

# **Validation of optimal targets for adoptive T-cell therapy of adenovirus infection**

## **Validierung optimaler Targets für die adoptive T-Zell-Therapie der Adenovirus-Infektion**

### **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Anna Keib

aus Dschambul/Kasachstan

Tübingen

2021

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

14.12.2021

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

Kevin Dennehy, PhD

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
1.1 Zusammenfassung .....	6
1.2 Abstract.....	7
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>9</b>
2.1 Humane Adenoviren.....	9
2.1.1 Klassifizierung.....	9
2.1.2 Morphologie und das Genom der humanen Adenoviren .....	10
2.1.3 Replikationszyklus der humanen Adenoviren .....	12
2.2 Infektion mit humanen Adenoviren .....	15
2.2.1 Epidemiologie .....	15
2.2.2 Klinisches Erscheinungsbild .....	15
2.2.3 Übertragung.....	16
2.2.4 Adenovirus-Infektion bei pädiatrischen Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation.....	16
2.2.5 Labordiagnostik.....	17
2.3 Immunsystem und T Lymphozyten .....	19
2.3.1 Immunantwort auf die Adenovirus-Infektion.....	19
2.3.2 Virale Mechanismen der Persistenz .....	21
2.3.3 Humanes Leukozytenantigen-System.....	22
2.3.4 T-Lymphozyten.....	24
2.4 Therapie einer Adenovirus-Infektion .....	25
2.4.1 Cidofovir .....	25
2.4.2 Brincidofovir (CMX001).....	25
2.4.3 Adoptiver T-Zell-Transfer .....	26
2.5 Zielsetzung dieser Arbeit .....	27

<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1 Vorhersage von T-Zell-Epitopen mittels Online-Plattformen.....	29
3.2 Verwendeter Adenovirus-Stamm.....	29
3.3 Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes .....	29
3.4 Zellzahlbestimmung.....	30
3.5 Expansion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes .....	31
3.6 Enzyme Linked Immuno Spot (ELISPOT) Assay.....	31
3.7 Streptamer- /Dextramerfärbung und Durchflusszytometrie .....	32
3.8 Klonierung der spezifischen T-Zell-Rezeptoren.....	32
3.9 Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren .....	33
3.10 Aufreinigung der Monozyten .....	33
3.11 Early activation Assay der Jurkat 76-Zelllinie .....	34
3.12 T-Zell Anreicherung .....	34
3.13 Zytotoxizitäts-Assays .....	34
3.14 <i>Adenovirus Dissemination Assay</i> .....	35
<b>4 Generierung Antigen-spezifischer T-Zellen für den adoptiven T-Zell-Transfer .....</b>	<b>36</b>
4.1 Vorhersage der möglichen T-Zell-Epitope mittels Online-Plattformen .....	36
4.2 Peptid-induzierte Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung .....	36
4.3 Expansion und Detektion Antigen-spezifischer T-Zellen nach einer Adenovirus-Infektion <i>in vitro</i> .....	46
<b>5 Funktionale Analyse Antigen-spezifischer T-Zellen für den adoptiven T-Zell Transfer ....</b>	<b>49</b>
5.1 Immortalisierte, mit dem ALYGSFATK T-Zell-Rezeptor transduzierte T-Zellen .....	49
5.2 Zytotoxische Kapazität expandierter Primärzellen und transduzierter Zellen mit kloniertem T-Zell-Rezeptor .....	51
5.3 Bestimmung der protektiven Kapazität spezifischer T-Zellen mittels <i>Adenovirus</i> <i>Dissemination Assay</i> .....	55

<b>6 Diskussion.....</b>	<b>60</b>
6.1 Generierung Antigen-spezifischer T-Zellen für den adoptiven T-Zell Transfer .....	60
6.2 Funktionale Analyse der primären Epitop-spezifischen T-Zellen und T-Zellen mit einer ektopischen Expression der adenoviralen spezifischen T-Zell-Rezeptoren .....	62
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>75</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>75</b>

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung

Humane Adenoviren (HAdV) können je nach Spezies akute Gastroenteritis, Konjunktivitis, Keratitis, Zystitis, Rhinitis, Pharyngitis oder Meningitis verursachen. In den meisten Fällen ist die Infektion selbst-limitierend und vermittelt eine typspezifische Immunität [Ison und Hayden, 2016]. Jedoch kann eine HAdV-Infektion bei pädiatrischen Patienten, durch eine vorübergehende Immunschwäche nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) begünstigt, eine wichtige Ursache für Morbidität und Mortalität darstellen [Tischer et al., 2016]. Für HAdV-Infektionen gibt es nur beschränkte Behandlungsmöglichkeiten, da bis heute noch keine hochwirksame Virostatika existieren. Etabliert haben sich Cidofovir und sein Derivat Brincidofovir. Diese ermöglichen es, die Infektion durch die Inhibierung der viralen DNA-Polymerase zu kontrollieren, jedoch nicht, das Virus an sich zu eliminieren. Da T-Zellen die wirksamsten Effektoren im menschlichen Immunsystem sind, kann die Kontrolle der T-Zell-Reaktionen die Morbidität und Mortalität bei einer HAdV-Infektion verbessern [Lee et al. 2017; Feucht et al. 2015]. Der adoptive T-Zell-Transfer bietet eine vielversprechende immuntherapeutische Strategie. Um möglichst spezifisch zytotoxische-T-Zellen zu generieren, ist es notwendig, die von den Humanen Leukozytenantigen (HLA)-Klasse-I-Molekülen präsentierende Antigenpeptide (Epitope) zu identifizieren. In einem individuellem Heilversuch konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, die für das Peptid-Epitop LTDLGQNLLY spezifisch sind, protektiv wirken [Günther et al. 2015]. Um möglichst vielen Patienten eine Immuntherapie zu ermöglichen, ist es notwendig, Epitope mit anderer HLA-Restriktion zu identifizieren.

Für die Identifizierung immundominanter HLA-Klasse-I-Epitope wurden aus Sequenzen des Adenovirus Serotyps 2 mittels der Computer-Algorithmen NetMHC™ und NetMHCstab™, potenzielle Epitope vorhergesagt. Siebenunddreißig neue Peptide wurden synthetisiert und auf Ihre Eigenschaft untersucht, eine Interferon- $\gamma$  Ausschüttung in T-Zellen zu induzieren, um die Immunogenität zu bestimmen. Acht vielversprechende Peptide für fünf verschiedene HLA-Allotypen konnten dabei identifiziert werden.

Für das HLA-A\*03:01-restringierte Epitop ALYGSFATK konnten spezifische T-Zellen nach einer 12-tägigen Expansion generiert werden. Mittels einer TCR-SCAN-RACE-PCR wurde aus diesen

T-Zellen spezifische T-Zell-Rezeptoren (TCRs) kloniert und in Spender-Lymphozyten transduziert. ALYGSFATK-spezifische-TCR-transduzierte-T-Zellen wiesen eine zytotoxische Kapazität von 99 % auf.

Die antivirale Kapazität von T-Zellen in einer infektiösen Umgebung konnte mithilfe des hier beschriebenen neu entwickelten Testverfahrens nachgewiesen werden. Hierfür wurden ALYGSFATK-spezifische-TCR-transduzierte-T-Zellen oder expandierte, HLA-A\*01-restringierte, LTDLGQNLLY-spezifische- und HLA-A\*02-restringierte, LLDQLIEEV-spezifische-T-Zellen mit HAdV-infizierten-Monozyten ko-kultiviert. Es wurden replikationskompetente Adenovirus 11 (Ad11pGFP) und Adenovirus 5 enthaltende Adenovirus-35-Faser-(Ad5F35GFP) -Viren verwendet. Nach drei Tagen konnte die virale Dissemination der infizierten GFP+ Monozyten mittels der Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Sowohl die LTDLGQNLLY-Peptid- oder LLDQLIEEV-Peptid-expandierten T-Zellen, als auch ALYGSFATK-spezifische-TCR-transduzierte-T-Zellen waren in der Lage, eine Dissemination der HAdV-Infektion zu verhindern.

Diese Arbeit beschreibt acht präklinisch getestete Adenovirus-spezifische HLA-Klasse I Epitope, sowie die zytotoxische Kapazität erfolgreich TCR-transduzierter-T-Zellen. Mittels eines neuen Testverfahrens, des sogenannten *Adenovirus Dissemination Assay* [Keib et al., 2019], konnte nachweislich gezeigt werden, dass sowohl physiologische T-Zellen als auch transduzierte T-Zellen eine Ausbreitung der Virusinfektion *in vitro* verhindern können.

## 1.2 Abstract

Human adenoviruses (HAdV) cause a variety of acute infections including gastroenteritis, pharyngitis, or meningitis, depending on the species. In most cases, the infection is self-limiting and imparts type-specific immunity [Ison and Hayden, 2016]. HAdV infections in pediatric patients can be an important cause of morbidity and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) due to a temporary Immunodeficiency [Tischer et al., 2016]. This problem is aggravated by the limited number of treatment options for HAdV infections, resulting from a lack of effective antiviral drugs. The established antivirals cidofovir and its derivative brincidofovir can control the infection by inhibiting the viral DNA polymerase, but they cannot eliminate the virus. Since T cells constitute the most potent effectors in the human immune system, controlling T cell responses can improve morbidity

and mortality in patients with HAdV infection [Lee et al., 2017; Feucht et al., 2015]. Adoptive T cell transfer offers a promising immunotherapeutic strategy. In order to generate specific cytotoxic T cells, it is necessary to identify the antigen peptides (epitopes) presented by the human leukocyte antigens (HLA) class I molecules. It was already shown in a compassionate care study that an infusion therapy with LTDLGQNLLY-specific T cells leads to a protective effect [Günther et al. 2015]. In order to enable as many patients as possible to undergo immunotherapy, it is necessary to identify epitopes with further HLA restrictions.

For the identification of immunodominant HLA class I epitopes, potential epitopes were predicted from sequences of the adenovirus serotype 2 using NetMHC™ and NetMHCstab™. Thirty-seven new peptides were synthesized and tested for their ability to induce interferon- $\gamma$  release in T cells in order to assess immunogenicity. Eight promising peptides for five different HLA allotypes were identified. T-cells specific for HLA-A\*03:01 restricted epitope ALYGSFATK could be generated after 12 days of expansion. Using a TCR-SCAN-RACE-PCR, specific TCRs were cloned from these T cells and transduced into lymphocytes from another donor. ALYGSFATK-specific-TCR-transduced T cells had a cytotoxic potential of 99 %.

The antiviral potential of T cells in an infectious environment could be demonstrated using the newly developed test procedure described here. For this purpose, ALYGSFATK-specific-TCR-transduced T cells or expanded, HLA-A\*01-restricted LTDLGQNLLY specific and HLA-A\*02-restricted LLDQLIEEV specific T cells were co-cultured with HAdV-infected monocytes. Replication-competent adenovirus 11 (Ad11pGFP) and adenovirus 5 containing adenovirus 35 fiber (Ad5F35GFP) viruses were used. The viral dissemination of the infected GFP<sup>+</sup> monocytes was quantified after three days by flow cytometry. As well as the potential of expanded LTDLGQNLLY-peptide- and LLDQLIEEV-peptide-specific T cells or ALYGSFATK-specific-TCR-transduced T cells to prevent dissemination of the HAdV infection.

This work describes eight pre-clinically tested adenovirus-specific HLA class I epitopes. Furthermore, we demonstrated successfully a high cytotoxic potential of TCR-transduced T cells. Employing a new test method, called *Adenovirus Dissemination Assay* [Keib at al., 2019], prevention of infection was demonstrated in both physiological and transduced T cells.



## 2 Einleitung

### 2.1 Humane Adenoviren

#### 2.1.1 Klassifizierung

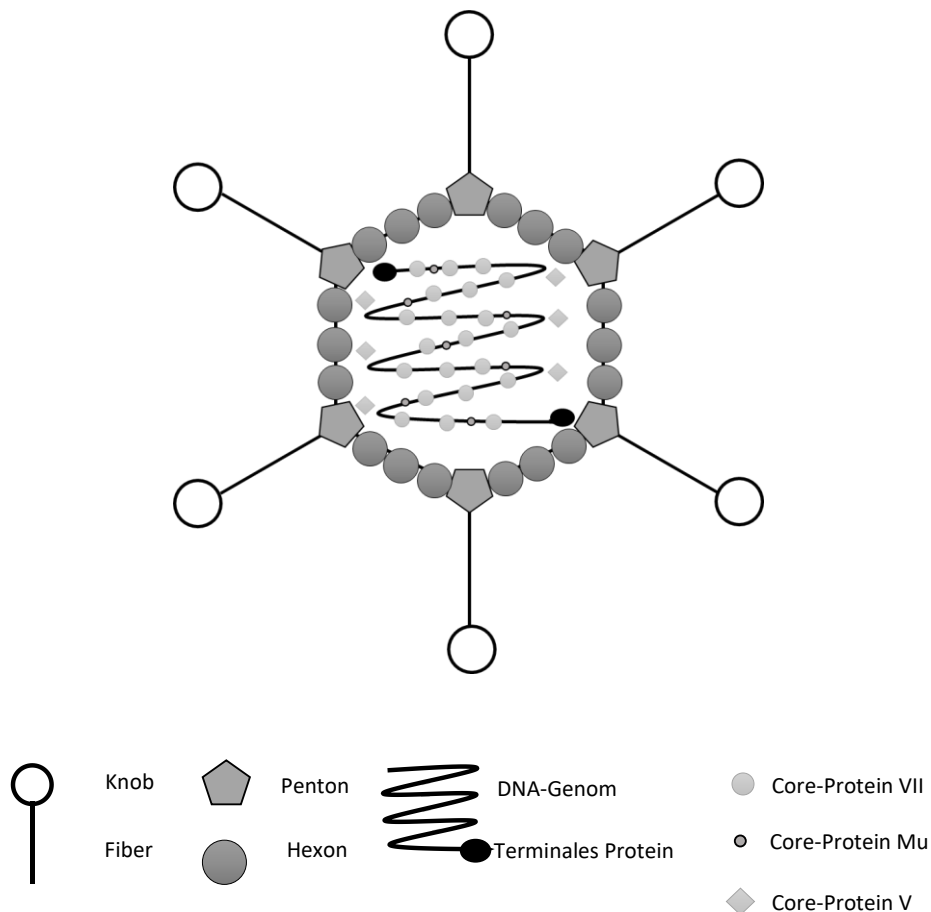
Humane Adenoviren wurden erstmals im Jahre 1953 von Wallace Rowe beschrieben. Er isolierte das Virus aus dem adenoiden Gewebe (der obere Anteil des lymphatischen Rachenrings) eines fünf Jahre alten Patienten, was schließlich zur Namensgebung beigetragen hat [Rowe et al., 1953]. Die humanen Adenoviren gehören zur Familie der *Adenoviridae* und der Gattung der *Mastadenoviren*, die zur Baltimore Klasse I gezählt werden (Baltimore, 1971). Adenoviren werden anhand der phylogenetischen Analysen, genomischen Organisation, Wachstumseigenschaften und der Onkogenität in sieben Spezies (Spezies A–G) eingeteilt [Radke and Cook, 2018; Ison and Hayden, 2016; Leen et al., 2006]. Eine weitere Einteilung in unterschiedliche Serotypen erfolgt anhand der Hämagglutinationshemmung sowie der Neutralisation (Referenzmethode). Die wird allerdings heutzutage immer mehr von Genomsequenzanalysen, Gensonden oder Restriktionsenzym-Analysen ausgeführt [Richman et al., 2017; Fields Virology, Wold and Horwitz, 2007; Radke und Cook 2018]. Viele Serotypen sind mit akuten respiratorischen, gastrointestinalen Infektionen oder Konjunktivitis assoziiert. Der Gewebetropismus der HAdV-Spezies bestimmt die klinischen Manifestationen einer Infektion. Die genaue Auflistung der Spezies und der dazugehörigen Lokalisation der Infektion sind in *Tabelle 1* aufgeführt.

**Tabelle 1** Auflistung der sieben Spezies mit den dazugehörigen Serotypen und Infektionsorten. Adaptiert von Ison and Hayden, 2016 und Leen et al, 2006.

Spezies	Serotyp	Infektionsort
A	12, 18, 31, 61	Gastrointestinal (GI)-Trakt
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66	Atemwege, Harntrakt
C	1, 2, 5, 6, 57	Atemwege
D	8-10, 12, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-29, 51, 53, 54, 56, 58-60, 63-67	Augen, GI-Trakt
E	4	Atemwege
F	40, 41	GI-Trakt
G	52	GI-Trakt

## 2.1.2 Morphologie und das Genom der humanen Adenoviren

Humane Adenoviren sind unbehüllte, pathogene Viren mit einer doppelsträngigen, linearen Desoxyribonukleinsäure (dsDNA). Das ikosaedrische Kapsid hat einen Durchmesser von etwa 91 nm, mit einer Masse von 150 MDa [Reddy et al., 2010].



**Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung der Morphologie der humanen Adenoviren.** Das ikosaedrische Kapsid besteht aus Hexonen, Pentonen mit je einem Fiberprotein. Die lineare DNA ist umhüllt mit Core Proteinen V, VII, Mu und Terminales Protein.

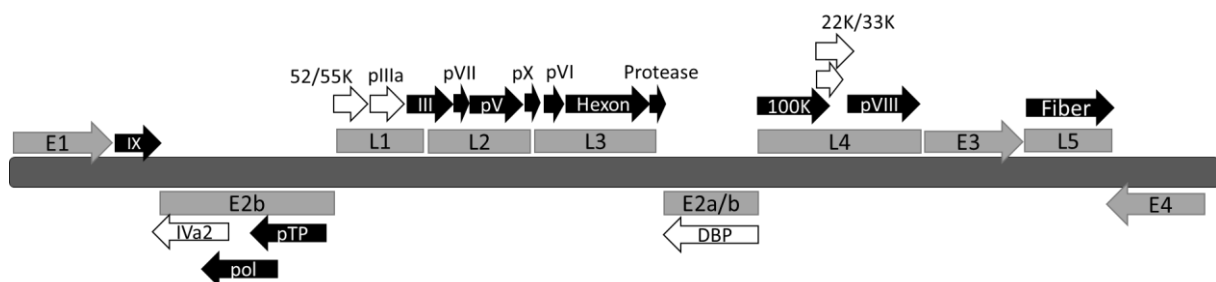
Das Kapsid besteht aus drei Hauptproteinen und mehreren Nebenproteinen. Bei den Hauptproteinen handelt es sich um 240 Hexone, die sich aus einem Trimer des Hexonproteins zusammensetzen. Sowie je einem Penton an den zwölf Eckpunkten, welches aus einem Pentamer des Pentonbasisproteins und dem Pentonbasis-assoziierten Protein besteht (*Abbildung 1*). An jedem Penton befindet sich je ein Trimer des Fiberproteins mit einer Knob

Domäne sowie einer lateralen Bindungsseite, die in der Lage ist mit zellulären Rezeptoren zu interagieren [San Martín, 2012]. Die Kapsid-assoziierten Proteine, VI, VIII auf der Innenseite und IX auf der Außenseite des Kapsids tragen u. a. zur Struktur und Stabilität des Kapsids bei [Ma and Hearing, 2011]. Einige Funktionen der Kapsidproteine sind aber bis heute nicht bekannt und müssen noch aufgeklärt werden. Das Kapsid umhüllt die lineare dsDNA mit einem Komplex der sogenannten Core-Proteine V, VII, Mu sowie das Terminale Protein (TP) und die Protease [Mangel and San Martín, 2014]. Das Protein VII beschützt dabei die virale DNA vor Schäden durch die zelluläre Antwort [Ismail et al., 2018]. Alle dreizehn Strukturproteine mit ihrer Lokalisation und Funktion sind in *Tabelle 2* aufgelistet.

**Tabelle 2** Strukturkomponenten der humanen Adenoviren. Die dreizehn Strukturproteine sind beschrieben mit Ihrer Hauptfunktion und Position [Hall et al., 2010, Ismail et al., 2018].

<b>Polypeptid</b>	<b>Funktion</b>	<b>Position</b>
II (Hexonprotein)	Hauptkomponente und Strukturgebung des Kapsids	Bestandteil des Ikosaeders
III (Pentonbasisprotein)	Beinhaltet ein RGD Motif, Bindungsstelle für die Interaktion mit zellulärem Intergrin	Kapsid-Eckpunkte
IV (Fiberprotein)	Erste Interaktion mit Wirtszelle	Bindet an den Pentonen
IIIa (Pentonbasis-assoziiertes Protein)	Stabilität der Eckpunkte, Bestandteil der Pentone	Unterseite des Pentonbasisproteins
VI	Protease-Kofaktor, Assembling, Endosomale Freisetzung	Innenseite der Hexone
VIII	Stabilisiert Hexon-Hexon-Interaktion	Innenseite der Hexone
IX	Stabilisiert das Kapsid	Außenseite des Kapsids
TP (Terminales Protein)	DNA-Replikation	5' Ende des Genoms
V	Verbindung zwischen Core und Kapsid	Core
VII	DNA-Kondensation	Core
Mu	DNA-Kondensation	Core
IVa2	Verpackung der DNA	Core
Protease	Spaltet die Präkursor – Proteine	Core

Die Proteine IVa2, L4 33K, L4 22K, E2 72K (auch bekannt als DBP, DNA-binding protein) und L1 55K sind bei der Eingliederung des Genoms ins vorgefertigte Kapsid beteiligt. Das Genom der humanen Adenoviren hat eine Länge von 26 bis 45 kbp, jeweils abhängig vom Serotyp [Ahi and Mittal, 2016; Ismail et al., 2018]. Neben der Kovalenten Bindung an jedem 5' Ende an das Terminale Protein ist das Genom durch eine ITR (Inverted Terminal Repeat) Sequenz flankiert. Weiterhin besitzen Adenoviren eine Sequenz für die Verpackung der DNA in das vorgefertigte Kapsid (packaging domain, PD) die eine AT-reiche Wiederholung beinhaltet und sich zwischen ITR und der E1A Transkriptions-Start-Seite befindet [Ahi and Mittal, 2016]. E1A wird als erstes exprimiert und gehört zu den frühen Transkriptionseinheiten zusammen mit E1B, E2A, E2B, E3 und E4 und findet vor Beginn der DNA-Replikation statt. Gefolgt durch die späten Transkriptionseinheiten L1-L5 (*Abbildung 2*) in der hauptsächlich Strukturproteine synthetisiert werden [H. Zhao et al., 2014].



**Abbildung 2 Transkriptions-Karte des HAdV-C5 Genoms.** Das virale Genom ist in dunkelgrau dargestellt. Die Early Region (E1, E2, E3 und E4) sowie die Late Region (L1, L2, L3, L4 und L5) sind hellgrau gezeichnet. Die Proteine, die durch diverse Regionen exprimiert werden, sind über und unter der Early/Late Region gekennzeichnet. Faktoren, die in der Verpackung des AdV involviert sind, werden mit weißem Hintergrund dargestellt. Die Abbildung wurde abgeändert nach Ahi and Mittal, 2016 und ist nicht maßstabsgetreu.

### 2.1.3 Replikationszyklus der humanen Adenoviren

Die Adsorption der humanen Adenoviren beginnt primär durch die Bindung der Fiber-Domäne an einen Oberflächenrezeptor der Wirtszelle (*Tabelle 3*). Bei vielen humanen Serotypen handelt es sich dabei um das Typ I Transmembran-Protein CAR (Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor). CAR ist an den Zell-Zell-Kontakten beteiligt und wird von verschiedenem Epithelgewebe von z.B. Lunge, Pankreas oder Herzmuskel exprimiert [Sobhy, 2017; Arnberg 2012].

**Tabelle 3** Liste der Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen, die an der Adsorption von humanen Adenoviren beteiligt sind [Sobhy, 2017; Arnberg 2012].

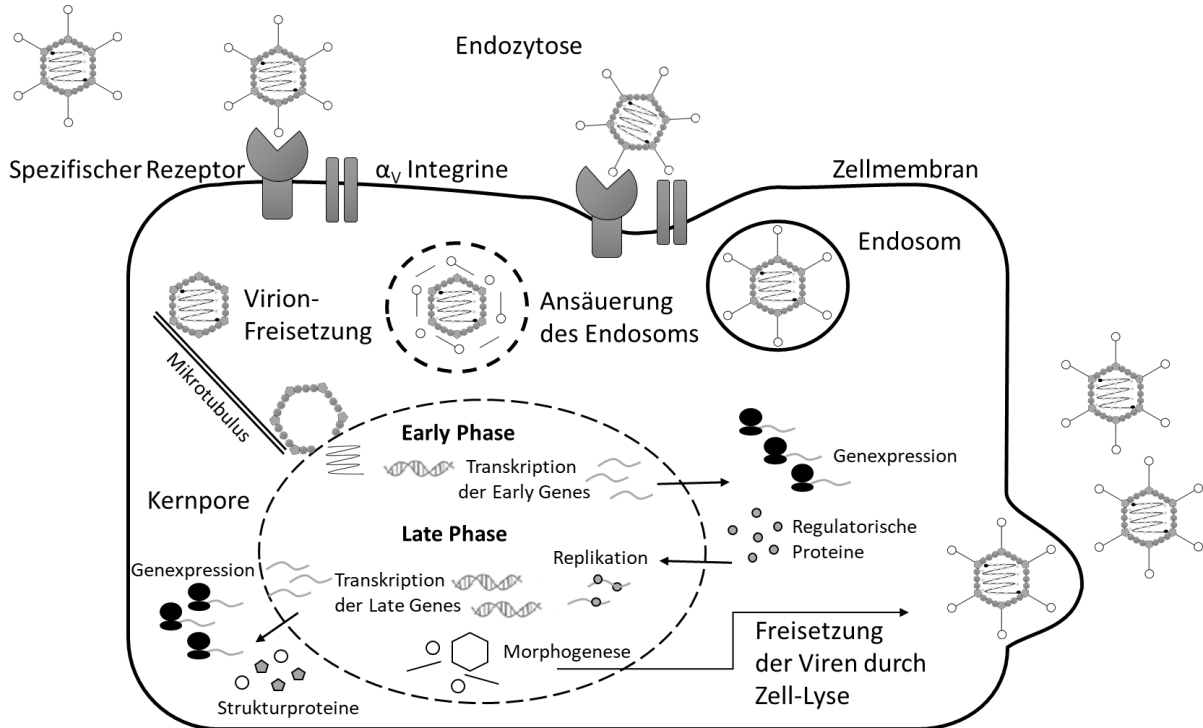
<b>Oberflächenrezeptor der Wirtszelle</b>	<b>Adenovirus-Serotyp</b>
CAR	Ad-12, 31, 2, 5, 9, 19a, 19p, 4 und 41
CD46	Ad-16, 21, 50, 11, 14, 34, 35, 19a und 37
CD80 und 86	Ad-3 und 7
DSG2	Ad-3, 7, 11 und 14
HSPG	Ad-2 und 5
Integrine	Ad-3, 35, 2, 5 und D60
MHC1- $\alpha$ 2	Ad-5
Sialinsäuren	Ad-8, 19a und 37
VCAM-1	Ad-5
GD1a Glykan	Ad-8, 19a and 37

Nach der ersten Interaktion können Adenoviren mittels Makropinozytose oder Clathrin-vermittelter Endozytose in die Wirtszelle eindringen. Dabei binden die Pentonbasisproteine mit dem flexiblen Loop, der RGD (Arginin, Glycin und Asparaginsäure) -Bindungsdomäne an Integrine der Wirtszelle ( $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_v\beta_1$ ). Eine Signalkaskade wird eingeleitet für die virale Internalisierung mittels Endozytose und Aktivierung von PI3K sowie durch eine Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts [Ismail et al., 2018, Wiethoff and Nemerow, 2016].

Im Endosom penetriert das virale VI-Kapsidprotein die Membran und induziert die Freisetzung der Adenoviren ins Cytoplasma. Dort werden sie entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert. Die DNA wird dann aus dem bereits degradierten viralen Partikel durch die Kernporen in den Zellkern transportiert [Lasswitz et al., 2018].

Im Zellkern angekommen, werden nach den regulatorischen Proteinen dann Strukturproteine synthetisiert. Mithilfe des L4 100K-Proteins können aus Peptid II Hexone gebildet werden. Zusammen mit den Pentonen und unter Einbezug der restlichen Kapsidproteine wird die leere Kapsidhülle aufgebaut. Die regulatorischen Proteine sind in der Lage, die virale DNA spezifisch zu erkennen und sie in das Kapsid einzubauen. Gleichzeitig werden dabei einige regulatorische Proteine freigesetzt. Vorläufer-Proteine werden geschnitten und ermöglichen so die

Ausreifung des viralen Partikels. Anschließend folgt die Freilassung der HAdV durch die Zell-Lyse (Abbildung 3).



**Abbildung 3 Infektionsweg und Replikation der Adenoviren.** Der adenovirale Replikationszyklus ist in zwei Phasen unterteilt, die Early Phase und die Late Phase. Die Early Phase exprimiert die regulatorischen Proteine, deren Funktion es ist, die weiteren viralen Gene zu aktivieren, den vorzeitigen Zelltod der infizierten Zelle zu verhindern sowie die Expression der Wirtsproteine für die DNA-Synthese zu modifizieren. In der zweiten Phase beginnt die Transkription der Late Virus-Gene, die Proteine für die Struktur und Reifung der Viruspartikel kodieren. Nach der Morphogenese wird das Virion durch die Zell-Lyse freigesetzt [Russel,2009]. Abbildung abgeändert und adaptiert nach Waye und Sing, 2010.

## **2.2 Infektion mit humanen Adenoviren**

### **2.2.1 Epidemiologie**

Infektionen mit Adenoviren sind weltweit verbreitet und tauchen endemisch auf. Mehr als 80 % der HAdV-Infektionen werden bei Kindern unter 4 Jahren diagnostiziert [Ison, 2006; Chang et al., 2008; Sandkovsky et al., 2014; Yeung et al., 2009]. Fünfzig % der Infektionen verlaufen asymptomatisch [Modrow, 2010]. Infektionen treten ganzjährig, ohne eine signifikante saisonale Variation auf, mit gelegentlich beobachteten steigenden Infektionen in den Herbst- und Wintermonaten [Lynch und Kajon, 2016; Bil-Lula et al. 2010].

### **2.2.2 Klinisches Erscheinungsbild**

Humane Adenoviren können je nach Spezies akute Gastroenteritis, Konjunktivitis, Keratitis, Zystitis, Rhinitis, Pharyngitis oder Meningitis verursachen (*Tabelle 1*). In den meisten Fällen ist die Infektion innerhalb von zwei Wochen selbst-limitierend und vermittelt eine typspezifische Immunität. Schwerwiegende Atemwegserkrankungen, wie *Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS)*, oder eine Ausbreitung der Infektion auf mehrere Organsystem tritt fast ausschließlich bei immunsupprimierten Patienten auf. Solche Infektionen können lebensbedrohlich sein, insbesondere bei pädiatrischen Patienten. [Radke und Cook 2018; Ison und Hayden, 2016; Lynch und Kajon, 2016].

Die Inkubationszeit beträgt 2 bis 14 Tage abhängig vom Serotyp und Übertragungsweg [Richman et al. 2017]. Eine HAdV-Infektion kann auch asymptomatisch eine Persistenz entwickeln, die sich jahrelang im lymphoiden Gewebe, renalem Parenchym oder anderem Gewebe befindet und durch Immunsuppression oder einen Immundefekt reaktiviert werden kann [Lynch und Kajon, 2016]. Persistente Infektionen werden überwiegend von HAdV-Spezies C verursacht. Die HAdV-Serotypen der Spezies C sind auch die häufigsten Infektionen im Kindesalter [Bil-Lula et al. 2010].

### **2.2.3 Übertragung**

Der Übertragungsweg der Adenoviren hängt vom Serotyp ab und kann durch direkten Kontakt erfolgen wie Tröpfcheninfektion, fäkal-orale Übertragung, infiziertes Gewebe, Blut und Bindehaut-Inokulation, oder indirekt durch Kontakt mit z.B. Kissen, ungenügend sterilisierte Geräte oder kontaminierte Waffen beim Militär [Ison und Hayden, 2016]. Infektionsquellen sind akut Erkrankte oder auch fluktuierend latent Erkrankte. Eine HAdV-Infektion kann bei gesunden Kindern oder Erwachsenen v. a. in überfüllten Umgebungen auftreten. Insbesondere sind Ausbrüche beim Militär beobachtet worden [Richman et al., 2017]. Adenoviren sind resistent gegen viele Desinfektionsmittel, wobei eine 95-prozentige Ethanol-Lösung effizient ist [Lynch und Kajon, 2016].

### **2.2.4 Adenovirus-Infektion bei pädiatrischen Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

In pädiatrischen Patienten, die einer HSZT unterzogen wurden, sind humane Adenoviren eine wichtige Ursache für Morbidität und Mortalität. Eine HAdV-Infektion bricht bei etwa 30 % der Patienten nach einer HSZT aus, mit einer Letalität von bis zu 83 % [Tischer et al., 2016]. Die Inzidenz von HAdV-Infektionen scheint bei pädiatrischen HSZT Empfängern höher zu sein als bei erwachsenen Patienten. In vielen Fällen wird angenommen, dass die Quelle der Infektion eine Persistenz im Darm-assoziierten, oder einem anderen lymphatischen Gewebe ist. Auch primäre Infektionen sind beschrieben [Radke und Cook 2018; Kosulin et al., 2016; Ison und Hayden, 2016]. Die meisten retrospektiven Studien haben gezeigt, dass sich der Ausbruch einer HAdV-Infektion hauptsächlich während der ersten 100 Tagen nach einer HSZT ereignet [Ison und Hayden, 2016]. Zu den Risikofaktoren für eine HAdV-Infektion zählen das Ausmaß der T-Zell-Depletion, die Gesamtintensität der Immunsuppression, die allogene Transplantation und die Exposition gegenüber Ganzkörperbestrahlung. Feuchtinger et al. (2005) konnte zeigen, dass HSZT-Patienten, die an einer HAdV-Infektion verstorben sind, keine HAdV-spezifischen T-Zellen aufweisen konnten. Eine geringe Lymphozytenzahl durch die immunsuppressive Behandlung oder eine verspätete T-Zell-Rekonstitution kann ein wichtiges Anzeichen für einen Nachweis einer Infektion sein [Chakrabarti et al., 2002; Bil-Lula et al., 2010]. Die prävalentesten Serotypen bei pädiatrischen Patienten nach einer HSZT sind Typ 31,



1, 2 und 5 der Spezies A und C [Radke und Cook 2018; Wy and Qasim, 2013]. Die Risikofaktoren sind junges Alter, Detektion einer HAdV-Infektion im Stuhl oder Nasopharynx, T-Zell-Depletion durch CD34<sup>+</sup> Selektion, der Gebrauch alternativer Spender oder die mangelnde Übereinstimmung der HLA-Gruppe der Spender, die Lymphopenie und die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-host disease (GVHD)) [Lee et al. 2017].

### **2.2.5 Labordiagnostik**

Eine optimale diagnostische Strategie hängt einerseits von der spezifischen Indikation ab. Andererseits können HAdV-Infektionen nur selten allein anhand klinischer Untersuchungen diagnostiziert werden. Obwohl die Therapiemöglichkeiten begrenzt sind, ist es für eine bestmögliche Behandlung wichtig, eine frühzeitige Diagnose zu stellen und eine Therapie vor einer extensiven Ausbreitung der Infektion zu beginnen. Eine akute HAdV-Erkrankung ist dann gegeben, wenn ein klinisches Syndrom mit einem positiven Befund aus der Kultur oder PCR vorhanden ist [Flomenberg et al., 1994; Ison und Hayden, 2016; Richman et al., 2017].

Adenoviren können aus Stuhlproben, Rachen- und Bindehautabstrichen, nasopharyngealen Aspiraten, Urin, Blut, Zerebrospinalflüssigkeit sowie aus Biopsieproben isoliert werden. Die optimale Probenart hängt sowohl vom klinischen Erscheinungsbild der Infektion als auch vom Serotyp ab. Jedoch ungeachtet der primären Infektionsstelle sind Stuhlkulturen häufig positiv in den ersten zwei Krankheitswochen. Eine hohe Viruslast in Stuhlproben kann einer Virämie mehrere Wochen vorausgehen. Es wird daher empfohlen, Patienten vor einer Transplantation auf HAdV zu testen, um eine bestmögliche Therapie abzustimmen. Weiterhin sollte eine dauerhafte Überwachung des peripheren Blutes bei immungeschwächten Patienten in Betracht gezogen werden [Ison und Hayden, 2016; Vere Hodge 2017; Richman et al., 2017].

Während einer akuten Infektion haben sich Kulturen der geeigneten Proben, als besonders ergiebig gezeigt. Da Adenoviren Spezies-spezifisch sind, funktioniert ihre Isolation am besten aus humanen Zellkulturen. Die beste Sensitivität erzielt man aus menschlichen embryonalen Nierenzellen. Jedoch werden aus Preisgründen oft etablierte Zelllinien wie A549, HeLa oder HEK 293 (Transformationsprodukt der menschlichen embryonalen Nierenzellen mit der AdV 5-DNA) verwendet. Um die Sensitivität zu erhöhen, wird empfohlen, mehrere Zelllinien simultan zu verwenden. Adenoviren verursachen charakteristische morphologische

Veränderungen der infizierten Zelle, den sogenannten zytopathischen Effekt (CPE), der oft in der Peripherie der Monoschicht beginnt. Die Zellen werden dabei runder und verlieren schließlich ihre Adhäsionsfähigkeit. Besonders in etablierten Zelllinien ist der CPE erst nach längerer Inkubationszeit zu beobachten, was oft bis zu 28 Tage dauern kann [Richman et al., 2017].

Ist ein CPE detektiert, kann die Identifikation der Viren durch immunologische Methoden wie Immunfluoreszenz, Polymerase-Kettenreaktion (PCR), enzymatische Immunsorptionsverfahren (EIA) oder Latex-Agglutinationstest bestätigt werden. Eine Detektion mit Fluoreszenz-Antikörpern und Immunhistochemie kann sowohl als direkte Diagnose in Proben des respiratorischen Traktes oder in anderen Gewebeproben, als auch als Bestätigungstest der viralen Isolate aus der Zellkultur verwendet werden.

Weitgehend etabliert hat sich auch die konventionelle PCR und die quantitative real-time PCR als diagnostische Methode. Dies wird ermöglicht durch die transaktivierenden Regionen der E1A-Gene und der N-Terminal-Region des Hexons, die zwischen vielen HAdV-Serotypen gut konserviert sind. Bei einer möglichen HAdV-Infektion sollten deswegen auch Blutproben auf die quantitative Viruslast gemessen werden und die Infektionsentwicklung regelmäßig überwacht werden [Claas et al., 2005; Bil-Lula et al. 2010; Ison 2006]. Dies erlaubt auch die Bestimmung einer Prognose, da höhere Viruslast mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Mortalität assoziiert ist.

Die neuere Shell-Vial-Kultur ermöglicht eine schnellere HAdV-Detektion aus klinischen Proben. Dabei wird eine Monoschicht einer Zelllinie auf einem Deckglas angezüchtet und das Virus mittels Zentrifugation eingimpft. Die Deckgläser werden für ein bis zwei Tage inkubiert und mit monoklonalen Antikörpern gegen das adenovirale Hexonprotein gefärbt [Rabalais et al., 1992]. Obwohl die Methode eine frühe Detektion einer HAdV-Infektion bietet, scheint sie eine etwa 50 % geringere Sensitivität als konventionelle Methoden aufzuweisen [van Doornum und Jong, 1998].

## 2.3 Immunsystem und T Lymphozyten

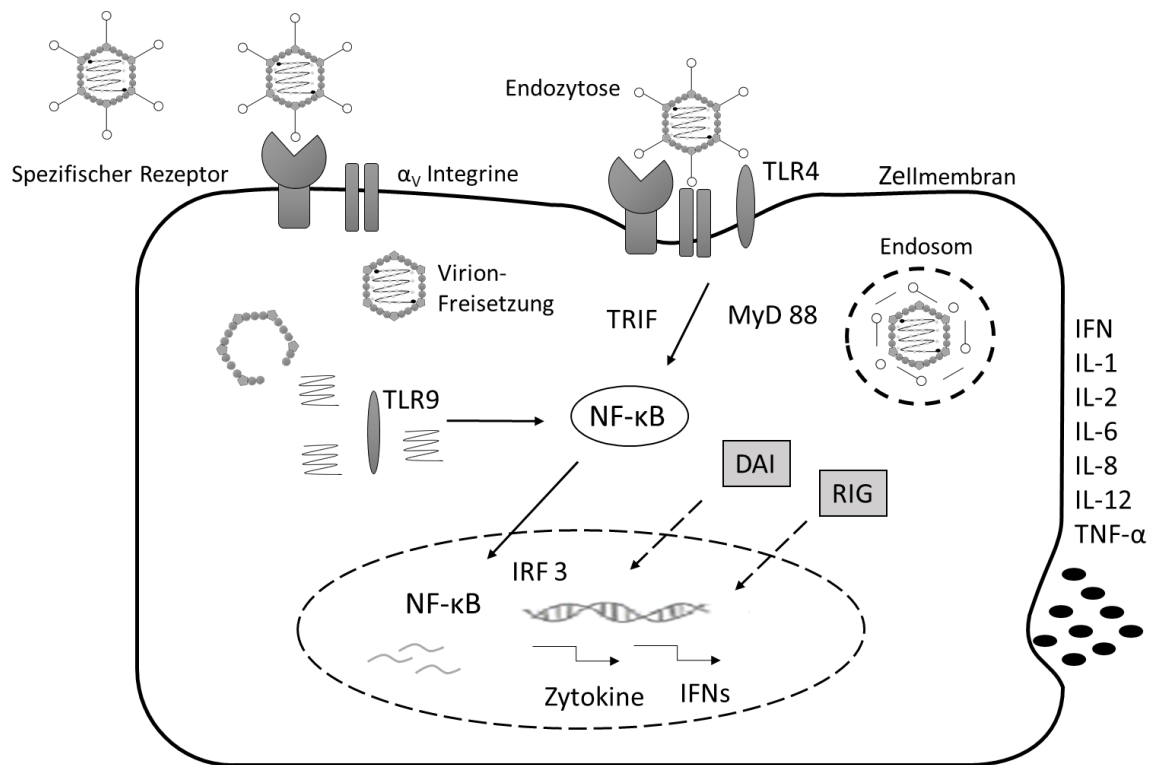
### 2.3.1 Immunantwort auf die Adenovirus-Infektion

Die Immunantwort bei einer HAdV-Infektion ist normalerweise sehr effektiv und sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort sind involviert. Die angeborene Immunantwort steuert die unmittelbare Reaktion des Wirts auf eine Infektion. Sie hat sich evolutionär entwickelt, da so zahlreiche Krankheitserreger schnell erkannt werden. Dadurch ist die angeborene Immunität nicht antigenspezifisch und führt auch nicht zu einem immunologischen Gedächtnis. Zur angeborenen Immunantwort gehören mehrere Komponenten, die unterteilt werden können in die mechanische, chemische und zelluläre Abwehr [Russell 2009; Gregory et al., 2011].

Die mechanische Barriere, wie z. B. die Haut, das Endothel des vaskulären Systems, die Bluthirnschranke oder der Selbstreinigungsmechanismus der Bronchien (Mukoziliäre Clearance) wird im Allgemeinen von Partikeln einer Größe von weniger als 5  $\mu\text{m}$  umgangen, sodass zusätzlich Abwehrmechanismen benötigt werden [Gregory et al., 2011; Aldhamen und Amalfitano, 2016]. Zur chemischen Abwehr gehören humane antimikrobielle Peptide. Eine der am häufigsten exprimierten Klassen dieser Peptide sind die kationischen  $\alpha$ -Defensine. In Zellversuchen konnten inhibitorische Effekte in der Replikation von manchen HAdV-Serotypen gezeigt werden. Dafür binden die  $\alpha$ -Defensine an die nicht-behüllten HAdV und machen sie resistenter gegen mechanische Kräfte, thermale Denaturierung und Proteolyse. Diese Stabilisierung blockiert das virale Kapsid VI-Protein und verhindert die Freisetzung des HAdV aus dem Endosom und damit auch die Interaktion zwischen den viralen Proteinen und den Faktoren in der Zelle, die benötigt werden für die virale Replikation [Holly et al. 2017; Fields et al. 2007; Gregory et al., 2011].

Eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort spielt ein Netzwerk verschiedener Zelltypen, einschließlich dendritischer Zellen (DCs), Natürlicher Killerzellen (NK), Monozyten/Makrophagen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie Neutrophile Granulozyten [Suzuki und Rooney 2012]. Diese Zellen exprimierten eine Vielzahl von Immunrezeptoren, den PRRs (Pattern-Recognition Receptors), die in der Lage sind Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) zu erkennen, und damit Selbst- von Fremddantigenen unterscheiden [Jooss und Chirmule 2003].

Die PRRs können bei der Bindung an PAMPs angeborene Immunsignalwege aktivieren, wie der MAP-Kinase, PI3K, NF- $\kappa$ B, der Interferonregulationsfaktoren (IRFs) 3 und 7 und / oder AP -1,56 [Russell, 2009; Aldhamen und Amalfitano, 2016]. Die Aktivierung dieser angeborenen Moleküle und Transkriptionsfaktoren koordiniert die Transkription mehrerer Gene, einschließlich solcher für proinflammatorische Zytokine und Chemokine (*Abbildung 4*).



**Abbildung 4 Zelluläre Antwort der angeborenen Immunantwort durch die Aktivierung der PRRs.** HAdV bindet an Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Die Bindungsdomäne interagiert u. A. mit Integrinen, Toll-like-Rezeptoren (TLR) und CAR. Nach der Internalisierung durch die Bindung an Wirtsrezeptoren wird die virale DNA von TLR9, *DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors* (DAI) und NOD-like Rezeptoren erkannt. Die virale Ribonukleinsäure (RNA) löst *retinoic acid inducible gene* (RIG-I) aus. Diese Interaktion überträgt Signale über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, und führt damit zur Produktion von Interleukinen und Zytokinen. *Abbildung abgeändert und adaptiert von Suzuki und Rooney 2012.*

Professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs), wie Makrophagen und DCs, befinden sich in den verschiedenen Geweben des Körpers in einem unreifen Zustand. Makrophagen sind der erste Zelltyp, der infiziert wird und Makrophagen zeigen auch die ersten Reaktionen bei der raschen Rekrutierung der Immunantwort [Suzuki und Rooney 2012; Kawasaki und Kawai 2014; Greber und Flatt 2019]. Die Wechselwirkung zwischen der RGD-Bindungsdomäne und

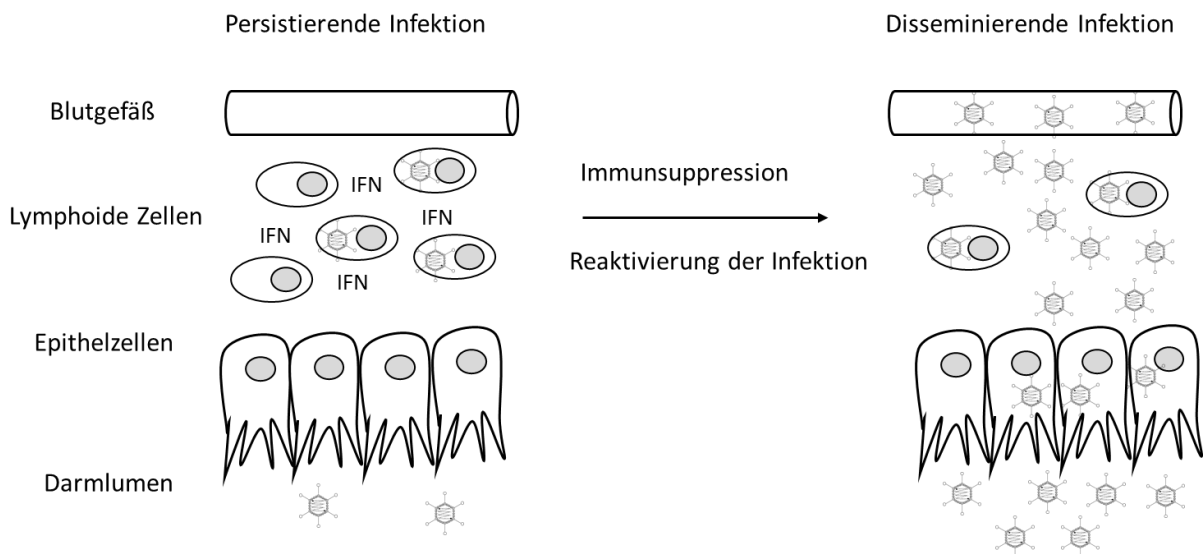
den zellulären Integrinen aktiviert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und somit auch einen autokrin abhängigen TNF $\alpha$ -Mechanismus, der zur DC-Reifung und -Funktion beiträgt [Gregory et al., 2011; Aldhamen und Amalfitano, 2016]. Unreife DCs exprimieren sehr geringe Mengen an Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC), haben aber ein hohes Maß an phagozytischer Aktivität, was eine effiziente Aufnahme von Antigenen ermöglicht [Jooss und Chirmule 2003]. Die Aktivierung und anschließende Antigenpräsentation durch DCs ist ein zentraler Schritt bei der Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunität, der zur Aktivierung/Differenzierung und Expansion von T-Zellen führt.

Die adaptive Immunantwort wird durch die entzündliche Umgebung konditioniert, die durch die angeborene Immunabwehr geschaffen wird. Sie beruht auf der Aktivierung und Expansion antigenspezifischer B- und T-Zellen und erzeugt ein immunologisches Gedächtnis. Während CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lage sind, virusinfizierte Zellen zu lysieren, sorgen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten für eine Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der B-Zellen, die zur Antikörperbildung führen. T-Helferzellen (Th-Zellen) sind auch entscheidend für die Generierung von Gedächtnisantworten [Shirley et al., 2020].

### **2.3.2 Virale Mechanismen der Persistenz**

Nach einer primär selbstlimitierenden Infektion kann HAdV trotzdem zu einer persistierenden Infektion in lymphoiden Geweben führen. Diese Infektion verbleibt in ihrem subklinischen Zustand bei einer intakten Immunantwort, kann aber bei einer Immunsuppression des Patienten reaktiviert werden. Eine Immunsuppression führt zum Verlust der Interferonaktivität, dabei sind Typ I Interferone (IFNs) und Interferon- $\gamma$  in der Lage, die virale Replikation zu unterdrücken. IFNs sind weit verbreitete Zytokine und haben eine wichtige Rolle sowohl bei der angeborenen als auch bei der adaptiven Immunität (*Abbildung 5*). Die IFN-induzierte Unterdrückung der HAdV-Replikation wird verursacht durch eine reduzierte HAdV-E1A-Genexpression, welche Produkte des viralen Transkriptionsaktivators und der Kontrolle des Zellzyklus kodiert. Die Mechanismen der E1A-Repression durch IFNs umfassen die Blockade der Rekrutierung des zellulären GABP-Transkriptionsfaktors für den E1A-Enhancer und die erhöhte Bindung und Regulation des Enhancers durch Proteine der

zellulären E2F / Rb-Familie. Diese IFN-induzierte Unterdrückung der E1A-Aktivität in infizierten Zellen ist mit der Etablierung eines persistent infizierten Zustands verbunden, und wenn IFN aus infizierten Zellen entfernt wird, wird die Virusinfektion reaktiviert und die Zellen entwickeln sich zu einem vollständig lytischen, virusproduzierenden Zustand [Radke und Cook 2018; Zheng et al. 2016; Kosulin et al., 2016].

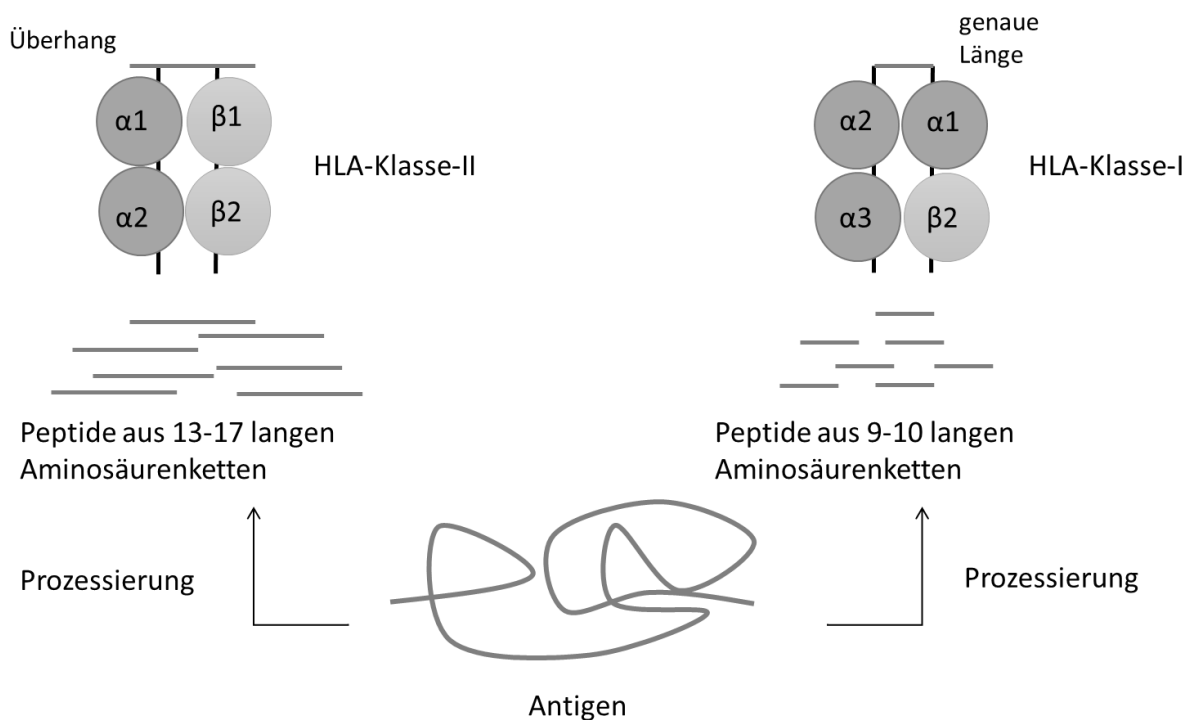


**Abbildung 5 HAdV-Persistenz und Reaktivierung im Darm.** Während der initialen Adenovirus-Infektion wird ausreichend IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  produziert, um einen Zustand der viralen Persistenz zu erzeugen. Adenoviren befinden sich vor allem in lymphoiden Zellen im Darm, sind aber in hochpermeablen Epithelzellen weitgehend abwesend. Chemotherapie-induzierte Immunsuppression dezimiert IFN-produzierende Lymphoidzellen und unterdrückt die IFN-Expression in den verbleibenden Wirtszellen. Die Unterdrückung der IFN-Antwort des Wirts ermöglicht eine verstärkte Expression des viralen E1A-Gens, was wiederum zu einer verstärkten viralen Replikation in lymphoiden Zellen und Epithelzellen führt, die große Mengen des Virus produzieren können. Diese virale Amplifikation kann zu einer erhöhten fäkalen Virusausscheidung, einer verstärkten Gewebeinvasion und einer blutbasierten Verbreitung der Infektion führen [Radke und Cook 2018].

### 2.3.3 Humanes Leukozytenantigen-System

Die Humane Leukozytenantigene (HLA) dienen der Bestimmung der Histokompatibilität und sind die humane Form der MHC-Moleküle, dabei handelt es sich um Glykoproteine, die in der Zellmembran verankert sind und in der Lage sind zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Dadurch spielen sie einerseits eine Rolle bei der Immunisierung gegen körperfremde Strukturen und andererseits auch als Alloantigene gegen Transfusionen, Schwangerschaften und Transplantation [Turner, 2004; Klein und Sato 2000].

Der HLA-Genkomplex auf dem Chromosom 6 enthält über 200 Gene, von denen mehr als 40 für Leukozytenantigene kodieren [Klein und Sato 2000]. Die Gene des  $\beta$ -Mikroglobulins des Klasse I Moleküls befinden sich auf dem Chromosom 15. Die HLA-Gene, die an der Immunantwort beteiligt sind, lassen sich in Klasse I und II einteilen, die topographisch und funktionell unterschiedlich sind. Zu den Klasse-I-Antigenen gehören HLA-A, HLA-B, HLA-C und HLA-E, HLA-F sowie HLA-G. Zu den Klasse-II-Antigenen gehören HLA-DM, -DO, -DP, -DQ, -DR. Die Klasse-I-Antigene bestehen aus einer schweren  $\alpha$ -Polypeptidkette und  $\beta$ -Mikroglobulin. Die  $\alpha$ -Polypeptidkette besitzt fünf Domänen zwei Peptidbindungsdomänen, eine Immunoglobulin-like Domäne, die transmembrane Region und einen zytoplasmatischen Schwanz [Klein und Sato 2000].



**Abbildung 6 Präsentation der Peptide durch die HLA-Moleküle.** HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren Peptide die aus endogen exprimierten Proteinen (Antigene) proteolytisch prozessiert werden. Bei der HLA-Klasse-II-Epitop-Präsentation werden Proteine prozessiert die in Endosomen abgebaut werden. Längere Klasse-II-Peptide überhängen typischerweise die offenen Enden der HLA-Klasse-II-Bindungsfurche, während kürzere Klasse-I-Peptide aufgrund des geschlossenen Endes der HLA-Klasse-I-Bindungsfurche in ihrer Größe eingeschränkt sind. Abbildung abgeändert und adaptiert von Sidney et al., 2020.

Die HLA-Klasse-I-Moleküle haben ein breites Funktionsspektrum wie die Antigenpräsentation, Regulierung von NK-Zellen in der angeborenen Abwehr und Regulierung des Eisenstoffwechsels und werden von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert [Gwozdowicz et al., 2019]. Die HLA-Klasse-I-Moleküle sind in der Lage Antigenpeptide aus dem Zytosol zu binden und auf der Zelloberfläche den zytotoxischen T-Zellen zu präsentieren (*Abbildung 6*). Bei der Antigenpräsentation werden gewöhnlich um die neun bis zehn Aminosäure langen Antigenpeptide von den T-Zell-Rezeptoren erkannt [Rammensee 1995].

Jedes Individuum hat einen einzigartigen Satz an HLA-Genen, was zu einer enormen Anzahl an möglichen Kombinationen innerhalb bestimmter Populationen führt mit einer damit verbundenen HLA-Diversität und einem großen Potenzial der Antigenpräsentation [Goldberg und Rizzo 2015].

#### **2.3.4 T-Lymphozyten**

T-Lymphozyten sind Mediatoren der zellulären Immunität. Sie besitzen hochvariable TCRs, die ausgewählt werden, um zwischen körperfremden Antigenproteinen zu unterscheiden, die von den HLA-Klasse-I und Klasse-II präsentiert werden. Der TCR ist ein Heterodimer aus zwei transmembraner Proteine und besteht entweder aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten oder selteneren, weniger variablen Form den  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten [Chien und Königshofer 2007]. T-Lymphozyten mit TCRs aus den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten exprimieren entweder CD4 oder CD8 auf der Zelloberfläche. Dabei handelt es sich um Korezeptoren die eine Erkennung der HLA-Klasse-I oder Klasse-II Molekülen vermitteln [Bierer et al., 1989]. Beide Ketten des  $\alpha$ : $\beta$  Rezeptors bestehen aus einer kurzen zytoplasmischen Domänen, einer transmembranen Helix und zwei Immunoglobulin-like Domänen. Die distale Immunoglobulin-like Domäne jeder Kette enthält drei ( $\alpha$ ) oder vier ( $\beta$ ) hypervariable Loops, die sich zwischen individuellen Zellen unterscheiden und die Spezifität der Antigenproteine und HLA der Rezeptoren definieren. Die Signalübertragung durch den T-Zell-Rezeptor wird durch den CD3-Komplex vermittelt. Weiterhin sind für eine effiziente Rezeptorsignalisierung für die meisten Liganden auch die Korezeptoren CD4 oder CD8 notwendig. Jede T-Zelle exprimiert eins der Moleküle, abhängig von der HLA Spezifität des Rezeptors. Die zytotoxischen T-Lymphozyten exprimieren CD8 und erkennen das



HLA-Klasse-I-Molekül, ihre Aufgabe besteht in der Erkennung körperfremder Antigenproteinen und die Beseitigung der Zellen, die sie präsentieren.

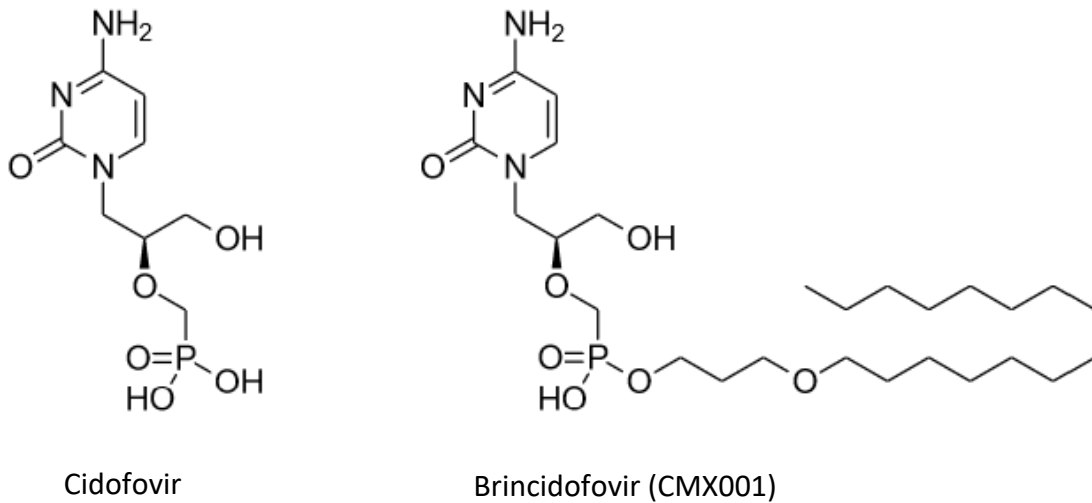
## **2.4 Therapie einer Adenovirus-Infektion**

### **2.4.1 Cidofovir**

Für adenovirale Infektionen gibt es nur beschränkte Behandlungsmöglichkeiten, bis heute existieren noch keine hochwirksame Virostatika. Als wirksam hat sich Cidofovir erwiesen, allerdings hat es eine geringe Bioverfügbarkeit und gilt als nephrotoxisch. Ungefähr 90 % des Cidofovirs werden innerhalb von 24 Stunden unverändert im Urin ausgeschieden [Lee et al. 2017]. Cidofovir wird von proximalen tubulären Zellen durch organische Anionentransporter schnell aufgenommen, was zu hohen intrazellulären Wirkstoffkonzentrationen und schlussendlich zur tubulären Nekrose führen kann [Lee et al. 2017]. Cidofovir ist ein Nucleotidanalogue des Cytosins welches selektiv die virale DNA-Polymerase inhibiert (*Abbildung 7*). Durch die kompetitive Inkorporation des aktiven Metabolit Cidofovir-diphosphat in der viralen DNA-Kette wird die Synthese und Replikation unterbrochen [Khanal et al, 2018].

### **2.4.2 Brincidofovir (CMX001)**

Brincidofovir (Synonym: CMX001), (3-hexadecyloxy-1-propanol-cidofovir) ist ein Derivat von Cidofovir und hat ein besseres Sicherheitsprofil, mit geringeren Nieren und Knochenmark Toxizität, jedoch sind die vorhandenen Daten bei immungeschwächten Patienten begrenzt (*Abbildung 6*). Bei Brincidofovir handelt sich um ein orales Prodrug welches um ein Lipid verändert wurde und erst in der Zelle abgespaltet und zum aktiven Wirkstoff verstoffwechselt wird, und führt somit zu einer besseren oralen Bioverfügbarkeit. Allerdings kann die orale Einnahme zu gastrointestinalen Nebenwirkungen führen, die mit einer Intravenösen Einnahme verhindert werden können. Obwohl Brincidofovir vorteilhafter erscheint als Cidofovir, sind auf die langfristige Sicht bessere Behandlungsmöglichkeiten erforderlich [Lee et al. 2017; Richman et al., 2017].



**Abbildung 7** Strukturformel von Cidofovir (links) und Brincidofovir (rechts).

### 2.4.3 Adoptiver T-Zell-Transfer

Ein vielversprechender Ansatz ist die Behandlung mit dem adoptiven T-Zell-Transfer. Gesunde seropositive Personen haben zirkulierende HAdV-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Bereich von ca. 1 % der gesamten T-Zellpopulation, die eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle latenter HAdV-Infektionen spielen. Es hat sich gezeigt, dass die Kontrolle der Virämie mit dem Nachweis steigender spezifischer HAdV-zytotoxischer T-Zellen korreliert [Vere Hodge 2017; Ison und Hayden, 2016]. HAdV-spezifische-T-Zellen können zuverlässig produziert und mit einem geringen Risiko für GVHD in HAdV-infizierte Patienten transferiert werden. Die oben genannte Literatur konnte zeigen, dass beim T-Zell-Transfer nicht die Quantität, sondern die Qualität der Zellen von Bedeutung ist. Ein möglicher Ansatz zur Gewinnung Epitop-spezifischer-T-Zellen ist mittels Peptid-gebundenen HLA-Multimeren. Durch die Behandlung mit dem adoptiven T-Zell-Transfer hatten die meisten Patienten eine komplette oder partielle Immunantwort auf die HAdV-Infektion entwickelt. Der adoptive T-Zell-Transfer ist immer noch experimentell, hat aber bereits vielversprechende erste Ergebnisse geliefert und wird derzeit in klinischen Phase III Studien untersucht, z. B. von Prof. T. Feuchtinger [Richman et al., 2017; Lee et al. 2017; Feuchtinger et al. 2004].

## 2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Humane Adenoviren verursachen bei gesunden Menschen in der Regel eine selbstlimitierende Infektion. Bei pädiatrischen Patienten können jedoch Infektionen mit HAdV eine Persistenz ausgebildet und bei einer Immunsuppression wieder reaktiviert werden [Tischer et al., 2016]. Insbesondere durch die Immunsuppression nach der HSZT kann eine reaktivierte oder aber auch eine neu erworbene akute Infektion zu einer lebensbedrohlichen Situation führen [Radke und Cook 2018; Ison und Hayden, 2016; Lynch und Kajon, 2016]. Momentan existieren keine hochwirksame Virostatika gegen Adenovirus-Infektionen, behandelt wird oft mit Cidovovir oder Brincidovovir [Khanal et al, 2018]. Beide Virostatika können selektiv die virale DNA-Polymerase inhibieren, jedoch nicht HAdV eliminieren. Eine spezifische T-Zell Antwort ist besonders wirksam bei Adenovirus-Infektionen und wirkt sich deswegen positiv auf die Überlebenschancen des Patienten aus [Feuchtinger et al., 2005]

Eine effektive und nicht-toxische therapeutische Strategie bietet der adoptive T-Zell-Transfer. Mithilfe von Peptid-gebundenen-Streptameren ist es möglich spezifische T-Zellen für eine Spenderlymphozyten-Transfusion zu detektieren und isolieren. Im klinischen Modell konnte eine schützende Wirkung nach einem adoptiven T-Zell Transfer nachgewiesen werden [Feucht et al., 2015; Günther et al. 2015]. Die spezifischen T-Zellen wurden dabei mithilfe des LTDLGQNLly-Peptid epitops aus den Spenderlymphozyten selektiert. Weitere Peptidepitope wurden beschrieben für LLDQLIEEV mit der Restriktion HLA-A\*02:01, FRKDVNMVL mit der Restriktion HLA-C\*07:02, sowie TYFSLNKF mit der Restriktion HLA-A\*24:01. Beide sind abgeleitet aus dem Hexon-Protein und wurden bereits in präklinischen Studien untersucht. Um einer möglichst breiten Bevölkerungsgruppe eine Spenderlymphozyten-Transfusionstherapie zu ermöglichen, ist eine Definition von mehreren Peptidepitopen diverser HLA-Restriktionen notwendig. Das Ziel dieser Arbeit war die Selektion möglicher Epitopeptide mittels vorhandener Online-Plattformen sowie ein Screening dieser Peptide auf ihre Immunogenität mittels der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung. Weiterhin stellte sich die Frage, ob Antigenproteine intrazellulär natürlich prozessiert werden und von antigenpräsentierenden Zellen als gesuchte Peptidepitope von HLA-I-Molekülen präsentiert werden.

Neue Möglichkeiten für die Anwendung eines adoptiven T-Zell-Transfers liefert die Transduktion körpereigener T-Zellen mit einem spezifischen TCR. Hierfür werden aus Adenovirus-spezifischen T-Zellen die gewünschten TCRs selektiert und in Spender-

lymphozyten transduziert. Die Zielsetzung war es, präklinisch zu ermitteln, ob TCR-transduzierte T-Zellen auch funktionsfähig sind und in der Lage sind, eine Ausbreitung der Adenovirus-Infektion zu inhibieren. Anhand einer hier neu beschriebenen Methode, des *Adenovirus Dissemination Assay* konnte dieser Frage nachgegangen werden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Vorhersage von T-Zell-Epitopen mittels Online-Plattformen**

Die Vorhersage der Bindung von Peptiden der HLA-Klasse I erfolgte mittels „*artificial neural networks* (ANNs)“. Hierfür wurde die Software der Online-Plattformen NetMHC™ 4.0 und NetMHCstab™ 1.0 verwendet. Dabei kann NetMHCstab™ die HLA Bindungs-Stabilität (mit einem Schwellenwert 6 h) und NetMHC™ die Bindungs-Affinität (mit einem Schwellenwert 500 nM) von Peptiden mit einer empfohlenen Länge von 9 bis 10 Aminosäuren vorhersagen [Nielsen et al., 2003]. Für die Vorhersage für das Humane Adenovirus Serotyp 2 wurden die Aminosäuren-Sequenzen von NCBI verwendet (NC\_001405.1).

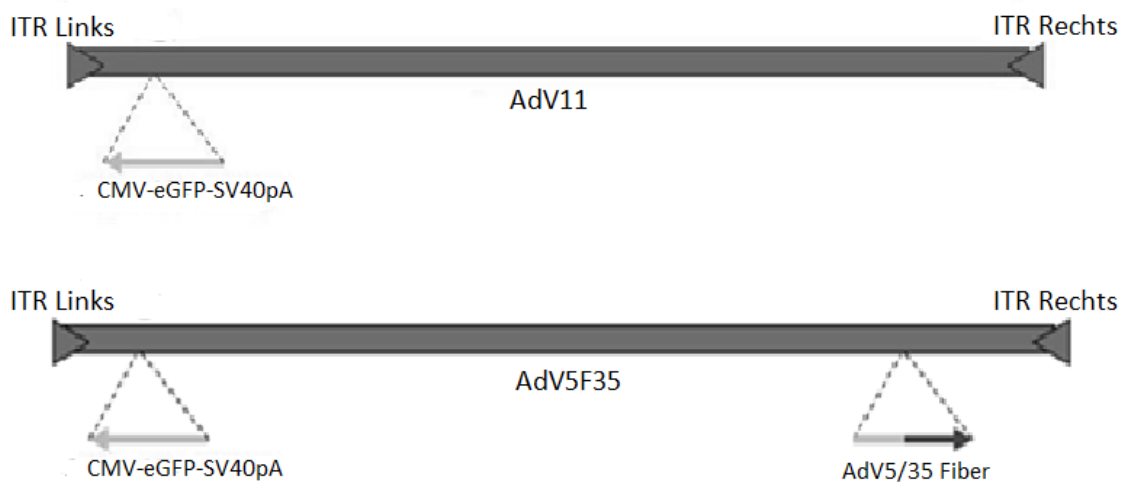
### **3.2 Verwendeter Adenovirus-Stamm**

Adenovirus 11 (AdV11pGFP) ist ein replikations-kompetentes Virus mit einer GFP-Expressionskassette, die sich upstream in der E1A-Region befindet. Diese wurde bereits von Mei et al., 2016 beschrieben. Das replikations-kompetente Adenovirus 5 (AdV5F35GFP) beinhaltet zusätzlich das Fiber eines Adenovirus 35, beschrieben von Leen et al., 2004 und wurde generiert durch die Firma O.D.260 Inc. (Boise, ID). Alle Virusisolate wurden in A549-Lungenepithel-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Elfriede Mikeler, Virologie, Universitätsklinikum Tübingen) produziert und besitzen einen vergleichbaren Titer (*Abbildung 8*).

### **3.3 Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

Buffy-Coats mit der Angabe der HLA-Typisierung wurden von der Abteilung für Transfusionsmedizin, Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Der Inhalt eines Buffy-Coats von etwa 20 ml wurde 1:3 mit DPBS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) verdünnt. Das verdünnte Blut wurde vorsichtig auf eine 15 ml Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) -Schicht pipettiert und für 27 min bei Raumtemperatur (RT) und 790 x g, ohne Bremse und Beschleunigung zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bilden PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) eine Schicht zwischen der oberen Plasma

Phase und dem Trennmedium (Ficoll-Paque) sowie einem Pellet aus Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten am unteren Ende des Falcon-Röhrchen. Die PBMCs wurden abgenommen und zwei Mal mit DPBS für 5 min bei 500 x g gewaschen. Ein Teil der PBMCs wurde in mehreren Kryoröhrchen und Einfriermedium (90 % FKS und 10 % DMSO) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA und Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bei -80°C gelagert, die andere Hälfte für weitere Versuche kultiviert.



**Abbildung 8 Adenovirus:** AdV11pGFP und AdV5F35GFP sind replikations-kompetente Viren mit einer GFP Expressionskassette, die sich in der upstream E1A-Region befindet [Mei et al., 2016]. AdV5F35GFP beinhaltet zusätzlich das Fiber eines Adenovirus 35 [Leen et al., 2004] und wurde generiert von der Firma O.D.260 Inc. (Boise, ID).

### 3.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0.1 mm. Die Zählkammer wurde befeuchtet und das Deckglas befestigt bis die Newtonsche Ringe zu sehen waren. Danach wurden 10 µl der Zellsuspension unter das Deckglas pipettiert. Alle vier Eck-Quadrate wurden ausgezählt, der Durchschnitt gebildet und mit  $1 \times 10^4$  pro ml multipliziert.

### **3.5 Expansion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

PBMCs wurden mit der Zellzahl von  $4 \times 10^6$  pro ml in DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) plus Supplements (10 % FKS und 1 % Penizillin/Streptomycin) und 4 µg/ml des relevanten Peptids (GeneCust, Dudelange, Luxemburg) ausgesät. Für die Kontrolle wurden die PBMCs ohne die Zugabe eines Peptids kultiviert und als „nicht-stimulierte Zellen“ bezeichnet. Nach 24 Stunden, am Tag 4, 7, und 10 erfolgte die Zugabe von Interleukin-2 (2 ng/ml, PeproTech, Hamburg, Deutschland) sowie ein Mediumwechsel. Die Dauer der Expansion betrug 12 Tage. Anstelle der Peptidzugabe wurden PBMCs auch mit AdV5F35GFP oder AdV11pGFP (MOI 0,1) infiziert und wie oben beschrieben für 12 Tage kultiviert.

### **3.6 Enzyme Linked Immuno Spot (ELISPOT) Assay**

Human IFN-γ ELISPOT<sup>Plus</sup> wurde nach Herstelleranleitung ausgeführt (Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden). Die bereits vorbeschichteten Näpfe (IFN-γ Antikörper 1-D1K) einer 96-Napf-Platte wurden vier Mal mit 250 µl/Napf DPBS gewaschen und für mindestens 30 Minuten mit DEMEM Medium bei RT beschichtet. Expandierte PBMCs wurden ausgezählt und in Duplikaten von jeweils 250 000 Zellen/Napf ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> sowie unter Vermeidung von Stößen, wurden die PBMCs entfernt und die Näpfe 5-mal mit 200 µl/Napf DPBS gewaschen. Nach einer Inkubation mit dem verdünnten biotinierten Antikörper (1 µg/ml Antikörper in DPBS mit 0,5 % FKS) für 2 Stunden bei RT und 5 weiteren Waschschritten erfolgte die Zugabe von Streptavidin-ALP (1:1000) für eine weitere Stunde, bei RT. Nach den wiederholten Waschschritten wurde die filtrierte (0,45 µm Filter) Substratlösung hinzugegen. Nach etwa 20 Minuten war die Farbentwicklung beendet und konnte durch das Waschen mit Leitungswasser gestoppt werden. Die trockenen Platten wurden bei RT im Dunkeln gelagert. Die Auswertung erfolgte mittels dem ELISPOT- Auslesegerät *ImmunoSpot Series 6 ELISPOT Reader™* (CTL, Bonn, Deutschland). Bei einer zu hohen IFN-γ Ausschüttung war die Auszählung nur begrenzt möglich und somit wurde die Spotanzahl auf 1000 gesetzt. Näpfe mit einer Spotanzahl < 25 wurden als negativ bewertet. Ebenfalls wurden alle Näpfe, deren Spotanzahl geringer war als die doppelte Spotanzahl der Kontrolle, als negativ eingestuft. Messungen mit einer Kontrolle höher als 250 Spots/Napf wurden als nicht zuverlässig eingestuft und aus der Auswertung ausgenommen.

Die Rohdaten wurden mithilfe von der Software GraphPad Prism 8™ (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) ausgewertet.

### **3.7 Streptamer- /Dextramerfärbung und Durchflusszytometrie**

Die Streptamer- sowie Dextramerfärbung wurde nach Herstelleranleitung ausgeführt. Für die Peptid-HLA Streptamerfärbung (IBA, Göttingen, Deutschland) wurden 0,8 µl Streptamer mit 1 µl Streptactin-phycoerythrin sowie 8,2 µl IS-Puffer (0,5 % BSA in DPBS) (Serva, Heidelberg, Deutschland) für 45 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und zum Zellpellet mit  $1 \times 10^6$  Zellen hinzu pipettiert. Nach einer Inkubation von 25 Minuten im Dunkeln, bei 4°C wurden 5 µl Mouse anti-Human CD8-allophycocyanin (BDBiosciences, Heidelberg, Deutschland) für weitere 20 Minuten hinzugefügt.

Für die Dextramerfärbung wurden  $1-3 \times 10^6$  PBMCs mit 2 ml Puffer (DPBS mit 5 % FKS) gewaschen (300 x g), in 50 µl Puffer resuspendiert und mit 5 µl Dextramer für 10 min, bei RT, im Dunkeln inkubiert. Für weitere 20 Minuten wurden die Oberflächen-Moleküle mit anti-CD 8 bei 4°C im Dunkeln gefärbt.

Nach der Färbung wurden die Zellen mit 2 ml der jeweiligen Puffer gewaschen und in 350 µl DPBS resuspendiert. Die Durchflusszytometrie wurde ausgeführt mit dem FACS Calibur™ (BDBiosciences, Heidelberg, Deutschland) und mithilfe der CellQuest™ Software analysiert. Lebendige Zellen wurden mithilfe des Gatings der FSC/SSC (forward scatter/side scatter) Profile ausgewählt.

### **3.8 Klonierung der spezifischen T-Zell-Rezeptoren**

Die Klonierung spezifischer TCRs wurde an der Technischen Universität München am Institut für Medizinische Mikrobiologie von Thomas Müller in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dirk H. Busch ausgeführt. Hierfür wurden mithilfe der TCR-SCAN-RACE-PCR spezifische TCRs identifiziert, in retroviralen Vektoren kloniert und in Jurkat 76 sowie PBMCs transduziert. Bei den TCRs handelt es sich um den HLA-A\*03:01 restringierten ALYGSFATK-spezifischen Rezeptor, benannt TCR-7-3, sowie um drei HLA-A\*01:01 restringierten LTDLGQNLLY-



spezifische Rezeptoren benannt TCR 89, TCR 90 und TCR 91. Das Spendermaterial für die HLA-A\*01:01 restringierten LTDLGQNLLY-spezifischen Rezeptoren stammte von einem Patienten vom Prof. Dr. Tobias Feuchtinger (Klinikum der Universität München, Abteilung für pädiatrische Hämatologie, Onkologie, Stammzelltransplantation und Hämostaseologie) und wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt, wie in der Publikation von Günther et al., 2015 beschrieben.

### **3.9 Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren**

Der Virustiter wurde mittels eines Endpunktverdünntests bestimmt. A549 Zellen ( $2 \times 10^4$  pro ml) wurden mit humanen Adv5F35GFP oder Adv11pGFP in einer Verdünnungsreihe von  $1 \times 10^{-1}$  bis  $10^{-12}$  infiziert. Nach 24 - 48 Stunden erfolgte die Auswertung am Immun-Fluoreszenzmikroskop. Die Anzahl der positiven Näpfe (GFP-positive Zellen) wurde nach Reed & Münch, 1938 ausgewertet.

### **3.10 Aufreinigung der Monozyten**

Die PBMCs wurden in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und langsam in 8 ml DMEM überführt. Die Zellen wurden bei 300 x g gewaschen und anschließend in 80 µl IS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl sollte dabei  $1 \times 10^7$  nicht überschreiten. Mit 20 µl der CD14-MicroBeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden die Zellen bei 4°C für 15 Minuten inkubiert, mit 2 ml Puffer gewaschen und in 1 ml IS-Puffer resuspendiert. Für die magnetische Auftrennung wurden die LS Säulen (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) mit 3 ml Puffer vorgespült. Vor der magnetischen Auftrennung sollten die Zellklumpen durch ein 30 µm Nylonsieb von der Zellsuspension aufgetrennt werden, um ein Verstopfen der Säulen zu vermeiden. Nachdem die Zellen durch die Säulen durchgelaufen sind, wurden sie dreimal mit je 3 ml Puffer gewaschen und von der Magnetwand abgenommen damit die CD 14 positive Zellen mit 5 ml IS-Puffer ausgewaschen werden. Zu den Monozyten ( $4 \times 10^6$ ) wurde GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor) (800 Units/ml) hinzugegeben und für 3 Tage bei 37°C sowie 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **3.11 Early activation Assay der Jurkat 76-Zelllinie**

Die mit GM-CSF behandelten Monozyten wurden mit humanen AdV5F35GFP oder AdV11pGFP (MOI 0.5) infiziert. Nach 24 Stunden wurden  $1 \times 10^5$  Jurkat 76 hinzugegeben und für einen weiteren Tag im Inkubator kultiviert. Vor der Durchflusszytometrie erfolgte eine Färbung mit Antikörpern gegen humanes CD8 sowie humanes CD69. Beim CD69 handelt es sich um einen Marker für die frühe Aktivierung der T-Zellen. Die Hochregulierung von CD69 ermöglicht es den T-Zellen, die Lymphknoten zu verlassen.

Für die positive Kontrolle wurde zusätzlich Peptid hinzugegeben. Als Negativ-Kontrolle dienten nicht infizierte, mit GM-CSF behandelte Monozyten zusammen mit den jeweiligen Jurkat 76-Zellen.

### **3.12 T-Zell Anreicherung**

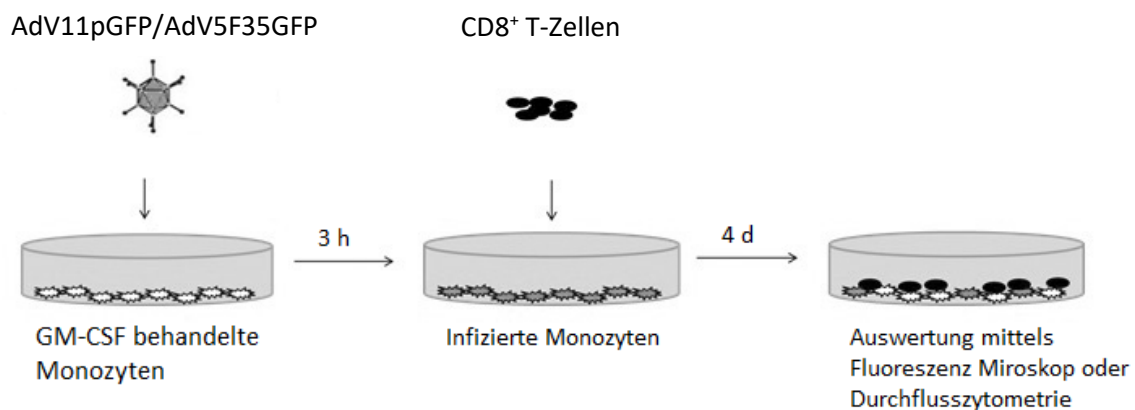
Die aufgetauten PBMCs wurden mithilfe von CD4- und CD56-gekoppelten MicroBeads und einer LS-Säule depletiert (siehe 3.6).

### **3.13 Zytotoxizitäts-Assays**

Für die Zytotoxizitäts-Assays wurden K15-Zellen (K562-Zellen die CD137, Membran-gebundenes Interleukin-15 sowie GFP exprimieren) mit HLA-A\*01:01, HLA-A\*02:01 oder HLA-A\*03 transduziert und als „Target“ Zellen verwendet [Fujisaki et al., 2009]. Angereicherte CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen) wurden zusammen mit den K15-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen) unter Zugabe von Peptid oder kovalent gebundenes Peptid im Inkubator kultiviert. Nach 2 Tagen erfolgte eine visuelle Auswertung mittels des Axiovert 200 Fluoreszenz Mikroskop und der AxioVision 4.6 Software von Zeiss (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) der lebendigen GFP-positiven K15 Zellen sowie eine quantitative Auswertung mittels Durchflusszytometrie. Hierfür erfolgte eine Zugabe einer definierten Anzahl von Polyesterene-Microspheres mit einem Durchmesser von 9  $\mu\text{m}$  (Polysciences, Eppelheim, Deutschland).

### 3.14 Adenovirus Dissemination Assay

Aus den aufgetauten und expandierten PBMCs wurden mithilfe der MicroBeads (siehe 3.5 und 3.12) CD8<sup>+</sup> T-Zellen angereichert. Die GM-CSF behandelten Monozyten konnten aus autologen PBMCs gewonnen werden (siehe 3.10). Am Tag 12 wurden die GM-CSF stimulierten Monozyten mit AdV5F35GFP (MOI 0.1) für 3 Stunden infiziert. Nachdem das Virus abgenommen worden war, wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml hinzugegeben und für weitere 3 bis 4 Tage bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (*Abbildung 9*). An Tag 4 erfolgte eine mikroskopische Auswertung mithilfe des Immun-Fluoreszenzmikroskops sowie der AxioVision™-Software. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) behandelt und die infizierten Monozyten mithilfe des FSC/SSC analysiert [Galperin et al. 2018].



**Abbildung 9 Adenovirus Dissemination Assay:** Aus Spender PBMCs aufgereinigte, GM-CSF behandelte Monozyten wurden mit einem eGFP-exprimierenden Adenovirus infiziert. Nach drei Stunden folgte die Zugabe der spezifischen T-Zellen oder Kontrollzellen. Jeden Tag folgte eine optische Kontrolle mittels Fluoreszenzmikroskopie und nach drei oder vier Tagen eine quantitative Auswertung mittels Durchflusszytometrie der eGFP positiven, infizierten Zellen.

## **4 Generierung Antigen-spezifischer T-Zellen für den adoptiven T-Zell-Transfer**

### **4.1 Vorhersage der möglichen T-Zell-Epitope mittels Online-Plattformen**

Die NetMHC 4.0™ und NetMHCstab 1.0™ Software sind in der Lage, die Bindungsaffinität möglicher T-Zell Epitope an das HLA-Molekül oder die Stabilität des Peptid-HLA Komplexes vorherzusagen. Für die Vorhersage der Epitope der HLA Klasse I-Peptide wurde die Sequenz des klinisch relevanten Adenovirus Serotyp 2 benutzt. Insgesamt wurden drei bereits bekannte sowie 37 neue Epitop-Kandidaten anhand einer Gegenüberstellung der Bindungsaffinität und Komplexstabilität ausgewählt. Die 37 Kandidaten sind sechs verschiedenen HLA-Allotypen zuzuordnen und wurden gewählt, um zusammen mit den bereits bekannten Epitopen ein möglichst breites Spektrum der Bevölkerung in Deutschland abzudecken [Schmidt et al., 2009]. Die komplette Liste aller Peptidsequenzen sowie die Abbreviation mit den Werten der Online-Plattformen sind in der *Tabelle 4* angegeben.

### **4.2 Peptid-induzierte IFN- $\gamma$ -Ausschüttung**

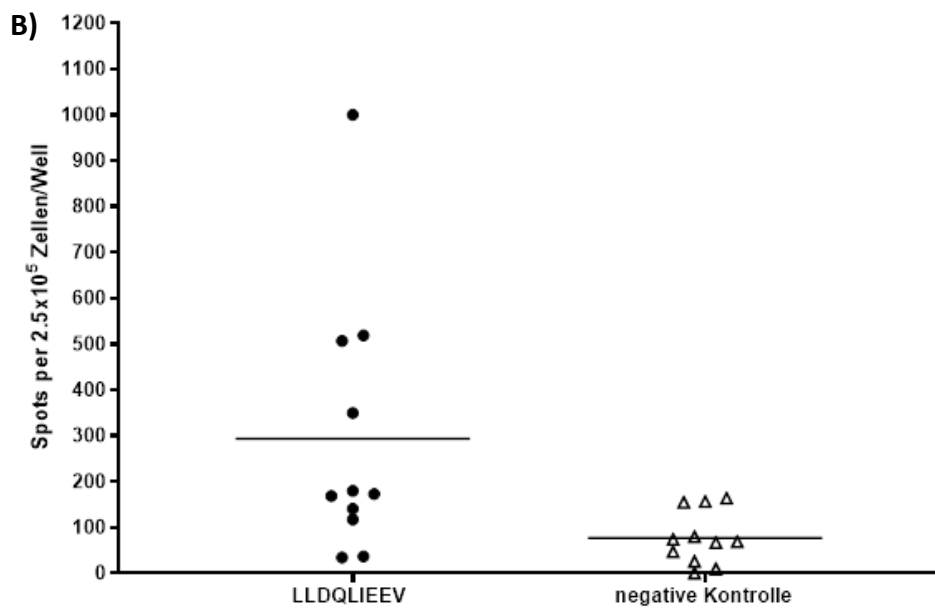
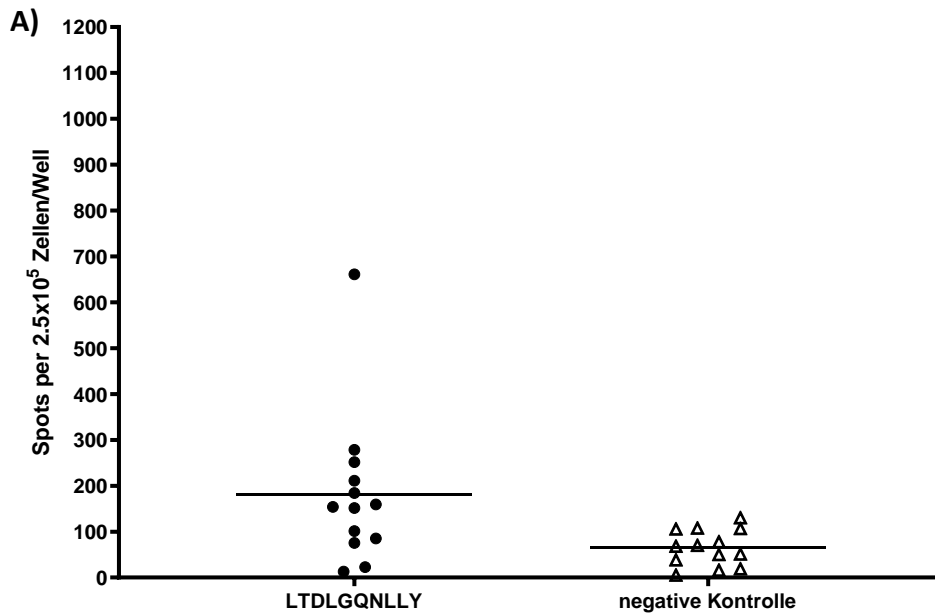
Als Teil einer Immunantwort wird von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen IFN- $\gamma$  produziert und kann zur Messung der Reaktion auf Antigene verwendet werden. Eine quantitative Methode zur Messung der IFN- $\gamma$  Ausschüttung ermöglicht der IFN- $\gamma$  ELISPOT-Assay. Mithilfe des ELISPOT-Assays wurden die in vorherigen Publikationen als immundominant beschriebene Peptide LTDLGQNLLY, LLDQLIEEV und FRKDVNMVL (*siehe Anhang Tabelle 3 und Abbildung 1*), auf ihre Kapazität eine Adenovirus-spezifische-T-Zell-Antwort zu induzieren, analysiert [Günther et al, 2015; Burbulla et al, 2016; Geyeregger et al., 2013, Keib et al., 2017]. Alle PBMCs wurden für 12 Tage mit Interleukin-2 und dem jeweiligen Peptid expandiert. Bei den Negativ-Kontrollen handelt es sich um expandierte PBMCs ohne Stimulation mittels Peptide. Peptide wurden als immundominant definiert, wenn die ELISPOT-Ergebnisse eine spezifische Antwort bei über 50 % der PBMC Spendern ergaben.

**Tabelle 4** Durch die Online- Plattformen NetMHC 4.0 und NetMHCstab 1.0 vorhergesagte Peptidsequenzen mit jeweiliger Restriktion, Herkunft, Affinität und Stabilität.

HLA I-Restriktion	Sequenz [aa]	Abkürzung	Vorhergesagte Affinität [nM]	Vorhergesagte Stabilität [h]
HLA-A*01:01	LTDLGQNLLY	hexon	10	6
HLA-A*02:01	LLDQLIEEV	E1A	7.84	14.32
HLA-C*07:02	FRKDVNMVL	hexon	23.71	-
HLA-A*03:01	RVMVSRSLTK	PIII	22.56	9.73
<b>HLA-A*03:01</b>	<b>ALYGSFATK</b>	<b>pol</b>	<b>12.11</b>	<b>13.38</b>
HLA-A*03:01	ALYLPDKLK	hexon	41.57	1.58
HLA-A*03:01	VIYGPTGCGK	IVa2	28.31	4.82
HLA-A*03:01	RLMETRGKK	pol	38.33	13.26
<b>HLA-A*03:01</b>	<b>RVLKKTTPMK</b>	<b>hexon</b>	<b>35.73</b>	<b>14.25</b>
HLA-B*08:01	ELKIKNRSL	33K	17.60	0.30
HLA-B*08:01	YSRLRYTEL	pTP	18.24	0.87
HLA-B*08:01	FMRGRHLIYL	E424K	10.31	0.48
HLA-B*08:01	ELRNRIFPL	33K	13.37	0.46
HLA-B*08:01	RLKTKETPSL	hexon	114.05	0.25
HLA-B*08:01	CLRLKVEGAL	E4 ORF3	115.13	0.26
<b>HLA-A*11:01</b>	<b>GTFYLNHTFK</b>	<b>hexon</b>	<b>5.21</b>	<b>18.83</b>
HLA-A*11:01	STADLAIASK	DBP	8.66	13.35
<b>HLA-A*11:01</b>	<b>YTYEWNFRK</b>	<b>hexon</b>	<b>6.57</b>	<b>9.50</b>
HLA-A*11:01	QSFAEVTYK	DBP	7.24	9.14
<b>HLA-A*11:01</b>	<b>GTAYNALAPK</b>	<b>hexon</b>	<b>10.24</b>	<b>8.86</b>
HLA-B*40:01	MEINLNANL	hexon	6.68	1.07
HLA-B*40:01	GEVATSVDL	pol	5.99	2.39
HLA-B*40:01	YEEDRGTPPL	pol	7.98	1.07
HLA-B*40:01	TEEMAASLL	E1A	13.06	1.60
HLA-B*40:01	GELFDSLNL	E1B 19K	13.06	1.78
HLA-B*40:01	GETITKSGL	hexon	24.07	1.96
<b>HLA-B*44:02</b>	<b>AEHTATTLNY</b>	<b>pTP</b>	<b>19.16</b>	<b>4.44</b>
HLA-B*44:02	KEIPTPYMW	pVIII	32.61	2.57
HLA-B*44:02	SEVSTYSMSF	fiber	26.17	1.89
HLA-B*44:02	METPDTHLSY	hexon	30.41	1.86
HLA-B*44:02	YEMCDITMY	E3 gp19K	9.32	1.82
HLA-B*44:02	AEETTAMLY	E4 34K	27.24	1.80
HLA-B*44:02	MEINLNANLW	hexon	9.65	1.62
HLA-B*51:01	YPANVPYPLI	hexon	136.18	6.45
HLA-B*51:01	MPQWSYMHI	hexon	122.11	3.07
HLA-B*51:01	IPLAGAPEI	100K	173.90	5.17
HLA-B*51:01	YPVFAVPEV	100K	329.53	11.71
<b>HLA-B*51:01</b>	<b>MPNLVPEVI</b>	<b>E1A</b>	<b>403.13</b>	<b>2.58</b>
<b>HLA-B*51:01</b>	<b>IPLQQVIAP</b>	<b>E3 RID</b>	<b>179.29</b>	<b>6.33</b>
HLA-B*51:01	LPALPAPPV	E4 ORF4	271.13	5.41

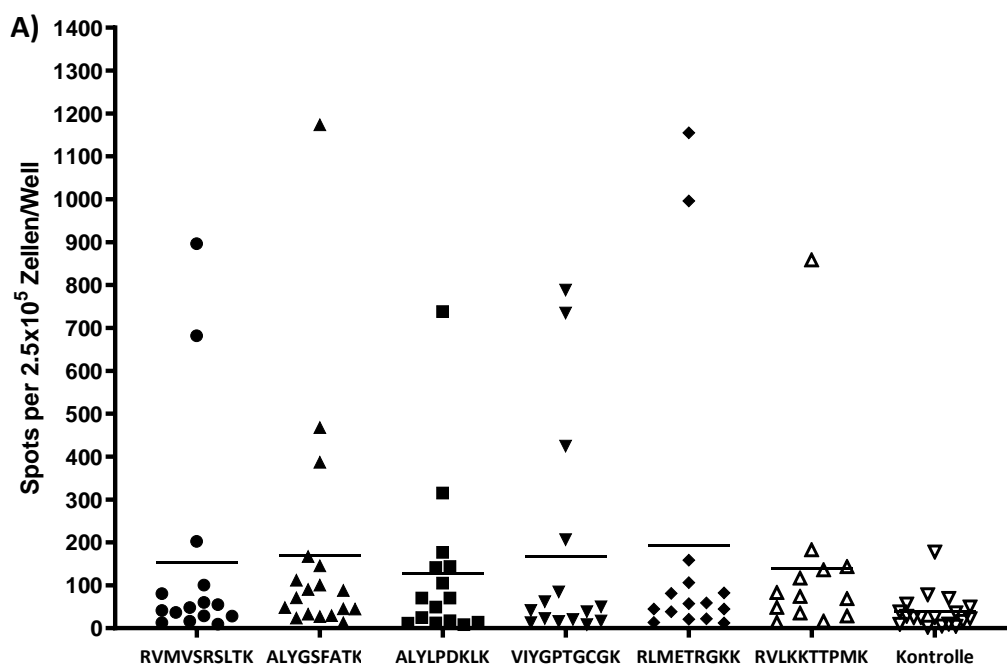
Die Auswertung der ELISPOT-Ergebnisse für das Peptid LTDLGQNLLY ergab eine spezifische Antwort bei 53,85 % der Spender und 63,46 % für das Peptid LLDQLIEEV. Eine immundominante Antwort der PBMCs, wie in der bisherigen Literatur beschrieben, konnte nach einer Stimulation mit dem LTDLGQNLLY- und LLDQLIEEV-Peptid gezeigt werden [Geyeregger et al., 2013; Leen et al., 2004]. Es wurden PBMCs von 13 verschiedenen Spender auf LTDLGQNLLY und 11 Spender auf LLDQLIEEV Spezifität getestet. Eine spezifische Antwort wurde definiert durch einen Cut-off Wert von > 25 Spots/Napf sowie > 2 x negativ Kontrolle (*Abbildung 10*). Alle Rohdaten sind im Anhang in den *Tabellen 1-9* zu sehen.

Sechs weitere Peptide, die zur Antigenvariante HLA-A\*03:01 gehören, wurden auf ihre Eigenschaft getestet, eine IFN- $\gamma$ -Ausschüttung der PBMCs zu induzieren. Nach dem IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Screening, konnten die Peptide ALYGSFATK die mit 66,67 % (18 verschiedene Spender) und RVLKKTTPMK mit 61,54 % (13 verschiedene Spender) über dem Schwellenwert lagen als immundominant identifiziert werden. Weitere vier Peptide (RVMVSRSLTK, ALYLPDKLK, VIYGPTGCGK und RLMETRQKK) konnten jeweils bei 36,84 % der 15 PBMC Spender, eine signifikante IFN- $\gamma$  Ausschüttung auslösen (*Abbildung 11*).



**Abbildung 10 Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung der expandierten PBMCs mit der HLA-A\*01:01- oder HLA-A\*02:01-Restriktion.** Die Messung der Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung der expandierten LTDLGQNLly- und LLDQLIEEV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen, erfolgte mittels des IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assays nach 12 Tagen Expansion von PBMCs zusammen mit dem relevanten Peptid oder als negative Kontrolle ohne Peptid. Es konnte gezeigt werden, dass die Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung der unterschiedlichen Spender für A) das Peptid LTDLGQNLly (HLA-A\*01:01) eine spezifische Antwort von 53,85 % und B) 63,46 % für das Peptid LLDQLIEEV (HLA-A\*02:01) ergab.

Mittels der Software NetMHC 4.0™ und NetMHCstab 1.0™ wurden auch für die Restriktionen HLA-B\*08 sowie HLA-B\*40 jeweils sechs relevante Peptide vorhergesagt und synthetisiert. Jedoch konnte nur geringfügig eine IFN- $\gamma$ -Ausschüttung der expandierten PBMCs nach der Stimulation mit jeweiligen Peptiden gemessen werden. Von elf PBMC-Donner mit einer HLA-B\*08-Restriktion lagen bei drei Spender die Werte über den Schwellenwert nach der Expansion mit dem Peptid FMRGRHLIYL. Bei den restlichen Peptiden stiegen die Werte nicht über 18,18 % an.

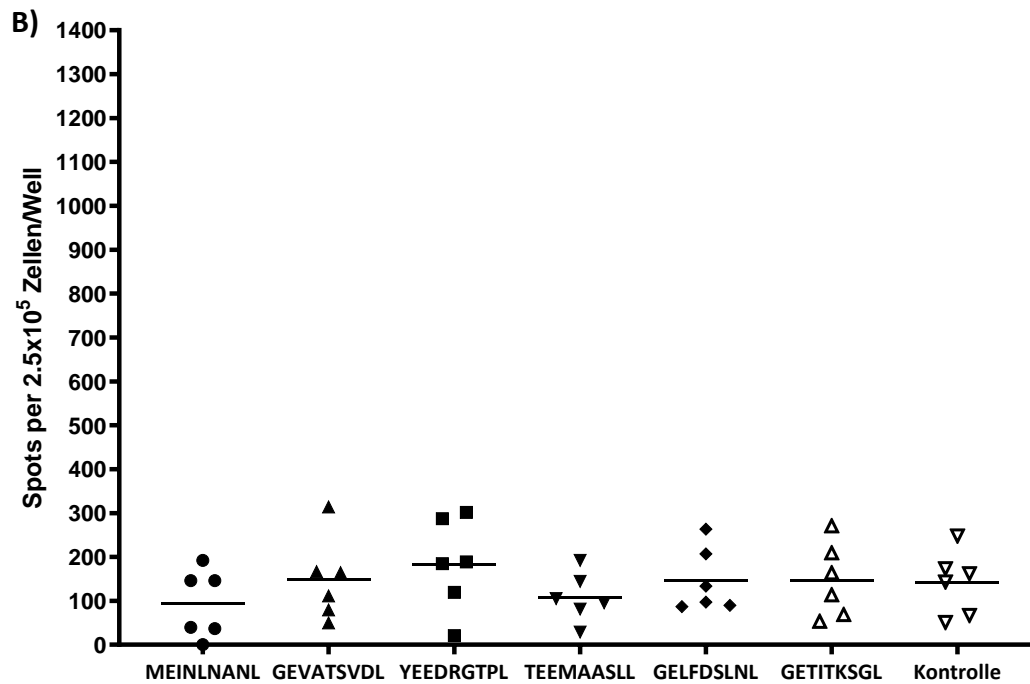
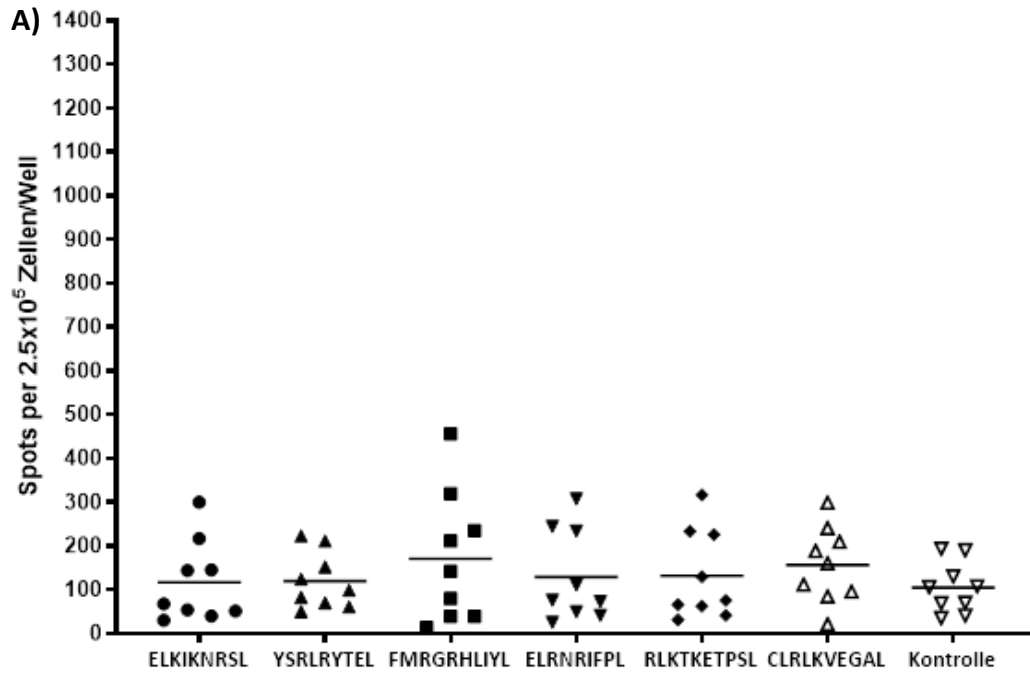


**Abbildung 11 Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung der expandierten PBMCs mit der HLA-A\*03:01-Restriktion.**

A) PBMCs von 13-18 verschiedenen Spendern wurden expandiert. Die Peptide ALYGSFATK mit 66,67 % (12 von 18 Spender) und RVLKKTTPMK mit 61,54 % (8 von 13 Spender) konnten als immundominant identifiziert werden. Die Peptide RVMVSRSLTK, ALYLPDKLK, VIYGPTGCGK und RLMETRGGK konnten jeweils bei 36,84 % der PBMCs eine signifikante IFN- $\gamma$ -Ausschüttung auslösen.

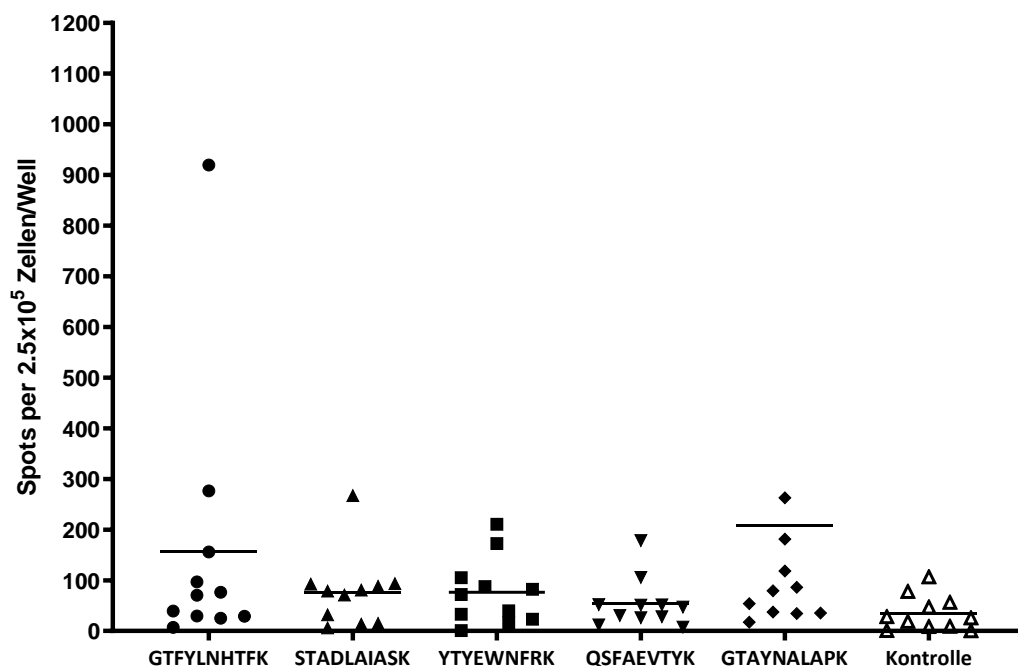
Bei den sechs Spender mit der HLA-B\*40:01 Restriktion wurde nach der Stimulation mit den synthetisierten Peptiden nur jeweils bei einem Spender eine hohe IFN- $\gamma$  Ausschüttung für die Peptide MEINLNANL, GEVATSVDL, YEEDRGTPPL gemessen (*Abbildung 12*).





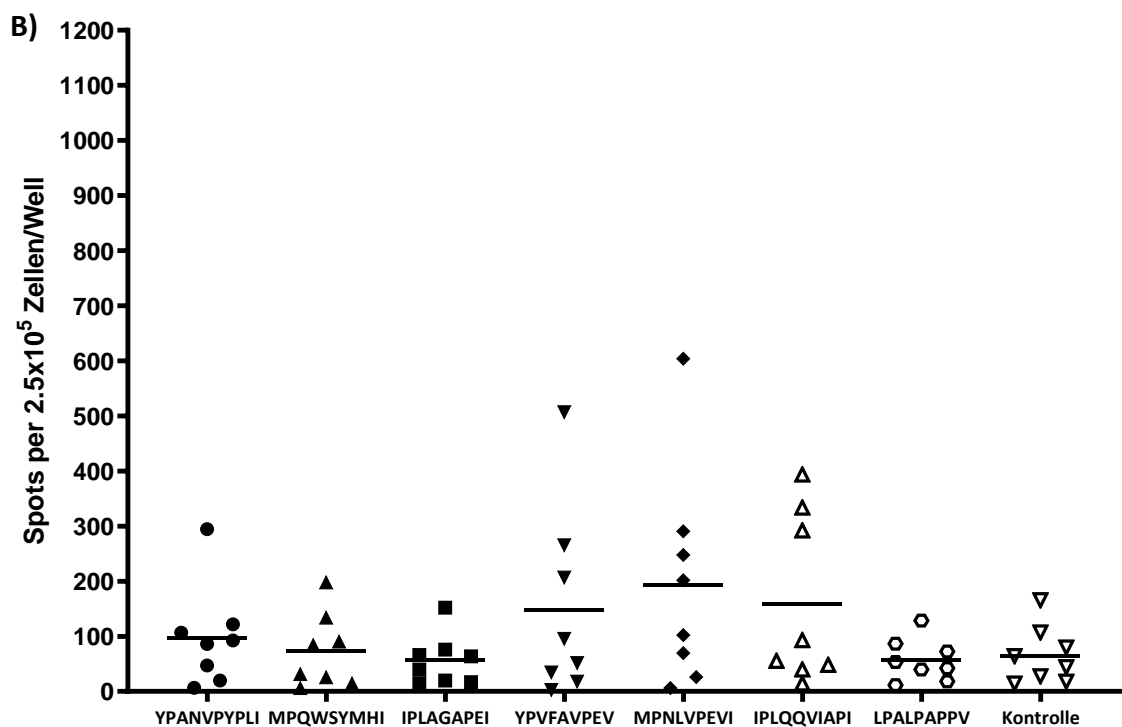
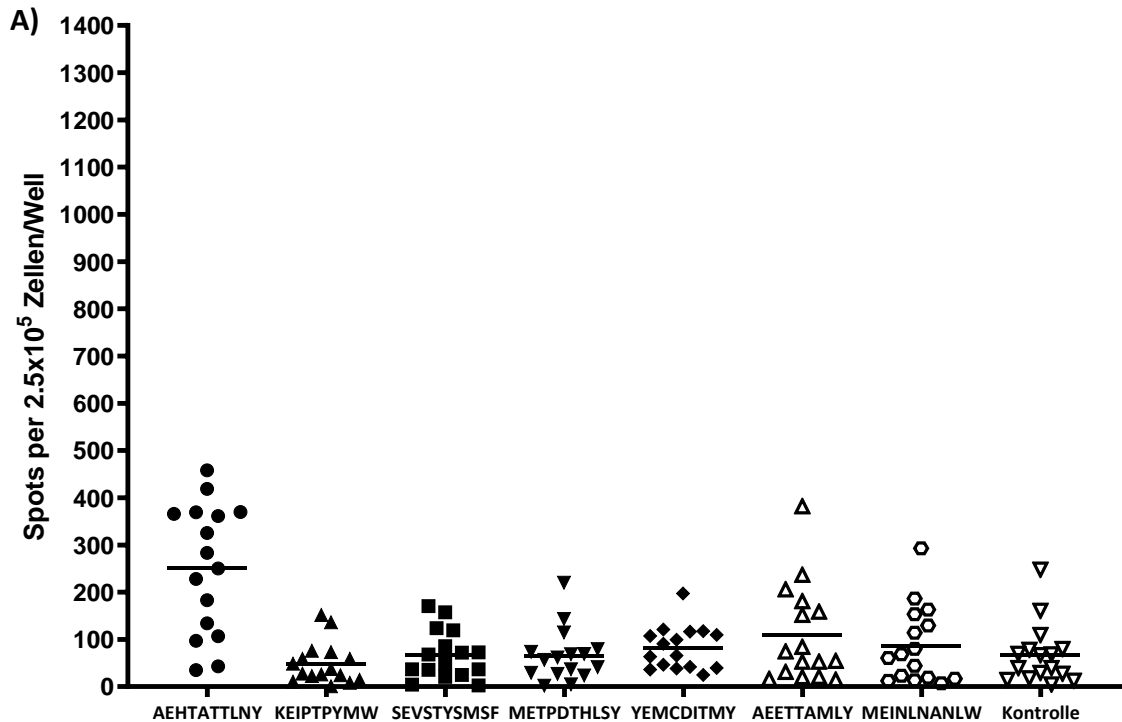
**Abbildung 12 IFN- $\gamma$ -ELISPOT Assay der expandierten PBMCs mit der HLA die HLA-B\*08:01- sowie HLA-B\*40:01-Restriktionen.** A) Die Auswertung der Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung der expandierten HLA-B\*08:01 PBMCs mit dem Peptid FMRGRHLYL ergab 27,27 % von elf Spendern Werte über dem Schwellenwert. Bei den Peptiden ELKIKNRSL, YSRLRYTEL, ELNRIFPL, RLKTKETPSL und CLRLKVEGAL stiegen die Werte nicht über 18,18 % an. B) Die Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung der sechs expandierten PBMCs mit der HLA-B\*40:01-Restriktion war bei 16,67 % der Spender signifikant nach der Zugabe der Peptide MEINLNANL, GEVATSVDL oder YEEDRGTP.

Bei den Epitop-Kandidaten, die zur Antigenvariante HLA-A\*11:01 gehören, konnte gezeigt werden, dass drei von fünf synthetisierten Peptiden eine Immunreaktion bei 54,55 % der PBMC-Spender auslösen. Das Peptid STADLAIASK konnte mit 45,45 % von insgesamt elf verschiedenen PBMCs-Spendern eine IFN- $\gamma$ -Ausschüttung induzieren und beim Peptid QSFAEVTYK lagen nur 27,27 % der Proben über dem Schwellenwert (*Abbildung 13*).



**Abbildung 13** Die Interferon- $\gamma$ -Werte der expandierten PBMCs mit der HLA-A\*11:0-Restriktion konnten zeigen, dass die Peptide GTFYLNHTFK, YTYEWNFRK, und GTAYNALAPK eine Immunreaktion bei 54,55 % der PBMC Spenden auslösen. Von den elf verschiedenen PBMC Spender konnte das STADLAIASK-Peptid bei 45,45 % eine Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung induzieren und das Peptid QSFAEVTYK bei 27,27 % der Spender. Ein Datenpunkt des GTAYNALPK-Peptids befindet sich mit 1384 Spots außerhalb der Skala (*siehe Anhang, Tabelle 7*).

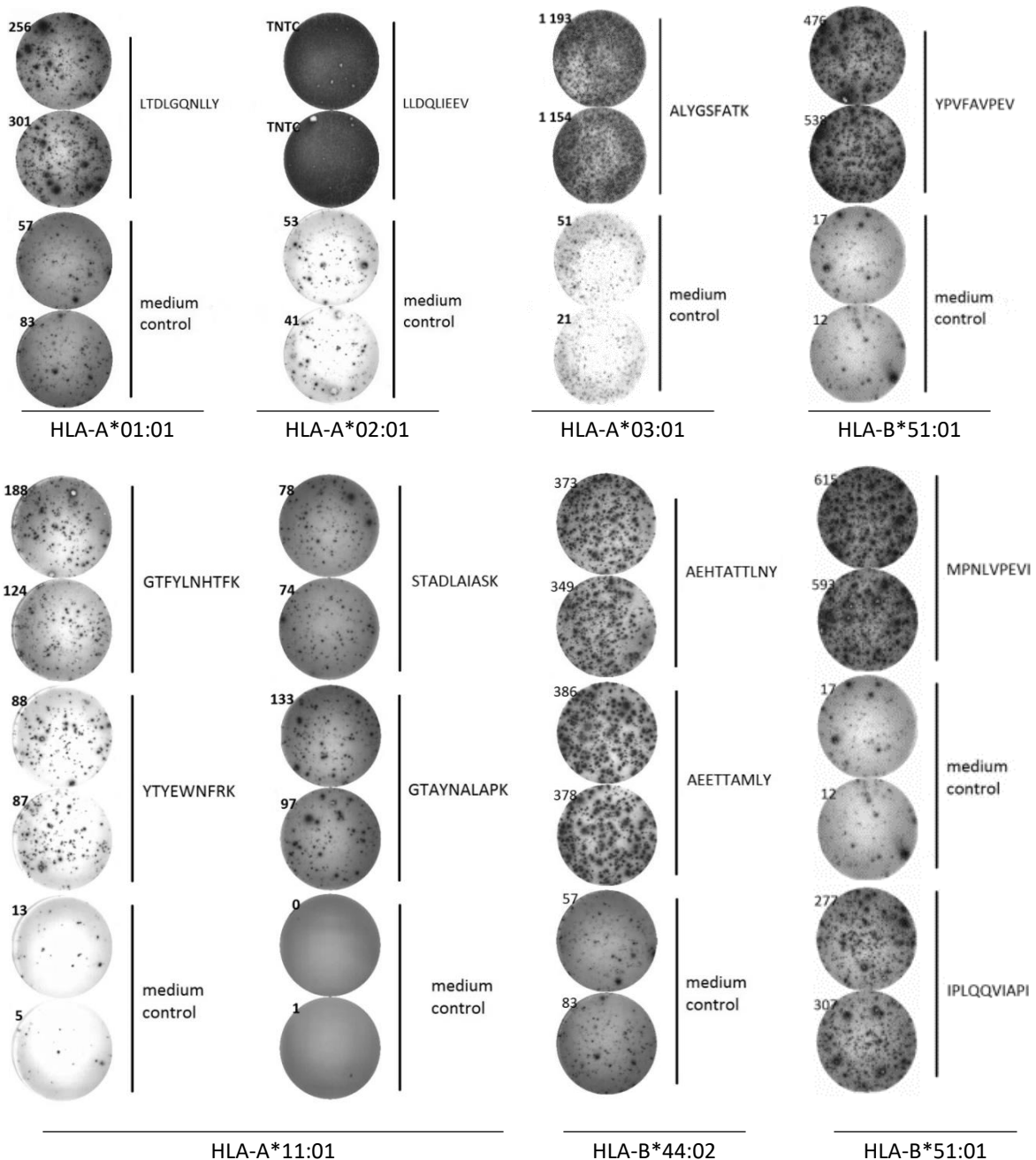
Für weitere sieben Peptide wurden PBMCs von 16 Spendern mit HLA-B\*44:02-Restriktion auf die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung evaluiert. Das Peptid AEHTATTLNY ergab eine Immundominanz mit 81,25 % IFN- $\gamma$ -positiv getesteten Spendern. Die Peptide AEETTAMLY und YEMCDITMY lagen beide bei 43,75 % jedoch sind die einzelnen Werte von YEMCDITMY meist nur knapp über den Schwellenwert. Die restlichen Peptide wurden bei null bis zwei positiven Spender als irrelevant gewertet (*Abbildung 14 A*).



**Abbildung 14 Die INF- $\gamma$ -ELISPOT-Auswertung für die Spender PBMCs mit HLA-B\*44:02- und HLA-B\*51:01-Restriktion.** A) Das Peptid AEHTATTLNY konnte mit 81,25 % von insgesamt 16 verschiedenen PBMCs Spendern mit der Restriktion HLA-B\*44:02 eine Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung induzieren. Bei den Peptiden AEETTAMLY und YEMCDITMY waren es 43,75 %. Die Peptide KEIPTPYMW, SEVSTYSMSF, METPDTHLSY, AEETTAMLY und MEINLNANLW lagen bei unter 12,5 % der Spender PBMCs mit einer Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung über dem Schwellenwert. B) Die Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung der expandierten PBMCs der Spender mit der HLA-B\*51:01 Restriktion ergab bei den Peptiden MPNLVPEVI und IPLQQVIAP I 50 % der Spender Werte über dem Schwellenwert. Die restlichen Peptide YPVFAVPEV, LPALPAPPV, YPANVPYPLI, IPLAGAPEI sowie MPQWSYMHI hatten positive Werte bei 25% der PBMC-Spendern.

Das IFN- $\gamma$  ELISPOT-Screening der Peptide MPNLVPEVI und IPLQQVIAPI ergab bei 50 % der getesteten PBMC-Spender mit der Restriktion HLA-B\*51:01 eine IFN- $\gamma$ -Ausschüttung über dem Schwellenwert. Bei den Peptiden YPVFAVPEV, LPALPAPPV, YPANVPYPLI, IPLAGAPEI sowie MPQWSYMHI konnte eine IFN- $\gamma$ -Ausschüttung von 25% der PBMC-Spendern nachgewiesen werden (*Abbildung 14 B*).

Mithilfe der NetMHC 4.0™ und NetMHCstab 1.0™ Software wurden 37 neue Epitop-Kandidaten ausgewählt, synthetisiert und im Rahmen eines Screenings auf ihre Eigenschaft getestet, eine IFN- $\gamma$ -Ausschüttung in PBMCs zu induzieren. Aus den 37 Epitop-Kandidaten konnten acht Peptide als immundominant identifiziert werden. Dies wurde definiert als eine induzierte IFN- $\gamma$ -Ausschüttung bei mehr als 50 % verschiedener PBMC Spender, nach einer 12-tägigen Stimulation mit jeweiligem Peptid. Bei den acht vielversprechendsten Peptiden handelt es sich um **ALYGSFATK** mit 63,64 % sowie **RVLKKTTPMK** mit 61,54 % (HLA-A\*03), **GTFYLNHTFK**, **YTYEWNFRK**, und **GTAYNALAPK** mit 54,55 % (HLA-A\*11), **AEHTATTLNY** (HLA-B\*44) mit 81,25 %, sowie **MPNLVPEVI** und **IPLQQVIAPI** (HLA-B\*51) mit genau 50 %.



**Abbildung 15** Ausgewählte Rohdaten des INF- $\gamma$  ELISPOT Assays der expandierten PBMCs. Die ausgewählten Peptide aus den 37 Epitop-Kandidaten lagen über dem Schwellenwert und konnten anhand des INF- $\gamma$ -ELISPOTs als immundominant identifiziert werden. Dies wurde definiert als eine induzierte INF- $\gamma$ -Ausschüttung bei mehr als 50 % verschiedener PBMC-Spender, nach einer 12-tägigen Stimulation mit jeweiligem Peptid. Zusätzlich werden die zwei bereits beschriebenen Peptide LTDLGQNLLY und LLDQLIEEV gezeigt. Ein Querschnitt aller Rohdaten ist im Anhang, *Tabelle 1-9*, zu finden.

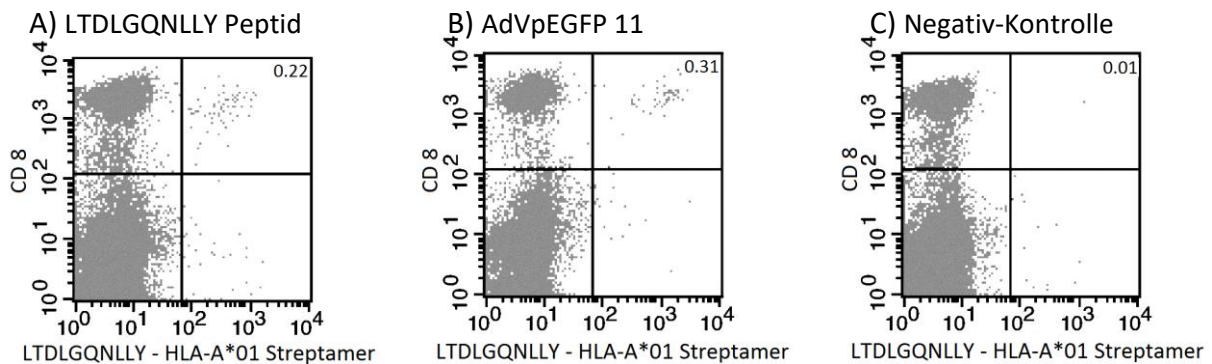
### **4.3 Expansion und Detektion Antigen-spezifischer T-Zellen nach einer Adenovirus-Infektion *in vitro***

Das Epitop aus dem Strukturprotein Hexon mit der HLA-A\*01:01 Restriktion LTDLGQNLly ist hochkonserviert und wird von T-Zellen aller HAdV-Spezies erkannt [Leen et al, 2004; Geyeregger et al, 2013]. Nach einer Expansion der PBMCs mit der Zugabe von LTDLGQNLly konnte bei 66,67 % der Spender (6 von 9) spezifische T-Zellen mithilfe von einer LTDLGQNLly-HLA-A\*01:01-Streptamerfärbung detektiert werden.

Um eine speziesübergreifende Erkennung zu bestätigen, wurden PBMCs mit dem AdV11pGFP oder AdVpEGFP 5 F35 infiziert. AdV11pGFP gehört zur Spezies B und ist in der Lage, myeloide Zellen zu infizieren, die dann in den PBMCs als APCs fungieren. HAdV 5 benötigt für die Infektion der myeloiden Zellen zusätzlich die Fiber eines Adenovirus 35 [Keib et al., 2019]. Nach der Infektion wurden die PBMCs für zwölf Tage mit Zugabe von Interleukin-2 expandiert. Die LTDLGQNLly-HLA-A\*01:01-Streptamerfärbung ermöglichte dann die Detektion spezifischer T-Zellen. Als positive Kontrolle dienten expandierte PBMCs der jeweiligen Spender mit Zugabe des LTDLGQNLly-Peptids sowie Interleukin-2. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl spezifischer-T-Zellen nach einer AdV11pGFP- oder AdVpEGFP 5 F35-Infektion sowie nach einer Stimulation mit dem Peptid signifikant höher war als bei der negativen Kontrolle. Bei den negativen Kontrollen handelt es sich um nicht infizierte, expandierte PBMCs der jeweiligen Spender mit Interleukin-2. Hier konnten teilweise auch spezifische T-Zellen detektiert werden, jedoch in einer viel geringeren Anzahl (*Abbildung 16*).

Das Epitop LLDQLIEEV aus dem E1A-Protein mit der HLA-A\*02:01-Restriktion wird im Gegensatz zu LTDLGQNLly nicht von T-Zellen aller Adenovirus-Spezies erkannt [Geyeregger et al, 2013]. Um eine Erkennung antigenpräsentierender Zellen nach einer Infektion zu ermöglichen wurden PBMCs mit einem neu generiertem Virus AdVpEGFP 5 F35 der Spezies C, infiziert und expandiert. AdVpEGFP 5 F35 beinhaltet zusätzlich das Fiber eines Adenovirus 35, welches eine Infektion der myeloiden Zellen ermöglicht. Die LLDQLIEEV-HLA-A\*02:01-Streptamerfärbung konnte einen Anstieg von 2.20 % der spezifischen T-Zellen nach der Expansion mit AdVpEGFP 5 F35 infizierten PBMCs im Vergleich zu expandierten Mock-infizierten PBMCs zeigen (*Abbildung 17*).

Nach der Expansion der PBMCs mit dem LLDQLIEEV-Peptid konnte mittels LLDQLIEEV-HLA-A\*02:01-Streptamerfärbung bei 37,5 % der Spender ein deutlicher Anstieg spezifischer T-Zellen nachweisen werden [Keib et al., 2019]. Bei zwei Spendern lagen die Mittelwerte der Anzahl spezifischer T-Zellen bei 0,57 % und 4,07 % (n=3) in den PBMCs.

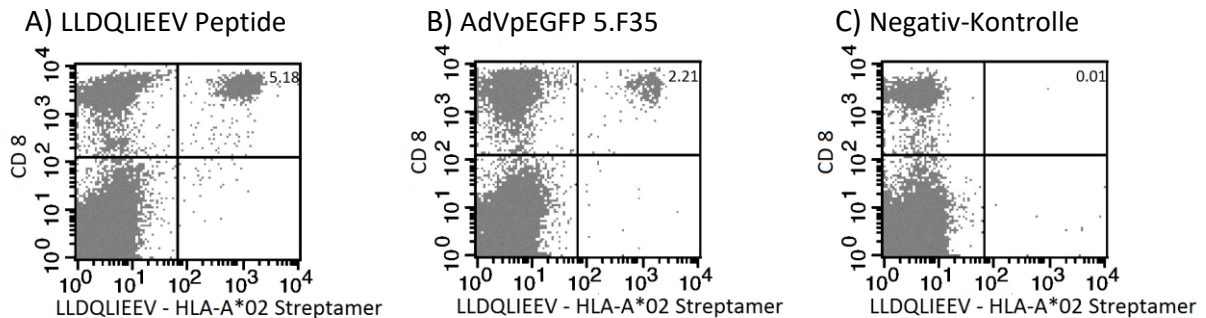


**Abbildung 16 Exemplarisches Beispiel mit LTDLGQNLly-HLA-A\*01:01-Streptamerfärbung nach einer Infektion der Spender PBMCs mit dem AdVpEGFP 11.** A) Spender PBMCs wurden für zwölf Tage zusammen mit LTDLGQNLly-Peptid und Interleukin-2 kultiviert. Am Tag zwölf wurden die PBMCs mit LTDLGQNLly-HLA-A\*01:01 Streptamerfärbung und anti-CD8-Antikörper gefärbt. Es konnten 0,22 % spezifischer T-Zellen nach einer Expansion detektiert werden. B) Spender PBMCs wurden mit dem AdVpEGFP 11 infiziert und für zwölf Tage mit Interleukin-2 kultiviert. Die anschließende LTDLGQNLly-HLA-A\*01:01 Streptamerfärbung konnte 0.31 % T-Zellen detektieren. C) Für die negative Kontrolle wurden PBMCs nur mit Interleukin-2 kultiviert und ebenfalls mit LTDLGQNLly-HLA-A\*01:01-Streptameren gefärbt.

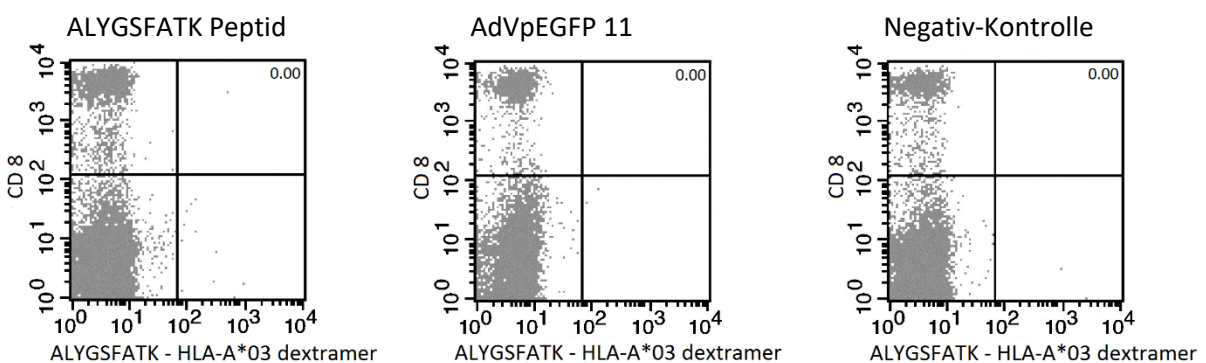
Einer der vielversprechendsten Epitop-Kandidaten nach dem IFN- $\gamma$  ELISPOT-Screening war das Peptid ALYGSFATK aus der DNA-Polymerase mit einer HLA-A\*03:01 Restriktion. Die INF- $\gamma$ -Ausschüttung in PBMCs, die zusammen mit dem Peptid ALYGSFATK kultiviert wurden, war bei 64 % der Spender signifikant erhöht.

Nach einer zwölf tägigen Expansion zusammen mit dem ALYGSFATK-Peptid und Interleukin-2 wurden die PBMCs auf spezifische T-Zellen mittels einer ALYGSFATK HLA-A\*03:01 Dextramerfärbung untersucht. Insgesamt wurden PBMCs von 25 Spendern expandiert und gefärbt, jedoch konnte bei keinem dieser Spender eine messbare Anzahl spezifischer T-Zellen identifiziert werden. Ebenfalls wurden die myeloiden Zellen der PBMCs von zwei verschiedenen Spendern mit AdVpEGFP 11 infiziert und die T-Zellen nach einer Expansion von 12 Tagen auf Ihre Spezifität untersucht. Jedoch konnte auch hier keine positive Färbung ausgeführt werden (*Abbildung 18*). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die

Frequenzen der spezifischen T-Zellen, nach einer 12-tägigen Expansion, zu niedrig waren um sie mithilfe der HLA-Multimerfärbung zu detektieren. Vergleichsweise dazu war zwar beim gleichen Spender nach der Expansion der PBMCs mit dem LTDLGQNLLY-Peptid, eine Detektion spezifischer T-Zellen mit dem HLA-Multimer möglich, jedoch handelt es sich bei LTDLGQNLLY um ein hochpotentes Peptid.



**Abbildung 17 Exemplarische LLDQLIEEV-HLA-A\*02:01-Streptamerfärbung nach einer Infektion der Spender PBMCs mit dem AdVpEGFP 5 F35.** A) PBMCs mit der HLA-A\*02:01-Restriktion wurden für zwölf Tage zusammen mit dem LLDQLIEEV-Peptid und Interleukin-2 kultiviert. Mithilfe der LLDQLIEEV-HLA-A\*02:01-Streptamerfärbung konnten 5,18 % CD8+ Zellen in den PBMCs detektiert werden. B) Nach der zwölf-tägigen Infektion der PBMCs mit dem AdVpEGFP 5 F35 konnten 2.21 % LLDQLIEEV-spezifischer CD8+ Zellen mittels der Durchflusszytometrie detektiert werden. C) Für die negative Kontrolle wurden PBMCs des gleichen Spenders nach einer zwölf-tägigen Expansion mit nur Interleukin-2 mit dem LLDQLIEEV-HLA-A\*02:01-Streptamer gefärbt.



**Abbildung 18 Exemplarische Darstellung der Expansion und Detektion von spezifischen T-Zellen von PBMC Spender mit der HLA-A\*03:01- sowie HLA-A\*01:01-Restriktion.** A) Spender-PBMCs wurden entweder mit dem ALYGSFATK-Peptid expandiert, mit dem AdVpEGFP 11 infiziert oder nur mit Interleukin-2 als Kontrolle für zwölf Tage kultiviert. Nach der ALYGSFATK-HLA-A\*03:01-Dextramerfärbung konnten in den PBMCs keine ALYGSFATK-spezifischen CD8+ Zellen detektiert werden. PBMCs vom gleichen Spender wurden als positive Kontrolle ebenfalls für zwölf Tage mit dem LTDLGQNLLY-Peptid expandiert. Im Gegensatz zum Peptid ALYGSFATK konnten mittels der LTDLGQNLLY-HLA-A\*01:01-Streptamerfärbung 0.22 % CD8+ Zellen in den PBMCs detektiert werden. Nach einer Infektion mit dem AdVpEGFP 11 waren es 0.31 % nach zwölf Tagen (siehe Abbildung 16).



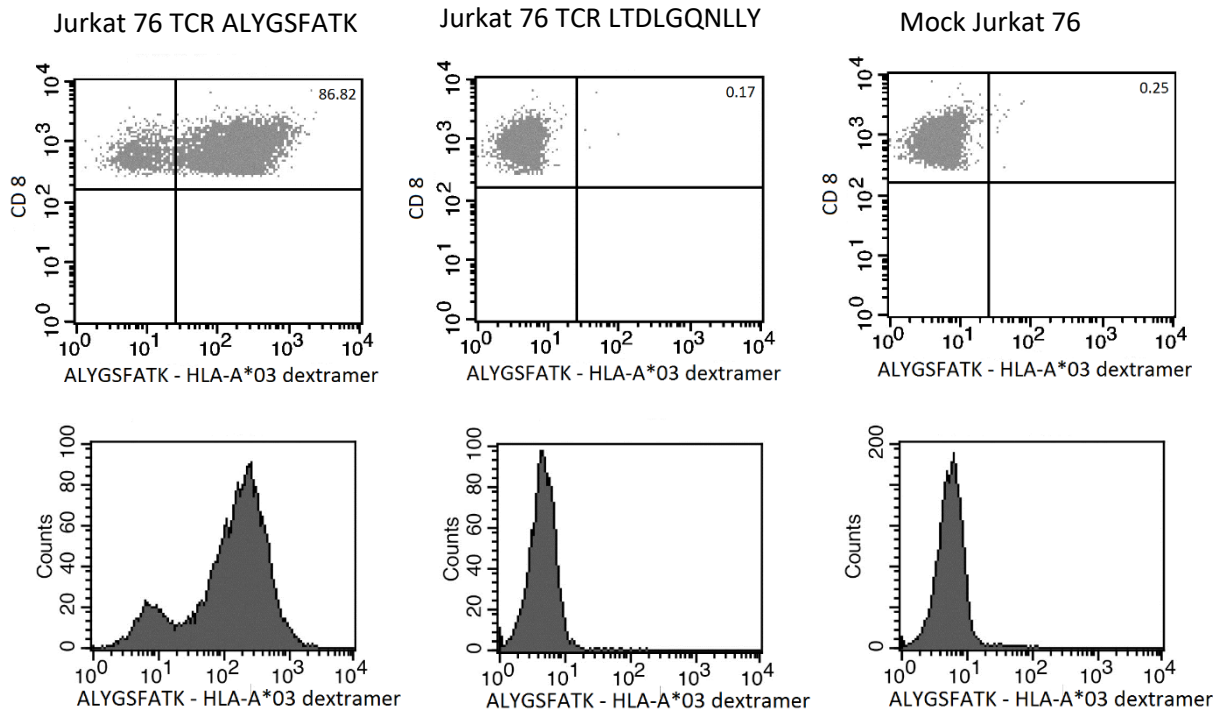
## 5 Funktionale Analyse Antigen-spezifischer T-Zellen für den adoptiven T-Zell-Transfer

### 5.1 Immortalisierte, mit dem ALYGSFATK T-Zell-Rezeptor transduzierte T-Zellen

Jurkat-Zellen sind eine immortalisierte Zelllinie, die aus humanen T-Lymphozyten abgeleitet ist und die in der Lage ist, Interleukin-2 zu produzieren. Die Subzelllinie Jurkat 76 ist frei von endogenen alpha- sowie beta-Ketten des TCR und umgeht somit die Problematik von TCR *miss-pairing* sowie von unerwarteten Spezifitäten [Miyana et al., 2017].

Expandierte PBMCs mit einer HLA-A\*03:01-Restriktion wiesen eine hohe IFN- $\gamma$ -Ausschüttung auf (*Abbildung 11 und 15*). Es war jedoch nicht möglich, mithilfe der ALYGSFATK-HLA-A\*03:01 Dextramere spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen anzufärben. Für weitere Untersuchungen wurden HLA-A\*03:01-restringierten Spenderzellen, mit der höchsten ALYGSFATK-induzierten IFN- $\gamma$ -Ausschüttung an die Technische Universität München, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene zu Händen von Thomas Müller übergeben. Thomas Müller konnte mithilfe einer Multimer-Aufreinigung T-Zellen isolieren und TCR-SCAN-RACE-PCR durchführen. Im Anschluss wurde eine Transduktion der Jurkat 76-Zelllinie mit einem ALYGSFATK-spezifischen TCR ausgeführt.

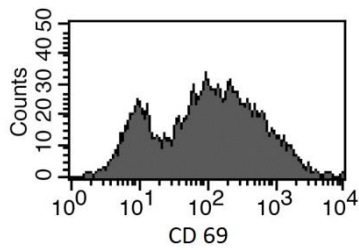
Mithilfe der ALYGSFATK-HLA-A\*03:01-Dextramerfärbung konnte gezeigt werden, dass 86.82 % der ALYGSFATK transduzierten Jurkat 76-Zellen in der Lage sind den spezifischen T-Zell-Rezeptor zu exprimieren (*Abbildung 19*). Bei der Mock-transduzierten Jurkat 76-Zelllinie konnte die ALYGSFATK-HLA-A\*03:01-Dextramerfärbung eine unspezifische Färbung von 0.25 % aufzeigen. Im Vergleich dazu hatten die Jurkat 76-Zellen, die mit drei verschiedenen LTDLGQNLly-spezifischen Rezeptoren transduziert wurden, geringere Expressionsraten des T-Zell-Rezeptors (*siehe Anhang, Abbildung 2*).



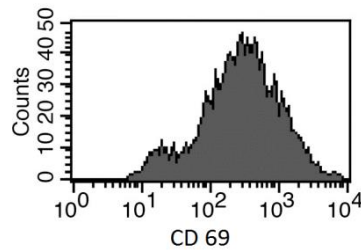
**Abbildung 19 ALYGSFATK-HLA-A\*03:01 Dextramerfärbung der transduzierten Jurkat 76-Zellen.** Jurkat 76-Zellen wurden mit dem ALYGSFATK-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduziert, mithilfe der ALYGSFATK-HLA-A\*03:01-Dextramerfärbung konnte eine Erfolgsrate von 86,82 % nachgewiesen werden im Gegensatz zu der Mock-transduzierten Jurkat 76 Zelllinie mit 0,25 %. Als eine weitere negative Kontrolle wurden mit dem ALYGSFATK-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduzierte Jurkat-76 Zellen mit LTDLGQNLLY-HLA-A\*01:01-Streptameren gefärbt, um falsch positiven Ergebnisse auszuschließen.

Jurkat 76-Zellen, die mit ALYGSFATK-spezifische-T-Zell-Rezeptor transduziert worden waren, wiesen nach einer Ko-Kultivierung mit AdVpEGFP 11 infizierten Monozyten, eine erhöhte CD69-Expression auf. Gleichermäßen konnten erhöhte Werte für die CD69- Expression nach einer Ko-Kultivierung mit ALYGSFATK-Peptid präsentierenden Monozyten festgestellt werden (*Abbildung 20*). Das Oberflächenprotein CD69 ist ein sogenanntes *Early Activation Antigen* und wird u. a. von aktivierten T-Zellen gebildet und dient als Immunmodulator [Ziegler et al, 1994].

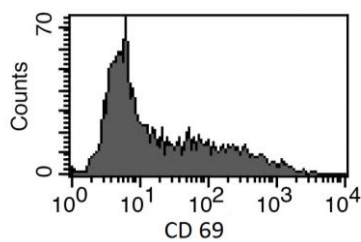
A) Infizierte Monozyten mit AdVpEGFP 11 + Jurkat 76 TCR 7-3



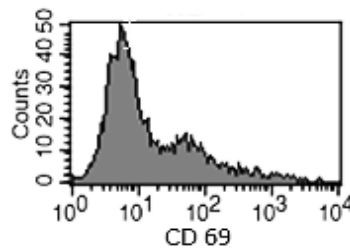
B) Positive Kontrolle: Monozyten + Jurkat 76 TCR 7-3 + ALYGSFATK Peptid



C) Negative Kontrolle: Monozyten + Jurkat 76 TCR 7-3



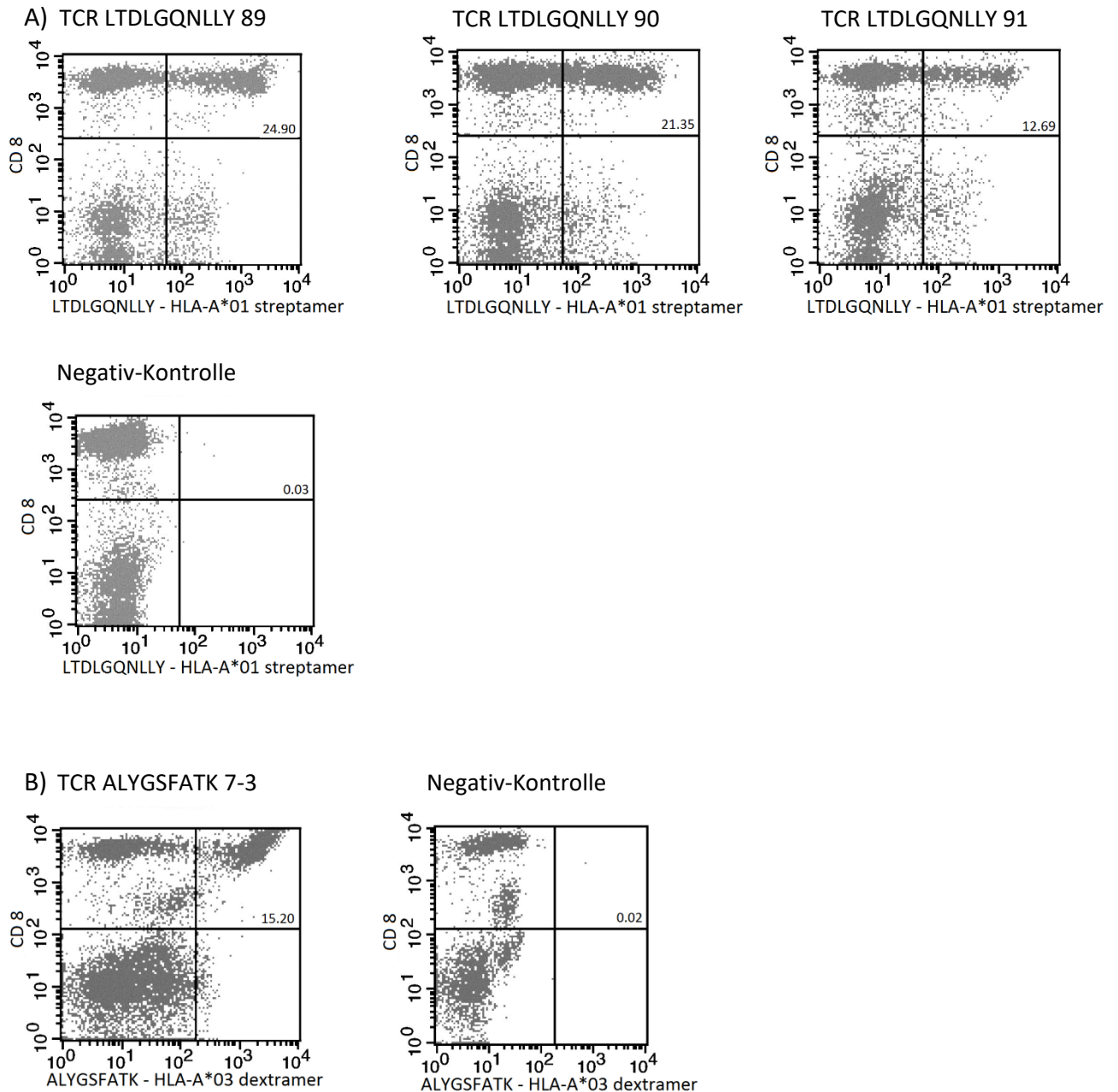
D) Negative Kontrolle: Infizierte Monozyten mit AdVpEGFP 11 + Jurkat 76



**Abbildung 20 Präsentation des Oberflächenproteins CD69 der Jurkat 76-Zelllinie.** Jurkat 76-Zelllinie wurde mit einem ALYGSFATK-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduziert. A) Nach einer Ko-Kultur der TCR-transduzierten-Jurkat 76 mit AdVpEGFP 11 infizierten Monozyten konnte eine deutliche Aktivierung der Zellen gezeigt werden. B) Als positive Kontrolle wurden die TCR-transduzierte Jurkat-Zellen mit ALYGSFATK-Peptid und nicht infizierten Monozyten ko-kultiviert. C) Als Negativ-Kontrolle wurde die Jurkat 76-Zelllinie ohne Zugabe von Peptid mit nicht infizierten Monozyten kultiviert. D) Mit einer weiteren negativen Kontrolle konnte gezeigt werden, dass Jurkat 76 ohne TCR-7-3 von infizierten Monozyten nicht aktiviert werden.

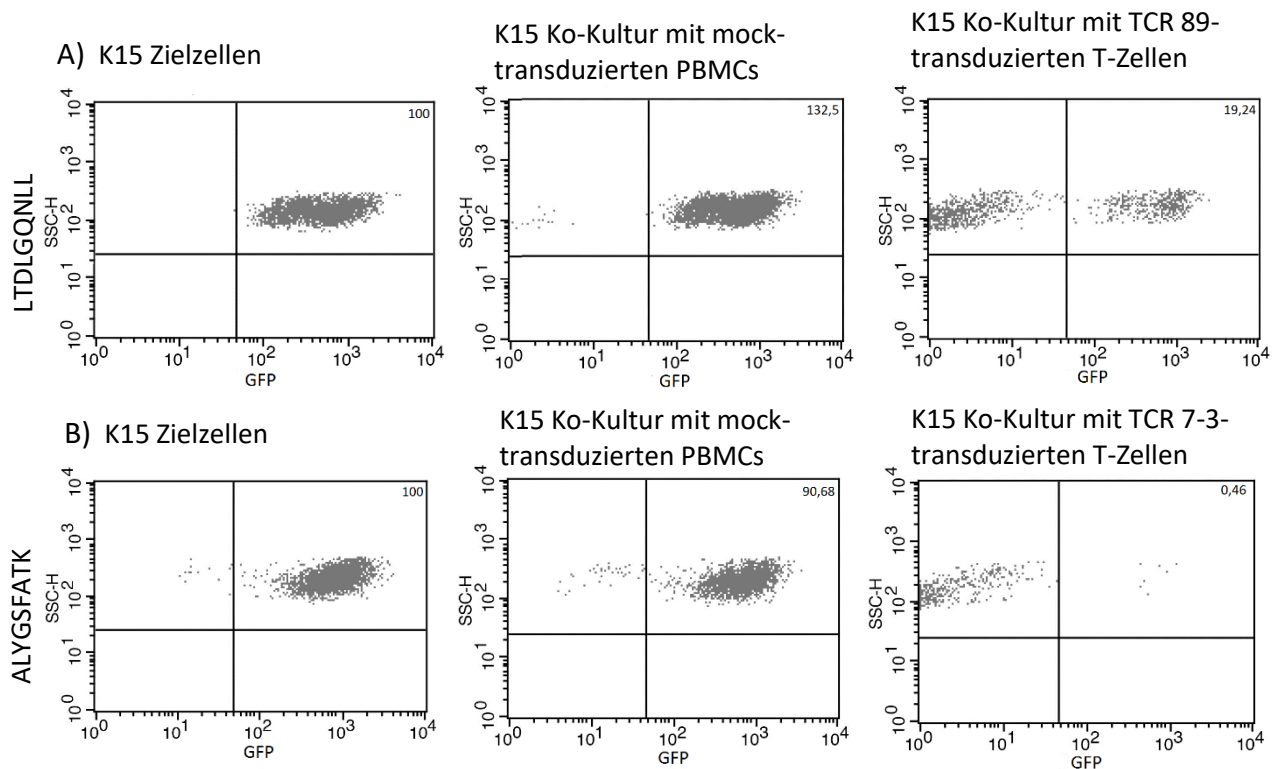
## 5.2 Zytotoxische Kapazität expandierter Primärzellen und transduzierter Zellen mit kloniertem T-Zell-Rezeptor

Mithilfe einer Multimer-Aufreinigung und TCR-SCAN-RACE PCR konnten T-Zell-Rezeptoren der ALYGSFATK und LTDLGQNLly spezifischen T-Zellen aus expandierten PBMCs isoliert werden. Nachdem die Transduktion der T-Zell-Rezeptoren in die Jurkat 76-Zelllinie erfolgreich war, wurden auch PBMCs mit den T-Zell Rezeptoren TCR ALYGSFATK 7-3, TCR LTDLGQNLly 89, TCR LTDLGQNLly 90 und TCR LTDLGQNLly 91 transduziert.



**Abbildung 21** Transduktionsrate der PBMCs mit LTDLGQNLLY- und ALYGSFATK-spezifischen TCR. A) PBMCs mit der HLA-A\*01:01 Restriktion wurden mit drei verschiedenen LTDLGQNLLY-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduziert (TCR 89, TCR 90 und TCR 91). Die Transduktionsrate beim TCR 89 lag bei 24,90 %, beim TCR 90 waren es 21,35 % und die niedrigsten Werte konnten beim TCR 91 mit 12,69 % mittels der LTDLGQNLLY-HLA-A\*01:01-Streptamerfärbung detektiert werden. HLA-A\*01:01-restringierten PBMCs vom gleichen Spender ohne klonierte T-Zell-Rezeptoren wurden als negative Kontrollen verwendet. B) PBMCs mit der HLA-A\*03:01 Restriktion wurden mit einem ALYGSFATK-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduziert. Die ALYGSFATK-HLA-A\*03:01-Dextramerfärbung konnte 15.20 % Spezifität auf aufweisen. Als negative Kontrolle wurden Mock-transduzierte PBMCs des gleichen Spenders verwendet.

Die Streptamerfärbung mit LTDLGQNLly-HLA-A\*01:01 konnte 24.90 % bis 12.69 % spezifische T-Zellen der transduzierten PBMCs mit der HLA-A\*01:01-Restriktion detektieren. PBMCs mit der HLA-A\*03:01-Restriktion wiesen nach der ALYGSFATK-HLA-A\*03:01 Dextramerfärbung 15.20 % Spezifität auf. PBMCs vom gleichen Spender ohne klonierten T-Zell-Rezeptoren wurden als negative Kontrollen verwendet (*Abbildung 21*).



**Abbildung 22** Die zytotoxische Kapazität der transduzierten PBMCs mit einem ALYGSFATK-spezifischen T-Zell-Rezeptor oder LTDLGQNLly-spezifischen T-Zell-Rezeptor TCR 89. A) PBMCs mit der besten Expressionsrate des LTDLGQNLly-T-Zell-Rezeptors wurden mit K15-Zielzellen ko-kultiviert. Die K15-Zielzellen exprimieren unter anderem GFP sowie HLA-A\*01:01 mit kovalent gebundenem LTDLGQNLly-Peptid. Mittels der Durchflusszytometrie wurde nach zwei Tagen nur noch 19,24 % der noch lebensfähig, GFP-produzierenden Targetzellen gemessen. B) Nach der Ko-Kultur der K15-Zielzellen (Expression von HLA-A\*01:01 mit kovalent gebundenem ALYGSFATK-Peptid) und der transduzierten PBMCs mit dem ALYGSFATK-T-Zell-Rezeptor ergab die Durchflusszytometriemessung 0,46 % der noch lebensfähigen Targetzellen. Im Vergleich dazu waren noch 90,68 % der Targetzellen in der Lage GFP zu exprimieren nach einer Ko-Kultur mit Mock-transduzierten PBMCs vom gleichen Spender.

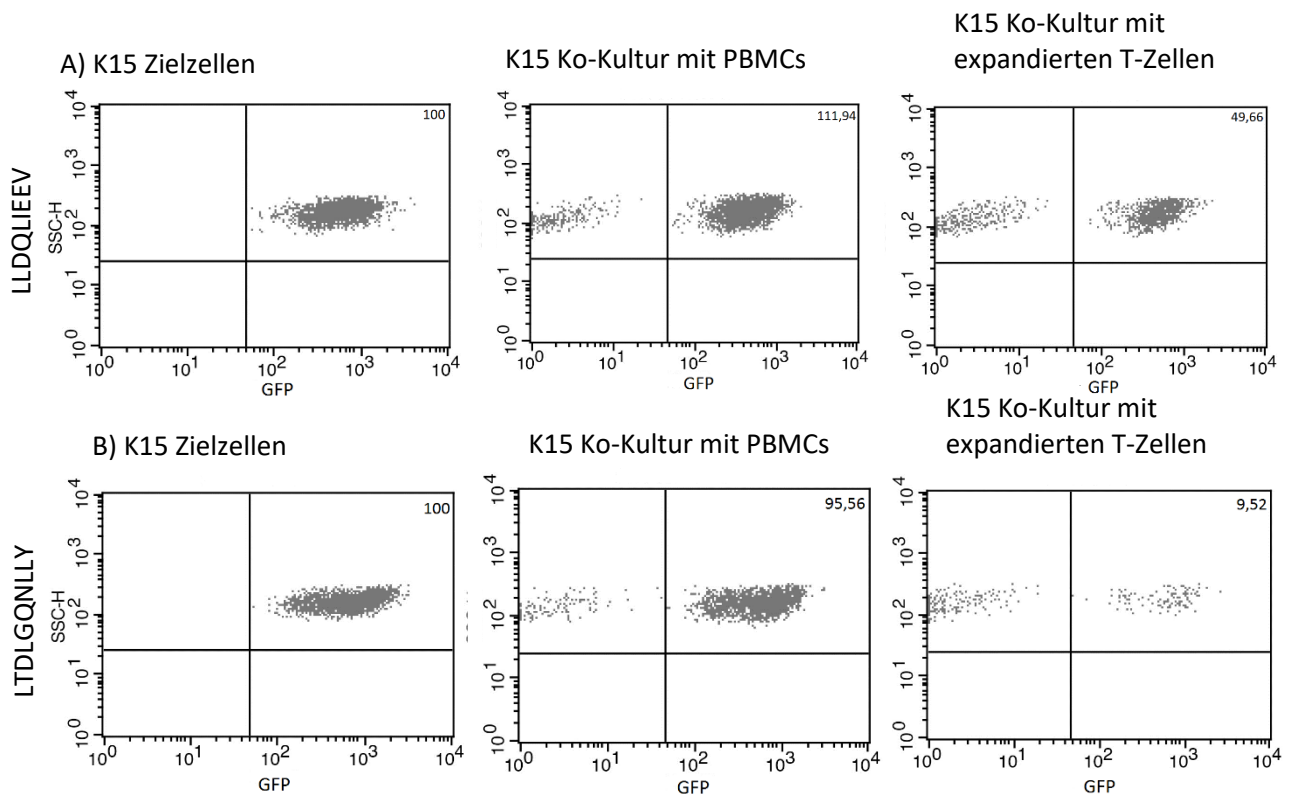
Die zytotoxische Kapazität der transduzierten PBMCs wurde ermittelt in dem PBMCs mit GFP-positiven K15-Zielzellen ko-kultiviert wurden. Nach zwei Tagen Inkubationszeit wurde die quantitative Auswertung der noch lebensfähigen GFP-positiven K15-Zellen mittels der

Durchflusszytometrie ausgeführt. Die T-Zellen der transduzierten PBMCs mit dem LTDLGQNLly-spezifischen T-Zell-Rezeptor waren in der Lage, innerhalb von zwei Tagen 80,76 % der Targetzellen zu lysieren. Die Messungen nach der Ko-Kultur der GFP-positiven K15-Zellen und der transduzierten PBMCs mit dem ALYGSFATK T-Zell-Rezeptor ergaben 0,46 % der noch lebensfähigen Targetzellen (*Abbildung 22*).

Die zytotoxische Kapazität der aus Buffy-Coats gewonnenen und expandierten PBMCs wurde ebenfalls mithilfe des Zytotoxizität-Assays bestimmt. PBMCs mit der Restriktion HLA-A\*02:01 und HLA-A\*01:01 wurden für 12 Tage mit Interleukin-2 sowie den Peptiden LTDLGQNLly oder LLDQLIEEV kultiviert. Aus den expandierten PBMCs wurden spezifische T-Zellen mittels einer Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD56<sup>+</sup> NK-Zellen angereichert, die mithilfe der Antikörper gekoppelten Microbeads erfolgte.

Die Streptamerfärbung mit LTDLGQNLly-HLA-A\*01:01 ergab einen Nachweis von bis zu 15,92 % spezifischer T-Zellen nach der Expansion der PBMCs und der Depletion [Keib et al., 2019]. Die Messungen der zytotoxischen Kapazität der T-Zellen, nach einer zweitägigen Ko-Kultur mit GFP-positiven K15-Targetzellen ergab eine durchschnittliche Zellviabilität von 7 % der Targetzellen (Mittelwert: 7 % der lebenden Zielzellen relativ zu den lebenden Zielzellen ohne die Anwesenheit von T-Zellen). Als Negativ-Kontrolle wurden für 12 Tage kultiviert PBMCs jeweils vom gleichen Spender ohne Peptid verwendet. Diese Zellen waren nicht in der Lage, die Targetzellen zu lysieren (Mittelwert 92 % lebender Zellen relativ zu den lebenden Zielzellen in der Abwesenheit von T-Zellen) [Keib et al., 2019].

Die Expansion und Anreicherung der HLA-A\*02:01 restringierten PBMCs ergab bis zu 17,55 % LLDQLIEEV spezifischer T-Zellen. Die zytotoxische Kapazität der T-Zellen wurde nach einer zweitägigen Ko-Kultur mit GFP-positiven K15-Zellen, mittels der Durchflusszytometrie ermittelt. Die Zellviabilität der K15-Targetzellen lag bei 49,66 % relativ zu den lebensfähigen K15-Zellen, die nicht zusammen mit den LLDQLIEEV-spezifischen T-Zellen kultiviert wurden (*Abbildung 23*).



**Abbildung 23 Exemplarische Darstellung der zytotoxischen Kapazität der CD8+ spezifischen T-Zellen expandiert mit den Peptiden LLDQLIEEV und LTDLGQNLLY.** A) Expandierte und angereicherte LLDQLIEEV spezifische T-Zellen wurden zusammen mit K15-Targetzellen (Expression von HLA-A\*02:01 und GFP) sowie dem Zusatz von LLDQLIEEV Peptid für zwei Tagen ko-kultiviert. Die zytotoxische Kapazität der T-Zellen wurde mittels der Durchflusszytometrie ermittelt. Die Zellviabilität der K15-Targetzellen lag bei 49,66 % relativ zu den lebensfähigen K15-Zellen, die nicht zusammen mit den LLDQLIEEV-spezifischen T-Zellen kultiviert wurden. Der Anteil der spezifischen Zellen nach einer Expansion und Anreicherung in den verwendeten PBMCs lag bei 17,55 % B) Die Messungen der zytotoxischen Kapazität der LTDLGQNLLY-spezifischen T-Zellen, nach einer zweitägigen Ko-Kultur mit GFP-positiven K15-Targetzellen ergab eine Zellviabilität von 9,52 % der Targetzellen. Der Anteil der spezifischen Zellen nach einer Expansion und Anreicherung in den verwendeten PBMCs lag bei 15,92 %. Als Negativ-Kontrolle wurden für 12 Tage kultiviert PBMCs jeweils vom gleichen Spender ohne Peptid verwendet. Diese Zellen waren nicht in der Lage, Targetzellen zu lysieren mit 95,56 % noch lebensfähigen Zellen [Keib et al., 2019].

### 5.3 Bestimmung der protektiven Kapazität spezifischer T-Zellen mittels *Adenovirus Dissemination Assay*

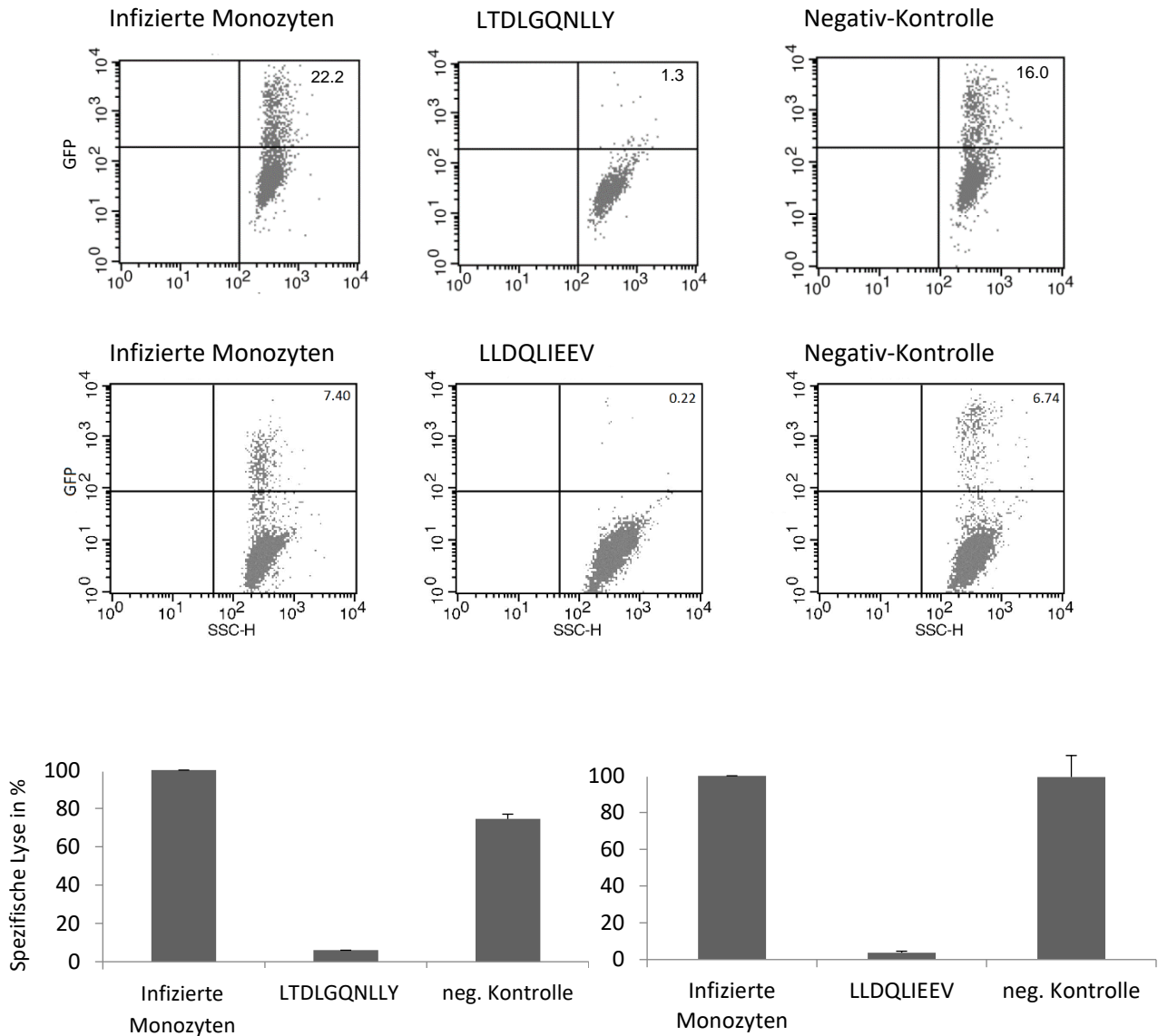
Jackson et al. beschreibt in den Veröffentlichungen von 2014 und 2017 eine neue Methode, die einen Nachweis liefert, dass die virale Ausbreitung durch HCMV-spezifische T-Zellen *in vitro* verhindert wird [Jackson et al, 2014; Jackson et al, 2017]. Der *Adenovirus Dissemination Assay* ist eine Adaption dieser Methode [Keib et al, 2019].

Im ersten Anlauf wurden Fibroblasten und A549 Targetzellen mit dem Adv11GFP infiziert, jedoch ergaben einige Ergebnisse unspezifische Werte und dieser Ansatz konnte nicht weiterverfolgt werden. Autologe dendritische Zellen wurden bereits als Targetzellen bei Analysen von Adenovirus-spezifischen T-Zellen beschrieben [Dörrie et al, 2014; Segerman et al 2006]. Aus diesem Grund wurden autologe, GM-CSF stimulierte Monozyten als Targetzellen gewählt. Monozyten wurden mithilfe von Microbeads aus PBMCs selektiert und für drei Tage mit GM-CSF kultiviert, bevor sie mit Adv11GFP infiziert wurden. Expandierte LTDLGQNLLY-spezifische T-Zellen sowie nicht stimulierte T-Zellen wurden dazugegeben, so dass ein Verhältnis 1:1 entstehen konnte zwischen infizierten Monozyten und spezifischen T-Zellen. Nach weiteren drei Tagen der Ko-Kultur LTDLGQNLLY-spezifischer T-Zellen und infizierter Monozyten konnte eine visuelle Auswertung mithilfe der Immun-Fluoreszenzmikroskopie oder eine quantitative Auswertung mittels der Durchflusszytometrie ausgeführt werden.

Nicht stimulierte Zellen konnten die virale Ausbreitung nicht verhindern, der Mittelwert von drei verschiedenen PBMC Spendern lag bei 77 % lebendigen GFP-positiven Monozyten nach der Normalisierung mit den infizierten Monozyten ohne T-Zellen (*Abbildung 24*). Im Gegensatz dazu konnten die LTDLGQNLLY-spezifischen T-Zellen signifikant die virale Ausbreitung mit einem Mittelwert von 14 % verbleibenden lebenden GFP-positiven Monozyten, verhindern [Keib et al, 2019].

Um zu ermitteln, ob auch LLDQLIEEV-spezifische T-Zellen eine virale Ausbreitung verhindern können, wurden die autologen GM-CSF behandelten Monozyten mit dem Adv5F35GFP-Stamm infiziert und mit nicht stimulierten Kontrollzellen sowie expandierten LLDQLIEEV spezifischen T-Zellen ko-kultiviert. LLDQLIEEV-spezifische T-Zellen mit einer 32 % Spezifität konnten die virale Ausbreitung verhindern mit einem Mittelwert von 4 % lebender GFP positiver Monozyten nach der Normalisierung mit den infizierten Monozyten ohne T-Zellen. Die nicht stimulierten Kontrollzellen konnten die Infektion nicht aufhalten mit einem Mittelwert von 99 % infizierten Monozyten. Diese Daten veranschaulichen, dass T-Zellen die spezifisch für ein Peptid-Epitop aus dem Nicht-Struktur-Protein E1A ebenfalls eine virale Ausbreitung verhindern können [Keib et al, 2019].



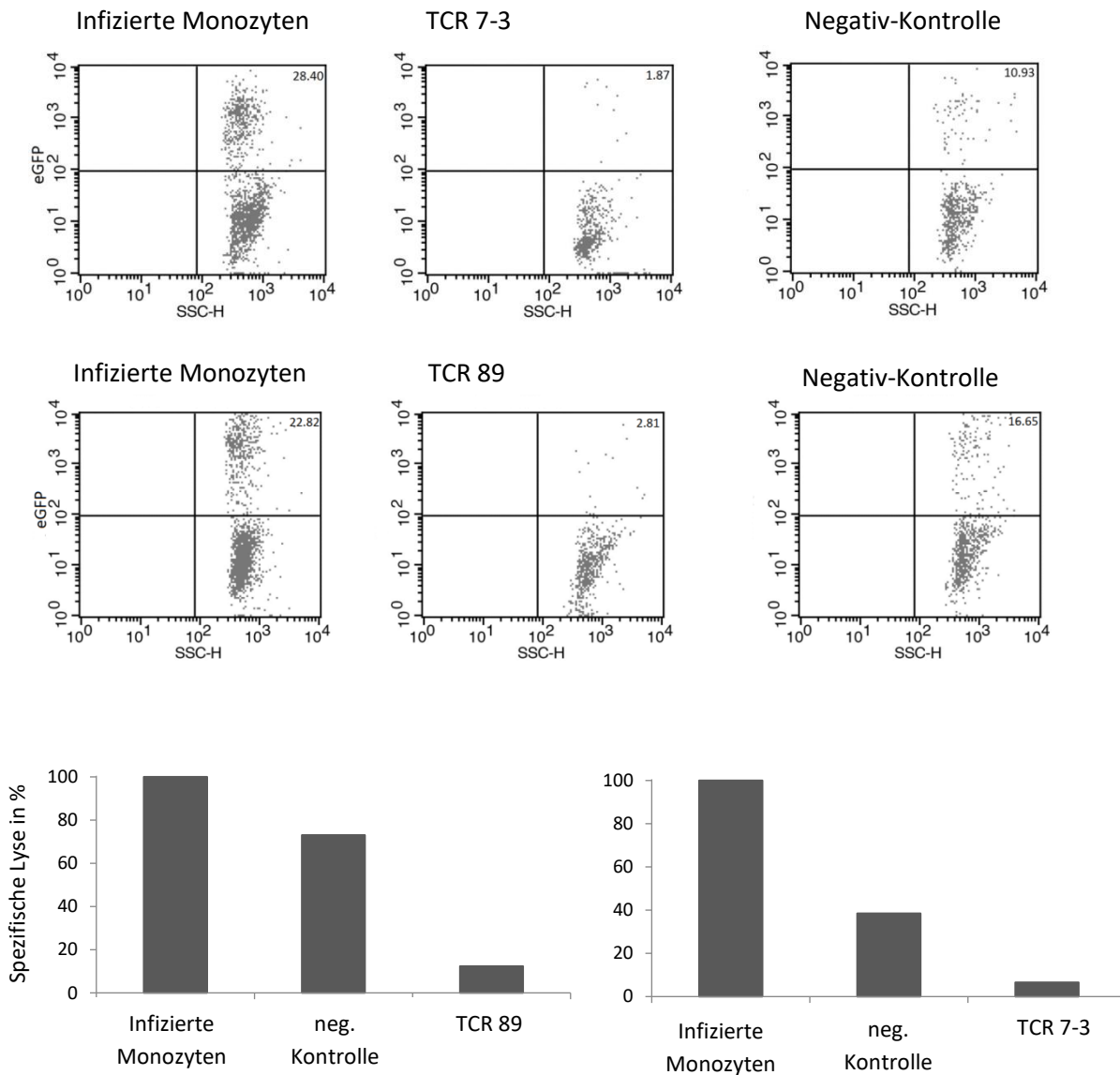


**Abbildung 24 Adenovirus Dissemination Assay mit HLA-A\*01:01- und HLA-A\*02:01-restrengierten PBMCs die mit den Peptiden LLDQLIEEV oder LTDLGQNLLY expandiert wurden.** A) GM-CSF behandelte autologe Monozyten wurden mit AdV11GFP infiziert. Expandierte LTDLGQNLLY-spezifische T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 zu infizierten Monozyten hinzugegeben. Nach drei Tagen konnte eine visuelle Auswertung mithilfe der Immuno-Fluoreszenzmikroskopie oder eine quantitative Auswertung mittels der Durchflusszytometrie ausgeführt werden. Die Negativ-Kontrolle mit nicht-spezifischen T-Zellen konnte die virale Ausbreitung nicht verhindern im Gegensatz zu den LTDLGQNLLY-spezifischen T-Zellen. Die Infektionsrate der Monozyten von 22,2 % lag nach der Ko-Kultur mit dem spezifischen T-Zellen bei 1,3 %. B) Expandierte LLDQLIEEV-Spezifische T-Zellen wurden mit Adv5F35GFP infizierten, autologen, GM-CSF behandelten Monozyten ko-kultiviert. Nach drei Tagen haben die Durchflusszytometrie Messungen eine Infektionsrate von 7.40 % ergeben, nach einer Ko-Kultur mit Kontroll-T-Zellen waren noch 6.74 % und mit den LLDQLIEEV-spezifische T-Zellen nur noch 0,22 % der Monozyten infiziert [Keib et al, 2019].

An der Technischen Universität München wurden HLA-A\*01:01 restringierte PBMCs mit LTDLGQNLly-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduziert. Mithilfe der LTDLGQNLly-HLA-A\*01:01-Streptamerfärbung konnten bis zu 25 % der spezifischen T-Zellen detektiert werden. Im Zytotoxizität-Assay konnte gezeigt werden, dass die transduzierten PBMCs in der Lage waren, K15GFP-Targetzellen mit einer kovalenten Bindung an das LTDLGQNLly-Peptid zu 80,76 % nach zwei Tagen zu lysieren. Der *Adenovirus Dissemination Assay* war in der Lage, nachzuweisen, dass die transduzierten PBMCs auch eine Infektion mit einem Adenovirus aufhalten konnten. Dafür wurden aus nicht-autologen Spender-PBMCs Monozyten isoliert und mit GM-CSF für zwei Tage kultiviert, bevor sie mit Adv5F35GFP infiziert wurden. PBMCs mit dem transduzierten T-Zell Rezeptoren wurden im Verhältnis 1:1 infizierter Monozyten zu LTDLGQNLly-spezifischen T-Zellen für vier Tage ko-kultiviert und optisch mittels Immun-Fluoreszenzmikroskopie und quantitativ mit der Durchflusszytometrie ausgewertet. Die transduzierten LTDLGQNLly-spezifischen T-Zellen konnten die Adv5F35GFP-Infektion verhindern mit nur noch 12,32 % lebensfähigen Monozyten relativ zu den infizierten Monozyten ohne T-Zellen. Die Ko-Kultur infizierter Monozyten mit nicht spezifischen T-Zellen ergab 72,92 % lebensfähiger Monozyten. Diese Ergebnisse zeigen, dass transduzierte PBMCs mit dem bereits beschriebenen LTDLGQNLly-T-Zell-Rezeptor nicht nur in der Lage sind, K15-Targetzellen zu lysieren, sondern auch mit dem Adenovirus infizierte Zellen zu erkennen und die Infektion zu minimalisieren.

Obwohl es nicht möglich war, in Primärzellen ALYGSFATK-spezifische T-Zellen mittels einer ALYGSFATK-HLA-A\*03:01-Dextramerfärbung nachzuweisen, war das IFN- $\gamma$  ELISPOT-Screening zielführend. An der Universität München wurden aus den PBMCs mit der höchsten Frequenz an ALYGSFATK-spezifischen T-Zellen, TCRs kloniert und in HLA-A\*03:01-restringierte PBMCs transduziert. Es konnte gezeigt werden, dass sich die transduzierten ALYGSFATK-spezifischen T-Zellen (15,20%) zytotoxisch ausgewirkt haben auf die K15-Targetzellen, die kovalent an ALYGSFATK-Peptid gebunden waren. Mithilfe des *Virus dissemination assay* konnte ebenfalls eine Reaktion auf Adv5F35GFP infizierte, mit GM-CSF stimulierte, HLA-A\*03:01 restringierte Monozyten nachgewiesen werden. Nach vier Tagen Ko-Kultur der infizierten Targetzellen und der transduzierten ALYGSFATK-spezifischen T-Zellen wurde die Infektionsrate der Targetzellen quantitativ mittels der Durchflusszytometrie ausgewertet. Die Ausbreitung der Adv5F35GFP-Infektion konnte relativ zu der Ko-Kultur mit nicht-transduzierten T-Zellen von 38,49 % infizierten Monozyten auf 6,58 % infizierten Monozyten reduziert werden (Normalisierung mit

den infizierten Monozyten ohne T-Zellen). Diese Ergebnisse zeigen, dass transduzierte PBMCs mit dem ALYGSFATK-spezifischen T-Zell-Rezeptor nicht nur in der Lage sind, K15-Targetzellen zu erkennen, sondern auch die Verbreitung einer Adenovirusinfektion in HLA-A\*03:01 restringierten Monozyten aufzuhalten (*Abbildung 25*).



**Abbildung 25 Adenovirus Dissemination Assay der transduzierten PBMCs mit spezifischen T-Zellrezeptor** A) Spender-Monozyten wurden für drei Tage mit GM-CSF behandelt und im Anschluss mit AdV5F35GFP infiziert. Mit ALYGSFATK-spezifischem T-Zell-Rezeptor transduzierte HLA-A\*03:01-restringierte PBMCs wurden zu den infizierten Monozyten hinzugegeben. Nach drei Tagen konnte eine visuelle Auswertung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie oder eine quantitative Auswertung mittels Durchflusszytometrie ausgeführt werden. Die Negativ-Kontrolle mit nicht spezifischen T-Zellen konnte die virale Ausbreitung nicht verhindern im Gegensatz zu den ALYGSFATK -spezifische T-Zellen. Die Infektionsrate der Monozyten von 28,40 % lag nach der Ko-Kultur mit dem spezifischen T-Zellen bei 1,87 % B) transduzierte LTDLGQNLly-spezifische T-Zellen wurden mit AdV5F35GFP infizierten, GM-CSF behandelten Monozyten ko-kultiviert. Nach drei Tagen haben die durchflusszytometrische Messungen eine Infektionsrate von 22.82 % ergeben, nach einer Ko-Kultur mit mock-transduzierten-T-Zellen waren es noch 16.65 % und mit den spezifische T-Zellen nur noch 2.81 % der Monozyten infiziert.

## 6 Diskussion

### 6.1 Generierung Antigen-spezifischer T-Zellen für den adoptiven T-Zell-Transfer

Der adoptiven T-Zell-Transfer wird zunehmend als eine effektive Behandlungsmethode für virale Infektionen bei immunsupprimierten Patienten anerkannt. Jedoch existieren mehrere Ansätze hierfür mit verschiedenen Vor- und Nachteilen.

Ein Ansatz ist ein Transfer spezifischer T-Zellen, nach einer *in vitro*-Expansion mithilfe der Antigen-Stimulation durch multiple Viren. Das hat den Vorteil der Einfachheit und Skalierbarkeit [Rooney und Leen, 2012; Papadopoulou et al., 2014]. Die Selektion und der Transfer spezifischer-T-Zellen, durch die IFN- $\gamma$ -Catch-Technologie, wurden bereits erfolgreich als Therapie bei EBV-, HCMV- und HAdV-Infektionen angewendet [Moosmann et al., 2010; Feuchtinger et al.; 2010, Feucht et al., 2015]. Ein wesentlicher Nachteil beider Ansätze ist der ausdifferenzierte Status und damit die geringere Funktionsfähigkeit der Zellen [Qian et al., 2016]. Als wichtiger Faktor für den klinischen Nutzen hat sich jedoch die Qualität und nicht die Quantität der transferierten Adenovirus-spezifischen T-Zellen herausgestellt [Feucht et al., 2015, Feuchtinger et al., 2006].

Ein alternativer Ansatz ist eine Transfusion mit Spenderlymphozyten, die eine geringe Anzahl virusspezifischer T-Zellen enthalten, die sich aber nach dem Transfer *in vivo* stark vermehren können. Bei einer HCMV-Infektion war der Transfer einer geringen Anzahl HCMV-spezifischer-T-Zellen ausreichend, um die Infektion zu eliminieren [Schmitt et al., 2011]. Die Selektion spezifischer T-Zellen kann mithilfe der reversiblen Peptid-HLA-Multimere erfolgen. Die Zellen behalten dabei die hohe proliferative Kapazität nach dem Transfer. Ebenfalls für eine HAdV-Infektion konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit durch reversible Peptid-HLA-Multimere selektierte Spenderlymphozyten erfolgreich sein kann [Stemberger et al., 2014].

Ein potentieller Nachteil der Spenderlymphozyten-Transfusion mithilfe einer Peptid-HLA-Multimer-Selektion ist, dass nur CD8<sup>+</sup> T-Zellen transferiert werden. Obwohl die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen normalerweise für das Überleben der CD8<sup>+</sup> T-Zellen benötigt werden, werden sie nicht ko-transferiert [Sun et al.; 2004]. Nichtsdestotrotz haben während der Infektion sowohl HCMV- und als auch HAdV-spezifische-CD8<sup>+</sup> T-Zellen ihre antivirale Funktion ausgeübt. Obwohl diese Zellen nicht auf Dauer überlebensfähig sind, reicht ihr Effekt aus, um eine akute Infektion zu beseitigen [Schmitt et al., 2011; Günther et al., 2015].

Spezifische-T-Zellen der ersten bekannten Spenderlymphozyten-Transfusionstherapie einer HAdV-Infektion wurden mithilfe der reversiblen LTDLGQNLLY-HLA\*01:01-Multimeren aus gesunden Spendern selektiert. Spezifische LTDLGQNLLY-T-Zellen exprimieren Marker, die mit einem niedrigen Differenzierungsstatus übereinstimmen und eine hohe proliferative, zytotoxische und IFN- $\gamma$ -produzierende Kapazität aufweisen [Günther et al., 2015].

In präklinische Studien wurden ebenfalls das Peptidepitop LLDQLIEEV von E1A abgeleitet mit der Restriktion HLA-A\*02:01, FRKDVNMVL und KPYSGTAYNAL mit der Restriktion HLA-C\*07:02, sowie TYFSLNNKF mit der Restriktion HLA-A\*24:01 alle von dem Hexonprotein abgeleitet, beschrieben. Hier wurden acht weitere Peptide vorgestellt: ALYGSFATK aus der DNA-Polymerase, RVLKKTTPMK (HLA-A\*03:01), GTFYLNHTFK, YTYEWNFRK, GTAYNALAPK (HLA-A\*11:01) von dem Hexonprotein abgeleitet, AEHTATTLNY (HLA-B\*44:02) von pTP, MPNLVPEVI von E1A und IPLQQVIAPI von E3RID (HLA-B\*51:01). In den vergangenen Jahren lag der Fokus auf Strukturproteinen wie dem Hexonprotein. Während auch hier potentielle Peptidepitope von dem Hexonprotein beschreiben werden, konnte aber auch eine Immundominanz der Peptide abgeleitet von den E1A, pTP, DNA Polymerase und E3RID nachgewiesen werden.

Mithilfe der bereits bekannten Peptidepitope und der hier neu beschriebenen, vielversprechenden Peptiden mit den HLA-Restriktionen A\*03:01, A\*11:01, B\*44:02, B\*51:01 könnten insgesamt 97 % der europäischen Bevölkerung therapiert werden.

Um zu bestätigen, dass HAdV-Infizierte APCs die präklinisch getesteten Peptide auf der Zelloberfläche präsentieren und von CD8<sup>+</sup> erkannt werden, wurden PBMCs mit Ad11pGFP oder Ad5F35GFP infiziert. Es konnten im Vergleich zu nicht-infizierten PBMCs deutlich höhere Frequenzen an CD8<sup>+</sup> peptidspezifischen T-Zellen detektiert werden. Peptidspezifischen-T-Zellen sowohl für das Peptid LTDLGQNLLY aus dem Hexonprotein als auch für das Peptid LLDQLIEEV aus E1A wurden durch HAdV-infizierte APCs stimuliert. Es müssen noch weitere Peptide getestet werden, aber sowohl diese Untersuchungen als auch die Tatsache, dass die Selektion spezifischer-T-Zellen mithilfe von reversiblen LTDLGQNLLY-HLA\*01:01-Multimeren im individuellem Heilversuch erfolgreich war, weist darauf hin, dass die präklinischen Untersuchungen klinisch übertragbar sind.

## 6.2 Funktionale Analyse der primären Epitop-spezifischen T-Zellen und T-Zellen mit einer ektopischen Expression der adenoviralen spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Einen neuen Ansatz für den adoptiven T-Zell-Transfer liefert die Transduktion körpereigener T-Zellen mit einem spezifischen TCR. TCR-transduzierte spezifische-T-Zellen sind ein hoch definiertes Produkt und in der Lage, die Problematik der HLA-Restriktion zu umgehen, da hier autologe T-Zellen mit einem spezifischen Rezeptor transduziert werden können. Das führt zu vielfältigen Therapiemöglichkeiten in unterschiedlichen klinischen Konstellationen und erweitert somit die Anwendung der adoptiven T-Zell-Therapie [Schober et al., 2019]. Allerdings ist auch hier die Identifizierung der Peptidepitope von Bedeutung. Mithilfe des hier neu beschriebenen Peptidepitopes ALYGSFATK wurden aus den spezifischen-T-Zellen TCRs identifiziert und in gesunde Spender-T-Zellen mit einer HLA-A\*03 Restriktion transduziert. TCR-transduzierte, ALYGSFATK-spezifische T-Zellen wiesen eine höhere Zytotoxizität bei Peptid-beladenen Zielzellen auf als spezifische-Primärzellen. Auch im Vergleich mit dem bereits klinisch-erfolgreichen Epitop LTDLGQNLLY konnten die TCR-transduzierte, ALYGSFATK-spezifische T-Zellen eine höhere Zytotoxizität aufweisen als TCR-transduzierte, LTDLGQNLLY-spezifische T-Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen nochmals die Immundominanz des Peptidepitops ALYGSFATK sowie die Funktionalität der Transduktion der T-Zellen mit dem spezifischen TCR.

Für Zytotoxizität-Assays wurden Peptid-beladenen Zielzellen verwendet, da es bisher für das Adenovirus keine Assays gab, die die antivirale Kapazität spezifischer T-Zellen in einer infektiösen Umgebung messen. In dieser Arbeit wurde die beschriebene T-Zell-Spezifität für LTDLGQNLLY genutzt, um einen einfachen und robusten *in vitro*-Assay zu entwickeln, der eine Messung der antiviralen Kapazität von T-Zellen ermöglicht [Keib et al., 2019]. Kürzlich wurde ein funktioneller Assay beschrieben, der die *in vitro* Kapazität von HCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen misst, eine virale Ausbreitung zu verhindern [Jackson et al., 2014; Jackson et al., 2017]. Da autologe dendritische Zellen bereits als Zielzellen für die funktionelle Analyse von Adenovirus-spezifischen T-Zellen verwendet wurden, wurden für den Assay autologe GM-CSF-stimulierte Monozyten mit Ad11pGFP oder Ad5pGFP infiziert und als Zielzellen verwendet [Dörrie et al., 2014]. Monozyten wurden mit einer niedrigen Infektionsmultiplikation mit dem Ad11pGFP oder Ad5pGFP infiziert, um die Verhinderung einer viralen Ausbreitung über die Zeit zu messen. Zusätzlich wurden die Anzahl der gesamten angereicherten T-Zellen und der

gesamten Monozyten gleich gehalten, was zu variablen, aber immer niedrigen Verhältnissen von spezifischen T-Zellen zu infizierten Monozyten im Bereich von 1:1 führte. Dies geschah mit dem Ziel, die physiologischen Bedingungen widerzuspiegeln. T-Zellen, die spezifische Epitope aus dem Strukturprotein Hexon erkenne, sind in der Lage, die Ausbreitung des Adenovirus auf den autologen Monozyten zu verhindern. T-Zellen, die für ein zweites Peptid-Epitop im Nicht-Strukturprotein E1A spezifisch sind, verhindern ebenfalls die virale Ausbreitung. Die Verhinderung der viralen Ausbreitung spiegelt sowohl die antivirale als auch die protektive Kapazität der spezifischen T-Zellen wider. Angesichts der klinisch protektiven Kapazität von LTDLGQNLLY-spezifischen T-Zellen in einem Patienten, sind vergleichbare Antworten der T-Zellen anderer Spezifikationen, in *Adenovirus Dissemination Assays* wahrscheinlich ähnlich schützend *in vivo*. *Adenovirus Dissemination Assays* sind so eingestellt, dass sie physiologische Bedingungen widerspiegeln: insbesondere die Anzahl der T-Zellen und Monozyten sind gleich groß, was zu einem niedrigen E:T-Verhältnis führt. Bei dem oben erwähnten Patienten erreichte die Anzahl der spezifischen T-Zellen 10 % aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen, was in der Größenordnung liegt, die im Virusdisseminationstest zu sehen ist.

Während alle analysierten LTDLGQNLLY-spezifischen T-Zellen die Ausbreitung des Virus *in vivo* verhindern konnten, konnte die Ausbreitung der Infektion nur mit LLDQLIEEV-spezifischen T-Zellen von PBMC-Spendern mit hohen Frequenzen an spezifischen T-Zellen verhindert werden. Diese Daten weisen auf einen Nachteil dieses Assays hin: ein Schwellenwert an spezifischen T-Zellen ist erforderlich, um die antivirale Kapazität nachzuweisen. Dieser Schwellenwert wird meist aber nicht nach Kurzzeit-Expansion von Peptid-Epitop-spezifischen T-Zellen erreicht. In diesem Sinne spiegelt der *Adenovirus Dissemination Assay* nicht die klinische Situation wider, in der Patienten trotz hoher Viruslast mit Cidofovir über viele Wochen hinweg überleben können und somit die Zeit haben, spezifische schützende T-Zell-Antworten zu entwickeln. Viele antivirale T-Zell-Antworten werden daher beim *Adenovirus Dissemination Assay* einfach übersehen.

Eine einfache Lösung ist, spezifische T-Zellen mit reversiblen Peptid-HLA-Streptameren auf eine Frequenz höher als 8 % aller T-Zellen anzureichern. Die geringe Anzahl der HAdV-spezifischen T-Zellen in nicht-stimulierten PBMC erlauben es, diese Zellen als Kontrolle zu verwenden. Nicht stimulierte T-Zellen vom gleichen Spender, kultiviert unter denselben Kurzzeit-Kulturbedingungen mit Ausnahme der Peptidzugabe, bieten eine geeignete

Kontrolle, um die spezifische Funktion von T-Zellen zu beurteilen. Möglicherweise ist dieser Assay auch geeignet, um Antworten auf andere Viren zu messen. Wir bezeichnen unseren Assay vor allem deshalb als „viralen Disseminationsassay“, weil er auf dem zuvor beschriebenen HCMV-Disseminationsassay basiert. Allerdings wurde die Ko-Kulturzeit auf nur drei Tage reduziert und somit die Zeit für die virale Dissemination aus produktiv infizierten Monozyten. Prävention der viralen Dissemination kann in dem Assay durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder auch durch NK-Zellen verhindert werden.

Das Ad5F35GFP-Virus infiziert myeloische Zellen, wie z. B. APCs. Das Virus ist ein unschätzbare Werkzeug zur Identifizierung von funktionellen Peptid-Epitopen in den für Kinder relevanten Adenoviren der Spezies C.

Der letzte, vielleicht nützlichste Vorteil des *Adenovirus Dissemination Assays* ist, dass für eine erfolgreiche Durchführung die Spezifität der T-Zellen nicht unbedingt bekannt sein muss, da die Zielzellen autologe Monozyten sind. Dieser Assay kann daher eine funktionelle Charakterisierung von T-Zellen mit unbekannter Adenovirus-Spezifität nach Expansion mit etablierten Protokollen mit Peptidbibliotheken oder viralen Vektoren ermöglichen.

HAdV-Epitop-spezifischer T-Zellen aus strukturellen und nicht-strukturellen Proteinen weisen eine antivirale Kapazität auf, die mithilfe des neuartigen *in vitro* Assay gezeigt werden konnte.

Die antivirale Kapazität primärer Epitop-spezifischer T-Zellen war zwar vergleichbar mit der von TCR-transduzierten Epitop-spezifischen T-Zellen, verhinderte aber auch unspezifisch die Ausbreitung des Virus` (*Abbildung 25*). Dies könnte an den allogenen Monozyten als APCs und dadurch einer nicht exakten HLA Übereinstimmung liegen. Wegen der kurzen Ko-Kulturzeit ist jedoch eine Nichtübereinstimmung von KIR-Rezeptoren der NK-Zellen wahrscheinlicher. Während die expandierten T-Zellen durch eine CD4- und CD59-Depletion angereichert wurden, fand dieser Schritt wegen der bereits hohen Zellzahl an Epitop-spezifischen T-Zellen bei den TCR-transduzierten T-Zellen nicht statt. Dies müsste in weiteren Versuchen noch untersucht werden.

Es bleibt abzuwarten, welche Strategie sich in Zukunft für die adoptive T-Zell-Therapie zur Behandlung immunsupprimierter Patienten mit einer HAdV-Infektion in der klinischen Anwendung etablieren wird.



## Literaturverzeichnis

Adenoviral Vectors for Gene Therapy (2016). Unter Mitarbeit von Andrea Amalfitano Yasser Aldhamen: Elsevier.

Ahi, Yadvinder S.; Mittal, Suresh K. (2016): Components of Adenovirus Genome Packaging. In: *Frontiers in microbiology* 7, S. 1503. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01503.

Aldhamen, Yasser A.; Amalfitano, Andrea (2016): Methods to Mitigate Immune Responses to Adenoviral Vectors. In: *Adenoviral Vectors for Gene Therapy*. Unter Mitarbeit von Andrea Amalfitano Yasser Aldhamen: Elsevier, S. 391–422.

Arnberg, Niklas (2012): Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. In: *Trends in pharmacological sciences* 33 (8), S. 442–448. DOI: 10.1016/j.tips.2012.04.005.

Bierer, B. E.; Sleckman, B. P.; Ratnofsky, S. E.; Burakoff, S. J. (1989): The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. In: *Annual review of immunology* 7, S. 579–599. DOI: 10.1146/annurev.iy.07.040189.003051.

Bil-Lula, Iwona; Ussowicz, Marek; Rybka, Blanka; Wendycz-Domalewska, Danuta; Ryczan, Renata; Gorczyńska, Ewa et al. (2010): PCR diagnostics and monitoring of adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients. In: *Archives of virology* 155 (12), S. 2007–2015. DOI: 10.1007/s00705-010-0802-1.

Burbulla, Daniel; Günther, Patrick S.; Peper, Janet K.; Jahn, Gerhard; Dennehy, Kevin M. (2016): Human CD8(+) T Cells Target Multiple Epitopes in Respiratory Syncytial Virus Polymerase. In: *Viral Immunol* 29 (5), S. 307–314. DOI: 10.1089/vim.2015.0091.

Chakrabarti, Suparno; Mautner, Vivien; Osman, Husam; Collingham, Kathryn E.; Fegan, Chris D.; Klapper, Paul E. et al. (2002): Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. In: *Blood* 100 (5), S. 1619–1627. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0377.

Chang, Sui-Yuan; Lee, Chun-Nan; Lin, Pi-Han; Huang, Hsueh-Hung; Chang, Luan-Yin; Ko, Wilson et al. (2008): A community-derived outbreak of adenovirus type 3 in children in Taiwan between 2004 and 2005. In: *Journal of medical virology* 80 (1), S. 102–112. DOI: 10.1002/jmv.21045.

Chien, Yueh-hsiu; Konigshofer, Yves (2007): Antigen recognition by gammadelta T cells. In: *Immunological reviews* 215, S. 46–58. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00470.x.

Claas, Eric C. J.; Schilham, Marco W.; Brouwer, Caroline S. de; Hubacek, Petr; Echavarria, Marcela; Lankester, Arjan C. et al. (2005): Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. In: *Journal of Clinical Microbiology* 43 (4), S. 1738–1744. DOI: 10.1128/JCM.43.4.1738-1744.2005.

Dörrie, Jan; Krug, Christian; Hofmann, Christian; Müller, Ina; Wellner, Verena; Knippertz, Ilka et al. (2014): Human adenovirus-specific  $\gamma/\delta$  and CD8+ T cells generated by T-cell receptor transfection to treat adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. In: PLoS one 9 (10), e109944. DOI: 10.1371/journal.pone.0109944.

Feucht, Judith; Opherk, Kathrin; Lang, Peter; Kayser, Simone; Hartl, Lena; Bethge, Wolfgang et al. (2015): Adoptive T-cell therapy with hexon-specific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSCT. In: Blood 125 (12), S. 1986–1994. DOI: 10.1182/blood-2014-06-573725.

Feuchtinger, Tobias; Lang, Peter; Hamprecht, Klaus; Schumm, Michael; Greil, Johann; Jahn, Gerhard et al. (2004): Isolation and expansion of human adenovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy. In: Experimental hematology 32 (3), S. 282–289. DOI: 10.1016/j.exphem.2003.12.009.

Feuchtinger, Tobias; Lücke, Julia; Hamprecht, Klaus; Richard, Celine; Handgretinger, Rupert; Schumm, Michael et al. (2005): Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. In: British journal of haematology 128 (4), S. 503–509. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05331.x.

Feuchtinger, Tobias; Opherk, Kathrin; Bethge, Wolfgang A.; Topp, Max S.; Schuster, Friedhelm R.; Weissinger, Eva M. et al. (2010): Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. In: Blood 116 (20), S. 4360–4367. DOI: 10.1182/blood-2010-01-262089.

Fields, Bernard N.; Knipe, David Mahan; Howley, Peter M. (Hg.) (2007): Fields' virology. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0712/2006032230-d.html>.

Flomenberg, P.; Babbitt, J.; Drobycki, W. R.; Ash, R. C.; Carrigan, D. R.; Sedmak, G. V. et al. (1994): Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. In: The Journal of infectious diseases 169 (4), S. 775–781. DOI: 10.1093/infdis/169.4.775.

Fujisaki, Hiroyuki; Kakuda, Harumi; Shimasaki, Noriko; Imai, Chihaya; Ma, Jing; Lockey, Timothy et al. (2009): Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. In: Cancer research 69 (9), S. 4010–4017. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3712.

Galperin, Moran; Farenc, Carine; Mukhopadhyay, Madhura; Jayasinghe, Dhilshan; Decroos, Amandine; Benati, Daniela et al. (2018): CD4+ T cell-mediated HLA class II cross-restriction in HIV controllers. In: Science immunology 3 (24). DOI: 10.1126/sciimmunol.aat0687.

Geyeregger, René; Freimüller, Christine; Stemberger, Julia; Artwohl, Michaela; Witt, Volker; Lion, Thomas et al. (2014): First-in-man clinical results with good manufacturing practice (GMP)-compliant polypeptide-expanded adenovirus-specific T cells after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. In: Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997) 37 (4), S. 245–249. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000034.

Geyeregger, René; Freimüller, Christine; Stevanovic, Stefan; Stemberger, Julia; Mester, Gabor; Dmytrus, Jasmin et al. (2013): Short-term in-vitro expansion improves monitoring and allows affordable generation of virus-specific T-cells against several viruses for a broad clinical application. In: *PloS one* 8 (4), e59592. DOI: 10.1371/journal.pone.0059592.

Goldberg, Anna Carla; Rizzo, Luiz Vicente (2015): MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. In: *Einstein (Sao Paulo, Brazil)* 13 (1), S. 153–156. DOI: 10.1590/S1679-45082015RB3122.

Greber, Urs F.; Flatt, Justin W. (2019): Adenovirus Entry: From Infection to Immunity. In: *Annual review of virology* 6 (1), S. 177–197. DOI: 10.1146/annurev-virology-092818-015550.

Gregory, Seth M.; Nazir, Shoab A.; Metcalf, Jordan P. (2011): Implications of the innate immune response to adenovirus and adenoviral vectors. In: *Future virology* 6 (3), S. 357–374. DOI: 10.2217/fvl.11.6.

Günther, Patrick S.; Peper, Janet K.; Faist, Benjamin; Kayser, Simone; Hartl, Lena; Feuchtinger, Tobias et al. (2015): Identification of a Novel Immunodominant HLA-B\*07: 02-restricted Adenoviral Peptide Epitope and Its Potential in Adoptive Transfer Immunotherapy. In: *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 38 (7), S. 267–275. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000087.

Gwozdowicz, Slawomir; Nestorowicz, Klaudia; Graczyk-Pol, Elzbieta; Szlendak, Urszula; Rogatko-Koros, Marta; Mika-Witkowska, Renata et al. (2019): KIR specificity and avidity of standard and unusual C1, C2, Bw4, Bw6 and A3/11 amino acid motifs at entire HLA:KIR interface between NK and target cells, the functional and evolutionary classification of HLA class I molecules. In: *International journal of immunogenetics* 46 (4), S. 217–231. DOI: 10.1111/iji.12433.

Hall, Kathryn; Blair Zajdel, Maria E.; Blair, G. Eric (2010): Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. In: *The Biochemical journal* 431 (3), S. 321–336. DOI: 10.1042/BJ20100766.

Holly, Mayumi K.; Diaz, Karina; Smith, Jason G. (2017): Defensins in Viral Infection and Pathogenesis. In: *Annual review of virology* 4 (1), S. 369–391. DOI: 10.1146/annurev-virology-101416-041734.

Ismail, Ashrafali M.; Lee, Ji Sun; Lee, Jeong Yoon; Singh, Gurdeep; Dyer, David W.; Seto, Donald et al. (2018): Adenoviromics: Mining the Human Adenovirus Species D Genome. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 2178. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02178.

Ison, Michael G. (2006): Adenovirus infections in transplant recipients. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 43 (3), S. 331–339. DOI: 10.1086/505498.

Ison, Michael G.; Hayden, Randall T. (2016): Adenovirus. In: *Microbiology spectrum* 4 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0020-2015.

Jackson, S. E.; Mason, G. M.; Okecha, G.; Sissons, J. G. P.; Wills, M. R. (2014): Diverse specificities, phenotypes, and antiviral activities of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. In: *Journal of virology* 88 (18), S. 10894–10908. DOI: 10.1128/JVI.01477-14.

Jackson, Sarah E.; Sedikides, George X.; Mason, Gavin M.; Okecha, Georgina; Wills, Mark R. (2017): Human Cytomegalovirus (HCMV)-Specific CD4+ T Cells Are Polyfunctional and Can Respond to HCMV-Infected Dendritic Cells In Vitro. In: *Journal of virology* 91 (6). DOI: 10.1128/JVI.02128-16.

Jooss, K.; Chirmule, N. (2003): Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. In: *Gene therapy* 10 (11), S. 955–963. DOI: 10.1038/sj.gt.3302037.

Kawasaki, Takumi; Kawai, Taro (2014): Toll-like receptor signaling pathways. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 461. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00461.

Keib, Anna; Günther, Patrick S.; Faist, Benjamin; Halenius, Anne; Busch, Dirk H.; Neuenhahn, Michael et al. (2017): Presentation of a Conserved Adenoviral Epitope on HLA-C\*0702 Allows Evasion of Natural Killer but Not T Cell Responses. In: *Viral Immunol* 30 (3), S. 149–156. DOI: 10.1089/vim.2016.0145.

Keib, Anna; Mei, Ya-Fang; Cicin-Sain, Luka; Busch, Dirk H.; Dennehy, Kevin M. (2019): Measuring Antiviral Capacity of T Cell Responses to Adenovirus. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 202 (2), S. 618–624. DOI: 10.4049/jimmunol.1801003.

Khanal, Subrat; Ghimire, Pranita; Dhamoon, Amit S. (2018): The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. In: *Biomedicines* 6 (1). DOI: 10.3390/biomedicines6010030.

Klein, J.; Sato, A. (2000): The HLA system. First of two parts. In: *The New England journal of medicine* 343 (10), S. 702–709. DOI: 10.1056/NEJM200009073431006.

Kosulin, K.; Geiger, E.; Vécsei, A.; Huber, W-D; Rauch, M.; Brenner, E. et al. (2016): Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22 (4), 381.e1-381.e8. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.12.013.

Lasswitz, Lisa; Chandra, Naresh; Arnberg, Niklas; Gerold, Gisa (2018): Glycomics and Proteomics Approaches to Investigate Early Adenovirus-Host Cell Interactions. In: *Journal of molecular biology* 430 (13), S. 1863–1882. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.04.039.

Lee, Yeon Joo; Prockop, Susan E.; Papanicolaou, Genovefa A. (2017): Approach to adenovirus infections in the setting of hematopoietic cell transplantation. In: *Current opinion in infectious diseases* 30 (4), S. 377–387. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000379.

Leen, Ann M.; Bollard, Catherine M.; Myers, Gary D.; Rooney, Cliona M. (2006): Adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 12 (3), S. 243–251. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.10.024.

Leen, Ann M.; Sili, Uluhan; Savoldo, Barbara; Jewell, Alan M.; Piedra, Pedro A.; Brenner, Malcolm K.; Rooney, Cliona M. (2004): Fiber-modified adenoviruses generate subgroup cross-reactive, adenovirus-specific cytotoxic T lymphocytes for therapeutic applications. In: *Blood* 103 (3), S. 1011–1019. DOI: 10.1182/blood-2003-07-2449.

Lynch, Joseph P.; Kajon, Adriana E. (2016): Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 37 (4), S. 586–602. DOI: 10.1055/s-0036-1584923.

Ma, Hsin-Chieh; Hearing, Patrick (2011): Adenovirus structural protein IIIa is involved in the serotype specificity of viral DNA packaging. In: *Journal of virology* 85 (15), S. 7849–7855. DOI: 10.1128/JVI.00467-11.

Mangel, Walter F.; San Martín, Carmen (2014): Structure, function and dynamics in adenovirus maturation. In: *Viruses* 6 (11), S. 4536–4570. DOI: 10.3390/v6114536.

Mei, Ya-Fang; Wu, Haidong; Hultenby, Kjell; Silver, Jim (2016): Complete replication-competent adenovirus 11p vectors with E1 or E3 insertions show improved heat stability. In: *Virology* 497, S. 198–210. DOI: 10.1016/j.virol.2016.07.026.

Modrow, Susanne (2010): *Molekulare Virologie*. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10403692>.

Nielsen, Morten; Lundegaard, Claus; Worning, Peder; Lauemøller, Sanne Lise; Lamberth, Kasper; Buus, Søren et al. (2003): Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 12 (5), S. 1007–1017. DOI: 10.1110/ps.0239403.

Papadopoulou, Anastasia; Gerdemann, Ulrike; Katari, Usha L.; Tzannou, Ifigenia; Liu, Hao; Martinez, Caridad et al. (2014): Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. In: *Science translational medicine* 6 (242), 242ra83. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008825.

Qian, Chongsheng; Wang, Yingying; Cai, Huili; Laroye, Caroline; Carvalho Bittencourt, Marcelo de; Clement, Laurence et al. (2016): Adenovirus-specific T-cell Subsets in Human Peripheral Blood and After IFN- $\gamma$  Immunomagnetic Selection. In: *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 39 (1), S. 27–35. DOI: 10.1097/CJI.000000000000105.

Rabalais, G. P.; Stout, G. G.; Ladd, K. L.; Cost, K. M. (1992): Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. In: *Journal of Clinical Microbiology* 30 (6), S. 1505–1508.

Radke, Jay R.; Cook, James L. (2018): Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. In: *Current opinion in infectious diseases* 31 (3), S. 251–256. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000451.

Rammensee, Hans-Georg (1995): Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. In: *Current Opinion in Immunology* 7 (1), S. 85–96. DOI: 10.1016/0952-7915(95)80033-6.

Reddy, Vijay S.; Natchiar, S. Kundhavai; Stewart, Phoebe L.; Nemerow, Glen R. (2010): Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. In: *Science (New York, N.Y.)* 329 (5995), S. 1071–1075. DOI: 10.1126/science.1187292.

REED, L. J.; MUENCH, H. (1938): A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS<sup>12</sup>. In: *American Journal of Epidemiology* 27 (3), S. 493–497. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

Richman, Douglas D.; Whitley, Richard J.; Hayden, Frederick G. (Hg.) (2017): *Clinical virology*. Fourth edition. Washington, DC: ASM Press.

ROWE, W. P.; HUEBNER, R. J.; GILMORE, L. K.; PARROTT, R. H.; WARD, T. G. (1953): Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 84 (3), S. 570–573. DOI: 10.3181/00379727-84-20714.

Russell, W. C. (2009): Adenoviruses: update on structure and function. In: *The Journal of general virology* 90 (Pt 1), S. 1–20. DOI: 10.1099/vir.0.003087-0.

San Martín, Carmen (2012): Latest insights on adenovirus structure and assembly. In: *Viruses* 4 (5), S. 847–877. DOI: 10.3390/v4050847.

Sandkovsky, Uriel; Vargas, Luciano; Florescu, Diana F. (2014): Adenovirus: current epidemiology and emerging approaches to prevention and treatment. In: *Current infectious disease reports* 16 (8), S. 416. DOI: 10.1007/s11908-014-0416-y.

Schmidt, Alexander H.; Baier, Daniel; Solloch, Ute V.; Stahr, Andrea; Cereb, Nezhil; Wassmuth, Ralf et al. (2009): Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. In: *Human immunology* 70 (11), S. 895–902. DOI: 10.1016/j.humimm.2009.08.006.

Schmitt, Anita; Tonn, Torsten; Busch, Dirk H.; Grigoleit, Götz Ulrich; Einsele, Hermann; Odendahl, Marcus et al. (2011): Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. In: *Transfusion* 51 (3), S. 591–599. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02940.x.

Schober, Kilian; Müller, Thomas R.; Gökmen, Füsün; Grassmann, Simon; Effenberger, Manuel; Poltorak, Mateusz et al. (2019): Orthotopic replacement of T-cell receptor  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains with preservation of near-physiological T-cell function. In: *Nature biomedical engineering* 3 (12), S. 974–984. DOI: 10.1038/s41551-019-0409-0.

Segerman, Anna; Lindman, Kristina; Mei, Ya-Fang; Allard, Annika; Wadell, Göran (2006): Adenovirus types 11p and 35 attach to and infect primary lymphocytes and monocytes, but hexon expression in T-cells requires prior activation. In: *Virology* 349 (1), S. 96–111. DOI: 10.1016/j.virol.2005.12.044.

Shirley, Jamie L.; Jong, Ype P. de; Terhorst, Cox; Herzog, Roland W. (2020): Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (3), S. 709–722. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.01.001.

Sidney, John; Peters, Bjoern; Sette, Alessandro (2020): Epitope prediction and identification- adaptive T cell responses in humans. In: *Seminars in immunology* 50, S. 101418. DOI: 10.1016/j.smim.2020.101418.

Sobhy, Haitham (2017): A comparative review of viral entry and attachment during large and giant dsDNA virus infections. In: *Archives of virology* 162 (12), S. 3567–3585. DOI: 10.1007/s00705-017-3497-8.

Stemberger, Christian; Graef, Patricia; Odendahl, Marcus; Albrecht, Julia; Dössinger, Georg; Anderl, Florian et al. (2014): Lowest numbers of primary CD8(+) T cells can reconstitute protective immunity upon adoptive immunotherapy. In: *Blood* 124 (4), S. 628–637. DOI: 10.1182/blood-2013-12-547349.

Sun, Joseph C.; Williams, Matthew A.; Bevan, Michael J. (2004): CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. In: *Nature immunology* 5 (9), S. 927–933. DOI: 10.1038/ni1105.

Suzuki, Masataka; Rooney, Cliona M. (2012): Adenovirus immunity: X marks the spot. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (12), S. 2197–2198. DOI: 10.1038/mt.2012.240.

Tischer, Sabine; Geyeregger, René; Kwoczek, Julian; Heim, Albert; Figueiredo, Constanca; Blasczyk, Rainer et al. (2016): Discovery of immunodominant T-cell epitopes reveals penton protein as a second immunodominant target in human adenovirus infection. In: *Journal of translational medicine* 14 (1), S. 286. DOI: 10.1186/s12967-016-1042-2.

Turner, D. (2004): The human leucocyte antigen (HLA) system. In: *Vox sanguinis* 87 Suppl1, S. 87–90. DOI: 10.1111/j.1741-6892.2004.00438.x.

van Doornum, G. J. J.; Jong, J. C. de (1998): Rapid Shell Vial Culture Technique for Detection of Enteroviruses and Adenoviruses in Fecal Specimens: Comparison with Conventional Virus Isolation Method. In: *Journal of Clinical Microbiology* 36 (10), S. 2865–2868.

Vere Hodge, R. Anthony (2017): Meeting report: 29th International Conference on Antiviral Research in La Jolla, CA, USA. In: *Antiviral research* 137, S. 23–40. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.10.014.

Waye, Mary Miu Yee; Sing, Chor Wing (2010): Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. In: *Pharmaceuticals* 3 (10), S. 3343–3354. DOI: 10.3390/ph3103343.

Wiethoff, Christopher M.; Nemerow, Glen R. (2015): Adenovirus membrane penetration: Tickling the tail of a sleeping dragon. In: *Virology* 479-480, S. 591–599. DOI: 10.1016/j.virol.2015.03.006.

Wy Ip, Winnie; Qasim, Waseem (2013): Management of adenovirus in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *Advances in hematology* 2013, S. 176418. DOI: 10.1155/2013/176418.

Yeung, Rani; Eshaghi, AliReza; Lombos, Ernesto; Blair, Joanne; Mazzulli, Tony; Burton, Laura; Drews, Steven J. (2009): Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007-June 2008. In: *Virology journal* 6, S. 11. DOI: 10.1186/1743-422X-6-11.

Zhao, Hongxing; Chen, Maoshan; Pettersson, Ulf (2014): A new look at adenovirus splicing. In: *Virology* 456-457, S. 329–341. DOI: 10.1016/j.virol.2014.04.006.

Zheng, Yueting; Stamminger, Thomas; Hearing, Patrick (2016): E2F/Rb Family Proteins Mediate Interferon Induced Repression of Adenovirus Immediate Early Transcription to Promote Persistent Viral Infection. In: *PLoS pathogens* 12 (1), e1005415. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005415.

Ziegler, S. F.; Ramsdell, F.; Alderson, M. R. (1994): The activation antigen CD69. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 12 (5), S. 456–465. DOI: 10.1002/stem.5530120502.



## Abkürzungsverzeichnis

AdV	Adenovirus
ALP	Alkalische Phosphatase
ANNs	Artificial neural networks
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor
CPE	cytopathischer Effekt oder zytopathischer Effekt
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DBP	DNA-bindendes Protein
DCs	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
FKS	Fetales Kälberserum
FSC/SSC	Forward scatter/Side scatter
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
GVHD	Graft-versus-host disease
HAdV	Human Adenovirus

HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HSZT	Stammzelltransplantation
IFNs	Interferone
IFN- $\gamma$	Interferon- Gamma
IL	Interleukin
ITR	Inverted terminal repeats
kbp	Kilobasenpaar
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOI	Multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Natürliche Killerzellen
ORF	Open reading frame
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Pol	DNA Polymerase
PD	Packaging domain
RNA	Ribonukleinsäure
RIG-I	Retinoic acid inducible gene
RT	Raumtemperatur
TCR	T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TLR	Toll-Like-Rezeptor

## Danksagung

Ein ganz besonderer Dank geht einerseits an Kevin Michael Dennehy (PhD) und Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen. Insbesondere bin ich sehr dankbar für die technische und wissenschaftliche Beratung. Ich hoffe alle Ratschläge in meinem zukünftigen Werdegang umsetzen und an andere weitergeben zu können.

Weiterhin bedanke ich mich bei Institutsleiter Prof. Dr. rer. nat. Thomas Iftner und ehemaligen Institutsleiter Prof. Dr. med. Gerhard Jahn für die Möglichkeit mein Promotionsvorhaben, am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruserkrankungen am Universitätsklinikum Tübingen umsetzen zu können.

Weiterer Dank geht an Dario Campana (St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN), Klaus Hamprecht (Tübingen, Deutschland), Elizabeth Jaffee (Johns Hopkins University, Baltimore, MD), Peter Lang (Tübingen, Germany), and Zsolt Ruzsics (Freiburg, Germany).

Ich danke allen Mitarbeiter der Blutbank (Tübingen, Deutschland) für die Versorgung mit Buffy-Coats und die HLA-Klasse-I-Typisierung.

Außerdem möchte mich bei Prof. Dr. med. Michael Schmitt für die stete Unterstützung bedanken.

**Publikationsliste:** Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

**Keib, Anna;** Günther, Patrick S.; Faist, Benjamin; Halenius, Anne; Busch, Dirk H.; Neuenhahn, Michael et al. (2017): Presentation of a Conserved Adenoviral Epitope on HLA-C\*0702 Allows Evasion of Natural Killer but Not T Cell Responses. In: *Viral Immunol* 30 (3), S. 149–156. DOI: 10.1089/vim.2016.0145.

**Keib, Anna;** Mei, Ya-Fang; Cicin-Sain, Luka; Busch, Dirk H.; Dennehy, Kevin M. (2019): Measuring Antiviral Capacity of T Cell Responses to Adenovirus. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 202 (2), S. 618–624. DOI: 10.4049/jimmunol.1801003.

## Anhang

**Supplement-Tabelle 1** Rohdaten der ELISPOT-Messung nach einer 12-tägigen Expansion der gesunden HLA-A\*01-Spender-PBMCs mit der Zugabe von IL-2 und Peptid. Gezeigt wird der Durchschnitt der Messungen aus zwei Nöpfen (Spots per  $2.5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um PBMCs ohne die Stimulation mit Peptid. Die Nöpfe mit einer Spotanzahl  $< 25$  wurden als negativ bewertet.

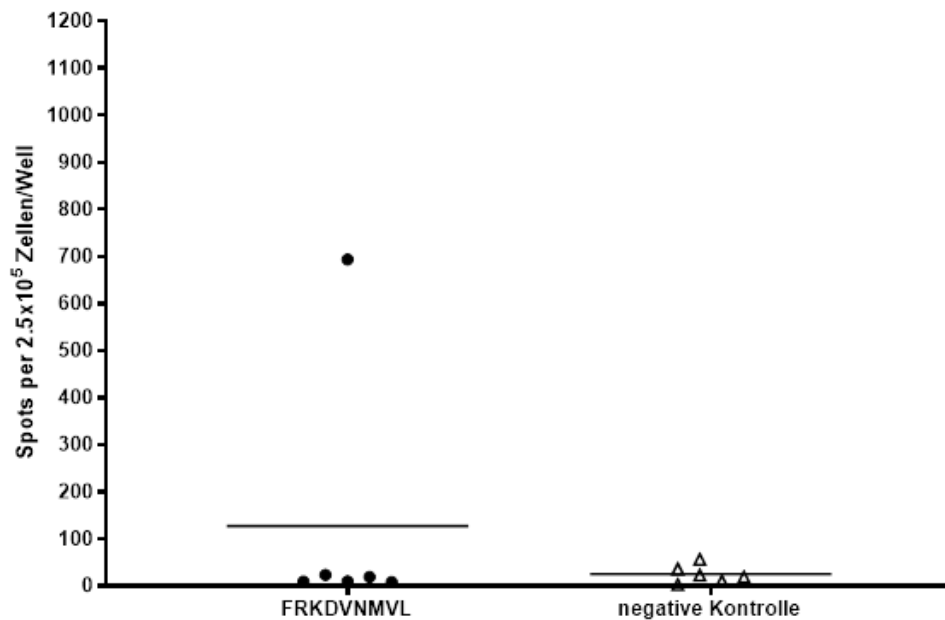
LTDLGQNLLY	Negativ-Kontrolle
85	50
22,5	16
101,5	38,5
13	5
661	107,5
151,5	105,5
211	130
75,5	19
154	106,5
159,5	51
184	78
278,5	70
251,5	68

**Supplement-Tabelle 2** Rohdaten der ELISPOT-Messung nach einer 12-tägigen Expansion der gesunden HLA-A\*02-Spender-PBMCs mit der Zugabe von IL-2 und Peptid. Gezeigt wird der Durchschnitt der Messungen aus zwei Nöpfen (Spots per  $2.5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um PBMCs ohne die Stimulation mit Peptid. Die Nöpfe mit einer Spotanzahl  $< 25$  wurden als negativ bewertet.

LLDQLIEEV	Negativ-Kontrolle
117,5	163,5
349,5	156,6
34,5	67
168,5	155
507	68,5
37	9,5
173	25,5
519	74
1000	47
180	0
141	80

**Supplement-Tabelle 3** Rohdaten der ELISPOT-Messung nach einer 12-tägigen Expansion der gesunden HLA-C\*07-Spender-PBMCs mit der Zugabe von IL-2 und Peptid. Gezeigt wird der Durchschnitt der Messungen aus zwei Nöpfen (Spots per  $2.5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um PBMCs ohne die Stimulation mit Peptid. Die Nöpfe mit einer Spotanzahl  $< 25$  wurden als negativ bewertet.

FRKDNMMVL	Negativ-Kontrolle
8	10
693,5	36
9	2,5
19	22,5
9,5	56,5
23	19



**Supplement-Abbildung 1** Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung der expandierten PBMCs mit der HLA-C\*07:02 Restriktion. PBMCs von 6 verschiedenen Spendern wurden für 12 Tage, mit der Zugabe des Peptids FRKDNMMVL und IL-2 expandiert. Für die negative Kontrolle wurden PBMCs ohne die Zugabe des Peptids expandiert. Ein Spender von sechs hatte eine Anzahl der Spots über 25 pro Napf und mehr als doppelt so hoch wie die Negativ-Kontrolle.

**Supplement-Tabelle 4** Rohdaten der ELISPOT-Messung nach einer 12-tägigen Expansion der gesunden HLA-B\*08-Spender-PBMCs mit der Zugabe von IL-2 und Peptid. Gezeigt wird der Durchschnitt der Messungen aus zwei Nöpfen (Spots per  $2.5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um PBMCs ohne die Stimulation mit Peptid. Die Nöpfe mit einer Spotanzahl < 25 wurden als negativ bewertet.

ELKIKNRSL	YSRLRYTEL	FMRGRHLYL	ELRNRIPL	RLKTKETPSL	CLRLKVEGAL	Negativ-Kontrolle
51	70	39	233,5	75,5	160	105,5
143,5	211	456	41	226	298,5	107,5
30	60,5	13,5	25,5	31	21	40,5
299,5	151,5	235	244,5	129,5	209	130
216,5	223	211	110,5	316,5	188	190
145	124	319	307	233	240,5	193,5
67,5	50	79,5	76	41	84,5	35
39,5	98,5	39	72,5	62,5	95,5	70
54	82,5	141,5	49	66	111,5	68,5

**Supplement-Tabelle 5** Rohdaten der ELISPOT-Messung nach einer 12-tägigen Expansion der gesunden HLA-B\*51-Spender-PBMCs mit der Zugabe von IL-2 und Peptid. Gezeigt wird der Durchschnitt der Messungen aus zwei Nöpfen (Spots per  $2.5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um PBMCs ohne die Stimulation mit Peptid. Die Nöpfe mit einer Spotanzahl < 25 wurden als negativ bewertet.

YPANVPYPLI	MPQWSYMHI	IPLAGAPEI	YPVFAVPEV	MPNLVPEVI	IPLQQVIAPI	LPALPAPPV	Negativ-Kontrolle
294,5	31,5	17	34,5	26	55,5	53,5	44
6,5	6	40	18	6	40	40	18
20	14,5	20	507	604	292	18,5	14,5
106,5	25,5	15	265	247,5	14,5	11,5	27,5
92,5	198	152	2,5	102	333,5	128,5	165,5
47	90,5	66	51,5	69,5	48	72,5	107
122	134	63,5	95,5	202	393,5	86,5	80
86	84	76	206,5	290,5	93	42	64

**Supplement-Tabelle 6** Rohdaten der ELISPOT-Messung nach einer 12-tägigen Expansion der gesunden HLA-A\*03-Spender-PBMCs mit der Zugabe von IL-2 und Peptid. Gezeigt wird der Durchschnitt der Messungen aus zwei Nöpfen (Spots per  $2.5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um PBMCs ohne die Stimulation mit Peptid. Die Nöpfe mit einer Spotanzahl < 25 wurden als negativ bewertet.

RVMVSRSLTK	ALYGSFATK	ALYLPDKLK	VIYGPTGCGK	RLMETRGKK	RVLKKTTPMK	Negativ-Kontrolle
80,5	112	177	206,5	82,5	--	78,5
16,5	467,5	8,5	38,5	59	--	24,5
681,5	387	315	424,5	1155	--	178
37	23,5	14	17	44,5	--	10
13	27	49	15,5	13,5	35	9,5
896,5	1173,5	738	788	996	858,5	36
202,5	167	70,5	84,5	158,5	116,5	25,5
100,5	32,5	12	41,5	38,5	16,5	5,5
55	100,5	70,5	61,5	57	73,5	69,5
28	13	17,5	13	12,5	13,5	22,5
60	29,5	143,5	22,5	81	68,5	2,5
41,5	48	141,5	50	106	143	50
9,5	44,5	11,5	8,5	22	136	16
48	145,5	105	735	44,5	28	38,5
28,5	45,5	25	20	21	83	5
--	90,5	--	--	--	--	56,5
--	71	--	--	--	182,5	28
--	88	--	--	--	48	25,5

**Supplement-Tabelle 7** Rohdaten der ELISPOT-Messung nach einer 12-tägigen Expansion der gesunden HLA-A\*11-Spender-PBMCs mit der Zugabe von IL-2 und Peptid. Gezeigt wird der Durchschnitt der Messungen aus zwei Nöpfen (Spots per  $2.5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um PBMCs ohne die Stimulation mit Peptid. Die Nöpfe mit einer Spotanzahl < 25 wurden als negativ bewertet.

GTFYLNHTFK	STADLAIASK	YTYEWNFRK	QSFAEVTYK	GTAYNALAPK	Negativ-Kontrolle
76,5	79	105	52	54	47
7	6	0,5	51	118,5	56,5
25	71	82	7,5	34,5	19
156	93,5	87,5	51,5	35,5	9
39,5	81	172,5	178,5	86	106,5
919,5	88	72	30,5	1384	0,5
29,5	32	33	28	79,5	28
97	15	16,5	12	17,5	8,5
70,5	13,5	40	26	37,5	25,5
29	92,5	23	47	181,5	0
276,5	267	210,5	105,5	263	78



**Supplement-Tabelle 8** Rohdaten der ELISPOT-Messung nach einer 12-tägigen Expansion der gesunden HLA-B\*40-Spender-PBMCs mit der Zugabe von IL-2 und Peptid. Gezeigt wird der Durchschnitt der Messungen aus zwei Nöpfen (Spots per  $2.5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um PBMCs ohne die Stimulation mit Peptid. Die Nöpfe mit einer Spotanzahl  $< 25$  wurden als negativ bewertet.

MEINLNANL	GEVATSVDL	YEEDRGTPL	TEEMAASLL	GELFDSLNL	GETITKSGL	Negativ-Kontrolle
39,5	164	301,5	95,5	207	209	173,5
146	166,5	287,5	144,5	263,5	270,5	162
0,5	50	185	28,5	89,5	163,5	143
146	111,5	20,5	81	87	53,5	51
192	314	119	192	133,5	113,5	248
36,5	79,5	189	105	97	68,5	67

**Supplement-Tabelle 9** Rohdaten der ELISPOT-Messung nach einer 12-tägigen Expansion der gesunden HLA-B\*44-Spender-PBMCs mit der Zugabe von IL-2 und Peptid. Gezeigt wird der Durchschnitt der Messungen aus zwei Nöpfen (Spots per  $2.5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um PBMCs ohne die Stimulation mit Peptid. Die Nöpfe mit einer Spotanzahl  $< 25$  wurden als negativ bewertet.

AEHTATLNY	KEIPTPYMW	SEVSTYSMSF	METPDTHLSY	YEMCDITMY	AEETTAMLY	MEINLNANLW	Negativ-Kontrolle
107	26	119,5	56,5	121	52,5	60,5	39,5
370	8,5	20,5	61,5	91	21	7	18
458	1	4	5	63,5	31	12,5	13
183	10,5	157,5	73,5	109,5	54,5	293	27,5
369	14,5	2,5	2	99,5	74,5	44	5
366	24	85,5	23,5	65,5	16,5	19	109,5
250	37,5	24,5	29,5	25	14,5	17	29,5
419	22,5	37	36,5	46,5	20	13,5	39,5
43	73	37	27	36	52,5	114	14,5
134	151,5	72,5	79,5	39,5	236,5	80	68,5
35	59	68	41	38,5	206	23	67
325,5	136,5	170,5	220	116,5	84	129,5	161
97	48,5	72	68,5	197,5	181	68,5	78
283	59	124	114,5	117,5	158,5	163	248
228	76	49	143	107,5	151,5	186,5	80
361	27,5	35,5	69	42	382	153,5	70

**Supplement-Abbildung 2** LTDLGQNLLY-HLA-A\*01:01 Streptamerfärbung der transduzierten Jurkat 76. Jurkat 76-Zellen wurden mit dem LTDLGQNLLY-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduziert. Mithilfe der LTDLGQNLLY-HLA-A\*01:01 Streptamerfärbung konnte die Transduktionseffizienz nachgewiesen werden.

