

**T-Zell-basierte Immuntherapie gegen
Cytomegalovirusinfektionen – Weiterentwicklung
mittels bispezifischer
Antikörper**

**T cell based immunotherapy against
Cytomegalovirus infections – enhancement by
bispecific antibodies**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Natascha Teufert

aus Nürnberg

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2019

Vorsitzende/r des Promotionsorgans: Prof. Dr. Georg Kreimer

Gutachter/in: Prof. Dr. Andreas Burkovski

PD Dr. Brigitte Biesinger-Zwosta

Hoffnung ist nicht die Überzeugung, dass etwas gut ausgeht, sondern die Gewissheit,
dass etwas Sinn hat – egal wie es ausgeht.

Václav Havel

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Abstract	7
3	Einleitung	9
3.1	Cytomegaloviren	9
3.1.1	Das humane Cytomegalovirus	9
3.1.2	Das murine Cytomegalovirus	12
3.1.3	Immunantwort gegen CMV	13
3.1.4	Immunevasionsmechanismen des CMV	16
3.2	Die hämatopoetische Stammzelltransplantation	19
3.2.1	Virusinfektionen nach Stammzelltransplantationen	20
3.2.2	Behandlung von HCMV-Infektionen nach allogener HSZT	21
3.3	Adoptive T-Zell-Therapie	22
3.3.1	Adoptive Immuntherapie mit virusspezifischen T-Zellen	22
3.3.2	Adoptive Immuntherapie mit CAR-modifizierten T-Zellen	23
3.4	BiTE [®] -Moleküle - Bispezifische Antikörper	26
3	Ziel der Arbeit.....	28
4	Material und Methoden.....	30
4.1	Material	30
4.1.1	Reagenzien und Lösungen	30
4.1.2	Puffer und Lösungen	31
4.1.3	Biologisches Material.....	31
4.1.4	Medien.....	33
4.1.5	Weitere Zellkulturlösungen	34
4.1.6	Oligonukleotide.....	34
4.1.7	Plasmide und BACmide	35
4.1.8	Enzyme und Antikörper	36
4.2	Standardmethoden.....	38
4.3	Zellbiologische Methoden.....	38
4.3.1	Kultivierung von adhärent gewachsenen Zellen.....	38
4.3.2	Kultivierung von Hybridom-Zelllinien.....	38
4.3.3	Isolation, Stimulation und Kultivierung von MMCs/ murinen T-Zellen.....	39
4.3.4	Isolation, Stimulation und Kultivierung von PBMCs/ humanen T-Zellen ...	39
4.3.5	Herstellung von Hybridomüberständen	40
4.4	Virologische Methoden.....	40

4.4.1	Herstellung von rekombinantem MCMV und Titerbestimmung	40
4.4.2	Herstellung lentiviral-transduzierter Zellen	42
4.4.3	K-Lyse virushaltiger Zellen und Überstände	42
4.5	Sonstige Methoden	43
4.5.1	Quantitative Real-Time PCR mit fluoreszenzmarkierten Taqman Sonden	43
4.5.2	Durchflusszytometrie	43
4.6	Titration des gB-BiTE [®]	44
4.7	Inhibition der Virusausbreitung durch T-Zellen und gB-BiTE [®] <i>in vitro</i>	45
4.8	Inhibition der MCMV Foci-Bildung durch T-Zellen und gB-BiTE [®]	46
4.9	Auswirkungen auf die Virusausbreitung durch Zytokin-Zugabe	46
4.10	Europium-Zytotoxizitäts-Assay	47
4.11	Detektion der Zytokin-Sekretion (ELISA)	47
4.12	Statistische Auswertung	48
5	Ergebnisse	49
5.1	Replikationsanalyse und Ermittlung einer geeigneten MOI.....	49
5.2	Bestimmung der benötigten Menge gB-BiTE [®] zur Vermittlung einer optimalen T-Zell Aktivierung	50
5.3	Inhibition der Virusausbreitung <i>in vitro</i> durch T-Zellen und gB-BiTE [®]	54
5.4	Analyse der Anzahl viraler Genomkopien nach Co-Infekt und Behandlung mit T- Zellen und gB-BiTE [®]	66
5.5	Resistenz infizierter Zellen gegenüber der gB-BiTE [®] -vermittelten Lyse durch T- Zellen	68
5.6	Bestimmung der benötigten Menge HWZv gB-BiTE [®] zur Vermittlung einer optimalen T-Zell Aktivierung	73
5.7	Inhibition der Virusausbreitung <i>in vitro</i> durch T-Zellen und HWZv gB-BiTE [®] ...	76
5.8	Resistenz infizierter Zellen gegenüber der HWZv gB-BiTE [®] -vermittelten Lyse durch T-Zellen	90
5.9	Veränderte Virusausbreitung durch verschiedene Zytokine.....	94
6	Diskussion.....	99
7	Fazit.....	108
7	Abkürzungsverzeichnis.....	110
8	Literaturverzeichnis.....	112
Anhang	120

1 Zusammenfassung

Die Infektion und Reaktivierung des humanen Cytomegalovirus (HCMV) bei immunsupprimierten Patienten, insbesondere nach hämatopoetischen Stammzelltransplantationen, stellen nach wie vor ein großes Problem dar. Trotz strenger Überwachung und präventiver Therapie sind sie eine der Hauptursachen lebensbedrohlicher Komplikationen. Eine adoptive Immuntherapie durch die Gabe Virus-spezifischer, aus dem Blut des Spenders isolierter und ex vivo expandierter zytotoxischer Gedächtnis-T-Zellen ist eine der neueren, vielversprechenden Therapien gegen HCMV. Dies ist bei Stammzelltransplantationen jedoch nur anwendbar, wenn der Spender HCMV seropositiv ist. Bei der Konstellation eines seropositiven Empfängers und eines seronegativen Spenders ist es nicht möglich Gedächtnis-T-Zellen aus dem Blut des Spenders in ausreichender Menge zu isolieren.

Eine technologische Variante der bispezifischen Antikörper, sogenannte *Bispecific T cell engagers* (BiTE[®]), sind sowohl für maligne Erkrankungen als auch für virale Infektionen eine aussichtsreiche Form der Therapie. BiTE[®] Moleküle erkennen auf der einen Seite ein Oberflächen-Antigen auf der Zielzelle, auf der anderen Seite das CD3 auf T-Zellen und sind dadurch in der Lage maligne oder Virus-infizierte Zellen mit zytotoxischen T-Zellen zu verbinden und Effektor-Funktionen der T-Zellen zu aktivieren. Der erste durch die FDA zugelassene BiTE[®] war Blinatumomab, ein CD19/CD3 spezifischer Antikörper, der erfolgreich für die Therapie Philadelphia-Chromosom negativer rezidivierender oder refraktärer akuter lymphatischer Prä-B-Zell Leukämie (Prä-B ALL) eingesetzt wird.

Das Glykoprotein B (gB) des HCMV, welches auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert wird, wurde bereits in früheren Arbeiten (Full et al., 2010) als Zielantigen eines chimären Antigen-Rezeptors (CAR) genutzt. Basierend auf den Ergebnissen der Charakterisierung dieses CARs wurde in Kooperation mit Amgen ein spezifischer, gegen das HCMV gB gerichteter BiTE[®] entwickelt. Die Funktionalität der humanen Version, welche neben gB das CD3 humaner T-Zellen bindet, konnte von unseren Kooperationspartnern bereits *in vitro* bestätigt werden. Aufgrund der positiven Daten soll der HCMV gB-BiTE[®] in einem *in vivo* Mausmodell weiter charakterisiert werden. Da HCMV nur humane Zellen infiziert, wurde von unserer Arbeitsgruppe ein MCMV generiert, welches das HCMV gB exprimiert, wobei dieses zur besseren Oberflächenpräsentation an eine EpCAM Domäne fusioniert wurde (MCMV gB-EpCAM). Außerdem stellte Amgen eine murine Version des gB-BiTE[®], welcher das CD3 muriner T-Zellen erkennt, zur Verfügung.

In dieser Arbeit sollte zunächst das Potential des murinen gB-BiTE[®] *in vitro* überprüft werden. Dies beinhaltet zum einen die Bestimmung einer geeigneten BiTE[®]-Konzentration zur optimalen Aktivierung von T-Zell-Effektorfunktionen, wie Zytokinfreisetzung und Zytotoxizität, sowie die Etablierung eines Assays zur Überprüfung einer Spezies- und Antigen-spezifischen Funktionalität und die Charakterisierung der Wirkweise des gB-BiTE[®].

Dieser vermochte es, abhängig von seiner Konzentration eine Freisetzung von IFN γ durch die T-Zellen zu induzieren und dadurch eine verminderte Virusausbreitung zu vermitteln. Trotz der starken Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen waren MCMV-infizierte Fibroblasten, ebenso wie HCMV infizierte Fibroblasten, jedoch resistent gegenüber einer T-Zell-vermittelten Lyse. Die durch den gB-BiTE[®] vermittelte Inhibition der viralen Ausbreitung scheint außerdem noch von weiteren, spezifisch gegen gB-exprimierende Zellen gerichteten Mechanismen beeinflusst zu werden.

Aufgrund der geringen Halbwertszeit kanonischer BiTE[®] Moleküle wurde, nach erfolgreicher Bestätigung der Funktionalität des gB-BiTE[®], für die Anwendung im Mausmodell eine Halbwertszeit-verlängerte Version (HWZv BiTE[®]) von Amgen generiert und diese hier analog zur normalen Variante charakterisiert. Der HWZv BiTE[®] verhielt sich dabei identisch zu seinem Vorgänger, bis auf eine, vermutlich durch den viralen Fc γ -Rezeptor (vFc γ R) vermittelte Antigen-unspezifische Bindung an MCMV Wt infizierten Zellen. Er vermittelte die Aktivierung der T-Zellen und durch die damit verbundene Sekretion von IFN γ eine Inhibition der Infektionsausbreitung, jedoch ebenfalls keine Lyse der infizierten Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen.

Die Inkubation MCMV Wt infizierter Zellen mit rekombinantem IFN γ sowie die Kombination von IFN γ und TNF α , führte zu einer stark inhibierten viralen Ausbreitung und stützt die Aussage einer antiviralen Wirkung des gB-BiTE[®] durch die Vermittlung spezifischer Zytokin-Sekretion. TNF α alleine bewirkte jedoch einen bisher unbeschriebenen gegenteiligen Effekt, nämlich eine deutlich gesteigerte Ausbreitung der Viren.

Zusammengefasst bestätigt die vorliegende Arbeit die Funktionalität sowohl des normalen murinen gB-BiTE[®] als auch einer Halbwertszeit-verlängerten Variante *in vitro* im murinen System und zeigt, dass diese für die weitere Evaluation in einem *in vivo* Mausmodell mit MCMV geeignet sind.

2 Abstract

Infection and reactivation of the human cytomegalovirus (HCMV) in immunocompromised patients, in particular after hematopoietic stem cell transplantation and despite strict controls and pre-emptive therapy, remain major causes of life threatening conditions in patients. Adoptive immunotherapy with virus-specific cytotoxic memory T cells isolated from the donor's blood and ex vivo expanded is a promising experimental therapy against HCMV. Unfortunately this approach is only feasible with a seropositive donor. In the high-risk constellation of a seronegative donor and a seropositive patient it is not possible to isolate enough HCMV specific memory T cells from the donor's blood.

A technological variant of bispecific antibodies, the so-called Bispecific T cell engagers (BiTE[®]), represent a promising therapy form for malignant diseases as well as virus infections. BiTE[®] molecules are able to recognize two molecules at the same time – a surface antigens expressed on target cells and the CD3 on T cells. This enables them to bring malignant or virus infected cells in close proximity to cytotoxic T cells, and activates the T cell effector functions. The first BiTE[®] which got FDA approval was Blinatumomab, a CD19/CD3 specific antibody for remitting or refractory Ph-Pre-B cell Acute Lymphoblastic Leukaemia (Pre-B ALL).

The HCMV glycoprotein g (gB), which is expressed on the surface of infected cells, was already used in prior works (Full et al., 2010) as an antigen for an HCMV specific chimeric antigen receptor (CAR). Based on the results of the characterisation of this CAR, a specific BiTE[®] targeting the HCMV gB was developed in cooperation with Amgen. The function of the human gB-BiTE[®] version, which targets the gB and connects it to the human CD3, could already be verified *in vitro* by our cooperation partners. As a result of these positive data, the gB-BiTE[®] needed further characterisation in an *in vivo* mouse model. Since HCMV only infects human cells, our group designed an MCMV additionally expressing the HCMV gB, which for better surface presentation is fused to the EpCAM domain (MCMV gB-EpCAM). Moreover Amgen provided a murine version of the gB-BiTE[®], which is able to bind to CD3 on murine T cells.

In the present work the potential of this murine gB-BiTE[®] was investigated *in vitro*. This included the determination of a suitable BiTE[®] concentration, in order to trigger optimal T cell effector functions like cytokine secretion and cytotoxicity, as well as establishing an assay to test for a species- and antigen-specific functionality and the mode of action of the gB-BiTE[®].

Depending on its concentration, the gB-BiTE[®] triggered the release of IFN γ by T cells and thereby decreased viral spread. Despite a strong activation of cytotoxic T cells, MCMV-infected cells still remain resistant to T cell mediated lysis. The gB-BiTE[®] mediated inhibition of the viral dissemination, in addition to secreted cytokines, seems to depend on further mechanisms specific for gB-expressing cells.

After successful confirmation of the functionality of the gB-BiTE[®], and due to the short serum half-life of the BiTE[®] molecules, a half-life extended BiTE[®] (HLE BiTE[®]) was generated by Amgen to facilitate the application in a mouse model. It was characterised analogous to the normal gB-BiTE[®]. Aside from an antigen-unspecific binding of the HLE BiTE[®] to MCMV Wt infected cells, it acts similar as its predecessor. The observed unspecific activation might be due to the expression of cytomegaloviral Fc γ receptors (vFc γ R), which are able to bind to Fc domains of immunoglobulins. The HLE gB-BiTE[®] mediates the activation of T cells and thereby secretion of IFN γ , which results in inhibition of the viral spread. However, direct lysis of the infected target cells was not obtained.

The incubation of MCMV Wt infected cells with recombinant IFN γ , as well as a combination of IFN γ and TNF α , reduces virus dissemination and supports the conclusion that an anti-viral effect of the gB-BiTE[®] is mediated by cytokine secretion. Notably, TNF α alone produced an unexpected and previously unknown effect, as it resulted an increased viral spread.

In summery the present data shows both the normal murine gB-BiTE[®] and the half-life prolonged version of the BiTE[®] are functional *in vitro* in a murine system, permitting now the application in an *in vivo* mouse model.

3 Einleitung

3.1 Cytomegaloviren

3.1.1 Das humane Cytomegalovirus

Die Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*) wird aufgrund verschiedener biologischer und genetischer Merkmale in drei Unterfamilien, die alpha- (α), beta- (β) und gamma- (γ) Herpesviren, eingeteilt. (Roizman et al., 1981; Roizman 1992) Bekannte Vertreter der α -Herpesviren sind das Herpes simplex Virus 1 und 2 (HSV-1; HSV-2) sowie das Varizella Zoster Virus (VZV). Zu den γ -Herpesviren gehören unter anderem das Epstein-Barr Virus (EBV) als auch das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV; auch Herpesvirus 8, HHV-8). Das Humane Cytomegalovirus (HCMV; auch Humanes Herpesvirus 5, HHV-5) zählt zusammen mit dem Humanen Herpesvirus 6 und 7 (HHV-6, HHV-7) zur Familie der β -Herpesviren. HCMV stellt dabei den Prototyp der β -Unterfamilie dar und charakterisiert sich durch ein sehr enges Wirtsspektrum, mit dem Menschen als einzig natürlichen Wirt. (Mocarski et al., 2007)

Die infektiösen Partikel aller drei Unterfamilien zeigen eine einheitliche Morphologie mit einer Größe von 150-200 nm. Ebenso besitzen alle Herpesviren ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom (dsDNA). Mit einer Genomlänge von ~235 Kilobasenpaaren (kb), codierend für mindestens 165 Genprodukte (Murphy & Shenk, 2008; Cunningham et al., 2010), zählt HCMV zu den komplexesten humanpathogenen Viren. Umgeben wird die dsDNA von einem ikosaedrischen Kapsid, welches selbst wiederum mit einer Tegumentschicht aus verschiedenen Proteinen umhüllt ist. (Mocarski et al., 2007) Die äußere Hülle der Viruspartikel besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, die der Wirtszelle entstammt und in welche verschiedene virale Glykoproteine eingelagert sind (Abb. 1).

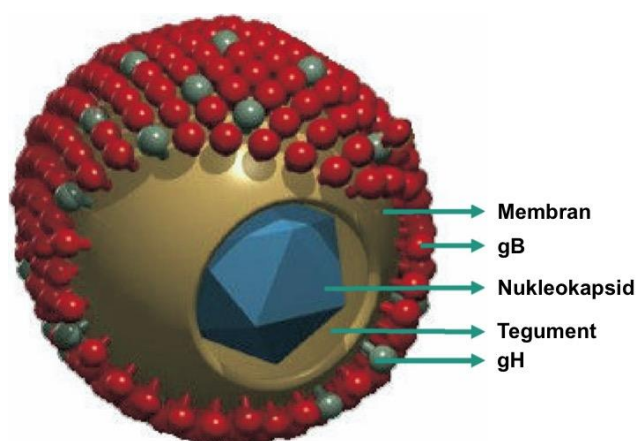


Abb. 1: Morphologie eines HCMV-Partikels.

Schematische Darstellung eines HCMV-Partikels. Die lineare, doppelsträngige DNA im Inneren des Nukleokapsids wird von einer proteinreichen Tegumentschicht und einer Hüllmembran, in die verschiedene Glykoproteine (z.B. gB, gH) eingelagert sind, umgeben. Modifizierte Abbildung nach Crough et. al, 2009.

Eine besondere Eigenschaft der Herpesviren ist die Etablierung einer lebenslangen latenten Infektion. Nach einer lytischen Primärinfektion sind diese in der Lage im Zustand der Latenz in ihren jeweiligen spezifischen Zielzellen zu persistieren. (Crough et al., 2009; Boeckh et al., 2011; Davison 2007) Während der Infektion einer Wirtszelle kommt es zur Bindung konservierter Glykoproteine der viralen Hüllmembran an ubiquitäre Zelloberflächenstrukturen wie Heparansulfat oder Glykosaminoglykane. HCMV vermittelt seine Bindung dabei über das Glykoprotein B (gB) und einen Komplex aus den Glykoproteinen M (gM) und N (gN). (Compton et al., 2007; Vanarsdall et al., 2012; Mocarski 2007) Die anschließende Aufnahme in die Wirtszelle erfolgt über die Fusion der viralen mit der zellulären Membran. Diese wird durch die Interaktion des gB und einem Komplex aus den Glykoproteinen H (gH) und L (gL) mit einem zellulären Rezeptor, diskutiert werden Integrine oder EGFR (*epidermal growth factor receptor*), initiiert. Nachdem das Virus in die Zelle eingedrungen ist, werden die Kapside entlang des Zytoskeletts zu den Poren des Zellkerns transportiert und die viralen Genome in den Nukleus geschleust. Das hoch regulierte Stadium der Latenz zeichnet sich durch ein Unterbleiben der Transkription der Mehrheit der viralen Gene und dem Fehlen der Produktion von Viruspartikeln aus. Die virale, lineare dsDNA zirkularisiert dabei zu stabilen extrachromosomalen Episomen, die nukleosomale Strukturen annehmen (Deshmane und Fraser, 1989; Shaw et al., 1979) und als solche im Zellkern verweilen. (Croen et al., 1991) Durch unterschiedliche Einflüsse können Herpesviren reaktivieren und erneut in die lytische Phase der Replikation eintreten. Die Produktion und Freisetzung infektiöser Viruspartikel ist die Folge (Abb. 2A). Der entscheidende Schritt hierbei ist die Initiation einer Expressionskaskade bestimmter viraler lytischer Gene. Sie beginnt mit der Expression der sehr frühen (*immediate-early*, IE) Gene, deren Genprodukte vor allem Transaktivatoren sind, welche die Transkription der frühen (*delayed-early* oder *early*, E) und späten (*late*; L) Gene fördern. Ein Großteil der frühen Gene kodiert für Proteine, die an der Genomreplikation und am Nukleinsäure-Stoffwechsel beteiligt sind. Unabhängig vom Zellzyklus und der Replikation der zellulären DNA vermitteln sie die Vermehrung der viralen Genome durch die Initiation des sogenannten *rolling-circle* Mechanismus, welcher von verschiedenen lytischen Replikationsursprüngen ausgeht (Abb. 2B). (Roizman et al., 1992) Als letzter Schritt im lytischen Replikationszyklus werden Strukturproteine transkribiert und synthetisiert, welche von den späten Genen kodiert werden und für den Zusammenbau der infektiösen Viruspartikel (*Assembly*) nötig sind, und es erfolgt die Freisetzung der Virionen durch Exozytose und/oder Lyse der infizierten Wirtszelle. (Flint et al., 2004)

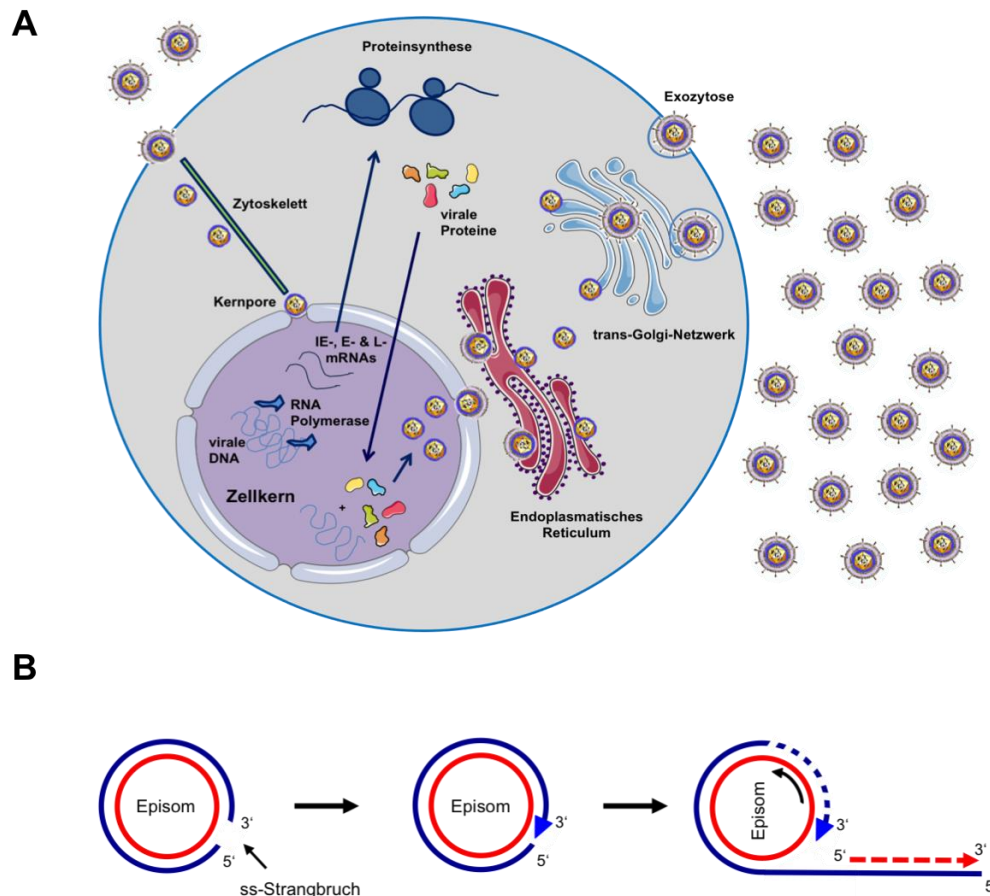


Abb. 2: Lytischer Vermehrungszyklus und rolling-circle Replikationsmechanismus der Herpesviren.

(A) Schematische Darstellung des lytischen Replikationszyklus von Herpesviren. Nach Infektion der Zielzelle erfolgt der Transport der Nukleokapside entlang des Zytoskeletts zu den Kernporen, an welchen die virale DNA in den Zellkern entlassen wird. Nach Transkription der verschiedenen mRNAs werden diese ins Zytoplasma exportiert und an den Ribosomen translatiert. Die viralen Proteine werden zurück in den Kern transportiert und zusammen mit dem viralen Genom in Vorläuferpartikel verpackt. Nach Knospung an der Kernmembran werden die Vorläuferpartikel im Endoplasmatischen Retikulum aufgenommen, mit den Tegumentproteinen umhüllt und zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert. Hier erfolgt die abschließende Umhüllung der Virionen. Über Golgivesikel werden die fertigen Viruspartikel zur zellulären Membran gebracht, mit der sie verschmelzen und so aus der Zelle freigesetzt werden. **(B)** Schematische Darstellung des rolling-circle Mechanismus. Durch einen Einzelstrang (ss)-Bruch an einem der beiden DNA-Stränge entsteht ein freies 3'-OH- und ein 5'-Phosphatende. Das 3'-OH-Ende wird dabei als Primer, unter Verwendung des geschlossenen Strangs als Matrize, für die Polymerisationsreaktion verwendet. Es entsteht ein kontinuierliches DNA-Konkatemer, das zum Doppelstrang ergänzt wird.

Das humane Cytomegalovirus ist ein weltweit stark verbreitetes Pathogen. Die Durchseuchungsrate innerhalb der Bevölkerung ist dabei abhängig vom jeweiligen sozioökonomischen Stand (Krech, 1973; Onorato et al., 1985), in entwickelten Nationen findet man eine Seroprävalenz von 50-70%. Die Übertragung des Virus kann durch Speichel, Bluttransfusionen, sexuellen Kontakt, Transplantationen, Muttermilch sowie, bereits vor der Geburt, über die Plazenta erfolgen. (Crough et al., 2009) HCMV ist in der Lage eine

Vielzahl verschiedener Wirtszellen zu befallen. Hierzu gehören sowohl Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen als auch Monozyten, Hepatozyten, Neutrophile, glatte Muskelzellen, Makrophagen, Stromazellen, Trophoblasten und neuronale Zellen. (Boeckh et al., 2011; Arvin et al., 2007)

Eine Primärinfektion von gesunden Individuen erfolgt in der Regel entweder asymptomatisch oder begleitet von leichten Symptomen. (Jordan et al., 1973; Cohen und Corey, 1985) Bei immunsupprimierten Personen, wie zum Beispiel AIDS- oder Transplantations-Patienten, können jedoch schwerwiegende lebensbedrohliche Komplikationen wie eine Retinitis, Enzephalitis, Pneumonie, Nephritis oder Gastroenteritis auftreten. (Crough et al., 2009; Boeckh et al., 2011) Auch für Schwangere bzw. deren Ungeborene kann eine Infektion mit HCMV während der Schwangerschaft weitreichende Folgen haben. HCMV ist bei uns mit einer Inzidenz von ca. 0,5% betroffener Neugeborener der häufigste Erreger pränataler Infektionen. Das Ansteckungsrisiko ungeborener Kinder liegt bei Erst-Infektion der Mutter mit HCMV während der Schwangerschaft bei 30-40%. In etwa 10-15% der Fälle der infizierten Neugeborenen treten Symptome wie eine Schädigungen des zentralen Nervensystems, Wachstumsstörungen und ein schrittweiser Verlust des Hör- und Sehvermögens auf. Die Mortalitätsrate der symptomatisch infizierten Säuglinge beträgt ca. 30%. (Crough et al., 2009)

3.1.2 Das murine Cytomegalovirus

Aufgrund der Spezies-spezifischen Replikation und Dissemination von CMV im Wirt existiert bisher kein direktes Tiermodell zur Untersuchung von HCMV. Da das murine Cytomegalovirus (MCMV) vergleichbare Eigenschaften in seiner Replikation sowie Pathogenität aufweist, gilt es als etabliertes Modellsystem für HCMV im Kleintier.

Die Morphologie der MCMV-Virionen entspricht im Wesentlichen der von HCMV. Der Stamm Smith besitzt 170 offene Leserahmen (ORF) wovon 48,8% Homologien zu anderen bekannten Proteinen aufweisen. 78 Gene von MCMV zeigen eine signifikante Homologie zu den jeweils entsprechenden HCMV-Genen. (Rawlinson et al., 1996)

Die lytische Replikation von MCMV erfolgt wie bei HCMV durch den Ablauf einer streng regulierten Expressions-Kaskade bestimmter viraler lytischer Gene (siehe 3.1.1).

Als Übertragungsweg von MCMV unter Freilandbedingungen oder in Käfighaltung gelten sowohl Speichel (z.B. durch Bisse) als auch die sexuelle Übertragung als die wahrscheinlichsten Formen der Virusausbreitung. Der vorherrschende Weg der Virusausbrei-

tung bei Mäusen in Käfighaltung ist die Ausbreitung über die oberen Atemwege. Der Viruseintritt erfolgt über olfaktorische Neurone, von wo aus einwandernde myeloide Zellen infiziert werden, welche dann in die Speicheldrüsen abwandern. (Farrell et al., 2016) Experimentelle Infektionsverläufe von MCMV sind neben der Art der Applikation (intra-peritoneal, intravenös oder intraplantar) und der Infektionsdosis auch von der Herkunft des Virus (Aufreinigung aus Zellkulturüberstand oder aus Speicheldrüsen) sowie dem Alter, dem Immunstatus und dem genetischen Hintergrund der infizierten Maus abhängig. (Krpmotić et al., 2003)

Die im Tiermodell bisher übliche intraperitoneale (i.p.) Gabe einer subletalen MCMV-Dosis führt in der Lunge, Leber, Milz, Niere und den Speicheldrüsen der Maus zu einer raschen Ausbreitung des Virus. Wie auch beim Menschen, bleibt die Infektion in immun-kompetenten Mäusen dabei asymptomatisch. Eine Replikation von MCMV kann aber noch bis zu vier Wochen nach Infektion in den Speicheldrüsen nachgewiesen werden. (Manning et al., 1992) Bei immunsupprimierten und immundefizienten Mäusen führen durch eine Primärinfektion oder die Reaktivierung latenter Viren hervorgerufene systemische MCMV-Infektionen zu Pneumonie, Hepatitis und Retinitis. Starke Befälle von Milz und Leber korrelieren dabei mit der Sterblichkeit. (Fitzgerald & Shellam, 1991)

3.1.3 Immunantwort gegen CMV

An der Immunantwort gegen HCMV ist sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunität beteiligt. Zusammen kontrollieren sie in immunkompetenten Individuen die Virusinfektion. Das angeborene Immunsystem stellt dabei die erste Stufe der Reaktion auf eine Virusinfektion da. Die Erkennung viraler Strukturen durch Toll-Like Rezeptoren (aus der Familie der *pattern-recognition receptors*) führt zur Stimulierung des NFκB Signalwegs, welcher seinerseits die Produktion inflammatorischer Zytokine und die Aktivierung Natürlicher Killer Zellen (NK-Zellen) auslöst. (Jackson et al., 2012; Crough et al., 2009) NK-Zellen zählen ebenfalls zur angeborenen Immunität und scheinen eine wichtige Funktion in der frühen Abwehr viraler Infektionen zu haben. Ein Defekt in ebendiesen Zellen kann mit schweren HCMV Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Jackson et al., 2012; Boeckh et al., 2011). Obwohl die Rolle humaner NK-Zellen in der Immunantwort gegen HCMV noch nicht ganz aufgeklärt ist, konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit dieser Zellen positive Effekte auf die Genesung von einer HCMV-Infektion hat. So konnte bei Transplantationspatienten, sowohl bei Primär- als auch bei wiederkehrenden Infektionen, eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität und dadurch eine erhöhte Überlebensrate beobachtet werden. (Crough et al., 2009)

Im murinen System sind NK-Zellen hauptsächlich für die Kontrolle der Ausbreitung in der frühen Phase der MCMV-Infektion in verschiedenen Organen verantwortlich. (Bukowski et al., 1984; Welsh et al., 1991; Tay & Welsh, 1997) Im Vergleich zu einigen Inzucht-Mausstämmen, wie z.B. C57BL/6-Mäuse, weisen MCMV-empfindliche Stämme, wie BALB/c, eine erhöhte Resistenz gegenüber einer MCMV-Infektion auf. (Allan & Shellam, 1984) Diese Anfälligkeit für eine Infektion mit MCMV hängt mit einer starken Ly49H-vermittelten NK-Zellantwort der jeweiligen Mausstämme zusammen. Hervorgehoben wird die Resistenz durch einen genetischen Unterschied in der *cmv-1*-Resistenzregion. Das dominante *cmv-1^r*-Allel kodiert in resistenten Mausstämmen für den aktivierenden Ly49H-NK-Zellrezeptor, welcher das m157-Genprodukt von MCMV auf der Oberfläche infizierter Zellen erkennt und folglich die Lyse der Zelle induziert. (Scalzo, 2002; Smith et al., 2002; Jackson et al., 2010; Crough et al., 2009)

Die Aktivierung der angeborenen Immunität spielt auch bei der Initiation des adaptiven Immunsystems eine entscheidende Rolle, da durch die angeborene Immunität rekrutierte NK-Zellen in der Lage sind, T-Zellen sowie Antigen-präsentierende-Zellen (APCs; *antigen presenting cells*) zu aktivieren. (Jackson et al., 2010)

Die adaptive Immunität resultiert aus zwei Teilen, einer humoralen und einer zellvermittelten (CD4+, CD8+, regulatorische T-Zellen ($\gamma\delta$ T-Zellen)) Immunantwort. (Arvin et al., 2007; Jackson et al., 2010) Die humorale Immunität ist gekennzeichnet durch die Produktion neutralisierender Antikörper durch B-Zellen. Diese Antikörper richten sich spezifisch gegen verschiedene virale Proteine und helfen dadurch die Ausbreitung von HCMV einzudämmen. Ziele sind zum Beispiel IE-1 oder Tegumentproteine, wie pp65 und pp150, aber auch Glykoproteine, wie gB und gH, die am Eintritt des Virus in die Wirtszelle beteiligt sind. (Crough et al., 2009; Jackson et al., 2010)

CD8+ cytotoxische T-Zellen (auch CTL, *CD8+ cytotoxic T lymphocytes*) der adaptiven zellvermittelten Immunität sind von maßgeblicher Bedeutung für die langfristige Kontrolle von CMV-Infektionen in immunkompetenten Individuen. Sie reagieren auf eine Vielzahl viraler Proteine wie zum Beispiel auf das HCMV-Tegumentprotein pp65 sowie auf Glykoproteine, wie gB und gH, und weitere Proteine, wie pp150, pp28, und pp50. (Sylwester et al., 2005) Ein Großteil seropositiver Personen zeigen eine deutliche CD8+ T-Zell-Antwort auf pp65 und das IE Protein. Bei Mäusen erkennen CTLs eine MCMV-Infektion vor allem über virale IE-Proteine, wie pp89. (Reddehase & Koszinowski, 1984; Koszinowski et al., 1987; Del Val et al., 1988)

In Studien an Knochenmarks-Transplantationspatienten konnte ein starker Zusammenhang zwischen der Wiederherstellung der CD8+ T-Zell-Population und dem Schutz vor

HCMV-Erkrankungen hergestellt werden. Das Fehlen einer CMV-spezifischen T-Zell-Antwort führte hingegen zur Ausprägung HCMV-spezifischer Erkrankungen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Patienten sowohl vor einer Primär- als auch einer reaktivierenden HCMV-Infektion durch die Gabe *ex vivo* expandierter Virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen geschützt werden können. (Crough et al., 2009; Jackson et al., 2010)

Viele der HCMV-spezifischen CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen exprimieren aktivierende oder inhibierende NK-Zell Rezeptoren und zeigen für gewöhnlich keine Expression des kostimulatorischen Moleküls CD28 mehr. (Jackson et al., 2010) Außerdem exprimieren sie die zytotoxischen Moleküle Granzym und Perforin. Polyfunktionale CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen sekretieren zudem verschiedene Zytokine wie TNF α , MIP1 β (*macrophage inflammatory protein 1 β* , auch CCL4) und IFN γ . Monofunktionale CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen hingegen zeigen lediglich eine Sekretion von IFN γ . Eine hohe Sekretion von IL-2 ist nicht vorzufinden, was möglicherweise mit dem Umstand zusammen hängt, dass die Sekretion von IL-2 mit der Expression von CD28 assoziiert ist. (Jackson et al., 2010)

Aber nicht nur CD8⁺ Virus-Spezifische T-Zellen spielen bei der Bekämpfung von HCMV eine wichtige Rolle, auch CD4⁺ T-Zellen sind maßgeblich an der zellulären Immunantwort beteiligt. So konnten mehrere Studien sowohl in Mäusen als auch Menschen zeigen, dass CD4⁺ T-Helfer-Zellen für eine effektive CD8⁺ T-Zellantwort notwendig sind. Der Erfolg von CD8⁺ Virus-spezifischen T-Zell-Infusionen war dabei abhängig von der Anwesenheit CD4⁺ T-Helfer-Zellen. (Jackson et al., 2010) Maßgeblich scheint hier eine kleine Subpopulation HCMV-spezifischer CD4⁺ T-Helfer-Zellen ohne Expression des kostimulatorischen Moleküls CD28 zu sein, welche IFN γ ausschüttet und die zytotoxischen Komponenten Perforin und Granzym B exprimiert. Normalerweise wird die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität meist mit CD8⁺ T-Zellen assoziiert, *in vitro* konnte jedoch gezeigt werden, dass CD4⁺ CD28⁻ T-Helfer-Zellen ebenfalls die Fähigkeit besitzen, aktiviert durch HCMV Antigene wie pp65, IE, gB und gH, eine MHC Klasse II beschränkte Zytotoxizität zu vermitteln. (Jackson et al., 2010)

Im Vergleich zu HCMV-seronegativen Personen ist der Anteil der CD4⁺ CD28⁻ T-Helfer-Zellen in seropositiven deutlich erhöht. Eine hohe Frequenz zirkulierender HCMV-spezifischer IFN- γ -sekretierender CD4⁺ T-Helfer Zellen ist außerdem mit einem verkürzten Krankheitsverlauf und abgeschwächten Symptomen verbunden (Jackson et al., 2010).

In mit MCMV infizierten Mäusen führte die selektive Depletion von CD4⁺ T-Zellen zu einem erhöhten Auftreten wiederkehrender MCMV-Infektionen. (Crough et al., 2009) Darüber hinaus konnte in einem Mausmodell, in welchem *in vivo* CD8⁺ T-Zellen durch Depletion oder genetische CD8-Deletion eliminiert wurden, gezeigt werden, dass die

restlichen Zellen trotzdem in der Lage waren die Infektion zu kontrollieren. (Jonjic et al., 1990; Crough et al., 2009)

Eine weitere an der Immunantwort gegen CMV beteiligte Zellpopulation sind $\gamma\delta$ -T-Zellen, die einen einzigartigen TCR, bestehend aus einer γ - und einer δ -Kette, exprimieren, etwa 4% aller CD3+ Zellen in humanem, peripherem Blut ausmachen und als MHC-unabhängig gelten. (Khairallah et al., 2017) Sie werden als Zellen beschrieben, die sich wie angeborene („*innate-like*“) Immunzellen mit adaptiven („*adaptive-like*“) Funktionen verhalten. So zeigen sie auf der einen Seite eine schnelle Gewebe-lokalisierte Antwort auf eine Vielzahl Stress-assoziiertes Stimuli, auf der anderen Seite weisen sie wiederum eine hohe Kapazität an TCR $\gamma\delta$ -Diversität auf. (Turchinovich et al., 2011) TRG-Varianten (TCR γ -Kette) gelten dabei als allgemein vorkommend, TRD (TCR δ -Kette) hingegen als individuelle Varianten. (Ravens et al., 2017)

Für MCMV konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen in teilweise immundefizienten Mäusen eine schützende, antivirale Funktion haben. CMV-induzierte $\gamma\delta$ -T-Zellen produzieren zum einen IFN γ sowie TNF α , die zusammen eine Inhibition der viralen Ausbreitung vermitteln können, zum anderen sind sie aber auch in der Lage infizierte Zellen effektiv zu töten. (Khairallah et al., 2017; Sell et al., 2015) Außerdem konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen sehr zeitig nach einer HSZT wieder vorhanden waren, sich jedoch in ihren Rezeptor-Varianten sowohl von den eigenen vorherigen als auch denen des Spenders unterscheiden, was auf eine *de novo* Synthese aus Spender-Stammzellen im Thymus des Patienten spricht. Bei Patienten, die nach der HSZT keine CMV-Reaktivierung entwickelten, zeigten sich die neu gebildeten allgemeinen $\gamma\delta$ -T-Zell-Varianten im Laufe der Zeit stabil. Patienten mit einer CMV-Reaktivierung bildeten hingegen individuelle $\gamma\delta$ -T-Zell-Varianten als Antwort auf diese aus. Dies bestätigt eine adaptive Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen als Reaktion auf virale Infektionen. (Ravens et al., 2017)

3.1.4 Immunevasionsmechanismen des CMV

Trotz der starken Immunantworten der angeborenen und adaptiven Immunität etabliert CMV in seinem Wirt eine lebenslange Latenz. Hierfür hat das Virus während der Koevolution mit seinem Wirt zahlreiche Evasionsstrategien entwickelt. Die Präsentationprozessierter viraler Peptide durch MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) der Klasse I und II an der Zelloberfläche infizierter oder Antigen-präsentierender Zellen (APC; *antigen presenting cell*) ist wesentlich um die

zelluläre Immunantwort des Wirts zu aktivieren. Sie ist daher ein Hauptziel der viralen Immunevasion. Durch Herabregulation und Modulation der Expression zellulärer MHC-Moleküle ist HCMV in der Lage infizierte Zellen vor der adaptiven Immunantwort des Wirts zu verbergen und sich zu schützen. Um der angeborenen Immunität zu entgehen, reguliert das Virus NK-Zell aktivierende Liganden herunter oder imitiert NK-Zell inhibierende Liganden. (Lucin et al., 2015)

Für die kanonische Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR, *t cell receptor*) auf CD8+ T-Zellen ist die Präsentation von Antigen-Peptiden auf MHC Klasse I Molekülen der Zielzelle erforderlich. Während der IE-Phase einer HCMV-Infektion wird vor allem der Transkriptionsfaktor IE-1 exprimiert; das virale Matrix-Protein pp65 ist jedoch in der Lage IE-1 zu phosphorylieren und dadurch selektiv dessen intrazelluläre Prozessierung und die MHC Klasse I-Präsentation auf der Zelloberfläche zu verhindern. (Crough et al., 2009) Zusätzlich kodiert das HCMV Genom für fünf Proteine, welche den Export oder die Generierung von MHC Klasse I- Peptid-Komplexen blockieren und eine schnelle Herabregulation der MHC Klasse I-Expression induzieren. Diese sind: US2, US3, US6, US10 und US11. (Crough et al., 2009; Halenius et al., 2015; Lucin et al., 2015) Die frühen Proteine US2 und US11 fördern den proteasomalen Abbau neu synthetisierter schwerer Ketten von MHC I-Molekülen. Das sehr frühe Protein US3 sowie US10 halten MHC Klasse I Peptid-Komplexe im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurück. US6 blockiert den Transport der Peptide ins ER. (Jackson et al., 2010; Reddehase 2002) Darüber hinaus werden kontinuierlich MHC Klasse I-Proteine, welche bereits mit viralen Peptiden beladen sind, in endosomale Vesikel endozytiert. (Lucin et al., 2015)

Im Fall von MCMV kennt man drei Genprodukte m04, m06 und m152, welche die Funktion von MHC-I negativ beeinflussen können. (Hengel et al., 1999)

Neben den Mechanismen zur Regulation von CD8+ T-Zell-stimulierenden MHC I-Peptid-Komplexen beeinflussen verschiedene virale Proteine auch MHC II-Moleküle, welche der Aktivierung CD4+ T-Zellen dienen. US2 fördert den proteasomalen Abbau von MHC II und US3 inhibiert durch Bindung an neu synthetisierte MHC-Ketten den Zusammenbau von MHC II-Peptid-Komplexen (Jackson et al., 2010; Hegde et al., 2002). Außerdem vermindert ein virales Homolog des Zytokins IL-10 (Interleukin 10, vIL10) die Expression von MHC Klasse I und II-Molekülen in infizierten Zellen und hemmt sowohl die Proliferation als auch die Zytokinproduktion von Immunzellen (Jackson et al., 2010).

Auch gegen die Immunabwehr des Wirts durch NK-Zellen hat HCMV diverse Strategien entwickelt. Die Aktivität von NK-Zellen wird durch eine Balance zwischen aktivierenden

und inhibierenden Signalen auf der Oberfläche infizierter Zellen reguliert. Ist diese gestört, erkennen NK-Zellen die veränderten Signale, wie z.B. eine verminderte MHC-I Expression, und schützen den Wirt durch die Sekretion von IFN γ oder die direkte Lyse der infizierten Zelle. Um dem zu entgehen, supprimiert HCMV aktivierende Signale und erhöht die Expression inhibierender Signale, was dem Virus ermöglicht, die Aktivierung von NK-Zellen effektiv zu kontrollieren. (Lucin et al., 2015) Hierfür nutzt HCMV zum einen den HLA-E Signalweg des Wirts. Die Bindung des viralen Proteins UL40 an HLA-E stimuliert dessen Expression auf der Oberfläche infizierter Zellen und führt über die Bindung des inhibierenden Rezeptors CD94/KKG2 zu einer Suppression der Aktivierung von NK-Zellen. (Jackson et al., 2010; Crough et al., 2009) Zum anderen exprimiert HCMV das Protein UL18, ein virales Homolog von MHC Klasse I. UL18 bindet den inhibierenden NK-Zell-Rezeptor LILRB1 (LIR-1) an der Zelloberfläche mit einer höheren Affinität als MHC-I und inhibiert dadurch die Aktivierung der NK-Zellen. (Jackson et al., 2010)

Nicht nur die Aktivierung inhibierender Rezeptoren wird von HCMV beeinflusst, auch die Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren wird verändert. So zum Beispiel auch der aktivierende NK-Zellrezeptor NKG2D (*natural-killer group 2'* Untergruppe D). Dieser bindet sowohl Liganden wie *MHC-class I polypeptide-related chain* (MIC) A und B als auch die Mitglieder der UL16-bindenden Proteine (ULBP1-6). Während der Infektion bindet das virale UL16 die Liganden MICB, ULBP1, -2 und -6 und hält diese dadurch im Trans-Golgi-Netzwerk oder ER zurück. Die virale miRNA miR-UL112 verstärkt zusätzlich den Abbau von MICB. Die Expression von MICA und ULBP3 werden durch das virale Protein UL142 reduziert. (Jackson et al., 2010)

In der Maus reguliert das MCMV Glykoprotein gp40 (Genprodukt von m152) spezifische NK-Zell-Liganden auf infizierten Zellen herunter, welche an den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D binden würden. (Krmptotic et al., 2002)

3.2 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation

Mehr als 50 Jahre nach Entdeckung der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) bleibt diese eine der wichtigsten und effektivsten Therapien im Kampf gegen Tumorerkrankungen wie Leukämien, Lymphome und Myelome, und gegen Immundefizienzen, Autoimmunerkrankungen, Anämien und Hämoglobinopathien. (Copelan 2006; Jenq et al., 2010) Hierbei wird das (veränderte) hämatopoetische System eines Patienten durch eine Infusion neuer hämatopoetischer Stammzellen ersetzt bzw. wieder hergestellt. (Jenq et al., 2010) Stammzellen sind undifferenzierte, pluripotente Zellen, die zu allen verschiedenen Zellarten des blutbildenden Systems differenzieren können. Sie besitzen die Eigenschaft einer unlimitierten Selbsterneuerung, was die kontinuierliche Bildung neuer Blutzellen und dadurch auch die Wiederherstellung des Immunsystems eines Patienten ermöglicht. (Copelan 2006) Stammzellen können aus Knochenmark, Nabelschnurblut und, nach Behandlung des Spenders mit dem *granulocyte-colony stimulating factor* (GCSF) zur Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark, auch aus peripherem Blut gewonnen werden. (Jenq et al., 2010)

Bei der HSZT werden grundsätzlich zwei Verfahren unterschieden. Bei der autologen Transplantation werden Zellen verabreicht, die zuvor aus dem Patienten selbst gewonnen wurden, während bei der allogenen Transplantation Zellen eines fremden Spenders infundiert werden. (Copelan 2006; Jenq et al., 2010) Allogene Transplantate besitzen bei Tumorerkrankungen den Vorteil, dass sich Spenderzellen gegen im Körper des Empfängers verbliebene Tumorzellen richten können (Graft-versus-Leukemia), was das Risiko von Tumorrezidiven, im Vergleich zur autologen Transplantation, verringert. Da im Falle einer allogenen Transplantation die verabreichten Zellen patientenfremdes Material sind, besteht die Gefahr einer Abstoßungsreaktion, welche als ‚*Graft-versus-Host-disease*‘ (GVHD) bezeichnet wird. Die Immunzellen erkennen den Körper des Empfängers als fremd und greifen diesen an. Um das Risiko einer GVHD zu minimieren, werden kompatible Stammzellspender mit dem gleichen humanen Leukozytenantigen-Typ (HLA-Typ) wie der Empfänger ausgesucht. (Copelan 2006; Jenq et al., 2010)

Der Wiederaufbau des Immunsystems nach einer HSZT erfolgt nach und nach und dauert insgesamt etwa 12-18 Monate. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Rekonstitution des Immunsystems sind dabei stark von der Art der Transplantation abhängig und dauert bei Empfängern allogener Stammzellen in der Regel länger als bei Patienten, die eine autologe Transplantation erhielten. Auch die Quelle der Spender-Stammzellen sowie das Maß der HLA-Kompatibilität spielen dabei eine entscheidende Rolle. (Socie et al., 2014)

3.2.1 Virusinfektionen nach Stammzelltransplantationen

Nicht nur eine GVHD kann nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen, gefürchtet als Auslöser schwerer Komplikationen sind auch verschiedene Arten von Infektionen, wie Bakterien- oder Pilzinfektionen, vor allem aber Virusinfektionen. (Boeckh et al., 2011) Bakterielle Infektionen können mit Antibiotika behandelt werden und ihre Häufigkeit nimmt in der Regel mit Wiedererreichen einer normalen Anzahl an neutrophilen Granulozyten, ca. ein Monat nach Transplantation, wieder ab. (Moss et al., 2005) Während die meisten bakteriellen Infektionen noch vor Ausbildung des neuen Immunsystems (*pre-engraftment* Phase) auftreten, können Virusinfektionen in jeder Phase bis hin zu späten Zeitpunkten nach der Transplantation auftreten. (Kedia et al., 2013) Bei viralen Infektionen unterscheidet man zwischen zwei Gruppen von Pathogenen: persistierende und nicht-persistierende Viren. Zu den persistierenden Viren zählen Herpesviren wie das Herpes Simplex Virus, das Varizella-Zoster Virus und das Cytomegalovirus, wobei es sowohl zu Reaktivierungen als auch zu Neu- und Superinfektionen kommen. Zu den nicht-persistenten Viren zählen unter anderem Adenoviren, Influenza, Parainfluenza oder auch das Respiratorische-Synzytial-Virus. (Moss et al., 2005; Kedia et al., 2013)

Ein Hauptgrund für die Reaktivierung persistierender Viren und die erhöhte Anfälligkeit für Virusinfektionen ist das Fehlen einer antiviralen T-Zellimmunität in den ersten Monaten nach einer HSZT. (Moss et al., 2005) Insbesondere HCMV-Infektionen sind noch immer die häufigste Ursache für eine erhöhte Posttransplantations-Mortalität. Innerhalb von drei Monaten nach einer allogenen Stammzelltransplantation entwickelten bis zu 25% der CMV-positiven Patienten CMV-assoziierte Erkrankungen. (Jenq et al., 2010) Auch das Risiko zur Entwicklung einer GVHD und für Infektionen mit weiteren Pathogenen ist durch eine Infektion mit HCMV erhöht. (Moss et al., 2005) Ein entscheidender Risikofaktor für die Entwicklung einer HCMV-Erkrankung nach Transplantationen ist der Serostatus sowohl des Spenders als auch des Empfängers. In ca. 80% der vor Transplantation seropositiven Patienten kommt es zu einer Reaktivierung von HCMV. Auch seronegative Patienten, die Stammzellen eines seropositiven Spenders erhalten, haben ein stark erhöhtes Risiko an CMV zu erkranken. Primärinfektionen in seronegativen Patienten treten in etwa 30% dieser Fälle auf. (Boeckh et al., 2011; Crough et al., 2009) Als weitere Risikofaktoren für Virusinfektionen werden die Entwicklung einer akuten oder chronischen GVHD, der Einsatz hochdosierter Corticosteroide zur Immunsuppression, die Verwendung von Stammzellen nicht-verwandter oder nicht-HLA-angepasster Spender als auch die Quelle der Stammzellen gesehen. (Boeckh et al., 2011; Crough et al., 2009)

3.2.2 Behandlung von HCMV-Infektionen nach allogener HSZT

Aufgrund der durch virale Infektionen verursachten schweren Komplikationen ist es von großer Notwendigkeit nicht nur zuverlässige diagnostische Methoden zu haben, sondern auch auf effektive und sichere Behandlungsmöglichkeiten zurückgreifen zu können. Hierbei stellt der Einsatz antiviraler Medikamente eine mögliche Behandlungsstrategie bei der Reaktivierung von HCMV dar. Ganciclovir und sein Derivat Valganciclovir sind dabei die am häufigsten eingesetzten Mittel der Wahl und können auch bereits prophylaktisch gegeben werden. Aufgrund der Nebenwirkungen der beiden Medikamente werden diese jedoch meist nur verabreicht, wenn das Virus im Blut der Patienten nachgewiesen werden kann. (Rogers, 2015) Beide Medikamente sind eine inaktive Form (*Pro-drug*) und werden erst durch die Phosphorylierung der viralen Kinase UL97 aktiviert, um dann die virale DNA-Replikation inhibieren zu können. Auch andere Virostatika, wie Cidofovir und Foscarnet, inhibieren die Aktivität der viralen DNA-Polymerase, sind jedoch weniger spezifisch und nebenwirkungsreicher. Cidofovir wird dabei durch Phosphorylierungen zellulärer Kinasen aktiviert, wohingegen Foscarnet bereits in aktiver Form verabreicht wird. (Boeckh et al., 2011; Lurain et al., 2010) Insgesamt werden diese Therapieansätze jedoch durch starke Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Hämatotoxizität und Knochenmarks-Toxizität limitiert. Außerdem besteht bei längerer Gabe der Medikamente die Gefahr einer Resistenzbildung durch Mutationen viraler Gene. Diese betreffen vor allem die virale Kinase UL97 und die virale DNA-Polymerase UL54. (Boeckh et al., 2011; Lurain et al., 2010) Speziell die Knochenmarks-Toxizität von Ganciclovir und Valganciclovir ist bei HSZT-Patienten ein großes Problem, da die transplantierten Stammzellen dadurch geschädigt werden und vermindert neue Blutzellen bilden können. (Rogers, 2015) Die Inzidenz von HCMV-Infektionen in den ersten drei Monaten nach einer allogenen Stammzelltransplantation konnte durch den Einsatz antiviraler Medikamente jedoch trotzdem von 25-30% auf 5% gesenkt werden. (Boeckh et al., 2011)

Ein 2017 durch die FDA zur Prophylaxe zugelassenes neues antivirales Medikament stellt Letermovir (Prevymis[®]) dar, welches spezifisch gegen HCMV wirkt und keine Aktivität gegenüber anderen Herpesviren aufweist. Es inhibiert die pUL56 Untereinheit des viralen Terminase-Komplexes und verhindert dadurch die Spaltung der konkatameren Virus-DNA in monomere DNA-Segmente, welche anschließend in die Kapside verpackt werden. Aufgrund seiner strikten Spezifität zeigt Letermovir keine zelluläre Toxizität und ist darüber hinaus mit wesentlich mildereren Nebenwirkungen verbunden. (Vergheese et al., 2013; Melendez et al., 2015)

3.3 Adoptive T-Zell-Therapie

3.3.1 Adoptive Immuntherapie mit virusspezifischen T-Zellen

Die Gabe virusspezifischer T-Zellen zur Wiederherstellung der zellulären Immunität ist ein aufwendiges aber vielversprechendes alternatives Therapiekonzept zur Behandlung von HCMV-Infektionen. (Peggs et al., 2003; Crough et al., 2009) Die Gruppe von Riddel und Greenberg konnte als Erste zeigen, dass eine Infusion von *ex vivo* expandierten HCMV-spezifischen CD8+ zytotoxischen T-Zellen zur Wiederherstellung der zellulären antiviralen Immunität in immunsupprimierten HSZT-Patienten führen kann. (Walter et al., 1995) Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass für die Aufrechterhaltung einer zellulären Immunität gegen HCMV die Anwesenheit von CD4+ T-Zellen erforderlich ist. (Walter et al., 1995) Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Einsele et al. in einer Studie, in welcher nach einer HSZT an einer HCMV-Infektion erkrankten Patienten, bei welchen die Therapie durch Ganciclovir fehlschlug, virusspezifische CD4+ T-Zellen verabreicht wurden. Gleichzeitig konnte dabei gezeigt werden, dass die Genesung von der HCMV-Infektion und die Reduktion der Viruslast stark von der effizienten Expansion von CD4+ und CD8+ T-Zellen abhängig war. (Einsele et al., 2002)

Weitere Studien zum adoptiven T-Zell-Transfer bei HCMV-Infektionen konnten zeigen, dass es durch Gabe polyklonaler Virus-spezifischer zytotoxischer T-Zellen möglich ist das Immunsystem des Patienten wiederherzustellen. Bei der Hälfte der behandelten Patienten war hierbei keine weitere Behandlung mit antiviralen Medikamenten mehr nötig. (Peggs et al., 2003) Darüber hinaus wurde die Behandlungsstrategie auch in einem Maus-Model bestätigt. Die Infusion CMV-spezifischer CD8+ T-Zellen in mit dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) infizierten Mäusen führte nicht nur zur Hemmung der Virusausbreitung und einer geringeren Mortalitätsrate, sondern es konnte auch eine Bekämpfung infizierten Gewebes durch die zytotoxischen T-Zellen beobachtet werden. (Holtappels et al., 2008)

Obwohl durch den adoptiven T-Zell-Transfer vielversprechende Ergebnisse erzielt werden konnten, birgt diese Art der Therapie nach wie vor einige Probleme in Bezug auf Produktion und Sicherheit. Zum einen muss der Produktionsprozess der Zellen in Einrichtungen erfolgen, welche den GMP (*good manufacturing practice*) Standards entsprechen. Diese sind sowohl im Aufbau als auch im Unterhalt sehr kostenintensiv und es wird geschultes Personal, welches regelmäßig neu trainiert werden muss, zur Durchführung der Expansions-Protokolle benötigt. (Leen et al., 2014) Zum anderen ist der Prozess an sich sehr zeitaufwendig. Von der Isolation der Zellen, über deren Aktivierung, bis hin zur *in vitro* Expansion können bis zu 12 Wochen vergehen. Im Anschluss

wird weitere Zeit zur Prüfung und Qualitätskontrolle des generierten Produktes benötigt. (Leen et al., 2014; Leen et al., 2008) Diese Produktionszeit kann durch die Verwendung sogenannter Peptid-HLA-Multimere zur Anreicherung von virusspezifischen T-Zellen verkürzt werden. Diese Peptid-HLA-Multimere sind MHC-Peptid-Komplexe die eine direkte Selektion der T-Zellen durch die Bindung an TCRs von virusspezifischen T-Zellen ermöglichen. (Leen et al., 2014; Leen et al., 2008) Eine weitere Möglichkeit der Gewinnung HCMV-spezifischer T-Zellen ist die Verwendung eines IFN- γ -Sekretionsassays. Dieser ermöglicht durch IFN- γ -spezifische Antikörperkomplexe die Isolierung IFN- γ -sezernierender HCMV-spezifischer T-Zellen nach einer Stimulation mit Antigenen. (Leen et al., 2014; Leen et al., 2008; Rauser et al., 2004) Die Anwendung dieser verbesserten Methoden benötigt jedoch eine ausreichend hohe Menge an HCMV-spezifischen T-Zellen im Spender, was die Expansion der virusspezifischen Immunzellen nur mit entsprechenden seropositiven Spendern möglich macht. (Leen et al., 2014; Leen et al., 2008)

3.3.2 Adoptive Immuntherapie mit CAR-modifizierten T-Zellen

Im Fall eines seronegativen Spenders scheitert dieser Ansatz aufgrund der sehr geringen Anzahl an Virus-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen, deren Anreicherung extrem zeit-, arbeits- und kostenintensiv wäre. (Leen et al., 2008). Somit wird für HCMV-seropositive HSZT-Patienten, die ein Transplantat von einem seronegativen Spender erhalten, ein alternativer Ansatz benötigt.

Eine alternative Behandlungsstrategie wäre der Einsatz polyklonal expandierter T-Zellen die über Gentransfer mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR) ausgestattet wurden. CARs sind modifizierte Rezeptoren mit einer intrazellulären Signaldomäne (CD3 ζ), einer Transmembrandomäne und einer extrazellulären Antigen-Bindestelle, die gegen ein natives Oberflächenmolekül auf der Zielzelle gerichtet ist. (Van der Stegen et al., 2015) Die Antigen-Bindestelle stammt entweder direkt von einem zellulären Rezeptor oder von einem monoklonalen Antikörper, dessen variable schwere und leichte Kette über einen kurzen Linker zu einem Einzelketten-Antikörper (*single chain fragment variable*, scFv) verbunden sind. Dadurch sind CARs im Vergleich zu T-Zell-Rezeptoren (TCRs) unabhängig von der intrazellulären Antigenprozessierung und der MHC-Antigen Präsentation. (Maus et al., 2014; Hudecek et al., 2013)

Seit der ersten Beschreibung eines CARs sind verschiedene CAR-Konstrukt-Varianten entstanden. Die erste Generation von CARs nutzte lediglich ein intrazelluläres Signal wie CD3 ζ oder CD28 (Abb. 3 A und B). Die zweite CAR-Generation enthielt dann bereits

zusätzlich die intrazelluläre Signaldomäne eines co-stimulatorischen Rezeptors wie CD28 (Abb. 3 C) oder CD137. Dies führt zu einer verstärkten Signaltransduktion und IL-2 Sekretion und folglich zur T-Zell-Aktivierung und Expansion. (Van der Stegen et al., 2015; Sadelain et al., 2013)

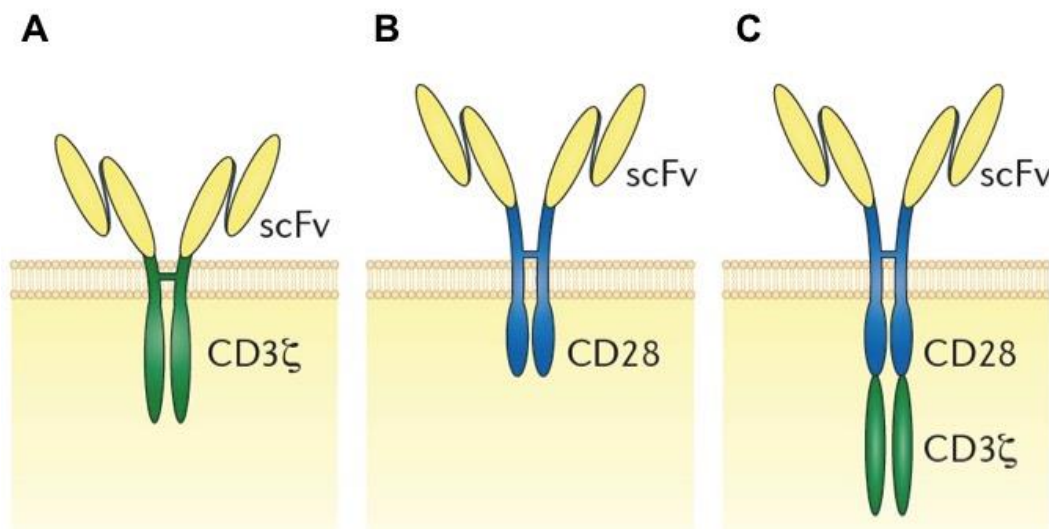


Abb. 3: Evolution der Chimären Antigenrezeptoren.

(A) Erste Generation der chimären Antigenrezeptoren (CAR), die durch Einbringung eines *single-chain variable fragment* (scFv), gekoppelt an CD3 ζ , in der Lage sind Antigene zu erkennen. (B) Chimärer co-stimulatorischer Rezeptor, der die scFv-Domäne, zur Induktion einer antigen-spezifischen Co-Stimulation, an die intrazelluläre Domäne von CD28 koppelt. (C) Zweite Generation der chimären Antigenrezeptoren, die durch die Einbringung einer co-stimulatorischen Signaldomäne in Kombination mit der CD3 ζ -Kette das Umprogrammieren von T-Zellen ermöglichen. (aus Van der Stegen et al., 2015)

Über die letzten Jahre hinweg entstanden viele spezifische CARs für verschiedene Zielantigene. Die bisher vielversprechendsten Ergebnisse erhielt man mit einem CD19-spezifischen CAR, welcher gegen bösartige B-Zell-Erkrankungen gerichtet ist. CD19 wird in den meisten B-Zell-Leukämien und -Lymphomen, jedoch nicht auf gesunden Zellen exprimiert und ist somit ein optimales Zielantigen für CARs. (Sadelain et al., 2013) In klinischen Studien konnte eine Eliminierung der B-Zell-Tumore in bis zu 90% der mit dem CD19-CAR behandelten Patienten gezeigt werden. (Davila et al., 2012)

Die meisten der bisher entwickelten CARs sind vorwiegend gegen Tumorantigene gerichtet, nicht aber gegen virale Proteine. Die ersten virusspezifischen CARs richteten sich gegen das Hüllprotein gp120 des humanen Immundefizienzvirus (HIV) (Masiero et al., 2005) und gegen Oberflächenproteine des Hepatitis B Virus (HBV) (Bohne et al., 2008). Beide zeigten *in vitro* spezifische Effektorfunktionen.

In Kooperation mit der Gruppe von Wolfgang Holter entwickelte unsere Arbeitsgruppe einen CAR der gegen das Glykoprotein B von HCMV gerichtet ist. (Full et al., 2010) Da

das virale gB im Laufe der Virusreplikation an der Oberfläche der infizierten Zellen prozessiert werden muss, stellt es ein ideales Zielantigen da. Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen welche diesen gB-spezifischen CAR exprimierten nach Co-Inkubation mit HCMV-infizierten Fibroblasten inflammatorische Zytokine ausschütteten. (Full et al., 2010)

Dieser Rezeptor der zweiten Generation besitzt die intrazellulären Signaltransduktionsdomänen aus CD28 und CD3 ζ . Außerdem enthält der CAR zur Stabilisierung des Rezeptors zwischen scFv und der Signaltransduktionsdomäne das Fc-Fragment von IgG1. Die extrazelluläre Domäne ist spezifisch für das virale gB und wurde abgeleitet von dem scFv des monoklonalen murinen Antikörpers gB 27-287, gerichtet gegen die AD1 von gB. (Abb. gB-CAR) (Full et al., 2010)

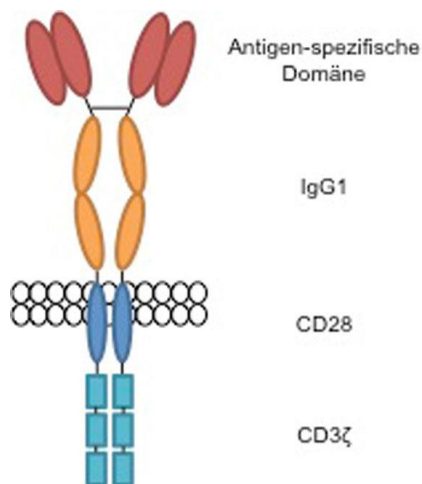


Abb. 4: Schematische Darstellung des gB-spezifischen CARs.

Chimärer Antigenrezeptor mit einer spezifischen extrazellulären Bindedomäne für das virale Protein gB aus HCMV sowie einer IgG1-Domäne zur Stabilisation und einem intrazellulären Teil aus CD28 und CD3 ζ .

3.4 BiTE[®]-Moleküle - Bispezifische Antikörper

Die Idee bispezifischer Antikörper wurde bereits vor mehr als 20 Jahren begründet. Die Gruppe von Staerz et al. entwickelte einen sogenannten Hybrid-Antikörper der aussah wie normales Immunglobulin G (IgG), jedoch zwei Arme mit unterschiedlichen Bindeeigenschaften enthielt. Sie konnten zum ersten Mal zeigen, dass Antikörper, die zwei verschiedene Zielantigene besitzen, zytotoxische T-Zellen zum Zweck der Lyse der Zielzellen in engen Kontakt mit Tumorzellen bringen können. (Staerz et al, 1985)

Das Konzept wurde über die Zeit weiterentwickelt und es entstanden immer mehr bispezifische Antikörper für viele unterschiedliche Zielantigene. Die Firma Micromet (heute ein Teil von Amgen) entwickelte und patentierte die sogenannte *Bispecific T cell engager* (BiTE[®]) Technologie. Die Idee hinter diesen BiTE[®] Molekülen ist die Reduktion der Antikörper auf ihre minimale Bindekapazität. Auf Basis dieses Verfahrens wurde auch ein HCMV-gB-spezifischer BiTE[®] produziert.

Diese bispezifischen Antikörper bestehen aus zwei variablen Einzelketten-Antikörpern (*single chain variable fragments*; scFVs). Beide Teile stammen aus verschiedenen Genen und ermöglichen dadurch die Bispezifität des Antikörpers für zwei unterschiedliche Zielantigene. Die scFVs sind Fusionsproteine aus den variablen Regionen der schweren und leichten Kette eines Antikörpers, ohne dadurch die jeweilige Antigen-Spezifität des natürlichen Antigen-bindenden Fragments (Fab) zu verlieren. Die beiden scFv sind dabei durch eine eingefügte Linker-Sequenz von ca. fünf Aminosäuren verbunden, wodurch eine einzelne Polypeptidkette von rund 55 kDa entsteht (Abb. 5). (Baeuerle et al., 2009; Suryadevara et al., 2015)

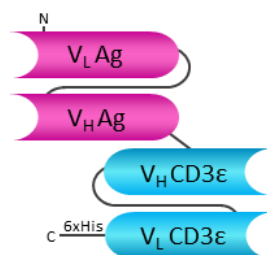


Abb. 5: Schematische Darstellung eines BiTE[®].

Schematischer Aufbau eines *bispecific T cell engager* (BiTE[®]) Moleküls, bestehend aus zwei unterschiedlichen scFVs, verbunden durch eine kurze Linker-Sequenz.

Die Effektivität der BiTE[®] Moleküle wurde anhand verschiedener Zielantigene, wie z.B. CD33 (AML, akute myeloische Leukämie) (Aigner et al., 2013; Laszio et al., 2014), EpCAM (Eierstockkrebs, solide Tumore) (English et al., 2015; Spiess et al. 2015), CEA (Magenkarzinom) (Spiess et al. 2015), PSMA (Prostatakrebs) (Spiess et al. 2015) und einige weitere, gezeigt. (Spiess et al. 2015) Verglichen mit anderen immuntherapeutischen Methoden haben BiTE[®] Moleküle einige Vorteile wie z.B. eine Unabhängigkeit von der MHC-Antigen-Präsentation. Außerdem sind sie in der Lage T-Zellen nicht nur

polyklonal zu rekrutieren und aktivieren, sondern auch T-Zellen aus der nahen Tumorumgebung zu reaktivieren. Weiterhin haben sie aufgrund ihrer geringen Größe die Möglichkeit weit in Gewebe einzudringen und dort lokale tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) zu aktivieren. Infolge der geringen Größe besitzen BiTE[®] Moleküle nur eine kurze Halbwertszeit, was jedoch im Hinblick auf das Risiko von Nebenwirkungen auch von Vorteil sein kann. Diese sind im Vergleich zu CARs wesentlich besser steuerbar. (Suryadevara et al., 2015)

Der erste durch die FDA zugelassene BiTE[®] war Blinatumomab (Blinicyto[®]). Er wird in der Therapie gegen Vorläufer-B-Zell akute lymphatische Leukämie (ALL) eingesetzt und ist gegen CD19 auf Tumor-B-Zellen gerichtet. Dieser BiTE[®] galt, ebenso wie sein CAR-Vorgänger, als wesentlicher Durchbruch. In der ersten klinischen Phase II Studie wurden 185 Patienten mit Blinatumomab behandelt, wovon 41,6% nach zwei Behandlungszyklen eine vollständige Remission erreichten. 81% der behandelten Patienten reagierten bereits nach dem ersten Behandlungszyklus auf den BiTE[®]. (Spiess et al., 2015; Sanford 2015; Garber 2014)

Aktuell werden BiTE[®] Moleküle für verschiedene Bereiche wie die Onkologie, Autoimmunerkrankungen oder chronische Entzündungen erforscht. (Spiess et al., 2015)

Zur Entwicklung einer neuen bispezifischen Antikörper-Therapie zur Bekämpfung von HCMV-Reaktivierungen in Patienten nach einer Stammzelltransplantation wurde zusammen mit Amgen ein HCMV-gB-spezifischer-BiTE[®] konstruiert der das virale Glykoprotein B als Zielantigen erkennt. Die Funktionalität dieses gB- BiTE[®] konnte bereits in ersten Versuchen *in vitro* nachgewiesen werden. (Brey et al., 2018) Unter Zugabe des BiTE[®] sezernierten T-Zellen in Co-Kultur mit HCMV-infizierten Fibroblasten Zytokine wie IFN γ und TNF. Die Menge an ausgeschüttetem Zytokin war dabei mit der von gB-CAR-exprimierenden T-Zellen vergleichbar. Darüber hinaus konnten die Zytokin-enthaltenden Überstände dieser Co-Kulturen die Ausbreitung von HCMV *in vitro* hemmen. Ähnlich dem gB-CAR wurde in einem Modellsystem mit HCMV-gB-exprimierenden uninfizierten Zielzellen durch die Zugabe des gB-BiTE[®] zusammen mit Effektor-T-Zellen eine Lyse der Zielzellen ausgelöst. Eine Lyse HCMV-infizierter Zellen konnte jedoch ebenso nicht beobachtet werden. (Brey et al., 2018)

3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die weitere Austestung einer neu entwickelten, auf bispezifischen Antikörpern basierenden Therapie von HCMV-Reaktivierungen in Patienten nach Stammzelltransplantationen. Die Funktionalität des in Kooperation mit Amgen entwickelten HCMV-spezifischen gB-BiTE[®] wurde zum ersten Mal zusammen mit unseren Kooperationspartnern (Brey et al., 2018) *in vitro* mit HCMV-infizierten Zellen gezeigt.

Für die spätere Anwendung des gB-BiTE[®] *in vivo* in einem Mausmodell wurde die Funktionalität einer murinen Variante des gB-BiTE[®] untersucht.

Hierfür wurde zunächst eine optimale Multiplizität der Infektion für alle folgenden Versuche ermittelt. Die Infektionen erfolgten dabei entweder mit MCMV Wt oder einem MCMV, welches zusätzlich das gB des HCMV auf der Oberfläche exprimiert.

Als nächstes wurde die optimale Arbeitskonzentration des gB-BiTE[®] zur effektiven Aktivierung von T-Zellen durch dessen Titration in Co-Kulturen mit aktivierten murinen T-Zellen und infizierten Murinen Embryonalen Fibroblasten (MEF) bestimmt.

Um zu ermitteln ob der murine gB-BiTE[®] die Fähigkeit besitzt die Ausbreitung von MCMV *in vitro* zu inhibieren ist im weiteren Verlauf ein Verfahren entwickelt worden, welches die Funktionalität der murinen Variante des gB-BiTE[®] in Co-Kulturen von infizierten MEFs mit murinen T-Zellen untersucht. Die Ausbreitung der viralen Infektion konnte in allen Versuchen durch das in MCMV integrierte Luziferase-Gen gemessen werden. Außerdem wurde die Ausschüttung von Zytokinen durch die T-Zellen bestimmt. Des Weiteren sollte die Fähigkeit des gB-BiTE[®] zur Vermittlung der Lyse infizierter Zellen durch die T-Zellen anhand eines Europium-Release-Assays zur Quantifizierung der Zielzell-Lyse untersucht werden. Verglichen wurden MCMV Wt bzw. gB-EpCAM infizierte MEFs dabei mit gB-EpCAM transduzierten 293T-Zellen. Auch hier wurde die Konzentration verschiedener Zytokine bestimmt. Zur Bestätigung der Ergebnisse erfolgten alle Versuche auch mit humanen T-Zellen und dem entsprechenden humanen gB-BiTE[®].

Da die Halbwertszeit dieser BiTE[®] Moleküle relativ niedrig ist, wurden in Zusammenarbeit mit Amgen sowohl ein muriner als auch ein humaner gB-BiTE[®] mit einer verlängerten Halbwertszeit entwickelt. Für die künftigen *in vivo* Versuche im Mausmodell reduziert dies die Applikationshäufigkeit der BiTE[®] Moleküle. Die Funktionalität dieser Halbwertszeit-verlängerten gB-BiTE[®] Moleküle (gB-BiTE[®] HWZv) wurde analog zu seinen Vorgängern wie oben beschrieben untersucht.

Um herauszufinden ob die Wirkung des murinen gB-BiTE[®] nur auf die Stimulation der Ausschüttung von Zytokinen durch die T-Zellen zurückzuführen ist, wurden MEF-Zellen gleichzeitig mit MCMV Wt und MCMV gB-EpCAM infiziert und mit murinen T-Zellen und

dem murinen oder, zur Kontrolle, dem humanen gB-BiTE[®] co-kultiviert und die Anzahl an jeweiligen viralen Genomen im Ansatz anhand einer quantitativen Real-Time PCR bestimmt. Als letztes wurde die Auswirkung verschiedener Zytokine auf die Ausbreitung der MCMV-Infektion analysiert.

Zusammengenommen erweisen die Ergebnisse dieser Arbeit die Funktionalität des murinen gB-BiTE[®] *in vitro* im murinen System und bilden die Grundlage für den Aufbau des *in vivo* Mausmodells. Dieses soll in der Zukunft zeigen, ob ein HCMV gB-spezifischer BiTE[®] ein Arzneimittel-Kandidat für weitere präklinische Studien sein könnte.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Reagenzien und Lösungen

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma/ARK, Deisenhofen
Chloramphenicol	Sigma/ARK, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Deoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	GenScript, Piscataway, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma/ARK, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Fluka, Buchs, Schweiz
Fötale Kälberserum Serum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gentamycin	Sigma/ARK, Deisenhofen
Glutamin	Sigma/ARK, Deisenhofen
Glycerol	Sigma/ARK, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma/ARK, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma/ARK, Deisenhofen
L-Arabinose	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Phenol	AppliChem, Darmstadt
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma/ARK, Deisenhofen
ROX (6-Carboxy-X-rhodamin)	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roche Diagnostik, Mannheim
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Merck und Serva bezogen.

4.1.2 Puffer und Lösungen

DNA-Auftragspuffer für Agarosegele, 10x	30% Glycerol; 0,25% Bromphenolblau; 0,25%Xylencyanol
Tris Buffered Saline (TBE), 10x	890mM Tris-HCl (pH 8,0); 890mM Borsäure; 0,5mM EDTA
Puffer P1	50mM Glukose; 25mM Tris/HCl pH 8; 10mM EDTA; 100 µg/ml RNase
Puffer P2	0,2M NaOH; 1% SDS
Puffer P3	3M Kaliumacetat, mit Eisessig auf pH 5,5 eingestellt.

Alle weiteren Puffer und Lösungen werden bei den verschiedenen, spezifischen Methoden beschrieben.

Größenmarker für die Gelelektrophorese

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
MidRange II PFG Marker	New England Biolabs, Ipswich, MA USA

4.1.3 Biologisches Material

Prokaryotische Zellen

Escherichia.coli (E.coli) GS1783: abgeleitet von *E.coli* Stamm EL250 mit *araC-P_{BAD}/-Sce* (EL250 = DY380 + *araC-P_{BAD}flpe*; DY380 = DH10B + [λ c857 (*cro-bioA*)]^b) (Lee et al., 2001).

Eukaryotische Zellen und humane Zelllinien

MEF (C57BL/6)	Primäre murine embryonale Fibroblasten (<i>mouse embryo-</i>
---------------	---

	<i>nic fibroblasts</i>), aus dem Mausstamm C57BL/6, bezogen von ATCC.
HEK 293T	Humane embryonale Nierenepithelzelllinie (HEK, <i>human embryonic kidney</i>), transformiert durch Adenovirus Typ 5 (Ad5) mit stabil im Genom integriertem SV40 (simian virus 40) T-Antigen (Dubridge et al., 1987; Pear et al., 1993).
27-287	Murine immortalisierte B-Zell Hybridom Zelllinie, welche monoklonale Antikörper gegen HCMV gB produziert (Britt, 1984; Britt et al, 1986); erhalten von Michael Mach, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen.
Croma101	Murine immortalisierte B-Zell Hybridom Zelllinie, welche monoklonale Antikörper gegen MCMV IE1 produziert; bezogen von Michael Mach, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen.
PBMC/ humane T-Zellen	Periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>), isoliert aus humanem Spenderblut.
MMC/ murine T-Zellen	Murine mononukleäre Zellen (<i>murine mononuclear cells</i>), isoliert aus Milzen von C57BL/6 Mäusen.

Virusstämme

MCMV Δ m157luc (MCMV Wt)	Rekombinantes Murines Cytomegalovirus; abgeleitet aus dem Wildtyp Stamm Smith; exprimiert anstelle von m157 das Luziferasegen des Glühwürmchen unter dem humanen <i>major immediate early promotor</i> (MIEP); erhalten von Prof. Dr. M. Messerle (Abteilung Virologie, Medizinische Hochschule Hannover; Klenovsek et al., 2007).
MCMV Δ m157luc gB-EpCAM	Rekombinantes Murines Cytomegalovirus; abgeleitet aus von MCMV Δ m157luc (MCMV Wt); expri-

miert zusätzlich das Glykoprotein B des HCMV zusammen mit der EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*, Epitheliales Zelladhäsionsmolekül, CD324) Transmembrandomäne unter einem IE-Promotor.

MCMV FSH Δ m138

Rekombinantes Murines Cytomegalovirus mit einer Deletion des m138/fcr-1 (Δ MC95.15; Mertens et al. 1997); erhalten von Prof. Hartmut Hengel (Institut für Virologie, Freiburg).

4.1.4 Medien

Bakterienkulturmedien

LB (Luria Bertani) Medium 10 g Bacto-Tryptone; 5 g Bacto-Hefeextrakt; 8 g NaCl; 1 g Glukose in 1 l H₂O (pH 7,2). Je nach Bedarf wurde zusätzlich Chloramphenicol (15 μ g/ml), Kanamycin (15 μ g/ml) oder Ampicillin (100 μ g/ml) zugegeben.

LB (Luria Bertani) Agar 15 g Agar wurden in 1 l LB-Medium gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 55°C, wurde je nach Bedarf Ampicillin (100 μ g/ml), Kanamycin (15 μ g/ml) oder Chloramphenicol (15 μ g/ml).

Zellkulturmedien

Alle Medien sowie Fötale Kälberserum, GlutaMAXTM und 1M HEPES wurden als Flüssigmedien von der Firma Gibco[®]/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen.

27-287/Croma101 RPMI-1640 mit Zusatz von 1x GlutaMAXTM Supplement, 10 mM HEPES, 10% FKS (bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert) und 50 mg/ml Gentamycin.

293T	DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>) mit Zusatz von 1x GlutaMAX™ Supplement, 10mM HEPES, 10% FKS (bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert) und 50 mg/ml Gentamycin.
MEF	DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>) mit Zusatz von 1x GlutaMAX™ Supplement, 10mM HEPES, 15% FKS (bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert) und 50 mg/ml Gentamycin.
PBMC/MMC	Lymphozyten-Medium; 50% RPMI-1640 + 50% Panserin (PAN-Biotech, Aidenbach) mit Zusatz von 1x GlutaMAX™ Supplement, 10 mM HEPES, 10% FKS (bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert), 50 mg/ml Gentamycin und 50-250 U IL-2/ml (PeproTech, Hamburg).

4.1.5 Weitere Zellkulturlösungen

Trypsin/EDTA	0,25%-ige Lösung in 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,56 Mm Na ₂ HPO ₄ ; 5 mM D-(+) Glukose; 25 mM Tris/HCl; 0,01% EDTA (pH 7,0).
PBS ₀	Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ ; 138mM NaCl; 2,7mM KCl; 6,5mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5mM KH ₂ PO ₄ .

4.1.6 Oligonukleotide

Die nachfolgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, USA und Leuven, Belgien) bezogen.

Oligonukleotide und Sonden für die quantitative *Taqman* PCR (qPCR)

Name	Sequenz (5' → 3')
MCMV Wt Cass	TGCCATTTCGAGCCCAGAGC ATCCCCGTCCCATAGCCG Sonde: /5HEX/CAATGCAAC/ZEN/CTTACCCGGCCTG/3IABkFQ/
MCMV hgB Cass	Sonde: /56-FAM/CGCAAACG/ZEN/CCTAACCCCTAAGCA/3IABkFQ/

MCMV hgB rev	GCCCGTACATCGCGAAGC
MCMV Cass fwd	TGCCATTCGAGCCCAGAGC

4.1.7 Plasmide und BACmide

BAC MCMV Δ m157luc: rekombinantes BACmid, welches die genomische Sequenz von MCMV, abgeleitet aus dem Wildtyp Stamm Smith trägt und anstelle von m157 das Luziferasegen des Glühwürmchens unter dem humanen *major immediate early promotor* (MIEP) exprimiert; erhalten von Prof. Dr. Martin Messerle (Abteilung Virologie, Medizinische Hochschule Hannover); beschrieben von Klenovsek et al., 2007.

BAC MCMV Δ m157luc hgB-EpCAM: BAC MCMV Δ m157luc abgeleitetes BACmid, welches zusätzlich das Glykoprotein B des HCMV zusammen mit der EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*, Epitheliales Zelladhäsionsmolekül) Transmembrandomäne unter einem IE-Promotor exprimiert.

pWPI-gB-EpCAM: Vektor-Plasmid eines bicistronischen lentiviralen Vektors der 2. Generation, der die Sequenz des extrazellulären Teil des humanen Glykoprotein B mit der Transmembrandomäne des EpCAM unter der Kontrolle des EF1-a Promotor enthält und durch eine IRES von dem internen Kontrollgen GFP getrennt ist. Das Plasmid besitzt außerdem eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion von Bakterien.

pMD2.G: Plasmidvektor, welcher die Sequenz für das Vesicular Stomatits Virus Glykoprotein (VSV-G), das bei Lentivirus-Produktionen als Hüllprotein dient, enthält. Außerdem besitzt er eine Ampicillinresistenz, die zur Selektion von Prokaryonten genutzt werden kann (erhalten von Didier Trono (Addgene plasmid # 12259)).

psPAX2: Lentiviraler Verpackungsvektor der 2. Generation, welcher für lentivirale Strukturgene und Enzyme zur Herstellung und Verpackung der RNA sowie der akzessorischen Proteine tat und rev kodiert. Transformierte Bakterien können über eine Ampicillinresistenz selektioniert werden (erhalten von Didier Trono (Addgene plasmid # 12260)).

4.1.8 Enzyme und Antikörper

Enzyme

Folgend Enzyme wurden von den angegebenen Firmen bezogen und in den mitgelieferten Puffersystemen nach Angaben der Hersteller verwendet.

Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Proteinase K (100 mg/ml)	AppliChem, Darmstadt
<i>Pst</i> I (10 U/ μl)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Primärantikörper

Spezifität	Spezies / Isotyp	Anwendung	Hersteller
CD28	human/IgG1k	Stimulation PBMCs	Biologend
HCMV-gB (27-287)	Maus/IgG2b	FACS	Hybridomüberstand
MCMV IE1 (Croma101)	Maus/IgG1	Immunfluoreszenz	Hybridomüberstand
CD3 (OKT3)	Maus/IgG2a	Stimulation PBMCs	Janssen-Cilag

Sekundärantikörper

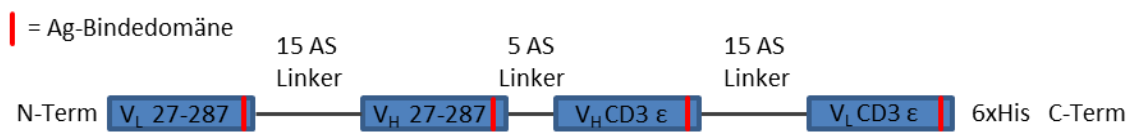
Spezifität	Spezies / Isotyp / Marker	Anwendung	Hersteller
Maus	Ziege/IgG H+L/Alexa [®] 488	Immunfluoreszenz/ FACS	Invitrogen
Maus	Esel/IgG H+L/Alexa [®] 647	FACS	Invitrogen

BiTE[®]-Moleküle

Muriner gB-BiTE[®]: *bispecific T cell engager*, bestehend aus zwei variablen Einzelketten-Antikörpern (*single chain variable fragments*, scFv), welche jeweils spezifisch für das HCMV gB bzw. das murine CD3ε sind; gB-spezifisches scFv abgeleitet aus der Hybridom-Zelllinie 27-287 (Schoppel et al, 1996); hergestellt aus einer einzelnen Polypeptidkette, bestehend aus den jeweiligen V_H und V_L (*variable heavy; variable light*)-Ketten der beiden scFv; V_H und V_L jeweils verbunden durch einen Polypeptid-Linker ((Gly₄Ser₁)₃); beide scFv verbunden durch flexiblen 5-Aminosäure-Linker (Gly₄Ser₁). (Abb. 5.1) (Dörken et al., Micromet AG, 2009, Patent Nr. US 7575923 B2)

Humaner gB-BiTE[®]: *bispecific T cell engager*, bestehend aus zwei variablen Einzelketten-Antikörpern (*single chain variable fragments*, scFv), welche jeweils spezifisch für das HCMV gB oder das humane CD3 ϵ sind; gB-spezifisches scFv abgeleitet aus der Hybridom-Zelllinie 27-287 (Schoppel et al, 1996); hergestellt aus einer einzelnen Polypeptidkette, bestehend aus den jeweiligen V_H und V_L (*variable heavy; variable light*)-Ketten der beiden scFv; V_H und V_L jeweils verbunden durch einen Polypeptid-Linker ((Gly₄Ser₁)₃); beide scFv verbunden durch flexiblen 5-Aminosäure-Linker (Gly₄Ser₁). (Abb. 5.1) (Dörken et al., Micromet AG, 2009, Patent Nr. US 7575923 B2)

A



B

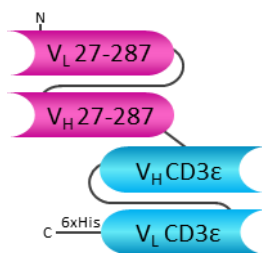


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des HCMV gB-BiTE[®].

(A) Schematische Anordnung der einzelnen V_H- und V_L-Elemente in der Polypeptid-Kette des HCMV gB-BiTE[®]. **(B)** Schematischer Aufbau des HCMV gB-BiTE[®], bestehend aus zwei scFvs, spezifisch für HCMV gB bzw. CD3 ϵ , verbunden durch eine kurze Linker-Sequenz.

4.2 Standardmethoden

Die folgenden Methoden wurden nach Standardprotokollen der angegebenen Literaturstellen oder nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

- Ethanol- und Isopropanol-Fällung von Nukleinsäuren, Restriktionsenzymspaltungen, Transformation von Bakterien und andere grundlegende Klonierungsschritte (Ausubel et al., 2003; Sambrook et al., 1989)
- Kleine Plasmid- und BACmid-Präparationen durch alkalische Lyse (Zagursky et al., 1985; Birnboim und Doly, 1979)
- Plasmid- und BACmid-Präparationen durch alkalische Lyse gefolgt von Anionen Austauschchromatographie mit Hilfe des PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

4.3 Zellbiologische Methoden

Alle für die durchgeführten Versuche benötigten Zellkulturen wurde bei 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit in den dazugehörigen Medien kultiviert (siehe 4.4.1).

4.3.1 Kultivierung von adhärent gewachsenen Zellen

Murine Embryonale Fibroblasten (MEF) wurden alle 3-7 Tage, spätestens jedoch bei Erreichen der Konfluenz, durch Zugabe von Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und 1:2 bis 1:3 mit frischem Medium gesplittet. Für Versuche wurden MEF Zellen zwischen Passage 4 und 19 verwendet. HEK 293T Zellen wurden alle 2-3 Tage ebenfalls mittels Trypsin/EDTA abgelöst und 1:5 bis 1:10 mit frischem Medium gesplittet und versorgt.

4.3.2 Kultivierung von Hybridom-Zelllinien

Suspensionszellen wurden regelmäßig abzentrifugiert (10 Minuten, 1250 rpm) und auf eine Zellzahl von $1-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit neuem Medium aufgefüllt.

4.3.3 Isolation, Stimulation und Kultivierung von MMCs/ murinen T-Zellen

Zur Gewinnung muriner MMCs bzw. T-Zellen wurden Milzen aus C57BL/6 Mäusen entnommen und vorsichtig mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb (70 µm Falcon™ Nylon Cell Strainer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) in eine Zellkulturschale mit 5 ml MACS-Puffer gedrückt. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in ein 15 ml steriles Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei RT und 1500 rpm abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und die Erythrozyten durch Zugabe von 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer für 5 Minuten bei RT lysiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 ml MACS-Puffer gestoppt und die Suspension erneut durch ein Zellsieb in ein 50 ml Falcon filtriert und mit MACS-Puffer auf 25 ml aufgefüllt. Im Anschluss folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm und RT für 12 Minuten und die Resuspension der Zellen in Lymphozyten-Medium mit 250 U/ml IL-2 bei einer Dichte von $1-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml. Zur Aktivierung und Expansion der Zellen wurden diese nach Herstellerangaben mit Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28 versehen und regelmäßig versorgt und gesplittet. Nach 7-10 Tagen wurden die Beads mittels magnetischer Separation aus den Zellen entfernt und neue Beads nach Herstellerangaben zugegeben. Nach erneuten 7-10 Tagen oder Erreichen der gewünschten Zellmenge wurden die Beads aus den Zellen entfernt und diese in Lymphozyten-Medium mit 100 U/ml IL-2 bei einer Dichte von $1-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml gehalten. Die Zellen ruhten nun bis zur weiteren Verwendung für 28-40 Tage. Zwischendurch wurden sie entsprechend gesplittet oder mit frischem Medium versorgt.

MACS-Puffer

PBSO mit 1% FKS, 2 mM EDTA

Erythrozyten-Lyse-Puffer

150 mM NH₄Cl, 20 mM HEPES, 100 mM EDTA.

4.3.4 Isolation, Stimulation und Kultivierung von PBMCs/ humanen T-Zellen

Die Gewinnung humaner PBMCs erfolgte mittels Dichtegradienten mit Biocoll (Biochrom, Berlin) aus anonymem Spendervollblut. Hierfür wurde das Vollblut zunächst 1:1 mit PBSO verdünnt und anschließend je 20 ml Biocoll-Lösung mit 30 ml verdünntem Blut überschichtet und dann bei RT und 1200 rpm ohne Bremse für 30 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Lymphozyten-Ring wurde im Anschluss vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und zwei Mal mit PBSO und einmal mit Lymphozyten-Medium gewaschen. Im Folgenden wurden die Zellen in Lymphozyten-Medium mit 250 U/ml IL-2 aufgenommen und bei einer Dichte von $1-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Zur Vermehrung und

Stimulation der Lymphozyten wurde eine 24-Lochplatte über Nacht mit einem 1:100 verdünntem anti-human CD3 (OKT3, Janssen-Cilag, Neuss) und CD28 (LEAF™ Purified anti-human CD28, Biolegend, San Diego, Kalifornien) Antikörper bei 4°C beschichtet und die Zellen am darauffolgenden Tag in die Platte überführt. Weiterhin wurden die Lymphozyten für die nächsten zwei Wochen regelmäßig in CD3/CD28-beschichtete Platten oder Flaschen gesplittet und mit frischem Medium versorgt. Bei Erreichen einer ausreichenden Menge an Zellen wurden diese wieder in normale Zellkulturflaschen überführt und bei einer Dichte von $1-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Lymphozyten-Medium mit 50-100 U/ml IL-2 gehalten. Diese T-Zellen ruhten nun für 28-40 Tage.

4.3.5 Herstellung von Hybridomüberständen

Zur Generierung von Antikörpern aus Hybridomüberständen wurde die jeweils entsprechende Hybridomzelllinie im entsprechenden Medium solange bei einer Dichte von $1-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert, gesplittet und mit frischem Medium versorgt bis eine ausreichende Menge an Zellen herangewaschen war. Danach wurden diese nicht weiter versorgt und nach dem Tod aller Zellen die Überstände geerntet. Die Ernte erfolgte durch eine Zentrifugation bei 1800 rpm und RT für 10-15 Minuten. Im Anschluss wurden die Hybridomüberstände entsprechend aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

4.4 Virologische Methoden

4.4.1 Herstellung von rekombinantem MCMV und Titerbestimmung

BACmid-DNA-Mini-Präparationen wurden mittels Alkalischer Lyse nach Zagursky et al. (1985) aus 5 ml Übernachtskulturen durchgeführt. Die isolierte DNA wurde anschließend zur Kontrolle anhand eines Restriktionsverdau analysiert. Hierfür wurden jeweils 10 µl der Mini-Präp BACmid-DNA mit 1µl Enzym, 2µl des entsprechenden 10x Puffer und sterilem H₂O (ad 20 µl) für 1-2 Stunden verdaut. Im weiteren Verlauf wurden die entsprechenden Ansätze auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und mittels PFGE aufgetrennt.

Für die Rekonstitution von rekombinantem MCMV wurden MEF-Zellen am Vortag 1:3 ausgesät und am Folgetag mit der gewünschten aufgereinigten viralen BACmid DNA mit

Hilfe des Transfektionsreagenz „*GenJet In Vitro DNA Transfection Reagent (Ver. II)*“ (Tebu-Bio, Offenbach) nach Herstellerangaben transfiziert. Nach etwa 5-7 Tagen, sobald ein nahezu kompletter CPE (cytopathischer Effekt) beobachtet werden konnte, wurde der Überstand geerntet und im Folgenden zur Steigerung der Titer passagiert. Hierfür wurden am Vortag wieder MEF-Zellen 1:3 ausgesät, am darauffolgenden Tag mit einer entsprechenden Menge MCVI infiziert und, wie oben beschrieben, nach 5-7 Tagen geerntet und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Titer generierter Virusüberstände wurden durch Endpunkttitration mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. Hierfür wurden 25.000 MEF-Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät und am Folgetag mit seriellen Verdünnungsreihen (10^{-2} - 10^{-7}) der verschiedenen Virenstocks infiziert. Nach 2-3 Tagen erfolgte eine spezifische intrazelluläre Detektion des viralen *immediate early 1* Proteins von MCMV mit dem monoklonalen Antikörper Croma101. Hierzu wurden die Überstände auf den Zellen abgenommen, die Zellen einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem 96% Ethanol für 15 Minuten bei -20°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 50-100 µl Croma101-Hybridomüberstand bei RT für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss sind die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 50 µl 1:200 verdünntem anti-Maus-IgG Alexa[®] 488 Sekundär-Antikörper für eine Stunde dunkel bei RT gefärbt worden. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS und die Trocknung der Zellen. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop und die Berechnung der Titer nach Reed und Münch, 1938.

Zur Bestimmung einer Standard-MOI für alle folgenden Versuche wurden 20.000 MEFs in einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät und am folgenden Tag mit unterschiedlichen MOIs in Triplikaten infiziert (0,5; 0,2; 0,1; 0,01; 0,05). Nach 48h erfolgte die Lyse der Zellen durch die Zugabe von 30 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega, Fitchburg, USA) für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln. Jeweils 5 µl der Lysate wurden anschließend in eine weiße, lichtundurchlässige 96-Loch-Platte überführt und durch automatische Zugabe von Luziferase-Assay-Puffer (100 µl/Loch) die emittierten Lichtquanten nach einer Messdauer von 5 Sekunden im Berthold Orion II Luminometer quantifiziert. Die Fehlerindikatoren wurden anhand der Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen berechnet.

4.4.2 Herstellung lentiviral-transduzierter Zellen

Das virale Protein HCMV-gB wurde durch lentiviralen Transfer stabil in 293T-Zellen eingeschleust. Die Produktion des lentiviralen Überstands erfolgte durch Kotransfektion des pWPI EpCAM-gB mit dem lentiviralen Verpackungsvektor psPAX2 und dem Vektor MD2.G in 293T.

Für die Transfektion wurden zunächst am Vortag 293T-Zellen 1:3 in 25cm² Flaschen ausgesät und am nächsten Tag mit 0,63 µg pMD2.G, 1,8 µg psPAX2 und 2,5 µg Expressionsplasmid nach Herstellerangaben transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Ernte des lentiviralen Überstandes durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 Minuten und anschließender Filtration durch einen 0,2 µm Minisart[®] NML Spritzenfilter (Sartorius, Göttingen). Im Anschluss wurden am Vortag 1:3 in 25cm²-Flaschen ausgesäte 293T-Zellen mit 3 ml des lentiviralen Überstandes transduziert und 1-3 Tage nach Transduktion mittels Durchflusszytometrie auf GFP+ gB+ Zellen analysiert.

4.4.3 K-Lyse virushaltiger Zellen und Überstände

Die Präparation viraler und zellulärer DNA aus virushaltigen Zellen wurde anhand einer K-Lyse durchgeführt. Hierfür wurde 1 ml Virusüberstand bzw. 500 µl Zellsuspension abgenommen, durch Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm für 90 Minuten (Virusüberstand) bzw. RT und 1500 rpm für 5 Minuten (Zellen) alle Viren bzw. Zellen pelletiert und anschließend in 100 µl K-Puffer mit frisch zugegebener Proteinase K (1:100) lysiert und verdaut. Es folgten hierbei zwei Inkubationsschritte für einmal 45 Minuten bei 56°C und zur Inaktivierung der Proteinase K einmal 15 Minuten bei 95°C. Die fertigen Lysate wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

K-Puffer 50mM KCl; 15mM Tris; 2,5mM MgCl₂; 0,5% Tween20; 10µg/ml
Proteinase K (frisch zugegeben)

4.5 Sonstige Methoden

4.5.1 Quantitative Real-Time PCR mit fluoreszenzmarkierten Taqman Sonden

Die Bestimmung der Anzahl an viralen Genomkopien pro Zelle erfolgte durch absolute Quantifizierung mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qPCR) mit fluoreszenzmarkierten Taqman-Sonden. Hierfür wurde zunächst die DNA mittels K-Lyse aus virushaltigen Zellen gewonnen und dann die Anzahl an viralen MCMV Wt-Genom- bzw. MCMV hgB-Genomkopien ermittelt. Zum Erstellen einer Standardkurve wurde jeweils in der gleichen PCR Untersuchung eine serielle Verdünnungsreihe (10^7 - 10^1 MCMV-BACmid-DNA-Moleküle) mitgeführt. Eine 50 μ l Reaktion beinhaltete folgende Komponenten: 0,5 μ l 6-ROX (0,2mM) als interne Referenz, 2,5 μ l Puffer P2, 5,5 μ l MgCl₂ (25mM), 3 μ l dNTPs (je 2,5mM), 0,25 μ l Taq Polymerase (5U/ μ l), 0,5 μ l des entsprechenden PrimeTime[®] qPCR Assay Mix (10 nM je Primer; 2,5 nM Sonde) (IDT, Coralville, USA) und/oder 1 μ l PrimeTime[®] Eco Sonde (2,5 nM), 2 μ l Primer fwd und/oder Primer rev (10 pmol/ μ l) und 5 μ l Matrizen-DNA. Jede Reaktion wurde in Triplikaten angesetzt. Einem initialen Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C folgten 40 Amplifikations-Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C, 15 s), Oligonukleotid Hybridisierung (60°C, 30s) und Elongation (68°C, 30 s). Die Durchführung der Reaktion erfolgte in einem Applied Biosystems 7500 *Real-Time* PCR System. Die Daten wurden im Folgenden mit der Applied Biosystems 7500 *Software* (Version 2.0.6) analysiert. Die Anzahl an viralen Genomkopien wurde in Relation zur Standardkurve anhand des jeweils spezifischen C_T-Wertes ermittelt.

Puffer Rox-K	0,2 mM 6-Carboxy-X-rhodamin
Puffer P2	100 mM Tris/HCl pH 8,3; 500 mM KCl

4.5.2 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde zur Analyse der Expression bestimmter Oberflächenmolekülen verwendet. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die sich spezifisch gegen ausgewählte Antigene richten, können Zellsuspensionen quantitativ analysiert werden. Zur Bestimmung der Anzahl transduzierter, gB-exprimierender 293Ts oder infizierter, gB-exprimierender MEFs in einer Population wurden 100.000-500.000 Zellen pelletiert (500 xg, 5 Minuten), einmal mit PBS_o gewaschen und in 150 μ l PBS + 150 μ l 4% PFA für 20 Minuten fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS_o wurden die Zellen mit 50 μ l 27-287 Hybridomüberstand für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss erneut einmal mit PBS_o gewa-

schen. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch einen direkt markierten anti-Maus Alexa[®] Fluor 647 Antikörper (1:200) für eine Stunde im Dunkeln bei 4°C. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS_o wurden die Zellen in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Zur Einstellung des Geräts wurden zusätzliche untransduzierte bzw. uninfizierte fixierte Zellen mitgeführt. Die Messungen wurden anhand der Software FCS Express V3 ausgewertet, wodurch der prozentuale Anteil transduzierter Zellen mit exprimiertem Oberflächenmarker bestimmt werden konnte.

FACS-Puffer

PBS_o mit 1% FKS

4.6 Titration des gB-BiTE[®]

Zur Bestimmung einer Standard-Arbeitskonzentration des gegen das gB des HCMV gerichteten BiTE[®] wurde eine Titration des Antikörpers durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 20.000 MEF Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatten ausgesät und am Folgetag mit HCMV gB-EpCAM (MOI von 0,01) infiziert. Als Kontrolle dienten uninfizierte MEFs. Nach 24 Stunden wurden sowohl zu uninfizierten als auch infizierten Zellen pro Vertiefung 100.000 murine oder humane T-Zellen in 100 µl frischem Lymphozyten-Medium gegeben. Zusätzlich erhielt jeder Ansatz eine unterschiedliche Konzentration des normalen oder halbwegszeitverlängerten (HWZv) murinen gB-spezifischen BiTE[®] (0-1000 ng/ml). Es folgte eine Inkubation der Co-Kulturen für 48 Stunden. Danach wurden alle Platten für 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 30 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega, Fitchburg, USA) und einer Inkubation der Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Schütteln. Jeweils 10 µl der Lysate wurden im Folgenden in eine lichtundurchlässige 96-Loch-Platte überführt und nach automatischer Zugabe von Luziferase-Assay-Puffer (100 µl/Loch) die absorbierten Lichtquanten nach einer Messdauer von 10 Sekunden im Luminometer quantifiziert. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten angesetzt und die Fehlerindikatoren anhand der Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen erstellt.

Luziferase-Assay-Puffer

pro 1 ml P/Rluc-A 2 mM ATP, 1 mM DTT, 75 µM D-Luziferin frisch zugeben

P/Rluc-A

200 mM Tris HCl; 15 mM MgSO₄; 0,1 mM EDTA; pH 8,0

4.7 Inhibition der Virusausbreitung durch T-Zellen und gB-BiTE[®] *in vitro*

Für die Untersuchung der Virusausbreitung *in vitro* wurden in einer 96-Loch-Flachbodenplatte pro Vertiefung 20.000 MEF ausgesät und am nächsten Tag mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM (MOI 0,01) infiziert. Uninfizierte MEF-Zellen dienten dabei als Kontrolle. Nach 24 Stunden wurde von allen Zellen das komplette Medium entfernt und jeweils durch 200 µl MEF-Medium ersetzt. Außerdem erfolgte eine Zugabe von je 100 µl fünf unterschiedlicher Kombinationen zu allen uninfizierten, MCMV Wt und MCMC gB-EpCAM infizierten Zellen. Diese waren wie folgt:

1. Lymphozyten-Medium
2. Lymphozyten-Medium + 100 ng/ml muriner oder humaner gB-BiTE[®] (normal oder HWZv)
3. 100.000 murine **oder** humane T-Zellen
4. 100.000 murine T-Zellen + 100 ng/ml humaner gB-BiTE[®] (normal oder HWZv) **oder** 100.000 humane T-Zellen + 100 ng/ml muriner gB-BiTE[®] (normal oder HWZv)
5. 100.000 murine T-Zellen + 100 ng/ml muriner gB-BiTE[®] (normal oder HWZv) **oder** 100.000 humane T-Zellen + 100 ng/ml humaner gB-BiTE[®] (normal oder HWZv)

Die Ansätze 1-4 dienten dabei als unterschiedliche Kontrollen. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Platten analog wie unter 4.6 beschrieben weiterbehandelt und einer Luziferase-Messung unterzogen. Die Überstände wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Jeder Ansatz wurde in Triplikaten angesetzt und die Fehlerindikatoren anhand der Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen erstellt.

4.8 Inhibition der MCMV Foci-Bildung durch T-Zellen und gB-BiTE[®]

Zum Nachweis einer Inhibition der MCMV Focus-Bildung *in vitro* wurden 20.000 MEFs pro Vertiefung in einer 96-Loch-Platte mit transparentem Boden (μ -Plate 96 Well, Ibidi, Planegg) ausgesät, infiziert und mit verschiedenen Konditionen, wie unter 4.7 beschrieben, für 48 Stunden inkubiert. Zum besseren Vergleich wurden für die Infektion unterschiedliche MOIs für die unterschiedlichen Viren eingesetzt (MCMV Wt MOI 0,005; MCMV gB-EpCAM MOI 0,01). Die Ernte der Zellen erfolgte nach Abnahme der Überstände durch die Fixierung der Zellen mit eiskaltem 96% Ethanol für 20 Minuten bei -20°C. Im Anschluss wurden die Zellen zwei Mal mit PBS_o gewaschen und danach mit 50 μ l Croma101-Hybridomüberstand inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschschriffe mit PBS_o und eine Färbung der Zellen durch einen anti-Maus Alexa[®] Fluor 488 Sekundär-Antikörper. Nach weiteren zwei Waschvorgängen wurde die DNA im Zellkern mit dem Farbstoff Höchst-33258 (1 μ g/ml) für 20 Minuten bei RT gefärbt, die Zellen noch einmal mit PBS_o gewaschen und anschließend an der Luft im Dunklen getrocknet. Danach konnten die Fluoreszenz der Zellen mikroskopisch analysiert werden.

4.9 Auswirkungen auf die Virusausbreitung durch Zytokin-Zugabe

Um die Wirkung der MCMV-Ausbreitung auf die Zugabe verschiedener Zytokine zu untersuchen wurden MEF-Zellen in einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät (20.000 MEF/Vertiefung) und sofort mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 und 1000 U pro Vertiefung) verschiedener Zytokine behandelt (IFN γ , TNF α oder beide in Kombination). 24 Stunden nach der Zytokinbehandlung wurden die Zellen mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert (MOI 0,01) und nach weiteren 48 Stunden wie unter 4.6 beschrieben geerntet und einem Luziferase-Assay unterzogen. Als Kontrolle dienten uninfizierte MEFs und unbehandelte, infizierte MEFs.

Zur weiteren Untersuchung festgestellten erhöhten viralen Ausbreitung unter Zugabe von TNF α wurde zunächst eine Abhängigkeit von der Dosis des Zytokins überprüft. Hierfür wurden erneut MEF-Zellen in einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät (20.000 MEF/ Vertiefung), sofort mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 U pro Vertiefung) TNF α behandelt und nach 24 Stunden mit MCMV Wt infiziert (MOI 0,01). Die Ernte und Analyse der Zellen erfolgte nach 48 Stunden wie unter 4.6 beschrieben mittels Luziferase-Assay.

Eine zeitliche Abhängigkeit von der Zytokinzugabe wurde ebenfalls untersucht und MEF-Zellen zu diesem Zweck wie oben beschrieben ausgesät. Die Zugabe von 50 U TNF α pro Vertiefung erfolgte 48, 24, 16 und 8 Stunden vor der Infektion mit MCMV Wt (MOI 0,01). Ernte und Analyse erfolgte wieder wie bei 4.6 nach 48 Stunden.

Eine Aufhebung des Effekts wurde durch eine Neutralisation des Zytokins überprüft. Hierfür wurden MEF-Zellen wieder wie bereits beschrieben ausgesät, mit 100 U TNF α pro Vertiefung behandelt und mit MCMV Wt infiziert (MOI 0,01). Gleichzeitig mit der Zugabe des Zytokins erfolgte die Zugabe von 1500, 1000, 500, 200, 100, 50, 20 bzw. 10 ng pro Vertiefung des neutralisierenden Antikörpers (LEAF[®] Purified anti-mouse TNF-alpha, Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA). Zytokin und Antikörper wurden vor Zugabe bei 4°C für 2 Stunden gemeinsam inkubiert. Als Kontrolle dienten infizierte Zytokin-unbehandelte, infizierte Zytokin- und Antikörper-unbehandelte und uninfizierte Zellen. Geerntet und analysiert wurden die Zellen erneut wie unter 4.6 beschrieben.

Jeder Ansatz wurde in Triplikaten angesetzt und die Fehlerindikatoren anhand der Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen erstellt.

4.10 Europium-Zytotoxizitäts-Assay

Mittels eines Europium-basierten Zytotoxizitäts-Assays sollte bestimmt werden, ob die verschiedenen Varianten des gB-BiTE[®] in der Lage sind durch die T-Zellen eine Lyse der infizierten Zielzellen zu induzieren. Hierfür wurde der DELFIA[®] EuTDA Cytotoxicity Reagents nach Herstellerangaben verwendet. Die verschiedenen Ansätze, wie unter 4.7 beschrieben, wurden sowohl auf uninfizierte, MCMV Wt und gB-EpCAM infizierte MEFs und gB-transduzierten 293Ts (4.4.2) gegeben. Die Inkubation der Co-Kulturen erfolgte für 4 Stunden bei 37°C. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten angesetzt.

4.11 Detektion der Zytokin-Sekretion (ELISA)

Zur Ermittlung der Konzentration an Zytokinen in Zellkulturüberstände aus den unter 4.6 und 4.7 beschriebenen Versuchen wurden ein sogenannter ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt. Die Detektion von murinem bzw. humanem TNF α und IFN γ erfolgte unter Verwendung des Herstellerprotokolls mit dem *Human* bzw. *Mouse TNF- α* bzw. *IFN- γ ELISA MAXTM Standard Kit* (Biolegend, San Diego, Kalifor-

nien, USA). Alle Überstände wurden 1:10 für einen TNF α - und 1:20 für einen IFN γ -ELISA in RPMI-Medium verdünnt und eingesetzt. Die Fehlerindikatoren wurden anhand der Standardabweichung aus zwei oder drei unabhängigen Versuchen erstellt.

4.12 Statistische Auswertung

Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde entweder eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) oder der Mann-Whitney-Test verwendet. Hierfür wurde die Software GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software, Inc.) genutzt. Das verwendete Konfidenzintervall lag bei 95% (**** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$).

5 Ergebnisse

5.1 Replikationsanalyse und Ermittlung einer geeigneten MOI

Die potentielle Einsetzbarkeit des murinen HCMV gB-spezifischen BiTE[®] in einem *in vivo* Mausmodell sollte in der folgenden Arbeit analysiert werden. Hierzu wurde zunächst ein Assay entwickelt anhand dessen die Funktionalität des BiTE[®] überprüft werden konnte. Der murine gB-BiTE[®] hat im Vergleich zu seinem humanen Analogon eine Bindestelle für das murine CD3 und kann dieses somit spezifisch auf Mäuse-T-Zellen erkennen und binden. Die Bindestelle für das HCMV gB bleibt dabei unverändert. Als Zielzellen dienten in allen Versuchen Murine Embryonale Fibroblasten (MEF). Diese primären Zellen wurden jeweils mit zwei unterschiedlichen Viren infiziert. Zum einen mit dem Wildtyp-Stamm MCMV Δ m157luc (Klenovsek et al., 2007; im Folgenden als MCMV Wt bezeichnet), welcher als Kontrolle fungierte, zum anderen mit einem vom Wt abgeleiteten MCMV Δ m157luc gB-EpCAM Virusstamm (im Folgenden als MCMV gB-EpCAM bezeichnet), welcher zusätzlich das spezifische Zielantigen des BiTE[®], HCMV gB unter Kontrolle des CMV *immediate early* promoters auf der Oberfläche exprimiert. Zur besseren Oberflächenpräsentation ist der extrazelluläre Anteil des gB an eine zelluläre EpCAM-Transmembrandomäne fusioniert. Beide Viren-Stämme besitzen ein Luziferase-Gen anhand dessen die Virus-Ausbreitung *in vitro* gemessen werden kann.

Um mögliche Replikationsunterschiede festzustellen und eine geeignete MOI (*multiplicity of infection*) zur Infektion der Zellen in den folgenden Versuche zu ermitteln, wurden zunächst MEFs mit MCMV Wt und MCMV gB-EpCAM mit unterschiedlichen MOIs zwischen 0,5 und 0,005 infiziert und die Virusausbreitung anhand der Luziferase-Produktion analysiert. Wie in Abbildung 6 zu sehen repliziert das gB-EpCAM Virus langsamer als der Wt. Die Menge an gemessenen RLUs (*relative light units*) nimmt mit sinkender MOI ab, weist jedoch auch bei sehr geringen MOI-Werten noch ausreichend hohe RLU-Werte auf. Die optische Kontrolle zeigte bei beiden Virus-Stämmen bei einer MOI zwischen 0,5 und 0,1 bereits einen, die Morphologie beeinträchtigenden stärkeren cytopathischen Effekt (CPE) sodass für die meisten weiteren Versuche eine MOI von 0,01 sowohl für den Wt als auch das gB-EpCAM-Virus gewählt wurde.

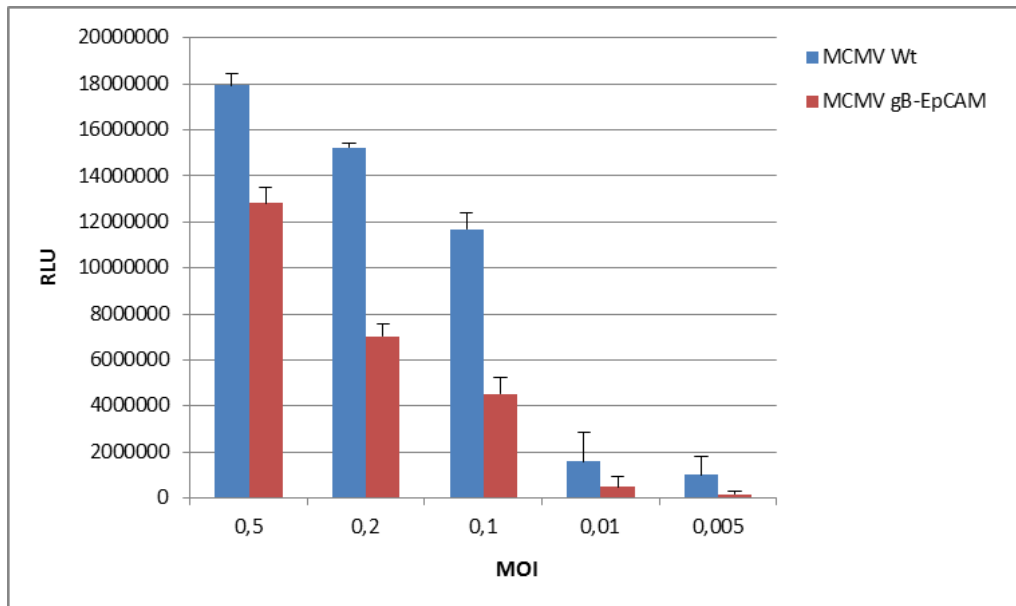


Abb. 6: Replikationsanalyse zur Ermittlung einer geeigneten MOI.

MEF-Zellen wurden mit MCMV Wt und MCMV gB-EpCAM mit unterschiedlichen MOI-Werten für 48 Stunden infiziert und im Anschluss die Virusausbreitung mittels Luziferase-Assay gemessen.

5.2 Bestimmung der benötigten Menge gB-BiTE[®] zur Vermittlung einer optimalen T-Zell Aktivierung

Im weiteren Verlauf sollte eine geeignete Konzentration des gB-BiTE[®] zur optimalen Aktivierung der T-Zellen gefunden werden. Entsprechend der aktuell in der Literatur zu findenden Werte für bereits angewandte andere BiTE[®] Moleküle (Aigner et al., 2013; English et al., 2015; Cioffi et al., 2011) wurden Konzentrationen von 1 ng/ml bis 1000 ng/ml für diesen Versuch gewählt. Ziel war es eine Antikörper-Konzentration zu finden, welche in Anwesenheit des Ziel-Antigens einen maximalen Effekt erzielt, ohne dabei gleichzeitig eine unspezifische Antigen-unabhängige T-Zell-Antwort auszulösen.

Die hierfür verwendeten murinen T-Zellen wurden aus Milzen von C57BL/6 Mäusen isoliert und mit *Mouse T-Activator CD3/CD28 Dynabeads*[®] stimuliert und vermehrt. Humane T-Zellen wurden aus Blut CMV-negativer anonymer Spender mittels eines Dichtegradienten isoliert und mit CD3 (OKT3) und CD28 Antikörpern stimuliert und vermehrt. Für Versuche eingesetzt wurden alle Zellen etwa vier Wochen nach deren Aktivierung.

Um einen Effekt des murinen gB-BiTE[®] auf die Virusausbreitung festzustellen, wurden MEFs mit MCMV gB-EpCAM infiziert und mit murinen oder humanen T-Zellen co-kultiviert und der murine bzw. humane gB-BiTE[®] in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Als Kontrolle dienten uninfizierte MEFs. Abbildung 7 A zeigt die Inhibition der viralen Ausbreitung durch murine T-Zellen und den murinen gB-BiTE[®] (ms gB-

BiTE®). Bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml ist eine deutliche Reduktion der Infektionsausbreitung zu erkennen. Konzentrationen ab 3 ng/ml bis hin zu 1000 ng/ml zeigen eine noch stärkere Hemmung der Virusvermehrung.

Eine Co-Kultur MCMV gB-EpCAM infizierter MEFs mit humanen T-Zellen und dem humanen gB-BiTE® (hu gB-BiTE®) zeigt schon ab 1 ng/ml eine sehr hohe Inhibition der viralen Infektionsausbreitung, die ebenfalls mit steigender BiTE® Konzentration noch weiter reduziert werden kann (Abb. 7 B).

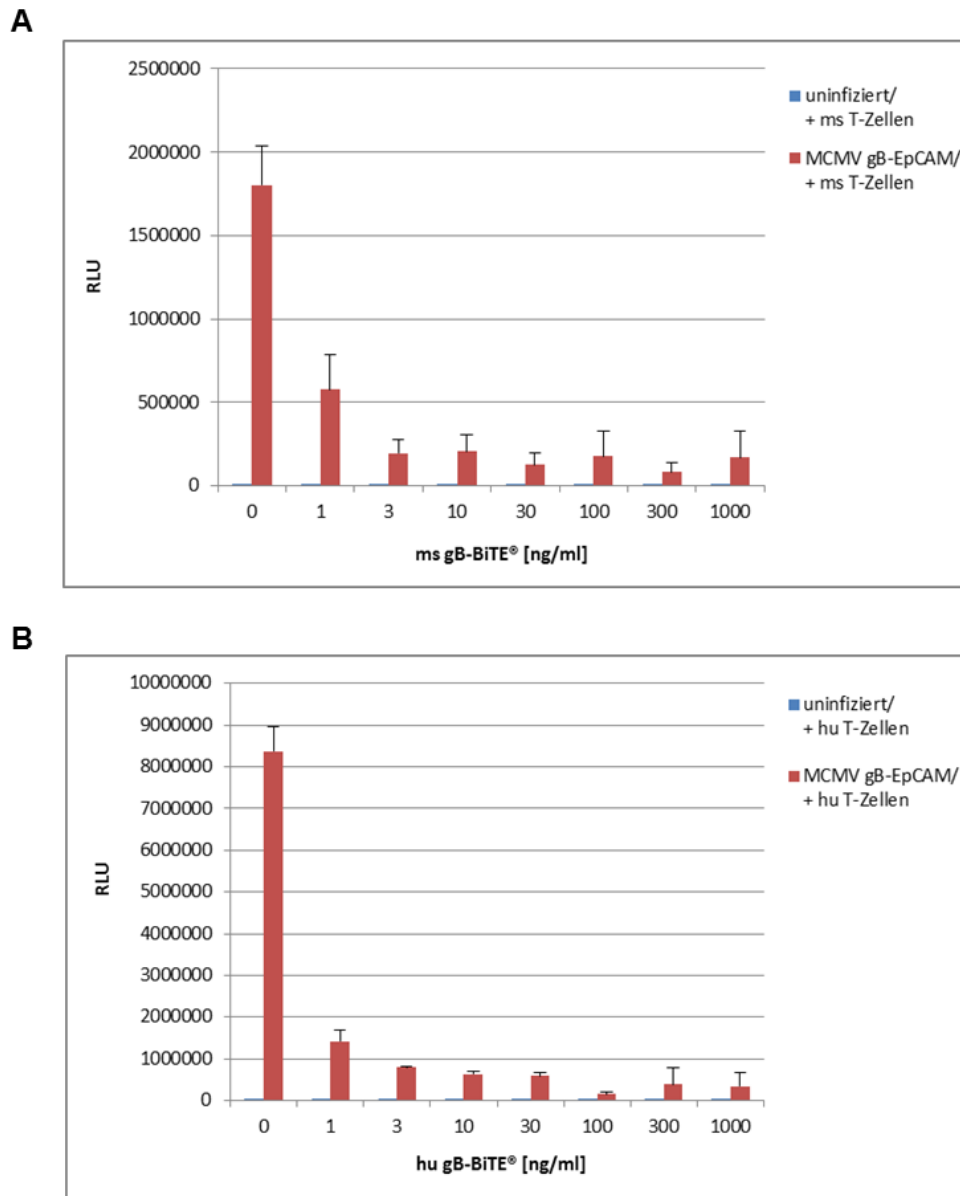


Abb. 7: Hemmung der Virusausbreitung mit unterschiedlichen Konzentrationen des gB-BiTE®.

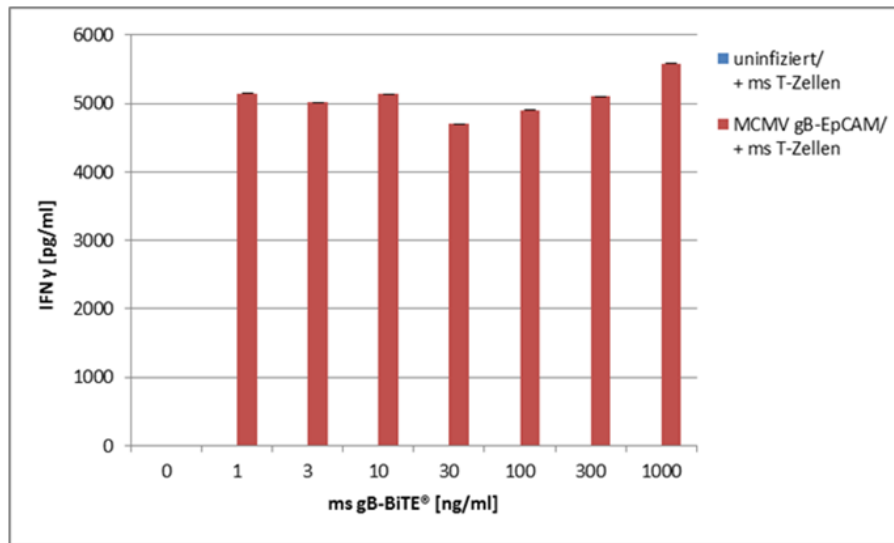
(A) MEFs wurden 24 Stunden nach Infektion (MOI = 0,01) mit MCMV-gB EpCAM mit murinen T-Zellen und unterschiedlichen Konzentrationen des murinen gB-BiTE® co-kultiviert und nach 48 Stunden mittels eines Luziferase-Assays die Virusausbreitung analysiert. Als Kontrolle dienten uninfizierte MEFs. **(B)** Hier erfolgte die Co-Kultur mit humanen T-Zellen und dem humanen gB-BiTE®.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von IFN γ und TNF α zur Replikations-Inhibition von HCMV (Cheeran et al., 2000) wurde die Aktivierung der T-Zellen anhand der sekretierten Menge an IFN γ und TNF α in den Überständen quantifiziert. Wie in Abbildung 8 A zu sehen, ist in Co-Kulturen mit murinen T-Zellen die Menge an ausgeschüttetem IFN γ bei allen getesteten gB-BiTE[®] Konzentrationen nahezu gleich hoch. Dies zeigt, dass der murine gB-spezifische BiTE[®] bereits ab einer geringen Menge in der Lage ist T-Zellen praktisch maximal zu aktivieren. Bei der Co-Kultivierung mit humanen T-Zellen steigt die Menge an sekretiertem IFN γ mit der Konzentration an zugegebenen humanen gB-BiTE[®] konstant an (Abb. 8 B). Hier kann jedoch auch bei uninfizierten Zellen ab einer Menge von 100 ng/ml BiTE[®] eine Antigen-unabhängige Aktivierung der T-Zellen festgestellt werden. Die Menge an ausgeschüttetem Zytokin ist jedoch geringer als bei einer spezifischen Aktivierung der T-Zellen und erreicht bei 300 ng/ml gB-BiTE[®] ihr Maximum und steigt auch mit noch höheren Konzentrationen des BiTE[®] nicht weiter an.

Sowohl in Co-Kulturen infizierter MEF mit murinen als auch mit humanen T-Zellen und dem entsprechenden Spezies-spezifischen gB-BiTE[®] konnte keine Sekretion von TNF α beobachtet werden. Die untere Messgrenze des Assays lag dabei bei 7,5 pg/ml.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl der murine als auch der humane gB-BiTE[®] *in vitro* im murinen System in Kombination mit den jeweiligen entsprechenden T-Zellen bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml in der Lage sind die Virusausbreitung durch die Ausschüttung von IFN γ zu inhibieren. Der humane BiTE[®] wies dabei in Kombination mit humanen T-Zellen auch auf uninfizierten Zellen ab einer Konzentration von 100 ng/ml eine Sekretion von IFN γ und dadurch eine scheinbar Antigen-unabhängige Aktivierung von T-Zellen auf. Eine Ausschüttung von TNF α konnte nicht beobachtet werden. Für alle folgenden Versuche wurde letztlich eine Konzentration von 100 ng/ml gB-BiTE[®] festgelegt.

A



B

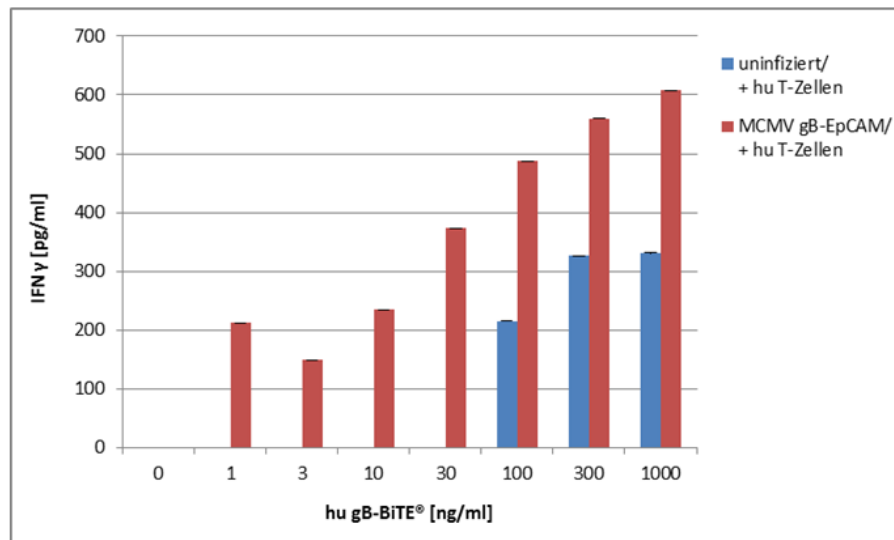


Abb. 8: INF γ Sekretion durch T-Zellen.

(A) MEFs wurden 24 Stunden nach Infektion mit MCMV-gB EpCAM mit murinen T-Zellen und unterschiedlichen Konzentrationen des murinen gB-BiTE® co-kultiviert und nach 48 Stunden die Aktivierung der T-Zellen anhand der Menge an sekretiertem INF γ in den Überständen bestimmt. Als Kontrolle dienten uninfizierte MEFs. **(B)** Hier erfolgte die Co-Kultur mit humanen T-Zellen und dem humanen gB-BiTE®.

5.3 Inhibition der Virusausbreitung *in vitro* durch T-Zellen und gB-BiTE®

Im Folgenden sollte nun ein direkter Nachweis der Virusinhibition über den gB-spezifischen BiTE® in Kombination mit T-Zellen erbracht werden. Zu diesem Zweck wurden mehrere unterschiedliche Ansätze parallel durchgeführt. Hierfür wurden MEFs entweder nicht infiziert oder mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert und 24 Stunden nach der Infektion mit unterschiedlichen Kombinationen behandelt. Um auszuschließen, dass der BiTE® unspezifisch an die Oberfläche uninfizierter oder infizierter Zellen bindet, wurden sowohl uninfizierte als auch MCMV Wt und MCMV gB-EpCAM infizierte MEFs mit T-Zellen und dem gB-BiTE® behandelt. Eine Antigen-unspezifische Aktivierung der T-Zellen durch den BiTE® wurde anhand von uninfizierten MEFs, die ebenso mit T-Zellen und BiTE® inkubiert wurden, überprüft. Als Kontrolle für die Spezies-spezifische CD3-Bindung des gB-BiTE® wurde in einem Ansatz der jeweils nicht Spezies-spezifische BiTE® mitgeführt. Zum Ausschluss eines alleinigen Effekts durch die T-Zellen dienten jeweils uninfizierte, MCMV Wt und gB-EpCAM infizierte MEFs in Co-Kultur mit T-Zellen, aber ohne Zugabe eines BiTE®. Auch eine eigenständige Wirkung des gB-BiTE®, ohne die Aktivierung der T-Zellen, wurde durch das Mitführen von uninfizierten, MCMV Wt oder gB-EpCAM infizierten MEFs in Kombination mit dem gB-BiTE®, jedoch ohne die Zugabe von T-Zellen überprüft. Die virale Ausbreitung wurde anhand der Luziferase-Expression der infizierten Zellen gemessen.

Abbildung 9 zeigt die unterschiedlichen Ansätze zur Überprüfung der spezifischen Wirkung des murinen gB-BiTE® in Kombination mit murinen T-Zellen. MCMV Wt infizierte Zellen weisen in allen Kombinationen einheitlich eine relativ hohe Infektionsausbreitung auf. Es zeigt sich keine Antigen-unabhängige Bindung des murinen gB-BiTE® (Mitte, lila) und dadurch auch keine Hemmung der viralen Ausbreitung. Auch Wt infizierte MEFs in Kombination mit murinen T-Zellen, ohne Zugabe eines BiTE® (Mitte, grün), haben keinen Effekt auf die Virusausbreitung. Das MCMV gB-EpCAM Virus zeigt, wie schon unter 5.1 beschrieben, einen langsameren Replikationszyklus als das Wt Virus. Was hier jedoch deutlich zu sehen ist, ist eine spezifische Inhibition der Virusausbreitung bei Zugabe von murinen T-Zellen in Kombination mit dem murinen gB-BiTE® zu MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen (rechts, lila). Eine Spezies-unspezifische Bindung der humanen Version des gB-BiTE® ist nicht zu erkennen (rechts, türkis). Auch ein Effekt allein durch T-Zellen (rechts, grün) oder den gB-BiTE® (rechts, rot) ist nicht vorhanden. Dies schließt auch z.B. postulierbare Neutralisationseffekte durch eine Bindung des gB-BiTE® an Viruspartikel aus.

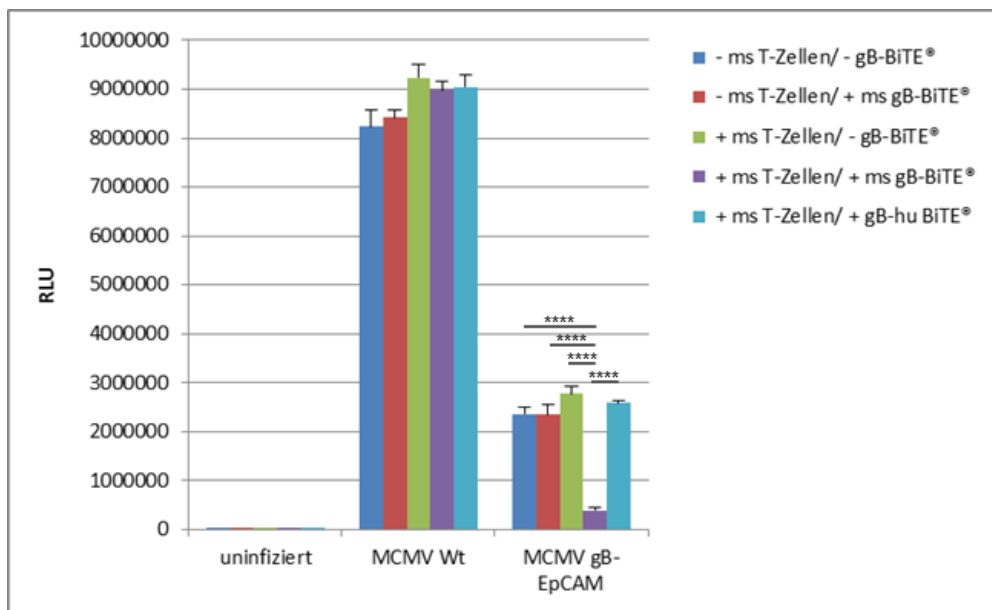


Abb. 9: Inhibition der Virusausbreitung mit murinen T-Zellen und dem murinen gB-BiTE[®].

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert (MOI 0,01) und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium (blaue Balken), nur den murinen gB-BiTE[®] (rote Balken), nur murine T-Zellen (grüne Balken), murine T-Zellen und den murinen gB-BiTE[®] (lila Balken) oder murine T-Zellen und den humanen gB-BiTE[®] (türkise Balken). Eine Analyse der viralen Ausbreitung erfolgte 48 Stunden nach Zugabe der unterschiedlichen Ansätze mittels Luziferase-Assay. Der gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte und MCMV Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des BiTE[®]. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE[®] enthielten sollten eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE[®] bestätigen. Der humane gB-BiTE[®] diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

Die Aktivierung der T-Zellen wurde auch hier wieder durch die Sekretion von IFN γ (Abb. 10) und TNF α in den Überständen der einzelnen Ansätze quantifiziert. Eine geringe Hintergrund-Produktion von IFN γ konnte in allen Ansätzen, die T-Zellen enthielten, nachgewiesen werden, was möglicherweise für nicht ausreichend lange geruhte T-Zellen sprechen könnte. T-Zellen, die mit MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen und dem murinen gB-BiTE[®] co-kultiviert worden sind, zeigten eine hohe IFN γ Sekretion und somit eine starke spezifische Aktivierung (Abb. 10, rechts lila). Darüber hinaus konnten nicht nur eine Antigen-unabhängige Bindung und Aktivierung der T-Zellen (Abb. 10, links und Mitte, lila) sondern auch eine Spezies-unspezifische Aktivierung durch den humanen gB-BiTE[®] (Abb. 10, rechts, türkise) ausgeschlossen werden.

Ebenso wie bei der Titration des gB-BiTE[®] konnte auch hier, bei einer unteren Messgrenze des Assays von 7,5 pg/ml, keine TNF α Produktion nachgewiesen werden.

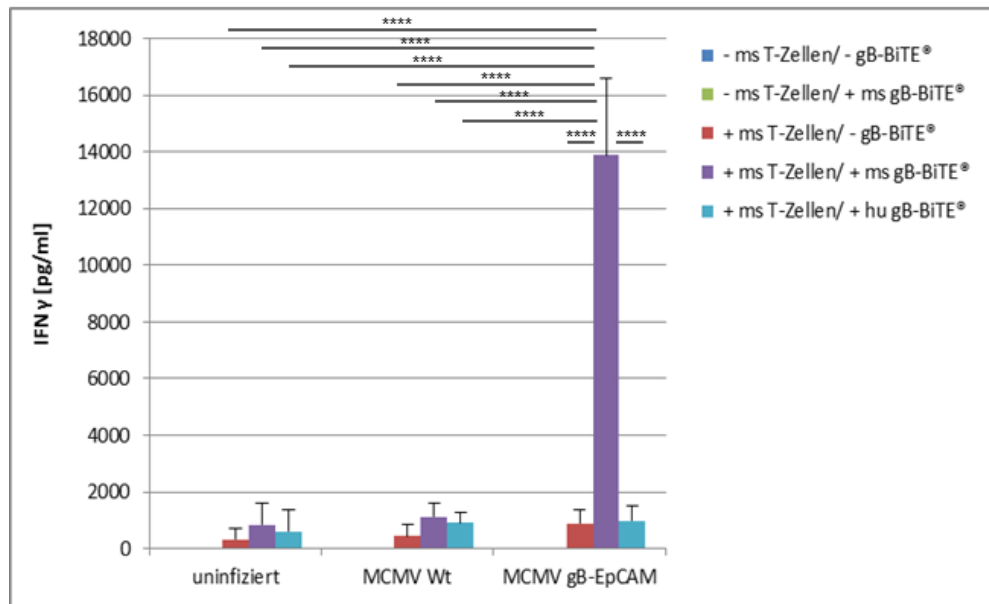


Abb. 10: INF γ Sekretion durch murine T-Zellen.

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert (MOI 0,01) und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium (blaue Balken), nur den murinen gB-BiTE[®] (rote Balken), nur murine T-Zellen (grüne Balken), murine T-Zellen und den murinen gB-BiTE[®] (lila Balken) oder murine T-Zellen und den humanen gB-BiTE[®] (türkise Balken). Die Aktivierung der T-Zellen wurde 48 Stunden nach der Inkubation anhand der Menge an sekretiertem INF γ in den Überständen bestimmt. Der gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte und MCMV Wt infizierte MEFs dienen als Kontrolle der Antigen-Spezifität des BiTE[®]. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE[®] enthielten sollten eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE[®] bestätigen. Der humane gB-BiTE[®] diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 15 pg/ml.

Bestätigt wurden die Ergebnisse nochmals durch eine Immun-Färbung. Hierfür wurden analog wie oben beschrieben MEFs unterschiedlich infiziert und co-kultiviert und mittels einer Färbung des murinen IE 1 Proteins analysiert und so die Ausbreitung der viralen Foci *in vitro* untersucht. Auf Grund der unterschiedlichen Größe und Form der Foci konnte nur eine qualitative Abschätzung der, allerdings deutlich erkennbaren, Effekte erfolgen. In Abbildung 11 C ist zu sehen, dass die Virusausbreitung durch murine T-Zellen und den Spezies-spezifischen gB-BiTE[®] sehr stark zurück geht und eigentlich keine Focus-Bildung mehr erkennbar ist. Uninfizierte Zellen dienen als Kontrolle der Antigen-Spezifität (Abb. 11 A), genauso wie MCMV Wt infizierte MEFs, bei welchen kein Unterschied zwischen den verschiedenen Co-Kulturen sichtbar ist (Abb. 11 B). Auch eine Spezies-unspezifische Wirkung des BiTE[®] ist nicht erkennbar.

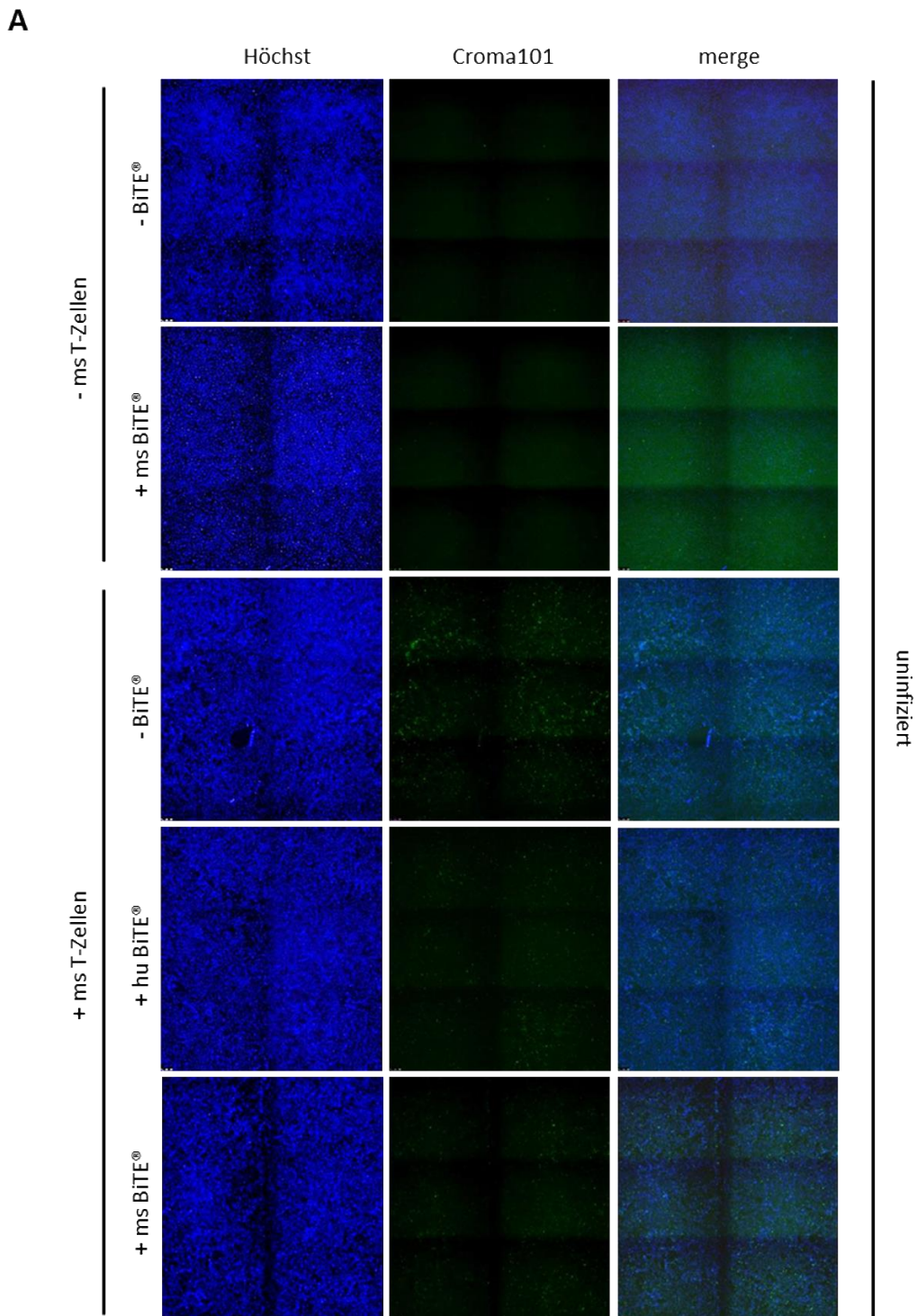


Abb. 11: Inhibition der Focus-Bildung durch murine T-Zellen und den gB-BiTE®.

(A) MEFs blieben uninfiziert und wurden nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den murinen gB-BiTE®, nur murine T-Zellen, murine T-Zellen und den murinen gB-BiTE® oder murine T-Zellen und den humanen gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte MEFs dienen als Kontrolle der Antigen-Spezifität des BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE® bestätigen. Der humane gB-BiTE® diene als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

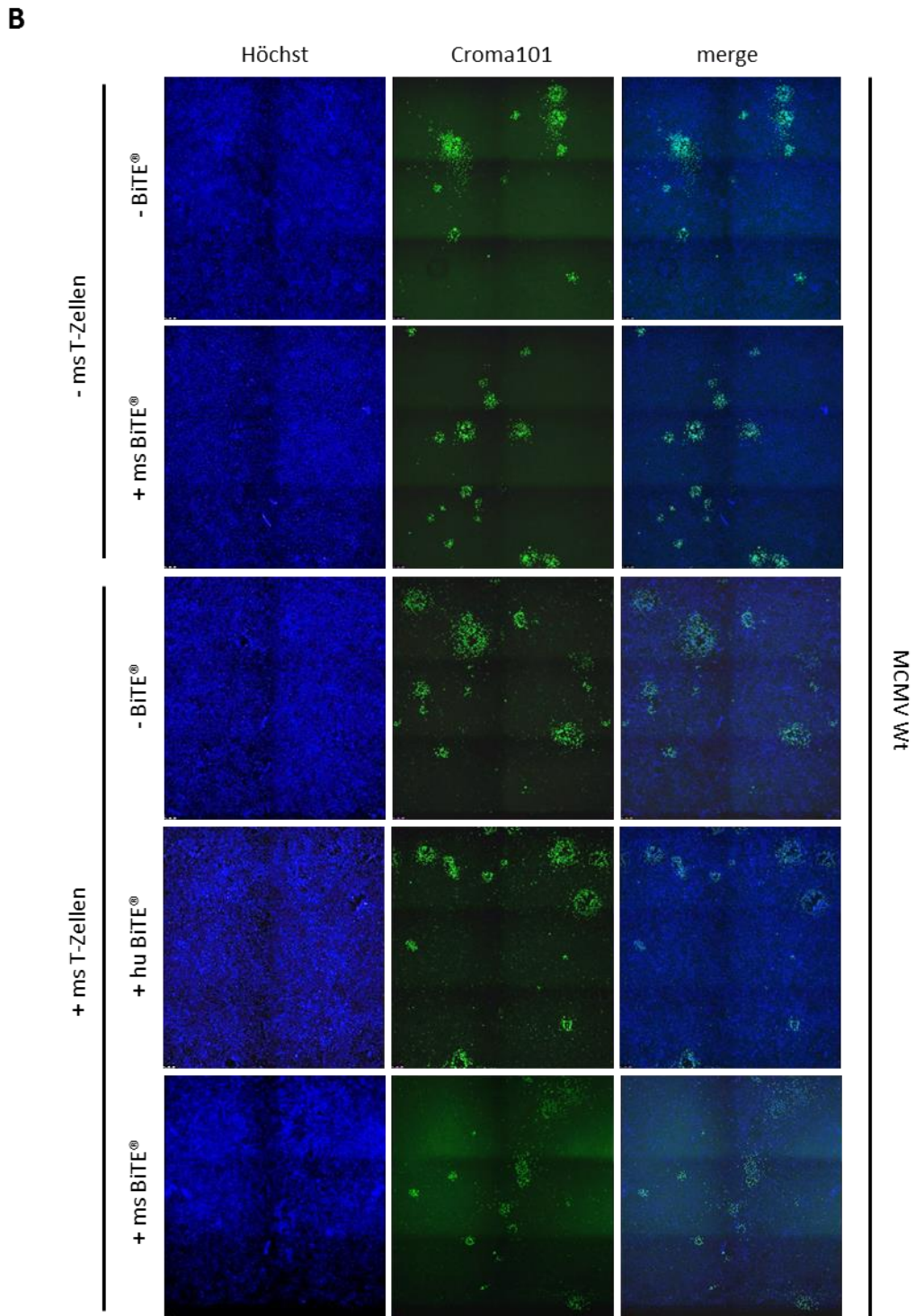


Abb. 11: Inhibition der Focus-Bildung durch murine T-Zellen und den gB-BiTE®.

(B) MEFs wurden mit MCMV Wt infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den murinen gB-BiTE®, nur murine T-Zellen, murine T-Zellen und den murinen gB-BiTE® oder murine T-Zellen und den humanen gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Wt infizierte MEFs dienen als Kontrolle der Antigen-Spezifität des BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE® bestätigen. Der humane gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

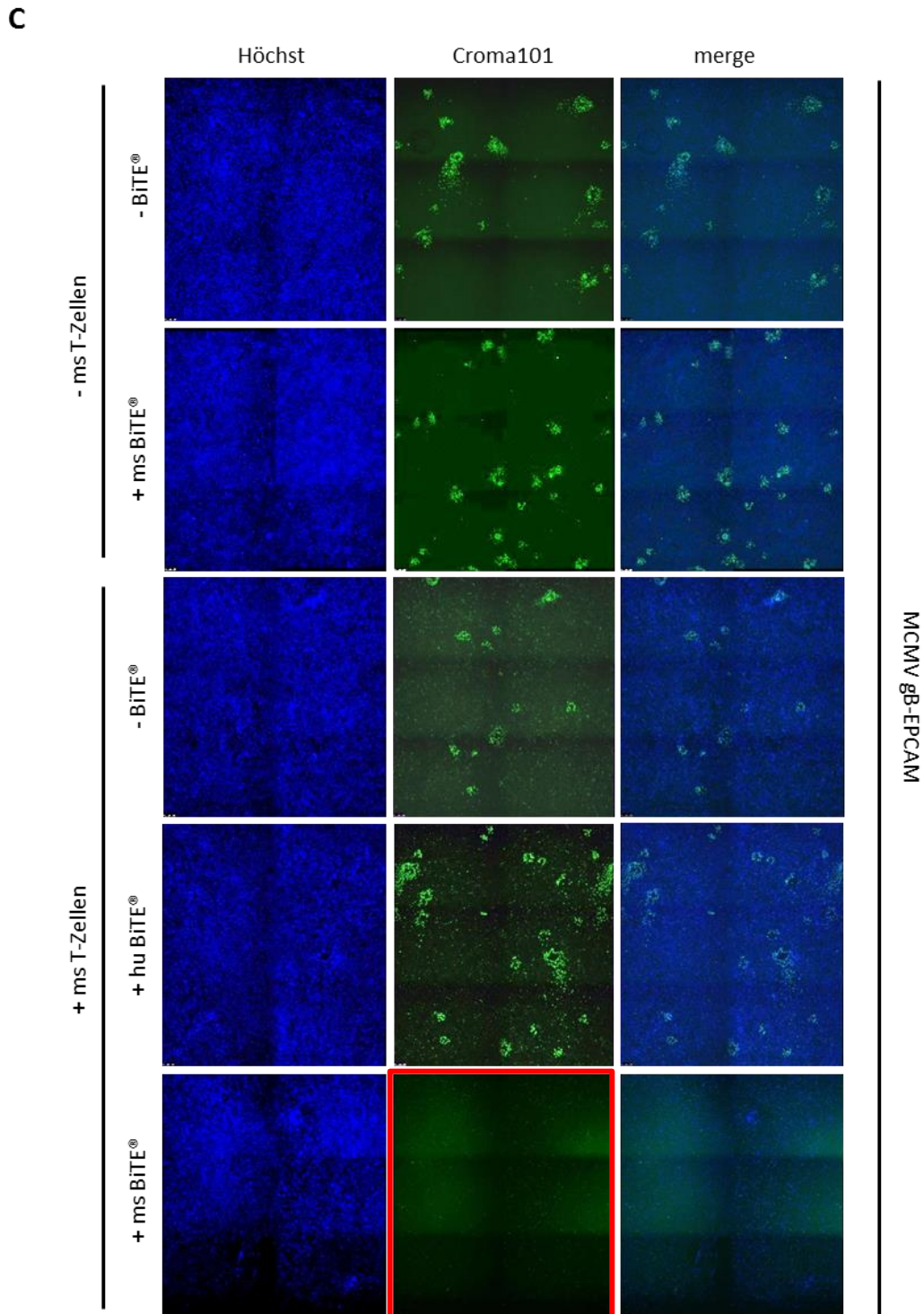


Abb. 11: Inhibition der Focus-Bildung durch murine T-Zellen und den gB-BiTE®.

(B) MEFs wurden mit MCMV gB-EpCAM infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den murinen gB-BiTE®, nur murine T-Zellen, murine T-Zellen und den murinen gB-BiTE® oder murine T-Zellen und den humanen gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE® bestätigen. Der humane gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

Des Weiteren konnte auch die Funktionalität des humanen gB-BiTE[®] mit dem oben beschriebenen Assay überprüft und nachgewiesen werden. Hier wurden jedoch humane anstatt muriner T-Zellen und der humane gB-BiTE[®] als spezifischer Antikörper eingesetzt. Wie in Abbildung 12 zu sehen zeigen weder T-Zellen noch der BiTE[®] alleine einen Effekt auf die Infektion. Eine Spezies-unspezifische sowie eine Antigen-unabhängige Inhibition der viralen Ausbreitung sind ebenso nicht zu erkennen. Was jedoch sichtbar wird, ist eine deutliche Reduktion der Infektion in Ansätzen mit Co-Kulturen von MCMV gB-EpCAM infizierten MEFs und humanen T-Zellen sowie dem humanen gB-BiTE[®].

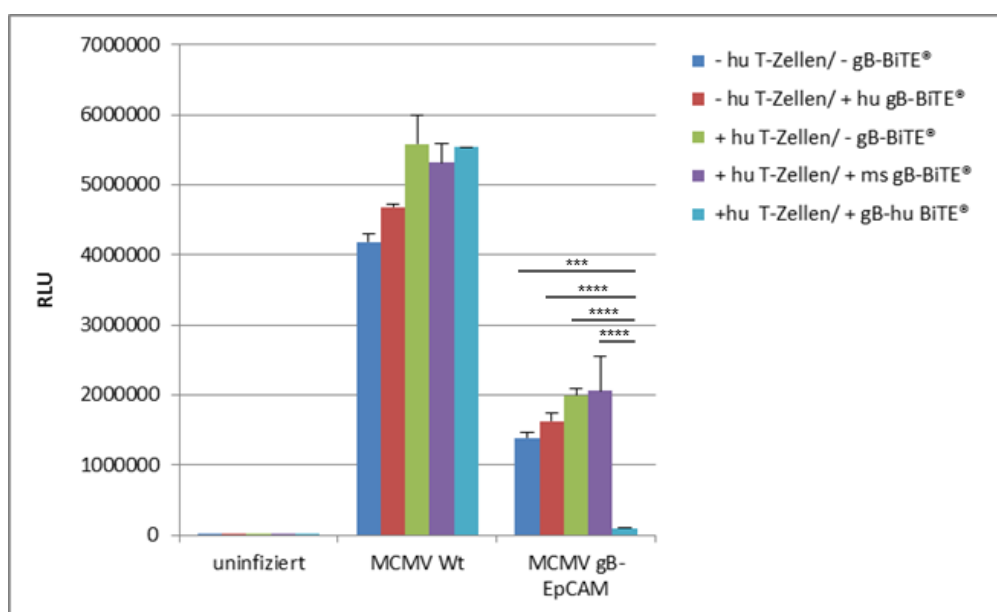


Abb. 12: Inhibition der Virusausbreitung mit humanen T-Zellen und dem humanen gB-BiTE[®].

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert (MOI 0,01) und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium (blaue Balken), nur den humanen gB-BiTE[®] (rote Balken), nur humane T-Zellen (grüne Balken), humane T-Zellen und den murinen gB-BiTE[®] (lila Balken) oder humane T-Zellen und den humanen gB-BiTE[®] (türkise Balken). Eine Analyse der viralen Ausbreitung erfolgte 48 Stunden nach Zugabe der unterschiedlichen Ansätze mittels Luziferase-Assay. Der gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte und MCMV Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des BiTE[®]. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE[®] enthielten sollten eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE[®] bestätigen. Der murine gB-BiTE[®] diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

Wie im Fall des oben beschriebenen Assays mit murinen T-Zellen wurde auch die Aktivierung der humanen T-Zellen durch die Sekretion von IFN γ (Abb. 13) und TNF α in den Überständen der einzelnen Ansätze bestimmt. Anders als bei murinen T-Zellen konnte eine Hintergrund-Sekretion von IFN γ in allen T-Zell-enthaltenden Proben nicht festgestellt werden, was für ausreichend lang geruhte T-Zellen spricht. Hier zeigten jedoch sowohl uninfizierte als auch MCMV Wt und MCMV gB-EpCAM infizierte Ansätze, die zusätzlich den humanen gB-BiTE[®] und humane T-Zellen enthielten, eine Ausschüt-

tung von IFN γ , wobei Proben, die MCMV gB-EpCAM infizierte MEFs enthielten das höchste IFN γ Level aufwiesen. Dieses Ergebnis korreliert dabei mit dem unter 5.2. Auch hier wurde bei einer Konzentration des humanen gB-BiTE[®] von 100 ng/ml eine Sekretion von IFN γ sichtbar. Eine Antigen-unabhängige Bindung und Aktivierung der T-Zellen kann in diesem Fall somit nicht ausgeschlossen werden, eine Spezies-unspezifische Aktivierung durch den murinen gB-BiTE[®] hingegen schon (Abb. 13, rechts, lila).

Eine Produktion des Zytokins TNF α war auch durch humane T-Zellen bei einer unteren Messgrenze des Assays von 7,5 pg/ml nicht messbar.

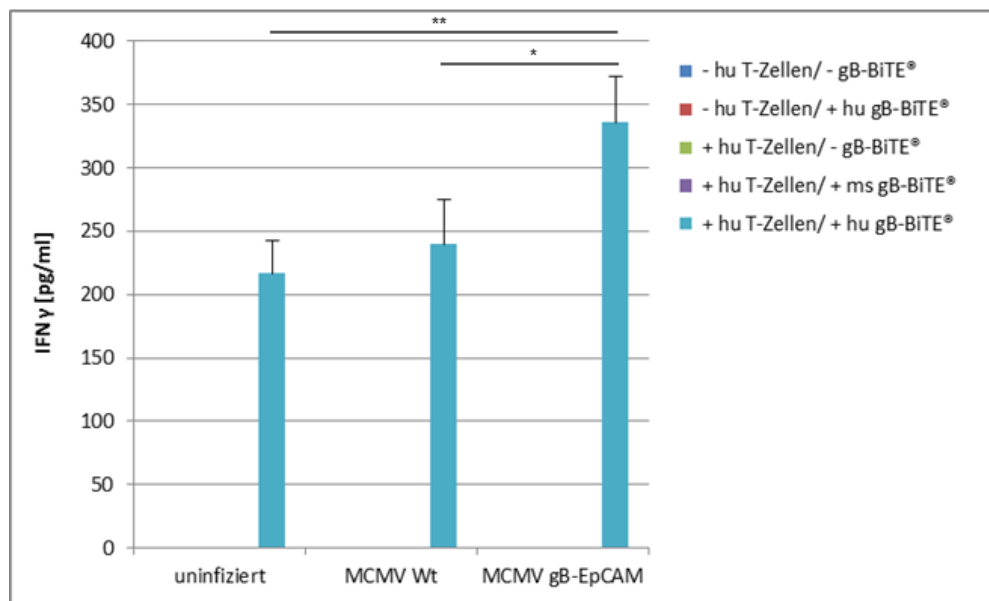


Abb. 13: INF γ Sekretion durch humane T-Zellen.

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert (MOI 0,01) und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium (blaue Balken), nur den humanen gB-BiTE[®] (rote Balken), nur humane T-Zellen (grüne Balken), humane T-Zellen und den murinen gB-BiTE[®] (lila Balken) oder humane T-Zellen und den humanen gB-BiTE[®] (türkise Balken). Die Aktivierung der T-Zellen wurde 48 Stunden nach der Inkubation anhand der Menge an sekretiertem IFN γ in den Überständen bestimmt. Der gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte und MCMV Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des BiTE[®]. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE[®] enthielten sollten eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE[®] bestätigen. Der murine gB-BiTE[®] diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 7,5 pg/ml.

Ebenso wie für Versuche mit murinen T-Zellen wurden auch für Co-Kulturen mit humanen T-Zellen Immun-Färbungen des murinen IE1 Proteins durchgeführt und die Veränderung der viralen Foci-Bildung untersucht. Analog zu murinen T-Zellen sind auch humane T-Zellen, vermittelt durch den humanen gB-BiTE[®] in der Lage die Ausbreitung und Foci-Bildung Antigen-spezifisch zu hemmen (Abb. 14 A-C). In Abbildung 14 C wird jedoch deutlich, dass die Ausbreitung der Infektion nicht so stark wie durch murine T-Zellen inhibiert wird und einige wenige Foci erkennbar bleiben.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Funktionalität sowohl des murinen als auch des humanen gB-BiTE[®] *in vitro*. Co-Kulturen von MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen und T-Zellen mit dem jeweiligen Spezies-spezifischen gB-BiTE[®] zeigen eine deutliche Verminderung der viralen Ausbreitung und Foci-Bildung sowie eine starke Aktivierung der T-Zellen. Es konnte eine Sekretion von IFN γ , jedoch nicht von TNF α beobachtet werden.

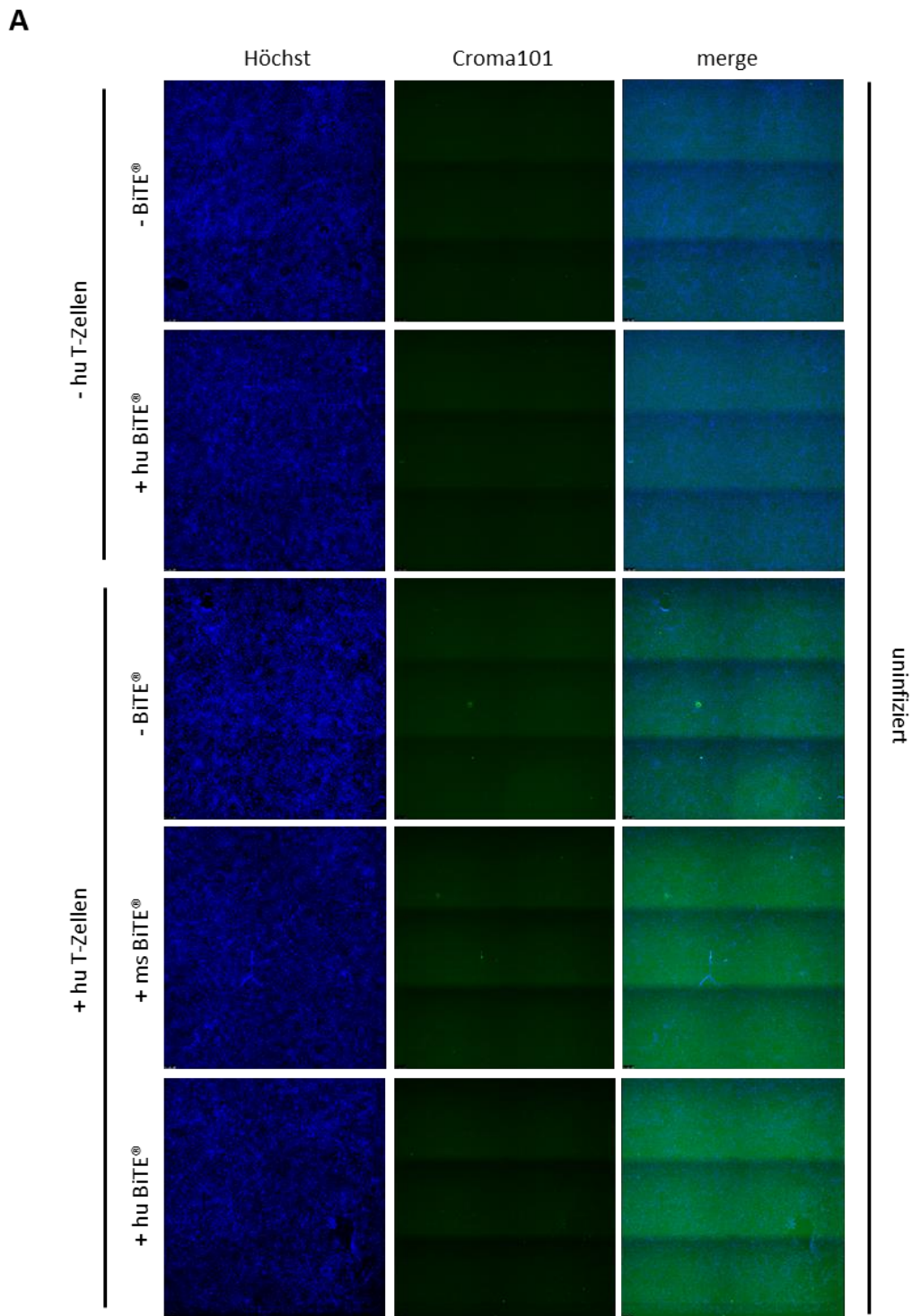


Abb. 14: Inhibition der Focus-Bildung durch humane T-Zellen und den gB-BiTE®.

(A) MEFs blieben uninfiziert und wurden nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den humanen gB-BiTE®, nur humane T-Zellen, humane T-Zellen und den humanen gB-BiTE® oder humane T-Zellen und den humanen gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE® bestätigen. Der murine gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

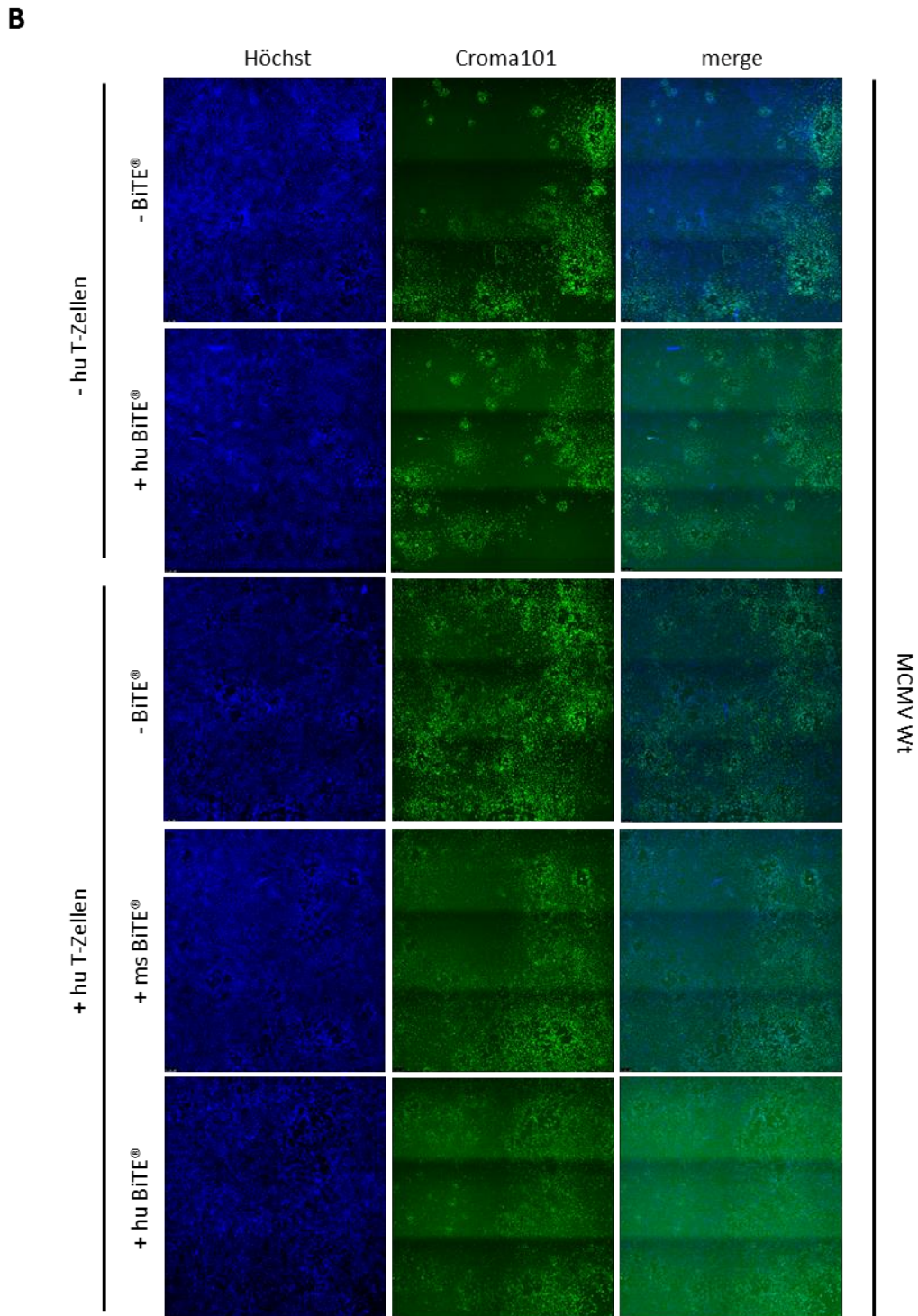


Abb. 14: Inhibition der Focus-Bildung durch humane T-Zellen und den gB-BiTE®.

(B) MEFs wurden mit MCMV Wt infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den humanen gB-BiTE®, nur humane T-Zellen, humane T-Zellen und den humanen gB-BiTE®, 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE® bestätigen. Der murine gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

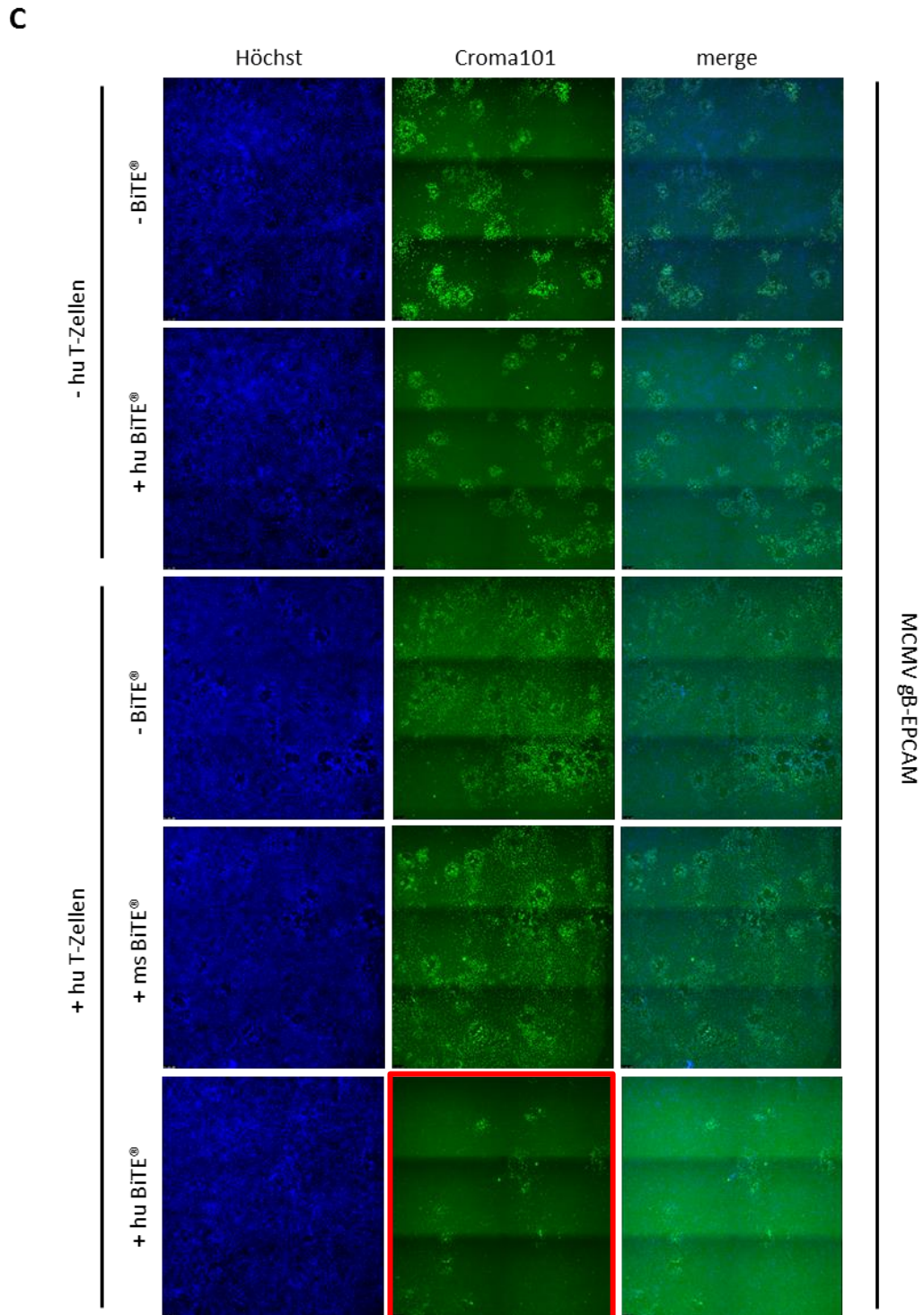


Abb. 14: Inhibition der Focus-Bildung durch humane T-Zellen und den gB-BiTE®.

(C) MEFs wurden mit MCMV gB-EpCAM infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den humanen gB-BiTE®, nur humane T-Zellen, humane T-Zellen und den murinen gB-BiTE® oder humane T-Zellen und den humanen gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und BiTE® bestätigen. Der murine gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

5.4 Analyse der Anzahl viraler Genomkopien nach Co-Infekt und Behandlung mit T-Zellen und gB-BiTE®

Durch die bisherigen Ergebnisse konnte eine Hemmung der viralen Ausbreitung *in vitro* in MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen durch die Co-Inkubation mit T-Zellen und dem jeweils Spezies-spezifischen gB-BiTE® und eine damit verbundene Sekretion von IFN γ durch die T-Zellen gezeigt werden. Es stellte sich nun die Frage, ob die Inhibition rein durch die Ausschüttung von IFN γ und eventueller anderer Zytokine entsteht, oder ob noch weitere Mechanismen, die möglicherweise zu einer direkte Inhibition des gB-EpCAM Virus führen, daran beteiligt sind. Um dies zu überprüfen, wurden MEFs gleichzeitig mit MCMV Wt als auch mit der gB-EpCAM Variante infiziert und dann mit murinen T-Zellen und dem murinen gB-BiTE® inkubiert. Um die Unterschiede in der Replikationsgeschwindigkeit der beiden Viren auszugleichen wurde das gB-EpCAM Virus hier mit einer etwas höheren MOI (0,02) eingesetzt.

24 Stunden nach der Infektion mit beiden Viren erfolgte die Zugabe von murinen T-Zellen und entweder keinem, dem humanen oder dem murinen gB-BiTE®. Der humane BiTE® diente dabei als Kontrolle. Nach einer Co-Inkubation von 48 Stunden erfolgte zunächst eine Analyse der Virusausbreitung mittels Luziferase-Assay. Hier wird eine leichte Hemmung der Infektionsausbreitung bei Zugabe des murinen BiTE® sichtbar (Abb. 15).

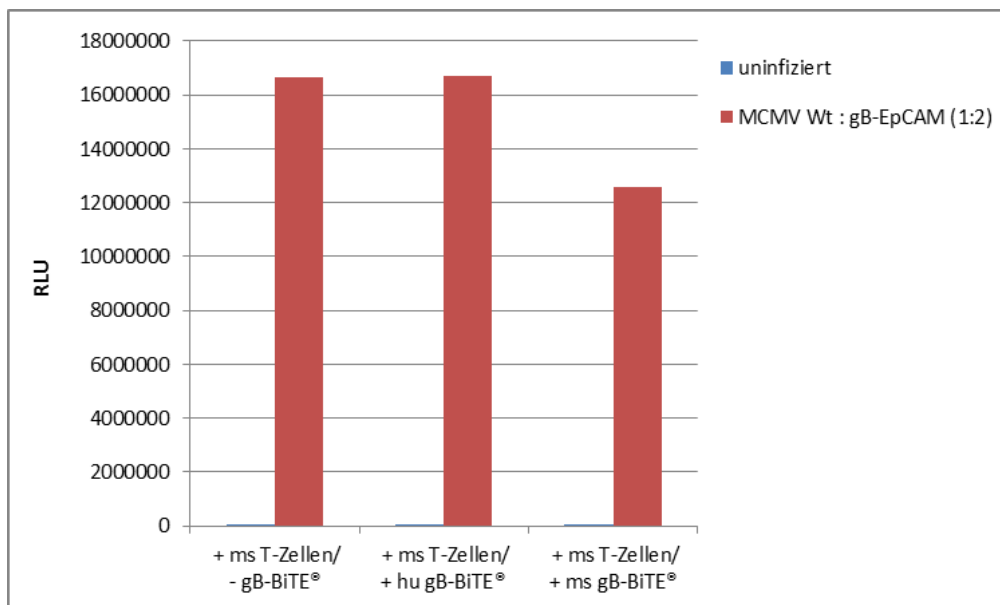


Abb. 15: Inhibition der Virusausbreitung durch murine T-Zellen und den murinen gB-BiTE® nach Co-Infekt.

MEFs wurden gleichzeitig mit MCMV Wt und gB-EpCAM in einem Verhältnis von 1:2 infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Co-Kulturen behandelt. Diese enthielten entweder nur murine T-Zellen, murine T-Zellen und den murinen gB-BiTE® oder murine T-Zellen und den humanen gB-BiTE®. Letzteres diente dabei zusammen mit uninfizierten MEFs als Kontrolle. Die Analyse der Infektionsausbreitung erfolgte 48 Stunden nach der Inkubation mittels Luziferase-Assay.

Die Hauptanalyse erfolgte durch eine quantitative Real-Time PCR, in welcher die Gesamtanzahl an viralen MCMV Wt und gB-EpCAM Kopien bestimmt wurde.

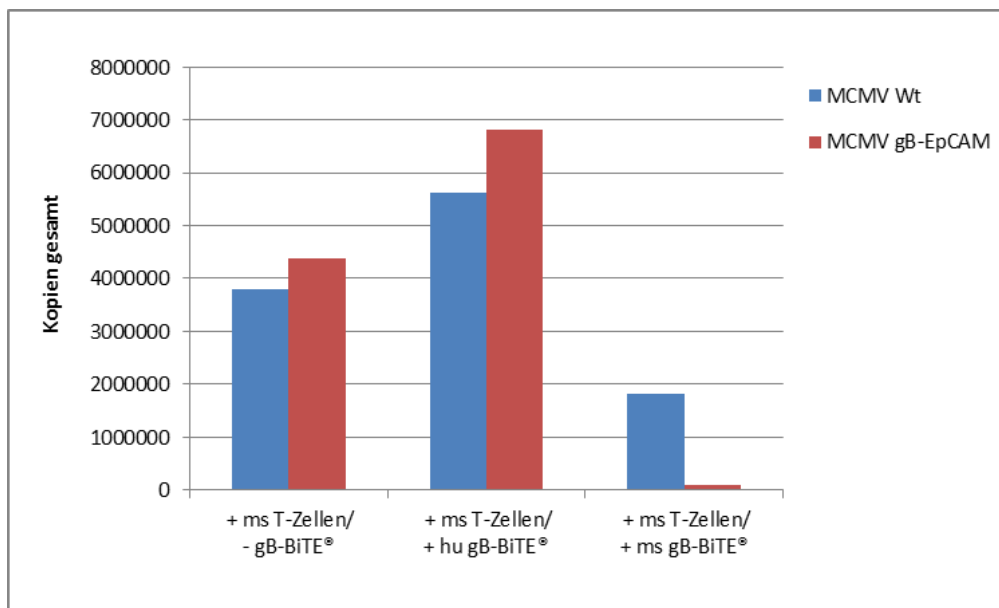


Abb. 16: Anzahl viraler Genomkopien nach Co-Infekt und Behandlung mit murinen T-Zellen und dem murinen gB-BiTE®.

MEFs wurden gleichzeitig mit MCMV Wt und gB-EpCAM in einem Verhältnis von 1:2 infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Co-Kulturen behandelt. Diese enthielten entweder nur murine T-Zellen, murine T-Zellen und den murinen gB-BiTE® oder murine T-Zellen und den humanen gB-BiTE®. Letzteres diente als Kontrolle. Die Anzahl an viralen Genomkopien wurde mittel quantitativer Real-Time PCR mit Taqman-Sonden bestimmt. Angegeben ist die Anzahl an Kopien im gesamten Ansatz.

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass durch die Anpassung der MOIs zum Messzeitpunkt eine relativ ähnliche Menge beider viralen Genome in den beiden Kontrollansätzen enthalten ist. Was deutlich wird ist die, vermutlich durch die IFN γ -Sekretion bedingte Reduktion sowohl der Anzahl an Wt als auch an gB-EpCAM Genomkopien in Ansätzen mit murinen T-Zellen und dem murinen gB-BiTE®. Beachtenswert ist die im Vergleich zum Wt noch geringere Anzahl an MCMV gB-EpCAM Kopien, was für einen zusätzlichen direkten Effekt des murinen gB-BiTE® in Verbindung mit T-Zellen auf MCMV gB-EpCAM infizierte Zellen hindeuten könnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass neben einer durch den gB-BiTE® vermittelten, parakrinen Zytokin-abhängigen generellen Inhibition der MCMV Virusausbreitung vermutlich noch direkte Mechanismen beteiligt sind, welche einen spezifischen Einfluss ausschließlich auf gB-exprimierende Zellen zu haben.

5.5 Resistenz infizierter Zellen gegenüber der gB-BiTE[®]-vermittelten Lyse durch T-Zellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob murine T-Zellen eine durch den murinen gB-BiTE[®] vermittelte Zytolyse der MCMV gB-EpCAM infizierten Zielzellen auslösen können. Proff et al. haben bereits gezeigt, dass gB-spezifische CAR T-Zellen zwar Zytokine ausschütten und dadurch die Ausbreitung von HCMV in HFF *in vitro* hemmen können, jedoch nicht in der Lage sind eine Zytolyse infizierter Zellen auszulösen. gB-exprimierenden 293T-Zellen werden hingegen effektiv durch CAR T-Zellen lysiert (Full et al., 2010). Bei unseren Kooperationspartnern (Brey et al., 2018) konnte mit der humanen Variante des gB-BiTE[®] keine Lyse infizierter Zielzellen durch humane T-Zellen beobachtet werden. Mit gB-exprimierenden 293Ts als Zielzellen wiederum war eine durch den gB-BiTE[®] vermittelte Zytolyse messbar.

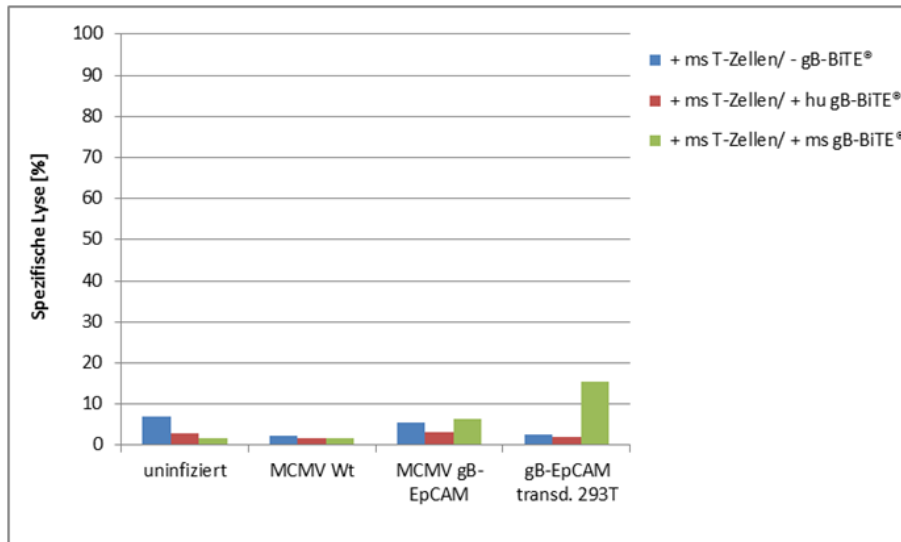
Um nun zu überprüfen ob der murine gB-BiTE[®] in der Lage ist die Lyse infizierter Zielzellen durch die T-Zellen zu induzieren, wurde ein Europium-basierter Zytotoxizitäts-Assay angewandt. Hierfür wurden MEFs entweder mit dem MCMV Wt oder gB-EpCAM Virus infiziert und nach 48 Stunden für vier Stunden mit murinen T-Zellen und dem murinen BiTE[®] co-inkubiert. Zur Kontrolle der Spezies- und Antigen-Spezifität wurden zusätzlich ein Ansatz mit T-Zellen und dem humanen gB-BiTE[®] und uninfizierte Zellen mit T-Zellen und den unterschiedlichen BiTE[®] Molekülen mitgeführt. Ein paralleler Versuch mit 293T Zellen, welche durch lentivirale Transduktion stabil das HCMV gB auf ihrer Oberfläche exprimieren, sollte zeigen, dass der BiTE[®] die Fähigkeit zur Induktion der Lyse nicht-infizierter Zellen besitzt. Die Expression von gB auf der Oberfläche wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse überprüft. Die Aktivierung der T-Zellen wurde wiederum durch die Menge an sekretiertem IFN γ und TNF α quantifiziert.

In Abbildung 17 A ist zu sehen, dass weder in den Kontrollen noch in MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen eine durch den murinen gB-BiTE[®] induzierte Lyse messbar war. Diese Beobachtung stimmt mit bereits beschriebenen Ergebnissen zur Resistenz CMV-infizierter Zellen gegenüber der Lyse durch aktivierte T-Zellen überein (Proff et al., 2016; Brey et al., 2018). An 293T gB-exprimierenden Zellen zeigte sich nur ein leichter zytolytischen Effekt. Dies ist möglicherweise jedoch durch eine geringe Transduktions- und Expressions-Effizienz bedingt. Während 91% der MCMV gB-EpCAM infizierte MEFs das HCMV gB auf ihrer Oberfläche exprimieren, war gB auf lediglich 5% der 293Ts nachweisbar (Abb. 17 C). Wt infizierte Zellen zeigen keine gB-Expression.

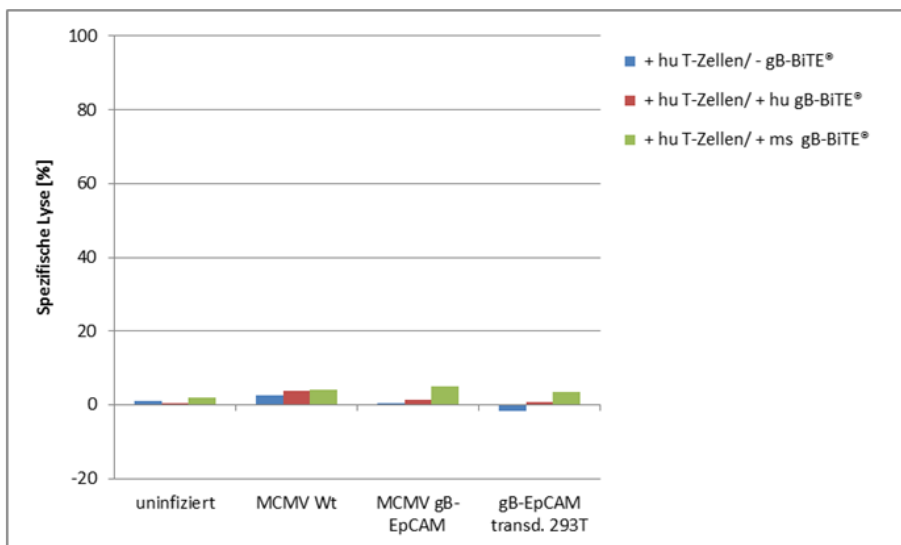
Auch in MEF-Co-Kulturen mit humanen T-Zellen und der humanen Variante des gB-BiTE[®] als spezifischer Antikörper konnte keine Zielzellyse festgestellt werden (Abb. 17

B). Allerdings ist durch die schlechte Transduktions-Effizienz auch bei gB-exprimierenden 293Ts keine spezifische Lyse erkennbar.

A



B



C

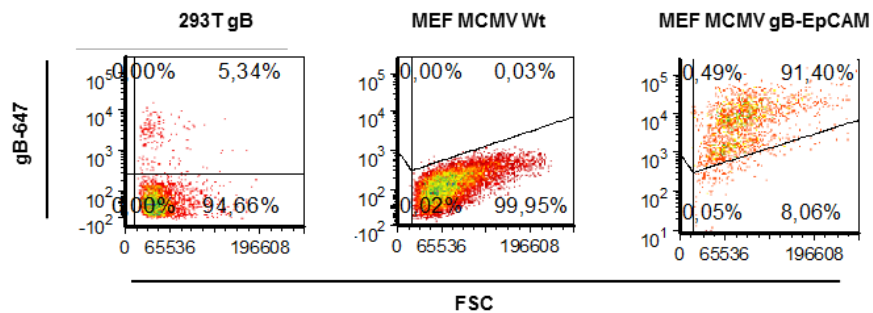
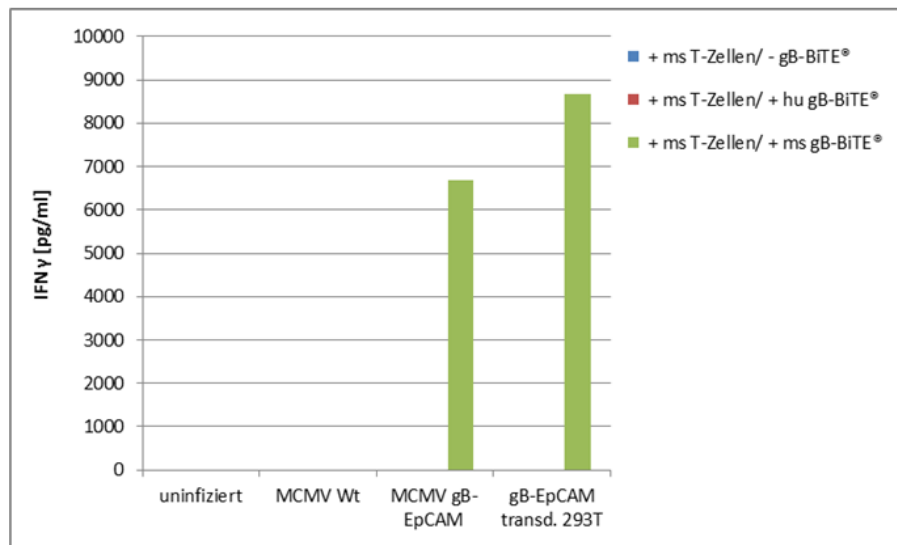
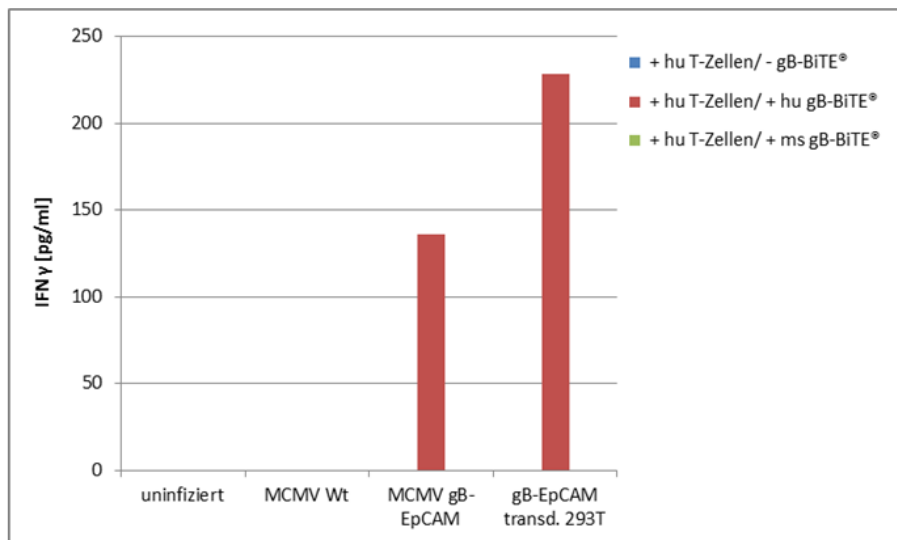


Abb. 17: Resistenz infizierter Zellen gegenüber Lyse durch T-Zellen.

(A), (B) Europium-basierter Zytotoxizitäts-Assay. MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder gB-EpCAM infiziert und 24 Stunden später mit verschiedenen Ansätzen für 4 Stunden inkubiert. Diese waren: nur T-Zellen, T-Zellen und muriner BiTE[®] oder T-Zellen und humaner BiTE[®]. Uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Als weitere Kontrolle wurden 293Ts lenti-viral mit einem gB-EpCAM-Konstrukt transduziert. Der gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. **(A)** Co-Kulturen wurden mit murinen T-Zellen angesetzt. Der humane BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle. **(B)** Co-Kulturen wurden mit humanen T-Zellen angesetzt. Der murine BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse der gB-Expression infizierter MEFs und gB-EpCAM-transduzierten 293Ts. Die Zellen wurden mit PFA fixiert und gB auf der Oberfläche mit dem Hybridomüberstand 27-287 und einem sekundären anti-Maus Alexa[®] 647 gefärbt.

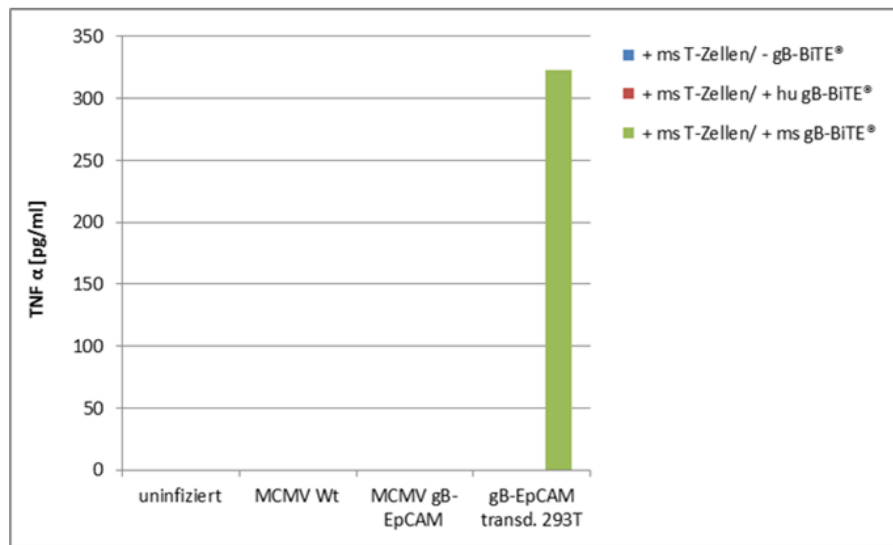
Betrachtet man jedoch die Sekretion von IFN γ , so wird eine durch den murinen (Abb. 18 A) bzw. humanen gB-BiTE[®] (Abb. 18 B) vermittelte Aktivierung der T-Zellen deutlich erkennbar. Humane T-Zellen schütten dabei deutlich weniger IFN γ aus als murine. Trotz der schwachen Expression von gB auf transduzierten 293Ts kommt es sowohl mit dem murinen als auch dem humanen BiTE[®] zu einer Aktivierung der T-Zellen. Eine Produktion von TNF α kann in infizierten Zellen nicht beobachtet werden, in gB exprimierenden 293Ts dagegen schon und zwar sowohl mit humanen (Abb. 19 B) als auch murinen T-Zellen (Abb. 19 A).

Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, dass MCMV infizierte Zellen gegenüber der Lyse durch T-Zellen resistent sind. Weder humane noch murine T-Zellen können MCMV infizierte MEF Zellen effizient lysieren, wenn die Erkennung durch den entsprechenden gB-BiTE[®] vermittelt wird. Die gB-exprimierenden 293T Zellen weisen aufgrund einer sehr geringen gB-Expression nur eine geringe bis keine Zielzelllyse auf. Dennoch genügt bereits diese geringe gB Expression zur Aktivierung der T-Zellen, die anhand der Sekretion von IFN γ in Co-Kulturen von MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen mit T-Zellen und dem entsprechend Spezies-spezifischen gB-BiTE[®] deutlich wird. Ähnlich infizierten MEFs wird auch nach Kontakt mit gB-293T große Mengen an IFN γ sekretiert; eine Ausschüttung von TNF α erfolgt hingegen nur bei den gB-293T. Die Daten zeigen somit, dass die durch den gB-BiTE[®] vermittelte Hemmung der viralen Ausbreitung *in vitro* nicht durch eine Lyse der infizierten Zielzellen, sondern vornehmlich durch eine Zytokin-Ausschüttung und mögliche andere, nicht-lytische Mechanismen bedingt ist.

A**B****Abb. 18: INF γ Sekretion durch murine und humane T-Zellen.**

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder gB-EpCAM infiziert und 24 Stunden später mit verschiedenen Ansätzen für 4 Stunden inkubiert. Diese waren: nur T-Zellen, T-Zellen und muriner BiTE[®] oder T-Zellen und humaner BiTE[®]. Uninfizierte Zellen dienen als Kontrolle. Als weitere Kontrolle wurden gB-exprimierende 293Ts verwendet. Der gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Die Aktivierung der T-Zellen wurde 4 Stunden nach der Inkubation anhand der Menge an sekretiertem INF γ in den Überständen aus dem Zytotoxizitäts-Assay bestimmt. **(A)** Co-Kulturen wurden mit murinen T-Zellen angesetzt. Der humane BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 15 pg/ml. **(B)** Co-Kulturen wurden mit humanen T-Zellen angesetzt. Der murine BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 7,5 pg/ml.

A



B

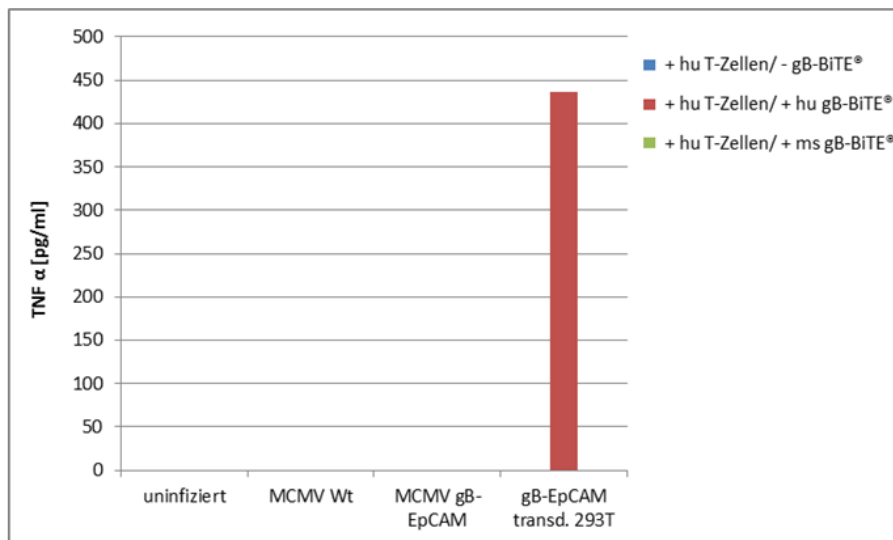


Abb. 19: TNF α Sekretion durch murine und humane T-Zellen.

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder gB-EpCAM infiziert und 24 Stunden später mit verschiedenen Ansätzen für 4 Stunden inkubiert. Diese waren: nur T-Zellen, T-Zellen und muriner BiTE[®] oder T-Zellen und humaner BiTE[®]. Uninfizierte Zellen dienen als Kontrolle. Als weitere Kontrolle wurden gB-exprimierende 293Ts verwendet. Der gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Die Aktivierung der T-Zellen wurde 4 Stunden nach der Inkubation anhand der Menge an sekretiertem TNF α in den Überständen aus dem Zytotoxizitäts-Assay bestimmt. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 7,5 pg/ml. **(A)** Co-Kulturen wurden mit murinen T-Zellen angesetzt. Der humane BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle. **(B)** Co-Kulturen wurden mit humanen T-Zellen angesetzt. Der murine BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle.

5.6 Bestimmung der benötigten Menge HWZv gB-BiTE[®] zur Vermittlung einer optimalen T-Zell Aktivierung

Die geringe Halbwertszeit der BiTE[®]-Moleküle im Organismus von rund 2 Stunden (Stieglmaier et al., 2015; Hoffman et al., 2014) und die damit verbundene Notwendigkeit einer konstanten Gabe, z.B. per Dauerinfusion oder zumindest täglichen Applikation, ist bei der potentiellen Verwendung in einem *in vivo* Mausmodell eher von Nachteil. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Amgen eine murine und eine humane Variante des gB-BiTE[®] entwickelt, welche eine verlängerte Halbwertszeit aufweisen (gB-BiTE[®] HWZv), so dass eine einmalige wöchentliche Gabe in der Regel ausreichend ist.

Die Funktionalität der neuen, halbwertszeitverlängerten (HWZv) BiTE[®] Moleküle wurde im Folgenden analog zu den normalen BiTE[®] Molekülen überprüft. Als erstes sollte eine geeignete Konzentration des HWZv BiTE[®], die zu einer optimalen Aktivierung der T-Zellen führt, ermittelt werden. Hierzu wurden MEFs mit einer geringen MOI (0,01) MCMV gB-EpCAM infiziert und 24 Stunden danach mit CD3/CD28 stimulierten murinen oder humanen T-Zellen co-kultiviert. Außerdem erfolgte die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des jeweils Spezies-spezifischen HWZv gB-BiTE[®]. Analysiert wurde die virale Ausbreitung mittels eines Luziferase-Assays. Eine Hemmung der Infektionsausbreitung ist sowohl mit dem murinen (Abb. 20 A) als auch dem humanen (Abb. 20 B) HWZv BiTE[®] bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml zu sehen. Mit steigender Konzentration des HWZv gB-BiTE[®] wird auch die Ausbreitung der Viren weiter gehemmt. Erst ab einer Konzentration von 100 ng/ml kann keine weitere Inhibition erzielt werden. Uninfizierte Zellen dienten hier als Kontrolle.

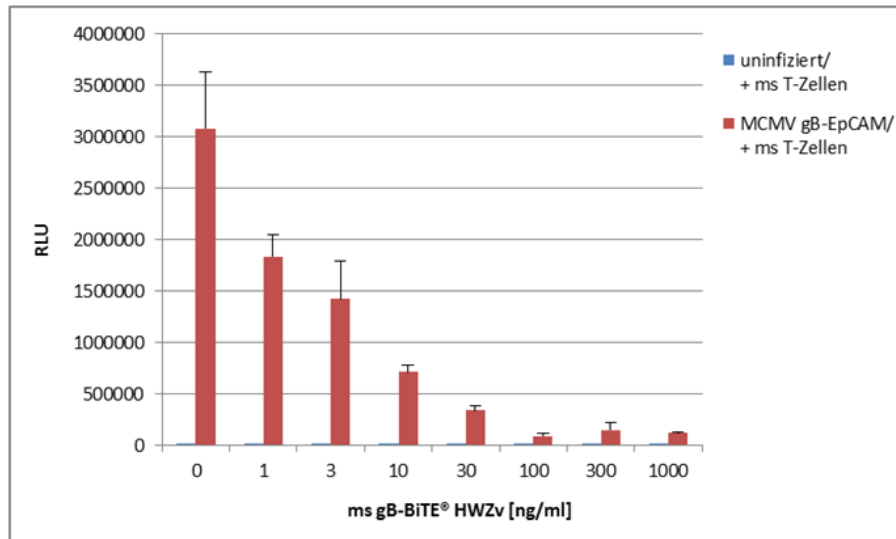
Eine Aktivierung der T-Zellen wurde durch die Quantifizierung der Menge an sekretiertem IFN γ analysiert (Abb. 21). In Co-Kulturen mit murinen T-Zellen steigt die Produktion von IFN γ mit steigender HWZv gB-BiTE[®] Konzentration stetig an (Abb. 21 A). Humane T-Zellen hingegen schütten allgemein weniger IFN γ aus und zeigen im Bereich von 1 ng/ml bis 300 ng/ml eine relativ konstante Sekretion, welche erst bei 1000 ng/ml HWZv gB-BiTE[®] um etwa das Doppelte ansteigt (Abb. 21 B).

Eine Sekretion von TNF α konnte weder in Co-Kulturen mit humanen noch murinen T-Zellen gemessen werden (Nachweisgrenzen bei 7,5 pg/ml).

Anhand dieser Ergebnisse konnte ein erster Hinweis auf die Funktionalität der HWZv gB-BiTE[®] erbracht werden. Beide Varianten (murin und human) des HWZv gB-BiTE[®] sind dabei in der Lage, bereits ab relativ geringen Konzentrationen, eine Aktivierung der T-Zellen zu vermitteln und dadurch die Virusausbreitung zu hemmen. Die Konzentration an sekretiertem IFN γ steigt in Co-Kulturen mit murinen T-Zellen parallel mit der Kon-

zentration an HWZv gB-BiTE[®] an. In Kombination mit humanen T-Zellen ist eine gesteigerte IFN γ - Ausschüttung erst mit 1000 ng/ml HWZv gB-BiTE[®] zu sehen. TNF α konnte in keinem Ansatz detektiert werden. Für alle folgenden Versuche wurde, wie bei seinem Vorgänger, eine Konzentration von 100 ng/ml HWZv gB-BiTE[®] festgelegt.

A



B

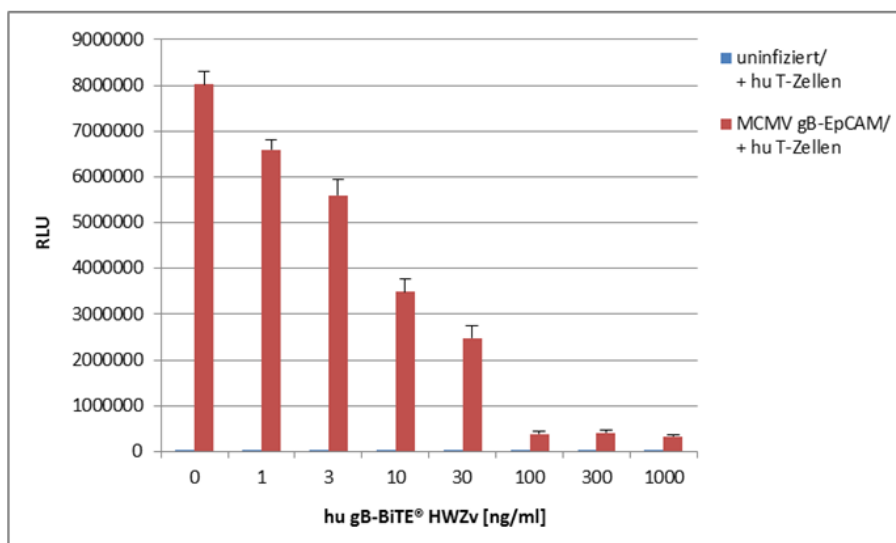
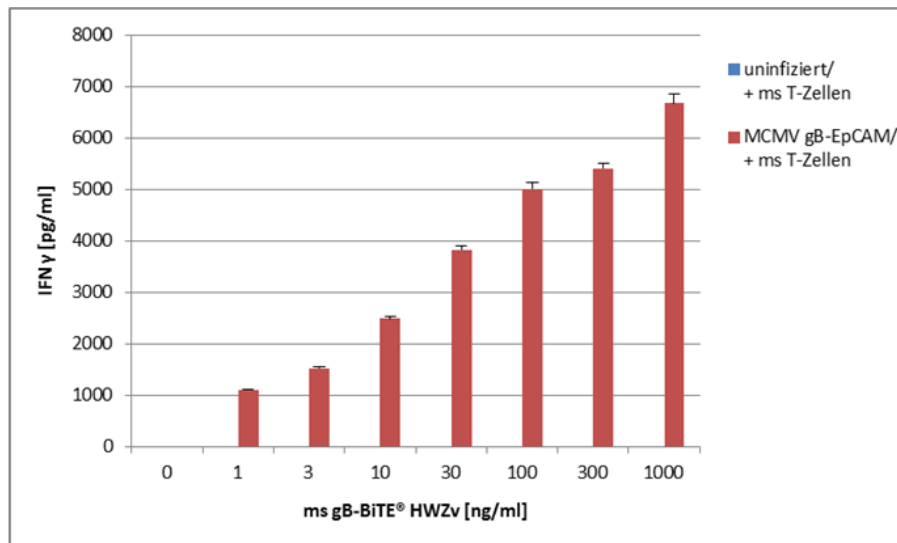
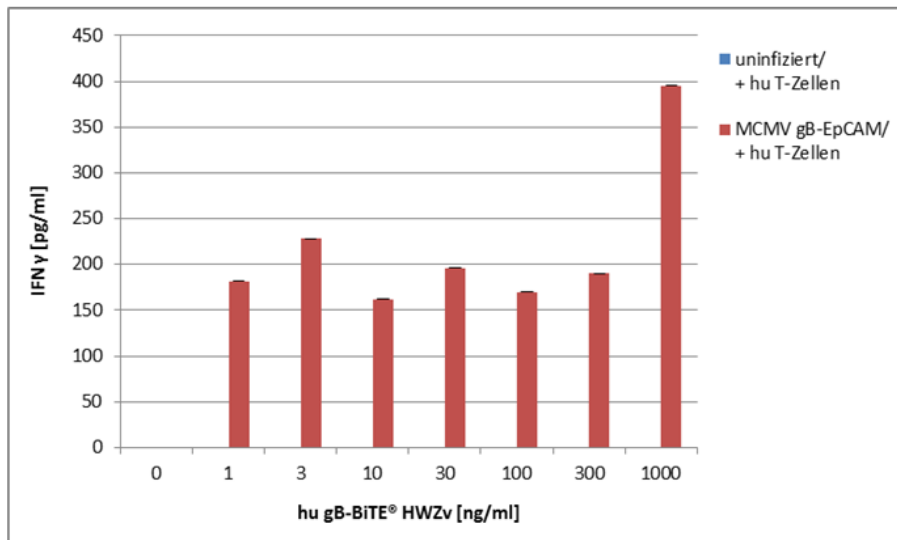


Abb. 20: Hemmung der Virusausbreitung mit unterschiedlichen Konzentrationen des HWZv gB-BiTE[®].

(A) MEFs wurden 24 Stunden nach Infektion mit MCMV-gB EpCAM mit murinen T-Zellen und unterschiedlichen Konzentrationen des murinen HWZv gB-BiTE[®] co-kultiviert und die Virusausbreitung nach 48 Stunden mittels eines Luciferase-Assays analysiert. Als Kontrolle dienten uninfizierte MEFs. **(B)** Hier erfolgte die Co-Kultur mit humanen T-Zellen und dem humanen HWZv gB-BiTE[®].

A**B****Abb. 21: INF γ Sekretion durch T-Zellen.**

(A) MEFs wurden 24 Stunden nach Infektion mit MCMV-gB EpCAM mit murinen T-Zellen und unterschiedlichen Konzentrationen des murinen HWZv gB-BiTE[®] co-kultiviert und die Aktivierung der T-Zellen nach 48 Stunden anhand der Menge an sekretiertem INF γ in den Überständen bestimmt. Als Kontrolle dienten uninfizierte MEFs. (B) Hier erfolgte die Co-Kultur mit humanen T-Zellen und dem humanen HWZv gB-BiTE[®].

5.7 Inhibition der Virusausbreitung *in vitro* durch T-Zellen und HWZv gB-BiTE[®]

Der Nachweis der Funktionalität der HWZv gB-BiTE[®] erfolgte analog wie schon für den normalen gB-BiTE[®] unter 5.3 beschrieben. MCMV Wt und MCMV gB-EpCAM infizierte MEFs wurden 24 Stunden nach der Infektion mit murinen T-Zellen und dem murinen HWZv gB-BiTE[®] oder dem humanen HWZv BiTE[®] für 48 Stunden co-kultiviert. Die humane Variante diente dabei als Kontrolle für die Spezies-Spezifität der Antikörper. Um auszuschließen, dass ein Effekt allein durch den BiTE[®] oder allein durch die T-Zellen entsteht, wurde jeweils ein Ansatz mit T-Zellen, aber ohne BiTE[®] und ohne T-Zellen, dafür mit BiTE[®] mitgeführt. Zur Überprüfung einer möglichen Antigen-unabhängigen Aktivierung der T-Zellen dienten MCMV Wt infizierte oder uninfizierte Zellen. Analysiert wurde die Virusausbreitung mittels Luziferase-Assay.

Abbildung 22 zeigt den Effekt der HWZv gB-BiTE[®] Moleküle mit murinen T-Zellen. Deutlich zu sehen ist die starke Reduktion der Virus-Dissemination bei Zugabe des murinen HWZv gB-BiTE[®] und murinen T-Zellen zu MCMV gB-EpCAM infizierten MEFs (rechts, lila). Eine alleinige Wirkung des BiTE[®] (rot) oder der T-Zellen (grün) ist nicht zu erkennen. Auch eine Spezies-unspezifische Bindung des Antikörpers liegt nicht vor (türkis). Was jedoch auffällt ist eine leichte, durch den murinen HWZv gB-BiTE[®] vermittelte Hemmung der Infektionsausbreitung bei MCMV Wt infizierten Zellen (Mitte, lila). Eine ausschließlich gB-Antigen-spezifische Bindung des murinen HWZv gB-BiTE[®] kann somit nicht bestätigt werden.

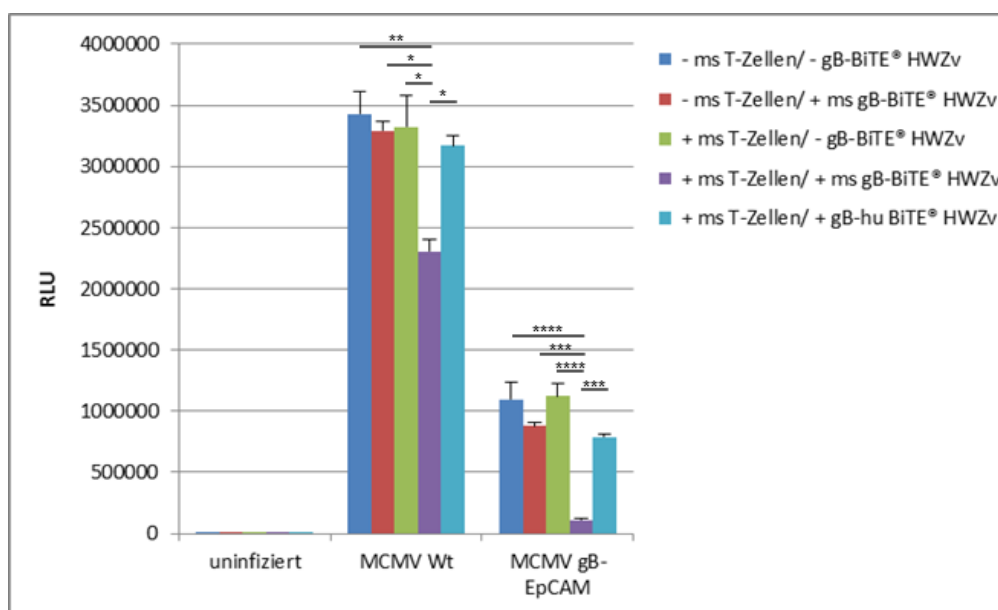


Abb. 22: Inhibition der Virusausbreitung mit murinen T-Zellen und dem murinen HWZv gB-BiTE®.

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert (MOI 0,01) und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium (blaue Balken), nur den murinen HWZv gB-BiTE® (rote Balken), nur murine T-Zellen (grüne Balken), murine T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® (lila Balken) oder murine T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE® (türkise Balken). Eine Analyse der viralen Ausbreitung erfolgte 48 Stunden nach Zugabe der unterschiedlichen Ansätze mittels Luziferase-Assay. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte und MCMV Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des HWZv BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der humane HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

Betrachtet man die Sekretion von IFN γ , wird deutlich, dass T-Zellen auch in Co-Kultur mit MCMV Wt infizierten Zellen und dem murinen HWZv gB-BiTE® aktiviert werden (Abb. 23). Die ausgeschüttete Menge an IFN γ und die damit verbundene Aktivierung der T-Zellen ist jedoch wesentlich geringer als bei einer gB-spezifische Bindung des HWZv BiTE®. Da Co-Kulturen mit uninfizierten Zellen keine IFN γ Produktion aufweisen, spricht dies nicht für eine unspezifische Bindung des HWZv BiTE® an zelluläre, sondern eher an virale Oberflächen-Moleküle. Eine Sekretion von TNF α konnte auch hier nicht beobachtet werden.

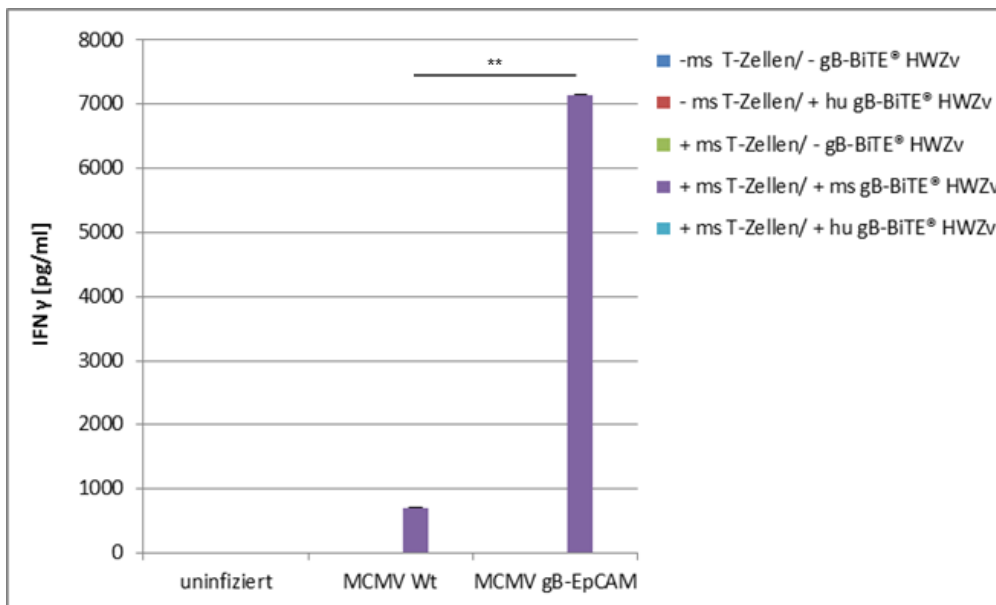


Abb. 23: INF γ Sekretion durch murine T-Zellen.

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert (MOI 0,01) und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium (blaue Balken), nur den murinen HWZv gB-BiTE® (rote Balken), nur murine T-Zellen (grüne Balken), murine T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® (lila Balken) oder murine T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE® (türkise Balken). Die Aktivierung der T-Zellen wurde 48 Stunden nach der Infektion anhand der Menge an sekretiertem IFN γ in den Überständen bestimmt. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte und MCMV Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des HWZv BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollten eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der humane HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 15 pg/ml.

Auch für den HWZv gB-BiTE[®] wurden zur Untersuchung der Veränderung der viralen Focus-Bildung Immunfärbungen des MCMV IE1 Proteins durchgeführt. Wie bereits in den Versuchen zuvor, wird auch hier nicht nur in Co-Kulturen von MCMV gB-EpCAM infizierten MEFs mit murinen T-Zellen und dem murinen HWZv gB-BiTE[®], sondern auch in denen mit MCMV Wt infizierten Zellen eine Inhibition der Virusausbreitung und Foci-Bildung sichtbar (Abb. 24 B und C).

T-Zellen in Kombination mit dem HWZv gB-BiTE[®] und uninfizierten Zellen weisen keine Aktivierung auf. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die verminderte Virusausbreitung in Wt infizierten Zellen auf eine unspezifische Bindung des HWZv BiTE[®] an virale Moleküle, welche auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert werden, zurückzuführen ist. Sowohl HCMV als auch MCMV exprimieren u.a. virale Fcγ-Rezeptoren (vFcγR), welche in der Lage sind die konstante Region von IgG zu binden und dadurch die IgG-vermittelte Aktivierung von Wirts-Fcγ-Rezeptoren zu unterbinden (Corrales-Aguilar et al., 2014). Für MCMV ist nur ein vFcγR bekannt, der von dem frühen Gen *m138/fcr-1* transkribiert wird (Thäle et al., 1994). Um zu untersuchen, ob dieser vFcγR *m138* (*fcr-1*) für die Antigen-unabhängige Bindung des murinen HWZv gB-BiTE[®] verantwortlich sein könnte, wurden MEFs mit einer MCMV *m138*-Deletions-Mutante (MCMV FSH Δ m138) infiziert und ebenfalls mit verschiedenen Co-Kulturen behandelt und einer Immunfärbung unterzogen. In Abbildung 24 D ist zu erkennen, dass hierbei der zuvor bei MCMV Wt infizierten Zellen zu beobachtende Effekt einer Reduktion der Foci bei Co-Kulturen mit T-Zellen und dem murinen HWZv gB-BiTE[®] nicht vorkommt. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, dass MCMV durch seinen vFcγR den HWZv BiTE[®] binden und dadurch eine Aktivierung der T-Zellen auslösen kann. Die entscheidende Modifikation des HWZv BiTE[®] ist eine erhöhte Molekulargröße, welche durch Einfügen einer zusätzlichen Immunglobulin-Fc-Domäne erreicht wird; diese ist durch Mutagenese derart modifiziert, dass sie nicht mehr an zelluläre FcR binden kann. Es ist zu vermuten, dass sich die Bindungseigenschaften der vFcγR für Fc soweit unterscheiden, dass diese modifizierte Fc des HWZv BiTE[®] von vFcγR noch gebunden wird.

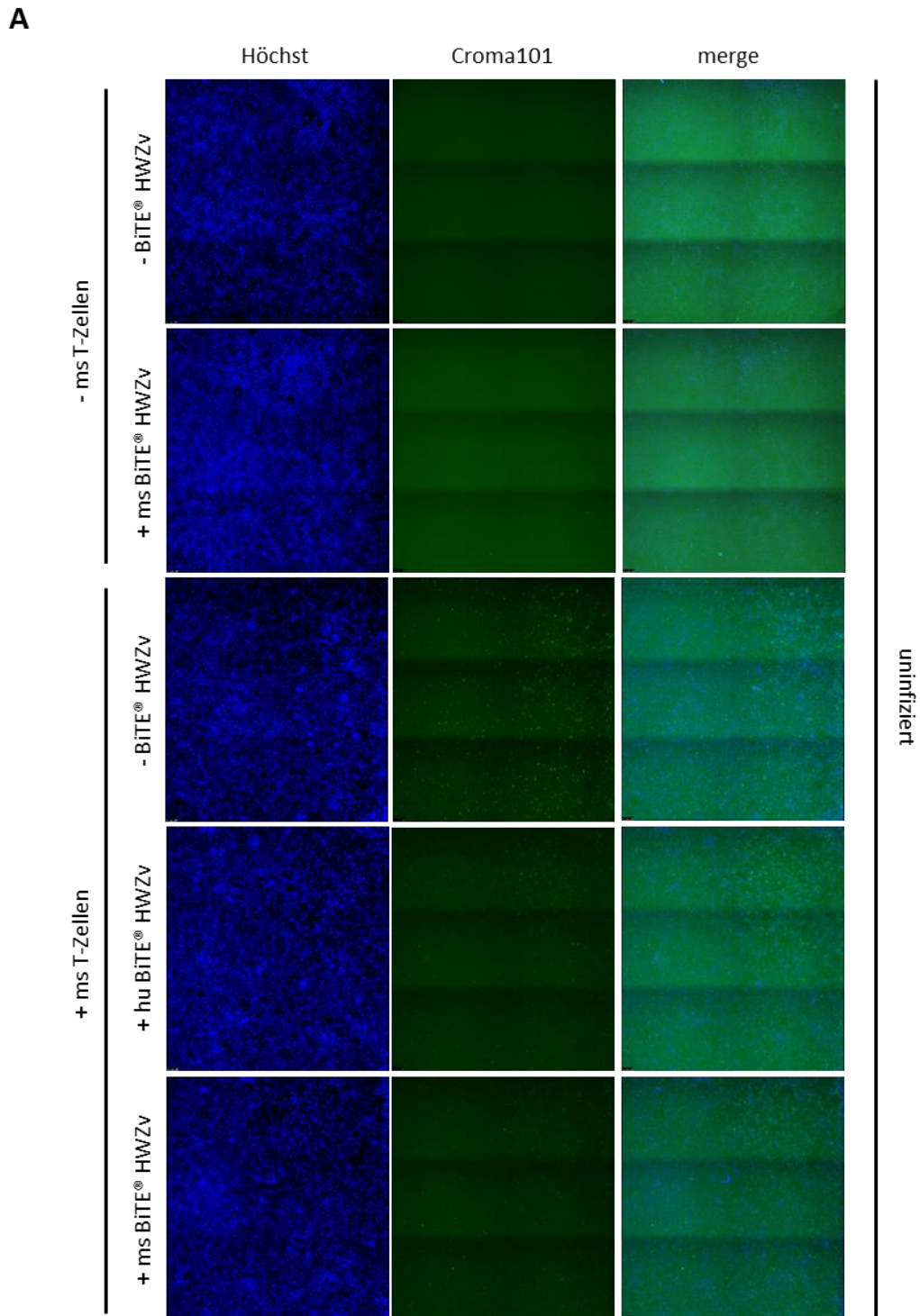


Abb. 24: Inhibition der Focus-Bildung durch murine T-Zellen und den HWZv gB-BiTE®.

(A) MEFs blieben uninfiziert und wurden nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den murinen HWZv gB-BiTE®, nur murine T-Zellen, murine T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® oder murine T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte MEFs dienen als Kontrolle der Antigen-Spezifität des HWZv BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der humane HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

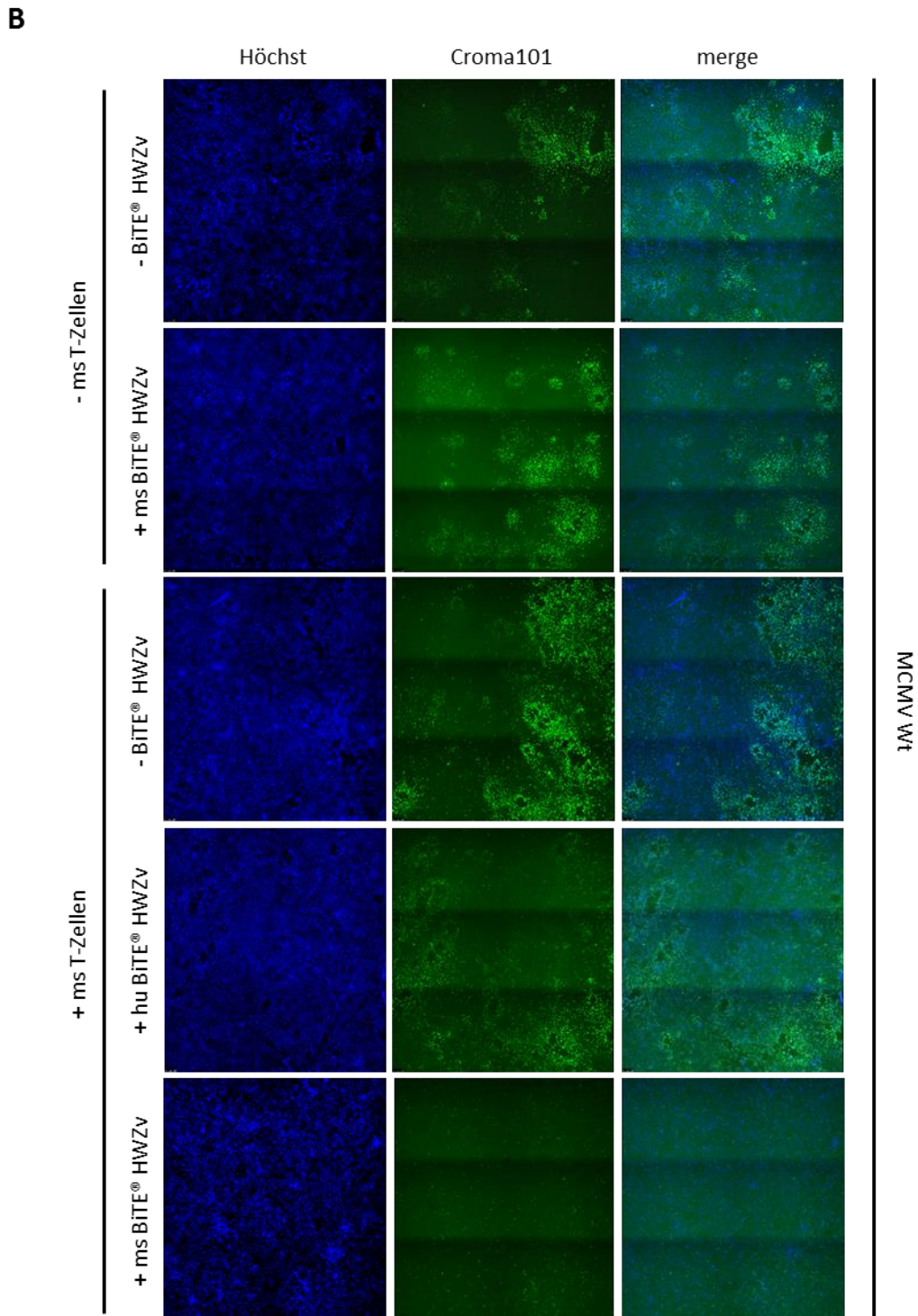


Abb. 24: Inhibition der Focus-Bildung durch murine T-Zellen und den HWZv gB-BiTE®.

(B) MEFs wurden mit MCMV Wt infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den murinen HWZv gB-BiTE®, nur murine T-Zellen, murine T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® oder murine T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des HWZv BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der humane HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

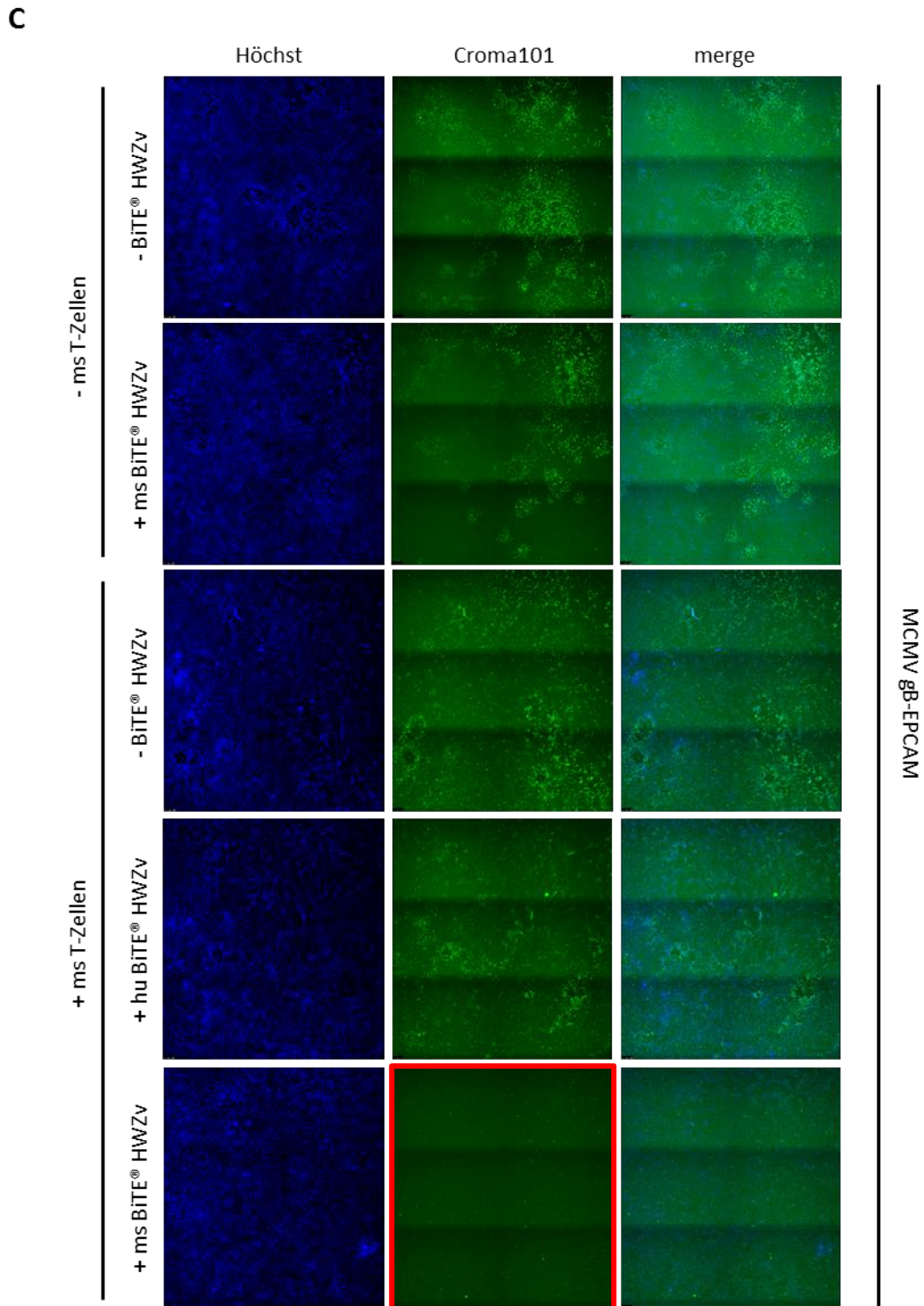


Abb. 24: Inhibition der Focus-Bildung durch murine T-Zellen und den HWZv gB-BiTE®.

(C) MEFs wurden mit MCMV gB-EpCAM infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den murinen HWZv gB-BiTE®, nur murine T-Zellen, murine T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® oder murine T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der humane HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

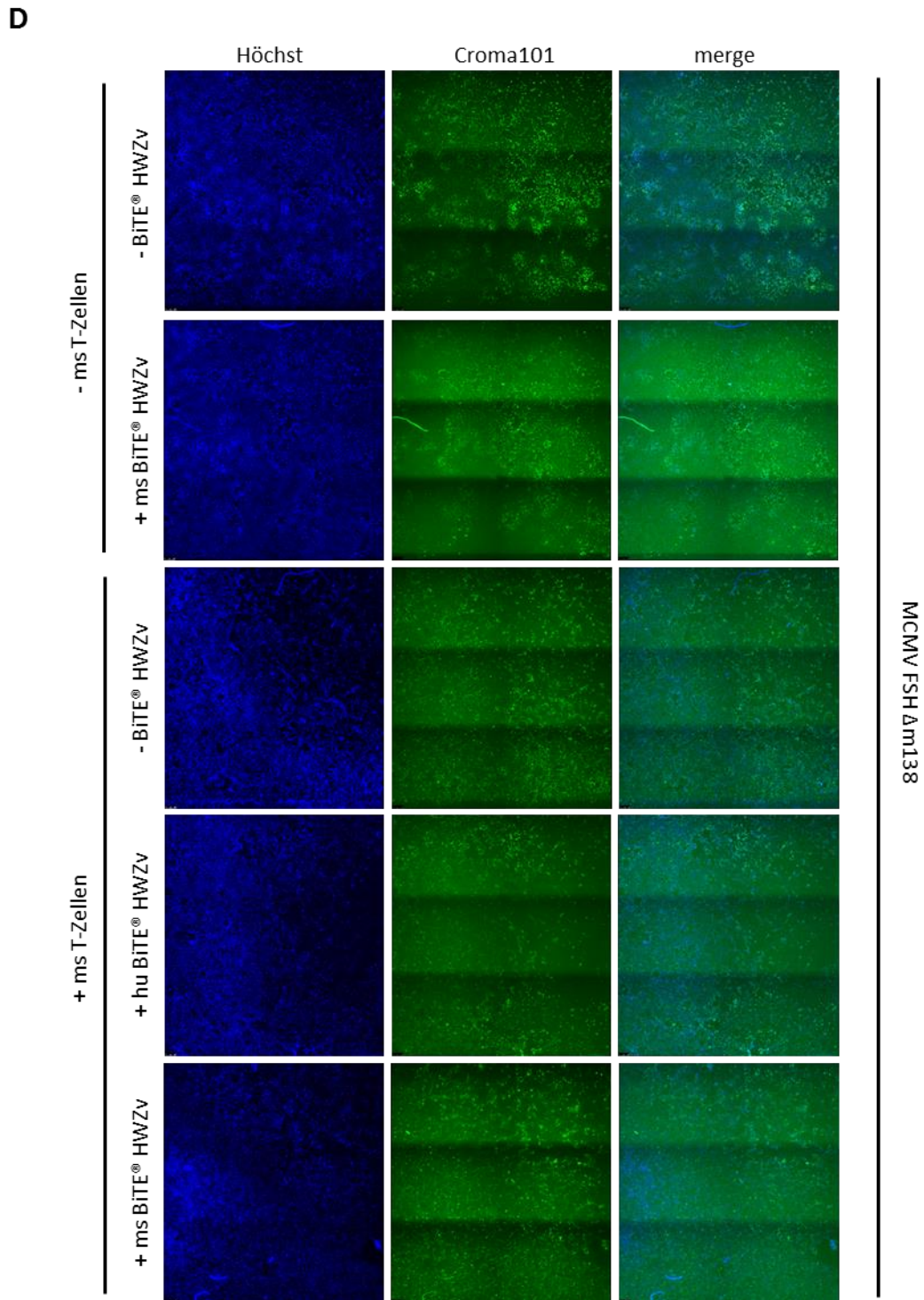


Abb. 24: Inhibition der Focus-Bildung durch humane T-Zellen und den HWZv gB-BiTE®.

(D) MEFs wurden mit MCMV FSH Δm138 infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den humanen HWZv gB-BiTE®, nur humane T-Zellen, humane T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® oder humane T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des HWZv BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der murine HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

Der Effekt einer vom gB Antigen-unabhängigen Hemmung der Virusausbreitung konnte auch bei der Co-Kultivierung MCMV Wt infizierter MEFs mit humanen T-Zellen – hier sogar noch etwas deutlicher – beobachtet werden (Abb. 25). Bei Zugabe des humanen HWZv gB-BiTE[®] ist sowohl bei MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen eine Antigen-spezifische als auch bei Wt infizierten Zellen eine Antigen-unspezifische Inhibition zu sehen (türkis).

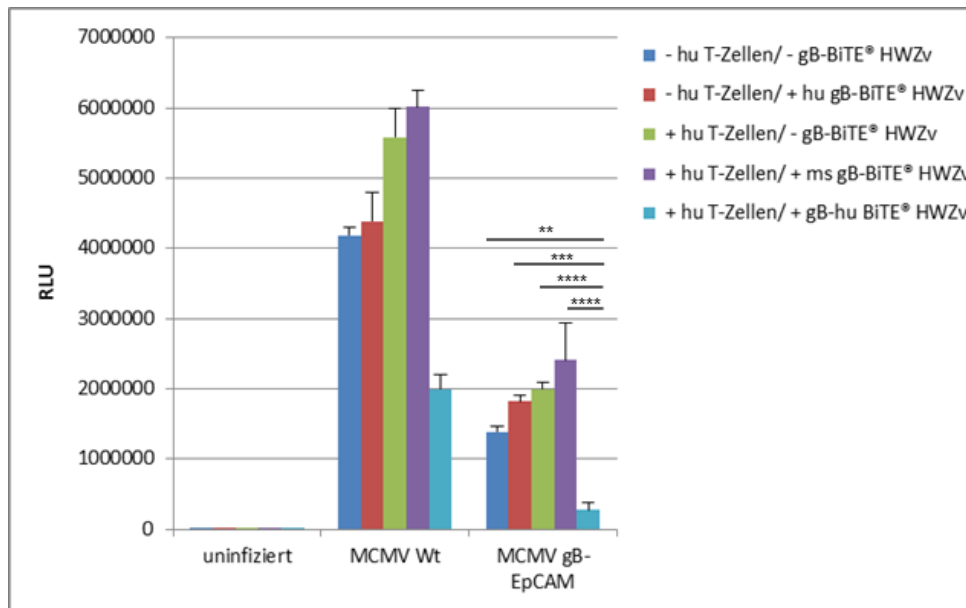


Abb. 25: Inhibition der Virusausbreitung mit humanen T-Zellen und dem humanen HWZv gB-BiTE[®].

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert (MOI 0,01) und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium (blaue Balken), nur den humanen HWZv gB-BiTE[®] (rote Balken), nur humane T-Zellen (grüne Balken), humane T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE[®] (lila Balken) oder humane T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE[®] (türkise Balken). Eine Analyse der viralen Ausbreitung erfolgte 48 Stunden nach Zugabe der unterschiedlichen Ansätze mittels Luziferase-Assay. Der HWZv gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte und MCMV Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des HWZv BiTE[®]. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE[®] enthielten sollten eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE[®] bestätigen. Der murine HWZv gB-BiTE[®] diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

Die IFN γ -Produktion humaner T-Zellen und deren Aktivierung ist im Vergleich zu der von murinen T-Zellen deutlich niedriger; der durch den humanen HWZv gB-BiTE[®] vermittelte Antigen-unspezifische Effekt jedoch deutlich größer (Abb. 26). Humane T-Zellen produzieren mit dem humanen HWZv gB-BiTE[®] auf MCMV Wt infizierten Zellen in etwa die Hälfte an IFN γ , wie auf MCMV gB-EpCAM infizierten MEFs. Auf uninfizierten Zellen zeigen auch humane T-Zellen keine Sekretion von IFN γ und auch eine Spezies-unspezifische T-Zell-Aktivierung ist nicht zu sehen. Genau wie bei murinen konnte auch bei humanen T-Zellen keine TNF α -Ausschüttung nachgewiesen werden.

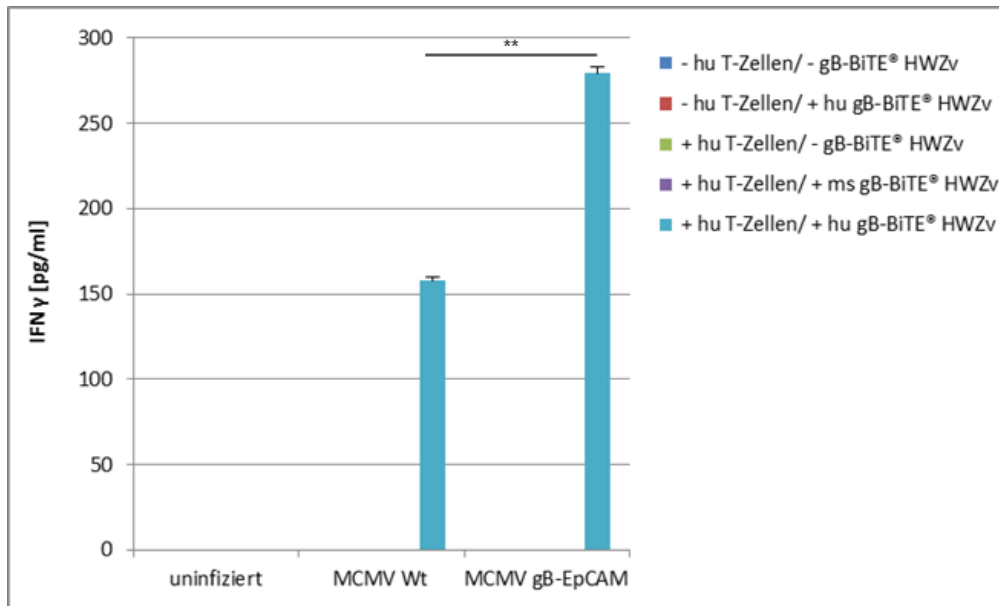


Abb. 26: INF γ Sekretion durch humane T-Zellen.

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert (MOI 0,01) und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium (blaue Balken), nur den humanen HWZv gB-BiTE[®] (rote Balken), nur humane T-Zellen (grüne Balken), humane T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE[®] (lila Balken) oder humane T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE[®] (türkise Balken). Die Aktivierung der T-Zellen wurde 48 Stunden nach der Infektion anhand der Menge an sekretiertem INF γ in den Überständen bestimmt. Der HWZv gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte und MCMV Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des HWZv BiTE[®]. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE[®] enthielten sollten eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE[®] bestätigen. Der murine HWZv gB-BiTE[®] diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 7,5 pg/ml.

Wie bereits zuvor für murine T-Zellen beschrieben, wurde hier eine Immun-Färbung des MCMV IE1 Proteins zur Analyse der viralen Foci-Bildung durchgeführt (Abb. 27). Analog zum normalen gB-BiTE[®] ist auch hier ein Rückgang der viralen Foci in Co-Kulturen von MCMV gB-EpCAM infizierten MEFs mit humanen T-Zellen und dem Spezies-spezifischen HWZv gB-BiTE[®] zu sehen (Abb. 27 C), jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei Verwendung muriner T-Zellen und dem murinen HWZv BiTE[®] (Abb. 24 C). Der Antigen-unspezifische Effekt, welcher mit MCMV Wt infizierten Zellen in oben beschriebenem Luciferase-Assay beobachtet werden konnte, ist hier allerdings deutlich schwächer zu sehen (Abb. 27 B). Bei MCMV FSH Δ m138 infizierten MEFs verschwindet, wie auch schon für murine T-Zellen beschrieben, der Effekt komplett und es ist keine Reduktion der viralen Foci-Bildung mehr erkennbar (Abb. 27 D).

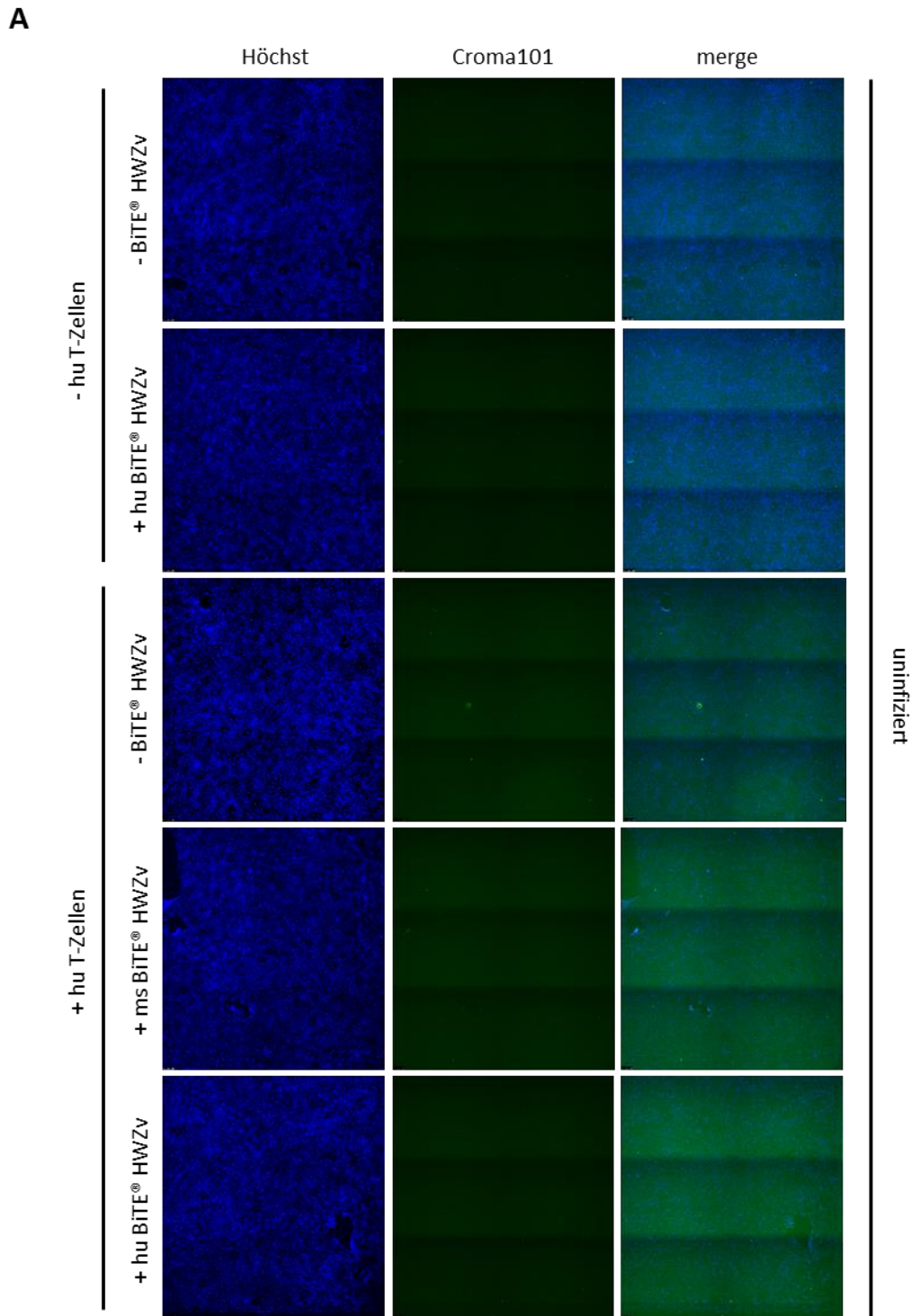


Abb. 27: Inhibition der Focus-Bildung durch humane T-Zellen und den HWZv gB-BiTE®.

(A) MEFs blieben uninfiziert und wurden nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den humanen HWZv gB-BiTE®, nur humane T-Zellen, humane T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® oder humane T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Uninfizierte MEFs dienen als Kontrolle der Antigen-Spezifität des HWZv BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der murine HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

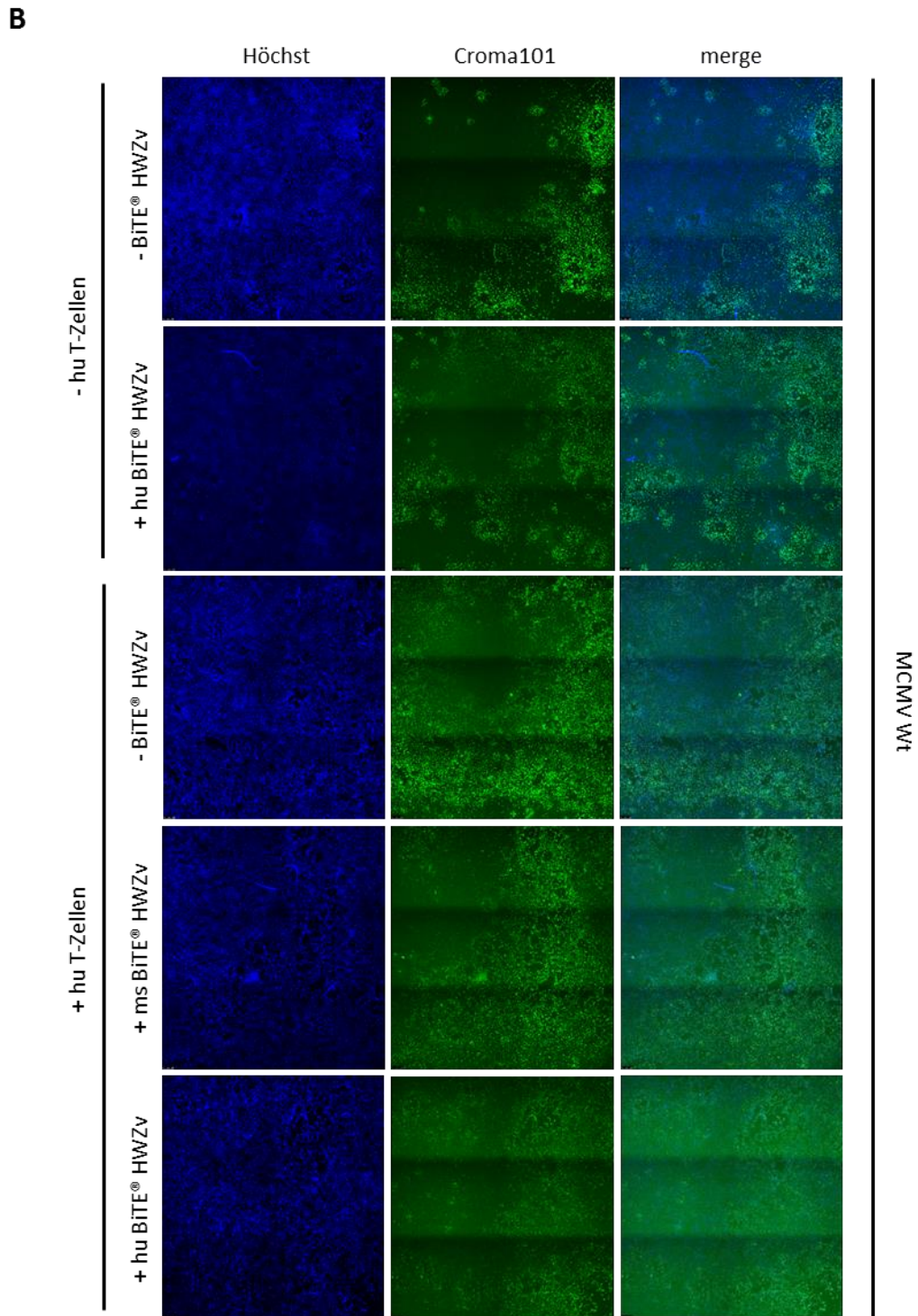


Abb. 27: Inhibition der Focus-Bildung durch humane T-Zellen und den HWZv gB-BiTE®.

(B) MEFs wurden mit MCMV Wt infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den humanen HWZv gB-BiTE®, nur humane T-Zellen, humane T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® oder humane T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Wt infizierte MEFs dienten als Kontrolle der Antigen-Spezifität des HWZv BiTE®. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der murine HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

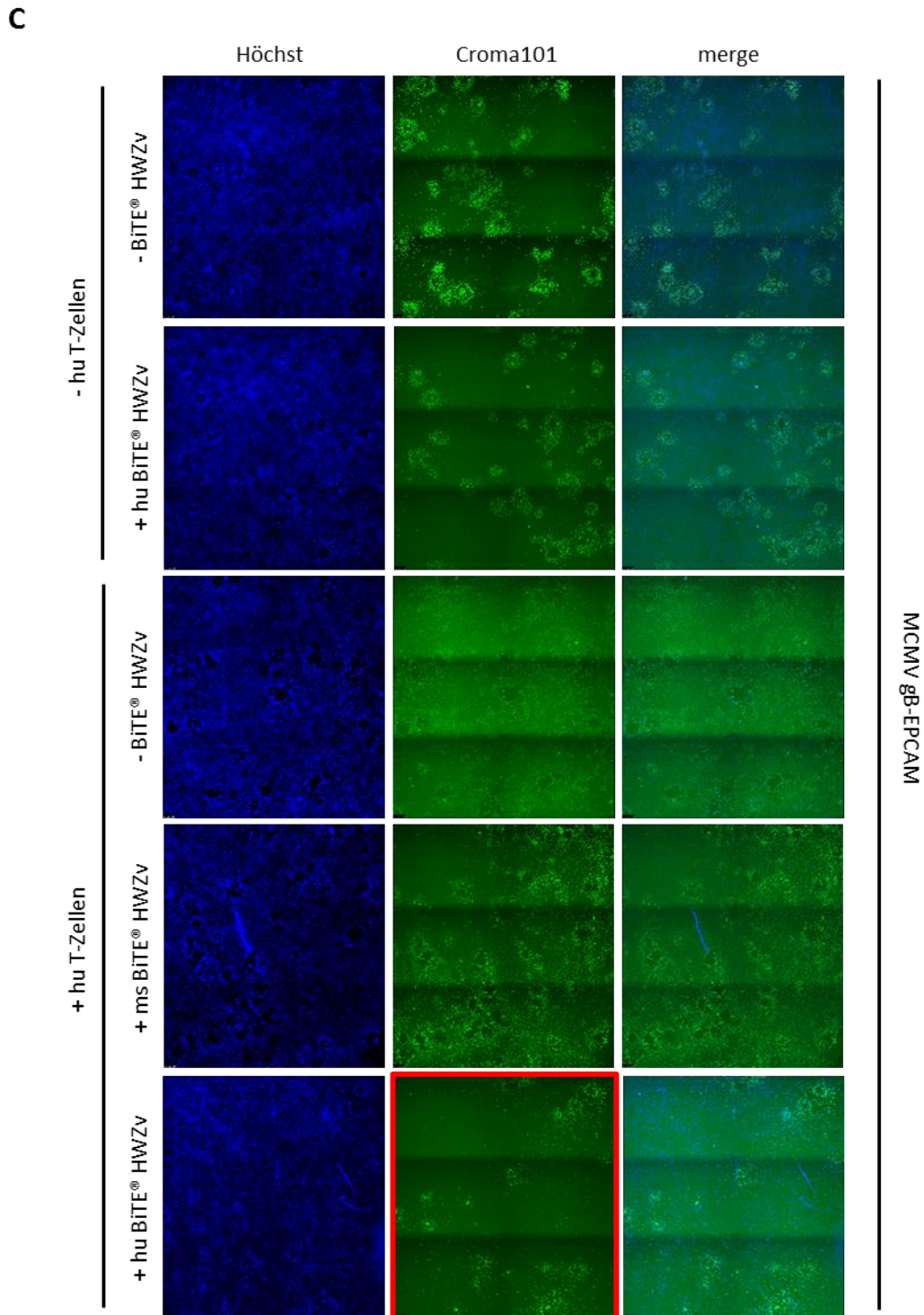


Abb. 27: Inhibition der Foci-Bildung durch humane T-Zellen und den HWZv gB-BiTE®.

(C) MEFs wurden mit MCMV gB-EpCAM infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den humanen HWZv gB-BiTE®, nur humane T-Zellen, humane T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® oder humane T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der murine HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

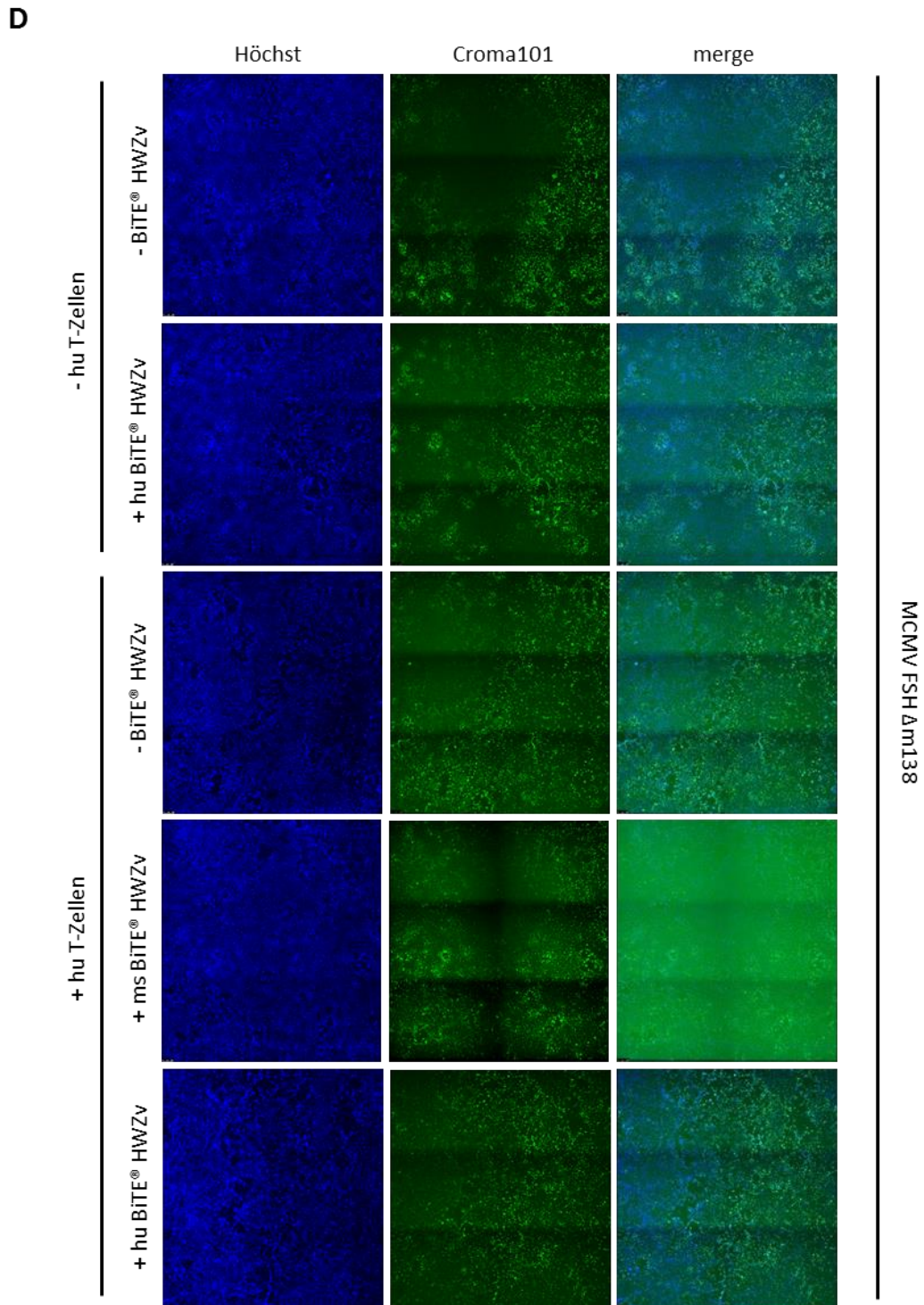


Abb. 27: Inhibition der Focus-Bildung durch humane T-Zellen und den HWZv gB-BiTE®.

(C) MEFs wurden mit MCMV FSH Δm138 infiziert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Diese enthielten: nur Medium, nur den humanen HWZv gB-BiTE®, nur humane T-Zellen, humane T-Zellen und den murinen HWZv gB-BiTE® oder humane T-Zellen und den humanen HWZv gB-BiTE®. 48 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert, das MCMV IE 1 Protein mit dem Croma 101 Hybridomüberstand und einem sekundären anti-Maus Alexa® 647 gefärbt und die Ausbreitung der Foci analysiert. Der HWZv gB-BiTE® wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Ansätze, die nur T-Zellen oder nur den HWZv BiTE® enthielten sollte eine ausschließlich gemeinsame Wirkung von T-Zellen und HWZv BiTE® bestätigen. Der murine HWZv gB-BiTE® diente als Kontrolle der Spezies-Spezifität.

Zusammen genommen kann die Funktionalität anhand der vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden, sowohl der murine als auch der humane HWZv gB-BiTE[®] vermitteln eine Aktivierung der entsprechenden Spezies-spezifischen T-Zellen. Diese schütten daraufhin IFN γ aus und hemmen effektiv die Ausbreitung der Infektion. Eine Sekretion von TNF α kann nicht beobachtet werden. Jedoch vermitteln sowohl der murine als auch der humane Halbwertszeit-verlängerte BiTE[®] neben einer Antigen-spezifischen Bindung an MCMV gB-EpCAM infizierte Zellen auch eine gB Antigen-unabhängige Bindung an MCMV Wt infizierte MEFs. Dies führt zu einer Antigen-unabhängigen Aktivierung der T-Zellen und der Sekretion von IFN γ . Da die T-Zellen beim Kontakt mit dem HWZv gB-BiTE[®] und uninfizierten Zellen nicht aktiviert werden, spricht dies für eine Bindung des BiTE[®] an virale Proteine, die auf der Wirtszelle exprimiert werden. Ein Kandidat hierfür ist der virale vFcγR. Eine MCMV Mutante, welche eine Deletion des vFcγR m138/fcr-1 besitzt, zeigt diesen Effekt nicht mehr und bestätigt somit die Vermutung.

5.8 Resistenz infizierter Zellen gegenüber der HWZv gB-BiTE[®]-vermittelten Lyse durch T-Zellen

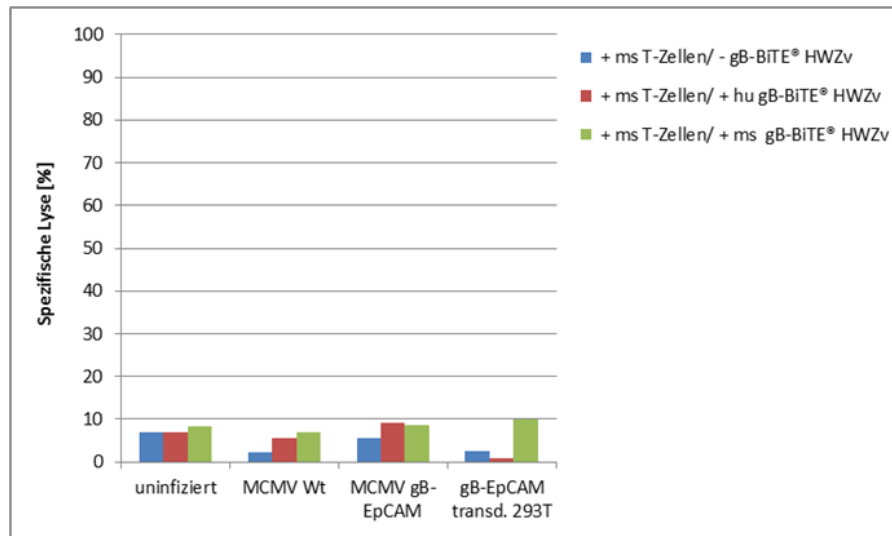
Im weiteren Verlauf sollte auch für die Halbwertszeit-verlängerte Variante des murinen und humanen gB-BiTE[®] die Fähigkeit zur Vermittlung einer Zielzellyse analysiert werden. Hierfür wurde wie unter 5.5 beschrieben ein Europium-basierter Zytotoxizitäts-Assay angewandt. Abbildung 28 zeigt, dass auch der HWZv BiTE[®] nicht in der Lage ist eine Lyse der infizierten Zielzellen durch die T-Zellen zu induzieren. Dies gilt sowohl für die murine (Abb. 28 A) als auch die humane (Abb. 28 B) Variante des HWZv BiTE[®]. Da für diesen Versuch die gleichen gB-exprimierenden 293Ts verwendet wurden wie für den unter 5.5, ist auch hier aufgrund der geringen Transduktions- und Expressionseffizienz des HCMV gB (Abb. 17 C) keine Lyse dieser Zellen zu sehen.

Ähnlich wie unter 5.5 schon zu sehen war, wird auch hier trotz fehlender Zielzellyse eine Aktivierung der T-Zellen durch die Sekretion von IFN γ sichtbar (Abb. 29). Murine T-zellen schütten dabei nicht nur bei durch den murinen HWZv gB-BiTE[®] vermittelten Kontakt mit MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen und gB-exprimierenden 293Ts IFN γ aus, sondern auch bei Kontakt mit MCMV Wt infizierten Zellen (Abb. 29 A). Dies stimmt mit den Beobachtungen eines gB Antigen-unabhängigen Effekts des HWZv gB-BiTE[®] unter 5.8 überein. Humane T-Zellen hingegen sekretieren hier nur bei Kontakt mit gB-EpCAM infizierten MEFs und gB-293Ts IFN γ (Abb. 29 B).

Eine TNF α Sekretion der murinen bzw. humanen T-Zellen ist, wie auch beim normalen gB-BiTE[®] nur in Co-Kulturen mit gB-293T und dem murinen bzw. humanen HWZv BiTE[®] nachweisbar (Abb. 30).

Zusammengefasst wird anhand der vorliegenden Versuche deutlich, dass auch der HWZv gB-BiTE[®] nicht in der Lage ist eine Zielzellyse durch die T-Zellen zu induzieren. Der murine Halbwertszeit-verlängerte BiTE[®] vermittelt jedoch sowohl eine Antigen-spezifische Bindung an MCMV gB-EpCAM infizierte Zellen als auch eine gB Antigen-unabhängige Bindung an MCMV Wt infizierte MEFs und aktiviert dadurch murinen T-Zellen, welche daraufhin IFN γ ausschütten. Bei humanen T-Zellen und dem humanen HWZv gB-BiTE[®] lässt sich dieser Effekt nur Antigen-Abhängig für gB-EpCAM infizierte Zellen beobachten. TNF α wird in keinem Ansatz in nachweisbaren Mengen produziert.

A



B

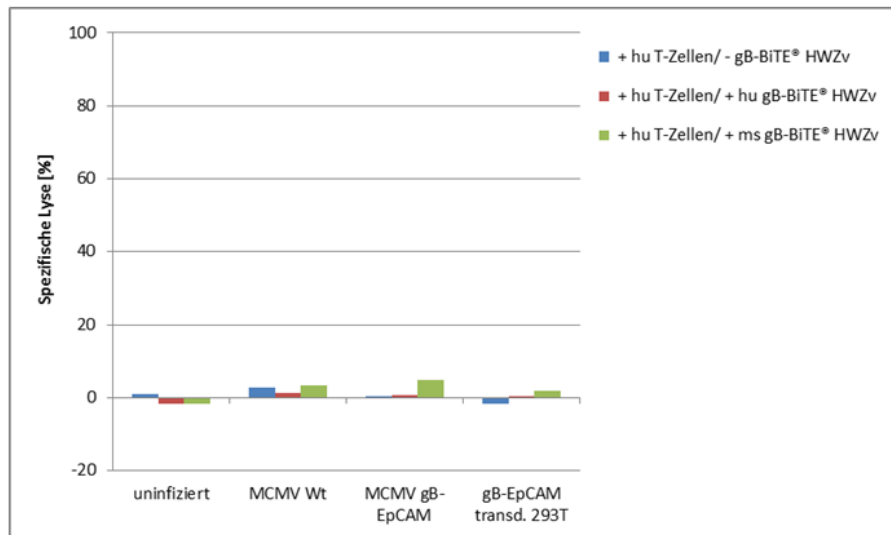
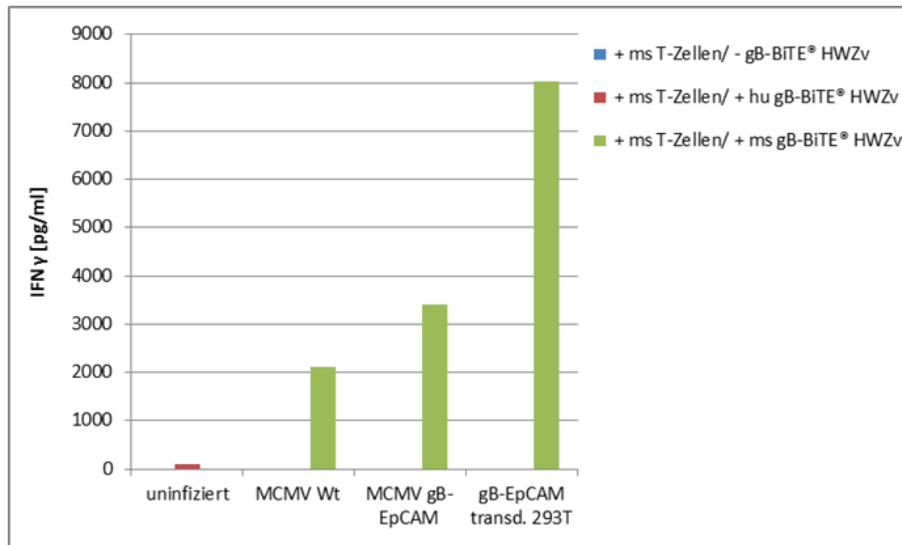


Abb. 28: Resistenz infizierter Zellen gegenüber Lyse durch T-Zellen.

Europium-basierter Zytotoxizitäts-Assay. MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder gB-EpCAM infiziert und 24 Stunden später mit verschiedenen Ansätzen für 4 Stunden inkubiert. Diese waren: nur T-Zellen, T-Zellen und muriner HWZv BiTE[®] oder T-Zellen und humaner HWZv BiTE[®]. Uninfizierte Zellen dienen als Kontrolle. Als weitere Kontrolle wurden 293Ts lenti-virale mit einem gB-EpCAM-Konstrukt transduziert. Der HWZv gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. **(A)** Co-Kulturen wurden mit murinen T-Zellen angesetzt. Der humane HWZv BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle. **(B)** Co-Kulturen wurden mit humanen T-Zellen angesetzt. Der murine HWZv BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle.

A



B

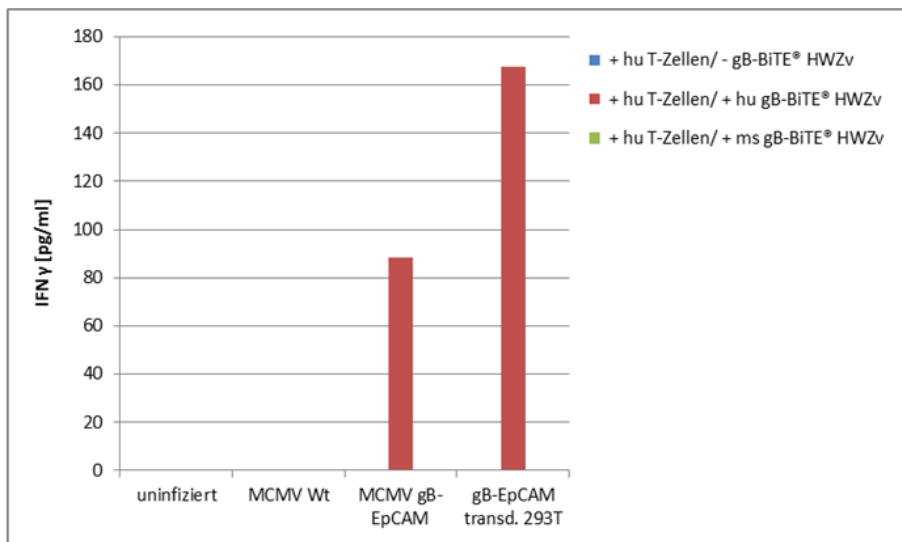
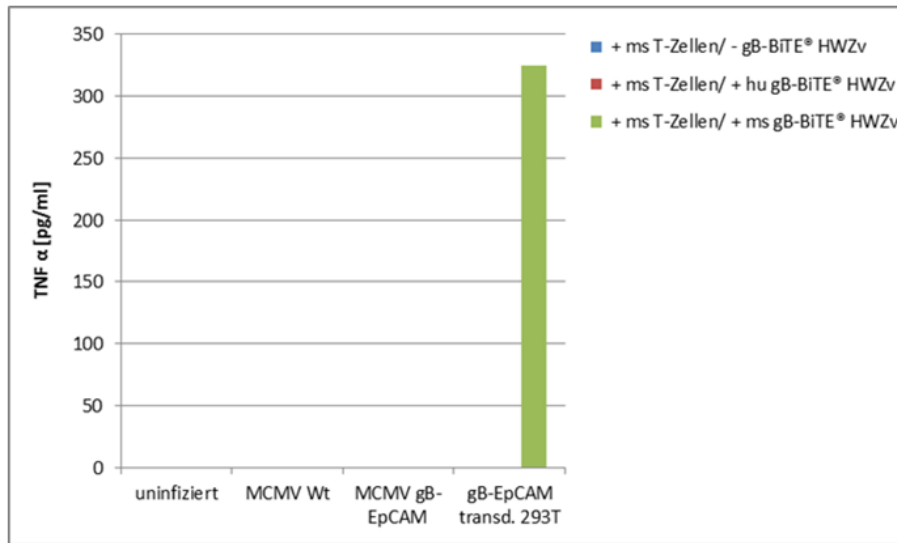


Abb. 29: INF γ Sekretion durch murine und humane T-Zellen.

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder gB-EpCAM infiziert und 24 Stunden später mit verschiedenen Ansätzen für 4 Stunden inkubiert. Diese waren: nur T-Zellen, T-Zellen und muriner HWZv BiTE[®] oder T-Zellen und humaner HWZv BiTE[®]. Uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Als weitere Kontrolle wurden gB-exprimierende 293Ts verwendet. Der HWZv gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Die Aktivierung der T-Zellen wurde 4 Stunden nach der Inkubation anhand der Menge an sekretiertem INF γ in den Überständen aus dem Zytotoxizitäts-Assay bestimmt. **(A)** Co-Kulturen wurden mit murinen T-Zellen angesetzt. Der humane HWZv BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 15 pg/ml. **(B)** Co-Kulturen wurden mit humanen T-Zellen angesetzt. Der murine HWZv BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 7,5 pg/ml.

A



B

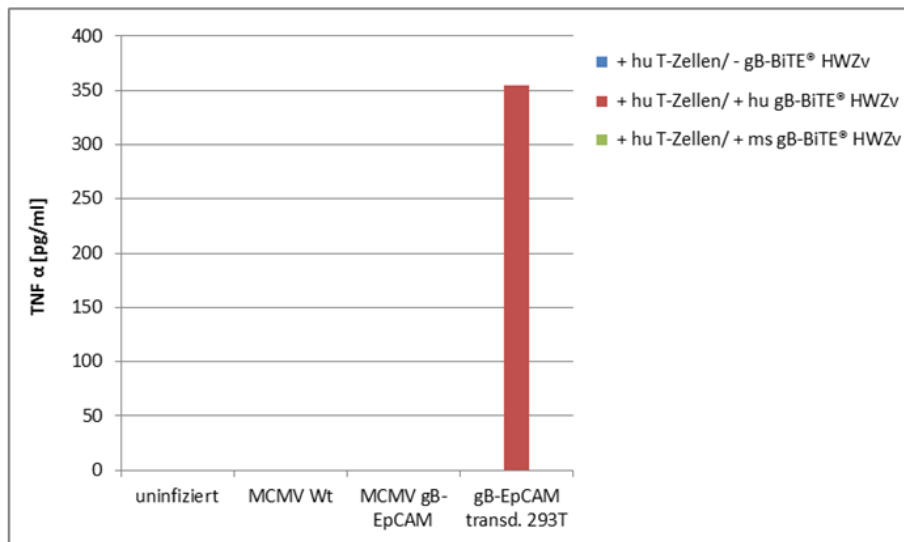


Abb. 30: TNF α Sekretion durch murine und humane T-Zellen.

MEFs wurden entweder nicht, mit MCMV Wt oder gB-EpCAM infiziert und 24 Stunden später mit verschiedenen Ansätzen für 4 Stunden inkubiert. Diese waren: nur T-Zellen, T-Zellen und muriner HWZv BiTE[®] oder T-Zellen und humaner HWZv BiTE[®]. Uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Als weitere Kontrolle wurden gB-exprimierende 293Ts verwendet. Der HWZv gB-BiTE[®] wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Die Aktivierung der T-Zellen wurde 4 Stunden nach der Inkubation anhand der Menge an sekretiertem TNF α in den Überständen aus dem Zytotoxizitäts-Assay bestimmt. Die untere Messgrenze des Assays lag bei 7,5 pg/ml. **(A)** Co-Kulturen wurden mit murinen T-Zellen angesetzt. Der humane HWZv BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle. **(B)** Co-Kulturen wurden mit humanen T-Zellen angesetzt. Der murine HWZv BiTE[®] diente als Spezies-spezifische Kontrolle.

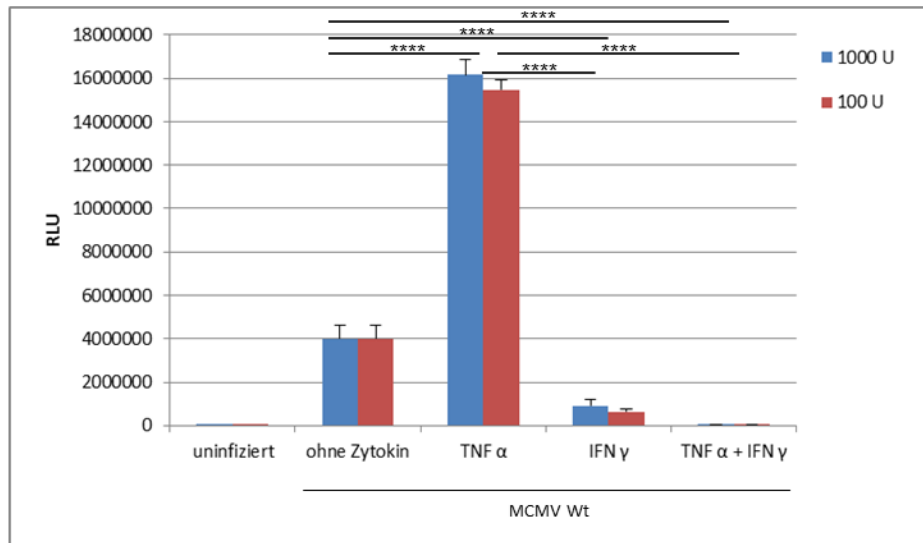
5.9 Veränderte Virusausbreitung durch verschiedene Zytokine

Nachdem in mehreren Versuchen gezeigt werden konnte, dass T-Zellen nach einer durch den gB-BiTE[®] vermittelten Aktivierung IFN γ sekretieren und dadurch die Ausbreitung von MCMV *in vitro* hemmen, sollte im Folgenden überprüft werden, ob dieser Effekt auch bereits durch die Zugabe von bestimmten Zytokinen zu MCMV infizierten Zellen erreicht werden kann. Hierfür wurden zunächst MEFs mit unterschiedliche Mengen an IFN γ und TNF α sowie beide in Kombination behandelt und 24 Stunden später mit MCMV Wt oder MCMV gB-EpCAM infiziert. Die Auswertung der viralen Ausbreitung erfolgte wieder mittels Luziferase-Assay.

In Abbildung 31 ist nun zu sehen, dass die Zugabe von IFN γ zu einer deutlichen Reduktion der Virusausbreitung *in vitro* führt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus den vorherigen Versuchen mit den verschiedenen gB-BiTE[®] Molekülen. Eine Sekretion von TNF α konnte in keinem der vorherigen Versuche mit infizierten MEF nachgewiesen werden. Lediglich T-Zellen in Kontakt mit gB-exprimierenden 293Ts und allen Varianten der gB-BiTE[®] wiesen eine TNF α -Produktion auf (Abb. 19 und 30). Behandelt man infizierte MEFs sowohl mit TNF α als auch IFN γ , wird die Ausbreitung noch effektiver und nahezu vollständig gehemmt. Gibt man dagegen nun nur TNF α zu MCMV infizierten Zellen, sieht man sowohl mit dem Wt als auch dem gB-EpCAM Virus einen sehr deutlichen Anstieg der Infektionsausbreitung im Vergleich zu Ansätzen ohne eine Zytokin-Zugabe.

Um herauszufinden ob dieser unter alleiniger TNF α -Zugabe beobachtete Effekt von der eingesetzten Dosis abhängig ist, wurden MEFs 24 Stunden vor der Infektion mit MCMV Wt mit verschiedenen Mengen an TNF α inkubiert. Abbildung 32 zeigt, dass bereits ab 4 U/ml TNF α eine leicht gesteigerte Virusausbreitung zu beobachten ist. Ab 40 U/ml ist dann ein deutlicher Anstieg der viralen Dissemination zu sehen. Dieser nimmt auch mit steigender Konzentration an TNF α nur noch marginal zu und erreicht bei 2000 U/ml seinen Sättigungspunkt.

A



B

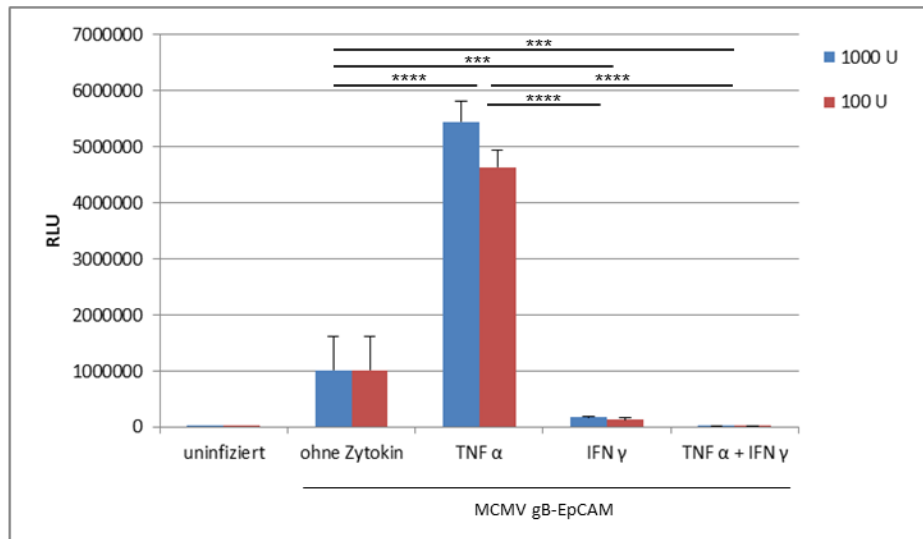


Abb. 31: Virusausbreitung unter Zytokin-Zugabe.

MEFs wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Mengen (100/1000 U pro Ansatz) IFN γ , TNF α oder einer Kombination aus beidem inkubiert und im Anschluss entweder mit MCMV Wt (**A**) oder MCMV gB-EpCAM (**B**) infiziert (MOI 0,01). Nach 48 Stunden erfolgte die Analyse der viralen Ausbreitung mittels Luziferase-Assay. Zellen ohne Zugabe eines Zytokins dienen als Vergleichswert, uninifizierte Zellen als Kontrolle.

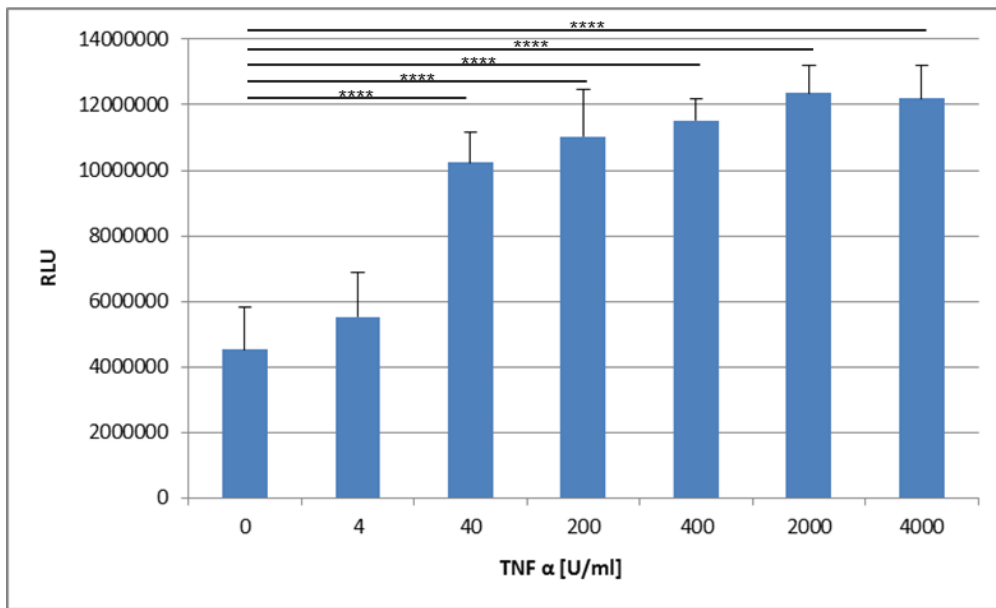


Abb. 32: Dosisabhängigkeit einer verstärkten Virusausbreitung unter TNF α -Zugabe. MEFs wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Mengen (0 - 4000 U/ml) TNF α inkubiert und danach mit MCMV Wt infiziert (MOI 0,01). Nach 48 Stunden erfolgte die Analyse der viralen Ausbreitung mittels Luziferase-Assay. Zellen ohne Zugabe von TNF α dienen als Vergleichswert.

Im weiteren Verlauf stellte sich die Frage, ob die Länge der Inkubation der Zellen mit TNF α , bevor sie mit MCMV infiziert werden, eine Rolle spielt. Hierfür wurden MEFs, bevor sie mit MCMV Wt infiziert wurden, unterschiedlich lange mit 50 U/Ansatz TNF α behandelt (Abb. 33). Erfolgt die Zugabe des Zytokins 8 Stunden vor der Infektion, ist eine deutlich gesteigerte Infektionsausbreitung zu beobachten. Bei einer Inkubation für 16 und 24 Stunden ist eine erhöhte virale Ausbreitung nach wie vor zu sehen, jedoch nicht mehr so stark wie bei einer Behandlung mit Zytokin für 8 Stunden. Gibt man TNF α 48 Stunden vor der Infektion zu den MEFs steigt der Effekt wieder auf ein mit dem 8 Stunden-Wert vergleichbares Maß an.

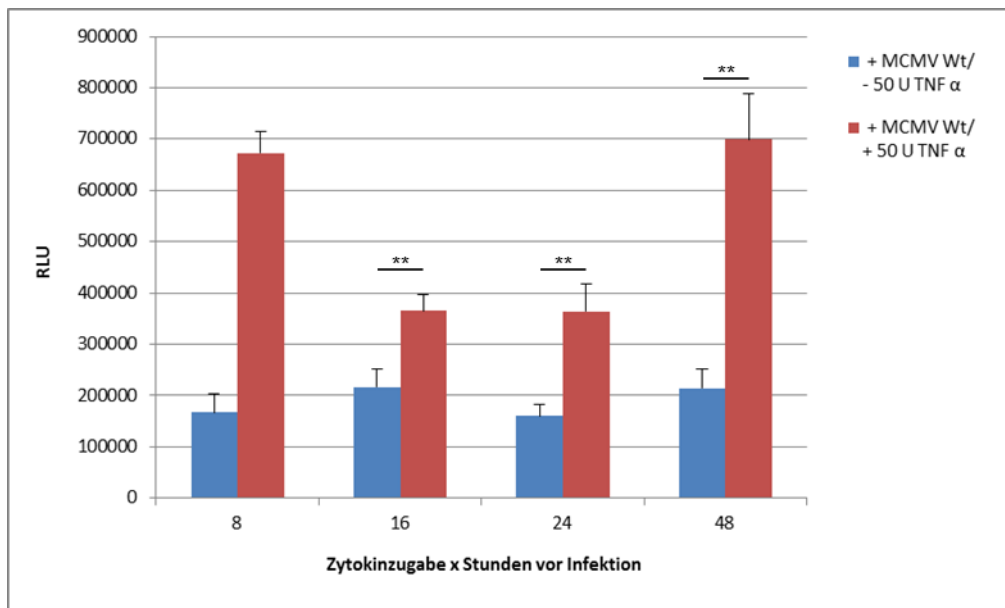


Abb. 33: Abhängigkeit einer verstärkten Virusausbreitung unter TNF α -Zugabe von dessen Inkubationszeit.

MEFs wurden für 8, 16, 24 oder 48 Stunden mit 50 U/Ansatz TNF α inkubiert und danach mit MCMV Wt infiziert (MOI 0,01). Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Analyse der viralen Ausbreitung mittels Luziferase-Assay. Zellen ohne Zugabe von TNF α dienten als Vergleichswert.

Als nächstes sollte bestätigt werden, dass der beobachtete Effekt einer gesteigerten Virusausbreitung durch TNF α tatsächlich auf das Zytokin und nicht auf eventuelle Kontaminationen des rekombinanten Proteins zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurde ein Neutralisations-Assay durchgeführt, bei welchem das zugefügte TNF α mit verschiedenen Konzentrationen eines monoklonalen anti-TNF α Antikörpers wieder neutralisiert wurde (Abb. 34). Schon eine Menge von 0,1 μ g anti-TNF α pro Ansatz führt zu einer deutlichen Reduktion des Effekts. Ein kompletter Rückgang auf das Niveau unbehandelter Zellen kann jedoch auch mit größeren Mengen an neutralisierendem Antikörper nicht erreicht werden.

Insgesamt zeigen die hier beschriebenen Versuche, dass IFN γ ein wichtiger Faktor bei MCMV Infektionen ist. Das Zytokin ist in der Lage die Ausbreitung einer MCMV Infektion effektiv zu inhibieren. In Kombination mit TNF α kann diese sogar noch stärker gehemmt werden.

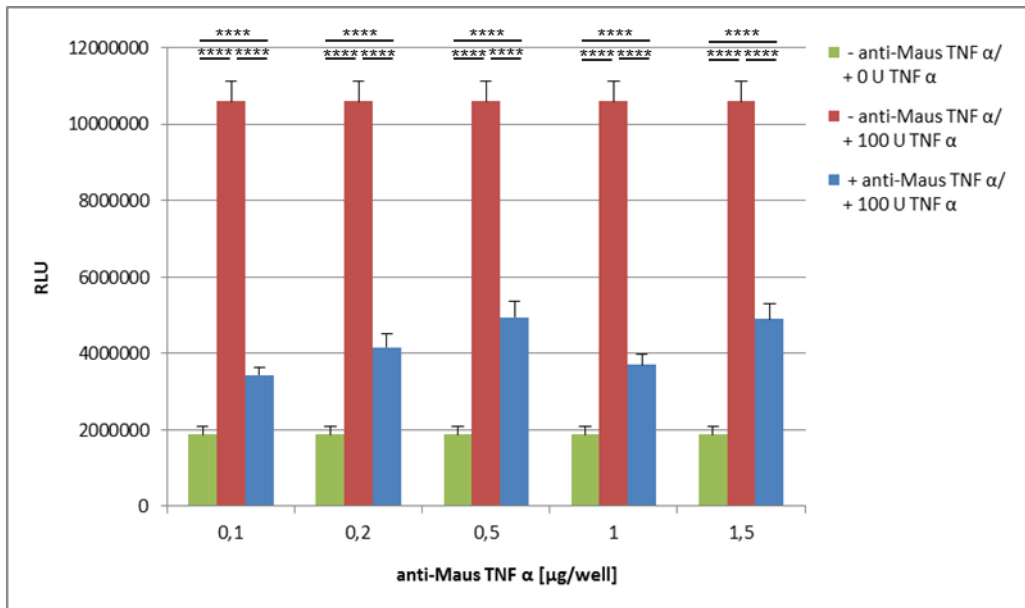


Abb. 34: Neutralisation von TNF α durch einen anti-Maus TNF α Antikörper.

Unterschiedliche Mengen anti-Maus TNF α Antikörper (0,1-1,5 $\mu\text{g/Ansatz}$) wurden mit 100 U/Ansatz TNF α für 2 Stunden bei 4°C miteinander inkubiert und anschließend auf MEFs gegeben. Nach 24 Stunden wurden diese dann mit MCMV Wt infiziert (MOI 0,01). Weitere 48 Stunden später erfolgte die Analyse der viralen Ausbreitung mittels Luziferase-Assay. Zellen ohne Zugabe von TNF α und anti-Maus TNF α sowie Zellen mit TNF α , aber ohne neutralisierenden Antikörper dienten als Vergleichswerte.

6 Diskussion

Eine adoptive Immuntherapie mit Virus-spezifischen T-Zellen stellt eine komplexe aber aussichtsreiche Therapieform von HCMV-Infektionen nach hämatopoetischen Stammzelltransplantationen dar. Die Wiederherstellung der T-Zell-Immunität, welche essentiell für die Kontrolle der viralen Infektion ist, wird durch diese Therapieform erreicht (Crough et al., 2009; Jackson et al., 2010). Im Fall der Hochrisiko-Konstellation eines seronegativen Spenders und eines seropositiven Empfängers kann diese Art der Therapie jedoch nicht angewandt werden, da es mit aktuellen Methoden nicht möglich ist eine ausreichende Menge an HCMV-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen aus dem Blut des seronegativen Spenders zu isolieren bzw. in der notwendigen Zeit zu expandieren (Leen et al., 2008). Eine andere mögliche Therapiemethode ist der Einsatz von CARs zur Generierung Virus-spezifischer T-Zellen. Eine Anreicherung Virus-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen ist hier nicht nötig, da durch CARs die Virus-Spezifität in jede beliebige T-Zell-Kultur, wie z.B. polyklonal expandierte Effektor-T-Zellen, eingebracht werden kann (Full et al., 2010; Maus et al., 2014; Masiero et al., 2005). Ein weiterer neuer Therapieansatz ist die Verwendung sogenannter BiTE[®] Moleküle (*Bispecific T cell Engager*). Diese Moleküle sind bispezifisch für zwei verschiedene Ziel-Antigene, was ihnen ermöglicht Immunzellen in Kontakt mit malignen oder Virus-infizierten Zellen zu bringen. Sie besitzen zwei scFv-abgeleitete Einzel-Ketten, welche gegen verschiedene Antigene, wie zum Beispiel gegen CD3 auf T-Zellen und hoch exprimierte Proteine auf der Oberfläche verschiedener Zielzellen, gerichtet sind. Verbunden werden sie durch eine kurze Linker-Sequenz. Diese BiTE[®] Moleküle können sowohl für maligne Erkrankungen, aber auch für Virus-Infektionen verwendet werden. Der erste durch die FDA (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der USA) zugelassene BiTE[®] war Blinatumomab (Blinicyto[®]), der sich gegen CD19 auf B-Zell-Lymphomen richtet (Spiess et al., 2015; Sanford 2015). Der Vorteil gegenüber CAR-T-Zellen ist zum Einen der Wegfall der Notwendigkeit der Erstellung bzw. Expansion spezifischer T-Zellen, zum Anderen eine weniger riskante bzw. besser steuerbare Anwendung im Hinblick auf toxische Nebeneffekte wie das Zytokin-Freisetzungssyndrom (CRS; *cytokine release syndrome*). Während CAR-modifizierter T-Zellen über Jahre persistieren können, weisen BiTE[®] Moleküle aufgrund ihres kleinen Molekulargewichts von rund 55 kDa eine sehr kurze Halbwertszeit auf. Die Aktivierung der T-Zellen kann so durch ein Absetzen der BiTE[®]-Gabe zügig aufgehoben werden. Die Vorteile der BiTE[®] Technology gegenüber des CAR-T-Zell Ansatzes führte zur Entwicklung eines BiTE[®], welcher neben seiner Spezifität für CD3, gegen das gB Protein des HCMV gerichtet ist. Das gB Protein wurde bereits in früheren Arbeiten als ein passendes Antigen für die HLA-unabhängige CAR-T-Zell-Therapie

HCMV infizierter Zellen identifiziert (Full et al., 2010). Der in Kooperation mit Amgen entwickelte gB-spezifische BiTE[®] wurde parallel von unseren Kooperationspartnern in Wien auf seine Funktionalität in HCMV infizierten HFFs hin untersucht (Brey et al., 2018). Nachdem hier eine durch den gB-BiTE[®] vermittelte Zytokin-abhängige Inhibition der Virusausbreitung *in vitro* im humanen System bestätigen konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit die mögliche Anwendung einer murinisierten Version des gB-BiTE[®] für ein *in vivo* Mausmodell untersucht werden. Der murinisierte BiTE[®] besitzt anstatt einer Spezifität für das humane CD3 eine solche für das murine CD3 und ist somit in der Lage murine T-Zellen zu binden. Die Virus-spezifische Bindekapazität für das HCMV gB bleibt unverändert.

Der erste Schritt zur Charakterisierung der murinen Variante des gB-BiTE[®] war die Findung einer geeigneten Multiplizität der Infektion (MOI; *multiplicity of infection*) sowie eine Analyse der Replikationseigenschaften der unterschiedlichen Viren. Damit eine Interaktion des gB-BiTE[®] mit dem HCMV gB nachgewiesen werden konnte, wurde ein MCMV verwendet, welches zusätzlich das gB des HCMV exprimiert. Dieses ist für eine effektivere Oberflächenpräsentation an eine EpCAM-Transmembrandomäne fusioniert worden. Neben diesem MCMV gB-EpCAM wurde ein MCMV Wt Virus als Kontrolle verwendet. Das MCMV gB-EpCAM weist einen geringfügig langsameren Replikationszyklus als das Wt Virus auf und so zeigte sich, dass die Verwendung einer MOI von 0,01 einerseits zu einer gut messbaren Ausbreitung des gB-EpCAM Virus führt, sich das Wt Virus aber gleichzeitig noch nicht zu stark ausgebreitet hat, sodass noch kein oder nur ein sehr geringer CPE zu sehen ist (Abb. 6). Daher wurde für die meisten folgenden Versuche eine Standard-MOI von 0,01 verwendet.

Der zweite wichtige Schritt war die Bestimmung einer passenden Konzentration des murinen gB-BiTE[®], die zu einer ausreichenden hohen Aktivierung der T-Zellen führt, ohne dabei eine unspezifische Reaktion hervorzurufen. Zu diesem Zweck wurde sowohl die murine als auch die humane Variante des gB-BiTE[®] in Co-Kulturen von den entsprechend Spezies-spezifischen CD3/CD28 stimulierten T-Zellen und MCMV gB-EpCAM infizierten murinen Fibroblasten titriert (Abb. 7). Hier zeigte sich bereits ein erster Hinweis auf die Funktionalität der BiTE[®] im murinen System. Bereits geringe Mengen rufen eine deutliche Verminderung der viralen Ausbreitung hervor. Die Aktivierung der T-Zellen bei Kontakt mit infizierten Zellen und dem gB-BiTE[®] wurde durch das Level an sekretiertem IFN γ und TNF α bestimmt, da diese beiden Zytokine in Kombination dafür bekannt sind die Virusausbreitung hemmen zu können (Cheeran et al., 2000). Eine messbare Sekretion von TNF α konnte jedoch weder von humanen T-Zellen mit dem humanen gB-BiTE[®] noch von murinen T-Zellen mit dem murinen gB-BiTE[®] detektiert werden. Eine Aus-

schüttung von IFN γ war jedoch in beiden Varianten vorhanden (Abb. 8). Mit einer Konzentration des murinen BiTE[®] von 100 ng/ml konnte eine ausreichend hohe Aktivierung der murinen T-Zellen sowie eine deutliche Hemmung der Virusausbreitung beobachtet werden, weshalb diese für alle weiteren Versuche als Standard-Arbeitskonzentration gewählt wurde. Im Vergleich zu murinen T-Zellen zeigten humane T-Zellen ab einer Konzentration von 100 ng/ml humanem gB-BiTE[®] eine Antigen-unabhängige Aktivierung bei Kontakt mit uninfizierten MEF-Zellen. Da es aber vorwiegend um die Austestung des murinen gB-BiTE[®] im homologen murinen System mit murinen T-Zellen ging, und die Variante mit humanen T-Zellen und dem humanen gB-BiTE[®] lediglich als Bestätigung der Funktionalität der BiTE[®] Technologie dienen sollte, wurde zum besseren Vergleich auch hier eine Konzentration von 100 ng/ml gB-BiTE[®] festgelegt.

Nachdem ein erster Hinweis auf die Funktionalität des gB-BiTE[®] gegeben war, sollte weiter eine Spezies-spezifische und Antigen-abhängige Funktion des BiTE[®] gezeigt werden. Dies wurde anhand verschiedener Co-Kulturen bestätigt. Der murine gB-BiTE[®] vermittelt dabei weder in Co-Kulturen von murinen T-Zellen mit uninfizierten noch mit MCMV Wt infizierten Zellen eine Antigen-unabhängige Aktivierung der T-Zellen und hat in diesen Negativkontrollen somit keinen Einfluss auf die Ausbreitung der Viren. Auf MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen hingegen vermittelte der murine gB-BiTE[®] eine starke Aktivierung der T-Zellen und eine damit einhergehende Hemmung der Infektionsausbreitung. Weiter konnte gezeigt werden, dass weder die alleinige Zugabe von T-Zellen noch des murine gB-BiTE[®] sowohl auf Wt als auch auf gB-EpCAM infizierte Zellen einen Einfluss auf die Ausbreitung der Viren haben. Außerdem konnte kein Spezies-unspezifischer Einfluss des humanen gB-BiTE[®] auf murine T-Zellen beobachtet werden. (Abb. 9 und 11) Eine Aktivierung der T-Zellen und die damit verbundene stimulierte Sekretion von IFN γ wurde nur in Co-Kulturen von MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen mit murinen T-Zellen und dem murinen gB-BiTE[®] in größeren Mengen nachgewiesen (Abb. 10). Eine geringe Menge IFN γ war dabei in allen anderen Co-Kulturen detektierbar; dies resultierte aus der vorherigen CD3/CD28 Stimulation und der damit verbundenen Aktivierung der T-Zellen, trotz dass diese lange geruht hatten bevor sie für diesen Versuch eingesetzt wurden.

Verwendet man anstatt muriner Effektorzellen humane T-Zellen, so beobachtet man ähnliche Muster bei der Ausbreitung der Viren. Diese wird dann ausschließlich in Co-Kulturen von MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen mit humanen T-Zellen und dem humanen gB-BiTE[®] effektiv inhibiert. Es tritt weder eine Spezies-unspezifische noch eine Antigen-unabhängige Hemmung auf. (Abb. 12). Lediglich anhand der Bildung infizierter Zellfoci wird deutlich, dass der Effekt nicht so stark ausgebildet ist wie bei Verwendung

homologer muriner T-Zellen und dem murinen BiTE[®] (Abb. 14 und 11). Was jedoch im Vergleich zu murinen T-Zellen auffällt, ist eine gewisse Antigen-unabhängige Aktivierung der humanen T-Zellen durch den gB-BiTE[®]. Sowohl auf uninfizierten als auch auf MCMV Wt infizierten Zellen kann eine Sekretion von IFN γ nachgewiesen werden (Abb. 13). Diese scheint jedoch keinen Einfluss auf die Inhibition der viralen Dissemination zu haben. Eine durch die CD3/CD28 Stimulation noch vorhandene Aktivierung der T-Zellen (wie bei murinen T-Zellen, siehe Abb. 10) kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, da ohne den humanen gB-BiTE[®] und mit dem murinen gB-BiTE[®] kein IFN γ produziert wird. Die Ergebnisse decken sich mit denen aus dem Titrationsversuch des humanen gB-BiTE[®] (Abb. 8). Bereits hier war auf uninfizierten MEFs eine Antigen-unabhängige Produktion von IFN γ ab einer Menge von 100 ng/ml BiTE[®] zu sehen. Bei einer Verwendung geringerer BiTE[®]-Konzentrationen hätte dies zwar vermutlich verhindert werden können, jedoch mit Sicherheit nicht ohne eine deutlich verminderte Hemmung der Virusausbreitung.

Außerdem ist allgemein die Menge an sekretiertem IFN γ bei murinen T-Zellen um einiges höher ist als bei humanen. Dies kann zum einen bedingt durch den Spender der T-Zellen und deren individuelle Effizienz sein, aber auch durch die Tatsache, dass in Co-Kulturen von humanen T-Zellen mit murinen Fibroblasten Zellen zweier unterschiedlicher Spezies mit entsprechend teilweise weniger kompatiblen Oberflächenrezeptoren aufeinander treffen. Dies erklärt vermutlich auch, dass die Ausbreitung der viralen Foci (Abb. 14 C) durch humane T-Zellen nicht so effektiv wie durch murine T-Zellen inhibiert wird (Abb. 11 C). Der antivirale Effekt von humanem Interferon auf murinen Zellen wird in der Literatur als deutlich geringer beschrieben als bei humanem Interferon auf humanen Zellen, was mit den hier beobachteten Ergebnissen einher geht. (Samuel et al., 1977). Ebenso könnten im homologen murinen System weitere T-Zell-Zytokine oder andere Mediatoren mit Spezies-spezifischer Wirkung aktiv sein, deren Homologe in stimulierten humanen T-Zellen sezerniert werden, auf infizierte murinen Zellen aus Gründen der Speziesrestriktion aber nicht einwirken können.

Da die Funktionalität des gB-BiTE[®] in einem murinen *in vitro*-System nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage des Mechanismus der durch den gB-BiTE[®] vermittelten Inhibition. Ein erster möglicher Weg der Inhibition ist die Produkt von IFN γ , welches als Inhibitor der viralen Infektionsausbreitung bekannt ist (Cheeran et al., 2000) und auch hier detektiert werden konnte. Auch TNF α gilt in Kombination mit IFN γ als ein starker Inhibitor viraler Infektionen. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es existiert sowohl eine Membran-gebundene als auch eine lösliche Form von TNF α . Die

lösliche Form entsteht dabei durch proteolytische Spaltung der in die Membran integrierten Form, vermittelt durch die Metalloprotease TACE (*TNF alpha converting enzyme*). (Black et al., 1997) Ob TNF α hier vielleicht produziert, jedoch nicht in den Überstand freigelassen wird und somit in seiner Membran-gebundenen Form zurück bleibt, ist unklar.

Um zu sehen ob darüber hinaus noch weitere Mechanismen beteiligt sind, die möglicherweise direkt und Zytokin-unabhängig auf gB-exprimierende Zellen wirken, wurde ein Co-Infekt durchgeführt, bei welchem murine Fibroblasten gleichzeitig mit dem MCMV Wt und dem gB-EpCAM Virus infiziert wurden. Bei einer ausschließlich Zytokin-bedingten Inhibition der viralen Ausbreitung sollte der Effekt ähnlich wie in Ansätzen mit MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen, murinen T-Zellen und dem murinen gB-BiTE[®] sein; diese werden in die Umgebung sekretiert und können somit auf alle sich in der Kultur befindenden Zellen wirken. Also sollte sowohl die Ausbreitung des Wt als auch des gB-EpCAM Virus gehemmt werden. Doch schon durch die Auswertung des Luziferase-Assays konnte man sehen, dass die Virusausbreitung durch Zugabe von T-Zellen und dem murinen gB-BiTE[®] nur geringfügig inhibiert wird (Abb. 15). Die Bestimmung der Anzahl an viralen Genomkopien zeigte dann, dass in Co-Kulturen mit co-infizierten murinen T-Zellen und dem murinen gB-BiTE[®] zwar im Vergleich mit Ansätzen ohne bzw. dem humanen gB-BiTE[®] weniger Kopien des Wt Virus vorhanden waren, die Anzahl an MCMV gB-EpCAM Kopien aber nochmals um einiges geringer war als die des Wt (Abb. 16), was darauf hindeutet, dass nicht nur Zytokine, sondern auch direkt spezifisch auf gB-EpCAM infizierte Zellen wirkende Mechanismen für eine Hemmung der viralen Infektionsausbreitung verantwortlich sind.

Ein weiterer Hauptmechanismus von Immunzellen ist die Eliminierung infizierter Zellen durch zytotoxische Effektorfunktionen. Zytotoxische T-Zellen eliminieren ihre Zielzellen durch Freisetzung von FasL und TRAIL, welche zur Aktivierung von Todesrezeptoren führen. (Mirandola et al., 2004; Waring et al., 1999) Außerdem setzen sie zytotoxische Granula frei, die sowohl Perforin als auch Granzyme enthalten. Das in diesen Granula enthaltene Perforin bildet in der Membran der Zielzelle Poren, durch welche die enthaltenen Granzyme in die Zelle eindringen können und durch die Spaltung von Caspasen und anderen pro-apoptischen Proteinen den Zelltod initiieren. (Farber et al., 2014)

Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob der gB-BiTE[®] in der Lage ist den Tod infizierter Zellen durch die T-Zellen zu vermitteln. Zusammen mit unseren Kollegen konnten wir bereits im humanen System sehen, dass HCMV-infizierte Zielzellen durch humane T-Zellen und den humanen gB-BiTE[®] nicht lysiert werden (Brey et al., 2018). Auch ich konnte weder eine durch murine T-Zellen und den murinen gB-

BiTE[®], noch eine durch humane T-Zellen und den humanen BiTE[®], initiierte Lyse infizierter Zielzellen beobachten (Abb. 17). Leider erfolgte auch in einem Kontrollversuch in 293T-Zellen, welche mit dem gB-EpCAM transduziert wurden, keine effektive Zielzelllyse. Dies lag jedoch weniger an der fehlenden Fähigkeit der Lyse-Vermittlung des gB-BiTE[®] als mehr an einer sehr schlechten Expressionseffizienz des gB auf der Oberfläche der 293T Zellen (Abb. 17 C). Brey et al. konnten nämlich bereits nachweisen, dass zumindest der humane gB-BiTE[®] im Prinzip durchaus in der Lage ist die Lyse einer (uninfizierten) Zielzelle zu induzieren. Was jedoch trotz fehlender Lyse durchgängig beobachtet werden konnte, ist eine starke Aktivierung der T-Zellen. Sowohl in Co-Kulturen von gB-exprimierenden 293T-Zellen als auch von MCMV gB-EpCAM infizierten MEFs mit murinen/humanen T-Zellen und dem murinen/humanen gB-BiTE[®] wurde eine Sekretion von IFN γ gemessen (Abb. 18). Während in infizierten Zellen nach wie vor kein sekretiertes TNF α nachweisbar war, konnte sowohl durch humane als auch durch murine T-Zellen mit ihrem jeweils Spezies-spezifischen BiTE[®] bei Kontakt mit gB-293Ts eine Ausschüttung von TNF α beobachtet werden (Abb. 19).

Die Beobachtung einer Resistenz CMV-infizierter Zellen gegenüber der Lyse durch zytotoxische T-Zellen wurde von unseren Arbeitsgruppen bereits einmal in Zusammenhang mit CAR T-Zellen beschrieben. Co-Kulturen HCMV infizierter HFFs mit T-Zellen, welche einen spezifisch gegen das HCMV gB-Protein gerichteten CAR exprimierten, zeigten trotz Aktivierung der T-Zellen und der Sekretion von IFN γ , Perforin und Granzymen keine Lyse der infizierten Zielzelle. (Proff et al., 2016) Demnach ist zu vermuten, dass HCMV noch weitere Mechanismen besitzt um der körpereigenen Immunabwehr und speziell der Lyse durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen. Beschrieben werden hier drei anti-apoptotische virale Proteine (UL36, UL37x1 und UL38) und die virale miRNA β 2.7 (Brune, 2011). UL37x1 hat dabei offensichtlich einen größeren Effekt auf die Resistenz gegenüber der T-Zell-Lyse als UL36. (Proff et al., 2016) Auch Halle et al. konnten in einem *in vivo* Versuch in Mäusen, welche mit einem das Zielepitop der CTLs exprimierendem MCMV infiziert waren, keine Lyse der Zielzellen beobachten, trotz hochspezifischer, das SIINFEKL Epitop mittels transgen exprimierten TCR erkennenden CTLs. Erst bei der Infektion mit einer MCMV-3D- Δ vRAP (*viral regulators of antigen presentation*) Mutante, die massive Defizite in der MHC-vermittelten Immunevasion aufweist, konnte eine T-Zell-vermittelte Lyse der infizierten Zielzellen erreicht werden. (Halle et al., 2016) Wobei zweierlei zu bemerken ist: die spezifische Lyse der mit dieser MCMV-Defektmutante infizierten Zellen wurde verglichen mit der Lyse von Zellen die infiziert waren mit einem ebenfalls immunevasive Eigenschaften besitzenden Poxvirus; und trotz fehlender Lyse sind MCMV spezifische T-Zellen sehr wohl in der Lage, die Virusinfektion zu kontrollieren, möglicherweise über sezernierte Interferone, TNF und weitere Zyto-

kine. Folglich scheint nicht nur HCMV, sondern auch MCMV Mechanismen entwickelt zu haben um dem vorzeitigen Tod der Zielzelle und dadurch seiner Eliminierung zu entgehen.

Nachdem eine Funktionalität des murinen gB-BiTE[®], welcher vorrangig durch das Auslösen der Sekretion von IFN γ durch T-Zellen eine Inhibition der viralen Ausbreitung vermitteln kann, in einem murinen *in vitro* System nachgewiesen werden konnte, sollte die Technologie für die bevorstehende Anwendung in einem *in vivo* Mausmodell angepasst werden. BiTE[®] Moleküle werden aufgrund ihrer geringen Größe von ca. 55 kDa rasch über die Niere ausgeschieden, was eine geringe Serum-Halbwertszeit von 2-4 Stunden zur Folge hat. (Stieglmaier et al., 2015; Hoffman et al., 2014) Daher ist eine ständige intravenöse Gabe nötig, um eine wirksame Konzentration des BiTE[®] aufrecht zu erhalten. Dies kann beim Auftreten von starken Nebenwirkungen von Vorteil sein, da die Aktivierung der T-Zellen durch ein Absetzen der Therapie sehr zeitnah reduziert werden kann. Die permanente intravenöse Gabe ist jedoch am Patienten, gegenüber einer fraktionierten Verabreichung, aufwendiger und weniger erwünscht. Auch bei Anwendung im Mausmodell ist eine dauerhafte der Gabe des BiTE[®] eher schwierig. Daher wurden von Amgen Varianten des murinen und humanen gB-BiTE[®] entwickelt, welche eine verlängerte Halbwertszeit aufweisen und nur noch eine einmal wöchentliche Woche Gabe erfordern. Auch für andere BiTE[®] Moleküle wie den CD19, CD33 oder anti-BCMA BiTE[®] wurden bereits Varianten mit einer längeren Halbwertszeit entwickelt. Der Unterschied zu den normalen (kanonischen) BiTE[®] Molekülen ist dabei eine zusätzliche Fusion an eine Fc-Domäne ohne eigene Fc-Bindungseigenschaften, wodurch die Antikörper größer (ca. 108 kDa) und daher weniger über die Niere ausgeschieden werden. (Arvedson et al., 2017; Lorenczewski et al., 2017; Goyos et al., 2017)

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen ob der Halbwertszeit-verlängerte gB-BiTE[®] (HWZv gB-BiTE[®]) *in vitro* eine zu dem normalen, kanonischen gB-BiTE[®] vergleichbare Funktionalität aufweist. Analog zum normalen gB-BiTE[®] wurde zunächst eine geeignete Konzentration der HWZv gB-BiTE[®] ermittelt. Sowohl der murine als auch der humane HWZv BiTE[®] vermittelten in Co-Kulturen von MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen mit den entsprechend Spezies-spezifischen HWZv BiTE[®] Molekülen eine mit steigender HWZv gB-BiTE[®]-Konzentration sinkende Ausbreitung der viralen Infektion (Abb. 20). Auch eine Aktivierung der T-Zellen, bestimmt durch Menge an sekretiertem IFN γ , ist vorhanden. Anders als beim normalen BiTE[®] zeigen humane T-Zellen mit dem humanen HWZv gB-BiTE[®] keine Antigen-unabhängige Aktivierung auf uninfizierten Zellen (Abb. 21). Eine Sekretion von TNF α konnte auch hier nicht nachgewiesen werden.

Im Vergleich zum normalen gB-BiTE[®], vermittelte der HWZv BiTE[®] nicht nur in Co-

Kulturen von MCMV gB-EpCAM infizierten Zellen, murinen/humanen T-Zellen und dem Spezies-spezifischen HWZv BiTE[®] eine Reduktion der viralen Ausbreitung, sondern auch in Kontakt mit MCMV Wt infizierten Zellen (Abb. 22, 24, 25 und 27). Auch eine Aktivierung der T-Zellen und die Sekretion geringer Mengen an IFN γ ist hier zu beobachten (Abb. 23 und 26). Da dieser Antigen-unspezifische Effekt nicht auf uninfizierten Zellen zu sehen ist und der gB-BiTE[®] zur Verlängerung der Halbwertszeit eine zusätzliche Fusion an eine Fc-Domäne enthält, vermute ich, dass dieser Effekt womöglich mit einer Bindung des BiTE[®]-Fc-Teils an virale Fc γ -Rezeptoren (vFc γ R) erklärbar ist. vFc γ R sind in der Lage die konstante Region von IgG zu binden und dadurch die IgG-vermittelte Aktivierung von Wirts-Fc γ -Rezeptoren zu unterbinden (Corrales-Aguilar et al., 2014). Sowohl HCMV als auch MCMV exprimieren vFc γ R. Für MCMV ist aktuell nur ein vFc γ R bekannt, weitere werden jedoch vermutet. Dieser wird von dem frühen Gen *m138/fcr-1* transkribiert (Thäle et al., 1994). Um zu überprüfen ob eine unspezifische Bindung des HWZv gB-BiTE[®] an diesen viralen, auf der Wirtzell-Oberfläche exprimierten Rezeptor vorliegt, wurden MEF Zellen mit einer MCMV *m138*-Deletions-Mutante (MCMV FSH Δ m138) infizierte und mit den üblichen Co-Kulturen behandelt (Abb. 24 D und 27 D). Sowohl in Co-Kulturen mit murinen T-Zellen und dem murinen HWZv gB-BiTE[®] als auch bei humanen T-Zellen und dem humanen HWZv gB-BiTE[®] war nun keine Inhibition der Virusausbreitung mehr sichtbar. Dies spricht dafür, dass der HWZv gB-BiTE[®] nicht nur spezifisch über das HCMV gB sondern auch über den virale MCMV *m138/fcr-1* Fc γ an infizierte Zellen binden kann. Die Aktivierung der T-Zellen und die Hemmung der Virusausbreitung fallen dabei aber wesentlich geringer aus als über eine spezifische Interaktion mit gB. Da jedoch mit dieser unspezifischen aber wohl Virus-spezifischen Bindung eine Inhibition der Infektionsausbreitung erreicht werden konnte, könnten virale Fc γ Rs ein potentiell Ziel-Antigen für die Entwicklung eines neuen CMV-spezifischen BiTE[®] darstellen, sofern eine Erkennung zellulärer FcR vermieden wird.

Im Weiteren wurde auch für den HWZv gB-BiTE[®] die Fähigkeit zur Vermittlung einer T-Zell-Lyse genauer untersucht. Es zeigte sich allerdings auch hier, dass es zwar zu einer starken Aktivierung der T-Zellen (sowohl human als auch murin) und der Sekretion von IFN γ kommt, eine Lyse der infizierten Zielzelle jedoch nicht erfolgt (Abb. 28 und 29).

Eine mögliche Anpassung der BiTE[®]-Technology, spezifisch für CMV-Infektionen, wäre unter Umständen die Verwendung anderer Effektorzellen. Jüngst konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen, welche sowohl Funktionen der angeborenen als auch Effektor-Gedächtnis-Funktionen der adaptiven Immunität aufweisen, in der Lage sind die Virusausbreitung zu inhibieren, und zwar neben der Sekretion von IFN γ und TNF α auch

durch die Zytolyse der infizierten Zielzelle. (Sell et al., 2015) Da $\gamma\delta$ -T-Zellen ebenfalls CD3 exprimieren, sollte man untersuchen, ob diese Art der Effektorzellen womöglich die Fähigkeit besitzt, infizierte Zellen durch den gB-BiTE[®] vermittelt zu lysieren.

IFN γ und TNF α können als pro-inflammatorische Zytokine die Ausbreitung von HCMV hemmen (Cheeran et al., 2000) und auch in dieser Arbeit konnte eine Sekretion von IFN γ und damit verbunden eine Inhibition der Virusausbreitung von MCMV *in vitro* beobachtet werden. Daher sollte nachfolgend durch die Zugabe verschiedener rekombinanter Zytokine gezeigt werden, welchen Einfluss sie auf die Ausbreitung von MCMV haben. Eine Zugabe von rekombinatem IFN γ 24 Stunden vor Infektion führte sowohl bei MCMV Wt als auch gB-EpCAM infizierten MEF-Zellen zu einer stark reduzierten Virusausbreitung. Eine Kombination von IFN γ und TNF α führte zu einer noch drastischeren, synergistischen Hemmung der Ausbreitung der Viren (Abb. 31). Möglicherweise wird zusammen mit TNF α ein weiterer oder anderer Signalweg und/oder die Expression zusätzlicher antiviraler Gene angeschaltet, was eine noch stärkere Virus-hemmende Wirkung vermittelt.

Erstaunlicherweise führte die alleinige Zugabe von rekombinatem TNF α zu einer deutlich gesteigerten Ausbreitung der Infektion *in vitro*. Dieser Effekt scheint dabei abhängig von der Menge an eingesetztem TNF α zu sein (Abb. 32). Eine erste, deutlich erhöhte Infektionsausbreitung wurde in den Versuchen ab rund 40 U/ml sichtbar und steigt auch mit höheren Konzentrationen nur noch geringfügig an. Ein Maximum wird bei 2000 U/ml TNF α erreicht. Des Weiteren scheint die Länge der Inkubation der Zellen mit TNF α vor der Infektion einen Einfluss auf die Ausbreitung zu haben (Abb. 33). Erfolgt eine Inkubation für 8 oder 48 Stunden, ist eine deutlich gesteigerte virale Dissemination zu beobachten. Bei einer 16- oder 24h-stündigen Inkubation der Zellen mit TNF α ist der Effekt ebenfalls zu sehen, jedoch deutlich geringer als bei 8 und 28 Stunden. Möglicherweise kann man hier einen Einfluss der unterschiedlichen Zellzyklusphasen oder einen Einfluss des TNF auf diese beobachten.

Ob der Effekt einer gesteigerten Ausbreitung von MCMV *in vitro* tatsächlich durch TNF α induziert wird, wurde durch die Neutralisation von TNF α mittels eines neutralisierenden anti-Maus TNF α Antikörpers überprüft. Eine vollständige Eliminierung des Effekts konnte dabei zwar nicht erzielt werden (Abb. 34), dennoch zeigte sich eine deutlich verminderte Virusausbreitung im Vergleich zu nur mit TNF α behandelten Zellen. Diese Beobachtung, dass ein als pro-inflammatorisch bekanntes Zytokin zum genau gegenteiligen Effekt führt, wurde in der Literatur bis jetzt noch nicht beschrieben und erfordert weitere Untersuchungen.

7 Fazit

Der gB-BiTE[®] bietet Vorteile in Anbetracht der im Vergleich zur CAR-Technology vereinfachten klinischen Anwendbarkeit und wäre eine attraktive alternative HLA-unabhängige Therapieform bei HCMV-Infektionen. Da HCMV ausschließlich humane Zellen infiziert, ist es für die weitere Charakterisierung des gB-BiTE[®] von Nöten eine Möglichkeit zu entwickeln, diesen in einem präklinischen *in vivo*-Mausmodell zu testen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die murine Variante des gB-BiTE[®] *in vitro* im homologen murinen System genauer untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die murine Variante des gB-BiTE[®] in der Lage ist die Ausbreitung von MCMV, welches zusätzlich für das HCMV gB codiert, *in vitro* zu unterdrücken. Der murine gB-BiTE[®] vermittelt dabei eine starke T-Zell-Aktivierung und die Sekretion von IFN γ . Eine spezifische Lyse infizierter Zielzellen konnte jedoch nicht erreicht werden, was aber mit Untersuchungen zum humanen gB-BiTE[®] sowie einem gB-spezifischen CAR einher geht (Proff et al., 2016; Brey et al., 2018). Trotz der fehlenden T-Zell-induzierten Lyse schließt dies eine antivirale Wirkung des gB-BiTE[®] nicht aus, da auch seine nicht-zytotoxische Funktion, wie die Sekretion von IFN γ , eine Inhibition der Virusausbreitung bewirken kann. Außerdem zeigt die Arbeit, dass wahrscheinlich weitere, spezifisch gegen das Zielprotein gB exprimierende Zellen gerichtete Mechanismen an einer Hemmung der Virusausbreitung beteiligt sind.

Eine Halbwertszeit-verlängerte Variante des gB-BiTE[®] wurde aufgrund dessen kurzer Serum-Halbwertszeit entwickelt, um eine vereinfachte Anwendbarkeit im Mausmodell zu erzielen. Diese zeigte neben den auch durch den normalen gB-BiTE[®] induzierten Effekten eine, möglicherweise durch den viralen Fc γ -Rezeptor (m138/fcr-1) bedingte, gB-Antigen-unabhängige aber für die Virusinfektion spezifische Bindung des HWZv gB-BiTE[®]. Dadurch entstand auch bei MCMV Wt infizierten Zellen eine leichte Reduktion der viralen Ausbreitung sowie eine Aktivierung der T-Zellen und eine Sekretion von IFN γ .

Darüber hinaus wurde erstmals ein noch unbekannter Effekt einer gesteigerten Virusvermehrung durch TNF α beobachtet. Dieses Phänomen bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit die Funktionalität einer murinen Variante des gB-BiTE[®] *in vitro* nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass der gB-BiTE[®] nicht nur

in seiner humanen Version im humanen *in vitro*-System sondern dass auch die murine gB-BiTE[®] Variante im murinen System *in vitro* eine effektive Inhibition der CMV-Ausbreitung bewirkt. Dies eröffnet die Möglichkeit diese neue Form der CMV-Therapie im weiteren Verlauf in einem präklinischen Mausmodell *in vivo* weiter zu untersuchen.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<i>Abbildung</i>
Ag	<i>Antigen</i>
AIDS	<i>Acquired Immun Deciciency Syndrome</i>
ALL	<i>akute lymphatische Leukämie</i>
AML	<i>akute myeloische Leukämie</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	<i>Ammoniumpersulfat</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BiTE [®]	<i>Bispecific T cell Engager</i>
CAR	<i>chimärer Antigen-Rezeptor</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
DNA	<i>Desoxyribunukleinsäure</i>
dNTPs	<i>Deoxyribonukleosidtriphosphate</i>
ds	<i>doppelstrang</i>
E	<i>early</i>
EBV	<i>Eppstein-Barr Virus</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EpCAM	<i>epitheliales Zelladhäsionsmolekül</i>
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKS	<i>Fötales Kälberserium Serum</i>
gB	<i>Glykoprotein B</i>
GCSF	<i>Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor</i>
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
GVHD	<i>Graft-versus-Host-disease</i>
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>
HCl	<i>Salzsäure</i>
HCMV	<i>Humanes Cytomegalovirus</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HHV	<i>Humanes Herpesvirus</i>
HIV	<i>Humanes Immundefizienzvirus</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HLE	<i>half-life elongated</i>
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
HSZT	<i>hämatopoetischen Stammzelltransplantation</i>
HWZv BiTE [®]	<i>Halbwertszeit-verlängerter BiTE[®]</i>
i.p.	<i>intraperitoneale</i>

Abkürzungsverzeichnis

IE	<i>immediate-early</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IgG	<i>Immunglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
kb	<i>kilobasen</i>
kDa	<i>kilo Dalton</i>
KSHV	<i>Karposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus</i>
L	<i>late</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
MCMV	<i>murines Cytomegalovirus</i>
MEF	<i>Murinen Embryonalen Fibroblasten</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>MHC-class I polypeptide-related chain</i>
MIP1 β	<i>macrophage inflammatory protein 1 β</i>
MMC	<i><u>murine mononuclear cells</u></i>
MOI	<i>Multiplizität der Infektion</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
NF κ B	<i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells</i>
NKG2D	<i>natural-killer group 2' Untergruppe D</i>
NK-Zellen	<i>Natürlich Killer-Zellen</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PBMC	<i><u>peripheral blood mononuclear cells</u></i>
PCR	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>
PMSF	<i>Phenylmethansulfonylfluorid</i>
ROX	<i>6-Carboxy-X-rhodamin</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
TACE	<i>TNF alpha converting enzyme</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TIL	<i>Tumor-infiltrierenden Lymphozyten</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
UL	<i>unique long</i>
ULBP1-6	<i>UL16-bindende Proteine 1-6</i>
US	<i>unique short</i>
vFcyR	<i>viraler Fcy-Rezeptor</i>
VZV	<i>Varizella Zoster Virus</i>

8 Literaturverzeichnis

1. Aigner M., Feulner J., Schaffer S., Kischel R., Kufer P., Schneider K., Henn A., Rattel B., Friedrich M., Baeuerle P.A., Mackensen A., Krause S.W. (2013). T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of aml blasts by a novel cd33/cd3-bispecific bite antibody construct. *Leukemia* 27, 1107-15.
2. Allan J.E. and Shellam G.R. (1984). Genetic control of murine cytomegalovirus infection: virus titers in resistant and susceptible strains of mice. *Archives of Virology* 81, 139-150.
3. Arvedson T.L., Balazs M., Bogner P., Black K., Graham K., Henn A., Friedrich M., Hoffmann P., Kischel R., Kufer P., Lutterbuese R., Muenz M., Raum T., Rattel B., Rex K., Rock D., Thomas O., Wahl J., Wolf A. and Coxon A. (2017). Generation of half-life extended anti-CD33 BiTE[®] antibody constructs compatible with once-weekly dosing. *American Association for Cancer Research* 7 (13), Supplement, pp55; 1538-7445.
4. Ausubel F., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (2005). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
5. Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K. (2007). *Human herpesviruses*. Cambridge University Press.
6. Baeuerle P.A., Reinhardt C. (2009). Bispecific t-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Research* 69 (12).
7. Birnboim H.C. and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
8. Black R.A., Rauch C.T., Kozlosky C.J., Peschon J.J., Slack J.L., Wolfson M.F., Castner B.J., Stocking K.L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K.A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J.N., Johnson R.S., Paxton R.J., March C.J. and Cerretti D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385, 729–733.
9. Boeckh M., Geballe A.P. (2011). Cytomegalovirus: Pathogen, paradigm, and puzzle. *The Journal of Clinical Investigation* 121(5), 1673-80.
10. Boeckh M., Nichols W.G. (2004). The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 103(6).
11. Bohne F., Chmielewski M., Ebert G., Wiegmann K., Kurschner T., Schulze A., Urban S., Kronke M., Abken H., Protzer U. (2008). T cells redirected against hepatitis b virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 134(1), 239-47.
12. Brey C.U., Proff J., Teufert N., Salzer B., Brozy J., Münz M., Pendzialek J., Ensser A., Holter W. and Lehner M. (2018). Biting back - Targeting Human Cytomegalovirus-infected fibroblasts with a gB/CD3 bispecific antibody construct (BiTE[®]). *Nature Scientific Reports* 8, 17453.
13. Britt W.J. (1984). Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virology* 135, 369-378.
14. Britt W.J. and Auger D. (1986). Synthesis and processing of the envelope gp55-116 complex of human cytomegalovirus. *Journal of Virology* 58, 185-191.
15. Brune W. (2011). Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus Research* 157, 144–150.

16. Bukowski J.F., Woda B.A. and Welsh R.M. (1984). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *Journal of Virology* 52, 119-128.
17. Cheeran M.C., Hu S., Gekker G., Kolensgard J.R. (2000). Decreased cytomegalovirus expression following proinflammatory cytokine treatment of primary human astrocytes. *Journal of Immunology* 164(2), 926-33.
18. Cioffi M., Dorado J., Baeuerle P.A., Heeschen C. (2011). Epcam/cd3-bispecific t-cell engaging antibody mt110 eliminated primary human pancreatic cancer stem cells. *Clinical Cancer Research* 18(2), 465–74.
19. Cohen J. I. and Corey G. R. (1985). Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine* 64, 100-114.
20. Compton T., Feire A. (2007). Chapter 16: Early events in human cytomegalovirus infection. In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanashi K., editors. *Human Herpesvirus: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
21. Copelan E.A. (2006). Hematopoietic stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 354(17), 1813-26.
22. Corrales-Aguilar E., Hoffmann K., Hengel H. (2014). CMV-encoded Fcγ receptors: modulators at the interface of innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunopathology* 36, 627–640.
23. Croen K.D. (1991). Latency of the human herpesviruses. *Annual Review of Medicine* 42, 61-67.
24. Crough T., Khanna R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: From bench to bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 76-98.
25. Cunningham C., Gatherer D., Hilfrich B., Baluchova K., Dargan D.J., Thomson M., Griffiths P.D., Wilkinson G.W., Schulz T.F. and Davison A.J. (2010). Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *Journal of General Virology* 91, 605-615.
26. Davila M.L., Brentjens R., Wang X., Riviere I., Adelain M.S. (2012). How do cars work? Early insights from recent clinical studies targeting cd19. *Oncoimmunology* 1(9), 1577-83.
27. Davison A.J. (2007). Chapter 1: Overview of classification. In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S. Roizman B., Whitley R., Yamanashi K., editors. *Human Herpesvirus: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
28. Del Val M., Volkmer H., Rothbard J.B., Jonjić S., Messerle M., Schickedanz J., Reddehase M.J. and Koszinowski U.H. (1988). Molecular basis for cytolytic T-lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus immediate-early protein pp89. *Journal of Virology* 62, 3965-3972.
29. Deshmane S.L. and Fraser N.W. (1989). During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *Journal of Virology* 63, 943-947.
30. Dörken B., Riethmüller G., Kufer P., Lutterbise R., Bargou R., Löffler A. (18. August 2009). CD19xCD3 Specific Polypeptides and Uses Thereof. Micromet AG München (DE), Patent Nummer US 7575923 B2.

31. Dubridge R.B., Tang P., Hsia H.C., Leong P.M., Miller J.H. and Calos M.P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and Cellular Biology* 7, 379-387.
32. Einsele H., Roosnek E., Rufer N., Sinzger C., Riegler S., Löffler J., Grigoleit U., Moris A., Rammensee H.-G., Kainz 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(11).
33. English D., Bellone S., Schwab C., Roque D., Lopez S., Vortolomai I., Cocco E., Bonazzoli E., Chatterjee S., Ratner E., Silasi D.-A., Azodi M., Schwartz P., Rutherford T., Santin A. (2015). Solitomab, an epithelial cell adhesion molecule/cd3 bispecific antibody (bite), is highly active against primary chemotherapy-resistant ovarian cancer cell lines in vitro and fresh tumor cells ex vivo. *Cancer* 121(3), 403–412.
34. Farber D.L., Yudanin N., Restifo N.P. (2014) Human memory t cells: Generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 14(1), 24-35.
35. Farrell H.E., Lawler C., Tan C.S.E., MacDonald K., Bruce K., Mach M., Davis-Poynter N., Stevenson P.G. (2016). Murine cytomegalovirus exploits olfaction to enter new hosts. *mBio* 7(2):e00251-16.
36. Fitzgerald N.A. and Shellam G.R. (1991). Host genetic influences on fetal susceptibility to murine cytomegalovirus after maternal or fetal infection. *Journal of Infectious Disease* 163, 276-281.
37. Flint S.J., Enquist L.W., Racaniello V.R. and Skalka A.M. (2004). *Principles of Virology, Second*, 298-339.
38. Full F., Lehner M., Thonn V., Goetz G., Scholz B., Kaufmann K.B., Mach M., Abken H., Holter W., Ensser A. (2010) T cells engineered with a cytomegalovirus-specific chimeric immunoreceptor. *Journal of Virology* 84(8), 4083-88.
39. Garber K. (2014). Bispecific antibodies rise again. *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 799-801.
40. Goyos A., Li C.-M., Deegen P., Bogner P., Thomas O., Klinger M., Wahl J., Goldstein R., Coxon A., Balazs M. and Chapman-Arvedson T. (2017). Generation of Half-Life Extended Anti-BCMA Bite[®] Antibody Construct Compatible with Once-Weekly Dosing for Treatment of Multiple Myeloma (MM). *Blood* 130, 5389.
41. Halenius A.C.G., Hengel H. (2015). Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus: So many targets- but how many arrows in the quiver? *Cellular & Molecular Immunology* 139, 53.
42. Halle S., Keyser K.A., Stahl F.R., Busche A., Marquardt A., Zheng X., Galla M., Heissmeyer V., Heller K., Boelter J., Wagner K., Bischoff Y., Martens R., Braun A., Werth K., Uvarovskii A., Kempf H., Meyer-Hermann M., Arens R., Kremer M., Sutter G., Messerle M., Förster R. (2016). In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T cell Cooperativity. *Immunity* 44, 233–245.
43. Hegde N.R., Tomazin R.A., Wisner T.W., Dunn C., Boname J.M., Lewinsohn D.M., Johnson D.C. (2002). Inhibition of HLA-DR assembly, transport, and loading by human cytomegalovirus glycoprotein US3: a novel mechanism for evading major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Journal of Virology* 76(21), 10929-41.
44. Hengel H., Reusch U., Gutermann A., Ziegler H., Jonjić S., Lucin P. and Koszinowski U.H. (1999). Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunological Reviews* 168, 167-176.

45. Hoffman L.M., Gore L. (2014). Blinatumomab, a bi-specific anti-CD19/CD3 BiTE[®] antibody for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: perspectives and current pediatric applications. *Frontiers in Oncology* 4, 63.
46. Holtappels R., Böhm V., Podlech J., Reddehase M.J. (2008). Cd8 t-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus infection: "Proof of concept" provided by the murine model. *Medical Microbiology and Immunology* 197, 125-34.
47. Hudecek M., Lupo-Stanhellini M.-T., Kosasih P.L., Sommermeyer D., Jensen M.C., Rader C., Riddell S.R. (2013). Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ror1-specific chimeric antigen receptor t cells. *Clinical Cancer Research* 19(12), 3153-64.
48. Jackson S.E., Mason G.M., Wills M.R. (2010). Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Research* 157(2), 151-60.
49. Jenq R.R., van den Brink M.R.M. (2010). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 10(3), 213-21.
50. Jonjić S., Pavić I., Lucin P., Rukavina D. and Koszinowski U.H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *Journal of Virology* 64, 5457-5464.
51. Jordan M. C., Rousseau W., Stewart J. A., Noble G. R. and Chin T. D. (1973). Spontaneous cytomegalovirus mononucleosis. Clinical and laboratory observations in nine cases. *Annals of Internal Medicine* 79, 153-160.
52. Kedia S., Acharya P.S., Mohammad F., Nguyen H., Asti D., Mehta S., Pan M., Mobarakai N. (2013). Infectious complications of hematopoietic stem cell transplantation. *Stem cell research & Therapy* S3.
53. Khairallah C., Déchanet-Merville J. and Capone M. (2017). $\Gamma\delta$ T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. *Frontiers in Immunology* 8, 105.
54. Koszinowski U.H., Keil G.M., Schwarz H., Schickendanz J. and Reddehase M.J. (1987). A nonstructural polypeptide encoded by immediate-early transcription unit 1 of murine cytomegalovirus is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 166, 289-294.
55. Krech U. (1973). Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bulletin of the World Health Organization* 49, 103-106.
56. Krmpotić A., Bubić I., Polić B., Lucin P. and Jonjić S. (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes and Infection* 5, 1263-1277.
57. Krmpotić A., Busch D.H., Bubić I., Gebhardt F., Hengel H., Hasan M., Scalzo A.A., Koszinowski U.H. and Jonjić S. (2002). MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nature Immunology* 3, 529-535.
58. Laszlo G.C.G., Harrington K., Dell'Aringa J., Newhall K., Means G., Sinclair A., Kischel R., Frankel S., Walter R. (2014). Cellular determinants for preclinical activity of a novel cd33/cd3 bispecific t-cell engager (bite) antibody, amg 330, against human aml. *Blood* 123(4).
59. Lee E.C., Yu D., Martinez de Velasco J., Tessarollo L., Swing D.A., Court D.L., Jenkins N.A. and Copeland N.G. (2001). A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73, 56-65.

60. Leen A.M., Heslop H., Brenner M.K. (2014). Antiviral t-cell therapy. *Immunological Reviews* 258(1), 12-29.
61. Leen A.M., Heslop H. (2008). Cytotoxic t lymphocytes as immune-therapy in hematological practice. *British Journal of Hematology* 143(2), 169-79.
62. Lorenczewski G., Friedrich M., Kischel R., Dahlhoff C., Anlahr J., Balazs M., Rock D., Boyle M.C., Goldstein R., Coxon A. and Chapman-Arvedson T. (2017). Generation of a Half-Life Extended Anti-CD19 BiTE[®] Antibody Construct Compatible with Once-Weekly Dosing for Treatment of CD19-Positive Malignancies. *Blood* 130, 2015.
63. Lucin P., Mahmutefendic H., Zagorac G.B., Tomas M.I. (2015). Cytomegalovirus immune evasion by perturbation of endosomal trafficking. *Cellular & Molecular Immunology* 154-69.
64. Lurain N.S., Chou S. (2010). Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews* 23(4), 689-712.
65. Manning W.C., Stoddart C.A., Langenaur L.A., Abenes G.B. and Mocarski E.S. (1992). Cytomegalovirus determinant of replication in salivary glands. *Journal of Virology* 66, 3794-3802.
66. Masiero S., Del Vecchio C., Gavioli R., Mattiuzzo G., Cusi M.G., Micheli L., Gennari F., Siccardi A., Marasco W.A., Palu G., Parolin C. (2005). T-cell engineering by a chimeric t-cell receptor with antibody-type specificity for the hiv-1 gp20. *Gene Therapy* 12(4), 299-310.
67. Maus M.V., Grupp S.A., Porter D.L., June C.H. (2014). Antibody-modified t cells: Cars take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 123(17), 2625-35.
68. Melendez D.P., Raymund R. (2015). Letermovir and inhibitors of the terminase complex: a promising new class of investigational antiviral drugs against human cytomegalovirus. *Infection and Drug Resistance* 8, 269-277.
69. Crnkovic-Mertens I., Messerle M., Milotic I., Szepan U., Kucic N., Krmpotic A., Jonjic S. and Koszinowski U.H. (1998): Virus Attenuation after Deletion of the Cytomegalovirus Fc Receptor Gene Is Not due to Antibody Control. *Journal of Virology* 72(2), 1377.
70. Mirandola P., Ponto C., Gobbi G., Sponzilli I., Vaccarezza M., Cocco L., Zauli G., Secchiero P., Manzoli F.A., Vitale M. (2004). Activated human nk and cd8+ t cells express both tnf-related apoptosis-inducing ligand (trail) and trail receptors but are resistant to trail-mediated cytotoxicity. *Immunobiology* 104(8), 2418-24.
71. Mocarski E.S. (2007). Chapter 15: Betaherpesvirus viral genes and their functions. In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamashita K., editors. *Human Herpesvirus: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
72. Moss P. and Rickinson A. (2005). Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nature Reviews Immunology* 5, 9-20.
73. Murphy E. and Shenk T. (2008). Human cytomegalovirus genome. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 325, 1-19.
74. Onorato I.M., Morens D.T. and Wahl G.M. (1985). Epidemiology of cytomegaloviral infections: recommendations for prevention and control. *Review Infectious Diseases* 7, 479-497.
75. Pear W.S., Nolan G.P., Scott M. L. and Baltimore D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *PNAS USA*. 90, 8392-8396.

76. Peggs K.S., Verfuërth S., Pizzey A., Khan N., Guiver M., Moss P.A., Mackinnon S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific t-cell lines. *The Lancet* 362.
77. Proff J., Walterskirchen C., Brey C., Geyeregger R., Full F., Ensser A., Lehner M. and Holter W. (2016). Cytomegalovirus-Infected Cells Resist T Cell Mediated Killing in an HLA-Recognition Independent Manner. *Frontiers in Microbiology* 7, 844.
78. Rauser G., Einsele H., Sinzger C., Wernet D., Kuntz G., Assenmacher M., Campbell J.D., Topp M.S. (2004). Rapid generation of combined cmv-specific cd4+ and cd8+ t-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood* 103(9), 3565-72.
79. Ravens S., Schultze-Florey C., Raha S., Sandrock I., Drenker M., Oberdörfer L., Reinhardt A., Ravens I., Beck M., Geffers R., von Kaisenberg C., Heuser M., Thol F., Ganser A., Förster R., Koenecke C. and Prinz I. (2017). Human gd T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. *Nature Immunology* 18(4), 393-401.
80. Rawlinson W.D., Farrell HE. and Barrell BG. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *Journal of Virology* 70, 8833-8849.
81. Reddehase M.J. (2002). Antigens and immuneevasions: Opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature Reviews Immunology* 2.
82. Reddehase M.J. and Koszinowski U.H. (1984). Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. *Nature* 312, 369-371.
83. Rogers N. (2015). A dormant danger: New therapies target a ubiquitous pathogen known as cytomegalovirus. *Nature Medicine* 21(10), 1104-05.
84. Roizman B., Carmichael L. E., Deinhardt F., de-The G., Nahmias A.J., Plowright W., Rapp F., Sheldrick P., Takahashi M. und Wolf K. (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* 16, 201-217.
85. Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. and Studdert M.J. (1992). The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* 123, 425-449.
86. Sadelain M.R.B., Riviere I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery*, 388-97.
87. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
88. Samuel C.E. and Farris D.A. (1977). Mechanism of interferon action Species specificity of interferon and of the interferon-mediated inhibitor of translation from mouse, monkey, and human cells. *Virology* 77, 556-565.
89. Sanford M. (2015). Blinatumomab: First global approval. *Drugs* 75, 321-27.
90. Scalzo A.A. (2002). Successful control of viruses by NK cells--a balance of opposing forces? *Trends in Microbiology* 10, 470-474.
91. Schoppel K., Haßfurther E., Britt W., Ohlin M., Borrebaceck C.A.K., Mach M. (1996). Antibodies Specific for the Antigenic Domain 1 of Glycoprotein B (gpUL55) of Human Cytomegalovirus Bind to Different Substructures. *Virology* 216, 133-145.
92. Sell S., Dietz M., Schneider A., Holtappels R., Mach M., Winkler T.H. (2015). Control of Murine Cytomegalovirus Infection by $\gamma\delta$ T Cells. *PLoS Pathogens* 11(2), e1004481.

93. Shaw J.E., Levinger L.F. and Carter C.W. (1979). Nucleosomal structure of Epstein-Barr virus DNA in transformed cell lines. *Journal of Virology* 29, 657-665.
94. Smith H.R., Heusel J.W., Mehta I.K., Kim S., Dorner B.G., Naidenko O.V., Iizuka K., Furukawa H., Beckman D.L., Pingel J.T., Scalzo A.A., Fremont D.H. and Yokoyama W.M. (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *PNAS USA*. 99, 8826-8831.
95. Socie G., Ritz J. (2014). Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 124(3).
96. Spiess C., Zhai Q., Carter P.J. (2015). Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Molecular Immunology* 67, 95-106.
97. Staerz U.D., Kanagawa O., Bevan M.J. (1985). Hybrid antibodies can target sites for attack by t cells. *Nature* 314, 628-21.
98. Stieglmaier J., Benjamin J. and Nagorsen D. (2015). Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 8, 1093-1099.
99. Suryadevara C.M., Gedeon P., Sanchez-Perez L., Verla T., Alvarez-Breckenridge C., Choi B., Fecci P., Sampson J. (2015). Are bites the "missing link" in cancer therapy? *Oncoimmunology* 4(6).
100. Sylwester A.W., Mitchell B.L., Edgar J.B., Taormina C., Pelte C., Ruchti F., Sleath P.R., Grabstein K.H., Hosken N.A., Kern F., Nelson J.A., Picker L.J. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of Experimental Medicine* 202(5), 673-85.
101. Tay C.H. and Welsh R.M. (1997). Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *Journal of Virology* 71, 267-275.
102. Thale R., Lucin P., Schneider K., Eggers M., Koszinowski U.H. (1994). Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an fc receptor. *Journal of Virology* 68, 12 7757-7765.
103. Turchinovich G., Pennington D.J. (2011). T cell receptor signaling in $\gamma\delta$ cell development: strength isn't everything. *Trends in Immunology* 32, 567-573.
104. Vanarsdall A.L., Johnson D.C. (2012). Human cytomegalovirus entry into cells. *Current opinion in Virology* 2(1), 37-42.
105. Van der Stegen S.J.C., Hamieh M., Sadelain M. (2015). The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nature Reviews Drug Discovery*.
106. Verghese P.S. and Schleiss M.R. (2013). Letermovir Treatment of Human Cytomegalovirus Infection Anti-infective Agent. *Drugs Future* 38(5), 291-298.
107. Walter E.A., Greenberg P.D., Gilbert M.J., Finch R.J., Watanabe K.S., Thomas E.D., Riddell S.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of t-cell clones from the donor. *The New England Journal of Medicine* 333(16), 1038-44.
108. Waring P., Müllbacher A. (1999). A.M. Cell death induced by the fas/fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunology and Cell Biology* 312-17.

109. Welsh R.M., Brubaker J.O., Vargas-Cortes M. and O'Donnell C.L. (1991). Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *Journal of Experimental Medicine* 173, 1053-1063.
110. Zagursky R.J., Baumeister K., Lomax N. and Berman M.L. (1985). Rapid and easy sequencing of large linear double-stranded and supercoiled plasmid DNA. *Gene Analysis Techniques* 2, 89-94.

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich, Natascha Teufert,

die eingereichte Doktorarbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe, außer den im Schriftumsverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmitteln keine weiteren benutzt und alle Stellen, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd entnommen sind, als solche kenntlich gemacht und einzeln nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), des Bandes und der Seite des benutzten Werkes in der Doktorarbeit nachgewiesen habe, die Doktorarbeit noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegt habe und dass dieselbe noch nicht anderen Zwecken - auch nicht teilweise - gedient hat.

Roßtal, den

Natascha Teufert

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Armin Ensser für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung während meiner Zeit in seiner Arbeitsgruppe bedanken. Ich habe in den letzten Jahren sehr viel Neues gelernt und viele fachliche und persönliche Erfahrungen sammeln können.

Prof. Dr. Andreas Burkovski danke ich für die Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit seitens der naturwissenschaftlichen Fakultät, das Erstgutachten sowie eine Mitgliedschaft in der Prüfungskommission zu übernehmen. Außerdem danke ich PD Dr. Brigitte Biesinger-Zwosta für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Yves Muller für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

Ein großes Dankeschön geht an alle ehemaligen und aktuellen Mitglieder des Ensser-Labors. Besonders Doris und Brigitte möchte ich für jegliche Unterstützung danken. Ihr habt mir in jeder Situation weiter geholfen, meine Fragen beantwortet und mir viel über das Laborleben gelernt.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an meine Mädels, Musch und Babs. Ohne euch, unsere Ausflüge und unsere gemeinsame Zeit wäre ich so manches Mal verzweifelt. Aber ihr habt es immer wieder geschafft mich aufzumuntern und mir viele schöne Momente und Erinnerungen zu beschenken. Danke, dass ihr da seid, wenn ich euch brauche!

Auch Eva und Berti sollen an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben. Danke für die wundervollen Chiemsee-Auszeiten, die mich immer wieder dem Alltag haben entfliehen lassen. Eva, danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hast und Berti, danke für jede technische Hilfe und dein unersetzbares, sonniges Gemüt.

Teddy, Danny und Emilio, ohne euch hätte ich diesen Weg nicht gehen können. Ihr wart/seid immer an meiner Seite und habt so manche Tränen getrocknet. Jeden Tag habt ihr mich begleitet und für jede Menge Spaß gesorgt. Und egal wo wir am Ende stehen, der Weg war immer unser Ziel.

Einem weiteren Menschen möchte ich von Herzen danken. Durch dich bin ich so oft wieder aufgestanden. Du hast mir die Kraft, den Mut und die Hoffnung gegeben weiterzumachen und nicht aufzugeben. Danke für all die wunderbaren und besonderen Momente, die du mir in den letzten Jahren geschenkt hast. Du hast mir gezeigt, dass ein kleines Glück die Gezeiten übersteht.

Ein besonderer Dank gilt meinem Michi. Oft weit weg, bist du dennoch immer bei mir. Du bist mein Fels in der Brandung. Du gibst mir Halt und ich danke dir dafür. Ohne dich, den Keller und die Company wäre ich heute um Jahre gealtert.

Ein großes, herzliches Dankeschön geht an meine Familie und vor allem meine Eltern, die mich immer unterstützen, egal was mir mal wieder einfällt. Danke, dass ihr immer für mich da seid. Ihr habt mich stark gemacht und habt mir Kraft gegeben für das Leben.

Zu guter Letzt, mein geliebter Malaga, im Herzen wirst du für immer bei mir sein.