *Autoimmun Rev* 5:252–257
24. Dhillon S (2022) Tebentafusp: First Approval. *Drugs* 82:703–710
25. Dudaniec K, Westendorf K, Nössner E, Uckert W (2021) Generation of Epstein-Barr Virus Antigen-Specific T Cell Receptors Recognizing Immunodominant Epitopes of LMP1, LMP2A, and EBNA3C for Immunotherapy. *Hum Gene Ther* 32:919–935
26. Dunmire SK, Hogquist KA, Balfour HH (2015) Infectious Mononucleosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 390:211–240
27. Eidelberg D, Sotrel A, Vogel H, Walker P, Kleefield J, Crumpacker CS (1986) Progressive polyradiculopathy in acquired immune deficiency syndrome. *Neurology* 36:912–916
28. Farag SS, Fehniger T, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA, Farag SS (2002) Natural killer cells: biology and application in stem-cell transplantation. *Cytotherapy* 4:445–445
29. Fevang B, Wyller VBB, Mollnes TE, Pedersen M, Asprusten TT, Michelsen A, Ueland T, Otterdal K (2021) Lasting Immunological Imprint of Primary Epstein-Barr Virus

- Infection With Associations to Chronic Low-Grade Inflammation and Fatigue. *Front Immunol* 12:
30. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M (2020) Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol* 10:523262–523262
 31. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A (2001) Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can* 164:1017–25
 32. Fugl A, Andersen CL (2019) Epstein-Barr virus and its association with disease - A review of relevance to general practice. *BMC Fam Pract* 20:
 33. Fulkerson HL, Nogalski MT, Collins-McMillen D, Yurochko AD (2021) Overview of Human Cytomegalovirus Pathogenesis. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2244:1–18
 34. Garcia KC, Degano M, Pease LR, Huang M, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA (1998) Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 279:
 35. Geisberger J, Behrends U (2022) Epstein-Barr-Virus-assoziierte Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen. *Kinder- Jugendmed* 22:149–157
 36. Griffiths P, Reeves M (2021) Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol* 19:759–759
 37. Haidar G, Boeckh M, Singh N (2020) Cytomegalovirus Infection in Solid Organ and Hematopoietic Cell Transplantation: State of the Evidence. *J Infect Dis* 221:S23–S31
 38. Hall ML, Liu H, Malafa M, Centeno B, Hodul PJ, Pimiento J, Pilon-Thomas S, Sarnaik AA (2016) Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors. *J Immunother Cancer* 4:
 39. Hamid MKI, Hasneen S, Lima AK, Shawon SR, Shahriar M, Anjum R (2025) Cervical cancer trends, HPV vaccine utilization, and screening in low- and lower-middle-income countries: an updated review. *Ther Adv Vaccines Immunother* 13:25151355251356646
 40. Hara S, Hoshino Y, Naitou T, Nagano K, Iwai M, Suzuki K, Yamamoto K, Nagasaka T, Morishima T, Kimura H (2006) Association of virus infected-T cell in severe hepatitis caused by primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol* 35:250–256
 41. Harner SG, Heiny BA, Newell RC (1970) Herpes zoster oticus. *Arch Otolaryngol Chic Ill* 1960 92:632–635
 42. Hassel JC, Piperno-Neumann S, Rutkowski P, Baurain J-F, Schlaak M, Butler MO, Sullivan RJ, Dummer R, Kirkwood JM, Orloff M, Sacco JJ, Ochsenreither S, Joshua AM, Gastaud L, Curti B, Piulats JM, Salama AKS, Shoushtari AN, Demidov L, Milhem M, Chmielowski B, Kim KB, Carvajal RD, Hamid O, Collins L, Ranade K, Holland C, Pfeiffer C, Nathan P (2023) Three-Year Overall Survival with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma. *N Engl J Med* 389:2256–2256

43. Hauser K, Netzer R, Rassow J (2022) *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
44. He Q, Liu Z, Liu Z, Lai Y, Zhou X, Weng J (2019) TCR-like antibodies in cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 12:
45. Hinedi TB, Koff RS (2003) Cholestatic hepatitis induced by Epstein-Barr Virus infection in an adult. *Dig Dis Sci* 48:539–541
46. Hodson EM, Jones CA, Webster AC, Strippoli GFM, Barclay PG, Kable K, Vimalachandra D, Craig JC (2005) Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet Lond Engl* 365:2105–2115
47. Hofmann MH, Gerlach D, Misale S, Petronczki M, Kraut N (2022) Expanding the Reach of Precision Oncology by Drugging All KRAS Mutants. *Cancer Discov* 12:924–937
48. Horn F (2020) *Biochemie des Menschen*. Thieme.
49. Kaufmann S H E. (2014) *Basiswissen Immunologie*. Thieme, Berlin.
50. Kerr JR (2019) Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol* 72:651–658
51. Khawaja F, Batista MV, El Haddad L, Chemaly RF (2019) Resistant or refractory cytomegalovirus infections after hematopoietic cell transplantation: diagnosis and management. *Curr Opin Infect Dis* 32:
52. Khawaja F, Spallone A, Kotton CN, Chemaly RF (2023) Cytomegalovirus infection in transplant recipients: newly approved additions to our armamentarium. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 29:44–50
53. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A (2018) The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation* 102:900–931
54. Lai J, Tan WJ, Too CT, Choo JAL, Wong LH, Mustafa FB, Srinivasan N, Lim APC, Zhong Y, Gascoigne NRJ, Hanson BJ, Chan SH, Chen J, MacAry PA (2016) Targeting Epstein-Barr virus-transformed B lymphoblastoid cells using antibodies with T-cell receptor-like specificities. *Blood* 128:1396–1407
55. Lancini D, Faddy HM, Flower R, Hogan C (2014) Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med J Aust* 201:578–580
56. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI (2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4005–4010
57. Leen AM, Myers GD, Sili U, Huls MH, Weiss H, Leung KS, Carrum G, Krance RA, Chang CC, Molldrem JJ, Gee AP, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM (2006) Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and

- produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med* 12:1160–1166
58. Libert N, Bigaillon C, Chargari C, Bensalah M, Muller V, Merat S, De Rudnicki S (2015) Epstein-Barr virus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *Biomed J* 38:70–76
 59. Limaye AP, Budde K, Humar A, Vincenti F, Kuypers DRJ, Carroll RP, Stauffer N, Murata Y, Strizki JM, Teal VL, Gilbert CL, Haber BA (2023) Letermovir vs Valganciclovir for Prophylaxis of Cytomegalovirus in High-Risk Kidney Transplant Recipients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 330:33–42
 60. Liu LW, Yn A, Gao F, Olson M, Crain M, Abboud R, Westervelt P, Abboud C, Vij R, Stockerl-Goldstein K, Pusic I, Cashen AF, Schroeder MA (2022) Letermovir Discontinuation at Day 100 After Allogeneic Stem Cell Transplant Is Associated With Increased CMV-Related Mortality. *Transplant Cell Ther* 28:510.e1-510.e9
 61. Liu X, Xu Y, Xiong W, Yin B, Huang Y, Chu J, Xing C, Qian C, Du Y, Duan T, Wang HY, Zhang N, Yu JS, An Z, Wang R (2022) Development of a TCR-like antibody and chimeric antigen receptor against NY-ESO-1/HLA-A2 for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* 10:
 62. Ljungman P, De La Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, Hubacek P, Navarro D, Cordonnier C, Ward KN (2019) Review Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). www.thelancet.com/infection
 63. Luria L, Cardoza-Favarato G (2023) Human Papillomavirus. *Encycl Child Adolesc Health First Ed* 1:953–964
 64. Manappallil RG, Mampilly N, Josphine B (2019) Acute hepatitis due to infectious mononucleosis. *BMJ Case Rep* 12:
 65. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, Haider S, Ullmann AJ, Katayama Y, Brown J, Mullane KM, Boeckh M, Blumberg EA, Einsele H, Snyderman DR, Kanda Y, DiNubile MJ, Teal VL, Wan H, Murata Y, Kartsonis NA, Leavitt RY, Badshah C (2017) Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 377:2433–2444
 66. Masur H, Whitcup SM, Cartwright C, Polis M, Nussenblatt R (1996) Advances in the management of AIDS-related cytomegalovirus retinitis. *Ann Intern Med* 125:126–136
 67. Mellinger JL, Rossaro L, Naugler WE, Nadig SN, Appelman H, Lee WM, Fontana RJ (2014) Epstein–Barr Virus (EBV) Related Acute Liver Failure: A Case Series from the US Acute Liver Failure Study Group. *Dig Dis Sci* 59:1630–1630
 68. Meng Q, Liu Z, Rangelova E, Poiret T, Ambati A, Rane L, Xie S, Verbeke C, Dodoo E, Del Chiaro M, Löhr M, Segersvärd R, Maeurer MJ (2016) Expansion of Tumor-reactive T Cells From Patients With Pancreatic Cancer. *J Immunother Hagerstown Md* 1997 39:81–89

69. Meysman P, Ogunjimi B, Naulaerts S, Beutels P, Van Tendeloo V, Laukens K (2015) Varicella-Zoster Virus-Derived Major Histocompatibility Complex Class I-Restricted Peptide Affinity Is a Determining Factor in the HLA Risk Profile for the Development of Postherpetic Neuralgia. *J Virol* 89:
70. Modrow S, Truyen U, Schätzl H (2021) *Molekulare Virologie*. Mol Virol
71. Mohseni M, Boniface MP, Graham C (2025) *Mononucleosis*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470387/>
72. Murata T, Sugimoto A, Inagaki T, Yanagi Y, Watanabe T, Sato Y, Kimura H (2021) Molecular Basis of Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation. *Viruses* 13:
73. Murphy K, Weaver C (2018) *Janeway Immunologie*. Janeway Immunol
74. Naughton P, Healy M, Enright F, Lucey B (2021) Infectious Mononucleosis: diagnosis and clinical interpretation. *Br J Biomed Sci* 78:107–116
75. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11:
76. Noy R, Epel M, Haus-Cohen M, Klechevsky E, Makler O, Michaeli Y, Denkberg G, Reiter Y (2005) T-cell receptor-like antibodies: novel reagents for clinical cancer immunology and immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 5:523–536
77. Oganessian V, Damschroder MM, Leach W, Wu H, Dall'Acqua WF (2008) Structural characterization of a mutated, ADCC-enhanced human Fc fragment. *Mol Immunol* 45:1872–1882
78. Olsen Saraiva Camara N, Lepique AP, Basso AS (2012) Lymphocyte Differentiation and Effector Functions. *Clin Dev Immunol* 2012:510603–510603
79. Park SS, Cho SY, Han E, Min GJ, Park S, Yoon JH, Lee SE, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Lee S, Kim HJ, Min CK, Cho SG, Lee JW (2019) Reactivation and dynamics of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus after rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for aplastic anemia. *Eur J Haematol* 103:433–441
80. Pichler R, Berg J, Hengstschläger A, Maschek W, Wiesinger J, Schön H (2001) Recurrent infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus with persistent splenomegaly. *Mil Med* 166:733–734
81. Praest P, Liaci AM, Förster F, Wiertz EJHJ (2019) New insights into the structure of the MHC class I peptide-loading complex and mechanisms of TAP inhibition by viral immune evasion proteins. *Mol Immunol* 113:103–114
82. Qin C, Yang G, Yang J, Ren B, Wang H, Chen G, Zhao F, You L, Wang W, Zhao Y (2020) Metabolism of pancreatic cancer: paving the way to better anticancer strategies. *Mol Cancer* 19:
83. Rink L, Kruse A, Haase H (2012) *Immunologie für Einsteiger*. Immunol Für Einsteig

84. Sadler AJ, Williams BRG (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8:559–568
85. Shafer P, Kelly LM, Hoyos V (2022) Cancer Therapy With TCR-Engineered T Cells: Current Strategies, Challenges, and Prospects. *Front Immunol* 13:835762
86. Shaw J, Matin N (2022) Opportunistic infections in HIV. *Medicine (Baltimore)* 50:294–297
87. Smith NA, Chan GC, O'Connor CM (2021) Modulation of host cell signaling during cytomegalovirus latency and reactivation. *Virol J* 18:
88. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R (2024) *Physiologie Das Lehrbuch*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
89. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:
90. Tan P-H, Ji J, Yeh C-C, Ji R-R (2021) Interferons in Pain and Infections: Emerging Roles in Neuro-Immune and Neuro-Glial Interactions. *Front Immunol* 12:
91. Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, Ley TJ (2000) DFF45/ICAD Can Be Directly Processed by Granzyme B during the Induction of Apoptosis. *Immunity* 12:621–632
92. Thongpooswan ABCDEF S, Chyn BEF E, Alfshawy MD, Restrepo ED, Berman CD, Ahmed KD, Muralidharan Corresponding Author S, Alfshawy M (2015) Polyradiculopathy and Gastroparesis due to Cytomegalovirus Infection in AIDS: A Case Report and Review of Literature.
93. Toribio ML, Gutiérrez-Ramos JC, Pezzi L, Marcos MAR, Martínez-A C (1989) Interleukin-2-dependent autocrine proliferation in T-cell development. *Nature* 342:
94. Tyring SK (2007) Management of herpes zoster and postherpetic neuralgia. *J Am Acad Dermatol* 57:
95. van de Weijer ML, Luteijn RD, Wiertz EJHJ (2015) Viral immune evasion: Lessons in MHC class I antigen presentation. *Semin Immunol* 27:125–137
96. Vine LJ, Shepherd K, Hunter JG, Madden R, Thornton C, Ellis V, Bendall RP, Dalton HR (2012) Characteristics of Epstein-Barr virus hepatitis among patients with jaundice or acute hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 36:16–21
97. Vorselen D (2022) Dynamics of phagocytosis mediated by phosphatidylserine. *Biochem Soc Trans* 50:1281–1291
98. Walti CS, Khanna N, Avery RK, Helanterä I (2023) New Treatment Options for Refractory/Resistant CMV Infection. *Transpl Int* 36:11785
99. Wang CJ, Palefsky JM (2015) Human Papillomavirus (HPV) Infections and the Importance of HPV Vaccination. *Curr Epidemiol Rep* 2:101–109

100. Wille PT, Wisner TW, Ryckman B, Johnson DC (2013) Human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein gB promotes virus entry in trans acting as the viral fusion protein rather than as a receptor-binding protein. *mBio* 4:e00332-00313
101. Wilms L, Weßollek K, Peeters TB, Yazdi AS (2022) Infektionen mit Herpes-simplex- und Varizella-zoster-Virus. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG* 20:1327–1353
102. Wollina U, Machetanz J (2016) [Herpes zoster and postherpetic neuralgia]. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb* 67:653–665
103. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11–22
104. Yim E-K, Park J-S (2005) The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 37:319–319
105. (2023) How cytotoxic T cells release their dying targets. *Nat Immunol* 24:1413–1414
106. RKI - RKI-Ratgeber - Zytomegalievirus-Infektion.
107. The Allele Frequency Net Database [Geographic Regions]. URL: https://www.allelefrequenciest.net/pop6001b.asp?pop_polyreg=HLA&pop_type_data=&pop_geog_region=Europe
108. The Allele Frequency Net Database [HLA Allele Information] A*24.
109. The Allele Frequency Net Database [HLA Allele Information] C*01.
110. The Allele Frequency Net Database [HLA Allele Information] DQB1*03+.
111. Cervical cancer. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>

7. Abkürzungsverzeichnis

ADCC: Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

BCR: B-Zell-Rezeptor

BZW: Beziehungsweise

CAD: Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease

CAR: Chimeric Antigen Receptor

CD: Cluster of Differentiation

CMV: Zytomegalievirus

DKMS: Deutsche Knochenmarkspenderdatei

DNA: Desoxyribonukleinsäure

EBNA: Epstein-Barr-Nuklearantigen

EBV: Epstein-Barr-Virus

eIF: Eukaryotischer Initiationsfaktor

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Fab: Fragment antigen binding

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

FC: Fragment crystallizable

HIV: Humanes Immundefizienz-Virus

HLA: Human Leukocyte Antigen

HPV: Humanes Papillomavirus

ICAD: Inhibitor of caspase-activated DNase

ICAM: Intercellular Adhesion Molecule

IFN: Interferon

Ig: Immunglobulin

IL: Interleukin

IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

LDH: Laktatdehydrogenase

LFA: Lymphocyte Function-associated Antigen

MHC: Major Histocompatibility Complex

NK: Natürliche Killerzelle

OD: Optische Dichte

PAMP: Pathogen-associated molecular pattern

PBMC: Periphere mononukleäre Zelle

PBS: Phosphate Buffered Saline

pMHC: Peptid-MHC-Komplex

PRR: Pattern Recognition Receptor

TAP: Transporter associated with antigen processing

TCR: T-Zell-Rezeptor

TH: T-Helferzelle

TIL: Tumor-infiltrierende Lymphozyten

TLR: Toll-like-Rezeptor

TNF: Tumornekrosefaktor

TR: Terminale Wiederholungssequenzen

TS: Tris-Salz-Lösung

UL: Unique Long

US: Unique Short

VZV: Varizella-Zoster-Virus

WHO: Weltgesundheitsorganisation

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des CMV-Genoms. Das Genom ist in zwei Abschnitte unterteilt: die unique short-Region (US) auf der rechten und die unique long-Region (UL) auf der linken Seite. An den Übergängen zwischen diesen Bereichen befinden sich interne Wiederholungssequenzen (IR), welche die vier isomeren Genomstränge darstellen, die durch intramolekulare Rekombination entstehen. Die terminalen Wiederholungssequenzen (TR) flankieren die Genomenden. Die Orientierung der genomischen Abschnitte ist durch Pfeile am unteren Rand der Abbildung dargestellt. Der Replikationsursprung (oriLyt) liegt zentral in der UL-Region. Exemplarisch sind die Gene UL4 und US6 eingezeichnet. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt und modifiziert nach [69]. _____ 9

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus des Zytomegalievirus. (1) Anheftung über virale Glykoproteine an zelluläre Rezeptoren und Penetration durch Fusion oder Endozytose, (2) Eintritt ins Zytoplasma mit Transport zum Zellkern und Freisetzung der DNA, (3) DNA-Replikation im Zellkern und Translation viraler Proteine im Zytoplasma, (4) Assemblierung der Kapside im Zellkern, (5) Verpackung der viralen DNA, (6) primäre Umhüllung und Austritt aus dem Zellkern, (7) sekundäre Umhüllung im ER–Golgi-Kompartiment und (8) Freisetzung reifer Virionen durch Exozytose. _____ 10

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs einer CMV. Die Abbildung zeigt schematisch den Verlauf einer CMV-Infektion von der Primärinfektion bis zur Reaktivierung. Oben links beginnt die Darstellung mit der Primärinfektion, bei der CMV über infektiöse Körperflüssigkeiten auf Epithel- bzw. Endothelzellen übertragen wird. Nach dieser initialen Infektion breitet sich das Virus in Richtung peripheres Blut aus und infiziert dort Monozyten, was zu einer stillen Infektion führt und zur Etablierung einer latenten Viruspräsenz beiträgt. Ein Teil der infizierten Monozyten kann sich in Makrophagen differenzieren (zentral unten), die das Virus über das Blut in verschiedene Organe transportieren und dort eine lytische Infektion hervorrufen (organassoziierte CMV-Infektion). Rechts oben in der Abbildung wird die Infektion von CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPCs) im Knochenmark dargestellt, in denen das Virus eine latente Infektion etabliert. Durch bestimmte Reaktivierungssignale können diese latenten HPCs entlang der myeloischen Zelllinie erneut differenzieren und Monozyten bzw. Makrophagen generieren (rechts unten), welche wiederum replikationsfähiges Virus produzieren. Diese Zellen tragen sowohl zur erneuten peripheren Virusausbreitung als auch zur Aufrechterhaltung des Infektionsreservoirs bei. _____ 11

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur des T-Zellrezeptors. Die Abbildung zeigt schematisch die Struktur des TCR. Oben ist die Antigenbindungsstelle zu erkennen, bestehend aus den variablen Regionen der α - und β -Kette (V α , V β). Darunter befinden sich die konstanten Regionen. Auf der linken Seite erkennbar die α -Kette und auf der rechten Seite die β -Kette (K α , K β). Die Disulfidbrücke, die beide Ketten miteinander verbindet, ist gelb dargestellt. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com und modifiziert nach [48]. _____ 15

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus von MHC-I- und MHC-II-Molekülen aus Seitenansicht.
MHC-Klasse-I-Molekül (links): Das MHC-Klasse-I-Molekül lässt sich in verschiedene Untereinheiten unterteilen: Oben links ist die grüne $\alpha 2$ -Untereinheit abgebildet, die gemeinsam mit der blauen $\alpha 1$ -Untereinheit rechts im Bild die Peptidbindungsstelle bildet. Unterhalb der $\alpha 2$ - und $\alpha 1$ -Untereinheiten befinden sich die $\alpha 3$ - und $\beta 2$ -Mikroglobulin-Untereinheiten. _____ 21

Abbildung 6: Durchflusszytometrie-Histogramme von HLA-A*0201-positiven Patienten CMV1 (a), CMV3 (b) und CMV4 (c). Dargestellt ist die Ereigniszahl (y-Achse) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Die graue Kurve zeigt das PE-Tetramer als Negativkontrolle, die rote Kurve das C1-Tetramer. Gestrichelte Linien markieren die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI), deren Differenz (Δ MFI) mit Pfeilen angegeben ist. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 32

Abbildung 7: Durchflusszytometrie-Histogramme von HLA-A*0201-positiven Patienten CMV2 (a), CMV7 (b) und CMV9 (c). Aufgetragen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Die graue Kurve stellt die Negativkontrolle (PE-Tetramer) dar. Die blaue Kurve zeigt das C7-Tetramer, die grüne Kurve das A6-Tetramer, und die rote Kurve repräsentiert das HLA-A*0201-kompatible C1-Tetramer. Gestrichelte Linien markieren die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI), deren Differenzen (Δ MFI) mit Pfeilen angegeben sind. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 34

- Abbildung 8: Durchflusszytometrie-Histogramme von HLA-A*0101 und HLA-B*0702-positiven Patienten CMV5 (a), CMV6 (b) und CMV8 (c).** Die Histogramme zeigen die Ereigniszahl (y-Achse) in Relation zur Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Die graue Kurve zeigt das PE-Tetramer (Negativkontrolle). Die grüne Kurve stellt das A6-Tetramer dar (restriktiv für HLA-A*0101), die blaue Kurve das C7-Tetramer (restriktiv für HLA-B*0702), die rote Kurve das C1-Tetramer. Gestrichelte Linien markieren die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI); die Δ MFI-Werte sind bei CMV6 für A6 und C7 separat angegeben. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 36
- Abbildung 9: Longitudinale Messung der Tetramer-Bindung bei Patient CMV3 (HLA-A*0201).** Aufgetragen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201-spezifisch). Dargestellt sind drei Zeitpunkte während abnehmender Viruslast: a) vor Beginn der Therapie, b) im Verlauf der Therapie, c) im weiteren Verlauf. Gestrichelte Linien markieren die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI); die Δ MFI-Werte sind durch Pfeile dargestellt. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 38
- Abbildung 10: Longitudinale Messung der Tetramer-Bindung bei Patient CMV7 (HLA-A*0201).** Auf den Histogrammen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A) aufgetragen. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201-spezifisch), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind drei Zeitpunkte während abnehmender Viruslast: a) vor Beginn der Therapie, b) im Verlauf, c) im weiteren Verlauf. Gestrichelte Linien markieren die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI); die Δ MFI-Werte sind durch Pfeile dargestellt. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 40
- Abbildung 11: Longitudinale Messung der Tetramer-Bindung bei Patient CMV1 (HLA-A*0201).** Dargestellt ist die Ereigniszahl (y-Achse) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A). Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201-spezifisch). Gezeigt sind zwei Zeitpunkte während abnehmender Viruslast: a) vor Beginn der Therapie, b) im Verlauf. Gestrichelte Linien markieren die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI); die Δ MFI-Werte sind durch Pfeile dargestellt. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 42
- Abbildung 12: CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast <5000 IU/ml.** Auf den Histogrammen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A) aufgetragen. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind sechs Kontrollpersonen: a) KP10, b) KP11, c) KP13, d) KP14, e) KP15, f) KP16. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 46
- Abbildung 13: CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast >5000 IU/ml.** Auf den Histogrammen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A) aufgetragen. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind drei Kontrollpersonen: a) KP12, b) KP17, c) KP18. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 48
- Abbildung 14: CMV-negative Kontrollpersonen mit passendem HLA-Status.** Auf den Histogrammen ist die Ereigniszahl (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, PE-A) aufgetragen. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind drei Kontrollpersonen: a) KP1 (HLA-A*0201+), b) KP3 (HLA-A*0201+), c) KP8 (HLA-A*0101+). Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 50
- Abbildung 15: CMV-negative Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status.** Die x-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität (PE-A), die y-Achse die jeweilige Ereigniszahl. Grau: Negativkontrolle (PE-Tetramer), rot: C1-Tetramer (HLA-A*0201), grün: A6-Tetramer (HLA-A*0101), blau: C7-Tetramer (HLA-B*0702). Dargestellt sind drei Kontrollpersonen: a) KP4, b) KP5, c) KP6. Analysiert mittels FlowJo und modifiziert nach [6]. _____ 52
- Abbildung 16: Zytotoxizitäts-Assay CMV3.** Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-A*0201-positiven Patienten CMV3 und eines HLA-A*0201-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C1 (PBMCs + C1-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C1 (PBMCs + CMV-Peptid + C1-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: CMV3. Daten modifiziert nach [6]. _____ 56

Abbildung 17: Zytotoxizitäts-Assay CMV7. Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-A*0201-positiven Patienten CMV7 und eines HLA-A*0201-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C1 (PBMCs + C1-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C1 (PBMCs + CMV-Peptid + C1-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: CMV7. Daten modifiziert nach [6]. _____ 57

Abbildung 18: Zytotoxizitäts-Assay CMV1. Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-A*0201-positiven Patienten CMV1 und eines HLA-A*0201-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C1 (PBMCs + C1-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C1 (PBMCs + CMV-Peptid + C1-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: CMV1. Daten modifiziert nach [6]. _____ 58

Abbildung 19: Zytotoxizitäts-Assay CMV8. Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-B*0702-positiven Patienten CMV8 und eines HLA-B*0702-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C7 (PBMCs + C7-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C7 (PBMCs + CMV-Peptid + C7-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: CMV8. Daten modifiziert nach [6]. _____ 59

Abbildung 20: Zytotoxizitäts-Assay CMVX. Der Zytotoxizitäts-Assay erfolgte mit den Lymphozyten des HLA-unpassenden, CMV-infizierten Patienten CMVX und eines HLA-B*0702-positiven, gesunden Spenders. Dargestellt ist die prozentuale Lyse von PBMCs (y-Achse) bei einem Effektor-zu-Target-Zellverhältnis (E:T) von 5:1. Auf der x-Achse sind vier Bedingungen abgebildet: 1 = nativ (PBMCs + NK-Zellen), 2 = nativ/C7 (PBMCs + C7-Antikörper + NK-Zellen), 3 = CMV (PBMCs + CMV-Peptid + NK-Zellen), 4 = CMV/C7 (PBMCs + CMV-Peptid + C7-Antikörper + NK-Zellen). Grüne Balken: gesunder Kontrollspender; blaue Balken: Patient CMVX. _____ 61

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte	23
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 3: Chemikalien und Sonstiges	24
Tabelle 4: CMV-Peptide	25
Tabelle 5: Übersicht der CMV-positiven Patienten mit mindestens einem kompatiblen HLA-Allel	31
Tabelle 6: Viruslast und spezifische C1-Tetramer-Bindung (ΔMFI) bei den HLA-A*0201-positiven Patienten CMV1, CMV3, CMV4	33
Tabelle 7: Viruslast und spezifische C1-Tetramer-Bindung (ΔMFI) bei den HLA-A*0201-positiven Patienten CMV2, CMV7 und CMV9	35
Tabelle 8: Viruslast und Tetramer-Bindung (ΔMFI) bei HLA-A*0101 und HLA-B*0702-positiven Patienten (CMV5, CMV6, CMV8).	37
Tabelle 9: Longitudinale Messung der Viruslast und C1-Tetramer-Bindung (ΔMFI) bei Patient CMV3 (HLA-A*0201-positiv).	39
Tabelle 10: Longitudinale Messung der Viruslast und C1-Tetramer-Bindung (ΔMFI) bei Patient CMV7 (HLA-A*0201-positiv)	41
Tabelle 11: Longitudinale Messung der Viruslast und C1-Tetramer-Bindung (ΔMFI) bei Patient CMV1 (HLA-A*0201-positiv)	43
Tabelle 12: CMV-positive Kontrollpersonen	44
Tabelle 13: CMV-negative Kontrollpersonen	45
Tabelle 14: CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast <5000 IU/ml; MFI-Werte für PE-, A6-, C1- und C7-Tetramer	47
Tabelle 15: CMV-positive Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status und Viruslast >5000 IU/ml; MFI-Werte für PE-, A6-, C1- und C7-Tetramer	49
Tabelle 16: CMV-negative Kontrollpersonen mit passendem HLA-Status; MFI-Werte für PE-, A6-, C1- und C7-Tetramer	51
Tabelle 17: CMV-negative Kontrollpersonen mit unpassendem HLA-Status; MFI-Werte für PE-, A6-, C1- und C7-Tetramer	53

10. Publikation

Cytomegalovirus-Specific T-Cell-Receptor-like Antibodies Target In Vivo-Infected Human Leukocytes Inducing Natural Killer Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

Bewarder, M., Christofyllakis, K., Petersen, M., Held, G., Smola, S., Carbon, G., Bette, B., Link, A., Kiefer, M., Bittenbring, J. T., Kos, I. A., Lesan, V., Kaddu-Mulindwa, D., Thurner, L., & Neumann, F. (2024). Cytomegalovirus-Specific T-Cell-Receptor-like Antibodies Target In Vivo-Infected Human Leukocytes Inducing Natural Killer Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 12908. <https://doi.org/10.3390/ijms252312908>

11. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Moritz Bewarder, für die wissenschaftliche Betreuung, die fachliche Unterstützung sowie die stets konstruktive Begleitung dieser Arbeit herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zudem Frau Birgit Bette, die mich während der gesamten Zeit unterstützt hat, ohne ihr Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke ihr herzlich für ihre außergewöhnliche Geduld und die kontinuierliche Förderung meines Vorhabens. Ebenso gilt mein Dank Frau Gabi Carbon sowie allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des José-Carreras-Zentrums für die stets hilfsbereite Unterstützung. Besonders hervorzuheben ist die herzliche und familiäre Arbeitsatmosphäre, die meine Zeit im Labor in besonderer Weise geprägt hat.

Dem Institut für Virologie in Homburg danke ich für die gelungene Kooperation und die fachliche Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt zudem meinen Freundinnen und Freunden, die mich stets ermutigt haben. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet und mich auch in arbeitsintensiven Phasen motiviert habt, dranzubleiben.

Schließlich möchte ich mich bei meiner gesamten Familie, allen voran bei meinen Eltern, bedanken. Ich danke euch von Herzen für die jahrelange Unterstützung und das unerschütterliche Vertrauen, das ihr mir während meines gesamten Studiums und der Erstellung dieser Arbeit entgegengebracht habt. Ohne euren Rückhalt und euren Glauben an mich wäre mein Weg bis zu diesem Punkt nicht möglich gewesen.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der
Dissertation nicht veröffentlicht.