

Aus dem
Institut für Immunologie
Abteilung für Peptid-basierte Immuntherapie

**T-Zell-vermittelte Immunantwort bei Tumor- und
Infektionskrankheiten: Klinische Implikationen beim
Ovarialkarzinom und SARS-CoV-2**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Tegeler, Christian Martin
2026**

Dekanin: **Professorin Dr. S. Y. Brucker**

1. Berichterstatter: **Professorin Dr. J. Walz**

2. Berichterstatter: **Professor Dr. O. Planz**

Tag der Disputation: **07.07.2026**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Das Immunsystem	7
1.2 T-Zell-Immunantwort.....	9
1.3 Beispielhafte Krankheitsmodelle zur Untersuchung der Rolle der T-Zell-vermittelten Immunität	11
1.3.1 Das Ovarialkarzinom - Erkrankung und Therapie	11
1.3.2 Das Ovarialkarzinom - Immunologischer Kontext und Bedeutung des Antigens Mesothelin.....	13
1.3.3 Immunantwort und Symptomatik bei Infektion durch SARS-CoV-2.....	13
1.4 Methodische Zugänge zur Untersuchung der T-Zell-Antwort	14
1.4.1 Massenspektrometrie-basierte Immunoepitidomik.....	15
1.4.2 Funktionelle T-Zell-Assays	15
1.5 Konzept und Zielsetzung der Dissertation	16
1.6 Forschungsfragen	16
1.7 Wissenschaftlicher Beitrag des Promovierenden	17
2. Publikationen	18
2.1 HLA-DR Presentation of the Tumor Antigen MSLN Associates with	18
Clinical Outcome of Ovarian Cancer Patients.....	18
2.1.1 Abstract	18
2.1.2 Introduction	19
2.1.3 Materials and Methods	20
2.1.4 Results	22
2.1.5 Discussion	30
2.2 Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort	32
2.2.1 Abstract	32
2.2.2 Introduction	33
2.2.3 Methods	34
2.2.4 Results	36
2.2.5 Discussion	45
3. Diskussion	48
3.1 Allgemeine Aspekte	48
3.2 Antigenpräsentation beim Ovarialkarzinom	48

3.3 COVID-19: Immunantwort, Pathogenese und neue Erkenntnisse.....	50
3.5 Klinische Relevanz und translationale Perspektiven.....	54
3.6 Fazit	56
4. Zusammenfassung.....	58
5. Literaturverzeichnis	59
6. Erklärung zum Eigenanteil und Veröffentlichungen	77
6.1 HLA-DR Presentation of the Tumor Antigen MSLN Associates with Clinical Outcome of Ovarian Cancer Patients.....	79
6.2 Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort	80
7. Anhang	81
8. Danksagung.....	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Figure 1. HLA presentation of tumor-associated antigenic peptides according to demographics and tumor characteristics.....	24
Abbildung 2: Figure 2. Impact of tumor-associated and MUC16-derived HLA class I-restricted peptide presentation on clinical outcomes.	26
Abbildung 3: Figure 3. Impact of tumor-associated and MSLN-derived HLA class II-restricted peptide presentation on clinical outcomes.	27
Abbildung 4: Figure 4. Impact of HLA-DRB gene expression on clinical outcome and in silico prediction of MSLN-derived peptide binding to HLA class II allotypes.	29
Abbildung 5: Figure 1. Symptom severity and antibody response in COVID-19.	38
Abbildung 6: Figure 2. Symptom severity and intensity of SARS-CoV-2-specific T cell response in COVID-19.....	40
Abbildung 7: Figure 3. Grouped symptom severity and intensity of SARS-CoV-2-specific T cell response in COVID-19.	43

Abkürzungsverzeichnis

+	Positiv
ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i>
CA-125	<i>Cancer antigen-125</i>
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
ELISpot	<i>Enzyme-Linked ImmunoSpot</i>
G1/G2	<i>Low or intermediate tumor grading</i>
G3	<i>High tumor grading</i>
HLA	<i>Humane Leukozytenantigene/Human leukocyte antigen</i>
IFN- γ	<i>Interferon-Gamma/Interferon-γ</i>
MS	<i>Massenspektrometrie</i>
MSLN	<i>Mesothelin</i>
MUC16	<i>Mucin-16</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
OS	<i>Overall survival</i>
OvCa	<i>Ovarian carcinoma</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFS	<i>Progression-free survival</i>
PMBCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes Netzwerk aus Zellen, Signalstoffen und Organen, das dem Schutz des Körpers vor pathogenen Mikroorganismen, maligne transformierten Körperzellen und weiteren Bedrohungen dient. Neben seiner eigentlichen Funktion muss es gleichzeitig eine gewisse Toleranz gegenüber gesunden Zellen halten, um den gesamten Organismus nicht zu gefährden. Eine Gliederung erfolgt in zwei größere Bereiche: Die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität. Während die angeborene Immunität eine unmittelbare, unspezifische Abwehr darstellt, zeichnet sich die adaptive Immunantwort durch eine hohe Spezifität, ein nahezu unbegrenztes immunologisches Gedächtnis und eine verzögerte, aber dafür gezielte Reaktion aus ¹.

Zentrale Akteure des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten oder B-Zellen sind primär für die Bildung spezifischer Antikörper verantwortlich. Die Erkennung von Antigenen durch die naive B-Zelle verläuft über die Bindung des Antigens an den B-Zell-Rezeptor. Bei ausgewählten Antigenen (zum Beispiel Oberflächenmolekülen von Bakterien) reicht dies bereits aus, um zu einer Produktion von spezifischen Antikörpern zu führen. Für die meisten Antigene ist jedoch eine zusätzliche Stimulation durch T-Zellen erforderlich. Nach Aufnahme des Antigens durch die B-Zellen und der Prozessierung des Antigens in kurze Peptidfragmente in der Zelle, werden diese dann über humane Leukozytenantigene (HLA) auf der Oberfläche der Zelle präsentiert. T-Helferzellen können diese Antigene mit ihrem T-Zell-Rezeptor binden und durch Zytokinausschüttung der B-Zelle das Signal zur Expansion und Differenzierung geben ¹⁻³.

T-Lymphozyten oder T-Zellen nehmen im Körper eine Vielzahl regulatorischer und zytotoxischer Funktionen wahr. T-Zellen entstehen, genau wie B-Zellen, im Knochenmark und wandern dann in den namensgebenden Thymus, in dem eine Selektion der Zellen erfolgt. Diese soll einerseits eine möglichst effektive Bindung an HLA-Moleküle (positive Selektion) als auch eine Verhinderung einer

Autoimmunität (negative Selektion) sicherstellen. Durch strenge Selektion werden mehr als 90% der T-Zellen aussortiert, bevor sie den Thymus verlassen können. Die überlebenden Zellen wechseln im Körper zwischen dem Blut und lymphatischen Organen hin und her und untersuchen antigenpräsentierende Zellen, unter anderem B-Zellen und dendritische Zellen, auf Infektions-assoziierte respektive Tumor-assoziierte Antigene. Neben diesen grundsätzlichen Funktionen können T-Zellen in zwei größere sowie einige kleinere Gruppen eingeteilt werden. Zu den größeren Gruppen gehören die *Cluster of differentiation* (CD) 4-positiven (+) T-Helferzellen und die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die über HLA-Klasse II-Moleküle präsentiert werden und lösen primär durch Ausschüttung von Zytokinen eine Immunreaktion aus. CD8⁺ T-Zellen erkennen dagegen Antigene, die über HLA-Klasse I-Moleküle präsentiert werden und können direkt eine zytotoxische Reaktion einleiten, die die infizierte oder veränderte Zelle eliminiert. Daneben existieren weitere Untergruppen wie beispielsweise regulatorische T-Zellen, die vor allem überschießende Immunreaktionen bremsen und kontrollieren sollen ^{1,2,4}.

Das adaptive Immunsystem entwickelt sich im Laufe des Lebens und ist stark von Umweltfaktoren, genetischer Prädisposition sowie vergangenen Infektionen geprägt. Es stellt ein zentrales Element der immunologischen Kontrolle von Infektionskrankheiten und maligne transformierten Zellen des Menschen dar. Erkrankungen des adaptiven Immunsystems können im Falle einer Infektion lebensbedrohlich sein und begünstigen die Entstehung von malignen Tumoren. Damit kommt dem Immunsystem eine Schlüsselrolle für das Verständnis dieser Erkrankungen und potentiellen Ansatzpunkten für therapeutische Zwecke zu ^{1,2}.

1.2 T-Zell-Immunantwort

T-Zellen besitzen die Fähigkeit, körperfremde oder pathologisch veränderte Proteinfragmente hochspezifisch zu erkennen, zu expandieren und eine differenzierte Immunantwort zu initiieren. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie Schlüsselfiguren des Immunsystems und von entscheidender Bedeutung für die Immunüberwachung des Körpers sowie die Eliminierung veränderter oder infizierter Körperzellen ²⁻⁴.

Die Erkennung veränderter Zellen, welche aufgrund einer Infektion oder malignen Transformation nicht mehr ihre eigentliche Funktion erfüllen, durch T-Zellen basiert auf der Präsentation von charakteristischen Antigenen in Form kurzer Peptidfragmente über sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplexe. Diese werden beim Menschen als HLA bezeichnet. Das HLA-System wird weiter in HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Moleküle hinsichtlich ihrer Struktur, zellulären Expression und des Ursprungs präsentierter Peptide unterschieden. Während HLA-Klasse I-Moleküle auf nahezu allen kernhaltigen Zellen vorkommen und endogene, zytosolisch generierte Peptide präsentieren, sind HLA-Klasse II-Moleküle primär auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und präsentieren extrazelluläre, sekundär lysosomal verarbeitete Peptide ^{3,5,6}.

Sowohl HLA-Klasse I- als auch HLA-Klasse II-Gene zeichnen sich durch eine erhebliche genetische Diversität aus, die durch zahlreiche Allele (HLA-A, -B, -C bzw. HLA-DR, -DP, -DQ) kodiert wird. Jeder Mensch besitzt eine einzigartige HLA-Kombination, die das individuelle Immunantwortspektrum beeinflusst und somit sowohl Schutz- als auch Krankheitsverläufe wesentlich beeinflussen kann. Neben dem klassischen HLA-System gibt es noch weitere, „nicht-klassische“ HLA-Gruppen, die auch Gegenstand zahlreicher Studien sind und sich primär durch die geringere Polymorphie auszeichnen ^{5,7,8}. Funktionell sind HLA-Klasse I-Moleküle überwiegend endogene, proteosomal generierte Peptide mit typischerweise 8 - 12 Aminosäuren, die über das endoplasmatische Retikulum transportiert, dort in die Bindungstasche geladen und anschließend an der Zelloberfläche aller kernhaltigen Zellen präsentiert werden. Dort werden sie von CD8⁺ T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor erkannt. HLA-Klasse II-Moleküle binden demgegenüber vorwiegend exogen vorliegende, in Endosomen/Lysosomen

prozessierte Peptide mit typischerweise 13 - 25 Aminosäuren. Diese werden dann, an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen, wie beispielsweise dendritischen Zellen und B-Zellen präsentiert und dann durch CD4⁺ T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor erkannt. Daneben gibt es noch Sonderwege, bei denen beispielsweise exogene Antigene über HLA-Klasse I-Moleküle präsentiert werden (Kreuzpräsentation) oder durch Autophagie endogene Antigene über HLA-Klasse II-Moleküle ^{3,6,9,10}. Diese Wege sind auch für Virus- oder Tumormunität klinisch von Bedeutung. Die Gesamtheit der HLA-präsentierten Peptide wird auch als Immunopeptidom bezeichnet und kann mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert und untersucht werden ¹¹. Es repräsentiert den selektiv prozessierten, funktionellen Ausschnitt des zellulären Proteoms, der für die Erkennung durch T-Zellen zugänglich ist ¹².

Die T-Zell-Population ist sehr divers und lässt sich in mehreren Untergruppen einteilen. Die größten Gruppen stellen dabei CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen dar. CD8⁺ T-Zellen können eine direkte zytotoxische Funktion auslösen. CD4⁺ T-Zellen üben hingegen primär regulatorische und koordinierende Aufgaben aus ⁴. Dazu zählen die Aktivierung weiterer Zellreihen wie B-Zellen, Makrophagen oder zytotoxischer T-Zellen ¹³. Über die grobe Einteilung in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hinaus differenzieren sich T-Zellen in weitere funktionelle Subtypen: CD4⁺ Untergruppen wie Typ 1-T-Helfer-Zellen (Leitzytokin: Interferon-Gamma) fördern zelluläre Abwehr gegen intrazelluläre Erreger und Tumorzellen. Typ 2-Helfer-Zellen (Leitzytokine: Interleukin-4, Interleukin-5 und Interleukin-13) stimulieren die humorale Immunantwort der B-Zellen und aktivieren Mastzellen. Typ 17-T-Helfer-Zellen (Leitzytokin: Interleukin-17) spielen eine wichtige Rolle in der Schleimhautimmunität und Kontrolle von Entzündungen ⁴. Follikuläre T-Zellen sind an der Bildung von Keimzentren beteiligt und aktivieren follikuläre B-Zellen ⁴. Eine weitere wichtige Rolle spielen regulatorische T-Zellen, welche die Immunreaktion bremsen und damit eine Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Zellen sichern ^{4,14,15}. CD8⁺ T-Zellen eliminieren Zielzellen nicht nur „direkt“, sondern nutzen spezifische Effektormechanismen sowie Zytokine, deren Zusammensetzung über die Immunreaktion und damit über den vermittelten Schutz vor Pathogenen sowie Selbstschutz vor maligner Transformation

entscheidet ¹³. Zudem modulieren korezeptorische Achsen die Reaktion von T-Zellen entweder stimulatorisch (beispielweise über CD28 oder *inducible T cell co-stimulator*) zur Verstärkung oder inhibitorisch (über *programmed cell death protein 1*, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, oder *lymphocyte-activation gene 3*) zur Begrenzung der Immunreaktion respektive zur Erschöpfungsinduktion ¹⁶. Die korezeptorischen Achsen stellen in der modernen Immuntherapie einen zentralen Ansatzpunkt der Tumorbehandlung dar ^{17,18}. Schließlich prägt auch der metabolische Zustand die T-Zell-Antwort. Eine verstärkte Glykolyse kann kurzfristig die akute T-Zell-Antwort unterstützen, wohingegen ein Abfall der Glukose, beispielsweise durch einen erhöhten Umsatz von malignen Zellen, die Anti-Tumor-Immunität sogar schwächen kann ¹⁹.

Zeitpunkt und Ausmaß der T-Zell-Immunantwort können einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf und die Prognose verschiedener Erkrankungen haben. Zudem basiert die Entwicklung neuerer, immunbasierter Therapieansätze auf der Relevanz der T-Zell-vermittelten Immunität ²⁰⁻²².

1.3 Beispielhafte Krankheitsmodelle zur Untersuchung der Rolle der T-Zell-vermittelten Immunität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die klinische Relevanz T-Zell-vermittelter Immunantworten anhand zweier unterschiedlicher Krankheitsbilder untersucht: Der Infektion mit dem Coronavirus *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) sowie dem Ovarialkarzinom.

1.3.1 Das Ovarialkarzinom - Erkrankung und Therapie

Das Ovarialkarzinom zählt zu den aggressivsten gynäkologischen Tumorerkrankungen. Eine valide Früherkennung existiert bislang nicht, etablierte Tumormarker und bildgebende Verfahren fehlt es im klinischen Alltag oft an Sensitivität und Spezifität für ein Screening. Oftmals treten Symptome erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung auf. Typische Beschwerden wie eine Zunahme des Bauchumfanges, drückende Schmerzen und geringer Appetit sind wenig spezifisch, können auch bei anderen Erkrankungen auftreten und verzögern oft eine rasche Diagnosestellung ²³. Auch bei korrekter Diagnosestellung, kann sich die Behandlung schwierig gestalten, da eine

Operabilität mitunter auch durch moderne Bildgebung präoperativ nicht eingeschätzt werden kann.

Sofern sich das Ovarialkarzinom in einem frühen Stadium befindet, besteht die Standardbehandlung aus einer primären, möglichst radikalen Operation mit dem Ziel einer maximalen Zytoreduktion ²⁴. Bei fortgeschrittener Erkrankung kann alternativ eine neoadjuvante, platinbasierte Chemotherapie mit anschließender Intervall-Operation erwogen werden, wenn eine vollständige Primärresektion nicht realistisch erscheint ²⁵. Der operativen Therapie folgt in der Regel eine Platin-haltige Systemtherapie, gegebenenfalls in Form einer Kombinationstherapie mit Antikörpern. Im fortgeschrittenen Stadium wird dabei beispielsweise Bevacizumab, ein Antikörper gegen den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), eingesetzt. Dieser hemmt die Tumorangiogenese durch Bindung an VEGF und reduziert die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen signifikant ²⁶. Nach Komplettierung der Chemotherapie wird die Behandlung mittels Erhaltungstherapie, zum Beispiel durch Inhibitoren des Enzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase, welche verhindern, dass Tumorzellen einen induzierten Schaden der DNA reparieren können, ²⁷ oder weiterer Gabe der Antikörpertherapie ²⁸, fortgesetzt. Die Auswahl richtet sich nicht nur nach dem Allgemeinzustand der Patientin, sondern auch zunehmend nach molekularen Untersuchungen. Ein großes Problem bei Ovarialkarzinom-Patientinnen bleibt die Bildung von Rezidiven, welche über 50% der Patientinnen in den ersten 5 Jahren nach Diagnose betreffen. Hier kann eine erneute operative Therapie erwogen werden ²⁹. Daneben sind auch bereits vielversprechende, neue Substanzen, wie das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Mirvetuximab-Soravtansin, für die Behandlung des inoperablen/metastasierten Ovarialkarzinoms zugelassen ³⁰. Trotz dieser Therapieverbesserungen in den letzten Jahren bleibt die Prognose insgesamt weiter ungünstig, was die Bedeutung von weiterführenden Studien, der Entwicklung von neuen immunbasierten therapeutischen Strategien und einer interdisziplinären Versorgung unterstreicht

³¹.

1.3.2 Das Ovarialkarzinom - Immunologischer Kontext und Bedeutung des Antigens Mesothelin

In den letzten Jahren ist zunehmend deutlich geworden, dass immunologische Faktoren, insbesondere die Aktivität tumorinfiltrierender T-Zellen, einen entscheidenden Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf des Ovarialkarzinoms nach Abschluss der primären Behandlung haben können. Infiltrate von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen im Tumorgewebe wurden mit einer verstärkten Immunantwort im Mikromilieu des Tumors sowie mit einem verlängerten Überleben assoziiert, was die Bedeutung einer effektiven T-Zell-Antwort unterstreicht ^{32,33}. Experimentelle Ansätze wie die *Chimeric Antigen Receptor* (CAR)-T-Zell-Therapie zielen darauf ab, eine Immunantwort im Tumorgewebe zu induzieren und so eine länger andauernde Tumorkontrolle zu erreichen ³⁴.

In diesem Zusammenhang stellt das Antigen Mesothelin (MSLN), ein im Tumormikromilieu des Ovarialkarzinoms funktionell bedeutsames Glykoprotein, welches häufig in Ovarialkarzinomen überexprimiert wird, eine vielversprechende Zielstruktur dar. MSLN bindet an Mucin-16 (MUC16) und fördert so Adhäsionen und eine peritoneale Ausbreitung, wobei die genauen Funktionen weiterhin unvollständig geklärt sind ^{35,36}. Schuster *et al.* konnten zeigen, dass MSLN bei 50% der Ovarialkarzinome als Antigen im Immunozeptidom präsentiert wird. Damit stellt es das häufigste, exklusiv auf dem Ovarialkarzinom präsentierte HLA-Klasse II-präsentierte Antigen dar. ³⁷. Die häufige Frequenz zusammen mit der tumorspezifischen Expression macht MSLN zu einem attraktiven Ziel für zelluläre zielgerichtete Immuntherapien. Präklinisch zeigten beispielsweise MSLN-spezifische CAR-T-Zellen in Ovarialkarzinommodellen eine deutliche antitumorale Aktivität ^{34,38}. Ein tieferes Verständnis der Signalwege eröffnet Möglichkeiten diese und andere Arten der immunbasierten Therapien im Ovarialkarzinom weiter zu verbessern.

1.3.3 Immunantwort und Symptomatik bei Infektion durch SARS-CoV-2

Die durch das Coronavirus SARS-CoV-2 ausgelöste Pandemie hat die zentrale Rolle des Immunsystems in der Pathogenese viraler Infektionskrankheiten eindrucksvoll unter Beweis gestellt und die Forschung in diesem Feld erheblich

vorangetrieben. Neben der humoralen Immunantwort und Antikörperbildung kommt auch der T-Zell-vermittelten Immunität, insbesondere durch CD4⁺ T-Zellen, eine maßgebliche Rolle für den Verlauf der Erkrankung *coronavirus disease 2019* (COVID-19) zu³⁹⁻⁴². Diese hat auch Folgen für die Rekonvaleszenz im Verlauf^{40,43}. Klinisch reichen die Symptome während einer SARS-CoV-2 Infektion von Fieber, Husten, Halsschmerzen, Geruchsverlust (Anosmie) und Muskelschmerzen bis zu (subjektiver) Dyspnoe, schwerer Hypoxämie sowie gastrointestinalen und neurologischen Manifestationen. Höhere Risiken bestehen bei Patienten höheren Alters, schweren internistischen Vorerkrankungen und bei Immunsuppression, sei es durch Medikamente oder Vorerkrankungen. Dabei hat auch die T-Zell-Antwort entscheidenden Einfluss auf die Schwere und die Letalität der Erkrankung und kann, wie bei den oben genannten Risikogruppen, entscheidend schwächer ausfallen^{42,44,45}. Auch bei der Chronifizierung in Form der Erkrankung Long COVID ist die T-Zell-Antwort von enormer Bedeutung und kann bei überschießender Aktivierung zu einer dauerhaften Immunaktivierung im Körper führen^{43,46}.

COVID-19 bietet ein relevantes Modell zur Untersuchung der funktionellen Rolle von T-Zellen bei viralen Infektionen. Im Gegensatz zu Tumorerkrankungen, in denen Immunantworten häufig supprimiert sind, ist bei COVID-19 das Gleichgewicht zwischen effektiver Virusbekämpfung und überschießender Immunreaktion entscheidend⁴⁶⁻⁴⁸.

1.4 Methodische Zugänge zur Untersuchung der T-Zell-Antwort

Die Analyse der T-Zell-Antwort ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis immunologischer Prozesse, insbesondere im Zusammenhang mit Infektionen, Krebs und Autoimmunerkrankungen. Um die T-Zell-Aktivierung, Antigenspezifität und Funktionalität zu erfassen, stehen verschiedene methodische Ansätze zur Verfügung. Zwei bedeutende Techniken sind die MS zur Identifizierung HLA-präsentierter Peptidantigene und funktionelle T-Zell-Assays zur Bewertung der zellulären Immunantwort.

1.4.1 Massenspektrometrie-basierte Immunozeptidomik

Die MS-basierte Immunozeptidomik ermöglicht die direkte Identifikation von Peptidfragmenten, die auf HLA-Molekülen präsentiert werden, um dort von T-Zellen erkannt zu werden. So kann die Gesamtheit aller präsentierten Antigene, das sogenannte Immunozeptidom analysiert werden ^{11,49}. Hierfür werden HLA-Moleküle aus Gewebe- und Zelllysaten mittels HLA-spezifischer Antikörper immunpräzipitiert und die gebundenen Peptide sauer eluiert. Anschließend werden die aufgereinigten Peptide mit Hilfe Flüssigkeitschromatographiegekoppelter Tandem-Massenspektrometrie analysiert. So lassen sich Peptidsequenzen und ihre posttranslationalen Modifikationen identifizieren ^{11,50}.

Diese Methode ist besonders wertvoll in der Krebsforschung, um tumorassoziierte Antigene zu entdecken, aber auch in der Impfstoffentwicklung, um immunogene Peptide gezielt auszuwählen. Die MS-basierte Immunozeptidomik stellt aktuell die einzige Möglichkeit dar natürlich präsentierte HLA-restringierte Peptide direkt zu identifizieren.

1.4.2 Funktionelle T-Zell-Assays

Der sehr sensitive *Enzyme-Linked ImmunoSpot* (ELISpot)-Assay ist eine Methode zur funktionellen Analyse der reaktiven T-Zellen auf Einzelzellebene. Er ermöglicht den Nachweis von Zytokin-sezernierenden Zellen nach spezifischer Antigen-Stimulation und ist damit besonders geeignet zur Untersuchung der Peptid-spezifischen T-Zell-vermittelten Immunantwort, zum Beispiel im Rahmen von Infektionen, Impfstudien oder bei Tumorerkrankungen ^{51,52}.

Im ELISpot-Verfahren werden isolierte T-Zellen (aus peripherem Blut oder Tumor-infiltrierende T-Zellen) auf einer mit Antikörpern beschichteten Membranplatte kultiviert, die gegen ein spezifisches Zytokin gerichtet sind - meist Interferon- γ . Nach Zugabe eines spezifischen Antigens, das von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert wird, erfolgt, sofern die T-Zellen bereits vorher Kontakt mit dem Antigen hatte, die Aktivierung der T-Zellen und eine damit verbundene Zytokinfreisetzung ⁵¹.

Die sezernierten Zytokine werden unmittelbar von den Antikörpern auf der Membran gebunden. Durch nachfolgende Inkubation mit einem

enzymgekoppelten Sekundärantikörper und einem Substrat entsteht an jeder Stelle, an der eine Zelle ein Zytokin ausgeschüttet hat, ein farbiger Punkt („Spot“). Diese Spots werden automatisiert gezählt und quantifiziert. Vorteile des ELISpot sind eine hohe Sensitivität sowie eine quantitative Aussagekraft der T-Zell-Antwort ⁵¹.

1.5 Konzept und Zielsetzung der Dissertation

Diese Dissertation untersucht die Rolle der T-Zell-vermittelten Immunität als zentralen Einflussfaktor bei Tumor- und Infektionskrankheiten, exemplarisch dargestellt am Ovarialkarzinom und an einer milden Infektion mit SARS-CoV-2. Ziel ist es, durch die Analyse immunologischer Mechanismen klinisch relevante Implikationen abzuleiten. Im Rahmen einer vergleichenden Betrachtung sollen Unterschiede der T-Zell-vermittelten Immunantwort in beiden Krankheitskontexten herausgearbeitet werden, um ein Verständnis ihrer jeweiligen pathogenetischen und prognostischen Bedeutung zu gewinnen.

Im Zentrum der Analysen stand hierbei die HLA-Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation als Grundlage für die Aktivierung spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien thematisieren zum einen die Präsentation tumorassoziierter Antigene über HLA-Klasse II-Moleküle beim Ovarialkarzinom und deren Assoziation mit dem klinischen Verlauf ⁵³, zum anderen die Charakterisierung der SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort und deren Zusammenhang mit Symptomausprägung bei COVID-19 ⁵⁴. Grundlage beider Studien sind bereits publizierte Daten zum Ovarialkarzinom und zu COVID-19, welche auf den oben dargestellten Methoden basieren und im Kontext der klinisch-translationalen Forschungsfragen weiter ausgewertet und besonders im Hinblick auf klinischen Outcome analysiert wurden ^{37,55}.

1.6 Forschungsfragen

Dabei ging es vor allem um die Beantwortung folgender Fragen:

- Wie beeinflusst die Präsentation von Antigenen über das HLA-System die Prognose bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom?

- Welche Zusammenhänge bestehen zwischen der Stärke und Qualität der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort und der klinischen Symptomatik bei COVID-19-Patientinnen und Patientinnen?
- Welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede lassen sich in der Reaktion der CD4⁺ T-Zellen zwischen Tumorerkrankungen (am Beispiel des Ovarialkarzinoms) und einer akuten Virusinfektion (am Beispiel von SARS-CoV-2) feststellen?

1.7 Wissenschaftlicher Beitrag des Promovierenden

Die Ergebnisse dieser kumulativen Dissertationen wurden als wissenschaftliche Beiträge in zwei Fachzeitschriften nach einem Peer Review-Verfahren veröffentlicht^{53,54}. Der wissenschaftliche Beitrag des Promovierenden ist in den Publikationen klar dargestellt und dokumentiert.

2. Publikationen

2.1 HLA-DR Presentation of the Tumor Antigen MSLN Associates with Clinical Outcome of Ovarian Cancer Patients

Die nachfolgenden Kapitel (2.1.1 bis 2.1.5) sind im Wortlaut unverändert der folgenden Publikation entnommen. Die Tabellen und Abbildungen wurden für bessere Lesbarkeit in Größe und Formatierung angepasst.

Tegeler CM, Scheid J, Rammensee H-G, Salih HR, Walz JS, Heitmann JS, Nelde A. HLA-DR Presentation of the Tumor Antigen MSLN Associates with Clinical Outcome of Ovarian Cancer Patients. *Cancers*. 2022; 14(9):2260. <https://doi.org/10.3390/cancers14092260>

2.1.1 Abstract

T-cell recognition of HLA-presented antigens is central for the immunological surveillance of malignant disease and key for the development of novel T-cell-based immunotherapy approaches. In recent years, large-scale immunopeptidome studies identified naturally presented tumor-associated antigens for several malignancies. Regarding ovarian carcinoma (OvCa), Mucin-16 (MUC16) and Mesothelin (MSLN) were recently described as the top HLA class I- and HLA class II-presented tumor antigens, respectively. Here, we investigate the role and impact of immunopeptidome-presented tumor antigens on the clinical outcomes of 39 OvCa patients with a follow-up time of up to 50 months after surgery. Patients with a HLA-restricted presentation of high numbers of different MSLN-derived peptides on their tumors exhibited significantly prolonged progression-free (PFS) and overall survival (OS), whereas the presentation of MUC16-derived HLA class I-restricted peptides had no impact. Furthermore, a high HLA-DRB gene expression was associated with increased PFS and OS. In line, *in silico* prediction revealed that MSLN-derived HLA class II-presented peptides are predominantly presented on HLA-DR allotypes. In conclusion, the correlation of MSLN tumor antigen presentation and HLA-DRB gene expression with prolonged survival indicates a central role of CD4⁺ T-cell responses for tumor immune surveillance in OvCa, and highlights the importance of immunopeptidome-guided tumor antigen discovery.

2.1.2 Introduction

The breakthrough clinical success of T-cell-based immunotherapy approaches, i.e., immune checkpoint inhibitors, bispecific antibodies and adoptive T-cell transfer, has caused a profound change in oncological treatment ⁵⁶⁻⁶⁰. These therapies rely on the rejection of cancer cells through the recognition of tumor antigens and T-cell-mediated cytotoxicity. Tumor antigens are represented by human leukocyte antigen (HLA)-independent surface molecules or by HLA class I- and HLA class II-presented T-cell epitopes, originating from intracellular proteins ⁶¹. In terms of the latter, neoepitopes derived from tumor-specific nonsynonymous somatic mutations are considered as central specificities of T-cell responses that are therapeutically reinforced by checkpoint inhibition, the only one of the above-described T-cell-mobilizing strategies that is thoroughly effective in solid tumors to date ^{62,63}. As only a minority of mutations at the DNA level is translated and naturally processed to HLA-presented neoepitopes targetable for T-cells ^{64,65}, non-mutated tumor-associated antigens, which result from differential gene expression or protein processing in tumor cells, are receiving increasing attention. In recent years, the identification of naturally presented tumor antigens has been advanced by mass spectrometry-based analyses of the entirety of HLA class I- and HLA class II-presented peptides, termed the immunopeptidome ^{37,66-71}. This methodology enabled the identification of highly frequent tumor-associated antigens for various tumor entities ^{37,66-71}, which have been used for the development of novel T-cell-based immunotherapy approaches ^{72,73}. Several studies demonstrate the pathophysiological relevance of T-cells targeting such tumor antigens by correlating spontaneous, pre-existing and immune checkpoint inhibitor-induced antigen-specific T-cell responses with improved clinical outcomes ^{66,74-76}. However, the role of tumor antigen presentation in the immunopeptidome on patient survival and outcomes has not yet been investigated. Here, we report on the clinical characteristics and disease outcomes of 39 ovarian carcinoma (OvCa) patients in relation to immunopeptidome-defined tumor antigen presentation. In a recent study, the mass spectrometry-based characterization of the antigenic landscape revealed several OvCa-associated CD4+ and CD8+ T-cell epitopes from a panel of tumor-

associated antigens ³⁷. Thereby, Mesothelin (MSLN) and Mucin-16 (MUC16), also known as cancer antigen 125 (CA-125), were identified as the two top OvCa-associated antigens presented on approximately 80% and 50% of analyzed tumor samples, respectively ³⁷. In the present study, we show that the presentation of MSLN-derived HLA class II-restricted peptides in the immunopeptidome is associated with longer patient survival, providing important insights into the role of immunopeptidome-guided CD4+ T-cell responses for tumor immune surveillance in OvCa.

2.1.3 Materials and Methods

Clinical Data

The clinical and survival data of patients with OvCa, whose tumor tissues had been previously analyzed by immunopeptidomics and RNA sequencing analysis ³⁷, were collected at the University Hospital Tübingen with a follow-up phase of up to 50 months after surgery. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki protocol. The study was approved by and performed according to the guide-lines of the local ethics committees (353/2007/B02). Detailed donor characteristics are provided in Table 1.

Table 1. Characteristics of patient cohort.

Ovarian Cancer Patients	
Age on day of surgery (years)	
Range	29–93
Median	62
Menopausal status (n (%))	
Pre-/peri-menopausal	7 (18)
Post-menopausal	32 (82)
Amount of tissue employed for immunopeptidome analysis (g)	
Range	0.5–3.0
Median	1.8
Grading (n (%))	
G1/G2	6 (15)
G3	33 (85)
Nodal status (n (%))	
Negative	12 (34)
Positive	23 (66)
n.a.	4
Distant metastases (n (%))	
M0	31 (79)
M1	8 (21)
Progression-free survival (days)	
Range	38–1500
Median	293
Overall survival (days)	
Range	38–1500
Median	921

Abbreviations: n, number of patients; g, weight in grams; G1/2, low/intermediate tumor grading; G3, high tumor grading; n.a., not applicable; M0, no sign of distant metastases; and M1, distant metastases.

Immunopeptidome and RNA sequencing data were retrieved from a previous publication ³⁷. The immunopeptidome dataset comprised the total number of identified OvCa-associated HLA class I- and HLA class II-presented peptides per patient, as well as the number of HLA class I- and HLA class II-presented MUC16- and MSLN-derived peptides per patient, representing the two top OvCa-associated tumor antigens. The OvCa-associated antigens include the previously described 56 and 28 HLA class I- and HLA class II-presented antigens identified exclusively and high frequently in OvCa, respectively (Table S1). Progression-free (PFS) and overall survival (OS) was depicted for < and ≥ median of the number of presented peptides (immunopeptidome data) and for < and ≥ median of FPKM values (RNA sequencing data). Since variable amounts of tumor tissue were employed for the immunopeptidome analyses (range: 0.5 g–3.0 g, median: 1.8 g) and a positive correlation of sample mass and identified HLA-presented peptides were observed (Figure S1), the analyses were conducted with the number of peptides normalized to 1 g of tumor tissue.

Binding Prediction

HLA class II MSLN peptide-binding prediction was performed for all previously described MSLN-derived peptides ($n = 62$)³⁷ using the prediction algorithm NetMHCIIpan 4.1a⁷⁷ with all available allele combinations ($n = 660$ for HLA-DR, $n = 2912$ for HLA-DQ, $n = 2048$ for HLA-DP) and the threshold of percentile rank < 5 .

Software and Statistical Analysis

Data are displayed as the mean with standard deviation, box plots as median with 25th and 75th quantiles and min/max whiskers. Continuous data were tested for distributions and individual groups were tested by use of the Mann–Whitney U-test. PFS and OS were calculated by the Kaplan–Meier method. The log-rank test was performed to test the difference of survival between the groups. Graphs were plotted using GraphPad Prism v.9.1.2. Statistical analyses were conducted using JMP Pro (SAS Institute, v.14.2) software. Overlap analysis was performed using BioVenn⁷⁸. p -values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

2.1.4 Results

Characteristics of the Patient Cohort

We analyzed the clinical and survival data of 39 patients with OvCa (Table 1) in relation to tumor antigen presentation within the HLA class I and HLA class II immunopeptidome³⁷. All patients underwent surgery at primary diagnosis between 2010 and 2015 and received a systemic therapy with platinum-based chemotherapy. The median patient's age on the day of surgery was 62 years. Most patients were post-menopausal (82%). The majority of patients had lymph node metastases (66%), whereas distant metastases were detected in only 21% of patients. Patients were followed up for up to 50 months after surgery. The median PFS was 293 days and the median OS was 921 days with a maximal follow-up time of 1500 days.

Tumor Antigen Presentation Does Not Associate with Demographics and Tumor Characteristics of OvCa

The association of demographics and tumor characteristics of OvCa patients with tumor antigen presentation was analyzed using sample mass-normalized mass spectrometry-derived immunopeptidome data of total OvCa-associated HLA

class I- and HLA II-restricted peptides, as well as MUC16-derived HLA class I- and MSLN-derived HLA class II-restricted peptides. OvCa-associated peptides describe the 56 and 28 HLA class I- and HLA class II-restricted antigens previously described to be exclusively and highly frequently presented in OvCa³⁷.

The presentation of total OvCa-associated HLA class I-restricted peptides did not differ according to the demographics and tumor characteristics, including age, nodal status, distant metastasis and grading (Figure 1A), as well as the location of primary disease, menopausal status and familial predisposition (Figure S2A). Regarding MUC16-derived HLA class I peptides, we found that cancers of nodal-positive patients presented more MUC16-derived peptides than those of patients without lymph node metastases (p-value 0.04, Figure 1B), whereas no differences were found for the other parameters (Figure 1B and S2B).

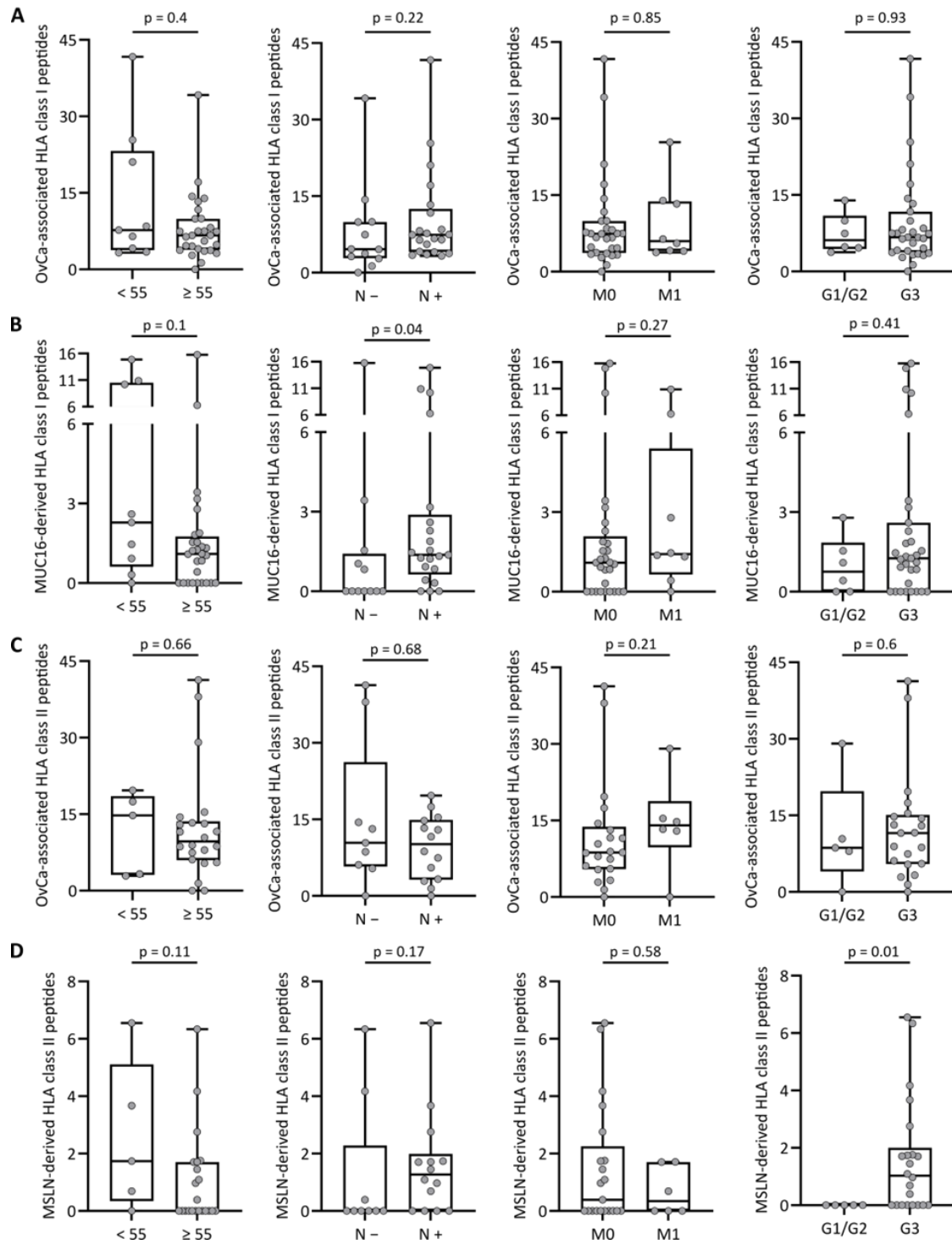


Figure 1. HLA presentation of tumor-associated antigenic peptides according to demographics and tumor characteristics.

Number of (A) OvCa-associated and (B) MUC16-derived HLA class I-presented peptides, as well as (C) OvCa-associated and (D) MSLN-derived HLA class II-presented peptides identified by the immunopeptidome analysis of primary tumor tissue in relation

to demographics and tumor characteristics, including age (left panel), nodal metastases (mid-left panel), distant metastases (mid-right panel) and tumor grading (right panel). Dots represent data from individual patients. Boxes represent the median and 25th to 75th percentiles, whiskers are minimum to maximum, Mann–Whitney U-test. Abbreviations: <55, age below 55 years; ≥55, age equal to or over 55 years; N –, no lymph node metastases; N +, lymph node metastases; M0, no sign of distant metastases; M1, distant metastases; G1/2, low/intermediate tumor grading; G3, high tumor grading; and *p*, *p*-value.

In line with HLA class I data, the presentation of OvCa-associated HLA class II-restricted peptides was not associated with demographics and tumor characteristics (Figure 1C and S2C). However, for MSLN-derived HLA class II-presented peptides, we observed that cancers of patients with high tumor grading (G3) present significantly more MSLN-derived HLA class II peptides than those of patients with low or intermediate tumor grading (G1/G2) (*p*-value: 0.01, Figure 1D). No difference in MSLN-derived HLA class II peptide presentation could be observed for age, nodal positivity and distant metastasis (Figure 1D), as well as for the location of primary disease, menopausal status or familial predisposition (Figure S2D). Taken together, the MUC16 and MSLN tumor antigen presentations within the HLA class I and HLA class II immunopeptidomes of OvCa were not associated with demographics and the majority of tumor characteristics, except for nodal status and grading, respectively.

Presentation of MSLN-Derived HLA Class II-Restricted Peptides Is Associated with an Improved Patient Survival

Subsequently, we investigated the impact of tumor antigen-derived HLA-restricted peptide presentation on PFS and OS. For HLA class I, PFS and OS rates did not differ between the patient groups with a low or high immunopeptidome presentation of OvCa-associated (Figure 2A,B) or MUC16-derived peptides (Figure 2C,D). Similar observations were made for the total OvCa-associated HLA class II peptides, with no significant difference between a low or high tumor antigen presentation regarding PFS and OS (Figure 3A,B). For MSLN-derived HLA class II-restricted peptides, we observed a significantly improved PFS and OS in patients with tumors presenting higher numbers of these peptides (*p*-value: 0.04 and 0.04, respectively, Figure 3C,D), highlighting the

importance of MSLN-directed CD4+ immune responses for tumor immunosurveillance.

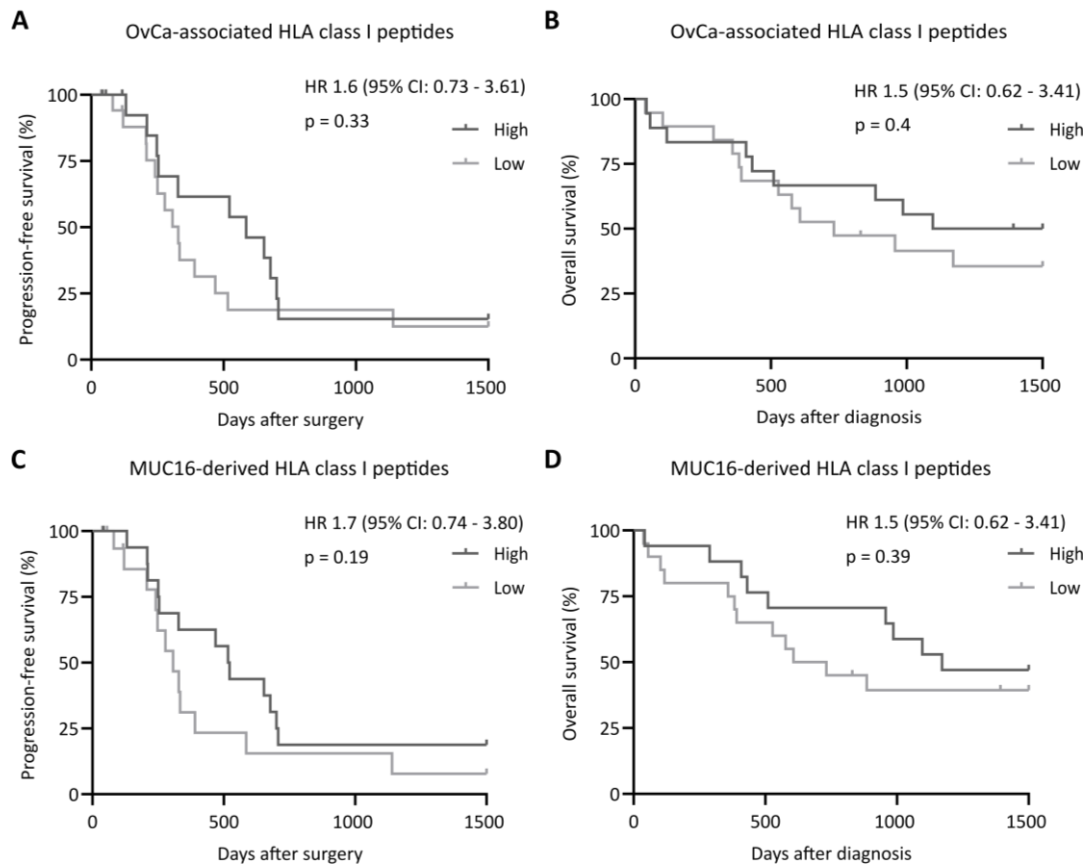


Figure 2. Impact of tumor-associated and MUC16-derived HLA class I-restricted peptide presentation on clinical outcomes.

Impact of (A,B) OvCa-associated and (C,D) MUC16-derived HLA class I-restricted peptide presentation on (A,C) progression-free and (B,D) overall survival rates, according to antigenic peptide presentation. Kaplan–Meier analysis, log-rank test. Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; and *p*, *p*-value.

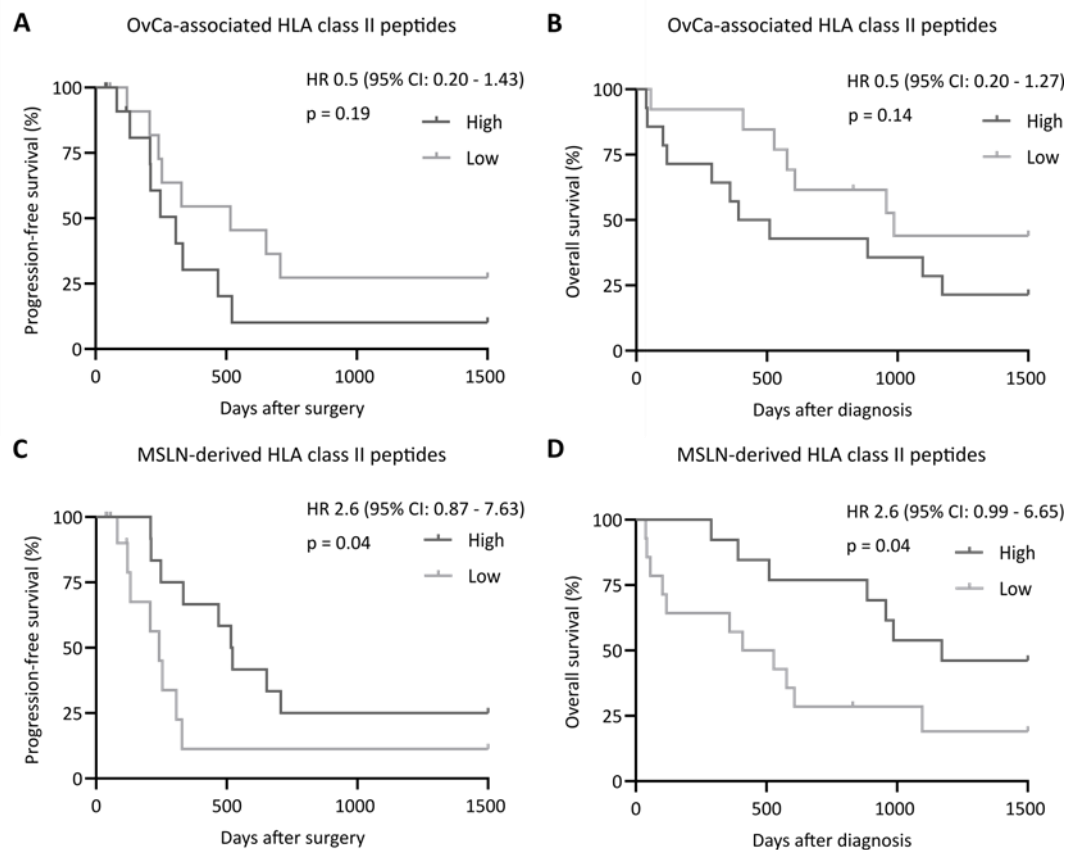


Figure 3. Impact of tumor-associated and MSLN-derived HLA class II-restricted peptide presentation on clinical outcomes.

Impact of (A,B) OvCa-associated and (C,D) MSLN-derived HLA class II-restricted peptide presentation on (A,C) progression-free and (B,D) overall survival rates, according to antigenic peptide presentation. Median progression-free and overall survival rates in patients presenting high numbers of MSLN-derived peptides in their tumor immunopeptidomes were 519 and 1171 days after surgery or diagnosis, respectively. Kaplan–Meier analysis, log-rank test. Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; and p , p -value.

HLA-DR Is a Predictor for Overall Survival in OvCa Based on Preferential HLA-DR-Restricted MSLN Presentation

The analysis of complex immunopeptidomics data has not yet become part of routine clinical practice and therefore, to date, does not constitute a suitable biomarker. Therefore, we analyzed the RNA sequencing data of the tumor antigen

MSLN in regard to the clinical outcomes. Of note, the level of MSLN gene expression, in contrast to HLA-restricted MSLN presentation, had no impact on patient survival (Figure S3), consistent with the previously reported distorted correlation of gene expression and HLA-restricted peptide presentation⁷⁹⁻⁸². However, the expression level of HLA molecules themselves, which are crucial for tumor antigen-derived peptide presentation, might be a suitable predictor. For HLA class I genes (HLA-A, -B and -C, Figure S4) and the majority of HLA class II genes (HLA-DRA, -DPA, -DPB, -DQA and DQB, Figure S5), a correlation of gene expression and patient survival was not detected. However, we observed improved PFS and OS for patients with a high HLA-DRB gene expression in their tumors (Figure 4A,B). To investigate if the 62 previously described HLA class II-presented MSLN-derived peptides are presented on HLA-DR allotypes, we performed an in silico binding prediction using the NetMHCIIpan 4.1a algorithm⁷⁷, considering 5620 different HLA class II alleles (n = 660 for HLA-DR, n = 2912 for HLA-DQ, n = 2048 for HLA-DP). A total of 95.2% (59/62) of the described peptides were predicted to bind to a total of 5,488 different HLA class II alleles. Interestingly, 94.9% (56/59) of those peptides were predicted to bind to different HLA-DR alleles, whereas only 54.2% (32/59) and 47.5% (28/59) were predicted to bind to HLA-DP and HLA-DQ alleles, respectively, highlighting the preferential HLA-DR-restricted presentation of MSLN-derived peptides (Figures 4C–E, Supplementary Data S1).

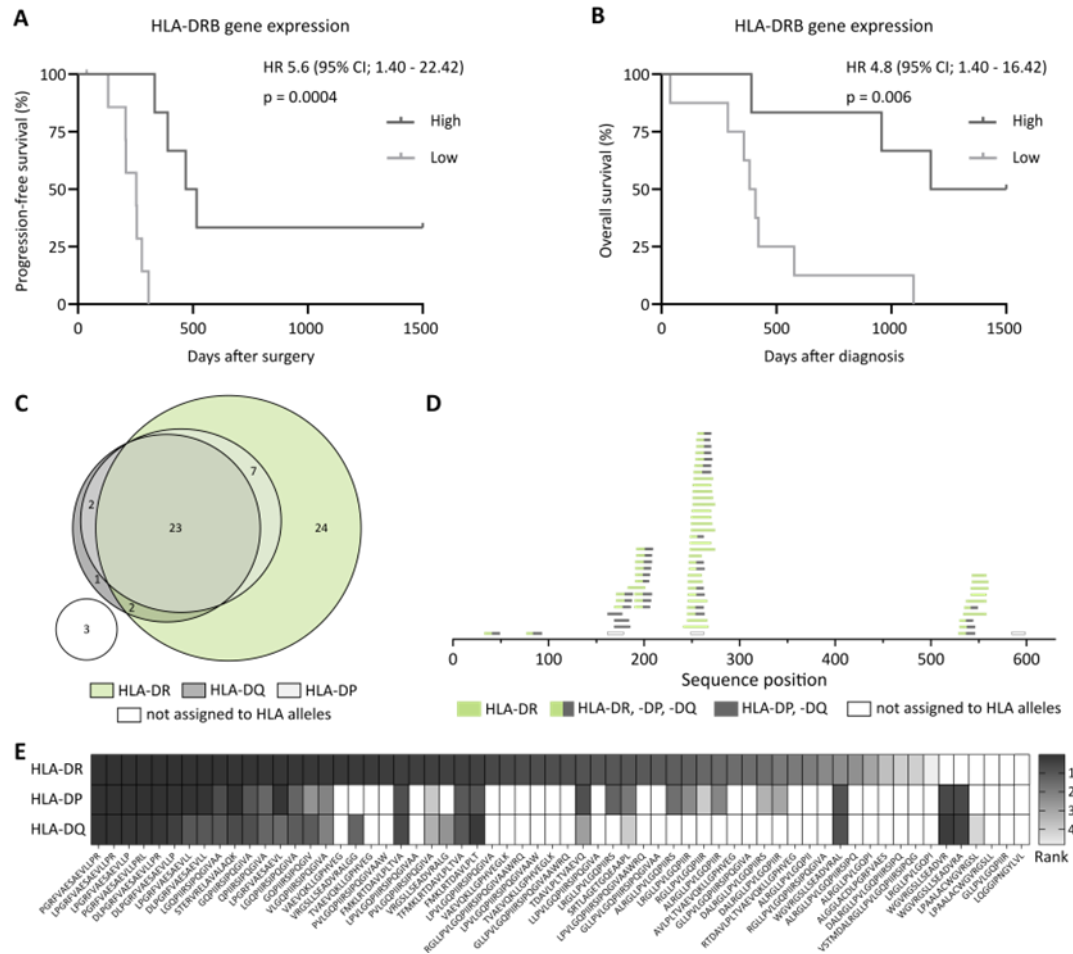


Figure 4. Impact of HLA-DRB gene expression on clinical outcome and in silico prediction of MSLN-derived peptide binding to HLA class II allotypes.

(A,B) Impact of HLA-DRB gene expression level on (A) progression-free and (B) overall survival rates, according to low and high HLA-DRB gene expressions in the patients' tumors. Median progression-free and overall survival in patients with a high HLA-DRB gene expression in their tumor was 493 and 1136 days after surgery or diagnosis, respectively. Kaplan–Meier analysis, log-rank test. (C) Overlap analysis of MSLN-derived peptides ($n = 62$) predicted *in silico* to bind to HLA-DR, -DP or -DQ alleles. (D) Peptide clustering of HLA-presented peptides on the MSLN source protein sequence according to *in silico* predicted binding to HLA class II allotypes. Peptides are grouped according to their predicted binding to different alleles of HLA-DR, -DP or -DQ. Peptides marked in green are predicted to bind exclusively to HLA-DR alleles. (E) Heat map depicting the percentile rank of the prediction scores for MSLN-derived peptides ($n = 62$) according to HLA-DR, -DP and -DQ allele groups. For each group, the rank of the best predicted allele is shown. Peptides are sorted by descending binding to HLA-DR alleles. Peptides with a percentile rank <1 are identified as strong binders, peptides with a percentile rank <5 as

weak binders. The gradient ranges from strong HLA binding (dark gray) over weak HLA binding (light gray) to no HLA-restricted peptide binding (white). Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; and p : p -value.

2.1.5 Discussion

T-cell recognition of HLA-presented antigens is central for the immunological surveillance of malignant disease^{83,84}. Various immunotherapeutic approaches, *i.e.*, adoptive T-cell transfer and vaccination approaches, intend to identify and target suit-able tumor antigens to therapeutically induce an anti-tumor T-cell response^{56,72,85,86}. The mass spectrometry-based characterization of naturally presented HLA-restricted peptides enabled the definition of tumor-associated antigens for several malignancies^{37,49,68,87-89}. In a previous publication³⁷, we identified OvCa-associated HLA class I- and HLA class II-presented tumor antigens with MUC16 and MSLN representing the two main tumor antigens for HLA class I and HLA class II, respectively.

For T-cells targeting such tumor antigens, a pathophysiological relevance has already been demonstrated in several studies by correlating spontaneous, pre-existing antigen-specific T-cell responses with improved clinical outcomes^{66,74-76}. However, the impact of tumor antigen presentation within the immunopeptidome on patient survival has not yet been investigated.

Here, we demonstrate that patients with a high presentation of MSLN in their tumor immunopeptidome, in terms of unique MSLN-derived HLA class II-presented peptides, exhibited a prolonged PFS and OS. Interestingly, we could not confirm the previously reported^{90,91} negative impact of MSLN gene expression on patient survival in our cohort. This is in line with previous findings demonstrating a distorted correlation between gene expression and HLA-restricted antigen presentation, highlighting that the immunopeptidome does not mirror the transcriptome or the proteome^{69,79-82}. This phenomenon has also been described for other “classical” and long-established tumor antigens, such as Her2neu, WT1, NY-ESO-1 and p53, for which only a limited or even absent HLA-bound presentation was observed, despite a tumor-associated overexpression at

the mRNA level ⁵⁹⁻⁶⁶. However, a high gene expression level of HLA-DR, which represents the main allotype for MSLN peptide presentation, as demonstrated by in silico peptide-binding predication, might be a good predictor for clinical outcomes, as we observed improved PFS and OS for respective patients. The association of a high HLA-DR expression with improved survival has already been shown for other tumor entities ⁹²⁻⁹⁷. Limitations of this study include the relative low number of OvCa patients, as well as the imbalance between high-grade and low-grade tumors with 85% of the patients presented with a high-grade tumor. However, this distribution reflects the expected distribution in such a patient cohort, as approximately 80% of OvCa patients are diagnosed at an advanced stage. Nevertheless, further large cohort studies should be carried out to confirm our results ⁹⁸. Of note, the positive impact of HLA-restricted presentation of MSLN-derived peptides and HLA-DR gene expression on survival was not observed for OvCa-associated peptides in total, for MUC16-derived HLA class I-presented peptides, or the gene expression of any other HLA allele, highlighting the importance of MSLN-specific CD4+ T-cell-guided immune responses in OvCa. Previous studies have already demonstrated the multifaceted direct and indirect role and involvement of CD4+ T-cells in anti-cancer immunity ⁹⁹⁻¹⁰⁵. These findings are in agreement with our findings and highlight the importance of the tumor antigen MSLN and the MSLN-directed CD4+ T-cell response in immune surveillance, specifically of OvCa. MSLN was not only described as a HLA-presented tumor antigen ³⁷, but was also suspected to be involved in OvCa metastasis ^{36,106,107}. Thus, MSLN represents a potential target for novel targeted and T-cell-based therapies. Currently, MSLN-directed CAR-T-cell and antibody treatments are evaluated in early clinical studies ^{34,108,109} and might pave the way toward an enhanced OvCa treatment.

2.2 Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort

Die nachfolgenden Kapitel (2.2.1 bis 2.2.5) sind im Wortlaut unverändert der folgenden Publikation entnommen. Die Tabellen und Abbildungen wurden für bessere Lesbarkeit in Größe und Formatierung angepasst.

Tegeler CM, Bilich T, Maringer Y, Salih HR, Walz JS, Nelde A, Heitmann JS. Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort. *Int J Infect Dis.* 2022;120:187-195. doi:10.1016/j.ijid.2022.04.019

2.2.1 Abstract

Objective

Besides SARS-CoV-2-directed humoral immune responses, T cell responses are indispensable for effective anti-viral immunity. Recent data have shown a correlation of COVID-19 symptoms with humoral immune response, but so far little is known on the association of SARS-CoV-2-directed T cell responses and disease severity. We here evaluated the prevalence of different clinical COVID-19 symptoms in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses.

Methods

Severity of eight different symptoms during acute infection were assessed questionnaire-based from 193 convalescent individuals and evaluated in relation to SARS-CoV-2 antibody levels and intensity of SARS-CoV-2-specific T cell responses 2 - 8 weeks after positive PCR.

Results

Whereas increased IgG serum levels could be associated with severity of most symptoms, no difference in T cell response intensity between different symptom severities was observed for the majority of COVID-19 symptoms. However, when analyzing loss of smell or taste and cough, awareness of more severe symptoms was associated with reduced T cell response intensities.

Conclusion

These data suggest that rapid virus clearance mediated by SARS-CoV-2-specific T cells prevents severe symptoms of COVID-19.

2.2.2 Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) induces highly variable clinical manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19), ranging from asymptomatic infections or mild disease characteristics to severe and even life-threatening courses of disease ⁴⁷. Infected individuals present with a variety of different disease symptoms, comprising fever, fatigue, loss of smell and taste, cough, headache, and/or dyspnea ¹¹⁰. Based on the manifestations of these symptoms, patients are categorized in different disease severity groups ¹¹¹ with most patients experiencing mild symptoms not requiring medical intervention or hospitalization ¹¹². After relief of symptoms, patients are considered to be protected from reinfection for several months mediated by the immunological memory of the humoral and cellular immune system ⁴². The humoral immune response, *i.e.* SARS-CoV-2-specific antibodies, detected in convalescent individuals has led to the approval of immune therapeutics like the REGN-COV2 antibody cocktail ¹¹³, and prophylactic vaccines, which aim to induce a protective immune response ¹¹⁴. Whereas most infected individuals remain asymptomatic or show mild symptoms and mount a potent immune response, others suffer from a severe course of disease with a dysregulated immune reaction ^{48,115,116}. A plethora of data is available regarding the characteristics of humoral and cellular immune responses in SARS-CoV-2-infected individuals ^{55,117-126}. Whereas antibody titers have been reported to be increased in patients with more severe COVID-19 ¹²³, so far, little is known about the correlation of T cell responses with clinical symptoms. T cells are not only central for immune modulation and for guiding B cells to produce antibodies, but also play an important role in virus clearance by direct killing of SARS-CoV-2-infected cells ^{120,127}.

Here, we studied COVID-19 course of 193 individuals during asymptomatic to moderate SARS-CoV-2 infection and their association with SARS-CoV-2-specific antibody and T cell responses up to 59 days after acute infection. The documented differences in symptom severity and immune response provide

insights into the role of T cell immunity against SARS-CoV-2 for the occurrence and severity of clinical symptoms.

2.2.3 Methods

Convalescents and blood samples

Blood and serum samples as well as questionnaire-based assessment of donor characteristics and disease symptoms from convalescent volunteers after asymptomatic to moderate symptomatic SARS-CoV-2 infection (n = 193) were collected at the University Hospital Tübingen from April to July 2020. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki protocol. The study was approved by and performed according to the guidelines of the local ethics committees (179/2020/BO2). SARS-CoV-2 infection was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) test after nasopharyngeal swab. Donor recruitment was performed by online and paper-based advertising (homepage, flyer). Sample collection in terms of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum was performed approximately 3 - 8 weeks after the end of symptoms and/or negative virus smear. Symptom categories were determined by subjective disease symptoms (no, mild, moderate, and severe, reported by questionnaire) of individual donors. Detailed donor characteristics and distribution of symptom severity are provided in Tables 1 and 2.

Table 1
Donor characteristics of COVID-19 convalescent donors.

	COVID-19 convalescent donors
Number of donors	193
Age (years)	
Range	18 - 79
Mean	43.3
SD	14
Sex (n [%])	
Female	91 (47)
Male	102 (53)
Time PCR to sample collection (d)	
Range	16 - 59
Median	41

n: number of donors. %: percentage of donors. SD: standard deviation.
PCR: polymerase chain reaction. d: days.

Table 2
Distribution of symptom severity in COVID-19 convalescent donors.

Symptom	n	Symptom severity – n (%)			
		Asymptomatic	Mild	Moderate	Severe
Feel sick	193	20 (10)	39 (20)	86 (45)	48 (25)
Cough	193	65 (34)	63 (33)	42 (22)	23 (12)
Fever	193	88 (46)	32 (16)	52 (27)	21 (11)
Sore throat	193	102 (53)	49 (25)	28 (15)	14 (7)
Headache	192	46 (24)	47 (24)	55 (29)	44 (23)
Loss of smell or taste	193	70 (36)	22 (11)	15 (8)	86 (45)
Shortness of breath	192	132 (69)	32 (17)	26 (13)	2 (1)
Fatigue	192	32 (17)	40 (21)	50 (26)	70 (36)

n: number of donors. %: percentage of donors.

T cell and antibody responses

Data on SARS-CoV-2-specific T cell responses assessed by interferon- γ (IFN- γ) enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay, anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid antibody titers assessed by Elecsys® anti-SARS-CoV-2 immunoassay (Roche Diagnostics) and anti-SARS-CoV-2 spike antibody titers assessed by Euroline Anti-SARS-CoV-2® (Euroimmune) were retrieved from a previous publication ⁵⁵. For this analysis, we considered SARS-CoV-2-specific T cell response intensities against the previously described SARS-CoV-2-specific epitope compositions for HLA class I and HLA-DR. These SARS-CoV-2-specific epitope compositions were designed from immunogenic SARS-CoV-2-derived T cell epitopes derived from different open reading frames (ORF), including spike, nucleocapsid, and membrane proteins, and recognized exclusively in convalescent patients after SARS-CoV-2 infection and not in SARS-CoV-2 unexposed individuals. The HLA class I and HLA-DR epitope compositions cover several different HLA class I and HLA-DR allotypes, respectively, to allow for standardized evaluation and determination of intensities of SARS-CoV-2-specific T cell responses. The intensity of T cell responses was measured as mean spot counts of duplicates in the ELISpot assay normalized to 5×10^5 cells minus the normalized mean spot count of the respective negative control.

Software and statistical analysis

Data are displayed as mean with standard deviation (SD), box plots as median with 25th or 75th quantiles and min/max whiskers. Continuous data were tested for distribution and individual groups were tested by use of an unpaired Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis test and corrected for multiple comparison, if applicable. Missing data were included in tables and in descriptive analysis. Graphs were plotted using GraphPad Prism v.9.1.2. Statistical analyses were

conducted using JMP Pro (SAS Institute, v.15) software. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

2.2.4 Results

Clinical characteristics of COVID-19 convalescent cohort

For this study, we analyzed clinical symptoms and SARS-CoV-2-specific antibody and T cell response data of 193 convalescent donors with an asymptomatic to moderate COVID-19 course. None of the donors was hospitalized, had severe/life-threatening symptoms according to the WHO criteria ¹¹¹ or was vaccinated prior to SARS-CoV-2 infection. It is assumed that all infections were caused by the wild type of SARS-CoV-2, although samples were not sequenced. Antibody and T cell responses were assessed 16 - 59 days (median 40.5 days) after positive PCR ⁵⁵. Mean age of convalescents was 43.3 (SD $\pm$ 14) years. The male:female ratio was nearly equally distributed with 1:1.2. As expected, subjective symptom severity was heterogeneously distributed. The most frequent symptoms were “feel sick” (93%), followed by “fatigue” (86%). 6% of study participants had reported no symptoms. Individuals experiencing “loss of smell or taste” or “fatigue” graded these symptoms mostly severe (45% and 36% of all convalescents, respectively). Interestingly, only two convalescents reported severe dyspnea according to questionnaire. Clinical data and details regarding distribution of severity of the respective symptom groups are presented in Tables 1 and 2.

Antibody levels and COVID-19 symptoms

As a first step, we compared anti-nucleocapsid-SARS-CoV-2 antibody titers of convalescent donors ⁵⁵ with severity of subjective COVID-19 symptoms. In case of the symptom “feel sick”, antibody titers were significantly higher in severe compared to asymptomatic, mild, and moderate cases (p-value 0.0043, 0.0023, and 0.044, respectively; Fig 1A). Regarding “cough”, there was a tendency for higher IgG titers in convalescents experiencing severe symptoms compared to other severity grades, but without reaching statistical significance (Fig 1B). Antibody titers were significantly higher in convalescents reporting mild, moderate, and severe “fever” compared to asymptomatic cases (p-value 0.0003,

<0.0001, and 0.0013, respectively; Fig 1C). Individuals with no and mild “sore throat” had significantly higher antibody titers compared to individuals with moderate symptoms (p-value 0.013 and 0.014, respectively; Fig 1D). Convalescents with severe “headache” showed significantly higher antibody levels than convalescents with no, mild, or moderate symptoms (p-value 0.011, 0.049, and 0.013, respectively; Fig 1E). In individuals reporting “loss of smell or taste”, IgG levels were significantly higher for convalescents with severe than for those with no symptoms (p-value 0.0002; Fig 1F). Considering “shortness of breath”, no significant difference between asymptomatic, mild, moderate, and severe symptoms was observed (Fig 1G). Convalescents experiencing severe or moderate “fatigue” had significantly higher IgG levels than convalescents without fatigue (p-value 0.016 and 0.026, respectively; Fig 1H). Additionally, we compared anti-spike-SARS-CoV-2 antibody titers of convalescent donors⁵⁵ with severity of subjective COVID-19 symptoms. Antibody titers were significantly higher in convalescents reporting severe manifestation of all assessed symptoms compared to asymptomatic individuals (Supplementary Fig 1). Taken together, anti-nucleocapsid IgG levels were significantly higher in individuals reporting severe manifestation of the symptoms “feel sick”, “fever”, “headache”, “loss of smell or taste” and “fatigue” compared to individuals without these symptoms, whereas anti-spike antibody titers differed for all assessed symptoms.

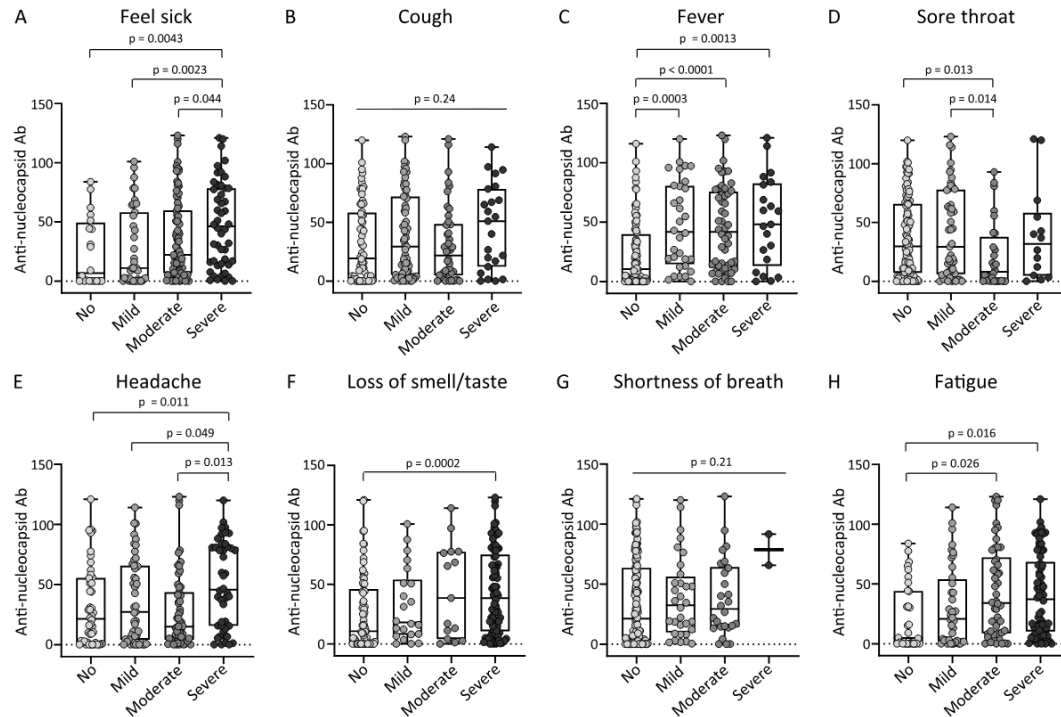


Figure 5. Symptom severity and antibody response in COVID-19.

Anti-nucleocapsid antibody (Ab) response (Elecys® Anti-SARS-CoV-2 S-test) assessed in COVID-19 convalescent donors ($n = 193$) with different COVID-19 symptoms grouped according to respective symptom severities. Symptoms during COVID-19, *i.e.* (A) feel sick, (B) cough, (C) fever, (D) sore throat, (E) headache, (F) loss of smell or taste, (G) shortness of breath, and (H) fatigue were assessed by questionnaire and grouped according to self-reported severity (no, mild, moderate, severe symptoms). p : p -value. Brackets mark significant p -values between two categories (Kruskal-Wallis test with Dunn's correction), continues lines indicate p -values between all categories (Kruskal-Wallis test). Box plots with min/max whiskers.

T cell immunity and COVID-19 symptoms

Next, we compared the severity of COVID-19 symptoms with the intensity of SARS-CoV-2-specific T cell responses for HLA class I- and HLA-DR-restricted T cell epitopes, assessed by IFN- γ ELISpot assay using SARS-CoV-2-specific epitope compositions in PBMC samples of SARS-CoV-2 convalescents⁵⁵. Intensity of HLA class I and HLA-DR T cell responses did not differ for the severity of the symptom “feel sick” (Fig 2A). Convalescent donors with moderate “cough” had a significantly decreased intensity of T cell responses to HLA class I epitope

compositions in comparison to convalescents experiencing mild or no symptoms (p-value 0.0049 and 0.031, respectively; Fig 2B). Of note, convalescents with mild “cough” displayed significantly increased intensity of HLA-DR T cell responses compared to asymptomatic convalescents or convalescents experiencing moderate “cough” (p-value 0.014 or 0.041, respectively; Fig 2B). Regarding the severity of “fever”, T cell responses to HLA class I epitope compositions were found to be significantly decreased in severe compared to mild cases (p-value 0.031; Fig 2C). This was not observed for T cell responses to HLA-DR epitope compositions (Fig 2C). In individuals experiencing “sore throat” and “headache”, the intensity of T cell response did not differ between symptom grades for HLA class I and HLA-DR epitope compositions (Fig 2D and E). When grouped according to the severity of “loss of smell or taste”, T cell responses to HLA class I epitope composition were significantly decreased in severe compared to mild cases (p-value 0.031; Fig 2F). In contrast, T cell responses to HLA-DR epitope composition were not different between the four categories of severity (Fig 2F). Intensity of HLA class I and HLA-DR T cell responses showed no significant difference between symptom severity categories for “shortness of breath” and “fatigue” (Fig 2G and H). Of note, when dividing the study population according to the time of sample collection (cut-off median: 42 days) into two groups, we did not observe higher HLA class I nor HLA-DR T cell response at the earlier time point (Supplementary Fig 2). In summary, no difference in T cell response intensity between different symptom severities was observed for the majority of COVID-19 symptoms. However, for “loss of smell or taste” and “cough”, awareness of more severe symptoms was associated with lower HLA class I-restricted T cell response intensities.

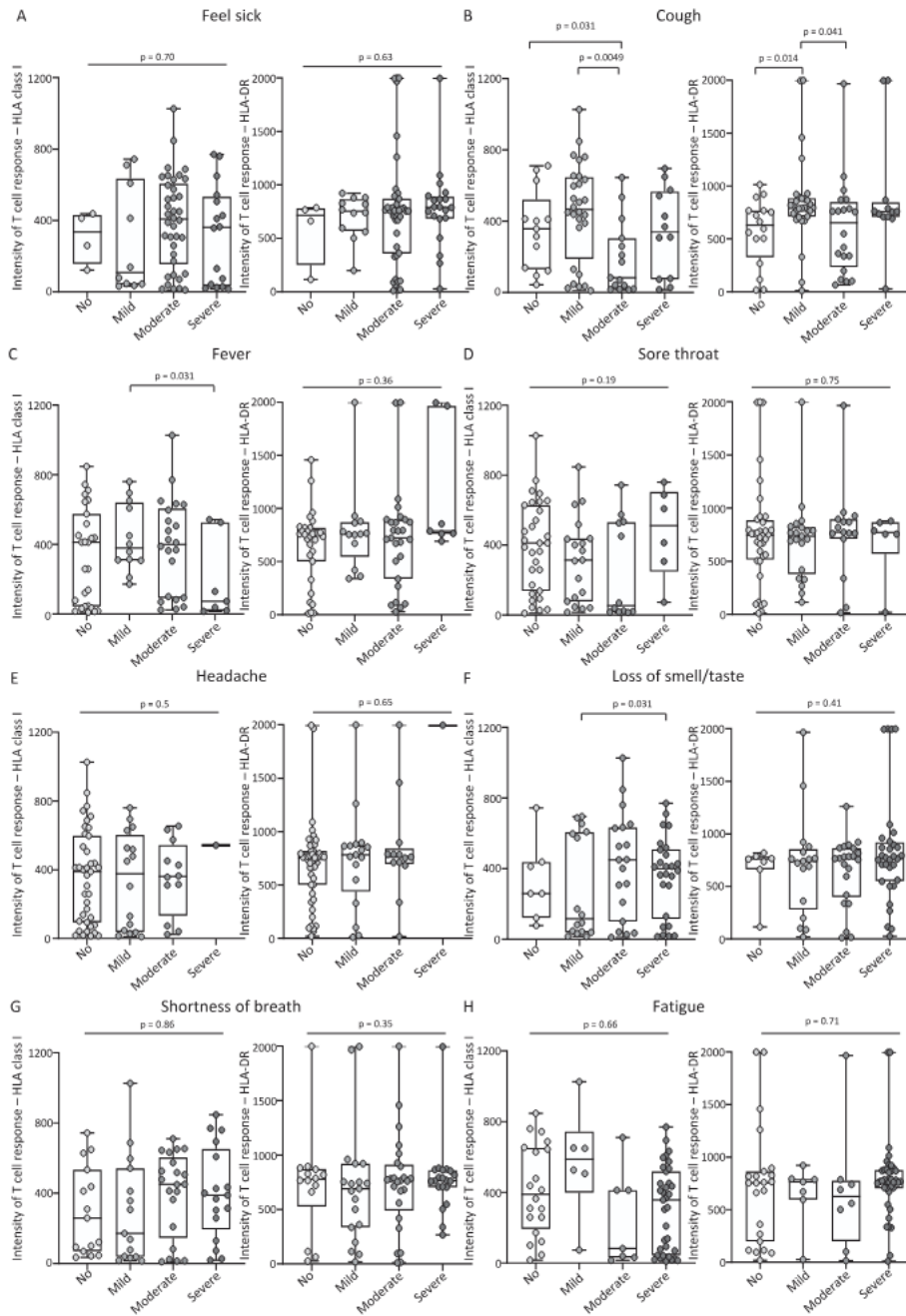


Figure 6. Symptom severity and intensity of SARS-CoV-2-specific T cell response in COVID-19.

Intensity of SARS-CoV-2-specific HLA class I (left) and HLA-DR (right) T cell response in COVID-19 convalescent donors ($n = 68$ for HLA class I, $n = 78$ for HLA-DR) with different symptom severities in the course of COVID-19. Symptoms during COVID-19, *i.e.* (A) feel sick, (B) cough, (C) fever, (D) sore throat, (E) headache, (F) loss of smell or

taste, (G) shortness of breath, and (H) fatigue were assessed by questionnaire and grouped into four grades according to self-reported severity (no, mild, moderate, severe symptoms). p: p-value. Brackets mark significant p-values between two categories (Kruskal-Wallis test with Dunn's correction), continues lines indicate p-values between all categories (Kruskal-Wallis test). Box plots with min/max whiskers.

Classification of symptoms and immune response

When symptom severity was grouped in asymptomatic versus symptomatic (mild/moderate/severe), anti-nucleocapsid antibody titers differed significantly for “feel sick”, “fever”, “loss of smell or taste” and “fatigue” (p-value 0.048, <0.0001, 0.0003, and 0.0023, respectively; Table 3). When analyzing the humoral response in symptomatic convalescent donors (mild versus moderate/severe symptoms), no significant difference was observed for most symptoms except for “feel sick” showing increased anti-nucleocapsid antibody titers in moderate/severe cases (p-value 0.013; Table 4).

Table 3
Analysis of symptoms (asymptomatic vs symptomatic convalescents) and antinucleocapsid antibody levels.

Symptom	Asymptomatic COVID-19 convalescent donors			Symptomatic COVID-19 convalescent donors			p-value
	n	Mean level of antibodies	SD	n	Mean level of antibodies	SD	
Feel sick	20	24.70	29.26	173	37.38	35.03	0.048
Cough	65	32.61	32.99	128	37.82	35.43	0.25
Fever	88	23.05	28.26	105	46.97	35.81	< 0.0001
Sore throat	102	37.21	33.12	91	34.78	36.39	0.38
Headache	46	31.61	33.41	146	37.72	34.98	0.28
Loss of smell/taste	70	26.38	31.88	123	41.58	35.04	0.0003
Shortness of breath	132	34.60	35.2	60	39.88	33.32	0.11
Fatigue	32	21.92	27.59	160	39.06	35.30	0.0023

Symptomatic convalescent individuals reported mild, moderate or severe symptoms. n: number of donors. SD: standard deviation; p-values calculated with Mann-Whitney-U test.

Table 4
Analysis of symptoms and antinucleocapsid antibody levels in symptomatic convalescents (mild versus moderate/severe).

Symptom	COVID-19 convalescent donors with mild symptoms			COVID-19 convalescent donors with moderate/severe symptoms			p-value
	n	Mean level of antibodies	SD	n	Mean level of antibodies	SD	
Feel sick	39	27.78	32.64	134	40.17	35.33	0.013
Cough	63	39.14	36.46	65	36.55	34.64	0.65
Fever	32	47.75	36.55	73	46.63	35.74	0.74
Sore throat	49	40.92	37.97	42	27.62	33.48	0.053
Headache	47	37.15	34.93	99	37.98	35.18	0.67
Loss of smell/taste	22	32.43	31.04	101	43.57	35.68	0.19
Shortness of breath	32	38.73	33.87	28	41.19	33.26	0.78
Fatigue	40	31.00	33.44	120	41.74	35.63	0.054

Symptomatic convalescent individuals reported mild, moderate or severe symptoms. n: number of donors. SD: standard deviation; p-values calculated with Mann-Whitney-U test.

T cell responses did not differ significantly between asymptomatic and symptomatic (mild/moderate/severe) participants (Tables 5 and 6). Analyzing T cell responses in symptomatic convalescents (mild versus moderate/severe symptoms) revealed no significant difference for most symptoms (Fig 3), except for “cough” and “loss of smell or taste” where the intensity of HLA class I T cell responses was significantly decreased in moderate/severe cases (p-value 0.0095 and 0.025, respectively; Fig 3B and F). Similar results were observed for the symptom “cough” regarding T cell responses to HLA-DR epitope compositions but failed to reach statistical significance (Fig 3B).

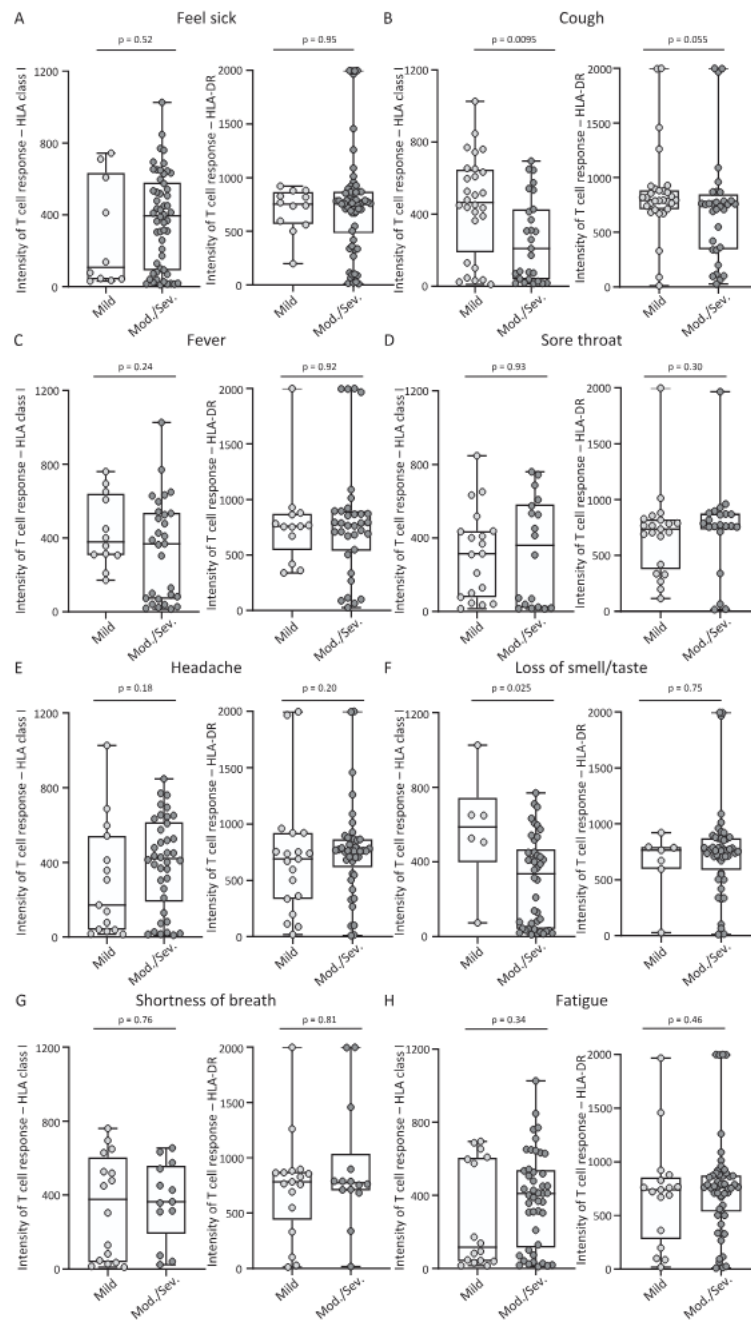


Figure 7. Grouped symptom severity and intensity of SARS-CoV-2-specific T cell response in COVID-19.

Intensity of SARS-CoV-2-specific HLA class I (left) and HLA-DR (right) T cell response in symptomatic COVID-19 convalescent donors with different symptom severities (mild versus moderate/severe) in the course of COVID-19. Symptoms during COVID-19, *i.e.* (A) feel sick (HLA class I: mild $n = 10$, moderate/severe $n = 54$; HLA-DR: mild $n = 12$,

moderate/severe n = 62), (B) cough (HLA class I: mild n = 28, moderate/severe n = 27; HLA-DR: mild n = 30, moderate/severe n = 32), (C) fever (HLA class I: mild n = 12, moderate/severe n = 29; HLA-DR: mild n = 13, moderate/severe n = 34), (D) sore throat (HLA class I: mild n = 19, moderate/severe n = 18; HLA-DR: mild n = 21, moderate/severe n = 21), (E) headache (HLA class I: mild n = 15, moderate/severe n = 38; HLA-DR: mild n = 19, moderate/severe n = 45), (F) loss of smell/taste (HLA class I: mild n = 6, moderate/severe n = 42; HLA-DR: mild n = 7, moderate/severe n = 48), (G) shortness of breath (HLA class I: mild n = 16, moderate/severe n = 13; HLA-DR: mild n = 17, moderate/severe n = 14), and (H) fatigue (HLA class I: mild n = 16, moderate/severe n = 45; HLA-DR: mild n = 17, moderate/severe n = 54) were assessed by questionnaire. Mod./Sev.: Moderate/severe; p: p-value; continues lines indicate p-values between all categories (Mann-Whitney U-test). Box plots with min/max whiskers.

Table 5
Analysis of symptoms (asymptomatic versus symptomatic convalescents) and HLA class I T cell response.

Symptom	Asymptomatic COVID-19 convalescent donors			Symptomatic COVID-19 convalescent donors			p-value
	n	Mean T cell intensity	SD	n	Mean T cell intensity	SD	
Feel sick	4	307.54	146.83	64	357.51	268.06	0.82
Cough	13	352.01	223.15	55	355.17	272.28	0.90
Fever	27	333.67	274.35	41	368.33	256.15	0.61
Sore throat	31	395.25	259.97	37	320.48	262.43	0.24
Headache	15	298.81	250.99	53	370.35	265.28	0.55
Loss of smell/taste	20	412.42	257.64	48	330.47	262.77	0.20
Shortness of breath	39	358.69	274.22	29	349.02	249.44	0.97
Fatigue	7	329.99	226.01	61	357.39	267.39	0.92

Symptomatic convalescent individuals reported mild, moderate or severe symptoms. n: number of donors. SD: standard deviation; p-values calculated with Mann-Whitney U test. The intensity of T cell responses is depicted as mean spot counts of duplicates in the ELISpot assay normalized to 5×10^5 cells minus the normalized mean spot count of the respective negative control.

Table 6
Analysis of symptoms (asymptomatic versus symptomatic convalescents) and HLA-DR T cell response.

Symptom	Asymptomatic COVID-19 convalescent donors			Symptomatic COVID-19 convalescent donors			p-value
	n	Mean T cell intensity	SD	n	Mean T cell intensity	SD	
Feel sick	4	582.00	316.70	74	745.76	450.41	0.45
Cough	16	567.47	314.74	62	781.20	464.21	0.07
Fever	31	648.12	347.04	47	796.22	493.19	0.24
Sore throat	36	757.99	501.11	42	719.67	394.92	0.67
Headache	14	728.43	482.18	64	739.31	439.84	0.68
Loss of smell/taste	23	720.64	556.49	55	744.35	394.16	0.63
Shortness of breath	47	688.97	392.3	31	810.72	511.72	0.30
Fatigue	7	663.14	246.99	71	744.67	459.87	0.66

Symptomatic convalescent individuals reported mild, moderate, or severe symptoms. n: number of donors. SD: standard deviation; p-values calculated with Mann-Whitney U test. The intensity of T cell responses is depicted as mean spot counts of duplicates in the ELISpot assay normalized to 5×10^5 cells minus the normalized mean spot count of the respective negative control.

2.2.5 Discussion

COVID-19 patients present with a variety of symptoms, ranging from asymptomatic infections or mild to severe courses of disease, potentially being also life-threatening and lethal ^{110,116,128,129}. Patients suffering from severe COVID-19 according to the WHO grading scale ¹¹¹ have been reported to develop a potent humoral immune response with high antibody titers against SARS-CoV-2 ^{116,130}. In this study, we are the first to report on the association between symptom severity of subjective symptoms in 193 individuals with asymptomatic SARS-CoV-2 infection or mild to moderate COVID-19 according to WHO ¹¹¹ and humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 by assessing both, serum antibody titers as well as SARS-CoV-2-specific T cell responses. “Feel sick” and “fatigue” were the most reported symptoms in our cohort, which had also been reported in other large cohort studies ¹³¹. In line with recent data, reporting on elevated anti-spike antibody levels in severe/life-threatening COVID-19 in hospitalized patients ^{123,130}, we found serum anti-nucleocapsid antibody levels to increase with more severe COVID-19 for most symptoms and serum anti-spike antibody levels to increase with more severe COVID-19 for all symptoms. In contrast, T cell immune responses decreased or showed no difference between the severity of COVID-19 cases ¹³². These results indicate that the extent of the humoral immune response appears to associate also with the severity of subjective symptoms in mild COVID-19 cases. Assessment of humoral immune responses to SARS-CoV-2 could therefore allow for the identification of asymptomatic individuals or patients with mild COVID-19, who would profit from early vaccination after recovery. This is supported by further data on SARS-CoV-2 antibodies in convalescent individuals, showing a decline in antibody titers already a few weeks to months after infection ^{124,133,134}. Assuming a linear decline, patients with high antibody titers would remain seropositive longer than those with initially lower antibody titers. This suggests that patients with asymptomatic or mild COVID-19 are more likely to be earlier seronegative for SARS-CoV-2 antibodies after infection. Whereas antibody titers have been shown to rapidly decrease after infection ¹³⁵, T cell responses appear

to persist longer ^{118,124} and, in case of SARS-CoV-1, were still measurable up to 17 years after infection ¹³⁶.

So far, the humoral immune response to SARS-CoV-2 is used to determine previous infection as well as anti-viral immunity after vaccination ¹¹⁴. The underlying reason for elevated antibody titers in patients suffering from severe COVID-19 is so far not fully understood and is considered to be the result of a more pronounced immune activation. A dysregulated immune response resulting in antibody-dependent enhancement (ADE) has been described for SARS-CoV-1-infected patients ^{137,138}, and might also contribute to disease severity in COVID-19.

So far, limited data have been provided on the association of T cell responses and COVID-19 symptoms ¹³⁹. We here employed previously reported data on SARS-CoV-2-specific T cell responses against HLA class I- and HLA-DR-restricted SARS-CoV-2-derived epitope compositions ⁵⁵ for a respective correlative study. Interestingly, and in contrast to humoral immune responses, intensities of T cell responses were found to be in most cases not associated with symptom severity, or were even decreased in individuals with worse symptoms. This held true for both, HLA class I- and HLA-DR-restricted T cell responses, indicating that a broad T cell response is induced even after mild disease symptoms. One might speculate that a more symptomatic disease is triggered and enhanced by negative effects of antibody response ^{137,138}, while early viral clearance by T cells might protect against a worse disease course.

A major problem of COVID-19 is the potential persistence of long-term symptoms ^{140,141}, which could be due to a dysregulated or overactive immune response. Whether intensity and characteristics of T cell or antibody responses are associated with occurrence of long-term symptoms is yet unclear, but constitutes an important question.

Our study population represents the majority of all COVID-19 cases, including asymptomatic to moderate cases according to WHO classification ¹⁴²⁻¹⁴⁵. The severity of disease symptoms, however, was assessed by a questionnaire, which of course has to be taken with caution due to non-objective individual self-

assessment ^{146,147}. In conclusion, we showed that in contrast to antibody responses, SARS-CoV-2-directed T cell responses are not elevated in severe COVID-19 cases, but are equally strong for different disease severities highlighting the strength of T cell-based immunity for viral clearance.

3. Diskussion

3.1 Allgemeine Aspekte

Die vorliegende Arbeit verortet sich an der Schnittstelle zwischen grundlegender Immunbiologie und klinischer Translation und untersucht zwei unterschiedliche Krankheitsmodelle, das Ovarialkarzinom und eine Infektion mit SARS-CoV-2, um allgemeine Prinzipien der T-Zell-vermittelten Immunität herauszuarbeiten. Im Bereich von Tumorerkrankungen hat die Immuntherapie in den letzten Jahren einen Durchbruch erlebt ^{22,59,60,148}. Doch nach wie vor ist die klinische Effektivität limitiert und erfordert somit ein kontinuierliches Erweitern unseres Verständnisses zur Weiterentwicklung immuntherapeutischer Therapiemöglichkeiten ^{22,149}. Auch bei Virusinfektionen, insbesondere im Hinblick auf vergangene und mögliche zukünftige Pandemien ist ein tiefgehendes Verständnis der Rolle der T-Zell-Antwort von immenser Bedeutung ^{115,119}. In den hier durchgeführten Studien ist die HLA-vermittelte Antigenpräsentation über das Immunozeptidom von Virus-infizierten oder malignen Zellen an T-Zellen als funktionelle Grundlage und Taktgeber der spezifischen T-Zell-Antwort zentral. Die klinisch-translational Übersetzung der Ergebnisse erfolgte über die Verknüpfung der Grundlagendaten mit klinischen Daten der betroffenen Patienten ^{37,53-55}. Im Tumorkontext adressiert dies vor allem die Heterogenität des Immunozeptidoms im Ovarialkarzinom. Die Tumore variieren stark in HLA-Expression und Antigenvielfalt, was die Immunreaktion von CD4⁺-T-Zellen maßgeblich beeinflusst ^{37,53}. Im Infektionsmodell bei einer milden bis moderaten Infektion mit SARS-CoV-2 zeigt die humorale und zelluläre antigen-spezifische Antwort Konsequenzen für die Symptomatik sowie den Verlauf und die Rekonvaleszenz ^{54,55}.

3.2 Antigenpräsentation beim Ovarialkarzinom

Schuster *et al.* konnten mittels MS-basierter Immunozeptidom-Analyse 56 HLA-Klasse I-restringierte und 28 HLA-Klasse II-restringierte Ovarialkarzinom-spezifische Antigene identifizieren, die nicht auf gesunden Kontrollen, sondern nur auf Tumorgewebe präsentiert werden ³⁷. Die höchste Frequenz mit einer Vielzahl unterschiedlichster identifizierter Peptide zeigten dabei die Antigene MUC16 für HLA-Klasse I und MSLN für HLA-Klasse II. Beide Antigene spielen

auch in der Tumorausbreitung eine wichtige Rolle. MSLN bindet dabei an MUC16 und könnte so an der Ausbreitung von Tumoren (beispielsweise beim Ovarialkarzinom im Bereich des Peritoneums) beteiligt sein ^{36,91,107,150,151}. Daneben konnte MSLN in zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen werden, wobei einer erhöhte Expression sowohl mit einem günstigen als auch mit einem ungünstigen Einfluss auf das Überleben assoziiert wurde ^{90,152-154}.

Die hier analysierten Daten zur HLA-DR-vermittelten Präsentation von MSLN beim Ovarialkarzinom liefern erste Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen HLA-präsentierter Antigenvielfalt und dem klinischen Verlauf der Patienten. Die positive Korrelation zwischen der Präsentation von MSLN und einem verlängerten progressionsfreien Überleben sowie dem Gesamtüberleben deutet auf einen immunprotektiven Mechanismus eines möglichst diversen, MSLN-abgeleiteten Immunoepitopoms hin, welcher dann durch ein breiteres Spektrum MSLN-spezifischer CD4⁺ T-Zellen vermittelt werden könnte. Unsere Beobachtung steht im Einklang mit bereits publizierten Daten, die tumorinfiltrierende T-Zellen als unabhängigen prognostischen Marker für das Überleben im Ovarialkarzinom identifizieren konnten ^{32,155}. MSLN-spezifische CD4⁺ T-Zellen könnten über mehrere Wege die Immunüberwachung in Ovarialkarzinom-Patienten verstärken: Dabei kommt möglicherweise eine direkte Effektorfunktion, beispielsweise über Interferon- γ -vermittelte Tumorchemmung in Betracht. Zudem könnte eine zusätzliche Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen oder eine Veränderung des Tumormikromilieus durch Ausschüttung von Zytokinen möglich sein.

Neben der tiefergehenden Betrachtung der immunologischen Aspekte im Ovarialkarzinom ergeben sich auch aus translationaler Perspektive interessante Möglichkeiten aus diesen Ergebnissen: (I) Durch eine Peptid-spezifische Vakzinierungsstrategie könnte MSLN ein interessantes Antigen für Patientinnen mit Ovarialkarzinom in einer stabilen Erkrankungssituation (beispielsweise nach vollständiger Entfernung des Tumors zeitgleich zur adjuvanten Therapie) darstellen. Neuere Daten belegen, dass MSLN-basierte Impfstrategien auf Basis von vorhergesagten respektive natürlich präsentierten Peptiden in präklinischen

Modellen zu einer Aktivierung sowohl von CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen führen konnten^{156,157}. Zudem wurde die Infiltration des Tumors durch T-Zellen und die Zytokinausschüttung positiv beeinflusst^{156,157}. Unsere Daten unterstreichen die Bedeutung von MSLN in der Immunaktivierung und liefern nun eine neue Grundlage, um solche Vakzine gezielt an natürlich präsentierte MSLN-Peptide anzupassen. (II) Bei Patientinnen mit geringen tumorinfiltrierenden T-Zellen könnte eine Kombination der adjuvanten Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren zur Erhöhung der anti-tumoralen Aktivität beitragen. Hinsichtlich einer möglichen Intervention wäre aber auch eine Pilotstudie mit einer MSLN-Peptidvakzine in Kombination mit einem Immun-Checkpoint-Inhibitor interessant. Im Rahmen der Studie könnten auch spezifisch unterschiedliche T-Zell-Populationen untersucht werden, um die Ergebnisse hinsichtlich der Immunogenität von MSLN weiter zu validieren. (III) Weitergedacht wäre zudem eine Verlaufsbeobachtung des Immunozeptidoms bei Patientinnen mit Rezidiv der Grunderkrankung oder auch eine regelmäßige Kontrolle der T-Zellen im Blut bei Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko denkbar, um individualisierte Ansätze in der Behandlung zu verstärken oder frühzeitig therapeutisch aktiv zu werden.

Die vorliegenden Daten weisen aber auch Limitationen auf. So basieren diese auf einer repräsentativen, wenn auch begrenzten Patientenzahl. Dies erschwert Subgruppenanalysen für einzelne Entitäten des Ovarialkarzinoms. Ebenso fehlen prospektive Daten zur Veränderung der Antigenpräsentation unter Therapie. Diese könnten weitere Hinweise über das Immunozeptidom des Ovarialkarzinoms liefern und damit die (präklinische und auch klinische) Forschung stärken.

Zusammengefasst ist die Diversität des Immunozeptidoms, insbesondere im Hinblick auf MSLN-abgeleitete Peptide, ein Indikator für die Prognose bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom und eröffnet die Möglichkeit für die weitere Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze.

3.3 COVID-19: Immunantwort, Pathogenese und neue Erkenntnisse

Im Kontext der SARS-CoV-2-Infektion war es Ziel dieser Studie, die Stärke der humoralen und zellulären Immunantwort in Relation zur klinischen Symptomatik

zu setzen. Die beobachtete positive Korrelation zwischen ausgeprägter Immunantwort und starker Symptomatik unterstützt die Hypothese, dass ein Teil der COVID-19-Symptome durch die Immunreaktion selbst vermittelt wird, etwa durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und weniger durch die Infektion selbst.

Für die meisten COVID-19-Symptome (Fieber, Kopfschmerz, Fatigue, Krankheitsgefühl) fand sich kein signifikanter Unterschied in der Intensität der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort zwischen verschiedenen Schweregraden der Symptome. Im Gegensatz dazu korrelierten höhere Immunglobulin-Spiegel deutlich mit stärker ausgeprägten Symptomen. Dagegen zeigte sich bei Husten sowie Geruchs-/Geschmacksverlust eine inverse Beziehung. Patientinnen oder Patienten, die diese Symptome als moderat bis schwer angaben, hatten signifikant geringere T-Zell-Antworten als diejenigen mit milden oder keinen entsprechenden Symptomen ⁵⁴. Dies unterstützt die Hypothese, dass frühe und funktionell adäquate T-Zell-Antworten zu einer raschen Viruseliminierung beitragen und damit das Auftreten schwerer Symptome begrenzen können. Im Gegensatz zur Höhe der Immunglobuline im Blut könnte eine wirksame T-Zellantwort also vor einer schweren Symptomatik schützen, anstatt mit ihr zu korrelieren.

Ältere Arbeiten zu Beginn der Pandemie stützen diese Interpretation ^{40,41,158}. Aber auch aktuellere Daten zeigen, dass besonders bei mildereren Verläufen koordinierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antworten mit einem insgesamt geringerem inflammatorischen Profil assoziiert sind ^{159,160} und auch lange als Schutz vor einer erneuten Infektion präsent bleiben ¹⁶¹. Schwere Verläufe hingegen sind mit einer starken Inflammation verbunden, die durch dysregulierte Immunantworten ausgelöst wird ¹⁶². Zudem konnte gezeigt werden, dass eine frühe T-Zell-Antwort, insbesondere von T-Helfer-Zellen mit schnellerer Viruselimination und weniger Hospitalisation assoziiert ist ⁴⁰. Des Weiteren wurden bei zuvor unexponierten Personen präexistente, teils kreuzreaktive CD4⁺-T-Zellen nachgewiesen, die möglicherweise zu einer frühen Viruskontrolle beitragen ¹²⁷. Bei Rekonvaleszenten zeigte sich eine ausgeprägte Heterogenität der T-Zellqualität.

Breite und Stärke der T-Zell-Antworten variierten und korrelierten hier mit klinischen Verläufen sowie bestimmten Immunophänotypen ¹⁶³. Früh einsetzende, CD4⁺-T-Zell-Antworten korrelierten darüber hinaus mit mildereren Krankheitsverläufen und besitzen damit prädiktiven sowie potenziell therapeutischen Wert ¹⁶⁴. Diese neuen Erkenntnisse sollten in die Gestaltung künftiger Präventions- respektive Behandlungsstrategien und konsekutiv entsprechender Immuninterventionen einfließen.

Darüber hinaus ist die Rolle von T-Zellen bei der Langzeitimmunität nach Infektion oder Impfung in den Fokus gerückt. Mehrere Arbeiten zeigen, dass auch bei abfallender Antikörperantwort langlebige Gedächtnis-T-Zellen persistieren, die eine protektive Wirkung entfalten können. Für die Langzeitimmunität sind langlebige CD4⁺ Gedächtnisantworten zentral. So bleiben selbst bei sinkenden Antikörpertitern T-Zell-Gedächtnis-Kompartimente bei mehr als 90 % der Genesenen über Monate nachweisbar und tragen zur Re-Infektionsprophylaxe bei ^{161,165-167}.

Diese Evidenz stützt unsere Interpretation, dass die Symptomschwere nicht nur Viruslast widerspiegelt, sondern auch Rückschlüsse auf die Qualität der T-Zell-Antwort zulässt. Für vulnerable Gruppen (hohes Alter, Komorbidität, Immunsuppression) könnte daraus folgen, dass eine frühzeitige antivirale Therapie geeignet sein könnte, eine Hyperinflammation zu bremsen, ohne die T-Zell-Funktion zu reduzieren. Ein limitierender Faktor unserer Daten ist die Querschnittsanalyse der Immunantworten. Hypothesen zur Kausalität zwischen der T-Zell-Antwort und der Symptomatik der Patientinnen und Patienten bleiben insgesamt spekulativ. Auch könnte durch den Zeitpunkt der Probenabnahmen und durch verschiedene Virusvarianten Daten der Publikation von Nelde *et al.* beeinflusst worden sein. Hier wäre eine externe Validierung in unabhängigen Kohorten zur Überprüfung sinnvoll.

Zusammengenommen zeigen unsere Daten, dass stärkere Immunantworten tendenziell mit stärkeren Symptomen einhergehen, was für eine zum Teil immunvermittelte Genese spricht. Dagegen zeigte sich jedoch kein Unterschied der T-Zell-Antwort, während höhere Immunglobulinspiegel deutlich mit stärkerer

Symptomatik korrelierten. Bei einigen Symptomen bestand eine inverse Beziehung. Eine stärkere Ausprägung ging hier mit geringeren T-Zell-Antworten einher, was frühe, effektive T-Zell-Antworten als potenziell protektiven Faktor nahelegt.

3.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Reaktion der CD4⁺-T-Zellen zwischen Tumorerkrankungen und einer akuten Virusinfektion

Neben den zwei Teilprojekten war es das Ziel dieser Arbeit die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der CD4⁺ T-Zell-Antworten in zwei unterschiedlichen Kontexten gegenüberzustellen. Statt einer pauschalen „Gemeinsamkeit“ zeigt sich dabei vielmehr eine komplementäre Dualität. Eine effektive Immunantwort basiert sowohl auf der Präsentation der Antigene im Immunozeptidom als auch auf der spezifischen T-Zell-Antwort auf ebendieses Antigen. Unsere Daten zeigen, dass beide Seite eine wichtige Rolle im Kontext der Immunantwort spielen.

Im Vergleich der beiden Erkrankungen unterscheiden sich die T-Zell-Antworten dabei deutlich. Im Falle einer viralen Erkrankung verläuft diese akut, hochreguliert und mit langfristiger Gedächtnisbildung. Dabei konnten wir auch eine inverse Beziehung zwischen der T-Zell-Reaktion und den Symptomen der Patientinnen und Patienten aufzeigen ⁵⁴. Im Falle einer Tumorerkrankung ist häufig eine konstante, aber oft eingeschränkte Immunantwort zu beobachten. In unserem Projekt war dabei die HLA-restringierte Präsentation des Antigens MSLN als einziges mit einer besseren Prognose assoziiert ⁵³. Als große Gemeinsamkeit stellen in beiden Modellen CD4⁺ T-Zellen den zentralen Taktgeber der adaptiven Immunantwort dar. Die Immunantwort nimmt damit erheblichen Einfluss auf die Verläufe beider Erkrankungen. Die Bedeutung der Immunantwort im Allgemeinen und von CD4⁺ T-Zellen im Speziellen konnte dabei bereits in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden ^{43,118,124,139,168-170}. Weitere Gemeinsamkeiten beider Modelle sind die HLA-Abhängigkeit der Reaktion und die Bedeutung der Antwortqualität für eine effektive Immunantwort.

Dagegen liegen Unterschiede in der Antigendynamik und der therapeutischen Konsequenz. Im Infektionsmodell verläuft die Reaktion primär transient, kann

aber auch einen chronischen Verlauf nehmen ^{43,46}. Beim Tumormodell handelt es sich um eine chronische, aber oft mangelhafte Reaktion auf die präsentierten Antigene ^{155,168,171}. Daraus lässt sich ableiten, dass bei der akuten Infektion mit SARS-CoV-2 therapeutisch die Dämpfung einer überschießenden respektive dysregulierten Immunaktivierung im Vordergrund steht, während beim Ovarialkarzinom die Problematik der Immunflucht und Immunsuppression adressiert werden sollte. Diese Unterschiede beeinflussen auch die therapeutische Strategie, etwa bei der Entwicklung von Impfstoffen oder dem Einsatz von Immunmodulatoren.

3.5 Klinische Relevanz und translationale Perspektiven

Die vorgestellten Ergebnisse könnten eine Grundlage für die Entwicklung neuer Diagnose- und Therapieansätze bieten.

Für das Ovarialkarzinom ergibt sich die Perspektive, MSLN als Zielstruktur für Vakzine weiterzuentwickeln. Parallel dazu könnten Kombinationsstrategien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren oder neuen Adjuvantien die weiterhin schlechte Prognose der Erkrankung verbessern. Während Immuncheckpoint-Inhibitoren wie beispielsweise Pembrolizumab beim Mammakarzinom große Erfolge verzeichnen konnten ²², ist ein solcher Durchbruch beim Ovarialkarzinom bislang ausgeblieben ¹⁴⁹. Sofern es gelänge mittels einer Vakzine die T-Zellen zu stimulieren, könnte auch eine Ergänzung mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor sinnvoll sein. Denkbar wäre zudem eine Untersuchung des löslichen Immunozeptidoms (beim Ovarialkarzinom oder anderen Tumorentitäten) und ein Vergleich zu bereits erhobenen Daten des membranständigen Immunozeptidoms. Dies könnte Untersuchungen im Sinne einer *liquid biopsy* ermöglichen und die Gewinnung von Informationen über Tumore über minimal-invasive Verfahren vereinfachen.

Im Falle von SARS-CoV-2 lässt sich aus den vorliegenden Daten schwerer ein konkreter Ansatz postulieren. Denkbar wäre aber bei künftigen Varianten von SARS-CoV-2 oder anderen (kommenden) *emerging viruses* die Integration von T-Zell-basierten Tests in diagnostische Algorithmen, um das Risiko für schwere Verläufe besser abzuschätzen und entsprechend frühzeitig zu intervenieren.

Darüber hinaus eröffnet die Untersuchung langlebiger T-Zell-Antworten nach Infektion oder Impfung Perspektiven für Boosterstrategien und Impfstoffdesign, insbesondere bei neu auftretenden Virusvarianten mit Pandemiepotential.

3.6 Fazit

Die Relevanz der CD4⁺ T-Zell-vermittelten Immunantwort für den Verlauf von Tumor- und Infektionskrankheiten ist erheblich. Im Kontext dieser Dissertation zeigt sich sowohl im Ovarialkarzinom als auch bei COVID-19, dass die Art und Qualität der HLA-Klasse II-vermittelten T-Zell-Antwort mit klinischen Parametern wie Überleben respektive Symptomschwere korreliert. Während im Tumorkontext eine Präsentation tumorassoziierter Peptide mit einem günstigen Verlauf beobachtet werden konnte, weisen die Daten aus der COVID-19-Studie darauf hin, dass eine zu starke oder dysregulierte T-Zell-Antwort symptomverstärkend wirken kann.

MS-basierte Analysen des Immunozeptidoms erlauben eine hochspezifische Charakterisierung der natürlich präsentierten HLA-restringierten Peptide und liefern somit einen funktionellen Zugang zur Tumorummunologie, der über genetische und transkriptomische Verfahren hinausgeht. Die Auswertung im Rahmen dieser Arbeit zeigt, dass dieser Ansatz nicht nur zur Identifikation prognostisch relevanter Muster beiträgt, sondern auch die Grundlage für gezielte, HLA-adaptierte Immuntherapien schaffen kann.

Zugleich zeigt sich anhand der COVID-19-Daten, dass funktionelle T-Zell-Analysen in Kombination mit serologischen Markern wertvolle Informationen über den Immunstatus von Patientinnen und Patienten liefern können. Die frühzeitige Identifikation protektiver oder potenziell pathogener Immunprofile könnte zur Entwicklung differenzierter Behandlungsstrategien beitragen.

Die Gegenüberstellung beider Erkrankungsmodelle macht deutlich, dass ein vertieftes Verständnis der T-Zell-Immunität sowohl für die Prognoseabschätzung als auch für die Therapiestratifizierung von zentraler Bedeutung ist und unterstreicht die Bedeutung der CD4⁺ T-Zell-Antwort. Während bei Tumorerkrankungen Strategien zur Immunaktivierung und verstärkten Antigenerkennung verfolgt werden müssen, steht bei Infektionskrankheiten wie COVID-19 die Immunmodulation und gezielte Dämpfung überschießender Reaktionen im Vordergrund.

Insgesamt unterstreichen unsere Daten die Notwendigkeit, immunologische Konzepte besser verstehen zu müssen. Der Ansatz, T-Zell-vermittelte Immunität krankheitsübergreifend zu untersuchen, bietet nicht nur einen Erkenntnisgewinn für die einzelne Erkrankung, sondern auch konkrete Impulse für personalisierte Therapiekonzepte. Dies gilt sowohl für zukünftige immunbasierte Tumorthérapien als auch für präventive Strategien im Bereich infektiologischer Erkrankungen.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit legen somit den Grundstein für weiterführende Forschungsvorhaben, die immunologische Mechanismen systematisch erfassen, funktional interpretieren und klinisch nutzbar machen mit dem Ziel, bestehende Behandlungskonzepte zu individualisieren und effizienter zu gestalten.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die klinische Relevanz der T-Zell-vermittelten Immunantwort im Kontext zweier unterschiedlicher Krankheitsbilder, dem Ovarialkarzinom und einer Infektion mit SARS-CoV-2, untersucht.

Im Kontext des Ovarialkarzinoms konnte durch die klinisch-translationalen Analyse bestehender immunozeptidomischer Daten gezeigt werden, dass eine diverse Präsentation von MSLN über HLA-Klasse II-Moleküle signifikant mit einem verlängerten progressionsfreien und Gesamtüberleben assoziiert ist. Dieses Erkenntnis ist von großer translationaler Bedeutung, da sie einen direkten Anknüpfungspunkt für die Entwicklung patientenindividueller Therapien bietet und die Bedeutung von CD4⁺ T-Zell-Antworten hervorhebt. Die Ergebnisse stützen zudem die Hypothese, dass CD4⁺ T-Zellen nicht nur eine unterstützende, sondern auch eine direkte zytotoxische Rolle im Tumormikromilieu einnehmen können.

Die Analyse SARS-CoV-2-spezifischer Immunantworten zeigt eine Korrelation zwischen der Stärke zellulärer und humoraler Immunantworten und der Symptomatik in der akuten Krankheitsphase. Während eine robuste Immunantwort mit einer stärkeren Symptomatik einherging, belegen aktuelle Arbeiten, dass bestimmte CD4⁺ T-Zell-Subtypen entscheidend für eine effektive Viruselimination und langlebige Immunität sind. Dies verdeutlicht die doppelte Rolle des Immunsystems: Einerseits als Schutzmechanismus, aber auch als potenzieller Treiber von Pathogenese.

Die Gegenüberstellung beider Krankheitsmodelle offenbart dabei die zentrale Rolle der CD4⁺ T-Zell-spezifischen Immunantwort in Relation zum klinischen Outcome.

Die Ergebnisse dieser Dissertation unterstreichen die Notwendigkeit, immunologische Daten nicht isoliert, sondern in ihrem klinischen Kontext zu interpretieren. Sie liefern eine starke Argumentationsgrundlage für die Entwicklung personalisierter immunologischer Interventionen, sei es durch Impfstoffe, T-Zell-basierte Therapien oder immunmodulierende Strategien.

5. Literaturverzeichnis

1. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem.* Oct 31 2016;60(3):275-301. doi:10.1042/ebc20160017
2. Chi H, Pepper M, Thomas PG. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. *Cell.* Apr 25 2024;187(9):2052-2078. doi:10.1016/j.cell.2024.03.037
3. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* Nov 11 2011;11(12):823-36. doi:10.1038/nri3084
4. Masopust D, Awasthi A, Bosselut R, et al. Guidelines for T cell nomenclature. *Nature Reviews Immunology.* 2025/11/18 2025;doi:10.1038/s41577-025-01238-2
5. McCluskey J, Kanaan C, Diviney M. Nomenclature and Serology of HLA Class I and Class II Alleles. *Curr Protoc Immunol.* Aug 1 2017;118:A.1s.1-a.1s.6. doi:10.1002/cpim.32
6. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:443-73. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095910
7. Altadill M, Álvarez I, Ataya M, et al. Human Cytomegalovirus Antigen Presentation by HLA-G in Infected Cells. *Hla.* May 2025;105(5):e70089. doi:10.1111/tan.70089
8. Benitez Fuentes JD, Bartolome Arcilla J, Mohamed Mohamed K, et al. Targeting of Non-Classical Human Leukocyte Antigens as Novel Therapeutic Strategies in Cancer. *Cancers (Basel).* Dec 22 2024;16(24)doi:10.3390/cancers16244266
9. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* Jul 13 2012;12(8):557-69. doi:10.1038/nri3254
10. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* Apr 2015;15(4):203-16. doi:10.1038/nri3818
11. Hoenisch Gravel N, Nelde A, Bauer J, et al. TOF(IMS) mass spectrometry-based immunopeptidomics refines tumor antigen identification. *Nat Commun.* Nov 17 2023;14(1):7472. doi:10.1038/s41467-023-42692-7

12. Shapiro IE, Bassani-Sternberg M. The impact of immunopeptidomics: From basic research to clinical implementation. *Semin Immunol.* Mar 2023;66:101727. doi:10.1016/j.smim.2023.101727
13. Koretzky GA. Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *J Immunol.* Sep 1 2010;185(5):2643-4. doi:10.4049/jimmunol.1090076
14. Ashby KM, Hogquist KA. A guide to thymic selection of T cells. *Nat Rev Immunol.* Feb 2024;24(2):103-117. doi:10.1038/s41577-023-00911-8
15. Scott EN, Gocher AM, Workman CJ, Vignali DAA. Regulatory T Cells: Barriers of Immune Infiltration Into the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2021;12:702726. doi:10.3389/fimmu.2021.702726
16. Baldanzi G. Immune Checkpoint Receptors Signaling in T Cells. *Int J Mol Sci.* Mar 24 2022;23(7)doi:10.3390/ijms23073529
17. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* Sep 2018;8(9):1069-1086. doi:10.1158/2159-8290.Cd-18-0367
18. Callahan Margaret K, Postow Michael A, Wolchok Jedd D. Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity.* 2016;44(5):1069-1078. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.023
19. Geltink RIK, Kyle RL, Pearce EL. Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annu Rev Immunol.* Apr 26 2018;36:461-488. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053019
20. Heitmann JS, Bilich T, Tandler C, et al. A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity. *Nature.* Jan 2022;601(7894):617-622. doi:10.1038/s41586-021-04232-5
21. Nelde A, Maringer Y, Bilich T, et al. Immunopeptidomics-Guided Warehouse Design for Peptide-Based Immunotherapy in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Immunol.* 2021;12:705974. doi:10.3389/fimmu.2021.705974
22. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* Feb 27 2020;382(9):810-821. doi:10.1056/NEJMoa1910549
23. Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M, et al. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of

- Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*. Jun 5 2021;397(10290):2182-2193. doi:10.1016/s0140-6736(21)00731-5
24. Trimbos B, Timmers P, Pecorelli S, et al. Surgical staging and treatment of early ovarian cancer: long-term analysis from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. Jul 7 2010;102(13):982-7. doi:10.1093/jnci/djq149
25. Vergote I, Amant F, Kristensen G, Ehlen T, Reed NS, Casado A. Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. *Eur J Cancer*. Sep 2011;47 Suppl 3:S88-92. doi:10.1016/s0959-8049(11)70152-6
26. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*. Dec 29 2011;365(26):2473-83. doi:10.1056/NEJMoa1104390
27. Moore K, Colombo N, Scambia G, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. Dec 27 2018;379(26):2495-2505. doi:10.1056/NEJMoa1810858
28. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. Dec 19 2019;381(25):2416-2428. doi:10.1056/NEJMoa1911361
29. Harter P, Sehouli J, Vergote I, et al. Randomized Trial of Cytoreductive Surgery for Relapsed Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. Dec 2 2021;385(23):2123-2131. doi:10.1056/NEJMoa2103294
30. Moore KN, Angelergues A, Konecny GE, et al. Mirvetuximab Soravtansine in FR α -Positive, Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. Dec 7 2023;389(23):2162-2174. doi:10.1056/NEJMoa2309169
31. Eisenhauer EA. Real-world evidence in the treatment of ovarian cancer. *Ann Oncol*. Nov 1 2017;28(suppl_8):viii61-viii65. doi:10.1093/annonc/mdx443
32. Guo N, Yang A, Farooq FB, et al. CD8 + T cell infiltration is associated with improved survival and negatively correlates with hypoxia in clear cell ovarian cancer. *Sci Rep*. Apr 21 2023;13(1):6530. doi:10.1038/s41598-023-30655-3
33. Chap BS, Rayroux N, Grimm AJ, Ghisoni E, Dangaj Laniti D. Crosstalk of T cells within the ovarian cancer microenvironment. *Trends Cancer*. Dec 2024;10(12):1116-1130. doi:10.1016/j.trecan.2024.09.001

34. Schoutrop E, El-Serafi I, Poiret T, et al. Mesothelin-Specific CAR T Cells Target Ovarian Cancer. *Cancer Res.* Jun 1 2021;81(11):3022-3035. doi:10.1158/0008-5472.Can-20-2701
35. Hilliard TS. The Impact of Mesothelin in the Ovarian Cancer Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel).* Aug 21 2018;10(9)doi:10.3390/cancers10090277
36. Hilliard TS, Kowalski B, Iwamoto K, et al. Host Mesothelin Expression Increases Ovarian Cancer Metastasis in the Peritoneal Microenvironment. *Int J Mol Sci.* Nov 18 2021;22(22)doi:10.3390/ijms222212443
37. Schuster H, Peper JK, Bösmüller HC, et al. The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 14 2017;114(46):E9942-e9951. doi:10.1073/pnas.1707658114
38. Schoutrop E, Poiret T, El-Serafi I, et al. Tuned activation of MSLN-CAR T cells induces superior antitumor responses in ovarian cancer models. *J Immunother Cancer.* Feb 2023;11(2)doi:10.1136/jitc-2022-005691
39. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med.* Oct 29 2020;383(18):1724-1734. doi:10.1056/NEJMoa2026116
40. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* Feb 2022;23(2):186-193. doi:10.1038/s41590-021-01122-w
41. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* Feb 18 2021;184(4):861-880. doi:10.1016/j.cell.2021.01.007
42. Tan Y, Liu F, Xu X, et al. Durability of neutralizing antibodies and T-cell response post SARS-CoV-2 infection. *Front Med.* Dec 2020;14(6):746-751. doi:10.1007/s11684-020-0822-5
43. Glynn P, Tahmasebi N, Gant V, Gupta R. Long COVID following mild SARS-CoV-2 infection: characteristic T cell alterations and response to antihistamines. *J Investig Med.* Jan 2022;70(1):61-67. doi:10.1136/jim-2021-002051
44. Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science.* Feb 5 2021;371(6529)doi:10.1126/science.abf4063

45. Sherina N, Piralla A, Du L, et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6-8 months after the infection. *Med.* Mar 12 2021;2(3):281-295.e4. doi:10.1016/j.medj.2021.02.001
46. Augustin M, Schommers P, Stecher M, et al. Post-COVID syndrome in non-hospitalised patients with COVID-19: a longitudinal prospective cohort study. *Lancet Reg Health Eur.* Jul 2021;6:100122. doi:10.1016/j.lanepe.2021.100122
47. García LF. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Front Immunol.* 2020;11:1441. doi:10.3389/fimmu.2020.01441
48. Krämer B, Knoll R, Bonaguro L, et al. Early IFN- α signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19. *Immunity.* Sep 4 2021;doi:10.1016/j.immuni.2021.09.002
49. Marcu A, Bichmann L, Kuchenbecker L, et al. HLA Ligand Atlas: a benign reference of HLA-presented peptides to improve T-cell-based cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* Apr 2021;9(4)doi:10.1136/jitc-2020-002071
50. Wacker M, Bauer J, Wessling L, et al. Immunoprecipitation methods impact the peptide repertoire in immunopeptidomics. *Front Immunol.* 2023;14:1219720. doi:10.3389/fimmu.2023.1219720
51. Akache B, McCluskie MJ. The Quantification of Antigen-Specific T Cells by IFN- γ ELISpot. *Methods Mol Biol.* 2021;2183:525-536. doi:10.1007/978-1-0716-0795-4_30
52. Ji N, Forsthuber TG. ELISPOT Techniques. *Methods Mol Biol.* 2016;1304:63-71. doi:10.1007/7651_2014_111
53. Tegeler CM, Scheid J, Rammensee HG, et al. HLA-DR Presentation of the Tumor Antigen MSLN Associates with Clinical Outcome of Ovarian Cancer Patients. *Cancers (Basel).* Apr 30 2022;14(9)doi:10.3390/cancers14092260
54. Tegeler CM, Bilich T, Maringer Y, et al. Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort. *Int J Infect Dis.* Jul 2022;120:187-195. doi:10.1016/j.ijid.2022.04.019

55. Nelde A, Bilich T, Heitmann JS, et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol.* Jan 2021;22(1):74-85. doi:10.1038/s41590-020-00808-x
56. Löffler MW, Chandran PA, Laske K, et al. Personalized peptide vaccine-induced immune response associated with long-term survival of a metastatic cholangiocarcinoma patient. *J Hepatol.* Oct 2016;65(4):849-855. doi:10.1016/j.jhep.2016.06.027
57. Carlino MS, Larkin J, Long GV. Immune checkpoint inhibitors in melanoma. *Lancet.* Sep 11 2021;398(10304):1002-1014. doi:10.1016/s0140-6736(21)01206-x
58. Sun LL, Ellerman D, Mathieu M, et al. Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies. *Sci Transl Med.* May 13 2015;7(287):287ra70. doi:10.1126/scitranslmed.aaa4802
59. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* Nov 21 2019;381(21):2020-2031. doi:10.1056/NEJMoa1910231
60. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* Aug 19 2010;363(8):711-23. doi:10.1056/NEJMoa1003466
61. Bauer J, Nelde A, Bilich T, Walz JS. Antigen Targets for the Development of Immunotherapies in Leukemia. *Int J Mol Sci.* Mar 20 2019;20(6)doi:10.3390/ijms20061397
62. van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, et al. Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol.* Nov 10 2013;31(32):e439-42. doi:10.1200/jco.2012.47.7521
63. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science.* Mar 25 2016;351(6280):1463-9. doi:10.1126/science.aaf1490
64. Yadav M, Jhunjunwala S, Phung QT, et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature.* Nov 27 2014;515(7528):572-6. doi:10.1038/nature14001

65. Finn OJ, Rammensee HG. Is It Possible to Develop Cancer Vaccines to Neoantigens, What Are the Major Challenges, and How Can These Be Overcome? Neoantigens: Nothing New in Spite of the Name. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Nov 1 2018;10(11)doi:10.1101/cshperspect.a028829
66. Kowalewski DJ, Schuster H, Backert L, et al. HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 13 2015;112(2):E166-75. doi:10.1073/pnas.1416389112
67. Neidert MC, Kowalewski DJ, Silginer M, et al. The natural HLA ligandome of glioblastoma stem-like cells: antigen discovery for T cell-based immunotherapy. *Acta Neuropathol.* Jun 2018;135(6):923-938. doi:10.1007/s00401-018-1836-9
68. Bilich T, Nelde A, Bichmann L, et al. The HLA ligandome landscape of chronic myeloid leukemia delineates novel T-cell epitopes for immunotherapy. *Blood.* Feb 7 2019;133(6):550-565. doi:10.1182/blood-2018-07-866830
69. Berlin C, Kowalewski DJ, Schuster H, et al. Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy. *Leukemia.* Mar 2015;29(3):647-59. doi:10.1038/leu.2014.233
70. Walz S, Stickel JS, Kowalewski DJ, et al. The antigenic landscape of multiple myeloma: mass spectrometry (re)defines targets for T-cell-based immunotherapy. *Blood.* Sep 3 2015;126(10):1203-13. doi:10.1182/blood-2015-04-640532
71. Reustle A, Di Marco M, Meyerhoff C, et al. Integrative -omics and HLA-ligandomics analysis to identify novel drug targets for ccRCC immunotherapy. *Genome Med.* Mar 30 2020;12(1):32. doi:10.1186/s13073-020-00731-8
72. Wick W, Dietrich P-Y, Kuttruff S, et al. GAPVAC-101: First-in-human trial of a highly personalized peptide vaccination approach for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36(15_suppl):2000-2000. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.2000
73. Rausch S, Kruck S, Stenzl A, Bedke J. IMA901 for metastatic renal cell carcinoma in the context of new approaches to immunotherapy. *Future Oncol.* May 2014;10(6):937-48. doi:10.2217/fon.14.61

74. Casalegno-Garduño R, Schmitt A, Spitschak A, et al. Immune responses to WT1 in patients with AML or MDS after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *Int J Cancer*. Apr 1 2016;138(7):1792-801. doi:10.1002/ijc.29909
75. Hojjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Daneshmanesh AH, et al. Spontaneous Immunity Against the Receptor Tyrosine Kinase ROR1 in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142310. doi:10.1371/journal.pone.0142310
76. Godet Y, Fabre E, Dosset M, et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin Cancer Res*. May 15 2012;18(10):2943-53. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-11-3185
77. Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand WH, Peters B, Nielsen M. Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. *J Proteome Res*. Jun 5 2020;19(6):2304-2315. doi:10.1021/acs.jproteome.9b00874
78. Hulsen T, de Vlieg J, Alkema W. BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics*. Oct 16 2008;9:488. doi:10.1186/1471-2164-9-488
79. Weinzierl AO, Lemmel C, Schoor O, et al. Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol Cell Proteomics*. Jan 2007;6(1):102-13. doi:10.1074/mcp.M600310-MCP200
80. Fortier MH, Caron E, Hardy MP, et al. The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J Exp Med*. Mar 17 2008;205(3):595-610. doi:10.1084/jem.20071985
81. Bassani-Sternberg M, Bräunlein E, Klar R, et al. Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat Commun*. Nov 21 2016;7:13404. doi:10.1038/ncomms13404
82. Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, Jensen LJ, Mann M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong

effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics*. Mar 2015;14(3):658-73. doi:10.1074/mcp.M114.042812

83. Matsumoto H, Thike AA, Li H, et al. Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Apr 2016;156(2):237-47. doi:10.1007/s10549-016-3743-x

84. Ryschich E, Nötzel T, Hinz U, et al. Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*. Jan 15 2005;11(2 Pt 1):498-504.

85. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*. Jul 13 2017;547(7662):217-221. doi:10.1038/nature22991

86. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*. Jul 13 2017;547(7662):222-226. doi:10.1038/nature23003

87. Nelde A, Kowalewski DJ, Backert L, et al. HLA ligandome analysis of primary chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells under lenalidomide treatment confirms the suitability of lenalidomide for combination with T-cell-based immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2018;7(4):e1316438. doi:10.1080/2162402x.2017.1316438

88. Bilich T, Nelde A, Bauer J, et al. Mass spectrometry-based identification of a B-cell maturation antigen-derived T-cell epitope for antigen-specific immunotherapy of multiple myeloma. *Blood Cancer J*. Feb 28 2020;10(2):24. doi:10.1038/s41408-020-0288-3

89. Reustle A, Fisel P, Renner O, et al. Characterization of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. Dec 15 2018;143(12):3181-3193. doi:10.1002/ijc.31741

90. Cheng WF, Huang CY, Chang MC, et al. High mesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*. Apr 7 2009;100(7):1144-53. doi:10.1038/sj.bjc.6604964

91. Coelho R, Ricardo S, Amaral AL, et al. Regulation of invasion and peritoneal dissemination of ovarian cancer by mesothelin manipulation. *Oncogenesis*. Jul 1 2020;9(6):61. doi:10.1038/s41389-020-00246-2
92. Ma XC, Hattori T, Kushima R, Terata N, Kodama M. Expression of HLA-class II antigen in gastric carcinomas. Its relationship to histopathological grade, lymphocyte infiltration and five-year survival rate. *Acta Oncol*. 1994;33(2):187-90. doi:10.3109/02841869409098403
93. Sikorska B, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. HLA-DR expression is a significant prognostic factor in laryngeal cancer. A morphometric study. *Apmis*. Apr 1999;107(4):383-8. doi:10.1111/j.1699-0463.1999.tb01569.x
94. Matsushita K, Takenouchi T, Shimada H, et al. Strong HLA-DR antigen expression on cancer cells relates to better prognosis of colorectal cancer patients: Possible involvement of c-myc suppression by interferon-gamma in situ. *Cancer Sci*. Jan 2006;97(1):57-63. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00137.x
95. Andersen SN, Rognum TO, Lund E, Meling GI, Hauge S. Strong HLA-DR expression in large bowel carcinomas is associated with good prognosis. *Br J Cancer*. Jul 1993;68(1):80-5. doi:10.1038/bjc.1993.290
96. Løvig T, Andersen SN, Thorstensen L, et al. Strong HLA-DR expression in microsatellite stable carcinomas of the large bowel is associated with good prognosis. *Br J Cancer*. Sep 23 2002;87(7):756-62. doi:10.1038/sj.bjc.6600507
97. Chen YY, Chang WA, Lin ES, Chen YJ, Kuo PL. Expressions of HLA Class II Genes in Cutaneous Melanoma Were Associated with Clinical Outcome: Bioinformatics Approaches and Systematic Analysis of Public Microarray and RNA-Seq Datasets. *Diagnostics (Basel)*. Jun 12 2019;9(2)doi:10.3390/diagnostics9020059
98. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. Jul 2018;68(4):284-296. doi:10.3322/caac.21456
99. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. Jun 4 1998;393(6684):480-3. doi:10.1038/31002
100. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and

memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature*. Feb 20 2003;421(6925):852-6. doi:10.1038/nature01441

101. Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, et al. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 20 1999;96(15):8633-8. doi:10.1073/pnas.96.15.8633

102. Greiner J, Ono Y, Hofmann S, et al. Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4(+) and CD8(+) T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. Aug 9 2012;120(6):1282-9. doi:10.1182/blood-2011-11-394395

103. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*. Jun 15 2007;109(12):5346-54. doi:10.1182/blood-2006-10-051318

104. Sun JC, Williams MA, Bevan MJ. CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nat Immunol*. Sep 2004;5(9):927-33. doi:10.1038/ni1105

105. Tran E, Turcotte S, Gros A, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science*. May 9 2014;344(6184):641-5. doi:10.1126/science.1251102

106. Huo Q, Xu C, Shao Y, et al. Free CA125 promotes ovarian cancer cell migration and tumor metastasis by binding Mesothelin to reduce DKK1 expression and activate the SGK3/FOXO3 pathway. *Int J Biol Sci*. 2021;17(2):574-588. doi:10.7150/ijbs.52097

107. Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, et al. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem*. Mar 5 2004;279(10):9190-8. doi:10.1074/jbc.M312372200

108. Morello A, Sadelain M, Adusumilli PS. Mesothelin-Targeted CARs: Driving T Cells to Solid Tumors. *Cancer Discov*. Feb 2016;6(2):133-46. doi:10.1158/2159-8290.Cd-15-0583

109. Adusumilli PS, Cherkassky L, Villena-Vargas J, et al. Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Sci Transl Med*. Nov 5 2014;6(261):261ra151. doi:10.1126/scitranslmed.3010162

110. Li LQ, Huang T, Wang YQ, et al. COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. *J Med Virol*. Jun 2020;92(6):577-583. doi:10.1002/jmv.25757
111. Son KB, Lee TJ, Hwang SS. Disease severity classification and COVID-19 outcomes, Republic of Korea. *Bull World Health Organ*. Jan 1 2021;99(1):62-66. doi:10.2471/blt.20.257758
112. Nakamichi K, Shen JZ, Lee CS, et al. Hospitalization and mortality associated with SARS-CoV-2 viral clades in COVID-19. *Sci Rep*. Feb 26 2021;11(1):4802. doi:10.1038/s41598-021-82850-9
113. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, et al. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*. Jan 21 2021;384(3):238-251. doi:10.1056/NEJMoa2035002
114. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. Dec 31 2020;383(27):2603-2615. doi:10.1056/NEJMoa2034577
115. Kowalik MM, Trzonkowski P, Łasińska-Kowara M, Mital A, Smiatacz T, Jaguszewski M. COVID-19 - Toward a comprehensive understanding of the disease. *Cardiol J*. 2020;27(2):99-114. doi:10.5603/CJ.a2020.0065
116. Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. Jul 28 2020;71(15):762-768. doi:10.1093/cid/ciaa248
117. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. Oct 1 2020;183(1):158-168.e14. doi:10.1016/j.cell.2020.08.017
118. Altmann DM, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Sci Immunol*. Jul 17 2020;5(49)doi:10.1126/sciimmunol.abd6160
119. Jarjour NN, Masopust D, Jameson SC. T Cell Memory: Understanding COVID-19. *Immunity*. Jan 12 2021;54(1):14-18. doi:10.1016/j.immuni.2020.12.009

120. Kared H, Redd AD, Bloch EM, et al. SARS-CoV-2-specific CD8+ T cell responses in convalescent COVID-19 individuals. *J Clin Invest.* Mar 1 2021;131(5)doi:10.1172/jci145476
121. Karlsson AC, Humbert M, Buggert M. The known unknowns of T cell immunity to COVID-19. *Sci Immunol.* Nov 18 2020;5(53)doi:10.1126/sciimmunol.abe8063
122. Woldemeskel BA, Kwaa AK, Garliss CC, Laeyendecker O, Ray SC, Blankson JN. Healthy donor T cell responses to common cold coronaviruses and SARS-CoV-2. *J Clin Invest.* Dec 1 2020;130(12):6631-6638. doi:10.1172/jci143120
123. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol.* Dec 2020;21(12):1506-1516. doi:10.1038/s41590-020-00814-z
124. Bilich T, Nelde A, Heitmann JS, et al. T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals. *Sci Transl Med.* Apr 21 2021;13(590)doi:10.1126/scitranslmed.abf7517
125. Brunk F, Moritz A, Nelde A, et al. SARS-CoV-2-reactive T-cell receptors isolated from convalescent COVID-19 patients confer potent T-cell effector function. *Eur J Immunol.* Aug 23 2021;doi:10.1002/eji.202149290
126. Bilich T, Roerden M, Maringer Y, et al. Preexisting and Post-COVID-19 Immune Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Cancer. *Cancer Discov.* Aug 2021;11(8):1982-1995. doi:10.1158/2159-8290.Cd-21-0191
127. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell.* Jun 25 2020;181(7):1489-1501.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.05.015
128. Miller J, Yan KS. COVID-19 Gastrointestinal Symptoms and Attenuation of the Immune Response to SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* Jun 2021;160(7):2251-2254. doi:10.1053/j.gastro.2021.03.029

129. Zhu J, Ji P, Pang J, et al. Clinical characteristics of 3062 COVID-19 patients: A meta-analysis. *J Med Virol.* Oct 2020;92(10):1902-1914. doi:10.1002/jmv.25884
130. Horton DB, Barrett ES, Roy J, et al. Determinants and dynamics of SARS-CoV-2 infection in a diverse population: 6-month evaluation of a prospective cohort study. *J Infect Dis.* Aug 13 2021;doi:10.1093/infdis/jiab411
131. Bakılan F, Gökmen İ G, Ortanca B, et al. Musculoskeletal symptoms and related factors in postacute COVID-19 patients. *Int J Clin Pract.* Aug 13 2021:e14734. doi:10.1111/ijcp.14734
132. Toor SM, Saleh R, Sasidharan Nair V, Taha RZ, Elkord E. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. *Immunology.* Jan 2021;162(1):30-43. doi:10.1111/imm.13262
133. Van Elslande J, Oyaert M, Ailliet S, et al. Longitudinal follow-up of IgG anti-nucleocapsid antibodies in SARS-CoV-2 infected patients up to eight months after infection. *J Clin Virol.* Mar 2021;136:104765. doi:10.1016/j.jcv.2021.104765
134. Haveri A, Ekström N, Solastie A, et al. Persistence of neutralizing antibodies a year after SARS-CoV-2 infection in humans. *Eur J Immunol.* Sep 27 2021;doi:10.1002/eji.202149535
135. Marot S, Malet I, Leducq V, et al. Rapid decline of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 among infected healthcare workers. *Nat Commun.* Feb 8 2021;12(1):844. doi:10.1038/s41467-021-21111-9
136. Anderson DE, Tan CW, Chia WN, et al. Lack of cross-neutralization by SARS patient sera towards SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect.* Dec 2020;9(1):900-902. doi:10.1080/22221751.2020.1761267
137. Negro F. Is antibody-dependent enhancement playing a role in COVID-19 pathogenesis? *Swiss Med Wkly.* Apr 6 2020;150:w20249. doi:10.4414/smw.2020.20249
138. Karthik K, Senthilkumar TMA, Udhayavel S, Raj GD. Role of antibody-dependent enhancement (ADE) in the virulence of SARS-CoV-2 and its mitigation strategies for the development of vaccines and immunotherapies to counter COVID-19. *Hum Vaccin Immunother.* Dec 1 2020;16(12):3055-3060. doi:10.1080/21645515.2020.1796425

139. Kim JY, Kwon JS, Bae S, et al. SARS-CoV-2-Specific Antibody and T Cell Response Kinetics According to Symptom Severity. *Am J Trop Med Hyg*. Jun 17 2021;105(2):395-400. doi:10.4269/ajtmh.20-1594
140. Huang C, Huang L, Wang Y, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet*. Jan 16 2021;397(10270):220-232. doi:10.1016/s0140-6736(20)32656-8
141. Mendelson M, Nel J, Blumberg L, et al. Long-COVID: An evolving problem with an extensive impact. *S Afr Med J*. Nov 23 2020;111(1):10-12. doi:10.7196/SAMJ.2020.v111i11.15433
142. Mulchandani R, Lyngdoh T, Kakkar AK. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. Jan 2021;51(1):e13429. doi:10.1111/eci.13429
143. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, et al. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest*. Dec 1 2020;130(12):6477-6489. doi:10.1172/jci140965
144. Jiang Y, Wei X, Guan J, et al. COVID-19 pneumonia: CD8(+) T and NK cells are decreased in number but compensatory increased in cytotoxic potential. *Clin Immunol*. Sep 2020;218:108516. doi:10.1016/j.clim.2020.108516
145. Liu J, Li S, Liu J, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. May 2020;55:102763. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102763
146. Maddox GL, Douglass EB. Self-assessment of health: a longitudinal study of elderly subjects. *J Health Soc Behav*. Mar 1973;14(1):87-93.
147. Ward M, Gruppen L, Regehr G. Measuring self-assessment: current state of the art. *Adv Health Sci Educ Theory Pract*. 2002;7(1):63-80. doi:10.1023/a:1014585522084
148. Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. Nov 29 2018;379(22):2108-2121. doi:10.1056/NEJMoa1809615
149. Matulonis UA, Shapira-Frommer R, Santin AD, et al. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer:

- results from the phase II KEYNOTE-100 study. *Ann Oncol.* Jul 1 2019;30(7):1080-1087. doi:10.1093/annonc/mdz135
150. Chen SH, Hung WC, Wang P, Paul C, Konstantopoulos K. Mesothelin binding to CA125/MUC16 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion via MMP-7 activation. *Sci Rep.* 2013;3:1870. doi:10.1038/srep01870
 151. Gubbels JA, Belisle J, Onda M, et al. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer.* Oct 26 2006;5(1):50. doi:10.1186/1476-4598-5-50
 152. Ho M, Bera TK, Willingham MC, et al. Mesothelin expression in human lung cancer. *Clin Cancer Res.* Mar 1 2007;13(5):1571-5. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-06-2161
 153. Chu GJ, Linton A, Kao S, et al. High mesothelin expression by immunohistochemistry predicts improved survival in pleural mesothelioma. *Histopathology.* Aug 2023;83(2):202-210. doi:10.1111/his.14916
 154. Tozbikian G, Brogi E, Kadota K, et al. Mesothelin expression in triple negative breast carcinomas correlates significantly with basal-like phenotype, distant metastases and decreased survival. *PLoS One.* 2014;9(12):e114900. doi:10.1371/journal.pone.0114900
 155. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* Jan 16 2003;348(3):203-13. doi:10.1056/NEJMoa020177
 156. Cai Z, Li Z, Zhong W, et al. Targeting Mesothelin Enhances Personalized Neoantigen Vaccine Induced Antitumor Immune Response in Orthotopic Pancreatic Cancer Mouse Models. *Adv Sci (Weinh).* Mar 2025;12(12):e2407976. doi:10.1002/advs.202407976
 157. Zeng W, Pan J, Fang Z, et al. A Novel PD-L1-Containing MSLN Targeting Vaccine for Lung Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2022;13:925217. doi:10.3389/fimmu.2022.925217
 158. Bertoletti A, Le Bert N, Qui M, Tan AT. SARS-CoV-2-specific T cells in infection and vaccination. *Cell Mol Immunol.* Oct 2021;18(10):2307-2312. doi:10.1038/s41423-021-00743-3

159. Coulon P-G, Prakash S, Dhanushkodi NR, et al. High frequencies of alpha common cold coronavirus/SARS-CoV-2 cross-reactive functional CD4+ and CD8+ memory T cells are associated with protection from symptomatic and fatal SARS-CoV-2 infections in unvaccinated COVID-19 patients. Original Research. *Frontiers in Immunology*. 2024-March-28 2024;Volume 15 - 2024doi:10.3389/fimmu.2024.1343716
160. Ramirez SI, Lopez PG, Faraji F, et al. Early antiviral CD4+ and CD8+ T cells are associated with upper airway clearance of SARS-CoV-2. *JCI Insight*. Dec 20 2024;9(24)doi:10.1172/jci.insight.186078
161. Nesamari R, Omondi MA, Baguma R, et al. Post-pandemic memory T cell response to SARS-CoV-2 is durable, broadly targeted, and cross-reactive to the hypermutated BA.2.86 variant. *Cell Host & Microbe*. 2024;32(2):162-169.e3. doi:10.1016/j.chom.2023.12.003
162. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*. Mar 11 2022;375(6585):1122-1127. doi:10.1126/science.abm8108
163. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*. Sep 4 2020;369(6508)doi:10.1126/science.abc8511
164. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. Nov 12 2020;183(4):996-1012.e19. doi:10.1016/j.cell.2020.09.038
165. Schnizer C, Andreas N, Vivas W, et al. Persistent humoral and CD4(+) T(H) cell immunity after mild SARS-COV-2 infection-The CoNAN long-term study. *Front Immunol*. 2022;13:1095129. doi:10.3389/fimmu.2022.1095129
166. Safont G, Latorre I, Villar-Hernández R, et al. Measuring T-Cell Responses against SARS-CoV-2 Is of Utility for Disease and Vaccination Management. *J Clin Med*. Aug 30 2022;11(17)doi:10.3390/jcm11175103
167. Nelson RW, Chen Y, Venezia OL, et al. SARS-CoV-2 epitope-specific CD4(+) memory T cell responses across COVID-19 disease severity and

antibody durability. *Sci Immunol.* Jul 22 2022;7(73):eabl9464. doi:10.1126/sciimmunol.abl9464

168. Barnett B, Kryczek I, Cheng P, Zou W, Curiel TJ. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol.* Dec 2005;54(6):369-77. doi:10.1111/j.1600-0897.2005.00330.x

169. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature.* 2020/08/01 2020;584(7821):457-462. doi:10.1038/s41586-020-2550-z

170. Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev.* Apr 2008;222:101-16. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00614.x

171. Li J, Huang H, Xie R, Yang R, Wang H, Wan L. Immunosuppressive mechanisms and therapeutic targeting of regulatory T cells in ovarian cancer. *Front Immunol.* 2025;16:1631226. doi:10.3389/fimmu.2025.1631226

6. Erklärung zum Eigenanteil und Veröffentlichungen

Diese Dissertation wurde in der Abteilung für Peptid-basierte Immuntherapie unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Juliane S. Walz und Dr. rer. nat. Annika Nelde durchgeführt. Die experimentelle Datenerhebung war vor Beginn der Dissertation bereits abgeschlossen. Das Projekt um die Dissertation wurde gemeinsam mit Frau Prof. Dr. Walz und Frau Dr. Nelde entworfen. Im Rahmen des Projektes wurden retrospektiv klinische Parameter und deren Korrelation mit der T-Zell-basierten Immunantwort bei gynäkologischen Tumorerkrankungen und einer milden bis moderaten SARS-CoV-2-Infektion ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in zwei wissenschaftlichen Artikeln nach einem Peer Review-Verfahren veröffentlicht. Die vorliegende Arbeit wurde als kumulative Dissertation aus folgenden Publikationen erstellt:

1. Tegeler CM, Scheid J, Rammensee H-G, Salih HR, Walz JS, Heitmann JS, Nelde A. HLA-DR Presentation of the Tumor Antigen MSLN Associates with Clinical Outcome of Ovarian Cancer Patients. *Cancers*. 2022; 14(9):2260. <https://doi.org/10.3390/cancers14092260>
2. Tegeler CM, Bilich T, Maringer Y, Salih HR, Walz JS, Nelde A, Heitmann JS. Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort. *Int J Infect Dis*. 2022;120:187-195. doi:10.1016/j.ijid.2022.04.019

Der Beitrag der Koautoren an den Publikation ist unter 6.1 und 6.2 für jede Publikation ausführlich dargestellt.

Ein Teil der Daten wurde zudem bereits in weiteren Arbeiten publiziert:

1. Nelde A, Bilich T, Heitmann JS, Maringer Y, Salih HR, Roerden M, Lübke M, Bauer J, Rieth J, Wacker M, Peter A, Hörber S, Traenkle B, Kaiser PD, Rothbauer U, Becker M, Junker D, Krause G, Strengert M, Schneiderhan-Marra N, Templin MF, Joos TO, Kowalewski DJ, Stos-Zweifel V, Fehr M, Rabsteyn A, Mirakaj V, Karbach J, Jäger E, Graf M, Gruber LC, Rachfalski D, Preuß B, Hagelstein I, Märklin M, Bakchoul T, Gouttefangeas C, Kohlbacher O, Klein R, Stevanović S, Rammensee HG, Walz JS. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol.* 2021 Jan;22(1):74-85.
2. Schuster H, Peper JK, Bösmüller HC, Röhle K, Backert L, Bilich T, Ney B, Löffler MW, Kowalewski DJ, Trautwein N, Rabsteyn A, Engler T, Braun S, Haen SP, Walz JS, Schmid-Horch B, Brucker SY, Wallwiener D, Kohlbacher O, Fend F, Rammensee HG, Stevanović S, Staebler A, Wagner P. The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Nov 14;114(46):E9942-E9951. doi: 10.1073/pnas.1707658114. Epub 2017 Nov 1. PMID: 29093164; PMCID: PMC5699044.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 16.02.2026

6.1 HLA-DR Presentation of the Tumor Antigen MSLN Associates with Clinical Outcome of Ovarian Cancer Patients

Tegeler CM, Scheid J, Rammensee H-G, Salih HR, Walz JS, Heitmann JS, Nelde A.

HLA-DR Presentation of the Tumor Antigen MSLN Associates with Clinical Outcome of Ovarian Cancer Patients. *Cancers*. 2022; 14(9):2260. <https://doi.org/10.3390/cancers14092260>

The authors contributed to the publications as indicated in the following table (indicated in %):

Contribution	Tegeler CM	Scheid J	Rammensee HG	Salih HR	Walz JS	Heitmann JS	Nelde A
Research concept					50		50
Selection of methods	50					25	25
Recruitment of patients							
Data acquisition	50	10				20	20
Data analysis Interpretation of results	75	5				10	10
Writing of Manuscript	70		5	5	5	5	10

6.2 Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort

Tegeler CM, Bilich T, Maringer Y, Salih HR, Walz JS, Nelde A, Heitmann JS. Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort. *Int J Infect Dis.* 2022;120:187-195. doi:10.1016/j.ijid.2022.04.019

The authors contributed to the publications as indicated in the following table (indicated in %):

Contribution	Tegeler CM	Bilich T	Maringer Y	Salih HR	Walz JS	Nelde A	Heitmann JS
Research concept	5			20	20	25	30
Selection of methods	50					25	25
Recruitment of patients							
Data acquisition	40	20	20			10	10
Data analysis Interpretation of results	60					20	20
Writing of Manuscript	75			5	5	5	10

7. Anhang

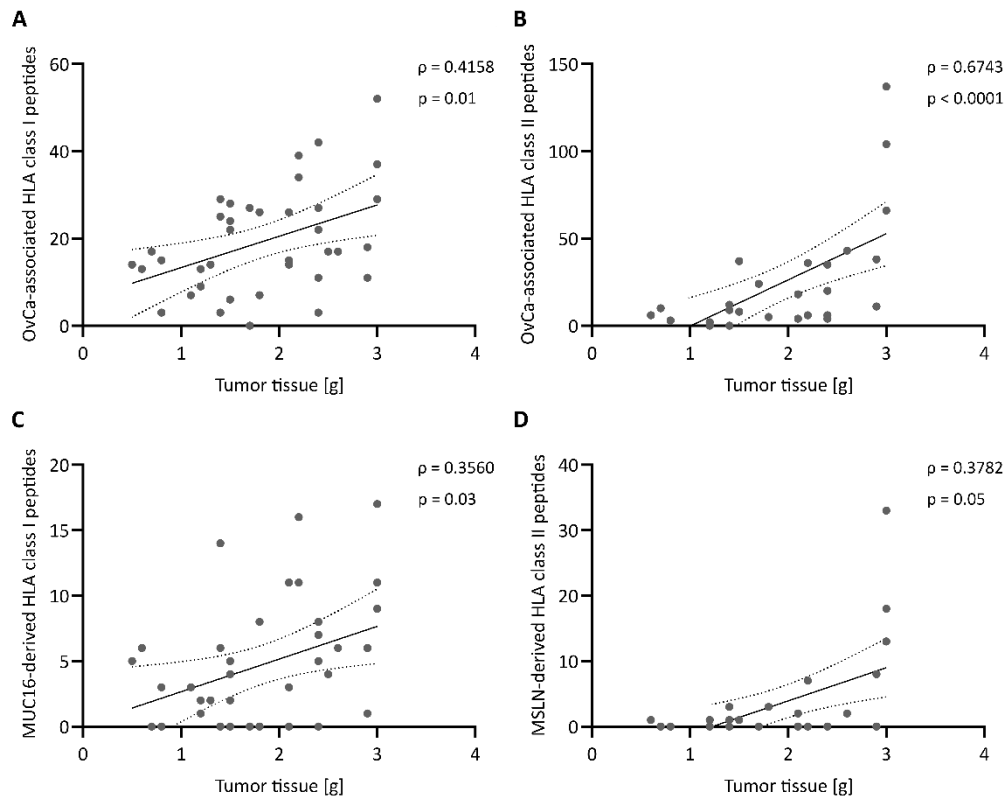
Supplementary Materials

for

**HLA-DR presentation of the tumor antigen MSLN associates
with clinical outcome of ovarian cancer patients**

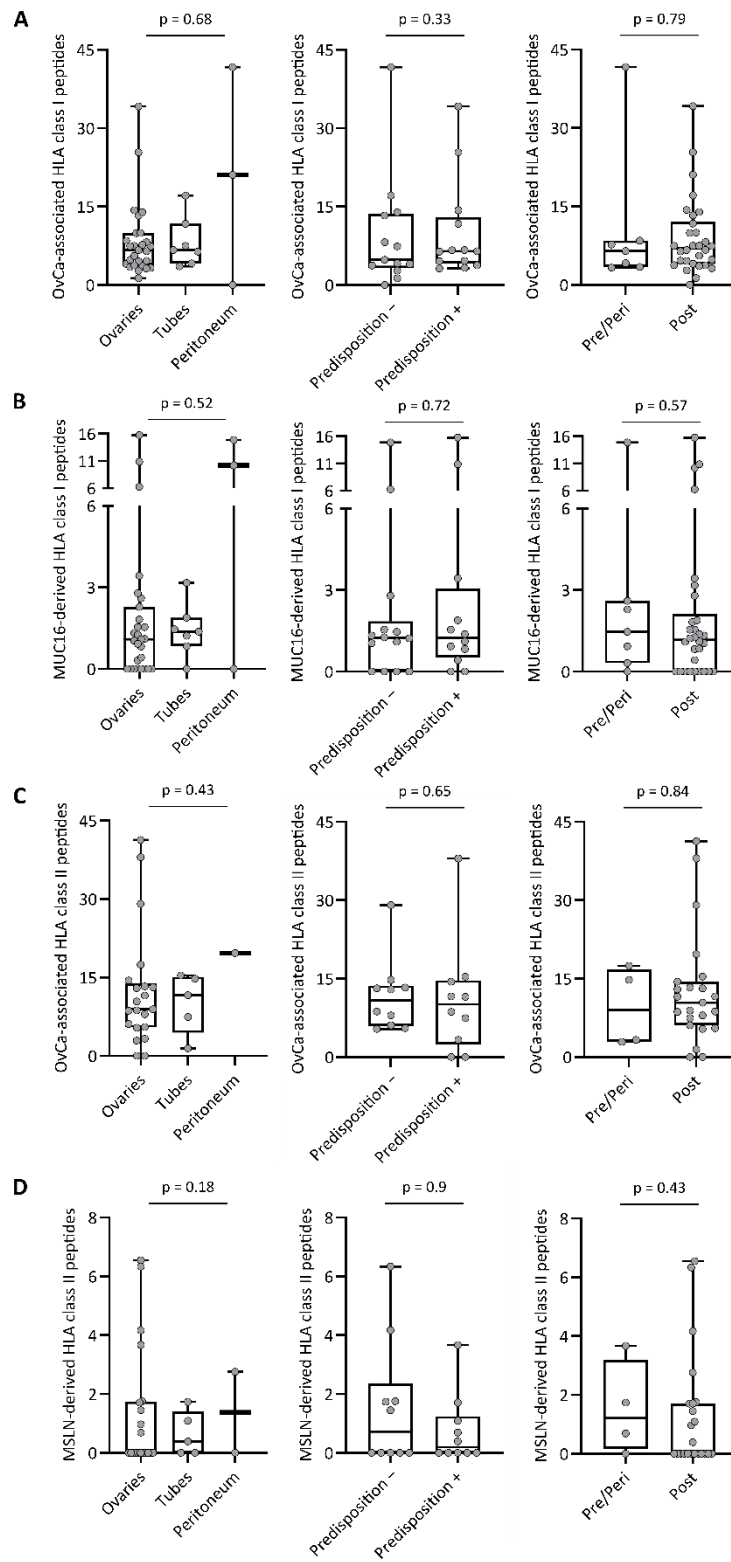
Christian M. Tegeler, Jonas Scheid, Hans-Georg Rammensee, Helmut R. Salih,
Juliane S. Walz, Jonas S. Heitmann*, Annika Nelde

*Correspondence to: jonas.heitmann@med.uni-tuebingen.de



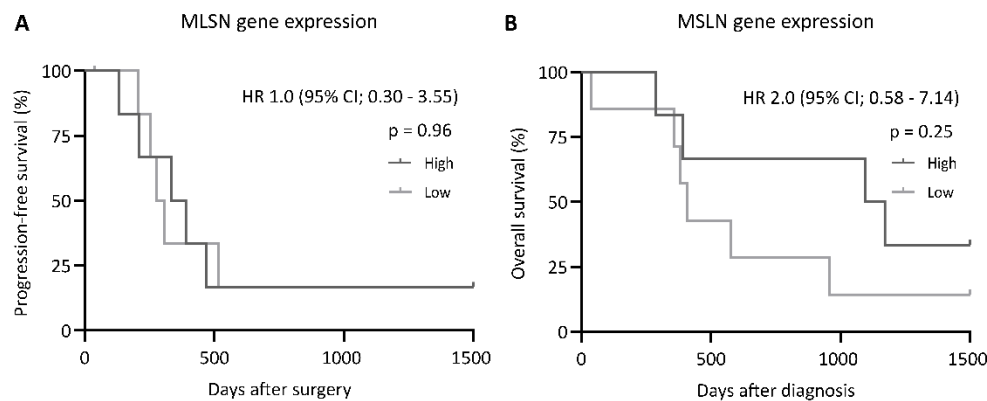
Supplementary Figure 1. Correlation between amount of tumor tissue and peptide identifications within the immunopeptidome.

Correlation analysis of tumor tissue quantity used for immunopeptidome analysis to the number of identified (A) OvCa-associated and (B) MUC16-derived HLA class I-presented peptides as well as (C) OvCa-associated and (D) MSLN-derived HLA class II-presented peptides in the immunopeptidome of OvCa patients ($n = 37$ for HLA class I, $n = 27$ for HLA class II). Dots represent data from individual patients. Linear regression line with 95% confidence level (dotted lines), Spearman's rho (ρ) and p-value.



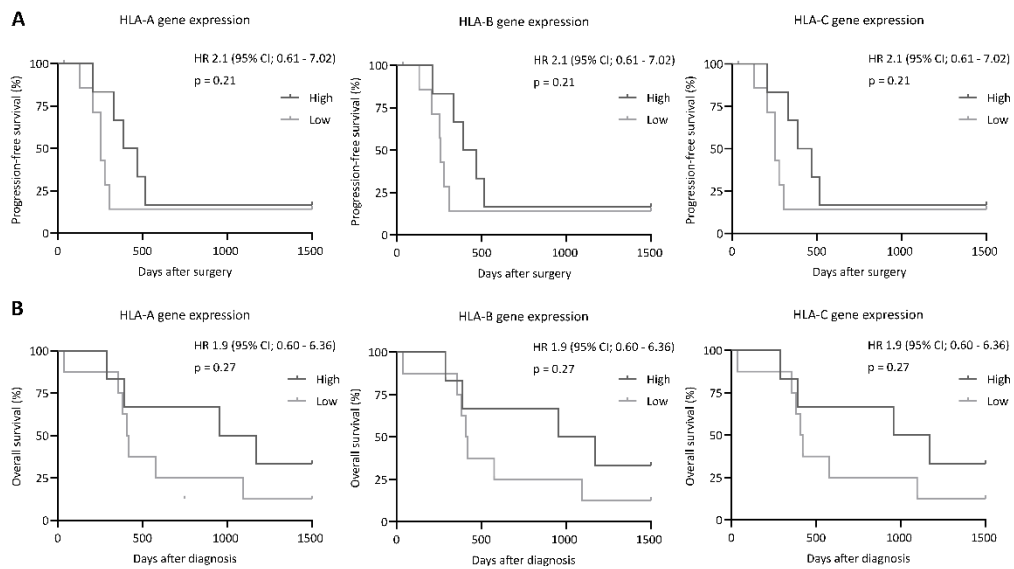
Supplementary Figure 2. HLA presentation of tumor-associated antigenic peptides according to demographics and tumor characteristics.

Number of (A) OvCa-associated and (B) MUC16-derived HLA class I- as well as (C) OvCa-associated and (D) MSLN-derived HLA class II-presented peptides identified by immunopeptidome analysis of primary tumor tissue in relation to demographics and tumor characteristics, including localization of primary tumor (left panels), menopausal status (mid panel), and familial predisposition (right panel). Dots represent data from individual patients. Boxes represent median and 25th to 75th percentiles, whiskers are minimum to maximum, Mann-Whitney U-test. Abbreviations: tubes, fallopian tubes; pre/peri, pre-menopausal/peri-menopausal; post, post-menopausal; predisposition –, no knowledge of other cancer cases in family; predisposition +, other cases of cancer in family; p, p-value.



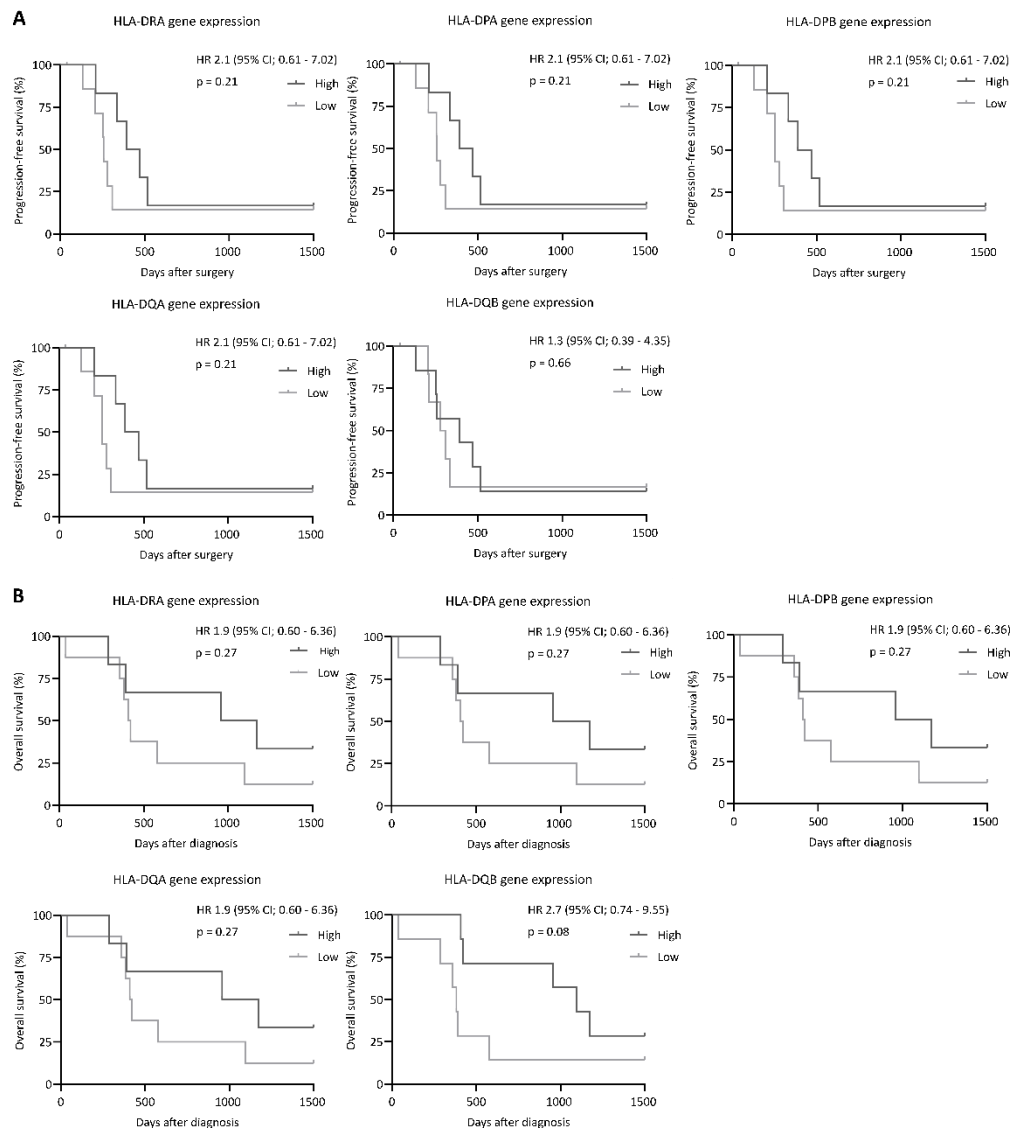
Supplementary Figure 3. Impact of MSLN gene expression on the clinical outcomes.

Impact of MSLN gene expression on (A) progression-free and (B) overall survival according to MSLN gene expression in the patients' tumor. Kaplan-Meier analysis, log-rank test. Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; p, p-value.



Supplementary Figure 4. Impact of HLA class I gene expression on clinical outcomes.

Impact of HLA class I gene expression on (A) progression-free and (B) overall survival according to HLA class I (HLA-A, -B, and -C) gene expression in the patients' tumor. Kaplan-Meier analysis, log-rank test. Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; p, p-value.



Supplementary Figure 5. Impact of HLA class II gene expression on clinical outcomes.

Impact of HLA class II gene expression on (A) progression-free and (B) overall survival according to HLA class II (HLA-DRA, -DPA, -DPB, -DQA, and -DQB) gene expression in the patients' tumor. Kaplan-Meier analysis, log-rank test. Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; p, p-value.

Supplementary Table 1: HLA class I- and HLA class II-restricted OvCa-associated antigens.

OvCa-associated HLA class I-restricted antigens	OvCa-associated HLA class II-restricted antigens
MUC16, EYA2, CEBPB, CRABP2, CTDSP2, CTDSL, CRABP1, S100A13, CTDSP1, AASDHPPT, LGALS1, IDO1, MMP11, TSEN34, SLC34A2, COL1A1, DNASE1, ID4, EFHC1, EPS8L1, MYOF, MANBA, ZNF217, PTTG1, PTPRF, FOLR1, FEN1, LAMC2, ATP13A5, ATP13A4, PSMG3, IFT57, BFAR, IFT172, KLK10, CXCL13, GIGYF1, DMD, P4HA1, BCAT1, UBXN1, PEG10, MFN1, SULF1, TMEM158, GOLGA1, ABHD1, SPON1, SETD8, NLRP2, DDIT4, PTTG2, PTGFRN, PPIE, FNDC3A, LRC42	MSLN, PTPRS, UBB, UBC, RL40, SQSTM, AGRG2, FPRP, PTPRF, ITB5, NGAL, FAT1, PLEC, RCN1, LAMA3, FNDC1, HTRA1, SYFB, FBLN4, PRDX2, TIG1, CXAR, FMOD, DREB, DPPA2, MUC16, NEO1, CSTN3

HLA class I- and HLA class II-restricted ovarian cancer (OvCa)-associated antigens identified previously (Schuster et al. PNAS 2015) to be exclusively and high frequently presented in OvCa.

Supplementary Materials

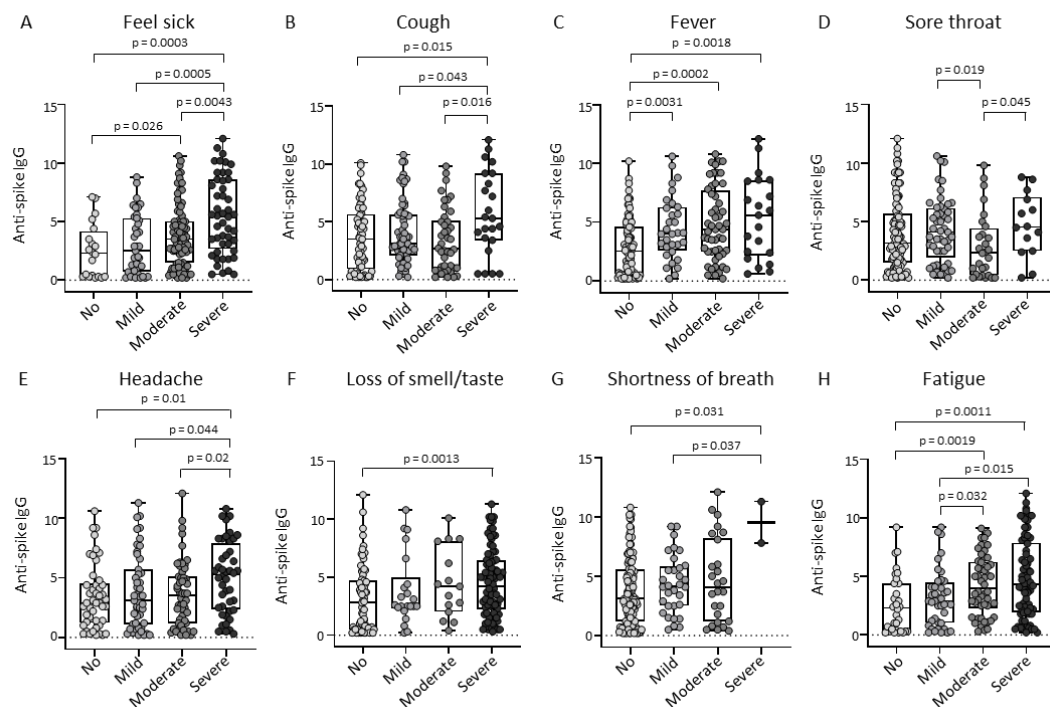
for

Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort

Christian M. Tegeler, Tatjana Bilich, Yacine Maringer, Helmut R. Salih, Juliane S. Walz, Annika Nelde*, Jonas S. Heitmann

*Correspondence to: annika.nelde@uni-tuebingen.de

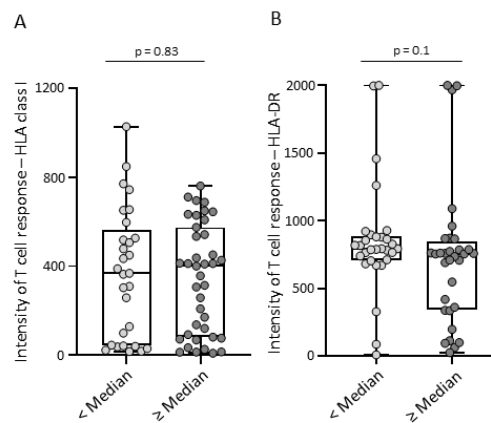
Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 1. Symptom severity and antibody response in COVID-19.

Anti-spike antibody (Ab) response (Euroline Anti-SARS-CoV-2®) assessed in COVID-19 convalescent donors (n = 193) with different COVID-19 symptoms grouped according to respective symptom severities. Symptoms during COVID-19, *i.e.* (A) feel sick, (B) cough, (C) fever, (D) sore throat, (E) headache, (F) loss of smell or taste, (G) shortness of breath, and (H) fatigue were assessed by questionnaire and grouped according to self-reported severity (no, mild, moderate, severe symptoms). p: p-value. Brackets mark significant p-values between two categories (Kruskal-Wallis test with Dunn's correction). Box plots with min/max whiskers.

Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 2. Intensity of SARS-CoV-2-specific T cell response in COVID-19 in relation to different time points.

Intensity of SARS-CoV-2-specific (A) HLA class I and (B) HLA-DR T cell response in COVID-19 convalescent donors depicted for < Median and ≥ Median of time from positive swab test to sample collection (n = 68 for HLA class I, n = 78 for HLA-DR). p: p-value. Continues lines indicate p-values between all categories (Mann-Whitney U-test). Box plots with min/max whiskers.

8. Danksagung

lucundi acti labores

Die Entstehung dieser Dissertation war von einigen Herausforderungen geprägt. Rückblickend durfte ich in dieser Zeit nicht nur fachlich, sondern auch persönlich viel lernen. Umso dankbarer bin ich, diesen Weg bis zum Ende gegangen zu sein. Begleitet wurde ich dabei von vielen Menschen, die mich unterstützt, bestärkt und inspiriert haben. Für all die Gespräche, die Unterstützung und die Empathie möchte ich mich von Herzen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Juliane S. Walz, sowie Frau Dr. rer. nat. Annika Nelde für die hervorragende Betreuung. Erst die konzeptionelle Weitsicht, das Engagement und die kontinuierliche Unterstützung haben diese Arbeit möglich gemacht und meinen wissenschaftlichen Weg entscheidend geprägt.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Helmut Salih und Herrn PD Dr. med. Jonas Heitmann bedanken, die mein Interesse an der Verbindung klinischer Tätigkeit mit translationaler Forschung nachhaltig geprägt und mich – tags wie nachts – klinisch gefordert und gefördert haben. Herrn Dr. med. Christopher Hackenbruch danke ich ebenfalls für seine stets verlässliche fachliche Unterstützung, insbesondere in den Momenten, in denen es ein Feuer zu löschen galt.

Ebenso danke ich allen Koautorinnen und Koautoren sowie den zahlreichen Kolleginnen und Kollegen aus Labor und Klinik, die mich bei diesem Projekt begleitet, unterstützt und inspiriert haben.

Ein spezieller Dank gilt meinen Bundesbrüdern UHB und Snowden für lange Abende, ehrliche Gespräche, niemals fachbezogene Diskussionen und den gemeinsamen Versuch, zwischendurch die Welt ein wenig besser zu denken.

Zu guter Letzt danke ich von Herzen meiner Frau, meinen Kindern und meinen Eltern für ihre unablässige Unterstützung auf meinem Weg, ihre Geduld und ihren Rückhalt während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit.