

Aus der Medizinischen Klinik für Innere Medizin I -  
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie  
des Universitätsklinikums des Saarlandes

Kommissarischer Direktor:

Prof. Dr. med. Lorenz Thurner

**Selektion und Charakterisierung eines HLA-C\*07:02 restringierten, CMV-  
spezifischen Antikörpers mittels Phagen-Display**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes**

**2025**

vorgelegt von

Arne Felbel

Geb. am: 21.12.1990 in Wiesbaden

Tag der Promotion: 20. Oktober 2025

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Philipp Staber  
Prof. Dr. Martina Sester

**Meiner Familie gewidmet**

## **Inhaltsverzeichnis**

Zusammenfassung.....	5
Summary .....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	7
1.0 Einleitung .....	11
1.1 Humanes Zytomegalievirus.....	11
1.1.1 Allgemeines.....	11
1.1.2 Primärinfektion.....	11
1.1.3 Replikationszyklus .....	12
1.1.4 Latenz der Viren.....	13
1.1.5 Immunabwehr und Immunevasion .....	13
1.1.6 Reaktivierung .....	14
1.2 Histokompatibilitätskomplex .....	16
1.2.1 Haupthistkompatibilitätskomplex (MHC).....	16
1.2.2 Struktur der MHC-Klasse-I und -II-Moleküle.....	16
1.2.3 Genetische Organisation des MHC beim Menschen.....	17
1.2.4 Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-und -II-Komplexe.....	18
1.2.5 Beladen der MHC-I-Komplexe .....	18
1.2.6 Beladen der MHC-II-Komplexe.....	19
1.3 Antikörper .....	19
1.4 Phagen-Display-Methode.....	21
1.4.1 Phagen-Display-Bibliothek und Phagen-Display-Methode .....	21
1.4.2 Phagemide .....	23
1.4.3 Fragestellung und TCR-like Antikörper.....	26
2.0 Material .....	27
2.1 Reagenzien .....	27
2.2 Medien, Puffer und Lösungen.....	31
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	37
2.4 Geräte .....	37

## Inhaltsverzeichnis

3.0 Methoden.....	39
3.1 Elektrophorese.....	39
3.1.1 Agarosegelelektrophorese .....	39
3.1.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
3.1.3 Coomassie Färbung .....	40
3.2 Herstellung der MHC-Klasse-I-Moleküle.....	40
3.2.1 Synthese der MHC-I- $\alpha$ -Ketten und Aufreinigung.....	40
3.2.2 Einengung und Faltung.....	42
3.3 Phagen-Display-Methode, Amplifikation und Selektion .....	43
3.3.1 Affinitätsselektion der Antikörper.....	43
3.3.2 Infizieren von TG1 Bakterien mit Eluat zur Phagenamplifizierung.....	44
3.3.3 Ernten der Bakterien.....	45
3.3.4 Amplifizieren der Phagen für weitere Selektionsrunden.....	45
3.3.5 Aufreinigung der Phagen.....	45
3.3.6 Phagen-Titration .....	46
3.3.7 Animpfen der Masterplatten und Produktion der Phagen .....	46
3.3.8 Phagen-ELISA-Testung .....	47
3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	48
3.4.1 PCR zur Kontrolle der Phagemid Klone .....	49
3.4.2 Fingerprint PCR der positiven Klone .....	49
3.4.3 Verdau und Fingerprint .....	49
3.5 Produktion löslicher Antikörperfragmente.....	50
3.5.1 Aufreinigung der Fab-Antikörper.....	50
3.5.2 SDS-PAGE der Fab-Antikörper .....	51
3.5.3 ELISA zum Screening der Bindungsfähigkeit der Fab-Antikörper .....	51
3.5.4 Aufreinigung des Phagemidvektors .....	51
3.6 Phagemid-Ligation und BirA-Sequenz .....	52
3.6.1 Transformation der Phagemide in TG1 Bakterien .....	53
3.6.2 Kontrolle der Ligation .....	53
3.6.3 Transformation und in Vivo Biotinylierung der Fab-Antikörper .....	53

## Inhaltsverzeichnis

3.7 Sequenzierung der Fab .....	54
3.8 Peptid-Beladung der LCL .....	54
3.9 Durchflusszytometrie .....	55
3.10 Zellkulturen .....	56
4.0 Ergebnisse .....	57
4.1 Synthese der MHC-Klasse-I-Komplexe.....	57
4.2 Affinitätsselektion der Phagenklone mit Hilfe der MHC-Klasse-I-Peptidkomplexen .....	57
4.2.1 Fingerprint-PCR zur Überprüfung der Phagenklone.....	59
4.2.2 Testung der Bindungseigenschaften verschiedener Phagenklone .....	61
4.2.3 Aufreinigung und erneute Überprüfung der Phagemidklone .....	63
4.3 Einführung einer BirA-Sequenz zur in vivo Biotinylierung der Fab .....	63
4.4 DNA-Sequenzierung ausgewählter Phagemidklone .....	64
4.5 Durchflusszytometrische Analyse der Bindungseigenschaften gefundener HLA-C*07:02-restringierter, CMV-spezifischer Fab-Antikörper.....	65
5.0 Diskussion .....	70
5.1 Aktuelle Standardtherapieverfahren zur Behandlung und Prophylaxe einer CMV-Infektion .....	70
5.2 Neue Therapieverfahren zur Behandlung und Prophylaxe einer CMV-Infektion.....	71
5.2.1 Ex-vivo Expansion .....	71
5.2.2 Direkte Selektion.....	71
5.2.3 Konstruierte Zellen.....	71
5.3 Antikörper-basierte Therapieverfahren .....	73
5.3.1 CMV-spezifische, HLA-C*07:02-restringierte TCR-like Antikörper .....	74
5.3.2 Voraussetzungen zur Applikation bei Menschen .....	78
Anhang .....	80
Abbildungsverzeichnis .....	80
Tabellenverzeichnis.....	81
Referenzen.....	82
Publikationen.....	89
pET human beta2 Mikroglobulin .....	90
Danksagung.....	91

## Inhaltsverzeichnis

Lebenslauf .....	92
------------------	----

## Zusammenfassung

Eine Zytomegalievirus (CMV)-Reaktivierung zählt zu den häufigsten Komplikationen bei Menschen nach allogener Stammzelltransplantation (HSCT) oder solider Organtransplantation (SOT). Trotz antiviraler Prophylaxe ist die CMV-Reaktivierung immer noch mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität bei Transplantationspatienten vergesellschaftet. Bei Gesunden wird die Infektion durch T-Zellen kontrolliert, bei Immunsupprimierten ist die T-Zellantwort für eine CMV-Kontrolle nicht mehr ausreichend.

Die T-Zell-abhängige Immunantwort stützt sich auf die intrazelluläre Prozessierung und Präsentation von Viruspeptiden durch MHC-Klasse-I-Moleküle der virusbefallenen Zellen.

MHC-Klasse-I-Moleküle werden durch die drei Gene HLA-A, HLA-B und HLA-C kodiert. T-Zellen erkennen mit ihrem T-Zell Rezeptor (TCR) den MHC/Peptid-Komplex, der von den infizierten Zellen präsentiert wird. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass HLA-C\*07:02 kodierte MHC-I-Rezeptoren kaum von immunevasiven Mechanismen des CMV betroffen sind.

TRC-like Antikörper können, im Gegensatz zu herkömmlichen Antikörpern, ähnlich dem TCR der T-Zellen den MHC/Peptid-Komplex binden und bieten sich daher als mögliche Therapieoption in Situationen mit T-Zell Defekt an.

Mit Hilfe der Phagen-Display-Methode haben wir HLA-C\*07:02 restringierte, CMV-spezifische Antikörper identifiziert. Hierzu wurden zunächst HLA-C\*07:02 Komplexe synthetisiert, um diese mit dem CMV-Peptid CRVLCCYVL zu beladen.

Durch Inkubation von Fab-Antikörper-präsentierenden Phagen mit diesen MHC-I-Komplexen konnten mehrere HLA-C\*07:02/CMV-Peptid-bindende Antikörperfragmente (Fab) identifiziert werden. Eine weitere Selektion der Phagen erfolgte an biotinylierten HLA-C\*07:02/CRVLCCYVL Komplexen. TG1 *E. coli* Bakterien wurden mit den selektierten Phagen infiziert und lösliche Fab produziert.

Die Bindungsfähigkeit der Fab wurde an HLA-C\*07:02-exprimierenden, lymphoblastoiden Zelllinien (LCL), die mit dem CMV-Peptid beladen wurden, getestet. Die Fab zeigten keine Bindung an mit einem Kontrollpeptid beladene HLA-C\*07:02-Komplexe, sowie an andere getestete HLA-C Allele.

Insgesamt konnten drei Fab-Klone mit spezifischer Bindungsfähigkeit gegenüber den HLA-C\*07:02/CRVLCCYVL Komplexen identifiziert werden.

## Summary

A Cytomegalovirus (CMV) reactivation in humans after allogeneic stem cell transplantation (HSCT) or solid organ transplantation (SOT) is one of the most common complications. Despite antiviral prophylaxis, CMV reactivation is still associated with significantly increased morbidity and mortality in transplant patients. In healthy individuals, infection is controlled by T-cells, while in immunosuppressed individuals the T-cell response is no longer adequate.

The T-cell immune response depends on the intracellular processing and presentation of viral peptides by MHC-class-I-molecules of virus-infected cells.

The MHC-class-I-molecules are encoded by the three genes HLA-A, HLA-B and HLA-C. T-cells recognize the MHC/CMV-peptide complex presented by infected cells with their T-cell receptor (TCR). Recent studies have shown that HLA-C\*07:02-encoded MHC-I receptors are hardly affected by the immune evasion mechanisms of CMV.

TRC-like antibodies, in contrast to conventional antibodies, can bind the MHC/peptide complex similar to the TCR of T-cells and therefore offer a potential therapeutic option for patients with T-cell defects.

Using the phage display method, we identified HLA-C\*07:02 restricted CMV-specific antibodies.

For this purpose, we first synthesized HLA-C C\*07:02 receptors to load them with the CMV peptide CRVLCCYVL.

By incubating phages with these MHC-I/peptide-complexes, several specific Fab-antibody presenting phages were identified. To ensure a binding ability, phages were further selected on biotinylated HLA-C\*07:02/CRVLCCYVL complexes. TG1 *E. coli* bacteria were infected with the selected phages and soluble Fab were produced.

The binding of the Fab was tested on HLA-C\*07:02 expressing lymphoblastoid cell lines (LCL) loaded with the CMV peptide. Selected Fab showed no binding to control peptide-loaded HLA-C\*07:02 receptors, as well as to LCLs expressing MHC complexes of different HLA-C alleles.

In total, three Fab clones were identified that showed specific binding to the HLA-C\*07:02/CRVLCCYVL complex.

## Abkürzungsverzeichnis

	2xTY	2xTrypton-Yeast-medium
	2xTY-AG	2xTY-Ampicillin-Glucose Lösung
	<i>A. dest.</i>	Aqua destillata
A	ADB	Agarose dissolving buffer
	ADC	Antibody-drug conjugate
	APC	Antigen-presenting cell(s)
	APS	Ammoniumpersulfat
	ARDS	Acute respiratory distress syndrome
	AS	Aminosäure
	ATPase	Adenosintriphosphatase
B	$\beta_2$ -m	$\beta_2$ -Mikroglobulin
	BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
	BLCL	B-lymphoblastoide Zelllinie
	bp	Basenpaar(e)
	BSA	Bovines Serumalbumin
	bsAbs	Bispecific antibodies
C	CAR	Chimäre Antigenrezeptoren
	CDR	Complementarity-determining region(s)
	cfu	Colony forming units
	C <sub>H</sub>	Konstante Domäne(n) der schweren Kette(n)
	C <sub>L</sub>	Konstante Domäne(n) der leichten Kette(n)
	CMV	Cytomegalievirus
	C-Region	Konstante Region
	CRS	Cytokine release syndrome
	CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
D	DNA	Deoxyribonucleic acid
	dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
	DTT	Dithiothreitol
E	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

## Einleitung

	EGFR	Epidermal growth factor receptor
	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
	EMA	European medicines agency
	ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Fab	Fragment(s) antigen binding
	FACS	Fluorescence-activated cell sorting
	Fc	Fragment(s) crystallizable
	FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
	FCS	Fetal calf serum
	F-Pilus	Fertilitätspilus
G	GTP	Guanosintriphosphat
	GvHD	Graft-versus-host-disease
H	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
	HSCT	Hematopoietic stem-cell transplantation
I	IFN	Interferon
	Ig	Immunglobulin(e)
	IL	Interleukin
	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	kbp	Kilobasenpaar(e)
	KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L	LCL	Lymphoblastoid cell line, Lymphoblastoide Zelllinie
M	MABEL	Minimal-anticipated-biological-effect-level
	MM	Magermilchpulver
N	NEB	New England Biolabs
	NK	Natürliche Killerzellen
	NMWL	Nominal molecular weight limit
	NOAEL	No-observed-adverse-effects-levels
O	OD	Optische Dichte
	ORI	Replikationsursprung
P	p	Protein
	p53	Protein 53, ein Tumorsuppressor

## Einleitung

	PAMP	Pathogen-associated molecular pattern(s)
	PBS	Phosphate buffered saline
	PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
	PEG	Polyethyleglycol
	PEI	Paul-Ehrlich-Institut
	pfu	Plaque forming unit
	PlacZ	Laktose Z-Promotor
	PLC	Peptide-loading complex
	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
	PRR	Pattern-recognition-receptor
Q	qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
	RT	Raumtemperatur
S	scFv	Single chain variable fragment
	SDS	Natriumlaurylsulfat
	SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
	SOC	Super optimal broth with catabolite repression
	SOT	Solid organ transplantation
	ssDNA	Single-stranded DNA, einzelsträngige DNA
T	Tab.	Tabelle
	TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
	TAP	Transporter associated with antigen processing
	Tapasin(e)	TAP-assoziierte(s) Glykoprotein(e)
	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
	TCR	T-Zellrezeptor
	TEMED	Tetramethylethylendiamid
	TNF	Tumornekrosefaktor
	TP53	Tumorprotein 53 Gen
	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	UV	Ultraviolett
V	V-Domäne(n)	Variable Domäne(n)

## Einleitung

	V <sub>H</sub>	Variable Domäne(n) der schweren Kette(n)
	V <sub>L</sub>	Variable Domäne(n) der leichten Kette(n)
	V-Region(en)	Variable Region(en)
	VST	Virus-specific T-cells

# 1.0 Einleitung

## 1.1 Humanes Zytomegalievirus

### 1.1.1 Allgemeines

Das humane Zytomegalievirus (CMV) oder auch humane Herpesvirus 5 (HHV5) gehört zur Familie der Herpesviridae und zur Gruppe der  $\beta$ -Herpesviren. Es handelt sich um ein behülltes Doppelstrang-DNA-Virus, das von einer Kapsidhülle umgeben ist. Das Virus ist weltweit verbreitet und weist eine geschätzte Durchseuchungsrate von 60-70 % unter Erwachsenen in Industrienationen auf [26].

Die Replikation des CMV findet überwiegend in menschlichen Fibroblasten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen statt. In Monozyten und Stammzellen der Hämatopoese kann eine Latenz etabliert werden.

Da das CMV in Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin, Sperma, Muttermilch und Blut enthalten sein kann, ist eine Übertragung auf vielen unterschiedlichen Wegen möglich, zum Beispiel durch Schmierinfektion, sexuellen Kontakt, bei der Geburt oder auch beim Stillen.

Die Primärinfektion verläuft in der Regel asymptomatisch. Vereinzelt kann es bei Immunkompetenten zu unspezifischen Erscheinungen wie Fieber, Husten oder Müdigkeit kommen. Bei immunsupprimierten Menschen und Neugeborenen können zahlreiche Organe betroffen sein und ernste Symptome auftreten. Eine wichtige Rolle spielt das CMV bei Transplantatempfängern. Eine CMV-Infektion oder CMV-Reaktivierung hier kann zu schwerwiegenden Komplikationen mit hohen Todesraten führen [38,49].

In der Schwangerschaft gehört das CMV zu den häufigsten Erregern kongenitaler Infektionen.

Die Infektion verläuft bei den Müttern meist symptomlos, kann aber intrauterin oder postnatal auf das Kind übertragen werden. Insbesondere Infektionen im ersten Trimenon können schwere Folgeschäden wie mentale Retardierung oder Hördefekte hervorrufen.

### 1.1.2 Primärinfektion

Die Primärinfektion mit CMV erfolgt häufig über eine Schmierinfektion. Die Viren gelangen über die Speicheldrüsen des Infizierten durch hämatogene Streuung zu anderen Organen. Selten treten Symptome auf, die einer Mononukleose mit Fieber und Lymphknotenschwellung ähneln können. Es kann zu Leuko- und Thrombozytopenien kommen und im Blutbild können sich atypische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zeigen. Nach erfolgter Primärinfektion persistiert das Virus in myeloischen Zellen, Monozyten oder hämatopoetischen Stammzellen, sodass es potenziell zu einer Reaktivierung des Virus kommen kann. Bei immunsupprimierten Menschen verläuft die Erstinfektion meist schwerer als eine spätere Reaktivierung [59].

## Einleitung

Besonders hoch ist die Gefahr einer Infektion bei Empfängern solider Organe (SOT) ohne CMV-spezifische Immunität, die ein Transplant eines seropositiven Spenders erhalten [69]. Ohne therapeutische Intervention tritt bei bis zu 90 % dieser Patienten eine CMV-Virämie und bei etwa 50-60 % eine symptomatische Infektion auf [20]. Studien haben gezeigt, dass CMV-Infektionen bei Patienten nach SOT, abhängig von der Art des Transplantatorganes, in 6-19 % der Fälle und bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (HSCT) in 22-34 % Fälle innerhalb der ersten zwölf Monate auftreten [13]. Als gefürchtete Komplikationen einer CMV-Virämie gelten die CMV-Retinitis und die CMV-Pneumonie, die nach einer HSCT gegenüber einer SOT vergleichsweise öfter beobachtet werden [76]. Diese können bei schweren Verläufen zur Erblindung, beziehungsweise zu einem schweren ARDS mit letalem Ausgang führen. Entsprechend der SOT konnte bei der HSCT gezeigt werden, dass die Wahl eines seropositiven Spenders für einen seronegativen Empfänger mit einer schlechteren Überlebensrate für den Empfänger vergesellschaftet ist [50].

### 1.1.3 Replikationszyklus [59]

Das CMV durchläuft wie andere Herpesviren in den meisten Zellen einen lytischen Infektionszyklus. Zunächst kommt es zur Adhäsion an die Zielzellmembran durch das virale Oberflächenprotein gB. Weitere Proteine wie das gD-Protein reagieren mit Oberflächenstrukturen der Zelle und initiieren das Eindringen in selbige [81]. Die Virusmembran und die Zellmembran verschmelzen hierbei und das Viruskapsid wird in das Zytoplasma freigesetzt. Durch Anlagerung des Kapsids an Mikrotubuli erfolgt ein Transport zu den Kernporen, durch die das Virusgenom in das Nukleoplasma aufgenommen wird. Im Kern zyklisiert das zunächst lineare Virus-Genom. Die RNA-Polymerase II transkribiert die viralen Gene in mRNAs, die in das Zytoplasma transportiert und dort translatiert werden. Die so entstandenen frühen Virusproteine (englisch: ‚immediate-early-Proteine‘) wirken als Regulatoren, die nach einem Rücktransport in den Kern die Expression sogenannter ‚delayed-early‘-Proteine des Virus-Genoms veranlassen. Bei diesen handelt es sich vor allem um Enzyme und Polypeptide, die für die Virusreplikation notwendig sind. Die Replikation der Virus-DNA findet im Kern selbst statt. Gleichzeitig mit der Virusreplikation werden späte Virusgene exprimiert, deren Produkte, zumeist Glykoproteine, im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert werden. Nach einer Modifikation im trans-Golgi-Netzwerk und in Golgi-Vesikeln werden diese Glykoproteine unter anderem zur Zelloberfläche transportiert und dort in die Membran eingebaut. Diese eingelagerten Polypeptide bilden jene antigenen Strukturen, gegen die sich später die antikörpervermittelte, zytotoxische NK-Zellantwort richtet.

Ein anderer Teil der Glykoproteine wird zurück in den Zellkern befördert und bildet dort das Viruskapsid. Zunächst wird eines der replizierten Genome über das Portalprotein in das Kapsid eingeschleust. Die DNA-haltigen Kapside lagern sich daraufhin an das Innere der Kernmembran an, werden von dieser umhüllt und gelangen in das ER. Die umhüllende Kernmembran verschmilzt mit der ER-Membran und der Viruspartikel wird hüllenlos in das Zytoplasma entlassen. Zuvor synthetisierte Virusproteine und das Nukleokapsid lagern sich in den Zisternen des trans-Golgi-Netzwerkes zusammen und werden von

## Einleitung

den Membranen der trans-Golgi-Zisternen umhüllt. Die so behüllten Viren werden mittels Golgi-Vesikel zur Zelloberfläche transportiert. Von dort werden sie in die Umgebung freigesetzt und können neue Zellen infizieren. Es wird spekuliert, dass zur hämatogenen Verbreitung des Virus Monozyten eine wichtige Rolle spielen. In Monozyten und Granulozyten kommt es zwar zur Bildung von ‚immediate-early‘-Proteinen, aber zu keiner lytischen Replikation des CMV [24]. Im Rahmen ihrer Immunfunktion können Monozyten durch das Gefäßendothel wandern und periphere Organe infiltrieren. Da die Replikation in den kurzlebigen Monozyten selbst nicht möglich ist, interagiert das Virus mit dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (englisch: ‚epidermal growth factor receptor‘, EGFR) auf der Monozytenoberfläche, um die Zellen zur Differenzierung in langlebige Makrophagen zu bewegen, in denen eine Vermehrung möglich ist [77]. Durch die EGFR-Aktivierung kommt es zum Beispiel zu einer verlängerten Expression des ‚myeloid leukemia cell differentiation‘-Proteins 1, welches die Apoptose der Monozyten inhibiert [11]. Dies initiiert intrazelluläre Signalwege, die sowohl die Motilität der Monozyten als auch deren Lebensdauer erhöhen. Nach der Reifung der Monozyten zu Makrophagen im Gewebe können durch die nun anlaufende Virusreplikation auch umgebene Zellen befallen werden.

### 1.1.4 Latenz der Viren

Die Folgen einer Erstinfektion sind abhängig vom befallenen Zelltyp. In Fibroblasten findet vor allem eine lytische Vermehrung der Viren statt, die mit dem Tod der Wirtszelle endet. In myeloischen Vorläuferzellen geht die zu Beginn lytische Replikation durch epigenetische Vorgänge in einen Latenzzustand über [21].

Durch Einsetzen der Immunantwort wird die Virusvermehrung schließlich unterdrückt und es etabliert sich eine Latenz. In diesem Zustand liegt eine stabile Anzahl extrachromosomaler viraler Genomkopien im Kernplasma vor. Eine Replikation der Virus-DNA erfolgt parallel mit der Vermehrung des Zellgenoms durch die zelleigene DNA-Polymerase, wobei die Kopien der viralen DNA an die Tochterzellen weitergegeben werden. Während der Latenzzeit kommt es zur keiner Viruspeptidproduktion, die zu einer Beladung von MHC-Klasse-I-Moleküle führen würde, sodass ein Zellbefall den zytotoxischen Immunzellen nicht angezeigt wird [59].

### 1.1.5 Immunabwehr und Immunevasion [61]

Als intrazelluläre Pathogene aktivieren Viren intrazelluläre Mustererkennungsrezeptoren (englisch: ‚pattern-recognition receptors‘, PRR), die von dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimiert werden. Sie erkennen spezifische pathogenassoziierte, molekulare Muster (englisch: ‚pathogen-associated molecular patterns‘, PAMP). PAMP sind einfache Moleküle oder Strukturen, die nicht im menschlichen Körper, jedoch in zahlreichen Mikroorganismen vorkommen. Es kann sich im Falle von Bakterien dabei um Oligosaccharide, Peptidoglykane oder Lipopolysaccharide handeln und im Falle von Viren meist um virale DNA. Diese PAMP sind hoch konservierte Strukturen, die unveränderliche Erkennungssignale darstellen und bei einfachem Kontakt mit Zellen des adaptiven

## Einleitung

Immunsystems eine Immunantwort auslösen. RNA-Viren replizieren ihr Genom mit Hilfe einer RNA-Polymerase, die im Gegensatz zur DNA-Polymerase der DNA-Viren keine Korrekturlesefunktion aufweist. Die fehleranfällige Replikation durch die RNA-Polymerase führt bei den RNA-Viren somit häufig zu Mutationen. Diese zufälligen Mutationen ermöglichen es den RNA-Viren, ihre Antigenepitope zu verändern und durch diesen als Antigen drift bezeichneten Vorgang der adaptiven Immunabwehr zu entkommen.

DNA-Viren weisen im Gegensatz zu RNA-Viren ein größeres Genom, jedoch eine geringere Mutationsrate auf und können der Immunabwehr daher kaum durch genetische Variabilität entkommen [61]. Allerdings können DNA-Viren in einen Latenzzustand eintreten, bei dem das Virus nicht aktiv repliziert. Während dieser Latenz löst das Virus keine Krankheit aus und es werden auch keine Viruspeptide synthetisiert, sodass den T-Zellen die Anwesenheit des Virus nicht über MHC-vermittelte Peptid-Präsentation signalisiert wird. Bei einer Reaktivierung des Virus kann es zu einem erneuten Krankheitsausbruch mit Entwicklung klinischer Symptome kommen. Um den zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen zu entkommen, nutzt das CMV mehrere Strategien, insbesondere [61]:

- eine Hemmung der humoralen Immunantwort durch Kodierung eines ‚fragment crystallizable‘ (Fc)-Rezeptors, was zur Blockierung der Effektorfunktion von Antikörpern, die an infizierte Zellen gebunden sind, führt.
- eine Blockade der Antigenprozessierung und -präsentation durch Hemmung der MHC-Klasse-I-Moleküle, was die Erkennung der infizierten Zellen durch CTL erschwert.

Um die MHC-I-abhängige Erkennung virusinfizierter Zellen durch das Immunsystem umgehen zu können, produziert das CMV verschiedene Immunevasine, unter anderem US2, US3 und US6. Das Evasin US2 delokalisiert neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle in das Zytosol, wo deren vorzeitiger Abbau erfolgt. Zudem stört US2 die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle an CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten. In Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen (englisch: antigen-presenting cells, APC) unterbricht US2 den MHC-II-Weg, indem es den Abbau zweier für die Antigenprozessierung wichtige Proteine, nämlich HLA-DR- $\alpha$  und -DM- $\alpha$ , beschleunigt [78].

Das Protein US3 blockiert die Funktion von ‚transporter associated with antigen processing‘ (TAP)-assoziierten Glykoproteinen (Tapasinen). Durch US3 kann keine Bindung mehr zwischen MHC-Molekül und TAP erfolgen, sodass das MHC-Molekül im ER zurückgehalten wird.

Das Evasin US6 hemmt die Adenosintriphosphatase (ATPase)-Aktivität von TAP, was den Transport der prozessierten Peptide in das ER verhindert.

### 1.1.6 Reaktivierung

Eine Reaktivierung des CMV ist unter anderem durch Entzündungsprozesse, Infektionen und Zellschäden, wie sie bei der Zellalterung vorkommen, möglich.

## Einleitung

Im klinischen Alltag erfolgt eine Reaktivierung bei Immunkompetenten oft im Rahmen von systemischen Entzündungsreaktionen, wie einer Sepsis [39,82]. Bei Patienten nach SOT ist die Reaktivierung mit einer Abstoßungsreaktion des transplantierten Gewebes [62] und bei Menschen nach HSCT mit einer Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (englisch: ‚graft-versus-host-disease‘, GvHD) assoziiert [9]. Zu einer GvHD kommt es bei einem unterschiedlichen Haupthistokompatibilitäts (englisch: ‚major histocompatibility complex‘, MHC) -Status von Spender und Empfänger, wenn die Empfängerzellen von den Immunzellen des Spenders als Antigen erkannt werden und eine Immunantwort des neuen adaptiven Immunsystems ausgelöst wird.

Ein Pathomechanismus, der zur Abstoßungsreaktion bei SOT beiträgt, ist neben der Immunogenität der körperfremden Zellen auch die vermehrte Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Durch eine transiente Unterbrechung der Blutzufuhr während des Prozesses der Entnahme kommt es im Spenderorgan zu einer kurzzeitigen Ischämie mit nachfolgender Reperfusion, was sich negativ auf das Gewebe auswirkt [8]. Im Rahmen dieses sogenannten Ischämie-Reperfusionsschadens kommt es auf zellulärer Ebene zu Defekten der mitochondrialen Elektronentransportkette mit vermehrter Freisetzung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, die sekundäre Zellschäden im Spenderorgan hervorrufen. Bei der darauffolgenden Entzündungsreaktion wandern T-Zellen ein, die eine Abstoßung des Transplantates initiieren können [21].

Bei Menschen mit medikamentös induzierter Immunsuppression, wie sie bei Patienten nach SOT und nach allogener HSCT eingesetzt wird, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Reaktivierung, was mit einer erhöhten Sterblichkeit vergesellschaftet ist [21]. Daher erfolgt nach Transplantation routinemäßig ein CMV-Monitoring mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)-Testung. Übersteigt die CMV-DNA einen bestimmten Schwellenwert im Blut, kann so frühzeitig mit einer präemptiven Therapie begonnen werden. Bei der SOT können Ganciclovir oder Valganciclovir, bei der HSCT Ganciclovir oder Foscarnet über mehrere Monate eingesetzt werden [88].

Bei Risikotransplantationen, zum Beispiel bei CMV-positivem Spender, kann auch eine Prophylaxe angezeigt sein. Hierfür werden nach SOT Aciclovir, Valaciclovir, Ganciclovir oder Valganciclovir, sowie bei Lebertransplantationen mit hohem Risiko, Letemovir zur Prophylaxe einer CMV-Reaktivierung eingesetzt [44,49,54].

Bei erwachsenen Empfängern einer HSCT kann anstelle Erstlinientherapie mit Ganciclovir oder Valganciclovir auch der spezifische virale Terminasehemmer Letemovir zur CMV-Prophylaxe gegeben werden [12,38]. Letemovir bietet, im Gegensatz zu den genannten Alternativen, den Vorteil einer nebenwirkungsärmeren Anwendung und keine Gefahr einer Myelosuppression. Bei symptomatischen Patienten nach SOT und HSCT erfolgt eine Therapie mit Ganciclovir oder Valganciclovir unter wöchentlicher Bestimmung des CMV-DNA-Titers, wobei auch die Gabe von Immunglobulinen (Ig) bei Hypogammaglobulinämie erwogen werden kann [88]. Eine weitere Behandlungsmethode beinhaltet den Transfer von CMV-spezifischen CTL eines allogenen Spenders. Diese können gezielt infizierte Zellen, die Viruspeptide mittels MHC-Klasse-I-Komplex präsentieren, abtöten [18].

## 1.2 Histokompatibilitätskomplex

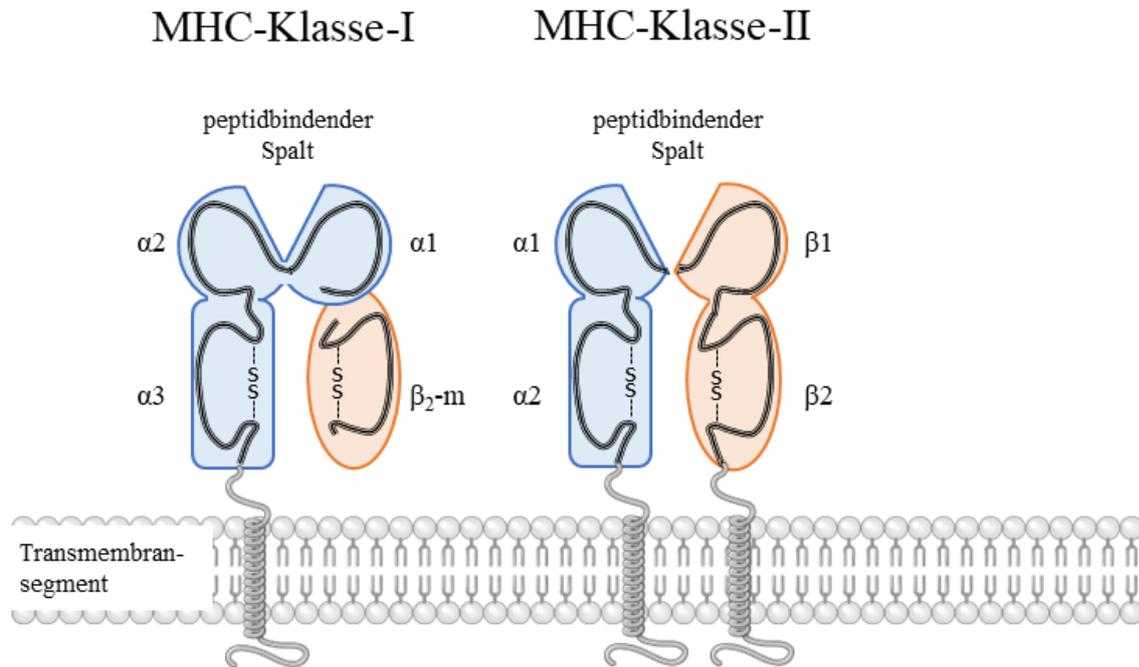
### 1.2.1 Haupthistkompatibilitätskomplex (MHC)

Bei dem MHC, auch als humane Leukozyten-Antigene (HLA) bezeichnet, handelt es sich um eine Gruppe von etwa 200 Genen mit einem Umfang von circa vier Millionen Basenpaaren, die beim Menschen auf Chromosom 6 lokalisiert sind. Der MHC kodiert Proteine, die für die Prozessierung von Antigenen und deren immunologische Präsentation verantwortlich sind. Bei diesen Genen handelt es sich um die am stärksten polymorphen Gencluster im menschlichen Genom mit zahlreichen Allelen an verschiedenen Loci [61].

Die gebildeten MHC-Moleküle binden Peptidfragmente, die durch den Abbau normaler Proteine, aber auch von Pathogenen entstehen, wodurch diese auf der Zelloberfläche T-Zellen und dem Immunsystem präsentiert werden.

### 1.2.2 Struktur der MHC-Klasse-I und -II-Moleküle [61]

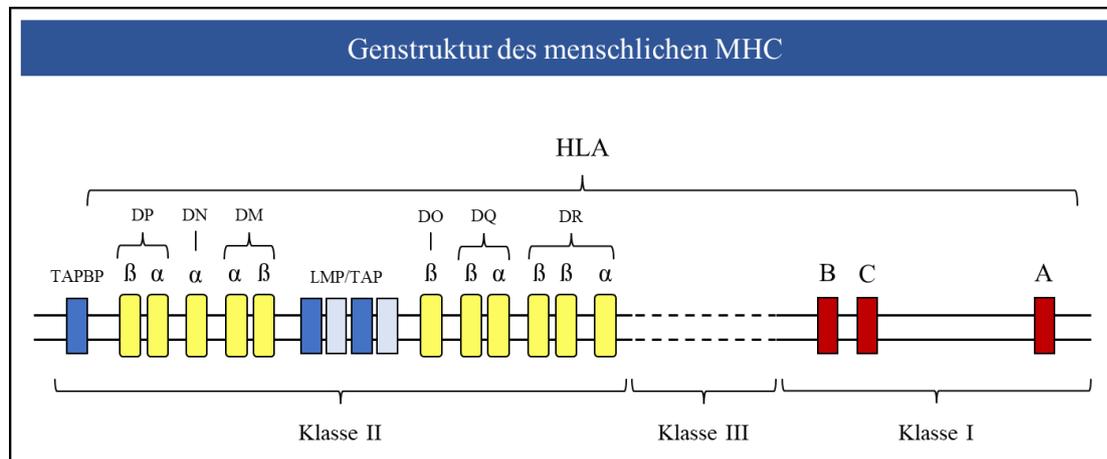
Das MHC-Klasse-I-Molekül besteht aus einer größeren  $\alpha$ -Polypeptidkette und einer kleineren  $\beta_2$ -Mikroglobulinkette, die nichtkovalent miteinander verbunden sind. Nur die  $\alpha$ -Kette besitzt ein Transmembransegment. Insgesamt verfügt das MHC-Klasse-I-Molekül über vier Domänen, wobei drei dieser Domänen die  $\alpha$ -Kette bilden ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ ) und eine das  $\beta_2$ -Mikroglobulin darstellt. Die sich gegenüberliegenden Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bilden einen peptidbindenden Spalt. Die Domänen  $\alpha_3$  und  $\beta_2$  ähneln hingegen der Fc-Region von Immunglobulinen. Die MHC-I-Moleküle sind, abgesehen vom  $\beta_2$ -Mikroglobulin, das nicht direkt an der Peptidbindung beteiligt ist, stark polymorph [61]. Die MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen ebenfalls aus zwei nicht kovalent verbundenen Polypeptidketten, einer  $\alpha$ -Kette und  $\beta$ -Kette. Jede Kette bildet zwei Domänen aus ( $\alpha$ -Kette:  $\alpha_1, \alpha_2$ ;  $\beta$ -Kette:  $\beta_1, \beta_2$ ). Im Gegensatz zum MHC-Klasse-I-Molekül durchspannen beide Ketten die Zellmembran und bilden zusammen den peptidbindenden Spalt. Die Peptidbindungsstelle besteht aus der  $\alpha_1$ - und der  $\beta_1$ -Domäne. Die  $\alpha_2$ - und  $\beta_2$ -Domänen besitzen ebenfalls eine der eines Ig ähnelnden Aminosäuresequenz, über die sie in der Zellmembran verankert sind.



**Abbildung 1:** Struktur der MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle.

Die Abbildung wurde teilweise durch die Nutzung von Servier Medical Art, bereitgestellt von Servier unter Lizenz von Creative Commons Attribution 3.0 unported License, generiert. (Quelle: modifiziert nach Koolmann, Röhm; Taschenatlas Biochemie des Menschen, Thieme, 2009)

### 1.2.3 Genetische Organisation des MHC beim Menschen



**Abbildung 2:** Genstruktur des menschlichen MHC

(Quelle: Murphy K, Weaver C (2018) Janeway Immunologie)

Die  $\alpha$ -Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls wird durch drei Gene, die als HLA-A, HLA-B und HLA-C bezeichnet werden, kodiert. Das Gen für  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist nicht auf Chromosom 6, sondern auf Chromosom 15 lokalisiert. Insgesamt drei Genpaare kodieren die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette der MHC-Klasse-II-Moleküle, die mit HLA-DR, -DP und -DQ gekennzeichnet sind. Einige Menschen besitzen noch ein

## Einleitung

zusätzliches HLA-DR-Cluster, das für eine  $\beta$ -Kette kodiert.

Daneben werden in der MHC-II-Region der TAP, Untereinheiten der Proteasomen (durch sogenannte ‚low molecular mass polypeptide‘ Gene), sowie mehrere Tapasine kodiert, die zur späteren Beladung der MHC-Moleküle mit Antigenpeptidfragmenten notwendig sind.

Aufgrund der bereits genannten Polygenie exprimiert jedes Individuum wenigstens drei unterschiedliche MHC-Klasse-I-Moleküle und drei MHC-Klasse-II-Moleküle.

Durch den starken Polymorphismus der MHC-Gene ist die Anzahl der unterschiedlichen MHC-Moleküle jedoch deutlich höher. Die meisten Menschen sind heterozygote Träger von MHC-kodierenden Genen, d.h. sie haben zwei verschiedene Allele für das gleiche Gen. Die MHC-Allele werden kodominant exprimiert. Die Produkte der einzelnen MHC-Allele können sich somit in bis zu 20 Aminosäuren unterscheiden und dabei insbesondere Einfluss auf die Bindungsspezifität für Peptide nehmen [61].

### 1.2.4 Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I- und -II-Komplexe [61]

Die Verarbeitung und Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche dient dazu, spezifische T-Effektorzellen und deren Effektorfunktion an Infektionsherden zu aktivieren.

MHC-Klasse-I-Moleküle werden von fast allen kernhaltigen, somatischen Zellen exprimiert und binden Peptide, die von  $CD8^+$ -T-Zellen erkannt werden. Die Moleküle der MHC-Klasse-II werden von APC exprimiert. Von diesen antigenpräsentierenden Rezeptoren gebundene Peptide werden wiederum von  $CD4^+$ -T-Zellen erkannt. Ob ein Peptid via MHC-I- oder MHC-II-Rezeptor präsentiert wird, hängt von der Lokalisation des Antigens innerhalb der Zelle, sowie der Zellart ab.

Peptide aus dem Zytosol werden über das ER auf neu gebildete MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und an die Zelloberfläche transportiert, wo sie den Immunzellen direkt präsentiert werden. So können Bestandteile von Viren und intrazellulären Bakterien, die im Zytosol abgebaut wurden, vom Immunsystem erkannt werden. Intravesikuläre Pathogene, die etwa von Makrophagen phagozytiert wurden oder extrazelluläre Pathogene, die zum Beispiel von B-Zellen aufgenommen wurden, werden über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert [61]. Die MHC-I- oder MHC-II-präsentierten Peptide sind dabei integraler Bestandteil der Molekülstruktur und damit so stark gebunden, dass ein Austausch von Peptiden an der Zelloberfläche verhindert wird.

### 1.2.5 Beladen der MHC-I-Komplexe [61]

Die im Zytosol synthetisierten  $\alpha$ -Ketten und das  $\beta_2$ -Mikroglobulin werden separat in das ER transportiert, in dessen Lumen die beiden Ketten zum MHC-Molekül gefaltet werden. Bei diesem Vorgang bindet eine MHC-Klasse-I- $\alpha$ -Kette zunächst an Calnexin, ein Chaperonprotein, das den Faltungsprozess unterstützt. Bei der Bindung des  $\beta_2$ -Mikroglobulin an die  $\alpha$ -Kette löst sich das Heterodimer aus der MHC-Klasse-I- $\alpha$ -Kette und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin von Calnexin ab und bindet an einen Chaperonprotein-Komplex aus Calreticulin und ERp57. Das teilweise gefaltete MHC-Klasse-I-Molekül bindet via ERp57 an das Protein Tapasin. Tapasin wiederum ermöglicht die Bindung an den TAP.

## Einleitung

Das MHC-Klasse-I-Molekül kann nur aus dem ER freigesetzt werden, wenn es ein zu präsentierendes Peptid bindet und so die Faltung vollendet werden kann.

Diese Aufgabe übernimmt der Peptidbeladungskomplex (PLC), bestehend aus ERp57, Calreticulin und Tapasin. Proteine und defekte ribosomale Produkte aus dem Zytosol werden in Proteasomen in Peptidfragmente gespalten und via TAP in das ER transportiert. TAP, das zugleich auch Bestandteil des PLC ist, überträgt die Peptide an das unvollständig gefaltete MHC-Klasse-I-Molekül. Der MHC-Peptid-Komplex wird anschließend zur Zelloberfläche transportiert.

### 1.2.6 Beladen der MHC-II-Komplexe [61]

MHC-Klasse-II-Moleküle werden von APC, wie zum Beispiel dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen gebildet, um Peptide den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu präsentieren.

Hierfür werden Antigene aus dem Extrazellulärraum mittels Phagozytose oder rezeptorvermittelter Endozytose in intrazelluläre Vesikel aufgenommen und prozessiert. Diese bilden zunächst sogenannte frühe Endosomen, die initial einen neutralen pH-Wert besitzen und angesäuert werden müssen, bevor sie mit Lysosomen fusionieren können. Sowohl Endosomen als auch Lysosomen enthalten saure Proteasen, die, durch niedrige pH-Werte aktiviert, Proteinantigene abbauen können. Die Peptidfragmentenhaltenden Vesikel verschmelzen anschließend mit Vesikeln, in denen sich MHC-Klasse-II-Moleküle befinden. Die MHC-Klasse-II-Moleküle binden daraufhin die entsprechenden Peptidfragmente und transportieren diese zur Zelloberfläche.

## **1.3 Antikörper [61]**

Lösliche Antikörper zählen wie B- und T-Zell-Rezeptoren zu den Ig, einer Proteinfamilie mit einer wichtigen Rolle in der Immunabwehr.

B-Zell-Rezeptoren sind membrangebundene Ig-Antigenrezeptoren, die von B-Zellen mit einem großen Spektrum an Antigenpezifität synthetisiert werden. Die von Plasmazellen sezernierte Form der Ig wird als Antikörper bezeichnet. Jede B-Zelle bildet nur Antikörper einer Spezifität für ein bestimmtes Antigen.

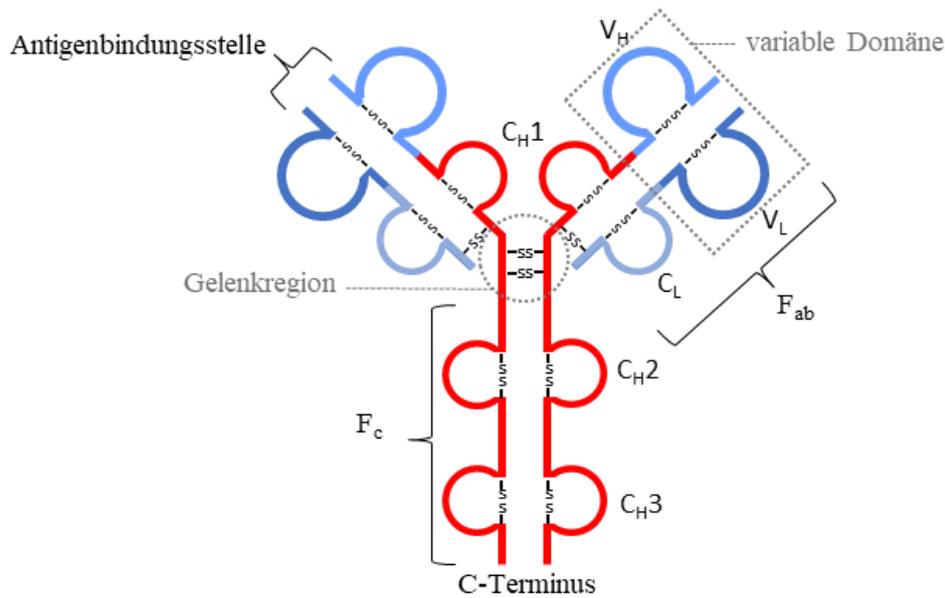
Zu den Aufgaben der Antikörper gehört das Binden passender Pathogene und das Mobilisieren anderer Immunzellen zur Elimination von Erregern. Strukturell können Antikörper in zwei Regionen eingeteilt werden: eine antigenbindende Region, die das Antigen erkennt und bindet, sowie eine zweite Effektorregion die aktiviert wird, sobald der Antikörper sein passendes Antigen gebunden hat. Die antigenbindende Region besteht aus zwei variablen Regionen (V-Regionen), welche wiederum aus einer leichten und einer schweren Polypeptidketten aufgebaut sind. Die Effektorregion wird auch als konstante Region (C-Region) bezeichnet und variiert kaum; anders als die V-Region, die zwischen jedem Antikörper variiert und so die Bindung einer Vielzahl von Antigenen ermöglicht. Es gibt beim Menschen fünf Klassen

## Einleitung

von Immunglobulinen: IgM, IgA, IgD, IgG und IgE, die sich jeweils im Aufbau ihrer schweren Ketten (englisch: ‚heavy chains‘, H-Ketten) unterscheiden. Die IgG-Klasse ist der häufigste Antikörper im Blut. Der IgG Antikörper hat eine Größe von etwa 150 kDa und besteht aus insgesamt vier Polypeptidketten. Das IgG besitzt zwei H-Ketten mit einer jeweiligen Größe von etwa 50 kDa und zwei kleinere, 25 kDa große, leichte Ketten (englisch: ‚light chains‘, L-Ketten). Die H- und L-Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Verbindung zwischen den schweren Ketten bildet eine bewegliche Gelenkregion. Die Aminosäuresequenz der Ig-Ketten wiederholt sich circa alle 110 Aminosäuren, wobei die repetitiven, sich ähnelnden Sequenzen einen eigenen Abschnitt der Proteinstruktur bilden. Die V-Region eines Antikörpers besteht aus den variablen Domänen (V-Domänen) der H- und L-Ketten, die zusammen die Antigenbindungsstelle bilden und dadurch auch die Antigenbindungsspezifität festlegen. Diese Antigenbindungsstelle wird durch je drei Aminosäureschleifen gebildet, die auch als hypervariable oder komplementaritätsbestimmende Region (englisch: ‚complementary-determining regions‘, CDR) bezeichnet werden. Diese CDR (CDR1, CDR2 und CDR3) bestimmen die Antigenpezifität [61]. Die konstanten Domänen (C-Domänen) der H- und L-Kette bilden die C-Region. Der IgG-Antikörper setzt sich aus zwei schweren Ketten, welche drei C-Domänen besitzen ( $C_{H1}$ -  $C_{H3}$ ), sowie einer V-Domäne ( $V_H$ ) zusammen. Die leichte Kette besteht aus einer C- und einer V-Domäne ( $C_L$  und  $V_L$ ). Das antigenbindende Fragment (englisch: ‚fragment antigen binding‘, Fab) wird von den C-Domänen  $C_{H1}$  und  $C_L$  zusammen mit den V-Domänen  $V_H$  und  $V_L$  gebildet. Der IgG Antikörper besitzt somit zwei identische Antigenbindungsstellen.

Die Domänen  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  der H-Kette bilden das sogenannte Fc-Fragment (englisch: ‚fragment crystallizable‘). Es besitzt Effektorfunktion und bindet an bestimmte Fc-Rezeptoren, die von Immunzellen, wie zum Beispiel Phagozyten, exprimiert werden. Zudem führt die Fc-Domäne zu einer Komplementaktivierung. Der Antikörper kann durch das Enzyme Papain proteolytisch so gespalten werden, dass zwei Fab und ein Fc entstehen.

## Einleitung



**Abbildung 3:** Struktur eines IgG-Antikörpers

(Quelle: modifiziert nach Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2016) *Duale Reihe Biochemie. Thieme*)

## 1.4 Phagen-Display-Methode [35]

### 1.4.1 Phagen-Display-Bibliothek und Phagen-Display-Methode

Um eine Phagen-Display-Bibliothek zu erzeugen werden Gensegmente antigenbindender Ig-Gene aus menschlichen B-Zellen, welche die V-Regionen der L- und H-Kette der Antikörper kodieren, mit einem Bakteriophagenhüllprotein fusioniert. Durch die Infektion von Bakterien mit Phagenpartikeln, die dieses Fusionsgen enthalten, kommt es zur Bildung von Phagen mit Expression antikörperähnlicher Fusionsproteine auf deren Oberfläche. Diese Fusionsproteine fungieren als antigenbindende Domänen und werden an der Phagenhülle exprimiert. Eine Sammlung rekombinanter Phagen mit einem großen Repertoire an antigenbindenden B-Zell-Rezeptoren wird auch als Phagen-Display-Bibliothek bezeichnet [61].

Bei der klassischen Phagen-Display-Methode wurden Fertilitätsplasmid ( $F^+$ )-enthaltende *E. coli* Bakterien mit nicht-lytischen, filamentösen M13-Phagen infiziert. Die Gensegmente, die entweder unterschiedliche Variationen von Einzelketten-Fragmenten (englisch: ‚single chain variable fragment‘, scFv) oder Fab-Antikörperfragmenten kodieren, wurden zuvor mit dem pIII-Hüllprotein der Phagen fusioniert. Das pIII-Hüllprotein liegt mit drei bis fünf Kopien pro Phagenpartikel vor und ermöglicht die Bindung des Phagen an den Fertilitätspilus (F-Pilus) von  $F^+$  *E. coli*. Nach Infektion der Bakterien werden die zirkuläre Einzelstrang-DNA-Moleküle im Zytoplasma der Wirtszelle repliziert, verpackt und als neue, infektiöse Partikel freigesetzt. Die neuen Phagenpartikel enthalten ebenfalls das pIII-Fusionsprotein zusammen mit einem scFv oder Fab und exprimieren dieses auf der Phagenoberfläche. Nach einer

## Einleitung

Aufreinigung der Phagenpartikel können diese zum sogenannten Biopanning genutzt werden. Es handelt sich dabei um eine Affinitätsselektionsmethode, mit der spezifisch bindende Phagen angereichert werden können. Die aufgereinigten Phagen werden hierzu mit einem spezifischen, statischen Antigen inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt ein Waschschriff. Phagen, die nicht an das Antigen binden, werden dabei ausgewaschen. Die Phagen, die aufgrund ihrer V-Domäne das statische Antigen binden, werden in Bakterien für weitere Selektionsrunden vermehrt.

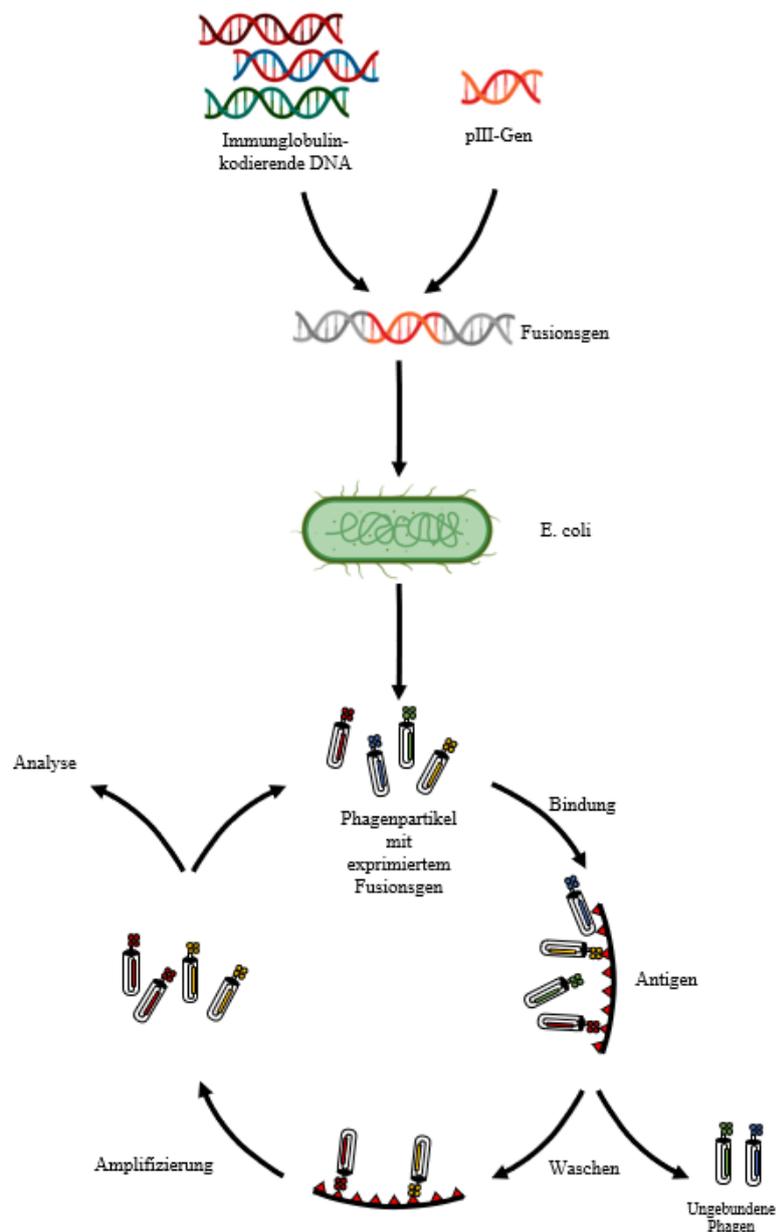


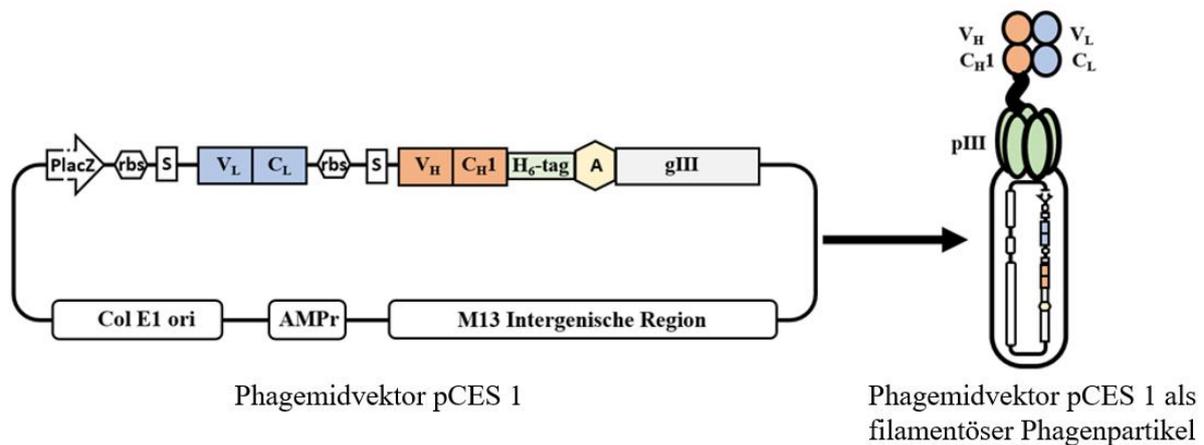
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Phagen-Display-Methode

DNA, die Millionen unterschiedlicher Ig-Gene kodiert, wird mit dem Gen für das Bakteriophagenhüllprotein pIII fusioniert. Mit Phagen, die solche Fusionsgene enthalten, werden Bakterien infiziert. Die daraus entstehenden Phagenpartikel exprimieren ein antikörperähnliches Fusionsprotein, das auf der Phagenhülle exprimiert wird. Durch Inkubation der Phagenpartikel mit einem statischen Antigen kommt es zur antigenspezifischen Bindung von Phagenpartikeln. Durch einen Waschschriff werden

## Einleitung

ungebundene Phagen entfernt. Die selektierten Phagen werden in Bakterien amplifiziert und wiederholt mit dem Antigen in abnehmender Konzentration inkubiert. (Quelle: modifiziert nach Hoogenboom HR, de Bruïne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends J-W, Roovers RC (1998) *Antibody phage display technology and its applications*. *Immunotechnology* 4:1–20)

### 1.4.2 Phagemide



**Abbildung 5:** Darstellung des Phagemidvektors pCES1 als Plasmid und als filamentöser Phagenpartikel mit exprimiertem Fusionsprotein.

Die Gene für die V-Region, bestehend aus der L-Kette ( $V_L$ ,  $C_L$ ) und der H-Kette ( $V_H$ ), sowie die Gene für die C-Region ( $C_H$  1), sind mit dem Hüllproteingen  $gIII$  des filamentösen Phagen verbunden. (AMPr: Ampicillin-Resistenz; Col E1: Colicin E1 Gen; A: Amber Stopp-Codon; rbs: Ribosomenbindungsstelle; S: Signal Sequenz). (Quelle: modifiziert nach Hoogenboom HR, de Bruïne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends J-W, Roovers RC (1998) *Antibody phage display technology and its applications*. *Immunotechnology* 4:1–20)

Der pCES1 Vektor enthält mehrere funktionelle Abschnitte, wie zum Beispiel den sogenannten Hexahistidin-Tag. Dabei handelt es sich um DNA-Fragmente, die für eine Aminosäuresequenz aus sechs aufeinanderfolgenden Molekülen Histidin kodieren. Dieses rekombinante Protein kann später zur Aufreinigung neuproduzierter Fab mit Hilfe einer Affinitätschromatographie genutzt werden. Der Laktose Z-Promotor (PlacZ) ist eine Basensequenz, an die die RNA-Polymerase von *E. coli* binden kann, wodurch die Transkription ermöglicht wird. Die Expression von PlacZ wird durch Laktose und Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert [66], sowie durch die lokale Glukosekonzentration reguliert. Glukose wirkt dabei als Repressor auf den PlacZ. Die RNA-Polymerase kann somit nicht mehr an den Promotor binden und keine Transkription der Phagemid-Gene auslösen. Hohe Konzentration an Glukose verhindern zwar die PlacZ- Expression, jedoch fördern sie gleichzeitig eine Infektion der Bakterien mit M13-Helferphagen. Phagemide nutzen PlacZ zur Expression des  $gIII$ -Antikörper Fusionsproduktes [22]: In der Abwesenheit von Glukose kommt es zur  $gIII$ -Fab-Antikörper Expression. Das Amber

## Einleitung

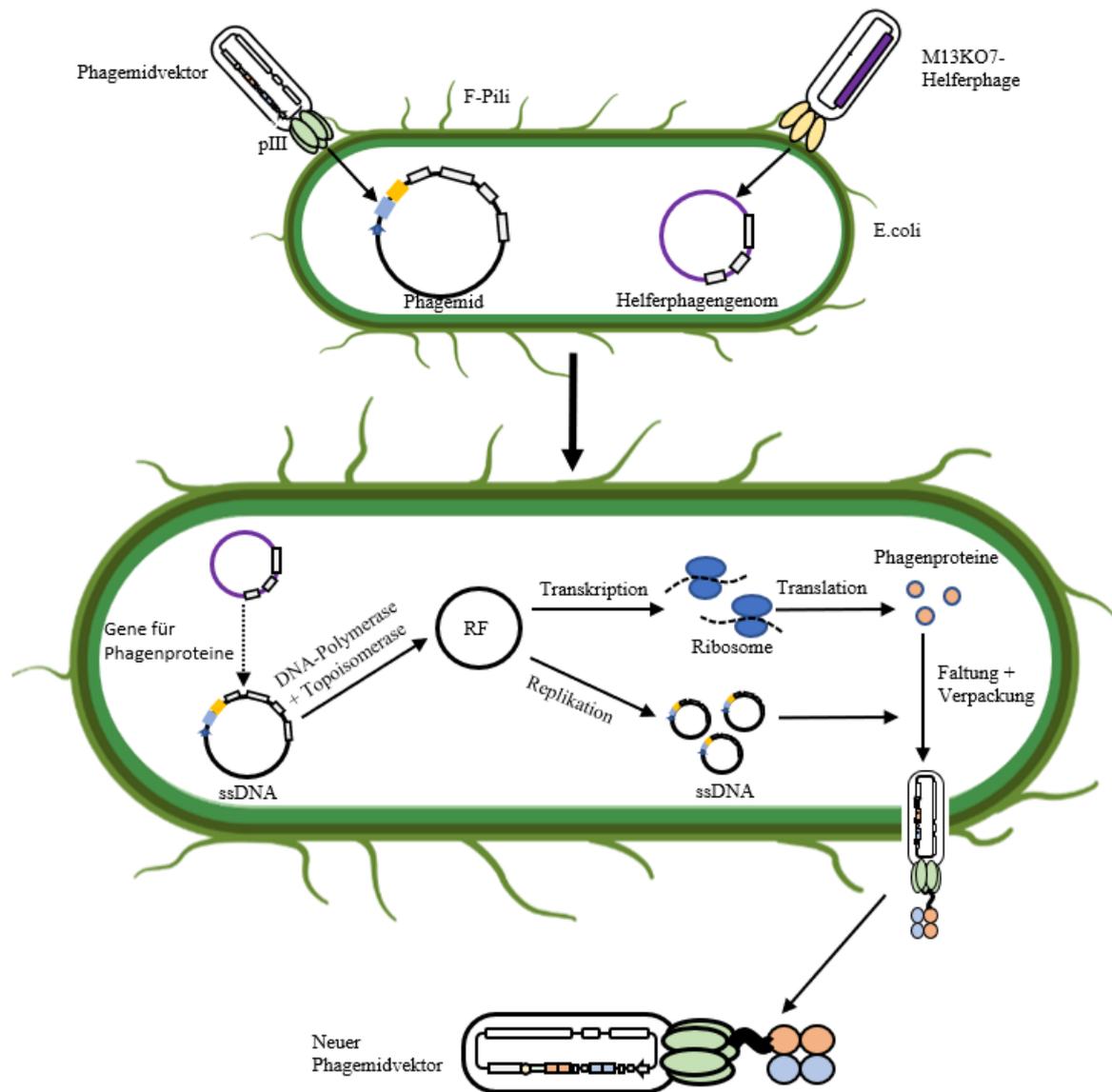
Stopp-Codon zwischen den Genen der V-Region und den Genen des Hüllproteins ermöglicht die Expression der Proteine in löslicher Form. Bei der Translation bewirkt das Amber-Codon einen Kettenabbruch, sodass keine Synthese des gIII-Hüllproteins stattfindet und nur der Fab-Antikörper inklusive Histidin-Tag gebildet wird. In TG1 Stämmen wird das Stoppcodon TAG nicht als solches erkannt, sondern kodiert stattdessen für Glutaminsäure [68]. Das Phagemidgenom enthält zudem ein Antibiotika-Resistenzgen zur Selektion infizierter *E. coli*, sowie mehrere Bindungsstellen für Restriktionsenzyme, welche eine spätere Klonierung erlauben.

Für unsere Experimente nutzten wir eine Phagemid-Antikörper-Bibliothek. Bei einem Phagemid handelt es sich um einen Hybriden bestehend aus einem filamentösen M13-Phagen und einem Plasmid mit zirkulärer Einzelstrang DNA (englisch: ‚single stranded DNA‘, ssDNA). Phagemide besitzen somit die Eigenschaft, wie ein Plasmid zu wachsen, und wie ein Phagenpartikel verpackt zu werden [89].

Das Phagemid enthält somit Gene für ein strukturelles Phagenprotein (hier pIII), sowie Gene für ein darzustellendes Protein, in unserem Fall ein spezifisches Fab, die miteinander fusioniert wurden. Die Phagemide können mit Unterstützung von Helferphagen, zum Beispiel M13KO7 Helferphagen, in filamentöse Phagenpartikel mit der typischen Morphologie eines filamentösen Phagen umgewandelt werden. Bei Koinfektion einer Bakterienkultur stellt dieser Helferphage dem Phagemid die Gene für fehlende Strukturproteine, sowie für eine Kanamycin-Resistenz bereit [68]. Filamentöse Phagen nutzen beispielsweise den F-Pili von *E. coli*, um mit Hilfe ihres pIII-Fusionsproteins in die Wirtszelle einzudringen. Die Phagemid-ssDNA wird durch die RNA-/DNA-Polymerase und Topoisomerase des Wirtes in ihre replikative Form überführt. Die Enzyme setzen hierfür am Replikationsursprung (ORI) des Minusstrangs in der intergenen Region an.

Die replikative Form dient als DNA-Matrize für die Translation und Herstellung neuer Phagemidproteine und wird aufgrund ihrer bakteriellen Herkunft wie ein Plasmid repliziert. Hierfür wird der ColE1-ORI genutzt. Nach Replikation der DNA, sowie der Transkription und Translation der Phagemidproteine an den bakteriellen Ribosomen, werden beide Komponenten zur inneren Membran der Wirtszelle transportiert.

Auf dem Plusstrang in der intergenen Region des Phagemids befindet sich ein weiterer ORI. Dieser wird erst aktiviert, wenn es zu einer Koinfektion mit einem Helferphagen kommt. Die Verpackungssequenz, die ebenfalls in der intergenen Region des Phagemids liegt, interagiert mit dem Proteinmontagekomplex an der inneren Zellmembran der *E. coli* Bakterien, was den Zusammenbau neuer Phagemidpartikel induziert [68].

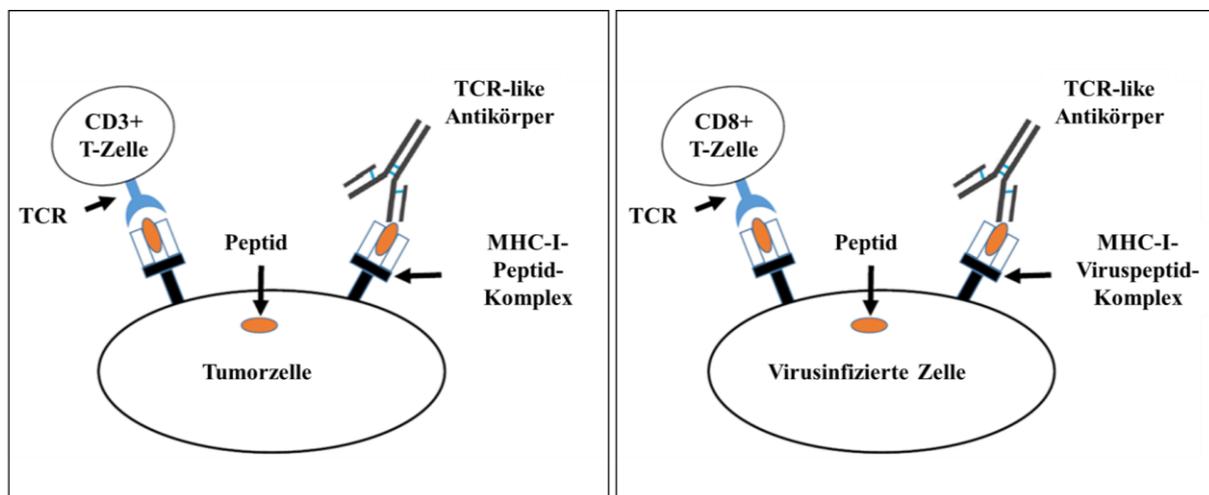


**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Phagemidreplikation unter Zuhilfenahme der genetischen Information eines M13KO-Helferphagen

Nach der Infektion des *E. coli*-Bakteriums durch das Phagemid und den Helferphagen wird die ssDNA des Phagemidvektors durch die DNA-Polymerase und Topoisomerase des Wirtes in ihre replikative Form überführt. Der Helferphage stellt Gene für zusätzliche, zur Phagemidreplikation notwendige Phagenproteine zur Verfügung. Nach der Replikation und Translation der Vektor-DNA erfolgt der Zusammenbau der neuen Phagenpartikel innerhalb der inneren Bakterienzellmembran (RF: replikative Form). (Quelle: modifiziert nach Wang, Y., Zhang, G., Zhong, L., Qian, M., Wang, M., & Cui, R. (2022). Filamentous bacteriophages, natural nanoparticles, for viral vaccine strategies. *Nanoscale*, 14(16), 5942–5959)

### 1.4.3 Fragestellung und TCR-like Antikörper

Eine Infektion mit CMV nach allogener HSCT oder SOT stellt eine schwerwiegende Komplikation bei Patienten mit eingeschränkter T-Zellantwort dar. Die effektive Immunantwort auf eine CMV-Infektion ist vor allem T-Zell-abhängig. Die Präsentation von Antigenen virusinfizierter Zellen erfolgt durch MHC-Klasse-I-Rezeptoren. Diese Rezeptoren präsentieren spezifische Peptide, die durch interzelluläre Prozessierung von Proteinen entstanden sind. T-Zell-Rezeptoren sind in der Lage, diese MHC-Viruspeptid-Komplexe zu binden. Antikörper binden natürlicherweise nicht an Peptide, die über MHC-I- oder MHC-II-Komplexe präsentiert werden. Antikörper, die hergestellt werden, um diese Strukturen zu binden heißen T-Zellrezeptor (englisch: ‚t-cell receptor‘, TCR)-like Antikörper. Diese TCR-like Antikörper können mit hoher Affinität an von MHC-I-Rezeptoren präsentierte virale oder tumoröse Antigene binden und diese so für das Komplementsystem, NK-Zellen oder phagozytierende Zellen markieren. So besteht die Möglichkeit, diese TCR-like Antikörper gezielt gegen virusinfizierte Zellen einzusetzen [5,41,47]. Die MHC-I-Rezeptoren werden über die drei Allele HLA-A, HLA-B und HLA-C kodiert. Da das CMV gezielt die Expression von HLA-A und HLA-B- Rezeptoren herunterreguliert, aber kaum die Expression der HLA-C beeinflusst [36], haben wir mit Hilfe der Phagen-Display-Methode nach HLA-C\*07:02-restringierten, CMV-spezifischen Antikörpern gesucht. Die identifizierten Antikörper sollten anschließend als Fab-Antikörper in *E. coli* Bakterien exprimiert und mittels Durchflusszytometrie auf mit CMV-Peptid beladenen, lymphoplastoiden Zellen getestet werden.



**Abbildung 7:** Tumor- und Virusantigenpräsentation über den MHC-Klasse-I-Komplex

Der von der Tumorzelle (beziehungsweise virusinfizierten Zelle) exprimierte Peptid-MHC-Komplex wird sowohl von der CD3<sup>+</sup>- beziehungsweise CD8<sup>+</sup>- T-Zelle, als auch dem TCR-like Antikörper in Form eines IgG erkannt. (Quelle: modifiziert nach Klein C, Lammens A, Schäfer W, Georges G, Schwaiger M, Mössner E, Hopfner K-P, Umaña P, Niederfellner G (2013) Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs* 5:22–33)

## 2.0 Material

### 2.1 Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
1 M Salzsäure (HCl)	AppliChem
1 M Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck
1 M Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Ambion
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Sigma
10x PCR-Puffer (enthält Magnesium)	Thermo Scientific
10x T4 DNA-Ligase Puffer	Thermo Scientific
40 % Glucose-Lösung	Braun
85 % Glycerol	Merck
100x bovines Serumalbumin (BSA)	Biolabs
Agar	Difco
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Ampicillin Stocklösung (100 mg/ml)	Ratiopharm
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Bacto™ Yeast Extract	BD
Bacto™ Tryptome	BD
Biotinyliertes BSA [1 µg/ml]	Biolabs
Bromphenolblau	Merck
Complete Tablets, EDTA-free, easy pack (Proteaseinhibitor)	Roche
Chloramphenicol	Sigma
Coomassie (Serva Blue R)	Serva
CutSmart Buffer 10x concentrated	Biolabs
D (+)-Biotin BioChemica	AppliChem
Difco™ Agar, Granulated	BD
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Dream Taq 10x Puffer	Thermo Scientific
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethidiumbromid (1 % Lösung)	Merck

## Material

Essigsäure	Roth
FACSFlow™	BD
Fetal calf serum (FCS)	biowest
Fd tet forward Primer (5' TTT GTC GTC TTT CCA GAC GTT AGT '3)	Sigma
Gene ruler 1 kb DNA-Leiter	Thermo Scientific
Guanidinhydrochlorid (Guanidin- HCl)	Merck
HLA.B27 BD FACS lysing Solution	Becton, Dickinso and Company, BD Bioscience
HyBeads Streaptavidin	Hyglos GmbH - a bioMérieux company
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt (Yeast-Extract)	Becton, Dickinson and Company Bacto™
HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure	Sigma
Imidazol	Fluka
Invitrogen 50 bp DNA-Leiter	Thermo Scientific
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Scientific
Kanamycin sulfate	Calbiochem
L-Arginine Base	Sigma
Leucepeptin	Sigma
M13 Reverse Primer (5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG '3)	Sigma
Magermilchpulver (MM)	Hochwald-Nahrungsmittelwerke GmbH
Methanol	Merck
NaCl	Caelo
Natriumacetat (NaAc)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
NEB 2 Puffer (New England Biolabs buffer)	Biolabs
Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTP)	Thermo Scientific
oxidiertes Glutathion	Sigma
Page ruler (Prestained Protein Ladder)	Thermo Scientific
Peptostatin	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylene (PEG)	Sigma
reduziertes Glutathion	Merck
RPMI 1640	Pan Biotech
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth

## Material

Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck
Serva Blue R (Coomassie)	Serva
Streptavidin, lyophilized [5 µg/ml]	Iba
Streptavidin PE	Jackson Immuno Research
Sucrose	Sigma
Talon Metal Affinity Resin	Takara
Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Merck
3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Microwell Peroxidase Substrate System, bestehend aus: <ul style="list-style-type: none"> <li>• TMB-Peroxidase Lösung B</li> <li>• TMB-Peroxidase Substrat</li> </ul>	KPL
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	In Labor angesetzt, Ausgangsmaterial zur Verfügung gestellt vom José-Carreras-Institut für Immun- und Gentherapie
Triethylamine (TEA)	Sigma
Triton X-100	Sigma
TRIS-Hydroxymethylaminomethan (TRIS-Puffer)	Merck
TRIS-HCl (TRIS-Hydrochlorid)	Roth
Tween 20	Caelo
Trypsin-EDTA Solution	Sigma

**Tabelle 2:** Verwendete Peptide und Proteine

Protein/Peptid	Sequenz	Hersteller
β <sub>2</sub> -Mikroglobulin, leichte Kette	Siehe Anhang	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
CMV	CRVLCYVL (IE-1, Cw0702-CMV)	GeneCust
MageA12	VAIGHLTIL-OH (Cw0702) MageA12	GeneCust

**Tabelle 3:** Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
BstNI (Restriktionsenzym) Schnittsequenz: CC/W(AT)GG	Biolabs

## Material

DNase I	Applichem
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Scientific
EcoR I HF (high fidelity) Schnittsequenz: G/AATTC	Biolabs
Thermo Scientific T4 DNA-Ligase	Thermo Scientific
Lysozym	Roche
Not I HF (high fidelity) Schnittsequenz: GC/GGCCGC	Biolabs

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Maus-Anti- $\alpha$ -M13 POX (Antiphagen-Antikörper)	GE-Healthcare
Anti-c-myc, Klon 9E10, (Maus)	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Anti-Streptavidin-Phage, Klon F2-Phage	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin (Anti-Mouse POX)	Dako
TÜ155 Antikörper (Maus)	Zur Verfügung gestellt von Prof. Andreas Ziegler, Berlin
W6/32 Antikörper (Maus)	Dako

Tabelle 5: Verwendete Bakterien und Phagen

<b>Bakterien</b>	<b>Bakterienstamm/Phage</b>	<b>Eigenschaften/Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
E. coli	BL 21 (DE3)	Expressionsbakterien	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
E. coli	AVB101	Enthält pBirAcm, ein pACYC184 Plasmid mit IPTG induzierbaren BirA- Gen zur Expression von Biotin-Ligase	Avidity
E. coli	TG1	Phagenproduktion und Proteinexpression. Es handelt sich um einen Amber-Unterdrückungsstamm.	Onkologisches Labor, Uniklinik des

## Material

			Saarlandes, Hom- burg
Helfer- Phage	M13KO7	Kanamycin Resistenz, [Stock-Lösung: 1,35 x10 <sup>10</sup> pfu/μl]	GE-Healthcare

## 2.2 Medien, Puffer und Lösungen

### 2xTY-Agar:

- 16 g Trypton
- 10 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- 15 g Agar
- 2 % Glukose
- 100 μg/ml Ampicillin
- Auf 1 l Aqua destillata (*A. dest.*) auffüllen
- **Für 2xTY-AC-Agar** 25 μg/ml Chloramphenicol zugeben

### 2x TY-Medium

- 16 g Trypton
- 10 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- Auf 1 l *A. dest.* auffüllen
- **Für 2xTY-AG:** 2 % bzw. 0.1 % Glukose und 100 μg/ml Ampicillin
- **Für 2xTY-AK:** 100 μg/ml Ampicillin und 25 μg/ml Kanamycin
- **Für 2xTY-AC:** 100 μg/ml Ampicillin, 25 μg/ml Kanamycin und 0,1% Glukose

### Lysogeny Broth (LB)-Agar

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- 15 g Agar
- 1 l *A. dest.*
- **Für LB-AC-Agar:** 100 μg/ml Ampicillin und 25 μg/ml Chloramphenicol

## Material

### LB-Ampicillin-Chloramphenicol-Medium (LB-AC)

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- 1 l *A. dest.*
- 100 µg/ml Ampicillin
- 25 µg/ml Chloramphenicol

### SOC-Medium:

- 20 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 0,6 g NaCl (10 mM)
- 0,2 g KCl (2,5 mM) in *A. dest.*
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 20 mM Glukose
- Auf 1 l *A. dest.* auffüllen

### 12 % Polyacrylamid-Gel

- 3,3 ml *A. dest.*
- 4,0 ml 30 % Acrylamid-Mix (Rotiphorese Gel 30)
- 2,5 ml TRIS (1,5 M, pH 8.8)
- 0,1 ml SDS
- 0,1 ml APS
- 0.004 ml TEMED

### 15 % Polyacrylamid-Gel

- 2,3 ml *A. dest.*
- 5,0 ml 30 % Acrylamid-Mix
- 2,5 ml TRIS (1,5 M, pH 8.8)
- 0,1 ml 10 % SDS
- 0,1 ml 10 % APS
- 0.004 ml TEMED

### Stack-Gel für Gelelektrophorese

- 1,4 ml *A. dest.*
- 0,33 ml 30 % Acrylamid -Mix

## Material

- 0,25 ml TRIS (1 M, pH 6.8)
- 0,01 ml 10 % SDS
- 0,01 ml 10 % APS
- 0.001 ml TEMED

### 10x Lämmli-Puffer (Tris-Glycin-Puffer)

- 144 g Glycin
- 30,34 g TRIS (1 M, pH 6,8)
- 10 g SDS
- 1 l *A. dest.*

### Reduzierender 5x SDS-Ladepuffer

- 0,6 ml TRIS (1 M, pH 6,8)
- 3 ml 85 % Glycerol
- 2 ml 10 % SDS
- 10 mg Bromphenolblau
- 4,4 ml *A. dest.*
- 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

### DNA-Ladepuffer 1 ml Ansatz

- 1 mg Bromphenolblau
- 2 mg Xyleucyanol
- 2 mg Orange G
- 0,5 g Sucrose
- 1 mM EDTA (1mM)
- 1 ml *A. dest.*

### Coomassie-Färbelösung

- 2,5 g Serva Blue R (Coomassie)
- 400 ml Methanol (10 M)
- 100 ml Essigsäure (1,7 mM)
- 500 ml *A. dest.*

### Coomassie-Entfärbelösung

- 400 ml Ethanol (10 M)
- 100 ml Eisessig (1,7 mM)

## Material

- 500 ml *A. dest.*

### 1 % Agarose-Gel

- 1 g Agarose
- 100 ml TAE
- zweimal für je 3 min erhitzen
- Mit *A. dest.* auf 100 ml auffüllen
- 100 µl Ethidiumbromid

### 3 % Agarose-Gel

- 3,75 g Agarose
- 125 ml TAE
- 20 ml *A. dest.*
- zweimal für je 3 min erhitzen
- 100 µl Ethidiumbromid

### Lysozym

- 1 g Lysozym (50 mg/ml)
- 20 ml *A. dest.*

### DNase I

- 2 mg/ml DNase I
- 50 % Glycerol
- 75 mM NaCl

### Resuspensionspuffer (pH 8)

- 50 mM TRIS-HCL (1 M)
- 25 % Saccharose
- 1 mM EDTA (0,5 M)
- 0,1 % Natriumazid
- 10 mM DTT

### Waschpuffer (pH 8)

- 50 mM TRIS-HCL (1 M)
- 100 mM NaCl (5 M)
- 1 mM EDTA (0,5 M)

## Material

- 0,1 % Natriumazid
- 1 mM DTT
- 0,5 % Triton X-100

### Dithiothreitol (DTT) (1 M)

- 1,54 g DTT
- 10 ml *A. dest.*

### 2-N-Morpholino-ethansulfonsäure (MES) (pH 6)

- 19,52 g MES
- 100 ml *A. dest.*

### Harnstofflösung (pH 6)

- 25 mM MES (1 M in *A. dest.*)
- 240,24 g Harnstoff (8 M)
- 10 mM EDTA (0,5 M)
- 100  $\mu$ M DTT

### Faltungspuffer (pH 7,76)

- 400 mM L-Arginine Base
- 100 mM HEPES
- 1 ml EDTA (0,5 M, pH 8)
- 250 ml *A. dest.*

### Injektionspuffer (pH 4,2)

- 28,66 g Guanidin-HCl (3 M)
- 10 mM NaAc (10 mM)
- 10 mM EDTA (10 mM)
- 100 ml *A. dest.*

### Tris-buffered saline (TBS), gefiltert

- 20 mM TRIS (pH 8 bei 4 °C)
- 150 mM NaCl
- *A. dest.*

## Material

### PMSF (200 mM)

- 34,84 mg PMSF
- 1 ml Methanol

### 4 % MM/PBS:

- 4 g Magermilch (MM)-Pulver
- 100 ml PBS

### 2 % MM/PBS/0,1 % Tween 20

- 0,5 ml 4 % MM/PBS
- 0,5 ml 0,2 % Tween 20

### 20 % PEG/2,5M NaCl

- 20 % Polyethylenglycol (PEG) 6000 (2,5 M)
- 2,5 M NaCl

### Biotinyliertes BSA/PBS

- 2 mg/ml biotinyliertes BSA
- PBS

### Maus-Anti- $\alpha$ -M13 POX in 2 % MM/PBS/0,05 % Tween 20

- 20 ml MM/PBS (4 %)
- 1 ml Tween 20 (2 %)
- 20 ml PBS
- 8  $\mu$ l  $\alpha$ -M13 POX

### Streptavidin/PBS

- 20 ml PBS
- 200  $\mu$ l Streptavidin

### TS-Puffer (pH 8)

- 12,1 g TRIS (0,2 M)
- 85,6 g Sucrose (0,5 M)
- Mit *A. dest.* auf 500 ml auffüllen

## Material

### Protease-Inhibitor

- 1 Tablette Protease-Inhibitor
- 2 ml *A. dest.*

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

- 26 G Spritzen
- AirPore Tape Sheets von QIAGEN (Folienabdeckung)
- Bio Rad Schwerkraftsäulen
- Biomax 30 kDa Ultrafiltration Membrane (Merck, Anleitung siehe Hersteller, anstelle Milli-Q-Wasser wird autoklaviertes Wasser verwendet)
- Dialyseschlauch: SERVATOR dialysis tubing, MWCO 12000-14000n, Diameter 21mm
- DYNAL MPC-S Magnet
- Filterpapier (Schleicher & Schuell; S&S folded filter Ø 240mm)
- Kendrogefäße
- NucleoSpin® Plasmid (NoLid), DNA, RNA and Protein purification kit, Macherey-Nagel
- Pall Centrifugal Devices, Microsep Advance with 10K Omega
- PP-Messbecher
- TC-Platte 96 Well, Standard von Saarlstedt
- TC-Platte 96 Well, Standard R von Saarlstedt
- Thermo Fischer Scientific Nunc U-Form Platten (Nunc™ 96-Well Polystyrene Round Bottom Microwell Plates)
- Vakuum Filter (VWR Bottle Top Filtration Units; 250ml, 0.2 µm PES)
- Zymoclean Gel DNA Recovery kit (Zymo Research)

## 2.4 Geräte

- Amicon Rührzelle (Model 202, 75 PSI max)
- ÄKTA prime automated liquid chromatography system
- Bio Rad Power Supply
- Eppendorf Zentrifuge 5810R
- Eppendorf Mikrozentrifuge 5415 R
- Erlenmeyerkolben
- Heidolph Unimax 1010 mit Heidolph Inkubator 1000

## Material

- HERA cell, Inkubationsschrank
- HERA safe, Heraeus Instrumentes, Sicherheitswerkbank
- Hermle AG, Kühlzentrifuge ZK 380
- Mettler Toledo pH-Meter
- MJ Research: PTC-200 Thermocycler
- Multifuge 3 S-R von Heraeus
- Nanodrop™ Thermo Scientific
- Neubauerzählkammer (improved) von Superior
- Photometer: Amersham Biosciences; GeneQuant pro
- Stuart Scientific Block Heater
- Stuart Scientific Blood Tube Rotator SB1
- Sysmex Rolling Mixer RM-810
- Ultraschall-Homogenisator: Brunson Digital Sonifier, Model 450D
- Vakuumpumpe (Vacubrand Mz2C)
- Wallace Victor2 Multilabel Counter

## 3.0 Methoden

### 3.1 Elektrophorese

#### 3.1.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zum Auftrennen von DNA-Molekülen genutzt, die anschließend mittels Färbung sichtbar gemacht werden. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die durch ihr Phosphatrückgrat negativ geladenen Nucleinsäuren zur Anode. Das Agarosegel dient als eine Art molekulares Sieb und trennt die DNA-Fragmente nach ihrer Größe auf. Größere Fragmente wandern dabei langsamer als kleinere, da sie durch die Poren des Gels stärker zurückgehalten werden.

Agarose ist ein Polysaccharid, das aus den Zellwänden der Rotalge gewonnen wird. Sie wird in Pulverform mit TAE-Pufferlösung erhitzt, beim Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzt und in Form gegossen. Der Agaroseanteil bestimmt das Auflösungsvermögen des Gels. Ein hoher Agaroseanteil erhöht die Dichte des Gels und stellt für die DNA-Fragmente einen erhöhten Widerstand da. Ein Gel mit hohem Agarosegehalt eignet sich daher besser zur Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle, während ein geringerer Agaroseanteil größere DNA-Moleküle gut auflösen kann.

Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen Phenanthridin-Farbstoff (ein Interkalationsfarbstoff). Es interkaliert die Basenpaare der DNA und verändert hierdurch deren Absorptionsspektrum. Sein Emissionsspektrum bleibt dagegen unverändert. Ethidiumbromid bindet die aufgetrennten Nucleinsäuren äquimolar und verstärkt so das resultierende Fluoreszenzsignal proportional zur DNA-Konzentration in der Probe. Die Farbstoff-Nucleinsäure-Komplexe bilden im Gel Banden. Mit Hilfe eines Molekülmassenstandards (englisch: ‚DNA-ladder‘) kann die Größe der DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Als Puffermedium wird ein ionenhaltiger TAE-Puffer verwendet, der den elektrischen Strom leitet.

Für die Elektrophoresekammer wurde ein 3%iges Agarosegel gegossen und die einzelnen Taschen des Gels mit jeweils 10-15 µl DNA-Probe und je 4 µl Ladepuffer beladen. Zur Einschätzung der Größe wurde je Gel eine Tasche mit 5 µl Molekülmassenstandard (englisch: ‚gene ruler‘) beladen. Anschließend wurden eine Spannung von 80-120 V angelegt und das Ergebnis unter ultravioletter (UV) Lichtstrahlung fotografiert.

#### 3.1.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Auftrennen von Proteinen wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) genutzt. Das Prinzip ist ähnlich dem der Agaroselektrophorese, allerdings wird als Trennmedium ein ungeladenes Polyacrylamid-Gel genutzt. Das Polyacrylamid-Gel enthält Natriumdodecylsulfat (SDS), welches an Proteine bindet und zu einem negativen Ladungsüberschuss führt. Somit wird die Eigenladung der einzelnen Aminosäuren innerhalb eines Proteins neutralisiert. Durch Anlegen einer Spannung wandern die nun negativ geladenen Proteine zum Pluspol, wobei ihre Laufstrecke

und -geschwindigkeit allein von ihrer Molekülgröße abhängig sind. Kleinere Proteine wandern somit schneller durch das Gel, als größere Proteine. Zur Größenabschätzung wurde auch hier ein standardisierter Größenmarker eingesetzt.

### 3.1.3 Coomassie Färbung

Die SDS-Gele wurden nach dem Trennvorgang mit dem Coomassie-Farbstoff Serva Blue R gefärbt. Dieser lagert sich an die basischen und aromatischen Ketten von Aminosäuren an. Da die Färbelösung auch das Gel färbt, wird dieses mit einer Entfärbelösung behandelt. Zur Fixierung der Proteine und Färbung wurden die Gele 30 min in der Färbelösung mit Methanol und Essigsäure inkubiert. Über Nacht (12-15 h) wurde das gefärbte Gel dann anschließend zusammen mit der Entfärbelösung auf einem Kipp-tisch geschwenkt. Die Proteinbanden sollten nach der Färbung deutlich auf dem Gel erkennbar sein.

## **3.2 Herstellung der MHC-Klasse-I-Moleküle**

Für die Selektion der CMV-spezifischen, HLA-C\*07:02 restringierten Phagen werden allelspezifische Komplexe benötigt. Die Liganden bestehen aus HLA-C\*07:02 Molekülen, die mit dem CMV-Peptid CRVLCYVYL [3] beladen wurden. Das MHC-Klasse-I-Molekül besteht aus einer  $\alpha$ -Kette (43 kDa) und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin (12 kDa). Die schwerere  $\alpha$ -Kette wurde durch ein rekombinantes DNA-Expres-sionsverfahren, das im Folgenden beschrieben wird, hergestellt. Das  $\beta_2$ -Mikroglobulin wurde vom José-Carreras-Institut für Immun- und Gentherapie freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 3.2.1 Synthese der MHC-I- $\alpha$ -Ketten und Aufreinigung

Der Expressionsvektor pET3, welcher das Gen für die MHC-I- $\alpha$ -Kette enthält [2], wurde zusammen mit einem pBirAcm Vektor [48] in *E. coli* Bakterien (BL21(DE3)) eingebracht. Der pET3 Vektor trägt eine T7-Promotorsequenz, dahinter folgen die kodierten Informationen über die Zusammensetzung der  $\alpha$ -Kette. An den T7-Promotor bindet die T7-RNA-Polymerase, die zur Transkription der Gene notwendig ist. Die Expression des T7-Polymerase-Gens unterliegt der Kontrolle eines Lac-Promotors (lacUV5), der durch IPTG oder Laktose induziert werden kann. In Gegenwart von IPTG kommt es zur Bildung der T7-Polymerase durch das Bakterium. Daraufhin kann die Polymerase an den T7-Promotor des pET3 Vektors binden, wodurch das Proteinprodukt exprimiert werden kann. Der pBirAcm-Vektor enthält Gene zur späteren in-vivo Biotinylierung und eine Chloramphenicol-Resistenz.

Vor der Transformation wurden die Bakterien auf Eis (4 °C) gelagert und anschließend mit 10 ng DNA für 15 min versetzt. Nach einem Hitzeschock (45 s) im 42 °C warmen Wasserbad erfolgte eine erneute zweiminütige Kühlung (4 °C). Danach wurden der Bakterienlösung je 250  $\mu$ l SOC-Medium hinzugefügt und die Mischung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-AC-Platten ausplattiert und über Nacht (12-15 h) bei 37 °C inkubiert.

## Methoden

Nur Bakterien, die die entsprechenden Antibiotikaresistenzen durch erfolgreiche Transformation erworben hatten, können sich unter diesen Bedingungen entsprechend vermehren.

Am nächsten Tag wurde dann eine einzelne Kolonie der transformierten Bakterien von der Agarplatte mit einer sterilen Öse gepickt und diese in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-AC-Medium (1 % Glukose) übertragen. Die Bakterienlösung wurde anschließend über Nacht (12-15 h) bei 37 °C inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden jeweils 10 ml in sechs Kolben mit je 500 ml LB-AC-Medium gegeben und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert, bis durch eine Vermehrung der Bakterien eine optische Dichte zwischen 0,6 und 1,0 erreicht wurde. Zu jedem Kolben wurde dann IPTG (0,5 mM) hinzugegeben. IPTG wirkt als Induktor des Lac-Promotors und führt zur Expression der  $\alpha$ -Ketten durch die Bakterien. Nach einer weiteren Inkubation für 4 h bei 37 °C konnten die Bakterien geerntet werden.

Der jeweilige Inhalt der Kolben wurde in Kendrogefäßen für 30 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und jedes Bakterienpellet wurde in jeweils 12,5 ml eisgekühltem Resuspensionspuffer gelöst, bei 4 °C für 20 min auf einem Rolltisch inkubiert und anschließend mittels Magnetrührer vermischt. Zur Lyse der Bakterien wurden je 50 ml der Suspension tröpfchenweise mit 1 ml Lysozym-Lösung (50 mg/ml, finale Konzentration: 1mg/ml), 0,25 ml MgCl-Lösung (1 M, finale Konzentration 5 mM), 0,834 ml DNase I-Lösung (2 mg/ml, finale Konzentration: 33,33  $\mu$ g/ml), 0,5 ml Triton-X 100 (finale Konzentration: 1 %) und 0,5 ml DTT-Lösung (1 M, finale Konzentration: 10 mM) vermischt. Die Bakteriensuspension wurde für weitere 15 min bei Raumtemperatur (RT) gerührt und danach auf Eis gekühlt, wobei sich die Viskosität durch die freigesetzte DNA und das hinzugegebene Triton-X 100 erhöhte. Die Suspension wurde mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators zehnmal für jeweils drei Sekunden zerkleinert, um eine vollständige Lyse der Bakterien sicherzustellen. Das Lysat wurde dann bei 10 000 g und 4 °C erneut für 15 min zentrifugiert und ein Teil (50  $\mu$ l, S1) des Überstandes aus jedem der fünf Zentrifugationsröhrchen für spätere Untersuchungen aufbewahrt. Das Pellet aus Zelltrümmern, welches auch die schweren  $\alpha$ -Ketten enthielt, wurde mit Waschpuffer auf jeweils 25 ml aufgefüllt. Es folgte ein weiterer Behandlungsschritt mit Ultraschall-Homogenisation und Zentrifugation. Diese Schritte wurden dreimal wiederholt, wobei pro Wiederholung ebenfalls je 50  $\mu$ l Überstand (Probenbeschriftung mit S für englisch: ‚sample‘) entnommen wurde (S2-S5). Der letzte Waschschrift wurde mit Triton-X 100-freiem Waschpuffer durchgeführt.

Das Pellet, das als weißliche Ablagerung imponiert, wurde in 200  $\mu$ l *A. dest.* resuspendiert und in 6 ml frisch angesetzte Harnstofflösung aufgenommen. Diese Lösung wurde für 15 min bei 10 000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen aufbewahrt.

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei 280 nm am Photometer nach Hintergrundabgleich mit der proteinfreien Harnstofflösung. Die Konzentration der Harnstofflösung wurde auf 500 nM für die schwere Kette adjustiert. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die zwischen den verschiedenen Isolations- und Waschsritten entnommenen 50  $\mu$ l-Proben (beschriftet mit S1-S5) wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf ihren Gehalt an der gewünschten  $\alpha$ -Kette untersucht.

### 3.2.2 Einengung und Faltung

Nach der Synthese der  $\alpha$ -Ketten musste der MHC-I-Komplex unter Hinzugabe der kleineren  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Kette und des CMV-Peptids in einem mehrtägigen Prozess zusammengesetzt werden. Der Vorgang der Proteinfaltung wurde zum Schutz der Proben vor Proteasen und Denaturierung auf Eis (4 °C) durchgeführt.

Für den ersten Faltungsschritt wurde CMV-Peptid in DMSO gelöst (finale Konzentration: 10 mg/ml). Zu 250 ml Faltungspuffer wurden 385 mg reduziertes Glutathion (5 mM) und 77,5 mg oxidiertes Glutathion (0,5 mM) als Redox-Puffer zugegeben. Des Weiteren kamen 250  $\mu$ l Proteaseinhibitor (200 mM PMSF in Methanol) hinzu. Das CMV-Peptid wurde tropfenweise hinzugegeben.

Zur Vorbereitung wurden 8 mg der ungefalteten MHC-I-Kette (210 nmol) mit achtmolarem Harnstoff-Puffer (20 mg/ml) auf ein Volumen von 400  $\mu$ l aufgefüllt. Anschließend wurde 700  $\mu$ l Injektionspuffer zugegeben (finale Konzentration  $\alpha$ -Kette: 0,2 mM). Danach wurde die Lösung in eine 26 G-Spritze aufgezogen und kraftvoll in den Faltungspuffer ausgestoßen. Mit 7 mg der  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Kette wurde gleich verfahren. Der Reaktionsansatz wurde dann 24 h lang bei 6-7 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Im Abstand von jeweils 24 h wurden erneut zweimalig aufbereitete Lösungen mit  $\alpha$ -Ketten, wie bereits beschrieben, hinzugegeben. Nach insgesamt 72 h wurde dann die zweite Faltung induziert. Zuerst wurde die Lösung zunächst durch Filterpapier (Porendurchmesser: 240 nm) manuell und anschließend per Vakuumfiltration (Porendurchmesser: 0,22  $\mu$ m) gefiltert. Die Einengung auf 25 ml Gesamtvolumen geschah mit Hilfe einer Amicon-Rührzelle bei 4 bar und Filtration durch eine Biomax 30 Membran (englisch: ‚nominal molecular weight limit‘, NMWL; hier 30 kDa). Die Proteine des MHC-I-Komplexes wurden von der Membran zurückgehalten (Retentat), während kleinere Moleküle und Wasser die Membranporen passierten (Permeat).

Die Rührzelle wurde so lange mit dem Permeat gespült, bis etwa 25 ml desselbigen zurückbleiben. Das Retentat wurde in ein 50 ml Schraubröhrchen gefüllt und bei 4 °C gelagert. Dem gesammelten Permeat wurden nacheinander 250  $\mu$ l PMSF, 8 mg der  $\alpha$ -Kette und 7 mg der  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Kette in Harnstoff-Puffer und Injektionspuffer zugegeben und die gewonnene Lösung wie bereits beschrieben weiterbehandelt. Nach der Konzentrierung wurden die während der Prozedur entnommenen Retentate bei 4600 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und in einem Microsep advance centrifugal device bei 3000 g auf ein Gesamtvolumen von 5-6 ml konzentriert. Das Retentat wurde unter Verwendung einer S75 Säule (TBS als Puffer) mittels UV-Größenausschluss-Chromatographie in zwei Fraktionen mit unterschiedlichen Konzentrationen aufgeteilt (Fraktion 1: 2,2 mg/ml MHC-I-Komplex, Fraktion 2: 0,5 mg/ml MHC-I-Komplex). Die einzelnen Fraktions-Monomer-Spitzen sowie eine Leerkontrolle mit TBS-Puffer wurden bei 4 °C gelagert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgt am Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm. Zu den einzelnen Fraktionen wurden mehrere Proteasehemmer (PMSF, Leucepeptin und Pepstatin, jeweils 3,5  $\mu$ l) in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben. Eine Auftrennung der Proteine erfolgte per Elektrophorese bei 175 V in einem 15%igen Acrylamidgel mit anschließender

Coomassiefärbung der Banden. In jede Tasche wurden dazu 4 µg der Fraktion mit 4 µl 5x SDS-Ladepuffer gegeben und mit TBS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 16 µl aufgefüllt. Als Kontrolle wurde eine Probe mit Material von vor der Proteinaufreinigung mitgeführt. Die Fraktionen, welche gefaltete MHC-I-CMV-Peptid-Komplexe (Einschlusskörperchen) enthielten, wurden zu jeweils 10 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

### 3.3 Phagen-Display-Methode, Amplifikation und Selektion

Das Prinzip der Phagen-Display-Methode ist die Expression eines Fusionsproteins, sodass ein fremdes Protein (zum Beispiel ein Fab) auf der Bakteriophagenoberfläche präsentiert wird. Phagen- oder Phagemidbanken können nach exprimierten Proteinen, die mit einer Probe (zum Beispiel Antikörper/Antigen) interagieren, durchsucht werden, indem die Probe an einer Membran oder dem Well einer Mikrotiterplatte immobilisiert wird [66]. Die von uns genutzte Phagemidbank, bestehend aus M13 filamentösen Phagen mit pCES1-Vektoren und mit einer Diversität von  $3,7 \times 10^{10}$  verschiedenen Fab-Antikörpern, wurde vom José-Carreras-Institut für Immun- und Gentherapie zur Verfügung gestellt. Die Phagen exprimieren über ihr pIII-Protein unterschiedliche Fab-Proteine. Durch die Affinitätsauswahl sollen Phagen mit hoher spezifischer Bindungskapazität an den MHC-I-CMV-Peptid-Komplex gefunden werden [34]. Streptavidin beschichtete, magnetische Beads (hyBeads) binden wiederum an den biotinylierten MHC-I-CMV-Peptid-Komplex. Bei Streptavidin handelt es sich um ein von der Bakterienspezies *Streptomyces avidinii* produziertes Protein, welches mit seinen Untereinheiten nichtkovalent an Biotin und somit auch an die biotinylierten MHC-I-Peptid-Komplexe bindet. Durch die Inkubation der Phagemid-Bibliothek mit den MHC-I-Peptid-Komplex kommt es zur Bindung der Phagen an die Komplexe.

Der Vorgang des Bindens der verschiedenen Phagen wird auch als Biopanning bezeichnet, wobei die Bindestärke jeweils von der Affinität der Phagen zum entsprechenden Zielmolekül abhängt. In den folgenden Waschschrritten wurden die schwach bindenden Phagen schließlich entfernt und solche mit hoher Bindungsaffinität selektioniert. Diese für das Antigen hochaffinen Phagen wurden anschließend in *E. coli* Bakterien amplifiziert. Der gleiche Vorgang wurde in mehreren Selektionsrunden wiederholt.

#### 3.3.1 Affinitätsselektion der Antikörper

Vor Beginn der Selektionsrunden mussten die Phagen der Phagemidbank erst von ihrem Lösemittel Glycerin separiert werden. Die Phagen (600 µl) wurden im Verhältnis 5:1 mit 20 % Polyethylenglykol (PEG)/2,5 M NaCl (120 µl) versetzt, für 10 min auf Eis inkubiert und bei 3400 g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Das nach der letzten Ausfällung zurückbleibende Pellet wurde in 0,5 ml PBS aufgenommen. Um unspezifische Bindungsvorgänge zwischen Phagen und Reaktionsgefäßoberflächen zu unterbinden, wurden die Phagen mit 0,5 ml einer 4%igen MM/PBS-Lösung

## Methoden

für 60 min unter kontinuierlicher Durchmischung geblockt. 10 µl der Phagenlösung wurden anschließend für eine Input-Titration verwendet.

Zur Affinitätsselektion wurden 300 µl der hyBeads geblockt und 100 µl nicht-geblockt verwendet. Die nicht-geblockten Beads wurden hierbei alleinig mit PBS gewaschen, während die geblockten mit 0,5 ml der 4%igen MM/PBS behandelt wurden.

Die Phagen wurden für 15 min zunächst auf einem Rotator mit nicht geblockten Beads bei RT inkubiert, um unspezifisch bindende Phagen zu entfernen. Die Beads wurden magnetisch (DYNAL MPC-S Magnet) gebunden und der Überstand wurde in der ersten Runde mit 15 µg biotinyliertem MHC-I-CMV-Peptid-Komplex (300 nM) für 1 h auf einem Rotator bei RT inkubiert. Der Phagen-Antigen-Mix wurde nun für 15 min zu den geblockten hyBeads hinzugegeben. Die biotinylierten MHC-I-CMV-Peptid-Phagen-Komplexe binden das Streptavidin der hyBeads und können durch einen Magneten am Rand des Gefäßes fixiert und anschließend isoliert werden. Zunächst wurden die hyBeads mit den gebundenen Phagen sechsmalig mit je 1 ml einer 2%igen MM/PBS/0,1 % Tween 20-Lösung gewaschen und in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, damit die unspezifisch an das Plastik gebundenen Phagen zurückbleiben. Es folgte ein sechsmaliges Waschen mit je 1 ml PBS/0,1 % Tween 20-Lösung und ein erneuter Wechsel des Reaktionsgefäßes, sowie ein abschließendes zweimaliges Waschen mit 1 ml PBS ohne Zusätze. Die Phagen wurden durch 1 ml Triethylamin-Lösung (100 mM), welche einen pH-Shift in ein alkalisches Milieu verursacht, aus den Phagen-Antigen-hyBeads-Komplexen herausgelöst und eluiert. Die hyBeads wurden mit dem Magneten entfernt und das Phagen-Eluat wurde mit 0,5 ml TRIS (1 M, pH 7,4) neutralisiert.

In zwei weiteren Selektionsrunden wurden die Phagen mit 5 µg MHC-I-Kontrollpeptid-Komplex (100 nM) präabsorbiert. Hierzu wurden die selektierten Phagen für 30 min mit dem MHC-I-Kontroll-Peptid-Komplex bei RT inkubiert und unspezifisch bindende Phagen wurden mit ungeblockten Beads entfernt. In der zweiten und dritten Runde wurde die Konzentration des MHC-I-CMV-Peptid-Komplexes auf 100 nM reduziert. Das Volumen der zugegebenen Beads wurde in der zweiten Selektionsrunde auf 150 µl bzw. 50 µl und in der Dritten auf 75 µl bzw. 50 µl reduziert.

### 3.3.2 Infizieren von TG1 Bakterien mit Eluat zur Phagenamplifizierung

Um über die selektierten Phagen in ausreichender Quantität zu verfügen, wurden die Phagen zunächst in TG1 *E. coli* amplifiziert. Die Bakterien wurden aus einer Vorkultur zunächst bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 in 2xTY-Medium inkubiert. Die Phagen binden über ihr pIII-Protein an den F-Pilus von *E. coli* und werden daraufhin internalisiert. Während der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien sind diese für Phagen am einfachsten zu infizieren. 5 ml der Bakteriensuspension wurden mit 4 ml 2xTY-Medium und 1 ml Phageneluat für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 3400 g und Verwerfen des Überstandes wurde eine Volumenreduktion

## Methoden

erreicht. Das verbleibende Bakterienpellet wurde in 2 ml 2xTY-AG-Medium resuspendiert. Die Suspension selbst wurde gleichmäßig auf vier große 2xTY-Agarplatten (d=13 cm, je 0,5 ml) ausgestrichen.

### 3.3.3 Ernten der Bakterien

Die Bakterienplatten wurden für mehrere Stunden kaltgestellt und anschließend mit 2-5 ml 2xTY-AG-Medium (2 % Glukose) beschichtet. Mit einem Glasspatel wurden die Bakterienkolonien abgetragen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Platte wurde erneut mit 2 ml 2xTY-AG-Lösung beschichtet, um eventuell verbliebene Bakterienkolonien miterfassen zu können. Die Bakteriensuspension wurde dann bei 3400 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde abpipettiert. Für eine längere Aufbewahrung der Bakterien wurde eine 85%ige Glycerin Lösung als Frostschutzmittel beigefügt (finale Konzentration: 15 %). Die Bakterien-Glycerin-Lösung wurde dann aliquotiert und bei -70 °C tiefgefroren.

### 3.3.4 Amplifizieren der Phagen für weitere Selektionsrunden

Die infizierten Bakterien wurden in je 50 ml 2xTY-AG-Medium bei 37 °C unter Schütteln für 1,5-2,5 h kultiviert, bis die OD<sub>600</sub> der Suspension von 0,05 wieder auf 0,5 angestiegen war. 5 ml der Bakteriensuspension (etwa  $7,5 \times 10^8$  Bakterien) wurden im Verhältnis 20:1 mit M13KO7 Helferphagen ( $1,8-2 \times 10^{13}$  pfu/ml) vermischt. Die Infektion der Bakterien mit Helferphagen erfolgte durch 30-minütige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad. Danach wurden die Bakterien bei 4000 g und RT für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 25 ml vorgewärmtem 2xTY-AK-Medium resuspendiert. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation auf einem Schüttler bei 30 °C.

### 3.3.5 Aufreinigung der Phagen

Die Übernachtkultur wurde zunächst bei 3400 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die neuen Phagen durch Zugabe einer 1:5 20 % PEG, 2,5 mM NaCl-Lösung ausgefällt. Anschließend wurde der Überstand für 1 h auf Eis gestellt und die Phagen danach bei 4 °C und 4000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nachdem das Phagenpellet in 1 ml PBS suspendiert und erneut für 2 min bei 4 °C und 14 000 g zentrifugiert wurde, enthält der neue Überstand die gewünschten Phagen. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, mit 250 µl einer 20%igen PEG/2,5 mM NaCl-Lösung (1:5) versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Bei 4 °C und 14 000 g wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl PBS aufgenommen und wieder für 2 min bei 4 °C und 14 000 g zentrifugiert, um eventuell vorhandene Bakterienreste komplett zu entfernen. Das weiße Pellet enthält nun die Phagen. Um zu überprüfen, ob der Überstand noch Phagen enthält, wurde dieser mit 500 µl PBS und 250 µl 20%ige PEG/2,5 mM NaCl-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 4 °C und 14 000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde ein letztes Mal in 500 µl PBS resuspendiert, 2 min bei 4 °C und 14 000 g zentrifugiert und der Überstand mit den aufgereinigten Phagen in ein neues Eppendorf Gefäß übertragen. Bis zur weiteren Verwendung wurden

## Methoden

die Phagen bei 4 °C gelagert. Die Schritte 3.3.1 bis 3.3.6 wurden im Rahmen der Affinitätsselektion insgesamt dreimal durchgeführt, um möglichst spezifisch an MHC-I/CMV-Peptid bindende Phagen zu selektionieren.

### 3.3.6 Phagen-Titration

Zur Kontrolle der Phagenselektion wurden bei jeder Selektionsrunde jeweils der so genannte Input- und der so genannte Output-Titer berechnet. Der Input-Titer bezieht sich auf die Phagenlösung, die vor der Inkubation mit den hyBeads entnommen wurde, der Output auf die Probe nach der Selektion. Der Titer sollte nach erfolgreicher Selektion erfahrungsgemäß um etwa  $10^5$  Verdünnungsstufen niedriger liegen. Der erwartete Titer sollte beim Input  $10^{12-13}$  cfu/ml betragen. Für den Input wurden Verdünnungen von  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-11}$  cfu/ml mit 2xTY in einem Endvolumen von jeweils 1 ml angelegt, für den Output solche mit  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  cfu/ml. 500 µl der jeweiligen Verdünnungsstufen wurden mit 500 µl TG1 Bakterien ( $OD_{600}=0,5$ ) für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, um die Bakterien zu infizieren. Anschließend wurde jeweils 100 µl der Bakterienlösung auf 2xTY-AG Agar ausplattiert. Als Negativkontrolle wurde eine separate Platte mit nichtinfizierten *E. coli* Bakterien beimpft, die aufgrund ihrer fehlenden Antibiotikaresistenz kein Wachstum zeigen sollten. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C über Nacht. Die Kolonien wurden am nächsten Tag ausgezählt und der Phagentiter wurde mit folgender Formel berechnet:

#### Berechnung Phagentiter:

$$\text{Phagentiter} \left[ \frac{\text{cfu}}{\text{ml}} \right] = 2 \times \frac{\text{Kolonienzahl}}{\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ausplattierte Menge}}$$

### 3.3.7 Animpfen der Masterplatten und Produktion der Phagen

Von den Bakterien der Output-Platte wurde eine Masterplatte angelegt. Dafür wurden in einer 96-Well-Microtiter-Platte pro Well jeweils 100 µl 2xTY- AG Medium vorgelegt. Aus der Output-Platte wurde in 92 der Wells jeweils eine einzelne Kolonie überführt, sodass insgesamt 92 Wells mit 92 unterschiedlichen Kolonien und somit potentiell verschiedenen Phagenklonen ausgewählt wurden. Zur Erfassung des Hintergrundsignals blieben vier Wells ohne Kolonie (Kontrollen). Die Platte wurde über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde von der Masterplatte ausgehend eine neue 96-Well-TC-Mikrotiter-Platte zur Phagenproduktion angelegt, indem jeweils einzelne Klone der Masterplatte auf die zweite Platte überführt wurden. Pro Well wurden hier 125 µl 2xTY-AG Medium vorgelegt. Die Masterplatte wurde anschließend in 15 % Glycerol bei -70 °C tiefgefroren.

Zu der neu angeimpften Platte wurden  $2 \times 10^9$  Helferphagen aus einer Stocklösung (M13KO7,  $1,35 \times 10^{10}$  pfu/µl) pro Well hinzu pipettiert. Die Infektion der Bakterien mit Helferphagen wurde durch eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C erreicht. Die Platte wurde anschließend 10 min bei 600 g zentrifugiert

## Methoden

und das entstandene Pellet in 125 µl glukosefreiem 2xTY-AK-Medium resuspendiert, da Glukose als Inhibitor des Lac-Promotors fungiert. Durch die Infektion mit Helferphagen und die Abwesenheit von Glukose im vorgelegten Medium kommt es zur Bildung eines Fusionsproteins zwischen dem Fab und dem gIII-Phagenprotein. Die neu gebildeten Phagen werden dann von den Bakterien in das Inkubationsmedium sezerniert. Die gesamte Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert.

### 3.3.8 Phagen-ELISA-Testung

Zum vorläufigen Screening der Bindungsfähigkeit der Phagenpartikel wurde ein ELISA durchgeführt. Für die Testung wurden jeweils eine Nunc™ 96-Well-Platte mit dem MHC-I-CMV-Peptid-Komplex und eine weitere mit dem MHC-I-Kontroll-Peptid-Komplex beschichtet (Coating). Dafür wurden die Platten zuerst mit 100 µl biotinyliertem BSA (Verdünnung 1:2000 in PBS) pro Well für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Jedes Well wurden dann mit 100 µl PBS-verdünntem Streptavidin (5 µg/ml) bei RT für 3 h auf einem Schüttler inkubiert und danach dreimalig mit einer Tween 20-Mischung (0,05 % in PBS) gewaschen. Es wurden 11,42 µl MHC-I-Peptid-Komplexe (1,75 µg/µl) mit 20 ml Tween 20-Lösung (0,05 % in PBS) vermischt, sodass bei einem Pipettiervolumen von 100 µl pro Well die Endkonzentration bei 1 µg/ml lag. Über Nacht wurde die Platte bei 4 °C inkubiert, damit die biotinylierten Komplexe sich an das Streptavidin anlagern konnten. Am nächsten Tag wurden die Platten erneut zweimal mit Tween 20-Lösung (0,05 % in PBS) gewaschen, bevor diese mit 160 µl Tween 20-Mischung (2 % MM/PBS/0,1 % Tween 20) für 30 min bei RT auf einem Schüttler geblockt wurden, um ein unspezifisches Binden der Phagen an das Plastik der Mikrotiterplatte zu verhindern. Die Platten mit den Bakterienkulturen, in denen zuvor die Phagenproduktion stattgefunden hatte, wurden bei 600 g für 10 min zentrifugiert, sodass sich die Phagenpartikel im Überstand befanden. Jeweils 15 µl des Überstandes wurden mit 85 µl Tween 20-Mischung (2 % MM/PBS/0,1 % Tween 20) versetzt und in die zuvor beschichteten Wells der Nunc™-Platte übertragen. Als Kontrollen wurden mitgeführt: zwei Leerkontrollen ohne Phagen mit Medium als Negativkontrollen, eine Positivkontrolle, welche anstelle der selektionierten Phagen einen Streptavidin bindenden F2-Phagen enthielt und zwei weitere Positivkontrollen, die mit den murinen Antikörpern TÛ155 beziehungsweise W6/32 beladen wurden. Der monoklonale Antikörper TÛ155 bindet konformationsspezifisch an HLA-A-, HLA-B- und HLA-C Komplexe, sofern diese richtig gefaltet sind [5]. Bei dem MHC-I-Antikörper W6/32 handelt es sich um einen IgG-Antikörper, der unabhängig von der Faltung an die schwere Kette der HLA-Komplexe bindet und die Detektion von HLA-A, HLA-B und HLA-C ermöglicht [74]. Nach einstündiger Inkubation bei RT auf einem Schüttler und dreimaligem Waschen mit Tween 20-Lösung (0,05 % in PBS) wurden 100 µl Anti-αM13 POX-Lösung mit der Tween 20-Mischung (2 % MM/PBS/0,05 % Tween 20) im Verhältnis 1:5000 verdünnt und zu allen Wells, mit Ausnahme der Leerkontrollen, hinzugegeben. Bei Anti-αM13 POX handelt es sich um einen Peroxidase-gekoppelten Antiphagen-Antikörper, der während einer einstündigen Inkubation auf einem Schüttler die Phagen, die sich an die MHC-Peptid-Komplexe angelagert

hatten, bindet. Im Falle der beiden Positivkontrollen wurde anstelle des Anti- $\alpha$ M13 POX-Antikörper ein Kaninchen-Anti-Maus-POX-Antikörper verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit Tween 20-Lösung (0,05 % in PBS) und zweimaligen Waschen mit PBS wurde der ELISA-Test mit Hilfe eines TMB-Peroxidase-Substrat-basierten Kits entwickelt. Dafür wurden die TMB-Peroxidase-Lösung und die TMB-Peroxidase-Substratlösung im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und davon je 100  $\mu$ l in ein Well gegeben. Wells mit gebundenen Anti- $\alpha$ M13-Antikörpern färbten sich daraufhin blau. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ l Schwefelsäure pro Well gestoppt. Dies führte zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption wurde mittels eines Wallace Victor<sup>2</sup> Multilabel Counters bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### 3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient zur *in-vitro* Vervielfältigung von DNA. Sie verläuft in drei Schritten:

- 1.) Denaturierung: Durch das Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den doppelsträngigen DNA-Molekülen aufgebrochen und die doppelsträngige DNA wird in zwei Einzelstränge getrennt. Die Temperatur wird anschließend auf eine für den Primer optimale Hybridisierungstemperatur reduziert.
- 2.) Hybridisierung und Anlagerung: Die Primer lagern sich bei Erreichen des Temperaturoptimums durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen an die 5'-Enden der beiden komplementären DNA-Sequenzen an.
- 3.) Elongation: Der Reaktionsansatz wird erneut auf das Temperaturoptimum (70-75 °C) der verwendeten Taq-Polymerase erwärmt. Diese thermophile Polymerase synthetisiert von den 3'-Enden des zugegebenen Primers aus eine neue, identische Kopie des Stranges, indem sie die freien Stellen mit Nukleotiden auffüllt. Der Ausgangsstrang dient dabei als Matrize.

Für die Arbeit wurden folgende Einstellungen am PCR-Gerät gewählt:

- Denaturierung: 94 °C für 45 s
- Hybridisierung: 54 °C für 45 s
- Elongation 72 °C für 1,5 min
- Insgesamt 35 Zyklen
- Dauer: 2 h 25 min

Wenn eine Bakteriensuspensionen anstelle von freier DNA als Ausgangsmaterial diente, wurde die Dauer des Denaturierungsschritt im ersten Zyklus von 45 s auf 4 min verlängert.

### 3.4.1 PCR zur Kontrolle der Phagemid Klone

Um zu überprüfen, ob das Phagemid in den einzelnen Klonen der Masterplatte vorlag, wurde eine PCR mit anschließender Elektrophorese durchgeführt. Es wurden folgende Substanzen zu jeweils 1 µl Bakteriensuspension pipettiert:

- 2,0 µl dNTP [2 mM]
- 2,1 µl 10xPuffer
- M13-reverse Primer [100 µM]
- 0,05 µl fd-tet Primer
- 0,1 µl Dreamtaq-Polymerase
- 15,7 µl *A. dest.*

Die Elektrophorese erfolgte im Anschluss an die PCR in 1%igem Agarosegel bei einer angelegten Spannung von 120 V. Das Beladungsvolumen betrug insgesamt 21 µl pro Tasche.

### 3.4.2 Fingerprint PCR der positiven Klone

Zur Übersicht über die Diversität und zur Charakterisierung der neuen Phagemidklone wurde eine Fingerprint-PCR angesetzt. Die DNA der einzelnen Klone wurde dabei mittels PCR amplifiziert und anschließend mit Restriktionsenzymen verdaut. Die verdauten DNA-Fragmente wurden durch eine Elektrophorese aufgetrennt, um die unterschiedlichen Klone anhand der Muster ihrer DNA-Fragmente charakterisieren zu können. In separaten Reaktionsgefäßen wurde pro Klon ein Reaktionsgemisch angesetzt (Gesamtvolumen 20 µl):

- 2 µl d-NTP Mix
- 2,1 µl 10x Taq-Reaktionspuffer Puffer mit Magnesium
- 0,05 µl M13-reverse Primer
- 0,05 µl fd-tet-forward Primer
- 0,1 µl Dream Taq-Polymerase (5 U/µl)
- 15,7 µl *A. dest.*
- 1 µl Bakteriensuspension

### 3.4.3 Verdau und Fingerprint

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe des Restriktionsenzym BstNI (Schnittstelle: CC/WGG) verdaut. Zu je 18 µl DNA-Probe wurden gegeben:

- 2,5 µl NEB 2 Puffer
- 0,25 µl 100x BSA

## Methoden

- 0,25 µl BstNI (10 U/µl)
- 4 µl *A. dest.*

Der Mix wurde für 2-3 h bei 60 °C inkubiert. Zu den danach resultierenden Verdauprodukten wurden je 2 µl Ladepuffer gegeben. Die Proben wurden bei einer Spannung von 80-120 V in 3%igem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Die Bandenmuster wurden verglichen, um unterschiedliche Klone zu identifizieren. Zur Amplifizierung wurden die Bakteriensuspensionen, die jeweils unterschiedliche Klone enthielten, auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.5 Produktion löslicher Antikörperfragmente

Von den mit den Phagen infizierten TG1 Bakterienkulturen wurden ausgehend von einer einzelnen, selektierten Kolonie Übernachtskulturen in je 3 ml 2xTY-AG Medium (2 % Glukose) angelegt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kulturen wurden dann 1:100 mit 2xTY-AG (0,1 % Glukose) verdünnt und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,8 und 1 erreicht wurde. Durch die Zugabe von IPTG (1 mM) wurden die Bakterien dazu angeregt, Fab-Antikörper zu produzieren und diese in das Periplasma zu transportieren. Da IPTG nicht vom Metabolismus der Bakterien verstoffwechselt wird, bleibt die Konzentration im Gemisch konstant [28]. Nach einer mehrstündigen Inkubation bei 30 °C wurden die Bakteriensuspensionen 15 min lang bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden dann über Nacht (12-15 h) bei -20 °C tiefgefroren, was zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität der enthaltenen Bakterien führte, die die Gewinnung der Fab-Antikörper erleichterte. Die Bakterienpellets wurden danach langsam aufgetaut und in je 2,5 ml TS-Puffer resuspendiert. Alle Schritte der Bakterienvorbereitung wurden auf Eis durchgeführt, um die Proteine vor Schädigung durch enthaltene Proteasen zu schützen. Die Bakteriensuspensionen wurden dann in 15 ml Röhren pipettiert und erneut 5 bis 10 min auf Eis gekühlt. Die ursprünglichen Gefäße wurde mit verdünnter TS-Lösung (1:3 mit *A. dest.*) gespült und die Suspensionen wurden zurück in eben diese Röhren übertragen. Zudem wurde ein Protease-Inhibitor (1:25) hinzugefügt und die Bakterien wurden lysiert. Darauf folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 17 000 g, um die Zellbestandteile der toten Bakterien zu entfernen. Der Überstand, der die löslichen Proteine aus dem Periplasma der Bakterien enthielt, wurde gewonnen und erneut zentrifugiert.

#### 3.5.1 Aufreinigung der Fab-Antikörper

Die Aufreinigung der Fab-Antikörper erfolgt mit Hilfe von TALON-Resin-Beads. Das TALON-Resin ist hierbei mit Kobalt-Ionen beschichtet und räumlich so orientiert, dass nur Proteine mit speziell konfiguriertem Histidin-Tag (His<sub>6</sub>-Tag) binden können. Dabei bindet das positiv geladene Kobalt-Ion an die beiden benachbarten Histidin-Reste. Der Überstand mit den Fab-Antikörpern wurde zu den TALON-

## Methoden

Resin-Beads gegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei 4 °C auf einem Rolltisch gemischt, wobei die Fab über ihren His6-Tag an die Beads binden konnten. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 360 g wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden die Beads mit 13 ml PBS (pH 8.0) bei 4 °C erneut auf dem Rolltisch für 10 min gewaschen und abermals abzentrifugiert. Die TALON-Beads wurden in 2 ml PBS (pH 8.0) resuspendiert und auf eine Elutionssäule (Bio Rad Schwerkraftsäulen) gegeben. Die Beads wurden zweimal mit Imidazol-Lösung (5 mM in PBS) gewaschen, wonach die Fab-Antikörper nach 1-minütiger Inkubation mit 350 µl Imidazol (100 mM in PBS) eluiert wurden. Imidazol verdrängt kompetitiv Histidin durch seine höhere Affinität zu Kobalt. Die Eluate wurden in kleinen Reaktionsgefäßen mit gespannter Dialysemembran im Deckel aufgefangen und in 1,5 l PBS über Nacht (12-15 h) unter leichtem Rühren bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Am nächsten Morgen wurde der Puffer gewechselt und das Eluat wurde nochmals für 2-3 h dialysiert. Nachdem auf diese Weise das verbleibende Imidazol entfernt worden war, erfolgte eine erste photometrische Konzentrationsmessung der Fab-Antikörper bei 280 nm Wellenlänge gegen den Dialysepuffer (Hintergrundsignal).

### 3.5.2 SDS-PAGE der Fab-Antikörper

Zum Nachweis der neu produzierten Fab-Antikörper wurde eine SDS-PAGE, mit anschließender Coomassie-Blau Färbung durchgeführt.

Um die Proteine alleinig nach ihrer jeweiligen Größe auftrennen zu können, bedarf es einer Linearisierung des Polypeptids inklusive einer Aufhebung seiner Tertiärstruktur. Die Proteinprobe wurde hierfür bei 100 °C für 5-10 min im Wasserbad erhitzt und mit reduzierenden Reagenzien (5x SDS-Laufpuffer) behandelt. SDS lagert sich daraufhin proportional zum molekularen Gewicht an das Polypeptid an.

Zur Vorbereitung wurde ein Zwei-Phasen-Gel (12 %), bestehend aus einer Sammel- und einer Trennphase, nach Standardprotokollen gegossen. Das obere Sammelgel wurde dann mit den denaturierten Proteinen und einem standardisierten Größenmarker (Page ruler) beladen. Als Elektroden-Puffer diente Lämmli-Puffer. Nach Anlegen einer Gleichspannung von 175 V erfolgt die Trennung der Proteine im Trenngel.

### 3.5.3 ELISA zum Screening der Bindungsfähigkeit der Fab-Antikörper

Die Durchführung und Auswertung des ELISA erfolgte wie in Abschnitt 3.3.8 beschrieben. Die Detektion der Fab-Antikörper erfolgte mit dem murinen Sekundärantikörper Anti-c-myc9E10 und Anti-Maus-POX als Tertiärantikörper.

### 3.5.4 Aufreinigung des Phagemidvektors

Um eine enzymatische Biotinylierungsregion in den pCES1-Phagemidvektor einfügen zu können, mussten die Phagemide der ausgewählten Klone aufgereinigt und ihre pCES1-Vektoren mit der Fab-Antikörper-kodierenden DNA-Sequenz linearisiert werden. Zur Aufreinigung der Phagemide aus den Bakterien wurde ein NucleoSpin® Plasmid purification-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die *E. coli*-

## Methoden

Bakterien wurden dabei zunächst durch alkalisches SDS lysiert und die Phagemid-DNA wurde an eine Silicamembran gebunden. Nach mehreren Waschschritten wurden die Plasmide schließlich mit alkalischem TRIS-HCl-Puffer eluiert.

### 3.5.5 Phagemidverdau und Aufreinigung

Über einen Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI HF (Schnittsequenz: G/AATTC) und NotI HF (Schnittsequenz: GC/GGCCGC) wurden so genannte ‚sticky ends‘ erzeugt, die durch ihren Überhang an ungepaarten Basen eine schnelle Ligation mit anderen komplementären Basensequenzen ermöglichen. Bei diesem Vorgang wurden das S-myc-, das Histidin-Motiv und ein Teil der Protein-III-kodierende Sequenz herausgeschnitten. Dazu wurde pro Probe folgender Reaktionsansatz gewählt und für 1 h bei 37 °C inkubiert:

- 0,5 µl EcoRI HF
- 0,5 µl NotI HF
- 2,5 µl CutSmart Puffer
- 6,5 µl *A. dest.*
- 15 µl Phagemidlösung

Im Anschluss wurde eine Elektrophorese in 1,2%igem Agarosegel bei 100-120 V durchgeführt. Unter UV-Belichtung zeigten sich zwei Banden: der schneller laufende, etwa 4,5 kbp große Vektor und die langsamer laufende DNA-Sequenz (etwa 1,2 kbp). Die Fraktion, welche den pCES-Vektor und die Information für die Fab-Antikörper enthielt, wurde herausgeschnitten und mit Hilfe eines Zymoclean™ Gel DNA-Recovery Kits nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Nach der Aufbereitung wurden Konzentration und Qualität der DNA mittels Nanodrop™ photometrisch bestimmt.

## **3.6 Phagemid-Ligation und BirA-Sequenz**

In den linearisierten Phagemidvektor wurde eine so genannte BirA-Sequenz eingefügt, die für eine Biotin Ligase kodiert. Zur späteren Biotinylierung der Vektorprodukte wurde Avi-Tag, ein 15 Aminosäuren langes Biotin-Akzeptorpeptid, genutzt (Sequenz der Akzeptorregion: GLNDIFEAQKIEWHE), an das Biotin durch die AVB101 Biotin-Ligase gebunden werden kann. Werden Fab mit dieser Sequenz in Bakterien mit Biotin Ligase exprimiert, entsteht eine Biotin-Bindungsstelle. Durch Bindung des Biotins an Streptavidin wird dann die Bildung von Fab-Tetrameren ermöglicht. Fab-Tetramere besitzen eine deutliche erhöhte Bindungsintensität gegenüber dem Rezeptorkomplex, als einzelne Fab [19]. Für die Ligation wurde, abhängig von der Vektorkonzentration der ausgewählten Klone, folgender Ansatz gewählt:

- 1 µl linearer pCES-Vektor

## Methoden

- 0,5 µl Insert in Form der BirA-Sequenz (1,5 ng/µl)
- 0,5 µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer
- 0,25 µl T4 DNA-Ligase (Soll 1 U/µl)
- 2,75 µl *A. dest.*
- Gesamtvolumen: 5 µl

Der Ligationsansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert.

### 3.6.1 Transformation der Phagemide in TG1 Bakterien

Die Phagemide wurden anschließend in kompetente Bakterien des *E. coli*-Stammes TG1 transformiert. Dazu wurden 70 µl der TG1 Bakteriensuspension zusammen mit dem obigen Ligationsansatz (siehe 3.6) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 45 s bei 42 °C im Wasserbad erwärmt. Durch den Hitzeschock wurde die Permeabilität der bakteriellen Zellwand deutlich erhöht, sodass die Plasmide ins Zytoplasma gelangen können. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden je Probenansatz 240 µl SOC-Medium hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln wurden die Bakterien auf 2xTY-AG-Platten ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### 3.6.2 Kontrolle der Ligation

Zur Kontrolle der Ligation wurde eine PCR der nach Ausplattierung gewachsenen Kolonien durchgeführt. Es wurde folgender Mastermix verwendet:

- 1 µl dNTP (2 mM)
- 1,1 µl 10xPuffer
- 0,025 µl 5'CH1-reverse Primer (100 µM)
- 0,025 µl Primer 3'BirA EcoRI (100 mM)
- 0,05 µl Dreamtaq
- 7,8 µl *A. dest*
- 1 µl Bakteriensuspension
- Gesamtvolumen: 11 µl

Die Größen der einzelnen Klon-PCR-Produkte wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Agarosegel) bestimmt.

### 3.6.3 Transformation und in Vivo Biotinylierung der Fab-Antikörper

Die TG1 Bakterienkolonien aus Abschnitt 3.6.1 wurden nach Herstellerangaben mit einem Nucleo-Spin® Plasmid DNA, RNA and Protein purification-Kit aufgearbeitet. Die aufgereinigten Phagemidvektoren wurden dann zur Transformation von E-coli-AVB101 verwendet. Bakterien des ABV101

## Methoden

Stammes verfügen über das durch IPTG induzierbare Plasmid pBirAcm mit dem darin enthaltenen BirA-Gen.

Die AVB101-Bakterien wurden mit der DNA der einzelnen Klone transformiert, indem diese mit jeweils 1 µl des aufgereinigten Plasmidgemisches zunächst auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock ausgesetzt wurden (siehe Abschnitt 3.2.1). Die Bakterien wurden nach der Transformation auf 2xTY-AG-Chloramphenicol-Platten kultiviert. Das pBirAcm-Plasmid enthält ein Chloramphenicol-Resistenzgen. Die Fab-Produktion wurde analog zu dem in Abschnitt 3.5 beschriebenen Vorgehen in einem größeren Umfang durchgeführt. Zusätzlich wurde dabei dem IPTG Biotin (1:100) beigemischt. Die Aufreinigung der Fab-Antikörper erfolgte auch hier über TALON-Beads (800 µl pro 1000 ml Kultur). Aufgrund des höheren Volumens der eluierten Fab-Lösung wurden Biomax 30 kDa Ultrafiltration Membranen verwendet. Nach erfolgter Konzentrationsmessung am Photometer wurde zur Kontrolle eine SDS-PAGE-Elektrophorese durchgeführt.

### 3.7 Sequenzierung der Fab

Die DNA-Sequenzierung der unterschiedlichen Fab-Klone wurde kommerziell durch folgendes Institut durchgeführt: Seq-IT GmbH & Co.KG, Pfaffplatz 10, 67655 Kaiserslautern.

### 3.8 Peptid-Beladung der LCL

Bevor eine durchflusszytometrische Färbung an den LCL-Zellen durchgeführt werden konnte, mussten die Zielzellen mit dem Peptid, an welches später die Fab-Antikörper binden sollten, beladen werden. Es wurden zur Beladung zwei unterschiedliche Peptide (finale Konzentration: 5 µg/ml, gelöst in DMSO) eingesetzt: das bereits beschriebene CMV-Peptid, sowie ein Kontrollpeptid (MageA12), um unspezifisch bindende Fab zu identifizieren. Pro Ansatz wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen gefärbt. Für die LCL-Zellen wurden zuerst sechs Röhrchen pro zu färbende Linie vorbereitet:

- 1. Röhrchen: Kein Peptid, nur DMSO, bei der Färbung werden keine AK hinzugegeben
- 2. Röhrchen: Beladung mit CMV-Peptid, bei der Färbung werden keine AK hinzugegeben
- 3. Röhrchen: Beladung mit MageA12, bei der Färbung werden keine AK hinzugegeben
- 4. Röhrchen: Kein Peptid, nur DMSO, bei der Färbung werden AK hinzugegeben
- 5. Röhrchen: Beladung mit CMV-Peptid, bei der Färbung werden AK hinzugegeben
- 6. Röhrchen: Beladung mit MageA12, bei der Färbung werden AK hinzugegeben

## Methoden

Die Zellen wurden bei 200 g für 5 min abzentrifugiert und in 5 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium ohne Zusatz von fötalem Kälberserum (FCS) resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden je 0,5 ml in ein neues Probenröhrchen übertragen und mit 0,5 ml RPMI-Peptid-Lösung (10 µg/ml Peptid) gemischt. Anschließend wurde der Probenansatz für 1 h bei 37 °C unter gelegentlicher, leichter Durchmischung inkubiert.

### **3.9 Durchflusszytometrie [87]**

Bei der Durchflusszytometrie mit Hilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper macht man sich zu Nutze, dass verschiedene Zelltypen unterschiedliche Oberflächenantigene exprimieren. So können beispielsweise ‚cluster of differentiation‘ (CD)-Antigene mittels spezifischer, fluoreszenzgekoppelter Antikörper gebunden werden und die gewonnene Information zur Identifizierung des Zelltyps herangezogen werden. Der in den CD-gebundenen Antikörpern enthaltene Fluoreszenzfarbstoff wird während der Durchflusszytometrie mittels Laser angeregt und emittiert ein Lichtsignal, welches von einem Fluoreszenzdetektor erfasst wird. Der Detektor wandelt die Signale in elektrische Impulse um, aus denen mit Hilfe einer Computersoftware Informationen zu Zellzahl und Fluoreszenz gewonnen werden können.

Wir nutzten verschiedene, typisierte Zellreihen, die das HLA-C\*07:02-Antigen exprimieren und beluden diese mit CMV-Peptid. Nach Inkubation mit den Fab-Antikörpern wurde ein Sekundärantikörper hinzugegeben, dessen Fluoreszenzsignal im Durchflusszytometer gemessen wurde.

Im Detail wurden die Probenröhrchen nach der Beladung (siehe Abschnitt 3.8.1) mit 1 ml FACS-Flow gewaschen und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, sodass ein Restvolumen von 50 µl verblieb. Anschließend wurden die einer lymphoblastoiden Zellen (LCL-Zellen) mit Fab-Antikörpern (finale Konzentration: 20 µg/ml) für 15 min bei RT inkubiert. Bei der LCL-Linie handelt es sich um EBV-transformierte B-Zellen. Die negativen Kontrollen enthielten anstelle der Antikörper nur PBS als Zusatz. Im Anschluss erfolgte ein Waschgang mit je 2 ml FACS-Flow, sowie eine erneute 5-minütige Zentrifugation bei 400 g. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde Streptavidin Phycoerythrin (PE, 1:300 in PBS) dazugeben und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Das fluoreszenzmarkierte Streptavidin lagerte sich währenddessen an die biotinylierten Abschnitte des Fab-Antikörpers an. Nach einem letzten Waschschriff mit 2 ml FACS-Flow Lösung und Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200 µl FACS-Flow Lösung resuspendiert und gemessen. Das nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes emittierte Licht wurde im Durchflusszytometer gemessen und ausgewertet.

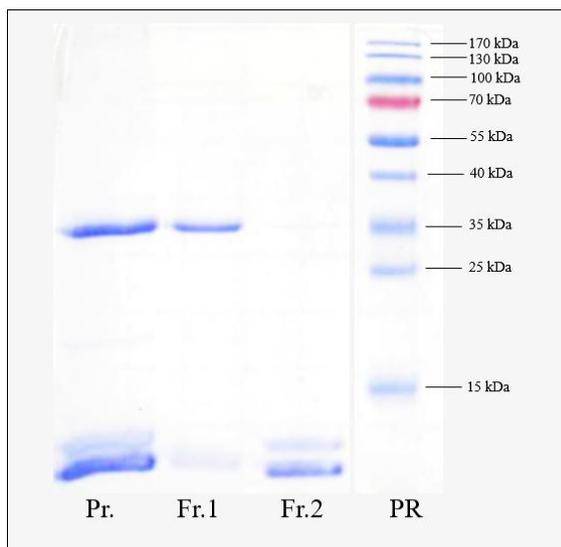
### **3.10 Zellkulturen**

Die Arbeiten an den Zellkulturen wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Inkubation der Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte. Die LCL-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit Zusätzen (10 % FCS, 2 mM L-Glutamin) kultiviert. Das Ablösen der adhären Zellen erfolgte ebenfalls unter einer sterilen Werkbank. Hierzu wurden 0,5 ml Trypsin-EDTA zugegeben und bei 37 °C bis zu einem Ablösen der Zellen etwa 2 Minuten inkubiert. Zur Neutralisierung der Trypsinwirkung wurden anschließend 0,5 ml FCS zugegeben. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer nach Herstelleranleitung.

## 4.0 Ergebnisse

### 4.1 Synthese der MHC-Klasse-I-Komplexe

Ziel der Arbeit war es, HLA-C\*07:02-restringierte, CMV-spezifische Antikörper mit Hilfe der Phagen-Display-Methode zu finden und zu charakterisieren. Zunächst mussten dafür MHC-Klasse-I-Moleküle aus ihren  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Ketten zusammengesetzt und mit dem CMV-Peptid beladen werden. Das Ergebnis wurde mittels Größenausschluss-Chromatographie überprüft. In dieser zeigten sich zwei Fraktionen von MHC-Komplexen. Die erste Bande lag bei einer Molekülmasse von circa 35 kDa, was der schweren  $\alpha$ -Kette entspricht. Die zweite Bande lag bei etwa 12 kDa, was auf das leichtere  $\beta_2$ -Mikroglobulin hinweist. Aufgrund der schwachen Verbindung der einzelnen Komponenten ließ sich der vollständige, peptidbeladene Komplex aus  $\alpha$ -Kette,  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Kette und Peptid nicht im Gel nachweisen.



**Abbildung 8:** Elektrophorese der MHC-I-Komplexe nach Größenausschluss-Chromatographie (Fr.1: Fraktion 1; Fr.2: Fraktion 2; PR: Probe vor der Aufreinigung; PR: Page ruler)

### 4.2 Affinitätsselektion der Phagenklone mit Hilfe der MHC-Klasse-I-Peptidkomplexen

Es wurden insgesamt drei Selektionsrunden mit dem MHC-Peptid-Komplex durchgeführt. Im Laufe der Selektionsrunden wurde die Konzentration der in der Probe enthaltenen Komplexe immer weiter reduziert, um möglichst spezifisch bindende Phagen zu finden. Während der Selektion des Inputs kam es zu

## Ergebnisse

einer Reduktion des Phagentiters nach jeder Selektionsrunde (Output). Die nach der Selektionsrunde verbliebenen Phagen wurden jeweils amplifiziert und für eine neue Selektionsrunde aufgearbeitet.

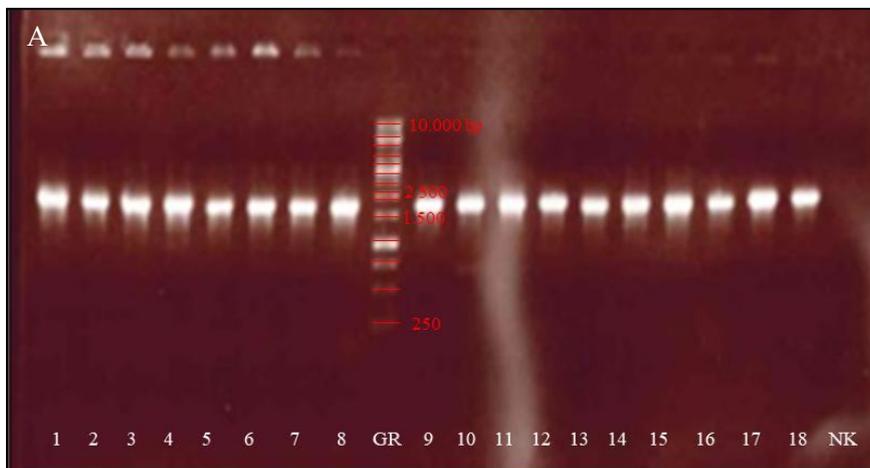
Die Koloniezahl bezieht sich auf die gewachsenen Bakterienkulturen nach der Ausplattierung. Innerhalb der ersten beiden Selektionsrunde wurde jeweils eine Reduzierung der enthaltenen Phagen um den Faktor ca.  $10^8$  erreicht.

Tabelle 6: Input und Output der einzelnen Selektionsrunden

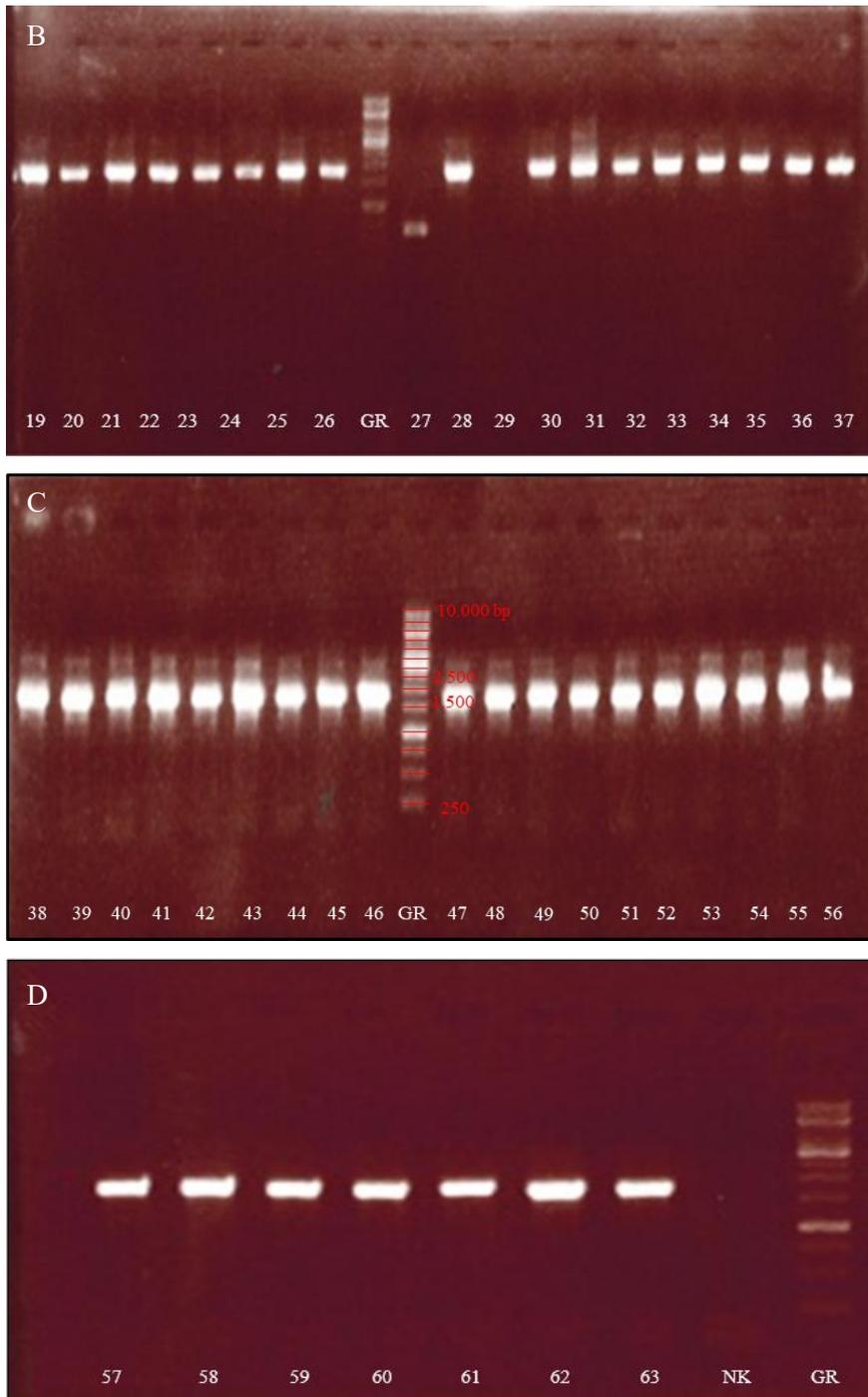
Selektionsrunde	1	2	3
Input [cfu/ml]	$5,68 \times 10^{12}$	$3,88 \times 10^{14}$	Kein Input gemessen
Output [cfu/ml]	$1,2 \times 10^5$	$8 \times 10^6$	$4,8 \cdot 10^7$
Output/Input	$2,1 \times 10^{-8}$	$2,06 \times 10^{-8}$	-

Nach der Aufreinigung des Outputs aus der dritten Selektionsrunde wurde von 92 zufällig ausgewählte Klonen eine Masterplatte angelegt. Durch einen gegen den MHC-I-CMV-Peptid-Komplex gerichteten ELISA-Test erfolgte ein erstes Screening zur Bindungsspezifität. Als Positivkontrolle wurde ein MHC-I-MageA12-Komplex verwendet. Es konnten 63 bindende Phagenklone identifiziert werden.

Für diese Klone wurde zunächst eine PCR mit anschließender Elektrophorese durchgeführt um zu testen, ob tatsächlich das gewünschte Produkt vorlag. Von den 63 bindenden Klonen wiesen 61 in etwa die erwartete Größe von 2000 bp auf.



## Ergebnisse



**Abbildung 9:** PCR und Elektrophorese der selektierten Klone

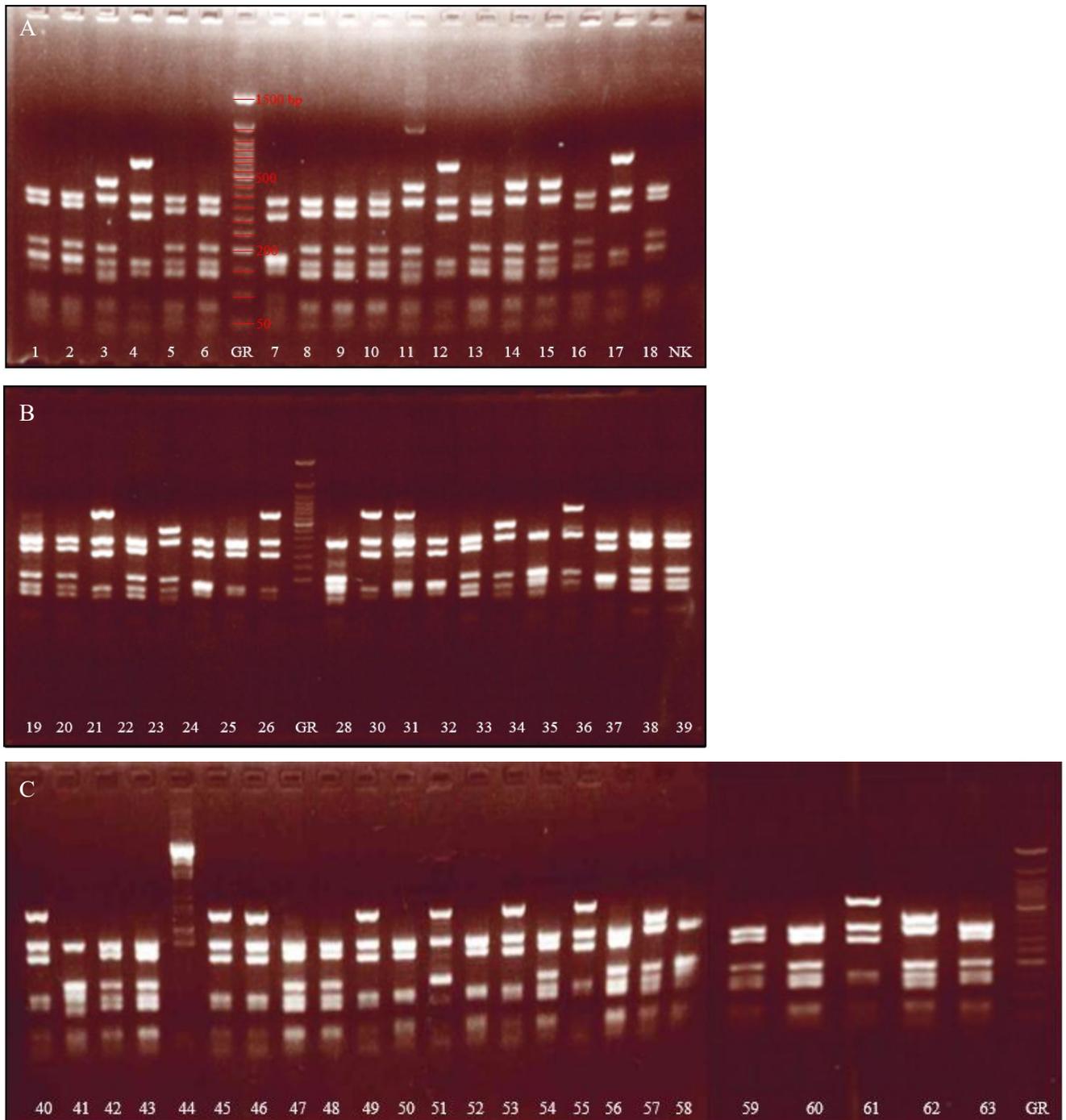
(GR: Gene ruler (1 kbp DNA-Längenmarker); NK: Negativkontrolle; (A): Klone 1-18; (B): Klone 19-37, Binder 27 und 29 nicht verwertbar; (C): Klone 38-56; (D): Klone 57-63)

### 4.2.1 Fingerprint-PCR zur Überprüfung der Phagenklone

Von diesen 61 Proben wurde zur Charakterisierung nach der Amplifikation jeweils eine weitere PCR angelegt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym BstNI verdaut und es wurde eine Elektrophorese der Fragmente durchgeführt. Das Enzym schneidet die DNA an der

## Ergebnisse

Sequenz CC/(AT)GG und ermöglicht, nach der Visualisierung mit Ethidiumbromid, einen Größen-Vergleich der DNA-Fragmente.



**Abbildung 10:** Fingerprint-PCR und Elektrophorese

*Bandenmuster nach Verdau der Proben mit BstNI (GR: gene ruler (Invitrogen 50 bp DNA-Leiter); NK: Negativ-Kontrolle; (A) Klone 1-18; (B) Klone 19-39, die Proben der Nummern 27 und 29 waren nicht auswertbar; (C) Klone 40-63).*

## Ergebnisse

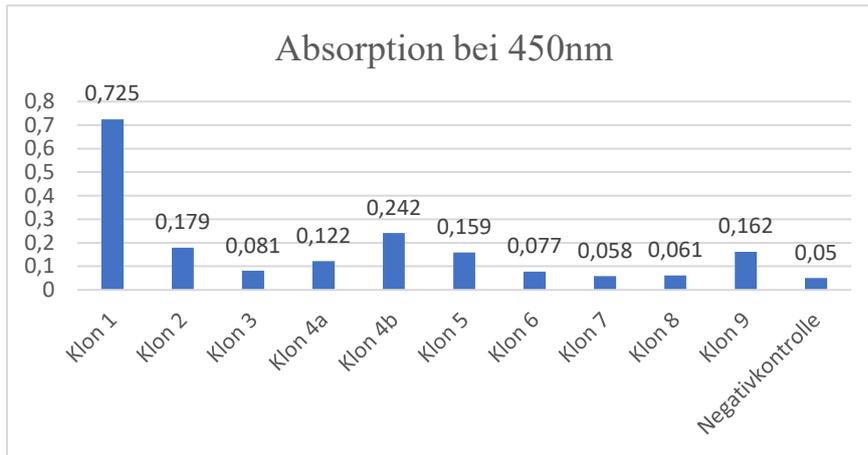
Es konnten insgesamt neun unterschiedliche Klone identifiziert werden. Um die anhand des resultierenden Bandenmusters vermutete Monoklonalität sicherzustellen, wurden Bakterienkolonien von jeweils drei Klonen mit gleichem Bandenmuster von der Masterplatte ausgewählt und via PCR abgeglichen. Nach dem Verdau der PCR-Produkte schloss sich eine Elektrophorese an. Es stellte sich heraus, dass es sich bei Klon 4 um zwei verschiedene Klone handelte, die fortan mit 4a und 4b bezeichnet wurden.

### 4.2.2 Testung der Bindungseigenschaften verschiedener Phagenklone

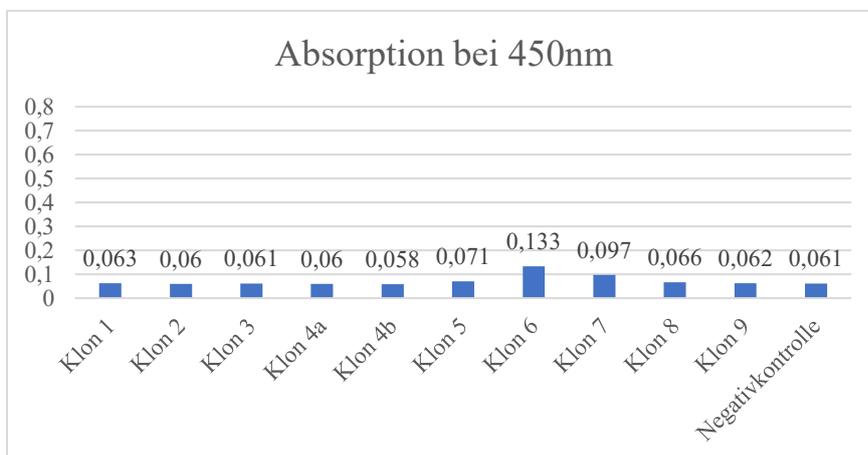
Mit den resultierenden Phagen-Produkten wurde ein ELISA unter Verwendung von mit MHC-I-CMV-Komplex beschichteten Platten durchgeführt. Zudem wurde zur Testung der Spezifität parallel jeweils ein ELISA mit einer MHC-I-Kontrollpeptid-beschichteten Platte angesetzt. Für die Positivkontrollen wurden TÛ155-Antikörper verwendet. Als Sekundäntikörper diente ein Anti-Maus-POX Antikörper, dessen Bindung durch Messung der Absorption bei 450 nm quantifiziert werden konnte. Keiner der Phagen zeigte relevante Bindungseigenschaften gegenüber dem Kontrollpeptid. Im nächsten Schritt wurden von zehn der Phagen-Proben mit positivem Bindungsverhalten gegenüber dem MHC-I-Komplex Fab-Fragmente hergestellt.

Die Bindungsfähigkeit der Fab wurde gegen MHC-I-CMV-Peptid-Komplexe und MHC-I-MageA12-Komplexe getestet. Um ein unspezifisches Binden beispielsweise an Streptavidin auszuschließen, erfolgte eine Kontrolle ohne Zugabe von MHC-I-Komplex. Als Sekundäntikörper wurde ein Anti-Maus-POX-Maus Antikörper verwendet. Die Absorption wurde wieder bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Es wurden fünf Klone (Klone 1, 2, 4a, 4b und 9) ausgewählt, deren Bindungsfähigkeit gegenüber peptidbeladenen Zellen getestet wurden. Je höher die Absorption der Probe, desto höher war die Menge an gebundenem Sekundäntikörper und demnach die Bindungsaffinität des entsprechenden Fab-Klons.

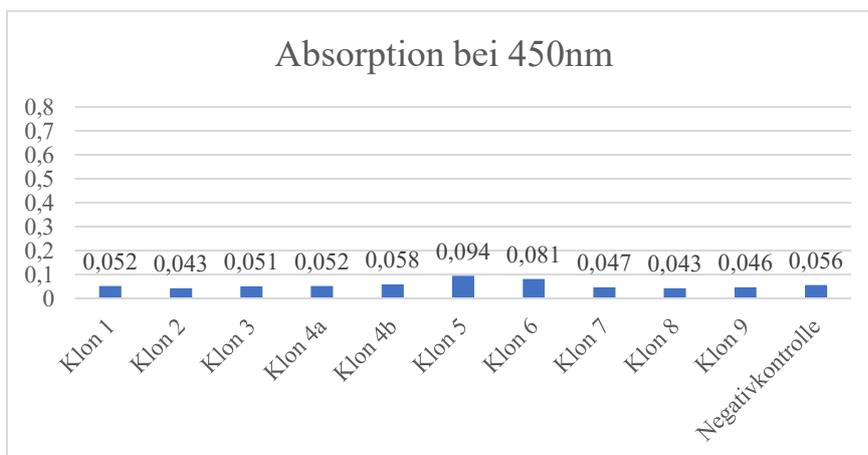
## Ergebnisse



**Abbildung 11:** ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Fab-Antikörper gegenüber CMV-Peptid-präsentierenden HLA-C\*07:02-Komplexen



**Abbildung 12:** ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Fab-Antikörper gegenüber MageA12-Kontrollpeptid-präsentierenden HLA-C\*07:02-Komplexen



**Abbildung 13:** ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Fab-Antikörper ohne Zugabe von HLA-C\*07:02-Komplexen

#### 4.2.3 Aufreinigung und erneute Überprüfung der Phagemidklone

Um den Phagemidvektor pCES1, welcher die Fab-kodierende Region enthält, zu linearisieren, wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI durchgeführt. In einem 1,2%igen Agarosegel wurden die Bestandteile per Elektrophorese getrennt. Bei der tiefer laufenden Bande handelt es sich um die Protein III-kodierende Sequenz. Die höher laufende Bande, die den jeweiligen Phagemid enthält, wurde vorsichtig aus dem Gel extrahiert und die enthaltene DNA aufgereinigt.

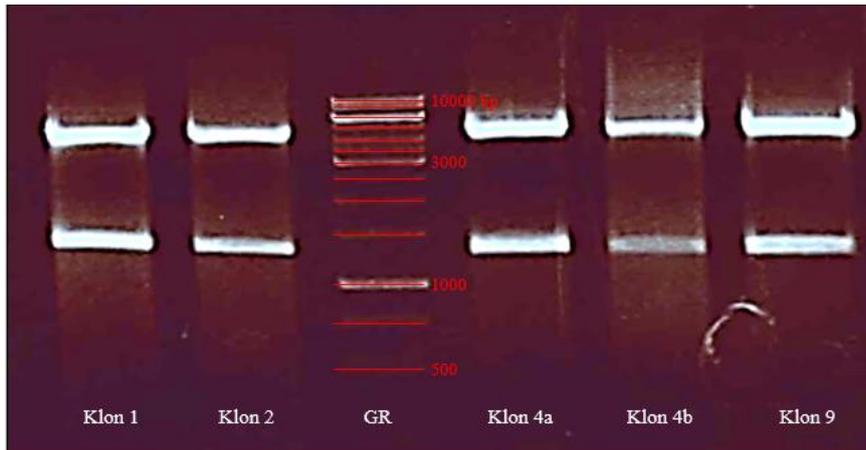
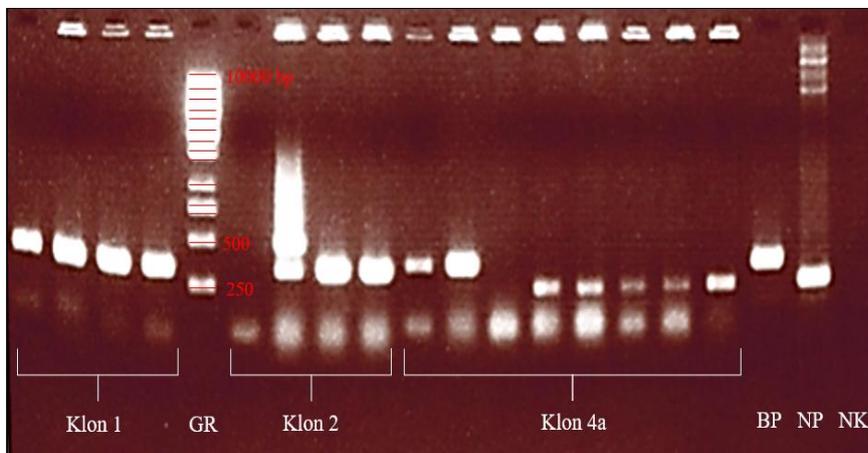
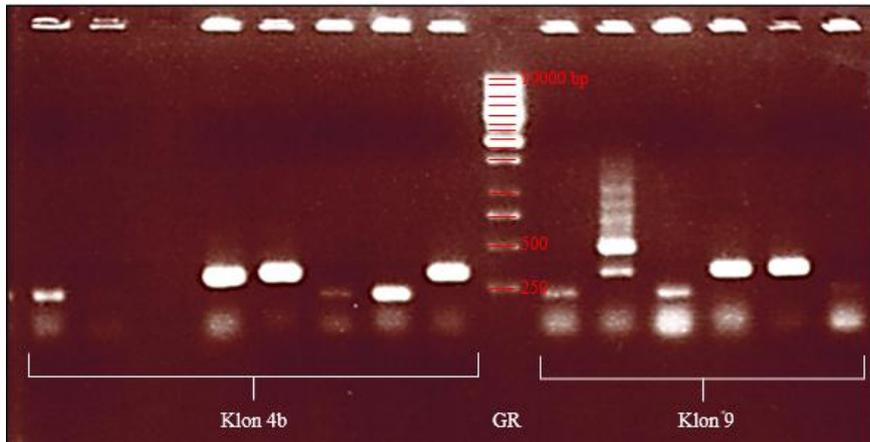


Abbildung 14: DNA-Fragmente der Phagemid-Vektoren der Klone 1, 2, 4a, 4b und 9 Aufnahme unter UV-Belichtung (Akquisitionszeit: 0,2 s) (GR: gene ruler, 1 kbp DNA-Längenmarker).

#### 4.3 Einführung einer BirA-Sequenz zur in vivo Biotinylierung der Fab

In den circa 4,5 kbp großen, linearisierten Vektor wurde eine 150 kbp große BirA-Sequenz zur in vivo Biotinylierung der Fab eingesetzt. Mit diesem Vektor transformierte TG1 Bakterien wurden angezüchtet. Durch eine PCR-Analyse mehrerer, ausgewählter Kolonien pro Klon wurde anschließend der Transformationserfolg überprüft.





**Abbildung 15:** PCR und Elektrophorese der Klone 1, 2, 4a, 4b und 9 zur Überprüfung der erfolgreichen Einsetzung der BirA-Sequenz

(GR: gene ruler; (1 kbp DNA-Längenmarker); NK: Negativkontrolle; BP: biotinyliertes Produkt als Positivkontrolle; NP: nicht biotinyliertes Produkt (Phagemidprobe ohne abschließende Ligation))

Die Produkte sollten nach erfolgreicher Ligation eine Größe von circa 350 bp aufweisen. Banden unterhalb der 350 bp-Grenze deuten auf eine nicht erfolgreiche Insertion hin. Nach der Ligation wurden von jedem der fünf Klone jeweils zwei Aufreinigungen von je zwei verschiedenen Bakterienkolonien durchgeführt. Im Anschluss wurde die Größe der Isolate erneut per Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Die Phagemid-DNA wurde mit den beiden Restriktionsenzymen EcoR I HF und Not I HF an den Rändern der Insertionsstelle in zwei Fragmente geschnitten und die Größen abgeglichen.

Zur in vivo Biotinylierung wurden AVB101 *E. coli* Bakterien mit den aufgereinigten Plasmiden transformiert. Bei der Expression der Fab-Fragmente durch die Bakterien unter Zugabe von IPTG bindet deren Biotin-Ligase kovalent Biotin-Peptide an die Fab. Die somit biotinylierten Antikörper konnten in der weiteren Vorbereitung mittels fluoreszenzmarkiertem Streptavidin markiert und durchflusszytometrisch analysiert werden. Nur für die vier der Klone 1, 2, 4a und 9 ergab sich eine hierfür ausreichende Konzentration.

#### 4.4 DNA-Sequenzierung ausgewählter Phagemidklone

Die DNA-Sequenzierung der mittels Durchflusszytometrie analysierten Klone wurde kommerziell durch Seq-IT GmbH & Co.KG durchgeführt. Diese zeigte eine 100%ige Übereinstimmung der Sequenzen der Klone 2 und 9, sodass die Durchflusszytometrie nur noch mit den Klonen 1, 2 und 4a fortgeführt wurde. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit IMGT/V-QUEST. Es zeigte sich, dass die Klone 1 und 2 jeweils eine Lambda-Kette und der Klon 4a eine Kappa-Kette besitzt. Die Gene und

## Ergebnisse

Aminosäuresequenzen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. Der Prozentwert in Klammern zeigt die Übereinstimmung mit dem verglichenen Keimbahn-Gen.

Tabelle 7: V-, J-, D-Gene und Aminosäuresequenz der CDR3 Region der variablen schweren Kette

Klon	V-Gen	J-Gen	D-Gen	CDR3
<b>1</b>	IGHV1-18*01 F (91,67 %)	IGHJ4*02 F (89,36 %)	IGHD6-13*01 F	CARGSSSWYFY FDYW
<b>2</b>	IGHV1-18*01 F (96,88 %)	IGHJ6*02 F (74,19 %)	IGHD3-9*01 F	CARGGDWGLP GMDVW
<b>4a</b>	IGHV1-24*01 F (99,31 %)	IGHJ4*02 F (85,11 %)	IGHD3-3*01 F	CATATIFGVVIP NFDYW

Tabelle 8: V-, J-Gene und Aminosäuresequenz der CDR3 Region der variablen leichten Kette

Klon	V-Gen	J-Gen		CDR3
<b>1</b>	IGLV3-21*04 F (90,68 %)	IGLJ3*02 F (100 %)		CQVWDGSSYH PVF
<b>2</b>	IGLV6-57*01 F (91,07 %)	IGLJ3*02 F (89,19 %)		CQSSGISDDWVF
<b>4a</b>	IGKV2-28*01 F, oder IGKV2D- 28*01 F (95,92 %)	IGKJ5*01 F (89,47 %)		CMQGTHWPFTF

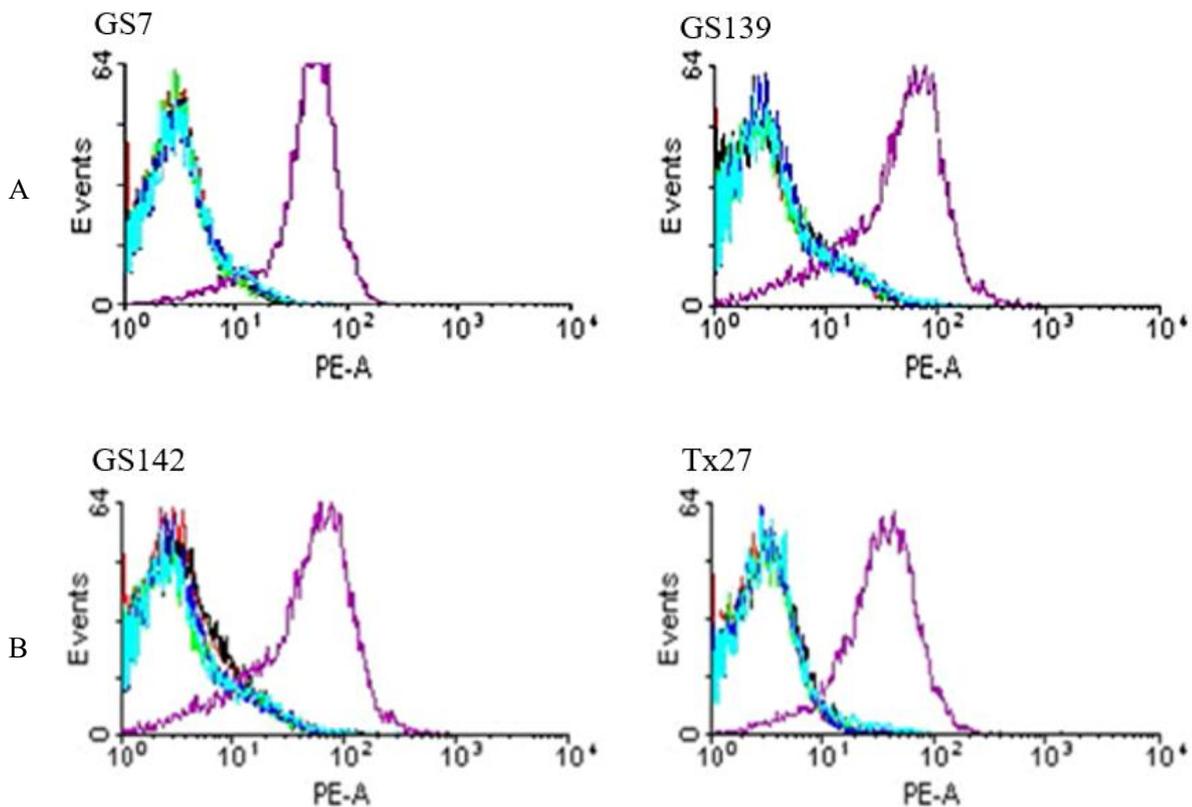
### 4.5 Durchflusszytometrische Analyse der Bindungseigenschaften gefundener HLA-C\*07:02-restringierter, CMV-spezifischer Fab-Antikörper

Im Verlauf der Arbeit konnten vier HLA-C\*07:02-restringierte, CMV-spezifische Fab-Antikörper identifiziert werden. Von den drei Antikörpern mit der höchsten Bindungsaffinität wurden zusätzlich durchflusszytometrische Messungen mit CMV-Peptid-beladenen Zellen durchgeführt. Diese erfolgten gegen unterschiedliche, typisierte Zellreihen, darunter HLA-C\*07:02-exprimierende und -nicht-exprimierende Linien. Die Messungen der Bindungsfähigkeit der selektierten Klone wurden an LCL-Zellen durchgeführt. Die LCL wurden freundlicherweise vom José-Carreras-Institut für Immun- und Gentherapie zur Verfügung gestellt.

Tabelle 9: HLA-Typisierung der verwendeten LCL

Zelllinie	HLA-A	HLA-B	HLA-C
<b>GS7</b>	A02:01, A03 <sup>+</sup>	B27:05, B44:0	C02:02, C05:01
<b>GS139</b>	A03:01	B07:02	<u>C07:02</u>
<b>GS142</b>	A11:01, A24:02	B40:06, B07:02	<u>C07:02</u> , C08:01
<b>Tx27</b>	A02:01, A24:02	B07:02, B18:01	<u>C07:02</u> , C12:03
<b>Tx26</b>	A03:01, A24:02	B35:01, B55:01	C03:04, C04:01
<b>F18</b>	A01:01, A68:01	B18:01, B37:01	C06:02, C12:03

Die Zelllinien GS139, GS142 und Tx27 exprimieren HLA-C\*07:02 (siehe Unterstreichungen), die Zelllinie GS7 den strukturell verwandten HLA-C\*02:02 Komplex. Die Homologie der HLA-Sequenzen für C\*07:02 und C\*02:02 beträgt etwa 96%. Als Kontrollen wurden die F18 und TX26 Linien gewählt, welche HLA-C\*07:02 negativ sind. Die Zellen der unterschiedlichen Linien wurden jeweils mit CMV-Peptid beladen. Höhere Peptidkonzentrationen führten unabhängig von der Antikörperbindung zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal. Die primäre Zellfärbung erfolgte mit PE-gekoppeltem Streptavidin.



## Ergebnisse

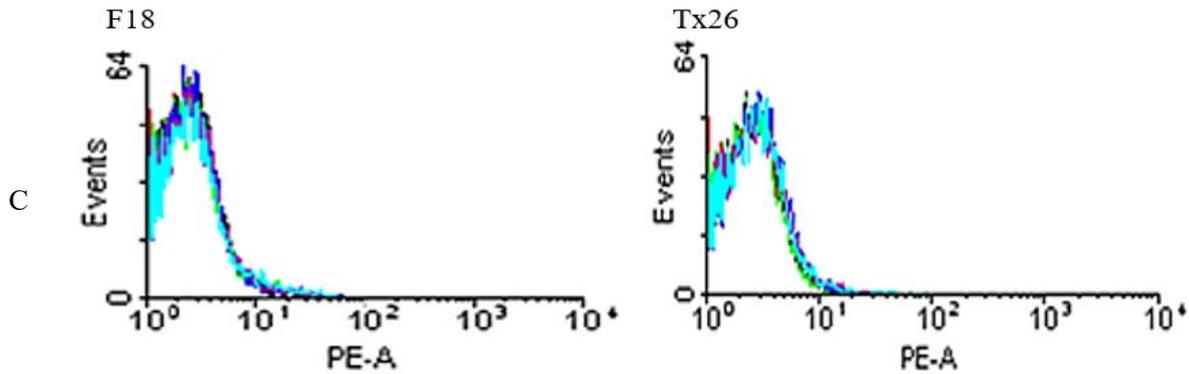
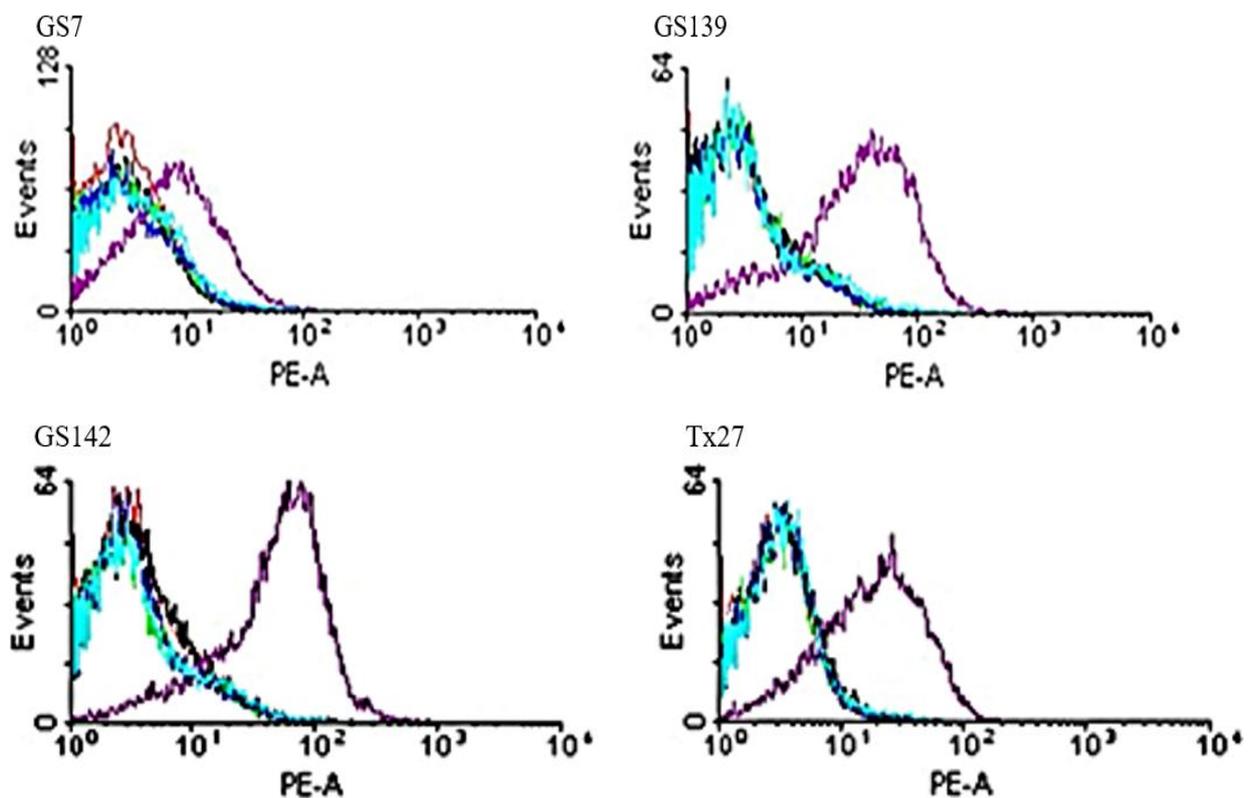


Abbildung 16: Durchflusszytometrie von Klon 1 mit den HLA-C\*07:02-exprimierenden Zelllinien GS7, GS139, GS142 und Tx27, sowie den HLA-C\*07:02-negativen Zelllinien F18 und Tx26

(PE-A: PE-Streptavidin; Rot: Zellen nur mit DMSO inkubiert; schwarz: Zellen nur mit dem CMV-Peptid beladen; grün: Zellen mit dem Kontrollpeptid MageA12 beladen; blau: Zellen mit DMSO und Antikörper inkubiert; violett: Zellen mit CMV-Peptid beladen und mit Antikörpern inkubiert; cyan: Zellen mit Kontrollpeptid und Antikörpern)

Die Durchflusszytometrie von Klon 1 mit den Zellreihen GS7, GS139, GS142 und Tx27 zeigte eine Bindungsaktivität der Antikörper an CMV-Peptid beladene, HLA-C\*07:02-positive Zellen. Unspezifische Bindungen an mit dem Kontrollpeptid beladenen Zellen ließen sich nicht feststellen. Das Fluoreszenzsignal aus der Messung der Zellreihen F18 und Tx26 zeigte keinen Unterschied zu dem der Probe mit dem Kontrollpeptid. Klon 2 zeigt im Vergleich zu Klon 1 eine ebenso spezifische, jedoch schwächere Bindungsaffinität zu denselben Zellreihen nach CMV-Peptidbeladung.



## Ergebnisse

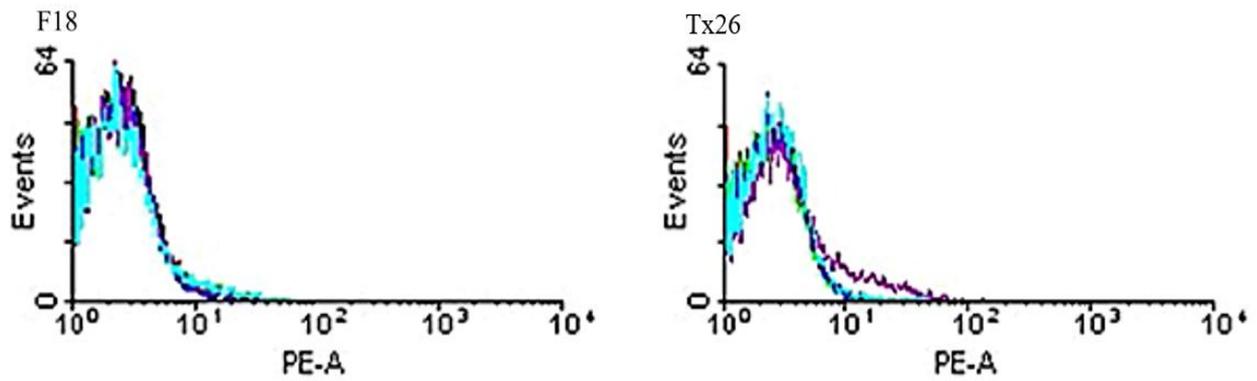
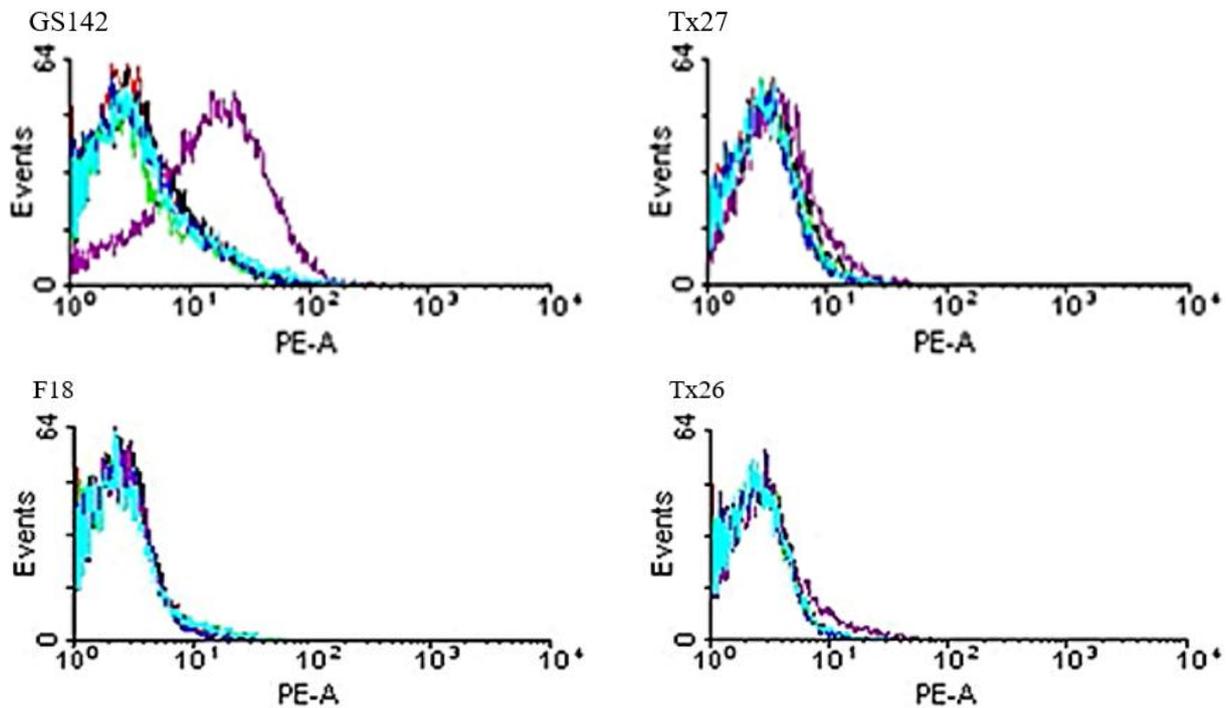


Abbildung 17: Durchflusszytometrie von Klon 2 mit den HLA-C\*07:02-exprimierenden Zelllinien GS7, GS139, GS142 und Tx27, sowie den HLA-C\*07:02-negativen Zelllinien F18 und Tx26.

(PE-A: PE-Streptavidin; Rot: Zellen nur mit DMSO inkubiert; schwarz: Zellen nur mit dem CMV-Peptid beladen; grün: Zellen mit dem Kontrollpeptid MAGEA12 beladen; blau: Zellen mit DMSO und Antikörper inkubiert; violett: Zellen mit CMV-Peptid beladen und mit Antikörpern inkubiert; cyan: Zellen mit Kontrollpeptid und Antikörpern)



## Ergebnisse

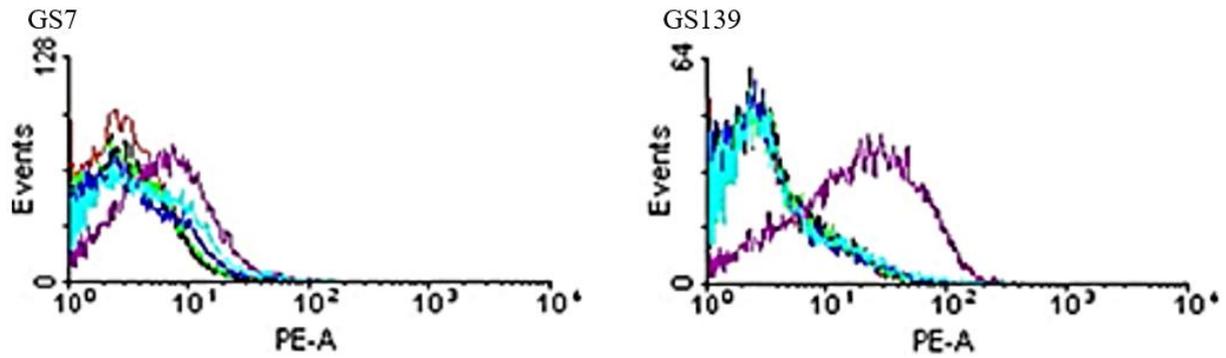


Abbildung 18: Durchflusszytometrie von Klon 4a mit den HLA-C\*07:02-exprimierenden Zelllinien GS7, GS139, GS142 und Tx27, sowie den HLA-C\*07:02-negativen Zelllinien F18 und Tx26.

(PE-A: PE-Streptavidin; Rot: Zellen nur mit DMSO inkubiert; schwarz: Zellen nur mit dem CMV-Peptid beladen; grün: Zellen mit dem Kontrollpeptid MageA12 beladen; blau: Zellen mit DMSO und Antikörper inkubiert; violett: Zellen mit CMV-Peptid beladen und mit Antikörpern inkubiert; cyan: Zellen mit Kontrollpeptid und Antikörpern)

Der Klon 4a zeigte im Vergleich zu Klon 1 und Klon 2 die schwächste Bindungsaffinität. Er zeigt zwar keine Bindungsaffinität zu den HLA-C\*07:02-negativen Zelllinien F18 und Tx26, aber auch nur eine sehr eingeschränkte Affinität zu den HLA-C\*07:02-positiven Zelllinien GS7 und Tx27

## 5.0 Diskussion

### 5.1 Aktuelle Standardtherapieverfahren zur Behandlung und Prophylaxe einer CMV-Infektion

Die symptomatische CMV-Infektion oder CMV-Reaktivierung zählen zu den häufigsten Komplikationen nach SOT oder HSCT.

Um die schweren Komplikationen einer Erstinfektion oder Reaktivierung bei immunsupprimierten Patienten zu verhindern, werden meist zwei Strategien verfolgt: einerseits die allgemeine Prophylaxe durch Gabe antiviraler Medikamenten wie Ganciclovir, Foscarnet, Cidofovir und Letermovir; andererseits das präventive, regelmäßige CMV-Monitoring anhand von Blutproben [43,54]. Die zur Prophylaxe gewöhnlich eingesetzten Substanzen können jedoch mit starken Nebenwirkungen, wie in Tabelle 10 aufgeführt, einhergehen.

Tabelle 10: Gängige Medikamente zur Prävention und Therapie einer CMV-Infektion bei Immunsupprimierten [13,55]

Medikament	Mechanismus	Nebenwirkungen
<b>Ganciclovir</b>	Inhibiert die DNA-Polymerase	Myelosuppression, Nephrotoxizität
<b>Valganciclovir</b>	Inhibiert die DNA-Polymerase, oral bioverfügbar, Prodrug von Ganciclovir	Myelosuppression, Nephrotoxizität
<b>Foscarnet</b>	Pyrophosphat-Analogon, direkte Hemmung der Polymerase UL54	Myelosuppression, Nephrotoxizität, Elektrolytentgleisungen
<b>Cidofovir</b>	Nucleotidanalogon, indirekte Hemmung der Polymerase UL54	Myelosuppression, Nephrotoxizität
<b>Letermovir</b>	Inhibition des Terminase-Komplexes	Übelkeit, Diarrhö
<b>Polyklonale CMV-IgG</b>	Erhöhung der Konzentration an CMV-Antikörpern	Infusionsreaktionen

Immunglobuline spielen in der Prophylaxe aufgrund ihrer limitierten Effektivität im Vergleich zu den antiviralen Pharmaka nur eine untergeordnete Rolle und werden daher meist nur additiv oder bei Unverträglichkeiten eingesetzt. Bei der Präventionstherapie wird die Virenlast wöchentlich bestimmt und bei einem Überschreiten einer zuvor festgelegten Schwelle mit einer antiviralen Behandlung begonnen. Aufgrund erheblicher Unterschiede in Testmaterial (Plasma versus Vollblut), Testplattform und individuellem Risikoprofil kann kein allgemeiner Schwellenwert für den sinnvollen Beginn einer präemptiven Therapie definiert werden [44].

## **5.2 Neue Therapieverfahren zur Behandlung und Prophylaxe einer CMV-Infektion**

Eine weitere Methode zur Prophylaxe und möglichen Therapie einer CMV-Infektion bei SOT und HSCT ist der Transfer von virusspezifischen T-Zellen (VST). VST können genutzt werden um eine virusspezifische Immunität kurz nach einer Transplantation rasch wiederherzustellen, oder um eine Infektion direkt zu behandeln [7,23,32,79]. Hierfür ist es notwendig, die am stärksten immunogen wirkenden Epitope des Erregers zu bestimmen, die von APC genutzt werden [23]. Um spezifische T-Zellen zu gewinnen, können unterschiedliche Methoden eingesetzt werden.

### 5.2.1 Ex-vivo Expansion

Hierbei werden T-Zellen eines Spenders entnommen und durch Kontakt zu APC zur Teilung angeregt. Die verwendeten APC wurden hierbei zuvor einem via MHC-I-Rezeptor-präsentierten Antigen ausgesetzt [57]. Die so expandierten T-Zellen können einem Patienten per Infusion verabreicht werden. Bei der Ex-vivo Expansion handelt es sich um ein Verfahren zur Herstellung polyklonaler T-Zellen, welches aus einer relativ kleinen Menge an Spenderblut ein ausreichendes therapeutisches Volumen generieren kann. Allerdings ist der Vorgang sehr zeitintensiv und kann bis zu mehreren Wochen andauern [7,23].

### 5.2.2 Direkte Selektion

Bei der direkten Selektion werden MHC-I-Komplexe eingesetzt, welche mit Peptiden des Virusantigens beladen sind, um die T-Zellen mit spezifischem TCR aus dem Spenderblut zu binden. Eine andere Möglichkeit besteht im Einsatz von spezifischen, monoklonalen und an magnetische Beads gekoppelten Leukozytenantikörpern, die an Zytokin-produzierende, beispielsweise Interferon (IFN)- $\gamma$ -sekretierende T-Lymphozyten, binden. Die Isolierung erfolgt anschließend mit Hilfe der magnetischen Eigenschaften der Beads [7,23]. Bei dieser Methode werden sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-Zellen selektiert. Im Vergleich zur Ex-vivo Expansion ist die direkte Selektion weniger zeitintensiv, setzt allerdings eine Seropositivität des Spenders voraus und kann für diesen aufgrund der Länge der Prozedur eine Belastung darstellen.

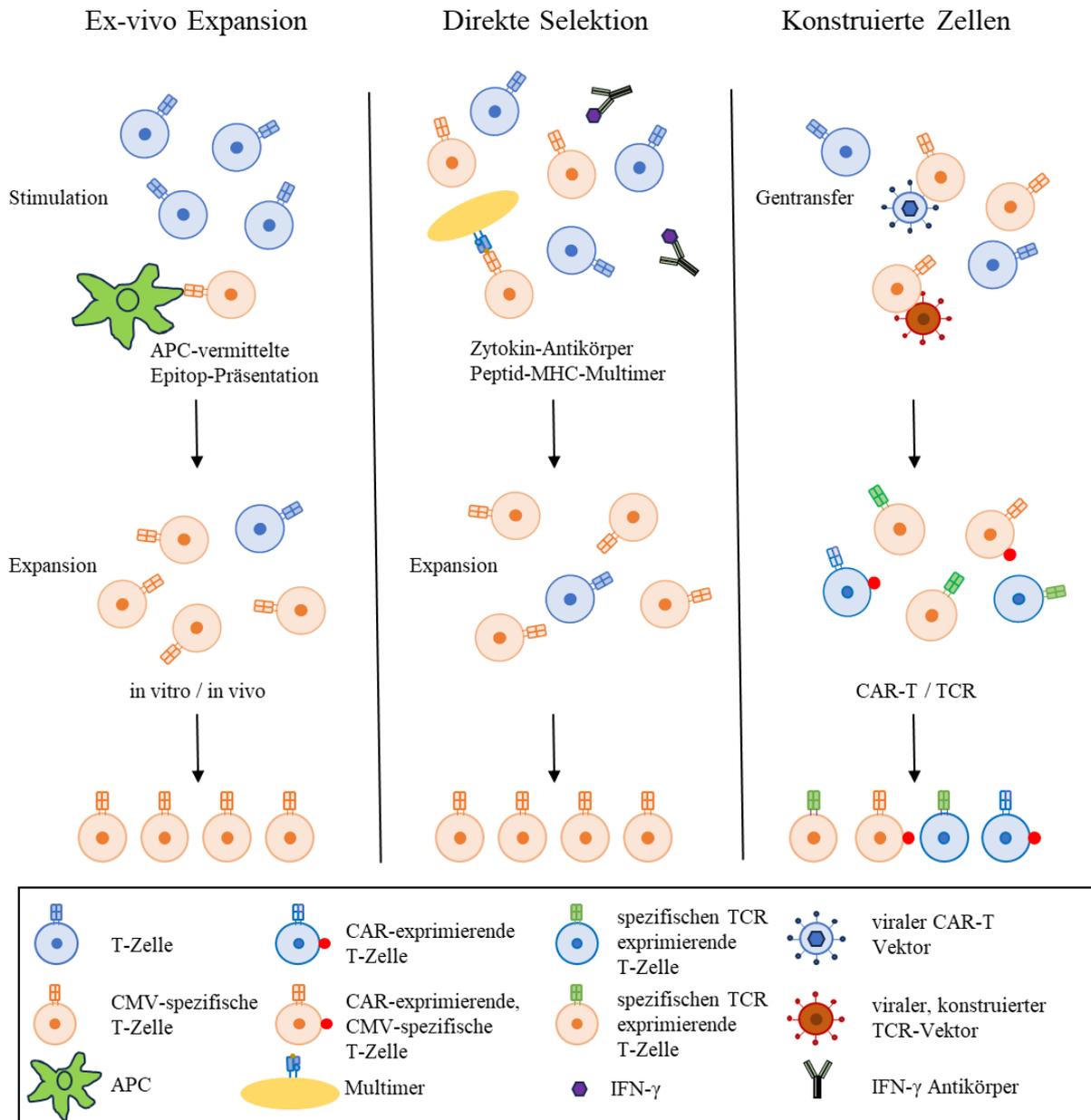
### 5.2.3 Konstruierte Zellen

Bei der Verwendung von konstruierten Zellen erfolgt durch einen Gen-Transfer von virusspezifischen TCR oder chimären Antigenrezeptoren (CAR) eine Änderung der Spezifität von T-Zellen hin zum gewünschten Virus-Antigen. CARs sind Rezeptoren, die rezeptortragenden Immunzellen sowohl Signale zur Zellaktivierung, als auch solche zur Ko-Stimulation anderer Immunzellen liefern. Die Rezeptorgene werden über eine Infektion mit Retroviren übertragen und von den T-Zellen stabil exprimiert, sodass so genannte CAR-T-Zellen entstehen. Diese bestehen aus einer extrazellulären Antikörperdomäne, einer

## Diskussion

Transmembrandomäne, sowie einer intrazellulären Domäne. Sie bieten den Vorteil, dass sie nicht nur Peptid-MHC-Komplexe als Antigen erkennen, sondern alle Strukturen, die auch ein regulärer Antikörper erkennen würde [61].

Ein Problem beim therapeutischen Einsatz von CAR-T-Zellen besteht in den hohen Kosten, sowie dem meist zeitaufwendige Herstellungsverfahren, was einen routinemäßigen Einsatz erschwert.



**Abbildung 19:** Verfahren zur Gewinnung von CMV-spezifischen T-Zellen

(Quelle: modifiziert nach García-Ríos E, Nuévalos M, Mancebo FJ, Pérez-Romero P (2021) Is It Feasible to Use CMV-Specific T-Cell Adoptive Transfer as Treatment Against Infection in SOT Recipients *Front Immunol* 12:657144)

### 5.3 Antikörper-basierte Therapieverfahren

Monoklonale Antikörper werden heutzutage bereits routinemäßig als Therapieverfahren bei einer großen Anzahl von Erkrankungen eingesetzt. Rituximab, einer der ersten zugelassenen, monoklonalen Antikörper, wird bis heute in der Krebstherapie und zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen verwendet. Rituximab ist ein chimärer Antikörper gegen das B-Zell-Oberflächenantigen CD20, der mittels Antikörper-induzierter, zellvermittelter Zytotoxizität beispielsweise die Abtötung von Lymphomzellen induzieren kann. Er wird daher hauptsächlich zur Behandlung von B-Zell-Lymphomen und -Leukämien eingesetzt [42]. Monoklonale Antikörper können mit Hilfe moderner, molekularbiologischer Methoden schnell und effizient in größeren Mengen hergestellt werden. Beim Einsatz in der Krebstherapie verursachen sie im Gegensatz zu vielen konventionellen Chemotherapeutika, die eine unspezifische Toxizität gegenüber allen, sich schnell teilenden Zellen besitzen, seltener Nebenwirkungen [63]. Dennoch kann es nach einer Antikörperinfusion prinzipiell zu Nebenwirkungen, beispielsweise durch eine Immunreaktion kommen, da sie Fremdeiweiße, zum Beispiel von der Maus, enthalten [63]. Mit der Entwicklung der rekombinanten DNA-Technik konnten erstmals weitaus weniger immunogene, humanisierte oder chimäre Antikörper hergestellt werden. Zudem verfügen diese rekombinant hergestellten Antikörper über eine verbesserte Fähigkeit, körpereigene, immunvermittelte Mechanismen zu rekrutieren. Somit sind sie im Vergleich zu den meisten in Mäusen produzierten (murinen) Antikörpern als effizienter zu betrachten [51].

Zu den möglichen akuten Reaktionen auf eine Therapie mit humanisierten oder chimären Antikörpern zählen der anaphylaktische Schock, die Serumkrankheit und das so genannte Zytokin-Freisetzungssyndrom (englisch: ‚cytokine-release-syndrome‘, CRS). Auch eine reaktive Antikörperbildung des Patienten gegen die therapeutischen Antikörper kann vorkommen [27]. Bei einer anaphylaktischen Reaktion werden an Mastzellen gebundenen IgE-Antikörper durch Antigenbindung quervernetzt, woraufhin von den Mastzellen pro-inflammatorische Mediatoren, wie beispielsweise Histamin, freigesetzt werden, die die allergische Reaktion vermitteln. Diese kann von Rhinitis und Bindehautschwellung bis hin zum lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock mit Herz-Kreislaufversagen reichen. Beispielsweise führt der monoklonale IgE-Antikörper Omalizumab, der bei schwerem allergischem Asthma bronchiale zum Einsatz kommt, selbst bei etwa 0,1 bis 0,2 % der Patienten zu einer anaphylaktischen Reaktion [27]. Die Serumkrankheit stellt eine so genannte Typ-III-Überempfindlichkeitsreaktion dar, die durch die Bildung von zytotoxischen Immunkomplexen, bestehend aus körperfremden Antikörpern und körpereigenen Immunzellen, gekennzeichnet ist [71]. Diese führt zu einer Aktivierung von Komplementsystem und Phagozyten. Es kommt hierbei durch die Ablagerung der Komplexe in kleinen Gefäßen, sowie in Haut und Gelenken zu entzündungsbedingten Läsionen. Diese können sich beispielsweise in einer Vaskulitis, einer Nephritis, Hautauschlägen, Arthritiden, sowie Fieber äußern [61]. Bei dem CRS handelt es sich um eine systemische Entzündungsreaktion, die auch durch andere Faktoren, wie Infektionen oder Medikamente (insbesondere einige Zytostatika) hervorgerufen werden kann [75]. Beim Auftreten eines CRS

im Rahmen einer antikörperbasierten Therapie kommt es zu einer massiven Zytokinausschüttung, überwiegend durch aktivierte T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen. Die komplette Pathophysiologie des CRS ist derzeit noch nicht in Gänze verstanden. Aktuell wird davon ausgegangen, dass durch die therapeutische Stimulation T-Zellen aktiviert werden, die durch Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder den Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  Makrophagen und Endothelzellen stimulieren und somit eine Kettenreaktion auslösen. Die stimulierten Immunzellen setzen wiederum weitere Zytokine wie IL-6 frei, das wiederum weitere T-Lymphozyten aktiviert [75]. Die Symptome eines CRS reichen von leichten Allgemeinerkrankungen wie Fieber und Kopfschmerzen, über Hypotension bis hin zum Kreislauf- und Organversagen. Das CRS tritt vor allem auch als Komplikation bei der CAR-T-Zelltherapie auf [1,75].

### 5.3.1 CMV-spezifische, HLA-C\*07:02-restringierte TCR-like Antikörper

Eine Limitierung des Einsatzes monoklonaler Antikörper ergibt sich aus dem Umstand, dass diese nur bestimmte Oberflächenantigene, wie beispielsweise CD20, gezielt erkennen können. Antikörper binden zudem natürlicherweise nicht an Peptide, die über MHC-I- oder MHC-II-Komplexe präsentiert werden, sondern an Krankheitserreger und Antigene in Extrazellulärräumen [61]. Die Immunantwort auf eine CMV-Infektion im Spätstadium und bei lebenslanger Persistenz der Viren im Körper ist stark von der Funktion der T-Zellen abhängig, da deren T-Zell-Rezeptoren in der Lage sind, die MHC-Viruspeptid-Komplexe zu binden [45]. Diese Erkennungs- und Bindungsfähigkeit der T-Zellen kann durch die Herstellung von TCR-like Fab-Antikörpern nachgeahmt werden, wodurch dann auch von MHC-Komplexen präsentierte, intrazelluläre, virale oder tumoröse Antigene erkannt werden können [30,46]. Die von uns identifizierten TCR-like Fab-Antikörper zeigten ein spezifisches Bindungsverhalten an LCL-Zellen bei einer Beladungskonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  CMV-Peptid. Als monovalente Antikörper verfügen sie jedoch nur über eine schwache Bindungsintensität. Um diese zu optimieren, haben wir durch die Einführung der BirA-Sequenz die Bildung von Fab-Tetrameren induziert. Außerdem ist zu bedenken, dass sich die Beladung der Zellen im Rahmen des Experiments von den Abläufen in vivo unterscheidet, da dort die Präsentation von prozessierten Peptiden durch immunevasive Mechanismen des Virus beeinflusst wird. Das CMV bildet verschiedene immunmodulierende Proteine, unter anderem die Glykoproteine US2, US3, US6 und US11, die die Ausbildung von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Membranaußenseite herunterregulieren, indem sie eine Translokation des Rezeptors zur Zelloberfläche verhindern [58]. Um die Affinität des Antikörpers zum Zielantigen für einen eventuellen therapeutischen Einsatz zu erhöhen, kann eine so genannte Affinitätsreifung durchgeführt werden. In vivo wird diese Affinitätsreifung durch somatische Hypermutationen in den B-Zellen erreicht, die zur Veränderung einer oder mehrerer Aminosäuren in der V-Region führt. Jene Antikörper, welche die beste Bindungsaffinität gegenüber der Zielstruktur besitzen, werden anschließend in den Keimzentren der Lymphknoten selektiert. Eine Affinitätsreifung der Antikörper in vitro folgt den gleichen Prinzipien und kann beispielsweise mit Hilfe einer so genannten ‚error prone PCR‘ kostengünstig durchgeführt werden. Hierbei werden im

ersten Schritt neue Varianten des Antikörpers generiert und diese anschließend anhand ihrer Affinität selektiert [10,17]. Um die Mutationsvielfalt zu erhöhen, wird die Fehleranfälligkeit der bakteriellen DNA-Polymerase künstlich erhöht. Dies kann durch eine Veränderung der Elektrolytkonzentrationen, durch Zugabe einzelner dNTPs zum Reaktionsgemisch, oder durch eine Steigerung der Anzahl an durchgeführten PCR-Zyklen erreicht werden [17]. Die mutierten Antikörpergene können dann in einen Phagen-Display Vektor eingesetzt werden, was eine Amplifikation und anschließende Isolation bindungsaffiner Antikörper mittels Phagen-Display-Methode ermöglicht. Ein weiterer Ansatz, welcher speziell auf die V-Regionen des Antikörpers abzielt, ist die Einführung von Mutationen in die CDR. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Methoden entwickelt, die von der Einführung gezielter Punktmutationen in die CDR oder die Gerüstregion, bis hin zum Austausch ganzer CDRs durch Zufallssequenzen reichen [4,10,17,22,85]. Ein weiterer Ansatz, um die Affinität der von uns gefundenen Antikörper zu erhöhen und ihre Bindungseigenschaften zu verbessern, wäre die Transformation von Fab zu vollständigen IgG-Antikörpern. Aufgrund ihrer Bivalenz könnten somit jeweils zwei Antigene gleichzeitig gebunden werden. Dadurch kommt es zur Erhöhung der so genannten Avidität, die als Stärke von Mehrfachbindungen definiert ist [33]. Ein konventioneller Ansatz besteht entweder im sequenziellen Klonen der VH- und VL- Domänen des Phagemidvektors in einen gemeinsamen Expressionsvektor, oder in der Verwendung eines eigenen Vektors jeweils für die leichte und die schwere Kette. Diese Vektoren werden anschließend in eine so genannte IgG-Kassette kloniert. Hierbei handelt es sich um einen Säugetiervektor, der die genetischen Informationen über die C<sub>L</sub>-, C<sub>H1</sub>-, C<sub>H2</sub>- und C<sub>H3</sub>-Domänen enthält [70]. Nach dem Klonierungsprozess exprimieren dann entsprechende Zellkulturen aus Säugetierzellen die Proteine, welche dann als vollständige IgG-Antikörper isoliert werden können. Neben einer möglichen Verbesserung der Bindungsaffinität durch seine bivalente Struktur besitzen IgG-Antikörper auch die Fähigkeit, über ihre Fc-Region mit Immunzellen zu interagieren. Somit können sie Einfluss auf die zelluläre Immunantwort nehmen, indem sie zum Beispiel NK-Zellen, Makrophagen oder neutrophile Granulozyten aktivieren, wodurch für diese die Phagozytose erleichtert wird. Neben ihrer Funktion bei der Komplementaktivierung hat die Fc-Region auch Einfluss auf die Verweildauer eines Antikörpers im Blutplasma. So besitzen IgG-Antikörper eine deutliche längere Plasmahalbwertszeit im Vergleich zu einzelnen Fab oder monovalenten Antikörpern, welche keine Fc-Region besitzen [73]. Es konnte gezeigt werden, dass IgG-Antikörper den neonatalen Fc-Rezeptor (englisch: ‚neonatal Fc-receptor‘, FcRn) binden können, der bei einer Schwangerschaft den Transport dieser Antikörper durch die Plazenta zum Fötus steuert [72]. Dieser wird auch noch im adulten Organismus, unter anderem in Endothelzellen und renalen Glomeruluszellen, exprimiert [61,84]. Der FcRn trägt zur Regulation des IgG-Spiegels bei, indem er die Fc-Region von im Körper zirkulierenden Antikörpern bindet, und deren Endozytose initiiert. Die IgG werden anschließend aus dem Urin ins Blut zurücktransportiert, wodurch ihre frühzeitige Ausscheidung verhindert wird. So kann eine biologische Halbwertszeit von über 10 Tagen für IgG-Antikörper erreicht werden [33,61].

## Diskussion

Bei der Entwicklung antikörperbasierter CMV-Therapien wäre es ebenfalls möglich, sich an den bereits im therapeutischen Einsatz befindlichen bispezifischen Antikörpern (englisch: ‚bispecific antibodies‘, bsAbs), wie Blinatumumab oder Talquetamab, zu orientieren. Bei diesen handelt es sich um gentechnisch hergestellte Antikörper, die gleichzeitig zwei unterschiedliche Epitope binden können, um so etwa den Kontakt zwischen einer Tumorzelle und einer immunologischen Effektorzelle herzustellen, oder um zelluläre Signalwege zu blockieren [31]. Der zur Behandlung der Philadelphia-Chromosom-negativen, rezidivierenden oder therapierefraktären B-lymphoblastischen Leukämie zugelassene bsAbs Blinatumumab zum Beispiel koppelt durch seine gleichzeitige Bindung an den CD19-B-Zellrezeptor und den CD3-T-Zellrezeptor immunologisch. Dies bewirkt eine Ausschüttung von zytolytischen Proteinen und Zytokinen, was schließlich die Lyse der Zielzelle hervorruft [67]. Zum bsAbs modifiziert könnte auch ein im Rahmen unserer Studie generierter TCR-like-Antikörper zur Rekrutierung von CTL oder NK-Zellen gegen virusinfizierte Zellen genutzt werden.

Mehrere Studien untersuchen derzeit den Einsatz von TCR gegen häufig mutierte Proteine wie das Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) und das Tumorsuppressorprotein 53 (p53). KRAS ist ein membrangebundenes Protein, das als Guanosin triphosphat (GTP)-Hydrolase (GTPase) fungiert und die Aktivierung wichtiger, membranrezeptor-abhängiger Signalwege kontrolliert [37]. KRAS kann durch unterschiedliche Effektoren, zum Beispiel den zellulären Wachstumsfaktor, wie ein Schalter aktiviert und deaktiviert werden, wodurch unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst werden können [37,52]. Durch Punktmutation des KRAS-Gens kann es zum Funktionsverlust der GTPase-Aktivität des KRAS-Proteins und somit seiner permanenten Aktivierung kommen. Das veränderte KRAS-Gen gehört zu den am häufigsten mutierten Genen beim kolorektalen, Pankreas- und Nicht-kleinzelligen Bronchiolalkarzinom. Hierbei geht es mit einer erhöhten Proliferationsrate, Überlebensfähigkeit und Akkumulation von Krebszellen einher [52]. Zudem ermöglicht KRAS den Tumorzellen durch seine Wirkung in der Tumormikroumgebung verschiedene Mechanismen der Immunevasion. KRAS fördert beispielsweise die Expression des ‚programmed death-ligand-1‘ (PD-L1), welcher T-Zellen inhibiert, die Herunterregulation von MHC-Klasse-I-Rezeptoren und die Sekretion von Zytokinen, die immunsuppressive Zellen rekrutieren [37]. Da es sich bei KRAS um ein intrazelluläres Protein handelt, kann es nicht von konventionellen, monoklonalen Antikörpern gebunden werden. Allerdings können prozessierte, von MHC-I-Komplexen präsentierte KRAS-Antigene von TCR gebunden werden [65]. KRAS-Mutationen werden aktuell als vielversprechende Ziele für zukünftige Tumortherapien angesehen. Es konnte gezeigt werden, dass KRAS-Antigene spezifisch von TCR erkannt werden konnten. In einer Studie wurden zwei spezifisch gegen das 9-mer KRAS-G12V Antigen gerichtete TCR in Mäusen identifiziert. Diese konnten in T-Zellen exprimiert werden, die auch experimentell eine zytotoxische Aktivität gegen die entsprechenden Tumorzellen zeigten [52]. Auch Mutationen im p53-Gen (TP53) können von T-Zellen erkannt werden. Dessen Genprodukt p53 wird ubiquitär in fast allen Körperzellen gebildet und unterliegt einem ständigen Abbau durch zelluläre Proteasen. Bei nicht reparierbaren DNA-Schäden wird p53 phosphoryliert und kann daraufhin nicht mehr abgebaut werden, wobei es intrazellulär akkumuliert

## Diskussion

und als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener pro-apoptotischer Gene stimuliert. Bei Verlust dieser Tumorsuppressorfunktion durch Mutationen in TP53 können die betroffenen Zellen nicht mehr über den p53-Signalweg in die Apoptose eintreten. Mutationen in TP53 sind die am häufigsten gefundenen genetischen Veränderungen bei menschlichen Krebsarten. Aktuell werden verschiedene Therapien mit Ansatz am p53-Signalweg untersucht [29,40]. Neben dem Versuch, die Funktion von p53 in Tumorzellen durch Inhibition des Abbaus wiederherzustellen, werden auch immuntherapeutische Ansätze verfolgt [29]. Da Tumorzellen mit TP53-Mutation oft p53 überexprimieren, können prozessierte p53-Peptide über MHC-I-Komplexe präsentiert werden und zum Beispiel von gentechnisch hergestellten T-Zellen oder auch TCR-like Antikörpern gebunden werden [29].

Einen von der Immunkompetenz des Patienten unabhängigen Ansatzpunkt stellt die Kopplung eines Zytotoxins an einen Antikörper oder alternativ an einen TCR-like Fab-Antikörper dar. Die direkte Abtötung von infizierten Zellen erfolgt dadurch ohne Beteiligung körpereigener Immunzellen und umgeht somit die Notwendigkeit eines ausreichenden Pools an Effektorzellen wie NK-Zellen und Makrophagen. Solche so genannten Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (englisch: ‚antibody drug conjugates‘, ADCs) werden bereits in der Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen oder bei der akuten myeloischen Leukämie eingesetzt [63]. Nach der Bindung des MHC-Peptid-Komplexes durch den modifizierten Antikörper und der anschließenden Internalisierung durch rezeptorvermittelte Endozytose, kann das Zytotoxin die Apoptose der Zelle induzieren [63]. Die TCR-like Antikörper imitieren die spezifische MHC-vermittelte Antigenerkennung der T-Zellen, werden aber nicht von den regulatorischen Schutzmechanismen von Tumoren beeinflusst, welche die T-Zell-Antwort inhibieren [14]. Es ließ sich bereits zeigen, dass TCR-like Antikörper in Mäusen die Phagozytose von EBV-infizierten, B-LCL-Zellen (BLCL) durch Makrophagen erleichtern und in vivo die Zelllast von BLCL-Tumoren reduzieren können [46]. Mit dem Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* verbundene Fab wurden bereits versuchsweise gegen HLA-typisierte, lymphoblastäre Zelllinien eingesetzt [5,14]. Die Einsatzmöglichkeit von Antikörperkonjugaten gegen von virusinfizierten Wirtszellen exprimierte Proteine wird seit längerem im Rahmen der Behandlung des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) 1 erforscht [80]. Als Ziele wurden zelleigene Strukturen, wie beispielsweise der virale Eintrittspunkt des HIV (CD4-Rezeptor), sowie Marker der T-Zell-Aktivierung, wie zum Beispiel der IL2-Rezeptor, identifiziert [80,86].

Besondere Schwierigkeiten im Einsatz von TCR-like Antikörpern ergeben sich allerdings aufgrund der hohen Variabilität an präsentierten Antigenen der Zielstruktur, der teils schwer erreichbaren Lokalisationen im Gewebe oder bei gewünschtem Einsatz in immunprivilegierten Organen [80]. Beim Einsatz von TCR-like Antikörpern in der CMV-Therapie muss zusätzlich die hohe interindividuelle Variabilität des MHC-Klasse-I-Moleküls bedacht werden. Das von uns untersuchte Allel HLA-C\*07:02 wird nur von etwa 14 % der deutschen Bevölkerung exprimiert [90], eine weitere Palette an TCR-like Antikörpern erstellt werden müsste, um die wichtigsten vorkommenden Allele abzudecken. Dennoch können Antikörper eine preiswerte Alternative oder Ergänzung zu konventionellen Krebs- oder Virustherapien

mit vergleichsweise geringen systemischen Nebenwirkungen und einer gezielteren Bekämpfung der Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen darstellen [80].

Ein weiterer Ansatz wäre der Transfer des TCR-like Antikörpers als CAR in T-Zellen, um diese im Rahmen der CAR-T-Zelltherapie einzusetzen. Ein standardmäßiger Einsatz der CAR-T-Zelltherapie wird jedoch durch die notwendige Verwendung von patienteneigenen T-Zellen und den zeitaufwendigen, oft von Hand durchzuführenden Modifikationsprozess limitiert [64]. Zurzeit sind nur CAR-T-Zellen aus autolog gewonnenen T-Lymphozyten zu therapeutischen Zwecken zugelassen, jedoch wird aktuell an Methoden zur Gewinnung von CAR-T-Zellen aus Spenderlymphozyten geforscht, die bei verschiedenen Patienten eingesetzt werden könnten [6,64]. Um die Gefahr einer GvHD bei der Verwendung allogener Immunzellen zu minimieren, könnte durch gezielte genomische Veränderung des TCR eine unerwünschte Interaktionen mit dem Gewebe des Empfängers verhindert werden [6].

### 5.3.2 Voraussetzungen zur Applikation bei Menschen

Antikörper der IgG-Klasse machen unter den für die Therapie menschlicher Erkrankungen zugelassenen Antikörpern den größten Anteil aus [83]. Die Zulassung von biologischen Arzneimitteln, zu denen auch die Antikörper gehören, erfolgt durch ein zentralisiertes Verfahren der europäischen Arzneimittelagentur (englisch: ‚European Medicines Agency‘, EMA) unter Mitwirkung von Experten des jeweiligen Mitgliedslandes, wie etwa dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) in Deutschland. Dazu muss das Medikament eine Reihe an Anforderung erfüllen [25,91]. Zunächst muss die toxikologische und pharmakologische Sicherheit in präklinischen Studien nachgewiesen werden. Dazu gehört die Charakterisierung schädlicher Effekte auf das Zielorgan, deren Dosisabhängigkeit, sowie die Feststellung einer möglichen Reversibilität dieser Effekte. Auf Grundlage dieser Ergebnisse erfolgt die Bestimmung einer sicheren Anfangsdosis für Studien am Menschen [92]. Studien am Tiermodell zur akuten und dosisakkumulierenden Toxizität, sowie zur Pharmakodynamik und Pharmakokinetik mit besonderem Augenmerk auf dem kardiovaskulären-, pulmonalen- und zentralnervösen System müssen durchgeführt werden [92]. Bei der Auswahl des Tiermodells muss die Vergleichbarkeit der physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge zum Menschen bedacht werden [25,60]. Es muss zudem geklärt werden, welchen Einfluss das tierische Immunsystem auf die Fähigkeiten des Antikörpers zur Aktivierung von immunvermittelten Effektormechanismen, wie zum Beispiel der Komplementaktivierung, hat [51]. Abhängig von der beabsichtigten Therapiedauer wird empfohlen, die Studien über einen Zeitraum von einem bis zu neun Monaten an einer Nagetier- und einer Nicht-Nagetierspezies zu durchzuführen [92]. Die Charakterisierung der Aminosäurestruktur, sowie der physio-chemischen und immunologischen Eigenschaften mit besonderer Beachtung möglicher biologischer Effekte, zum Beispiel durch Fc-Bestandteile bei monoklonalen Antikörpern, sollte vor dem Beginn der Phase-I-Studien vorliegen [25,91]. Um die Gefahr einer Kreuzreaktion, also dem Binden eines Antikörpers an ein strukturell ähnliches, jedoch unerwünschtes Epitop einschätzen zu können, sollte der genaue Bindungsort bekannt sein. Um diesen zu

## Diskussion

ermitteln, kommen unter anderem immunhistochemische Methoden und Tiermodelle zum Einsatz [17,51]. Bei der Auswahl der Tiermodelle ist zu berücksichtigen, dass in der Regel die strukturellen Unterschiede in den aus Proteinen oder Glykoproteinen bestehenden Epitopen mit der Abnahme des Verwandtschaftsgrades zweier Spezies zunehmen [51]. So weisen bestimmte Epitope von Affenarten, wie etwa Schimpansen, eine große Ähnlichkeit zu menschlichen Epitopen auf, wohingegen die Ähnlichkeit der menschlichen Epitope zu den meisten Epitopen von Nagetieren sehr gering ausgeprägt ist [51]. Werden alle behördlichen Anforderungen erfüllt und die präklinischen Risikofaktoren als weitgehend bekannt und akzeptabel eingeschätzt, muss eine sinnvolle Dosis zur erstmaligen Testung von Verträglichkeit und Pharmakokinetik eines Antikörpers an gesunden menschlichen Probanden gefunden werden. Diese Erstdosis kann aus den toxikologischen Vorstudien entweder mit Hilfe des ermittelten NOAEL-Wertes (englisch: ‚no-observed-adverse-effects-levels‘) oder des MABEL-Wertes (englisch: ‚minimal-anticipated-biological-effect-level‘), der kleinstmöglichen Konzentration, bei der ein messbarer Effekt gerade noch zu erwarten ist, hergeleitet werden [16,25,91]. Unter dem NOAEL kann die höchste experimentelle Dosis eines Stoffes verstanden werden, bei welcher keine schädliche Wirkung zu erwarten ist [15,25].

In den so genannten Phase-II-Studien erhalten kleine Gruppen von meist 100 bis 300 ausgewählten Probanden mit der entsprechenden Erkrankung das neue Medikament [93]. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, ob und bei welcher Dosierung sich ein gewünschter Effekt oder Nebenwirkungen einstellen [53,93]. In der sich daran anschließenden dritten Phase wird an einem größeren Patientenkollektiv der therapeutische Effekt eines neuen Wirkstoffes mit den bisherigen Standardtherapien verglichen [53]. Erteilt die EMA schließlich die Zulassung für ein bestimmtes Medikament, so darf dieses auf den Markt gebracht und von Ärzten verordnet werden.

Nach der Zulassung folgt die vierte Studienphase, die klinische Prüfung des Stoffes im Praxisbezug. In langjährigen Beobachtungsstudien wird hierbei evaluiert, ob spezifische, definierte Endpunkte, wie zum Beispiel eine Verbesserung des Überlebens, erreicht wurden und inwiefern es zum Auftreten von seltenen Nebenwirkungen oder Medikamenteninteraktionen gekommen ist [53,56,93].

## Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle.....	17
Abbildung 2: Genstruktur des menschlichen MHC .....	17
Abbildung 3: Struktur eines IgG-Antikörpers.....	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Phagen-Display-Methode .....	22
Abbildung 5: Darstellung des Phagemidvektors pCES1 als Plasmid und als filamentöser Phagenpartikel mit exprimiertem Fusionsprotein. ....	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Phagemidreplikation unter Zuhilfenahme der genetischen Information eines M13KO-Helferphagen .....	25
Abbildung 7: Tumor- und Virusantigenpräsentation über den MHC-Klasse-I-Komplex.....	26
Abbildung 8: Elektrophorese der MHC-I-Komplexe nach Größenausschluss-Chromatographie .....	57
Abbildung 9: PCR und Elektrophorese der selektierten Klone.....	59
Abbildung 10: Fingerprint-PCR und Elektrophorese.....	60
Abbildung 11: ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Fab-Antikörper gegenüber CMV-Peptid-präsentierenden HLA-C*07:02-Komplexen.....	62
Abbildung 12: ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Fab-Antikörper gegenüber MageA12-Kontrollpeptid-präsentierenden HLA-C*07:02-Komplexen .....	62
Abbildung 13: ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Fab-Antikörper ohne Zugabe von HLA-C*07:02-Komplexen.....	62
Abbildung 14: DNA-Fragmente der Phagemid-Vektoren der Klone 1, 2, 4a, 4b und 9.....	63
Abbildung 15: PCR und Elektrophorese der Klone 1, 2, 4a, 4b und 9 zur Überprüfung der erfolgreichen Einsetzung der BirA-Sequenz .....	64
Abbildung 16: Durchflusszytometrie von Klon 1 mit den HLA-C*07:02-exprimierenden Zelllinien GS7, GS139, GS142 und Tx27, sowie den HLA-C*07:02-negativen Zelllinien F18 und Tx26 .....	67
Abbildung 17: Durchflusszytometrie von Klon 2 mit den HLA-C*07:02-exprimierenden Zelllinien GS7, GS139, GS142 und Tx27, sowie den HLA-C*07:02-negativen Zelllinien F18 und Tx26. ....	68
Abbildung 18: Durchflusszytometrie von Klon 4a mit den HLA-C*07:02-exprimierenden Zelllinien GS7, GS139, GS142 und Tx27, sowie den HLA-C*07:02-negativen Zelllinien F18 und Tx26. ....	69
Abbildung 19: Verfahren zur Gewinnung von CMV-spezifischen T-Zellen.....	72

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien..... 27

Tabelle 2: Verwendete Peptide und Proteine ..... 29

Tabelle 3: Verwendete Enzyme..... 29

Tabelle 4: Verwendete Antikörper ..... 30

Tabelle 5: Verwendete Bakterien und Phagen ..... 30

Tabelle 6: Input und Output der einzelnen Selektionsrunden ..... 58

Tabelle 7: V-, J-, D-Gene und Aminosäuresequenz der CDR3 Region der variablen schweren Kette 65

Tabelle 8: V-, J-Gene und Aminosäuresequenz der CDR3 Region der variablen leichten Kette ..... 65

Tabelle 9: HLA-Typisierung der verwendeten LCL ..... 66

Tabelle 10: Gängige Medikamente zur Prävention und Therapie einer CMV-Infektion bei Immunsupprimierten ..... 70

## Referenzen

1. Abboud R, Keller J, Slade M, DiPersio JF, Westervelt P, Rettig MP, Meier S, Fehniger TA, Abboud CN, Uy GL, Vij R, Trinkaus KM, Schroeder MA, Romee R (2016) Severe Cytokine-Release Syndrome after T Cell-Replete Peripheral Blood Haploidentical Donor Transplantation Is Associated with Poor Survival and Anti-IL-6 Therapy Is Safe and Well Tolerated. *Biol Blood Marrow Transplant* 22:1851–1860
2. Altman JD, Davis MM (2003) MHC-Peptide Tetramers to Visualize Antigen-Specific T Cells. *Current Protocols in Immunology* 53:17.3.1-17.3.33
3. Ameres S, Mautner J, Schlott F, Neuenhahn M, Busch DH, Plachter B, Moosmann A (2013) Presentation of an Immunodominant Immediate-Early CD8<sup>+</sup> T Cell Epitope Resists Human Cytomegalovirus Immuno-evasion. *PLOS Pathogens* 9:e1003383
4. Barbas CF, Hu D, Dunlop N, Sawyer L, Cababa D, Hendry RM, Nara PL, Burton DR (1994) In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3809–3813
5. Bewarder M, Held G, Thurner L, Stilgenbauer S, Smola S, Preuss K-D, Carbon G, Bette B, Christofyllakis K, Bittenbring JT, Felbel A, Hasse A, Murawski N, Kaddu-Mulindwa D, Neumann F (2020) Characterization of an HLA-restricted and human cytomegalovirus-specific antibody repertoire with therapeutic potential. *Cancer Immunol Immunother* 69:1535–1548
6. Blache U, Popp G, Dünkel A, Koehl U, Fricke S (2022) Potential solutions for manufacture of CAR T cells in cancer immunotherapy. *Nat Commun* 13:5225
7. Bollard CM, Heslop HE (2016) T cells for viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Blood* 127:3331–3340
8. Braza F, Brouard S, Chadban S, Goldstein DR (2016) Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes. *Nat Rev Nephrol* 12:281–290
9. Broers AEC, van der Holt R, van Esser JWW, Gratama J-W, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, Löwenberg B, Cornelissen JJ (2000) Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 95:2240–2245
10. Chan DTY, Groves MAT (2021) Affinity maturation: highlights in the application of in vitro strategies for the directed evolution of antibodies. *Emerg Top Life Sci* 5:601–608
11. Chan G, Nogalski MT, Bentz GL, Smith MS, Parmater A, Yurochko AD (2010) PI3K-dependent upregulation of Mcl-1 by human cytomegalovirus is mediated by epidermal growth factor receptor and inhibits apoptosis in short-lived monocytes. *J Immunol* 184:3213–3222
12. Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, Richard MP, Bornhäuser M, Groth C, Einsele H, Silverman M, Mullane KM, Brown J, Nowak H, Kölling K, Stobernack HP, Lischka P, Zimmermann H, Rüksamen-Schaeff H, Champlin RE, Ehninger G (2014) Letemovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 370:1781–1789
13. Cho S-Y, Lee D-G, Kim H-J (2019) Cytomegalovirus Infections after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Current Status and Future Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 20:2666
14. Dahan R, Reiter Y (2012) T-cell-receptor-like antibodies – generation, function and applications. *Expert Rev Mol Med* 14:e6

15. Dorato MA, Engelhardt JA (2005) The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues, and definition(s). *Regul Toxicol Pharmacol* 42:265–274
16. dp\_admin (2015) Festlegung der Dosis für die „erste Anwendung am Menschen“. URL: <https://toolbox.eupati.eu/resources/festlegung-der-dosis-fuer-die-erste-anwendung-am-menschen/?lang=de>
17. Dübel S, Breitling F, Frenzel A, Jostock T, Marschall ALJ, Schirrmann T, Hust M (2019) *Rekombinante Antikörper: Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis*. Springer-Verlag
18. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, Grigoleit U, Moris A, Rammensee H-G, Kanz L, Kleihauer A, Frank F, Jahn G, Hebart H (2002) Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99:3916–3922
19. Fairhead M, Howarth M (2015) Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods Mol Biol* 1266:171–184
20. Fishman JA (2017) Infection in Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation* 17:856–879
21. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M (2020) Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10:130
22. Fukunaga A, Maeta S, Reema B, Nakakido M, Tsumoto K (2018) Improvement of antibody affinity by introduction of basic amino acid residues into the framework region. *Biochem Biophys Rep* 15:81–85
23. García-Ríos E, Nuévalos M, Mancebo FJ, Pérez-Romero P (2021) Is It Feasible to Use CMV-Specific T-Cell Adoptive Transfer as Treatment Against Infection in SOT Recipients? *Front Immunol* 12:657144
24. Grefte A, Harmsen MC, van der Giessen M, Knollema S, van Son WJ, The TH (1994) Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J Gen Virol* 75 ( Pt 8):1989–1998
25. Gross S, Jost N, Hartmann J-P (2017) Genehmigung klinischer Prüfungen mit biologischen Arzneimitteln. *Bundesgesundheitsbl* 60:826–829
26. Gupta M, Shorman M (2021) *Cytomegalovirus*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459185/>
27. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJT (2010) The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 9:325–338
28. Hansen LH, Knudsen S, Sørensen SJ (1998) The Effect of the lacY Gene on the Induction of IPTG Inducible Promotors, Studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Curr Microbiol* 36:341–347
29. Hassin O, Oren M (2023) Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nat Rev Drug Discov* 22:127–144
30. He Q, Liu Z, Liu Z, Lai Y, Zhou X, Weng J (2019) TCR-like antibodies in cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 12:99

31. Herrera M, Pretelli G, Desai J, Garralda E, Siu LL, Steiner TM, Au L (2024) Bispecific antibodies: advancing precision oncology. *Trends in Cancer* 10:893–919
32. Hill GR, Tey S-K, Beagley L, Crough T, Morton JA, Clouston AD, Whiting P, Khanna R (2010) Successful immunotherapy of HCMV disease using virus-specific T cells expanded from an allogeneic stem cell transplant recipient. *Am J Transplant* 10:173–179
33. Holliger P, Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23:1126–1136
34. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 19:4133–4137
35. Hoogenboom HR, de Bruijne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends J-W, Roovers RC (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4:1–20
36. Hosie L, Pachnio A, Zuo J, Pearce H, Riddell S, Moss P (2017) Cytomegalovirus-Specific T Cells Restricted by HLA-Cw\*0702 Increase Markedly with Age and Dominate the CD8+ T-Cell Repertoire in Older People. *Front Immunol* 8:
37. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L (2021) KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Sig Transduct Target Ther* 6:1–20
38. Jakharia N, Howard D, Riedel DJ (2021) CMV Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prevention and Treatment Strategies. *Curr Treat Options Infect Dis* 13:123–140
39. Kalil AC, Florescu DF (2009) Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit Care Med* 37:2350–2358
40. Kim SP, Vale NR, Zacharakis N, Krishna S, Yu Z, Gasmi B, Gartner JJ, Sindiri S, Malekzadeh P, Deniger DC, Lowery FJ, Parkhurst MR, Ngo LT, Ray S, Li YF, Hill V, Florentin M, Masi RV, Paria BC, Levin N, Bera A, Hedges EA, Choi A, Chatani PD, Parikh AY, Levi S, Seitter S, Lu Y-C, Zheng Z, Prickett TD, Jia L, Hernandez JM, Hoang CD, Robbins PF, Goff SL, Sherry RM, Yang JC, Rosenberg SA (2022) Adoptive Cellular Therapy with Autologous Tumor-Infiltrating Lymphocytes and T-cell Receptor–Engineered T Cells Targeting Common p53 Neoantigens in Human Solid Tumors. *Cancer Immunology Research* 10:932
41. Klechevsky E, Gallegos M, Denkberg G, Palucka K, Banchereau J, Cohen C, Reiter Y (2008) Antitumor activity of immunotoxins with T-cell receptor-like specificity against human melanoma xenografts. *Cancer Res* 68:6360–6367
42. Klein C, Lammens A, Schäfer W, Georges G, Schwaiger M, Mössner E, Hopfner K-P, Umaña P, Niederfellner G (2013) Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs* 5:22–33
43. Kotton CN (2013) CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *American Journal of Transplantation* 13:24–40
44. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A, Group on behalf of the TTSICC (2018) The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation* 102:900–931
45. La Rosa C, Diamond DJ (2012) The immune response to human CMV. *Future Virol* 7:279–293

46. Lai J, Tan WJ, Too CT, Choo JAL, Wong LH, Mustafa FB, Srinivasan N, Lim APC, Zhong Y, Gascoigne NRJ, Hanson BJ, Chan SH, Chen J, MacAry PA (2016) Targeting Epstein-Barr virus-transformed B lymphoblastoid cells using antibodies with T-cell receptor-like specificities. *Blood* 128:1396–1407
47. Lai J, Choo JAL, Tan WJ, Too CT, Oo MZ, Suter MA, Mustafa FB, Srinivasan N, Chan CEZ, Lim AGX, Zhong Y, Chan SH, Hanson BJ, Gascoigne NRJ, MacAry PA (2017) TCR-like antibodies mediate complement and antibody-dependent cellular cytotoxicity against Epstein-Barr virus-transformed B lymphoblastoid cells expressing different HLA-A\*02 microvariants. *Sci Rep* 7:9923
48. Li Y, Sousa R (2012) Novel system for in vivo biotinylation and its application to crab antimicrobial protein scygonadin. *Biotechnol Lett* 34:1629–1635
49. Limaye AP, Budde K, Humar A, Vincenti F, Kuypers DRJ, Carroll RP, Stauffer N, Murata Y, Strizki JM, Teal VL, Gilbert CL, Haber BA (2023) Letemovir vs Valganciclovir for Prophylaxis of Cytomegalovirus in High-Risk Kidney Transplant Recipients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 330:33–42
50. Ljungman P, Brand R, Hoek J, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Styczynski J, Ward KN, Cesaro S (2014) Donor Cytomegalovirus Status Influences the Outcome of Allogeneic Stem Cell Transplant: A Study by the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 59:473–481
51. Loisel S, Ohresser M, Pallardy M, Daydé D, Berthou C, Cartron G, Watier H (2007) Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Critical reviews in oncology/hematology* 62:34–42
52. Lu D, Chen Y, Jiang M, Wang J, Li Y, Ma K, Sun W, Zheng X, Qi J, Jin W, Chen Y, Chai Y, Zhang CWH, Liang H, Tan S, Gao GF (2023) KRAS G12V neoantigen specific T cell receptor for adoptive T cell therapy against tumors. *Nat Commun* 14:6389
53. Lüllmann H, Mohr K, Hein L (2015) Taschenatlas Pharmakologie. 7., vollständig überarbeitete Auflage edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart ; New York
54. Maffini E, Giaccone L, Festuccia M, Brunello L, Busca A, Bruno B (2016) Treatment of CMV infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol* 9:585–596
55. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, Haider S, Ullmann AJ, Katayama Y, Brown J, Mullane KM, Boeckh M, Blumberg EA, Einsele H, Snyderman DR, Kanda Y, DiNubile MJ, Teal VL, Wan H, Murata Y, Kartsonis NA, Leavitt RY, Badshah C (2017) Letemovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine* 377:2433–2444
56. McLeod C, Norman R, Litton E, Saville BR, Webb S, Snelling TL (2019) Choosing primary endpoints for clinical trials of health care interventions. *Contemp Clin Trials Commun* 16:100486
57. Micklethwaite K, Hansen A, Foster A, Snape E, Antonenas V, Sartor M, Shaw P, Bradstock K, Gottlieb D (2007) Ex vivo expansion and prophylactic infusion of CMV-pp65 peptide-specific cytotoxic T-lymphocytes following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:707–714
58. Mocarski ES (2002) Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends in Microbiology* 10:332–339

59. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H (2010) *Molekulare Virologie*. 3. edition. Springer Spektrum
60. Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, Nandi SK (2022) Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab Anim Res* 38:18
61. Murphy K, Weaver C (2018) *Janeway Immunologie*.
62. Nett PC, Heisey DM, Fernandez LA, Sollinger HW, Pirsch JD (2004) Association of Cytomegalovirus Disease and Acute Rejection with Graft Loss in Kidney Transplantation. *Transplantation* 78:1036–1041
63. Peters C, Brown S (2015) Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Bioscience Reports* 35:e00225
64. Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, Le Clerre D, Chion-Sotinel I, Derniame S, Potrel P, Bas C, Lemaire L, Galetto R, Lebuhotel C, Eyquem J, Cheung GW-K, Duclert A, Gouble A, Arnould S, Peggs K, Pule M, Scharenberg AM, Smith J (2015) Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for “Off-the-Shelf” Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Research* 75:3853–3864
65. Poole A, Karuppiiah V, Hartt A, Haidar JN, Moureau S, Dobrzycki T, Hayes C, Rowley C, Dias J, Harper S, Barnbrook K, Hock M, Coles C, Yang W, Aleksic M, Lin AB, Robinson R, Dukes JD, Liddy N, Van der Kamp M, Plowman GD, Vuidepot A, Cole DK, Whale AD, Chillakuri C (2022) Therapeutic high affinity T cell receptor targeting a KRASG12D cancer neoantigen. *Nat Commun* 13:5333
66. Primrose SB, Twyman R (2009) *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. Wiley, Hoboken
67. Przepiorka D, Ko C-W, Deisseroth A, Yancey CL, Candau-Chacon R, Chiu H-J, Gehrke BJ, Gomez-Broughton C, Kane RC, Kirshner S, Mehrotra N, Ricks TK, Schmiel D, Song P, Zhao P, Zhou Q, Farrell AT, Pazdur R (2015) FDA Approval: Blinatumomab. *Clinical Cancer Research* 21:4035–4039
68. Qi H, Lu H, Qiu H-J, Petrenko V, Liu A (2012) Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. *Journal of Molecular Biology* 417:129–143
69. Razonable RR, Humar A (2013) Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation* 13:93–106
70. Reader RH, Workman RG, Maddison BC, Gough KC (2019) Advances in the Production and Batch Reformatting of Phage Antibody Libraries. *Mol Biotechnol* 61:801–815
71. Rixe N, Tavarez MM (2021) *Serum Sickness*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538312/>
72. Roopenian DC, Akilesh S (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7:715–725
73. Saxena A, Wu D (2016) Advances in Therapeutic Fc Engineering – Modulation of IgG-Associated Effector Functions and Serum Half-life. *Front Immunol* 7:580
74. Shields MJ, Ribaldo RK (1998) Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the amino terminus of  $\beta$ 2-microglobulin. *Tissue Antigens* 51:567–570

75. Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, Stemmler HJ, Schlößer HA, Schlaak M, Kochanek M, Böll B, von Bergwelt-Baildon MS (2018) Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* 6:56
76. Son G, Lee JY, Kim J-G, Kim YJ (2021) Clinical features of cytomegalovirus retinitis after solid organ transplantation versus hematopoietic stem cell transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 259:585–591
77. Stevenson EV, Collins-McMillen D, Kim JH, Cieply SJ, Bentz GL, Yurochko AD (2014) HCMV reprogramming of infected monocyte survival and differentiation: a Goldilocks phenomenon. *Viruses* 6:782–807
78. Tomazin R, Boname J, Hegde N, Lewinsohn D, Altschuler Y, Jones T, Cresswell P, Nelson J, Riddell S, Johnson D (1999) Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature medicine* 5:1039–43
79. Tzannou I, Papadopoulou A, Naik S, Leung K, Martinez CA, Ramos CA, Carrum G, Sasa G, Lulla P, Watanabe A, Kuvalekar M, Gee AP, Wu M-F, Liu H, Grilley BJ, Krance RA, Gottschalk S, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE, Leen AM, Omer B (2017) Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol* 35:3547–3557
80. Umotoy JC, de Taeye SW (2021) Antibody Conjugates for Targeted Therapy Against HIV-1 as an Emerging Tool for HIV-1 Cure. *Front Immunol* 12:708806
81. Vanarsdall AL, Howard PW, Wisner TW, Johnson DC (2016) Human Cytomegalovirus gH/gL Forms a Stable Complex with the Fusion Protein gB in Virions. *PLoS Pathog* 12:e1005564
82. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, Pachot A, Brooks TL, Deych E, Shannon WD, Green JM, Storch GA, Hotchkiss RS (2014) Reactivation of Multiple Viruses in Patients with Sepsis. *PLOS ONE* 9:e98819
83. Wang X, Mathieu M, Brezski RJ (2018) IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* 9:63–73
84. Ward ES, Zhou J, Ghetie V, Ober RJ (2003) Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *International Immunology* 15:187–195
85. Ye W, Liu X, He R, Gou L, Lu M, Yang G, Wen J, Wang X, Liu F, Ma S, Qian W, Jia S, Ding T, Sun L, Gao W (2022) Improving antibody affinity through in vitro mutagenesis in complementarity determining regions. *J Biomed Res* 36:155–166
86. Zarling JM, Moran PA, Haffar O, Sias J, Richman DD, Spina CA, Myers DE, Kuebelbeck V, Ledbetter JA, Uckun FM (1990) Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4<sup>+</sup> cells by monoclonal antibodies. *Nature* 347:92–95
87. Zündorf I (2009) *Molekulare Biotechnologie*. Von David P. Clark, Nanette J. Pazdernik. *Pharmazie in unserer Zeit* 38:585–585
88. 093-002l\_S2k\_Virusinfektionen-Organtransplantierte-alloge-Stammzell-Transplantierten-Diagnostik-Praevention-Therapie\_\_2019-06-verlaengert.pdf. URL: [https://register.awmf.org/assets/guidelines/093-002l\\_S2k\\_Virusinfektionen-Organtransplantierte-alloge-Stammzell-Transplantierten-Diagnostik-Praevention-Therapie\\_\\_2019-06-verlaengert.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/093-002l_S2k_Virusinfektionen-Organtransplantierte-alloge-Stammzell-Transplantierten-Diagnostik-Praevention-Therapie__2019-06-verlaengert.pdf)

89. Phagemid - an overview | ScienceDirect Topics. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/phagemid>
90. The Allele Frequency Net Database [Search HLA Allele Frequencies]. URL: [http://www.allele-frequencies.net/hla6006a.asp?hla\\_locus\\_type=Classical&hla\\_locus=&hla\\_allele1=C\\*07%3A02&hla\\_allele2=C\\*07%3A02&hla\\_selection=&hla\\_pop\\_selection=&hla\\_population=3767&hla\\_country=&hla\\_dataset=&hla\\_region=&hla\\_ethnic=&hla\\_study=&hla\\_order=order\\_1&hla\\_sample\\_size\\_pattern=equal&hla\\_sample\\_size=&hla\\_sample\\_year\\_pattern=equal&hla\\_sample\\_year=&hla\\_level\\_pattern=equal&hla\\_level=&standard=a&hla\\_show=](http://www.allele-frequencies.net/hla6006a.asp?hla_locus_type=Classical&hla_locus=&hla_allele1=C*07%3A02&hla_allele2=C*07%3A02&hla_selection=&hla_pop_selection=&hla_population=3767&hla_country=&hla_dataset=&hla_region=&hla_ethnic=&hla_study=&hla_order=order_1&hla_sample_size_pattern=equal&hla_sample_size=&hla_sample_year_pattern=equal&hla_sample_year=&hla_level_pattern=equal&hla_level=&standard=a&hla_show=)
91. Guideline on the requirements for quality documentation concerning biological investigational medicinal products in clinical trials.
92. ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals - Scientific guideline | European Medicines Agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-pharmaceuticals-scientific-guideline>
93. Klinische Prüfungen - Paul-Ehrlich-Institut. URL: <https://www.pei.de/DE/regulation/klinische-pruefung/klinische-pruefungen-node.html>

## **Publikationen**

Bewarder M, Held G, Thurner L, Stilgenbauer S, Smola S, Preuss K-D, Carbon G, Bette B, Christofyllakis K, Bittenbring JT, Felbel A, Hasse A, Murawski N, Kaddu-Mulindwa D, Neumann F (2020) Characterization of an HLA-restricted and human cytomegalovirus-specific antibody repertoire with therapeutic potential. *Cancer Immunol Immunother* 69:1535–1548

**pET human beta2 Mikroglobulin**

HS GC.pET-beta2-MG\_T7 Sequenz:

TTCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG

ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGA-  
GAATGGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAA  
GTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTCAGACTT-  
GTCTTTCAG-  
CAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATGA  
GTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTCACAGCCCAAGATAGTTAAGTGG-  
GATCGAGACATGTAA

AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA-  
GATCCGGCTGCTAACAAA-  
GCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTT  
GGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGA ACTATATCCG-  
GATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTA  
CGCGCAGCGTGACCGCTACACTT-  
GCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGG  
CTTTCCTCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGG-  
CACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGA  
TAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTT-  
GTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATT  
TTGCCGATTTCCGGCTATATGGGTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAAC-  
GCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGC  
GGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCGCTCATGAGACAA-  
TACCCTGATAATGCTTCAATATATTGAAAAGAGAGTATGAGTATTCACATTTTCGTGTTTCG  
CCTATTCCCTTTTTGCCGCCATTTGGCTTCTTGTTTTTTGCTCACCAGAACGCTGGGTAG-  
TAGATTCTGAAGAATCGTGGTTCACAAGTGGTTACACGGAACCGTGAAATTA

### **Danksagung**

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Lorenz Thurner für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit im onkologischen Labor der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Homburg erstellen zu dürfen.

Bei Herrn PD Dr. med. Moritz Bewarder bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas dieser Doktorarbeit und sowie für seine Betreuung, Vorschläge und Anregungen.

Bei Herrn Prof. Andreas Ziegler möchte ich mich für die Bereitstellung der TÛ155-Antikörper bedanken.

Weiterhin möchte ich mich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des José-Carreras-Institutes für Immun- und Gentherapie der Klinik für Innere Medizin I für die gute Zusammenarbeit danken. Insbesondere bei Problemen und Fragen konnte ich mich vertrauensvoll an Frau Gabi Carbon und Frau Birgit Bette wenden.

Bei Frau Natalie Fadle möchte ich mich für die Durchführung der Größenausschluss-Chromatographie bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Freundin Tabea Reckner bedanken, die mich immer unterstützt und mir Mut zugesprochen haben.

Anhang

## **Lebenslauf**

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