

Aus dem Berlin-Brandenburg Centrum für Regenerative Therapien
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**ALTERSABHÄNGIGE VERÄNDERUNGEN DER
CD4⁺ T-ZELL-ANTWORT NACH
GELBFIEBERIMPfung**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Nora Mälzer

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	3
1 ABKÜRZUNGEN	6
2 EINLEITUNG	8
2.1 DAS IMMUNSYSTEM	8
2.2 STEIGENDE LEBENSERWARTUNG UND IMMUNOLOGISCHE KOMPLIKATIONEN	8
2.3 IMPFSTUDIEN ALS MÖGLICHKEIT DIE FUNKTIONALITÄT DES IMMUNSYSTEMS ZU UNTERSUCHEN	9
2.4 IMPFEN IM HÖHEREN LEBENSALTER	10
2.5 IMPFUNG GEGEN GELBFIEBER ALS MODELL FÜR EINEN ERSTKONTAKT MIT EINEM VIRALEN PATHOGEN	11
2.6 BEURTEILUNG DER QUALITÄT EINER IMPFANTWORT	13
2.7 CD4 ⁺ T ZELLEN UND IMPFUNG	14
2.8 CD4 ⁺ T-ZELLENTWICKLUNG	14
2.9 <i>RECENT THYMIC EMIGRANTS</i> UND HOMÖOSTATISCHE PROLIFERATION	15
2.10 AKTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON NAIVEN CD4 ⁺ T ZELLEN	17
2.11 POLARISATION VON CD4 ⁺ T ZELLEN	19
2.12 HELFERFUNKTION FÜR B ZELLEN	21
2.13 EINFLUSS VON CD4 ⁺ T ZELLEN AUF DIE CD8 ⁺ T ZELLANTWORT	22
3 AUSBLICK FÜR DIE ARBEIT	24
4 METHODIK	25
4.1 TECHNISCHE LABORAUSSTATTUNG	25
4.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	25
4.3 PUFFER	26
4.4 CHEMIKALIEN UND ALLGEMEINE REAGENZIEN	27
4.5 AUSWAHL DER PROBANDENKOHORTE	28
4.6 STUDIENABLAUF – BLUTENTNAHMEN UND IMPFUNG	29
4.7 DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION ZUR ANREICHERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS DEM PERIPHEREN BLUT	30
4.8 <i>IN-VITRO</i> -KURZZEITSTIMULATION ZUR IDENTIFIKATION ANTIGENSPEZIFISCHER CD4 ⁺ T-ZELLEN	31
4.9 MULTIDIMENSIONALE ZELLANALYSE IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	32
4.10 MEHRFARBENPANELS ZUR CHARAKTERISIERUNG DER CD4 ⁺ T ZELLANTWORT	36
4.11 FÄRBUNG VON OBERFLÄCHENMERKMALEN	41
4.12 LEBEND-TOT-DISKRIMINATION	42
4.13 ZELLFIXIERUNG UND –PERMEABILISIERUNG	42
4.14 INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG	43
4.15 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ZELLZÄHLUNG	43
4.16 MESSUNG DER VIRUSLAST DURCH RT-QPCR	44
4.17 INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ ZUM NACHWEIS GELBFIEBER-SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER	44
4.18 PLAQUE-REDUKTIONS-NEUTRALISATIONSTEST (PRNT90)	44
4.19 INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPER GEGEN FLAVIVIREN VOR IMPFUNG	45
4.20 DATENANALYSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	45

5	ERGEBNISSE	47
5.1	YFV-17D-SERUMVIRÄMIE	47
5.2	NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER	49
5.3	YFV-17D-SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER-ANTWORT (IGM UND IGG)	51
5.4	ABSOLUTE CD4 ⁺ T ZELLZAHLEN IM PERIPHEREN BLUT	53
5.5	<i>RECENT THYMIC EMIGRANTS</i>	55
5.6	OBERFLÄCHEN-PHÄNOTYPISIERUNG VON NAIVEN UND GEDÄCHTNIS- CD4 ⁺ T ZELLPOPULATIONEN IM VERLAUF	57
5.7	<i>EX-VIVO</i> -IDENTIFIKATION VON YFV-17D-SPEZIFISCHEN CD4 ⁺ T ZELLEN	60
5.8	ZYTOKINPRODUKTION DURCH YFV-17D-SPEZIFISCHER CD4 ⁺ T ZELLEN NACH <i>IN-VITRO</i> -KURZZEITSTIMULATION	63
5.9	DIE GELBFIEBER-SPEZIFISCHE CD4 ⁺ T-ZELLANTWORT UND NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER IM LANGZEITVERLAUF	67
5.10	POLYFUNKTIONALITÄT YFV-17D-SPEZIFISCHER CD4 ⁺ T ZELLEN	71
6	DISKUSSION	74
6.1	SERUMVIRÄMIE	75
6.2	ANTI-KÖRPERANTWORT	76
6.3	ABSOLUTE ZELLZAHLEN	77
6.4	<i>RECENT THYMIC EMIGRANTS</i>	78
6.5	NAIVE UND GEDÄCHTNIS-T-ZELL-SUBPOPULATIONEN	79
6.6	DIE <i>EX-VIVO</i> -IDENTIFIKATION ANTIGENSPEZIFISCHER CD4 ⁺ T ZELLEN	80
6.7	<i>IN VITRO</i> STIMULATION	81
6.8	DIE GELBFIEBER-SPEZIFISCHE CD4 ⁺ T-ZELLANTWORT UND NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER IM LANGZEITVERLAUF	83
6.9	POLYFUNKTIONALITÄT DER T-HELPERZELLANTWORT	84
6.10	FAZIT UND AUSBLICK	86
7	LEBENS LAUF	88
8	DANKSAGUNG	89
9	LITERATURVERZEICHNIS	90
10	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	97

ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT

Das menschliche Immunsystem unterliegt komplexen, altersassoziierten Veränderungen, die als Grundlage für die im höheren Lebensalter steigende Inzidenz von Infektions-, Tumor- und Autoimmunerkrankungen diskutiert werden.

Der Gelbfieberimpfstoff YFV-17D enthält attenuiertes Gelbfieber-Virus und erzeugt nach Impfung eine Virusinfektion im menschlichen Organismus. So wird die hervorgerufene antivirale Immunantwort dem Untersucher zugänglich. In der hier vorliegenden Studie wurde die Immunantwort nach Gelbfieber-Erstimpfung bei 24 Probanden in zwei altersgetrennten Teilnehmerkohorten (23-28 Jahre und 55-68 Jahre) mithilfe von Analysen der induzierten Impfvirämie und Antikörperantwort im Serum sowie hochdimensionaler Durchflusszytometrie charakterisiert.

Den Fokus bildeten hier der Phänotyp und die Funktionalität des $CD4^+$ T Zellkompartiments vor und im Verlauf nach Impfung. $CD4^+$ T Zellen üben einen wichtigen koordinativen Einfluss auf verschiedene Komponenten des Immunsystems aus: So unterstützen sie die Antikörperproduktion durch B Zellen, die Aktivität von zytotoxischen $CD8^+$ T Zellen und agieren auch regulatorisch, um Immunantworten effizient zu begrenzen. $CD4^+$ T Zellen durchlaufen entscheidende Selektionsschritte im Thymus, einem lymphatischen Organ, dessen Funktionalität mit zunehmendem Lebensalter abnimmt. Dies geht mit einem schrumpfenden Angebot und einer eingeschränkten Diversität neu gebildeter T Zellen einher mit bislang unzureichend geklärtem Einfluss auf die Erstantwort gegen ein neues Pathogen.

Die serologische Analyse der YFV-17D-Virämie mittels RT-qPCR zeigte, dass ältere Probanden den Höhepunkt der Virämie signifikant später erreichten, also vermutlich schlechter die Replikation des Impfvirus eingrenzen konnten. Eine Verzögerung zeigte sich ebenfalls in der Bildung Gelbfieber-spezifischer neutralisierender Antikörper mit niedrigeren Titern der älteren Gruppe an Tag 14.

Die Zusammensetzung des peripheren T-Zellpools vor Impfung wurde mithilfe von Zelloberflächenmarkern bestimmt. Hier zeigte sich, dass ältere Personen über signifikant weniger naive $CD4^+$ T Zellen verfügten und insbesondere der Anteil der kürzlich dem

Thymus entstammenden CD4⁺ T Zellen verringert war. Dies korrelierte mit niedrigeren Zahlen Gelbfieber-spezifischer CD4⁺ T Zellen in der Expansionsphase der Antwort. Probanden, mit niedrigeren Frequenzen dieser aktivierten Zellen, zeigten einen späteren Höhepunkt ihrer Serumvirämie und niedrigere Titer neutralisierender Antikörper an Tag 14. Das Zytokinprofil der mittels CD40L identifizierten YFV-17D-spezifischen CD4⁺ T Zellen wurde nach *in vitro* Impfstoff-Stimulation untersucht und zeigte eine robuste, polyfunktionale Th₁-dominierte Antwort ohne signifikante Differenzen zwischen beiden Altersgruppen.

Alle Probanden entwickelten ungeachtet ihres Alters bis Tag 28 eine als protektiv einzustufende Impfantwort, welche auch bis zum Folgetermin nach 20-35 Monaten weitestgehend stabil blieb. Altersassoziierte Einschränkungen der Immunkompetenz ließen sich also vorrangig in der Akutphase der Impfantwort nachweisen. Dies könnte zusammengefasst als Folge des bei älteren Menschen verkleinerten Repertoires naiver CD4⁺ T Zellen bei erhaltener Funktionalität der einzelnen T Zelle interpretiert werden.

The human immune system is subject to complex, age-associated changes, which are being discussed as causes for the increasing incidence of infectious, malignant and autoimmune diseases at higher age.

The Yellow Fever vaccine YFV-17D contains attenuated Yellow fever virus and induces upon vaccination a viral infection in the human organism. Thus, an antiviral immune response becomes accessible to the investigator. In this study, the immune responses after first-time YFV-17D-vaccination was monitored by serological analyses of serum viremia and antibody titers as well as multidimensional flow cytometry (FACS) in 24 healthy volunteers belonging to two age-separated cohorts (23-28 years and 55-68 years).

A focus was set on the phenotype and functionality of the CD4⁺ T-cell-compartment before and after vaccination. CD4⁺ T Cells act as important coordinators of various arms of the immune system, supporting antibody production by B cells, enhancing the performance of cytotoxic CD8⁺ T cells and furthermore regulating immune responses to an optimal level. During their formation, CD4⁺ T cells pass through selection in the thymus, a lymphoid organ losing functionality with increasing age. This involves a shrinking and less diverse

pool of newly formed T cells with so far unclear impact on the primary response against a new pathogen.

The serological analysis of YFV-17D-viremia by RT-qPCR showed, that elderly participants reached their maximum of viremia significantly later, suggesting an impaired capability to control viral replication. A delay was also observed in the production of Yellow-fever-specific neutralizing antibodies in elderly donors with lower median titers at day 14.

The composition of the peripheral CD4⁺ T-cell-pool prior to vaccination was assessed with the help of cell surface markers. Elderly donors possessed significantly less naive CD4⁺ T cells with a particularly strong reduction in cells having recently emigrated from the thymus. These lower numbers correlated with fewer Yellow-fever-specific CD4⁺ T cells during expansion-phase of the response. Donors, displaying smaller numbers of this activated subset, showed a delayed peak in serum -viremia and lower titers of neutralizing antibodies at day 14.

The cytokine-profile of YFV-17D-specific CD4⁺ T cells, identified according to their surface-expression of CD40L after *in vitro* vaccine-stimulation, showed a robust, polyfunctional Th₁-dominated immune response without significant deviations between age groups.

Until day 28, all donors displayed protective immune responses regardless their age, which remained stable in terms of antigen-specific CD4⁺ T cells and antibody titers also until the follow up at 20-35 months after vaccination. Age-related impairments of the immune competence could therefore be observed predominantly in the acute phase of the immune response. The initial delay suggests a skewed repertoire of naive CD4⁺ T cells in the elderly with preserved functionality of the individual cell.

1 ABKÜRZUNGEN

α	anti
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanine
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMV	Zytomegalievirus
Cy5	Indopentamethyncyanine
DAPI	4',6'-Diamino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid
DC	Dendritische Zelle
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	Forkhead box P3
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Zentrifugalkraft: $g = 9.81 \text{ m/s}^2$
GE	<i>Genomic Equivalent</i>
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IIFA	Indirekter Immunfluoreszenzassay
IL	Interleukin
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	Natürliche Killerzelle
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROR γ T	Retinoic acid-related Orphan Receptor γ T
RT	Raumtemperatur
SAE	<i>Serious Adverse Event</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{CM}	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
T _{EM}	Effektor Gedächtnis-T-Zelle
TGF	<i>Tumor Growth Faktor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Factor
VV	Vaccinia Virus
YFV	Gelbfieber-Virus (<i>Yellow Fever Virus</i>)
YEL-AND	<i>Yellow Fever Vaccine-associated Neurotropic Disease</i>
YEL-AVD	<i>Yellow Fever Vaccine-associated Viscerotropic Disease</i>

2 EINLEITUNG

2.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem dient der Erkennung und Beseitigung eindringender Krankheitserreger (Pathogene) sowie von im Organismus entstandenen pathologisch veränderten Zellen. Für die Ausübung dieser Abwehrfunktionen bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz verfügt es über eine Vielzahl eng ineinander greifender Mechanismen, die sich im Rahmen der Evolution über viele Millionen von Jahren hinweg entwickelt haben.

2.2 Steigende Lebenserwartung und immunologische Komplikationen

Die Lebenserwartung des Menschen hat sich dank wissenschaftlicher, technologischer und sozioökonomischer Fortschritte innerhalb der letzten 100 Jahre annähernd verdoppelt und liegt heute bei Geburt in Europa bei durchschnittlich 75,4 Jahren. Im Jahr 2011 lag der Anteil der über 60-Jährigen in Europa bei einem Fünftel der Bevölkerung, für das Jahr 2050 wird bereits ein Drittel prognostiziert (United Nations 2011). Ein besseres Verständnis der biologischen Veränderungen im menschlichen Alterungsprozesses ist unerlässlich und Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsarbeiten.

Auch das Immunsystem unterliegt altersbedingten Veränderungen. Eine zunehmende Anfälligkeit für Infektionserkrankungen im fortgeschrittenen Lebensalter sowie ein erhöhter Anteil komplizierter Krankheitsverläufe, die einen Krankenhausaufenthalt erforderlich machen oder zum Tod führen, weisen darauf hin. So entfallen 80-90% der Todesfälle nach saisonaler Influenzainfektion auf Personen über 65 Jahren (Thompson, Shay et al. 2003). Auch die Zahl von Krebserkrankungen nimmt im höheren Lebensalter zu (Berger, Savvides et al. 2006). So ist Lungenkrebs nach Herz- und Gefäßerkrankungen bei Personen über 65 Jahren führende die häufigste Todesursache in Europa mit 200 Todesfällen/100.000 Einwohner (Buchow, Cayotte et al. 2012). Ebenfalls als immunologische Fehlregulation kann die im Alter steigende Inzidenz von Autoimmunerkrankungen gewertet werden. So liegt das mediane Lebensalter bei Diagnosestellung von rheumatoider Arthritis,

Dermatomyositis, systemischen Vaskulitiden, granulomatöse Polyangitis und Sjögren-Syndrom bei über 50 Jahren (Cooper und Stroehla 2003).

2.3 Impfstudien als Möglichkeit die Funktionalität des Immunsystems zu untersuchen

Sollen immunologische Prozesse im menschlichen Organismus analysiert werden, sieht sich der Untersucher im Vergleich zum Tierversuch mit experimentellen Einschränkungen konfrontiert. Das Durchführen von Infektionsversuchen, um erregerspezifische Immunantworten unter kontrollierten Bedingungen analysieren zu können, ist aus ethischer Sicht nicht zumeist nicht vertretbar. So kann alternativ auf Personen zurückgegriffen werden, die eine Infektion auf natürlichem Weg erworben haben. Hier gestaltet sich jedoch eine Kontrolle der Studienbedingungen schwierig, da das Probandenkollektiv nur bedingt gewählt werden kann und der eigentliche Infektionszeitpunkt und -weg sowie die Erregerkonzentration häufig unbekannt bleiben.

Als eine experimentelle Option, Pathogen-spezifische Immunantworten auch im Menschen zu erforschen, haben sich daher Studien mit bereits zugelassenen Impfstoffen etabliert. Seit der Einführung des Pockenimpfstoffes durch Edward Jenner im Jahr 1796 werden Impfstoffe gegen eine Vielzahl unterschiedlicher bakterieller und viraler Krankheitserreger eingesetzt und stellen ein hocheffizientes Konzept zur Krankheitsprävention auf individueller und gesamtgesellschaftlicher Ebene dar. Die meisten verfügbaren Impfstoffe basieren auf dem Prinzip, das Immunsystem mit einem bestimmte, abgeschwächten Erreger oder einem seiner Bestandteile zu konfrontieren und so eine körpereigene, gegen das Pathogen gerichtete Immunantwort hervorzurufen ohne jedoch die eigentliche Erkrankung auszulösen. Die induzierte Immunantwort umfasst zumeist die Bildung protektiv wirkender, spezifischer Antikörper sowie das Entstehen sogenannter langlebiger Gedächtniszellen, die im Falle einer Infektion mit dem Wildtyp-Pathogen eine schützende Immunreaktion vermitteln können. Dieses Verfahren wird als aktive Immunisierung bezeichnet. Der Erreger kann hierbei entweder als Lebendimpfstoff in abgeschwächter, eingeschränkt teilungsfähiger Form verabreicht werden oder aber als Totimpfstoff vorliegen, der vollständig inaktivierte, vermehrungsunfähige Erreger oder Bestandteile

dieser enthält. Beide Verfahren der aktiven Immunisierung sind in der Lage, den Aufbau einer lang anhaltenden, im Falle von Lebendimpfstoffen über Jahrzehnte hinweg schützenden Immunkompetenz zu initiieren. Im Gegensatz hierzu löst eine passive Immunisierung, bei der gegen das Pathogen wirksame Antikörper direkt verabreicht werden, keine körpereigene, Erreger-gerichtete Antwort aus und ist nur in einem begrenzten Zeitraum vor dem Zerfall und Abbau der übertragenen Antikörper wirksam.

Im Kontext humanbiologischer Forschung bieten also insbesondere aktive Immunisierungen mit konventionell eingesetzten Impfstoffen eine interessante Möglichkeit, immunologische Prozesse *in vivo* zu untersuchen, also im lebendigen Gesamtorganismus, dessen Komplexität so berücksichtigt werden kann.

2.4 Impfen im höheren Lebensalter

Impfstoffe besitzen das Potential bei relativ geringen Kosten und begrenztem zeitlichen und personellen Aufwand Schutz vor potentiell kompliziert oder lebensbedrohlichen Infektionen zu bieten und sind daher auch für die wachsende Bevölkerungsgruppe höheren Lebensalters von hoher Relevanz.

Allerdings zeigten verschiedene Studien, dass der Impferfolg bei älteren Individuen eingeschränkt sein kann: Untersuchungen zur Immunantwort nach saisonaler Influenzaimpfung ergaben, dass in der Personengruppe der Über-60-jährigen nur zwei Drittel der Probanden nach Impfung einen protektiven, spezifischen Antikörpertiter ausbildeten. In der Probandengruppe unter 60 Jahren hingegen lag deren Anteil bei über 80% (Goodwin, Viboud et al. 2006). Die Ergebnisse dieser Übersichtsarbeit legen nahe, dass die Fähigkeit zum Aufbau einer schützenden Immunantwort altersbedingten Veränderungen unterliegt. Die Interpretation der zugrunde liegenden Studien gestaltet sich jedoch insofern schwierig, als dass ein Großteil der Studienpopulation aufgrund der weiten, natürlichen Verbreitung des Erregers sowie gegebenenfalls vormalig erhaltener Grippeimpfungen bereits vor Beginn über Influenza-spezifische Gedächtniszellen und Antikörper verfügt. So zeigten He und Kollegen dass die Zahl Influenza-spezifischer Gedächtnis-T-Helferzellen vor Impfung einen Einfluss auf die Größe der induzierten T-Zellantwort hat (He, Holmes et al. 2008). Eine Unterscheidung zwischen intrinsischen

biologischen Altersveränderungen und der Auswirkung eines unterschiedlich ausgeprägten immunologischen Gedächtnisses ist in diesem Modell demnach nur eingeschränkt möglich. Um also des Aspekt des Alterns des menschlichen Immunsystems möglichst gezielt im Rahmen einer Immunisierung untersuchen zu können, sollte idealerweise auf einen Impfstoff zurückgegriffen werden, für den die gewählte Studienpopulation immunologisch naiv ist, das heißt, weder in Kontakt mit dem Wildtyp-Erreger war noch eine Impfung erhalten hat. Hiermit verwandt ist der Aspekt der Kreuzreaktivität. Dies bezeichnet die gegen den neuen Erreger gerichtete Aktivierung des humoralen und zellulären Immunsystems aufgrund einer bestehenden Immunisierung gegen ähnlich strukturierte, aber nicht identischen Antigene. Bei der häufig untersuchten Grippe-Impfung stellt dies aufgrund der diversen Influenzastämme ein weiteres Problem in der Ergebnisinterpretation dar. Zuletzt wäre aus Sicht des Untersuchers eine ausreichend starke und möglichst umfassende Aktivierung des Immunsystems wünschenswert, wie es insbesondere bei Lebendimpfungen der Fall ist, sodass die induzierte Immunantwort experimentell gut erfasst werden kann und einer natürlich auftretenden Infektion möglichst nahe kommt.

2.5 Impfung gegen Gelbfieber als Modell für einen Erstkontakt mit einem viralen Pathogen

Die Impfung gegen das Gelbfieber-Virus (*Yellow Fever Virus*, YFV) ermöglicht die experimentell günstige Konstellation einer sicheren und hoch immunogenen Lebendimpfung gegen ein in Europa nicht verbreitetes Virus. Außer durch Impfung besitzen Individuen hier in der Regel also kein Gelbfieber-spezifisches immunologisches Gedächtnis und auch die Kreuzreaktivität zu anderen, hier natürlich vorkommenden Erregern ist eher gering. Ein weiterer positiver Aspekt zur Erforschung altersbedingter Veränderungen ist, dass sie in der Regel nur als Reiseimpfung verabreicht ist, es also möglich ist, immunologisch naive Probanden verschiedenen Lebensalters zu rekrutieren.

Die Impfung gegen das Gelbfieber-Virus wurde 1937 vom südafrikanischen Virologen Max Theiler (1899 – 1972) entwickelt. Das Gelbfieber-Virus ist ein 40-50nm großes, behülltes RNA-Virus mit positiver Polarität und gehört der Familie der *Flaviviridae* an. Es wird durch Stechmücken (*Aedes aegypti*) auf den Menschen übertragen und ist in den tropischen und

subtropischen Gebieten Afrikas und Südamerikas verbreitet. Weltweit erkranken jährlich 200.000 Personen an Gelbfieber mit einem letalen Verlauf in über einem Zehntel der Fälle (WHO 2011). Bei der milden Verlaufsform kommt es innerhalb einer Woche nach Infektion zu einem ersten Fieberanstieg, begleitet von unspezifischen Krankheitssymptomen wie Kopf- und Gliederschmerzen. 15% der Erkrankten erleiden einen komplizierten Krankheitsverlauf mit Ausbildung einer schweren Leberentzündung (Hepatitis), die sich mit dem Auftreten der namensgebenden Gelbsucht (Ikterus) und lebensbedrohlichen Störungen der Blutgerinnung manifestiert. Ein Fünftel der Betroffenen, die in dieses Stadium der Krankheit eintreten, verstirbt (Monath 2008).

Seit der offiziellen Einführung des Impfstoffs im Jahr 1944 wurden weltweit mehr als 600 Millionen Dosen verabreicht (Barrett and Teuwen 2009). Der eingesetzte Impfstamm YFV-17D unterscheidet sich vom Wildtyp Stamm Asibi nur geringfügig und wird in embryonisierten Hühnereiern attenuiert und vermehrt. Die einmalige Gabe führt bei über 95% der Geimpften innerhalb von 10 Tagen zu einer langjährig bestehenden Immunität (Lang, Zuckerman et al. 1999). Eine Auffrischimmunsisierung ist nach 10 Jahren empfohlen. Eine Studie, in der Seren von Gelbfieber-geimpften Soldaten untersucht wurden, konnten bei über 80% der Individuen auch noch 30 Jahre nach Impfung protektive Antikörpertiter nachgewiesen werden (Poland, Calisher et al. 1981). Eine weitere Besonderheit neben der außerordentlichen Immunogenität der YFV-17D Impfung besteht in der Ausbildung einer transienten Virämie mit dem Impfvirus, innerhalb der ersten Tage nach Impfung, die bei ca. 60% der erstmalig geimpften Personen im Serum mittels RT-PCR detektiert werden kann (Reinhardt, Jaspert et al. 1998). Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine Infektion von Körperzellen und dortige Virusreplikation erfolgt. Die Gelbfieberimpfung gilt im Allgemeinen als gut verträglich. Ein Fünftel der Geimpften erleidet leichte Nebenwirkungen wie Kopf- und Gliederschmerzen. Schwere Impfreaktionen gehen meist auf eine Überempfindlichkeit gegen im Impfstoff enthaltene Hühnereiweißbestandteile zurück. Jedoch wurden in der Literatur bis 2009 über 50 Einzelfallberichte veröffentlicht, in denen über das Auftreten von schweren und teilweise tödlich verlaufenden Krankheitsbildern nach Impfung (sog. *Serious Adverse Event*, SAE) berichtet wird. Hierbei konnte bei einem Teil der betroffenen Patienten der im Impfstoff enthaltene YFV-17D-Virusstamm entweder im zentralen Nervensystem oder systemisch im Blut oder anderen

Organen wie Leber und Nieren nachgewiesen werden. Die mit einer Enzephalitis und neurologischen Ausfällen einhergehende *Vaccine-associated neurotropic disease* (YEL-AND) tritt in den USA in einer Inzidenz von 0.8/100.000 Impfungen auf. Interessanterweise verdoppelt sich diese in der Altersgruppe 60-69 Jahren auf 1.8/100.000. Bei Über-70-jährigen liegt sie um das Vierfache erhöht bei 2.3/100.000. Bei systemischer Virusausbreitung ähnelte die Symptomatik dem hämorrhagischen Verlauf der Wildtyp-Infektion (YEL-AVD – *Vaccine associated viscerotropic disease*) mit einer Letalität von bis zu 40%. Die Frequenz für das Auftreten von YEL-AVD wird auf 0.3-0.5 Fälle/100.000 Impfdosen geschätzt (Gershman and Staples 2011). In mehreren Übersichtsarbeiten wurde neben einer vorbestehenden krankheits- oder medikationsbedingten Immunsuppression ein höheres Lebensalter bei Erstimpfung als Risikofaktor für das Auftreten eines SAEs angegeben, der zugrundeliegende Mechanismus konnte bis jetzt allerdings nicht geklärt werden (Khromava, Eidex et al. 2005; McMahon, Eidex et al. 2007). Die bislang einzige prospektive Studie zu altersabhängigen Unterschieden der Impfantwort nach YFV-17D-Impfung von Roukens und Kollegen zeigt, dass Probanden über 60 Jahren signifikant häufiger und eine verlängert messbare Serumvirämie entwickelten als jüngere Spender und zudem erst mit zeitlich verzögert spezifische Antikörper ausbildeten (Roukens, Soonawala et al. 2011). Die Gelbfieberimpfung bietet also eine exzellente Studiengrundlage für die Untersuchung des komplexen Immunoseneszenz-Prozesses. Mithilfe einer Erweiterung der experimentellen Methodik konnten wir in unserer Arbeit auch ein detailliertes Bild der zellulär vermittelten Immunkompetenz im Kontext einer antiviralen Erstantwort im höheren Lebensalter erlangen.

2.6 Beurteilung der Qualität einer Impfantwort

Um die Qualität einer Immunantwort nach Impfung beurteilen zu können, muss zunächst festgelegt werden, wie immunologischer „Schutz“ definiert werden soll. In einer Vielzahl bereits veröffentlichter Studien sowie in der klinischen Routinediagnostik wird hier zumeist auf das Vorhandensein und die Menge neutralisierender Antikörper zurückgegriffen. In einer mit Rhesusaffen durchgeführten Studie konnte für Gelbfieber ein enger Zusammenhang zwischen dem Serumtiter neutralisierender Antikörper und der Resistenz gegenüber Infektionen mit dem Wildtypvirus belegt werden (Mason, Tauraso et al. 1973).

Doch auch die Fähigkeit zur Aktivierung des angeborenen, unspezifischen Immunsystems sowie die Qualität der zellulären, erregerspezifischen Antwort sind in den Fokus der Forschung und Impfstoffentwicklung gerückt. Allerdings fehlen hier noch Standards zur Evaluation einer Impfantwort.

2.7 CD4⁺ T Zellen und Impfung

In dieser Arbeit soll auf die Rolle von CD4⁺ T Zellen und die in dieser Zellpopulation bestehenden, altersabhängigen Veränderungen im Rahmen der Impfantwort eingegangen werden. CD4⁺ T Zellen sind ein entscheidender Bestandteil des adaptiven Immunsystems und werden in der Literatur häufig als T-Helferzellen bezeichnet, da sie weitere an der Immunantwort beteiligte Zellpopulation sowohl aktivierend als auch regulierend beeinflussen können.

Eine wichtige Helferfunktion besteht in der Produktion aktivierend wirkender Oberflächenmoleküle und der Sekretion von Zytokinen, die unter anderem die Differenzierung zytotoxisch wirkender CD8⁺ T Zellen in entscheidendem Maße fördert (Shedlock und Shen 2003). In Studien zur humoralen Impfantwort mit HIV-infizierten Personen, die mit fortschreitendem Krankheitsverlauf einen zunehmenden Verlust funktionaler CD4⁺ T Zellen erleiden, konnte für verschiedene Impfungen (Influenza, Tetanus, Diphtherie, Poliomyelitis und Pneumokokken) gezeigt werden, dass ein signifikanter, positiver Zusammenhang zwischen CD4⁺ T-Zellzahlen und der Höhe der Antikörper besteht. (Kroon FP 1994; Kroon FP 1995)

2.8 CD4⁺ T-Zellentwicklung

Die Entwicklung von CD4⁺ T Zellen beginnt wie bei allen Lymphozyten zunächst im Knochenmark. Von hier aus wandern die unreifen Vorläuferzellen in den Thymus - ein hinter dem Brustbein liegendes, hochspezialisiertes lymphatisches Organ - wo weitere Differenzierungsschritte ablaufen. T Zellen erkennen ihr Zielantigen mithilfe ihres auf der Oberfläche befindlichen T Zell-Rezeptors (TCR). Dieser verfügt über eine hochvariable Region zur Bindung des Zielantigens, die mithilfe einer mehrstufigen Rekombination von Gensegmenten während des Bildungsprozesses entsteht. T Zellen erkennen ihr Antigen in der Regel nur, wenn es an körpereigene Präsentationsmoleküle gebunden vorliegt.

Im Thymus wird zunächst im Zuge der sogenannten *positiven Selektion* überprüft, ob die die Vorläuferzellen mit diesen als Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) bezeichneten Präsentationsmolekülen in ausreichendem Maße interagieren. Im zweiten Schritt werden im Rahmen der *negativen Selektion* potentiell autoreaktive Vorläuferzellen aussortiert, die durch starke Bindung an präsentierte körpereigene Peptide auffallen. Nach erfolgreichem Durchlaufen beider Selektionsschritte verlassen die frisch gebildeten CD4⁺ T Zellen den Thymus und zirkulieren als *naive* Zellen vorrangig im Blut und den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz sowie den in der Darmmukosa befindlichen Peyer'schen Plaques (Murphy 2011).

2.9 Recent Thymic Emigrants und Homöostatische Proliferation

Die Identifikation naiver CD4⁺ T Zellen und ihre Abgrenzung gegenüber Antigen-erfahrenen Effektor- und Gedächtniszellen gelingt in der Durchflusszytometrie durch die kombinierte Analyse der Oberflächenmoleküle CD45RA und CCR7, die von naiven Zellen koexprimiert werden (Sallusto, Lenig et al. 1999). Diese Population setzt sich aus kürzlich aus dem Thymus ausgetretenen Zellen (*Recent Thymic Emigrants* = RTEs) sowie aus Zellen zusammen, die in der Peripherie homöostatisch proliferiert sind. Mit zunehmendem Lebensalter verändert sich die relative Zusammensetzung des naiven CD4⁺ T-Zellpools, wohingegen die absolute Größe weitestgehend konstant bleibt (Naylor, Li et al. 2005). Eine wichtige Einflussgröße ist hier die bereits ab dem Kindesalter physiologisch einsetzende Abnahme der Thymusaktivität, die mit einer Umstrukturierung des Thymusgewebes einhergeht. Hierbei steigt der Anteil an perivaskulärem Fettgewebe drastisch, wohingegen sich die immunologisch aktiven medullären und kortikalen Thymusanteile zurückbilden (Steinmann, Klaus et al. 1985). Eine Studie zur Rekonstitution des CD4⁺ T-Zellpools nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation im Kindes- und Jugendalter zeigte bereits innerhalb der ersten 20 Lebensjahre eine deutliche inverse Korrelation zum Alter: Je jünger die Patienten waren, desto schneller trat eine Regeneration der naiven CD4⁺ T-Zellpopulation ein (CD45RA⁺), die in fast allen Fällen mit einer radiologisch nachweisbaren Vergrößerung des Thymus' einherging (Mackall, Fleisher et al. 1995). Es lassen sich jedoch auch im fortgeschrittenen Lebensalter noch Nachweise einer erhaltenen

Thymusaktivität finden, z.B. in der Form von Nebenprodukten, der im Thymus ablaufenden TCR-Rekombination (Poulin, Viswanathan et al. 1999).

Die Unterscheidung homöostatisch proliferierter T Zellen von RTEs ist einerseits über die Bestimmung der Gehalts an *T Cell Receptor Excision Circles* (TRECs) einer bestimmten Zellpopulation möglich. Hierbei handelt es sich um im Zytoplasma vorliegende, episomale ringförmige DNS Strukturen, die während der T-Zell-Rezeptor-Rekombination entstehen und im Zuge der Zellteilung nicht verdoppelt werden, sondern in jeweils einer der entstehenden Tochterzellen verbleiben. T Zellen mit keiner oder nur wenigen zurückliegenden Teilungsschritten wie RTEs verfügen also über einen höheren Gehalt an TRECs als Zellen, die sich bereits vielfach nach ihrem Austritt aus dem Thymus geteilt haben (Al-Harhi, Marchetti et al. 2000). Kimmig et al. zeigten, dass dieser Zusammenhang für naive CD4⁺ T Zellen gut mit der Expression des Oberflächenmarkers CD31 korreliert und somit auch durchflusszytometrisch analysiert werden kann (Kimmig, Przybylski et al. 2002). CD31 ist ein Adhäsionsmolekül auf der Zelloberfläche, das Lymphozyten zur transendothelialen Migration in sekundäre lymphatische Organe befähigt. Obwohl bislang keine grundlegenden funktionellen Unterschiede zwischen CD31⁺ und CD31⁻ naiven CD4⁺ T Zellen bekannt sind, ist die Betrachtung der Zusammensetzung des naiven T Zell-Pools dennoch von Interesse. Kohler und Kollegen demonstrierten, dass homöostatisch proliferierte CD31⁻ CD4⁺ T Zellen über ein deutlich weniger polyklonales TCR Repertoire verfügen, als CD31⁺ RTEs (Kohler, Wagner et al. 2005). Die Fähigkeit zur Erkennung eines neuen Antigens, wie im Fall der hier durchgeführten Immunisierung mit YFV-17D, setzt das Vorhandensein einer Zelle mit einem passenden TCR voraus. Je größer und vielfältiger die Population naiver T Lymphozyten ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass antigenspezifische Zellen aktiviert werden können und im Verlauf der Immunantwort verschiedene Effektorfunktionen übernehmen. Douek und Kollegen konnten mithilfe von TREC Analysen nachweisen, dass die Austrittsrates neugebildeter T Zellen aus dem Thymus mit zunehmendem Alter deutlich abnimmt, jedoch auch im hohen Lebensalter nicht vollständig zum Erliegen kommt (Douek, McFarland et al. 1998).

Inwiefern die Zusammensetzung des CD4⁺ T-Zell-Repertoires einen Einfluss auf die Qualität und Kinetik einer immunologischen Antwort gegen ein neues Pathogen hat, wurde im Menschen bislang nicht untersucht. Für zytotoxische CD8⁺ T Zellen zeigte eine Studie

zur Immunantwort nach Influenza allerdings, dass die altersabhängige Abnahme der TCR-Vielfalt zu Einschränkungen der antigenspezifischen Antwortkompetenz durch CD8⁺ T Zellen führt (Yager, Ahmed et al. 2008).

2.10 Aktivierung und Differenzierung von naiven CD4⁺ T Zellen

Naive T Zellen benötigen für ihre Aktivierung und anschließende Ausdifferenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen in der Regel den Erhalt von drei Signalen: Dies ist zum einen die Bindung des TCR/CD3 Komplexes an ein passendes, über MHC-II präsentiertes Peptidantigen. CD4⁺ ist ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche von T Zellen als Ko-Rezeptor für die Bindung des TCRs an MHC-II gebundene Peptide dient. Im Gegensatz zu den von jeder kernhaltigen Körperzelle kontinuierlich ausgebildeten MHC-I Molekülen, die der Präsentation intrazellulär synthetisierter Proteine dienen, finden sich MHC-II Moleküle im Allgemeinen nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (*Antigen Presenting Cell*, APC), die sich aus unterschiedlichen Populationen wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen sowie B-Zellen zusammensetzen. Mithilfe von MHC-II präsentieren APCs Peptidsequenzen der durch Endozytose aufgenommenen Antigene. Dies können zum Beispiel extrazellulär vorliegende Mikroorganismen sein oder Fragmente virusinfizierter oder apoptotischer Zellen (Murphy 2011). Die entstandene Bindung des TCR/CD3 Komplexes an das über MHC-II präsentierte Peptid vermittelt über die intrazellulären Anteile der beteiligten Rezeptoren eine Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die für die folgende T Zell Aktivierung von Bedeutung sind. Der zweite zur Aktivierung erforderliche, auch als *Kostimulation* bezeichnete Stimulus wird im Fall von naiven CD4⁺ T Zellen vorrangig über die Interaktion von auf der CD4⁺ T Zelle befindlichen Oberflächenrezeptoren wie CD28 und seinen von aktivierten APCs exprimierten Liganden CD80 bzw. CD86 vermittelt (Kearney, Walunas et al. 1995). CD28 verfügt über eine intrazelluläre Domäne, die nach Bindung des Liganden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Verschiedene Arbeiten zu dieser komplexen, zellulären Interaktion konnten zeigen, dass sowohl die Spezifität des TCRs für ein bestimmtes Antigen als auch die Antigenkonzentration und -kontaktzeit die Aktivierung und spätere Differenzierung der Zelle beeinflussen kann (Grakoui, Bromley et al. 1999). Pro-inflammatorisch wirksame Zytokine wie Interleukin 1 (IL1) stellen das dritte zur Aktivierung erforderliche Signal dar (Curtsinger, Schmidt et al. 1999).

Aktivierete naive $CD4^+$ T Zellen beginnen das stark proliferationsfördernde Zytokin IL2 zu produzieren, dass sowohl *autokrin* auf die Zelle selbst als auch *parakrin* auf benachbarte Zellen wirkt und in beiden Fällen deren klonale Expansion durch rapide Zellteilung fördert. Zusätzlich wird die α -Untereinheit des IL2-Rezeptors CD25 vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert, wodurch der Wirkungsgrad von IL2 noch weiter erhöht wird (Cantrell and Smith 1984). Nach mehreren Teilungsschritten differenzieren die klonal expandierten T Zellen in der sogenannten Expansionsphase zunächst hauptsächlich weiter in kurzlebige Effektorzellen, die im Rahmen der ablaufenden Immunantwort verschiedene Funktionen übernehmen. In der sich anschließenden Kontraktionsphase, die sich im Falle einer Infektion oder Impfung nach Kontrolle und Beseitigung des Pathogens bzw. Impfantigens anschließt, gehen ca. 90% der gebildeten Effektorzellen in Apoptose. Die nach der Kontraktionsphase verbleibenden T Zellen sind vorrangig langlebige, zentrale Gedächtniszellen, die im Falle eines Zweitkontaktes mit demselben Pathogen eine schnelle und schützende Immunantwort vermitteln sollen (Seder und Ahmed 2003). Wie die Differenzierung zu Gedächtniszellen genau abläuft ist nicht abschließend geklärt. Einige Erklärungsmodelle gehen von einer bereits initial festgelegten Trennung zwischen späteren Effektor- und Gedächtniszellen aus, andere Konzepte vertreten eher die Theorie eines graduellen Entwicklungsprozesses in Abhängigkeit von Dauer und Stärke der Antigenstimulation aus und berücksichtigen die Entstehung funktional unterschiedlicher Gedächtniszellsubpopulationen (Kaech, Wherry et al. 2002) (s. Abb. 2.10). Es wird hier unterschieden zwischen effektorartigen Gedächtniszellen (T_{EM}), die bei einem erneuten Kontakt mit ihrem Peptid schnell aktiviert werden und Effektorzytokine produzieren und zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}), die in ihrem Phänotyp eher naiven Zellen gleichen, jedoch deutlich leichter als diese zu aktivieren sind und bei Reaktivierung zu Effektorzellen ausdifferenzieren. Auch 100 Tage nach Impfung konnten Miller und Kollegen bei ihren Probanden YFV-17D spezifische $CD4^+$ T Zellen in niedriger, jedoch stabiler Frequenz nachweisen (Miller, van der Most et al. 2008).

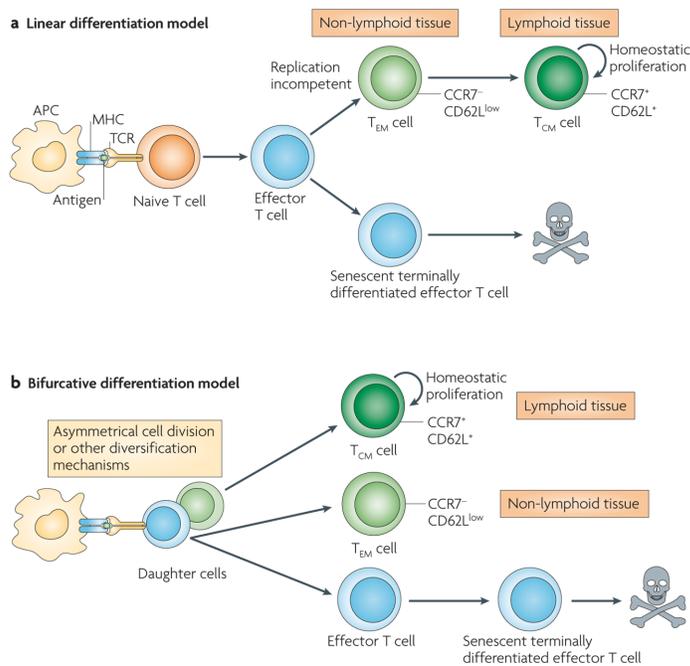


Abb. 2.10: Gemäß dem linearen Differenzierungsmodell (a) führt die TCR-Stimulation einer naiven T Zelle zur Bildung von Effektor-T Zellen. Diese Population teilt sich im Folgenden auf in entweder terminal differenzierte Effektor T Zellen (T_{EMRA}), die nach Beendigung der Immunantwort relativ zeitnah apoptotisch werden. Auf der anderen Seite stehen die Effektor-Gedächtnis T Zellen (T_{EM}), aus welchen wiederum einige zentrale Gedächtnis T Zellen (T_{CM}) hervorgehen, die in lymphatischen Geweben über lange Zeit hinweg homöostatisch proliferieren und bei erneutem Antigenkontakt aktiviert werden können.

Das zweigeteilte Differenzierungsmodell (b) geht hingegen davon aus, dass nach erfolgter Antigen-Erkennung aus den aktivierten, naiven T Zellen direkt zwei Zelllinien, mit unterschiedlichen Eigenschaften hervorgehen: Die in der akuten Immunantwort involvierten Effektor- und Effektor-Gedächtnis T Zellen, sowie die durch homöostatische Proliferation langfristig erhalten bleibenden zentralen Gedächtniszellen.

Aus: Ahmed, R., Bevan, M. J., et al. (2009). "The precursors of memory: models and controversies." *Nature Reviews Immunology* 9(9): 662-668.

2.11 Polarisation von CD4⁺ T Zellen

Eine besondere Eigenschaft von CD4⁺ T Zellen ist die Breite der von ihnen in der Interaktion mit anderen Leukozyten ausgeübten Funktionen, die sie auch über die von ihnen sezernierten Zytokine vermitteln. Hierbei ist es jedoch so, dass die einzelne aktivierte CD4⁺ T Zelle zumeist über ein relativ enges Spektrum an produzierten Zytokinen verfügt. Dies wird als *Polarisation* bzw. *Lineage-Zugehörigkeit* bezeichnet. Zusätzlich zu den seit vielen Jahren eingehend untersuchten Th₁ und Th₂ Linien ist heute in der Literatur eine große und kontinuierlich wachsende Vielfalt weiterer T-Zell-Kategorien bekannt. Hierzu gehören Th₁₇ CD4⁺ T Zellen, natürliche und induzierte regulatorische T_{reg} CD4⁺ Zellen, sowie weitere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Populationen wie z.B. Th₉ oder folliculären T Helferzellen (T_{fh}). Für die Differenzierung zwischen Th₁ und Th₂ T Helferzellen konnte gezeigt werden, dass insbesondere das durch aktivierte APCs generierte Zytokinmilieu von Bedeutung für die Polarisation der naiven T-Helfer-Zelle ist.

Th₁ CD4⁺ T Zellen sind insbesondere in der Abwehr intrazellulär vorliegender Pathogene (Bakterien, Viren) sowie von Tumorzellen von Bedeutung, da das von ihnen produzierte Spektrum an Zytokinen die zellvermittelte Immunantwort fördert. Erkennen APCs mithilfe ihrer *Toll Like Receptors* (TLR) ein entsprechendes Pathogen, so fördert das von ihnen im

Folgendes produzierte IL12 eine Ausdifferenzierung der aktivierten naiven T Helferzellen zu Th₁-Zellen, vermittelt über eine Aktivierung von STAT4 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) und der hierbei induzierten Expression der Th₁-Mastertranskriptionsfaktoren *T-bet* und *Eomes*. Das in Folge von der Th₁ Zelle produzierte Zytokin IFN γ , fördert unter anderem die Aktivität von Natürlichen Killer Zellen (NK Zellen) und Makrophagen. Th₁ Zellen bilden sowohl IL2 sowie häufig auch das pro-inflammatorisch wirksame Zytokin TNF α (Grogan, Mohrs et al. 2001).

Extrazellulär vorliegende Pathogene wie Parasiten begünstigen im Gegenzug die Entstehung von Th₂-polarisierten CD4⁺ T Zellen, die mithilfe des von ihnen gebildeten Zytokinprofils die humorale Immunantwort unterstützen. Das Th₂-Signatur-Zytokin IL4 fördert in T Zellen über die Aktivierung von STAT5 eine gesteigerte Expression des Th₂-Mastertranskriptionsfaktors GATA3, woraufhin die Produktion von IL4, IL5 sowie IL13 einsetzt (Zhu, Yamane et al. 2006). Es konnte zudem eine negative Wirkung von IL4 auf die Ausbildung von Th₁ polarisierten Zellen gezeigt werden. Dies trifft im Gegenzug umgekehrt auch auf IL12 und IFN γ und ihren inhibierenden Effekt auf die Entstehung von Th₂ Zellen (Abehsira-Amar, Gibert et al. 1992).

Seit 2005 sind Th₁₇ Zellen als weitere funktionell unterschiedliche T Helferzellpopulation bekannt (Heon Park, Zhaoxia Li et al. 2005). Sie finden sich *in vivo* sowohl in der Abwehr extrazellulärer Krankheitserreger als auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie Morbus Chron oder Multipler Sklerose. Sie entstehen in der Gegenwart der Zytokine TGF β , IL1 β , IL6 und IL21 und exprimieren nach der Aktivierung von STAT3 den Transkriptionsfaktor ROR γ T als Mastertranskriptionsfaktor. Über die Produktion der Zytokine IL17, IL-22, IL-26, TNF α und Lymphotoxin- β können Th₁₇ Zellen je nach Subtypinsbesondere einen aktivierenden Einfluss ausüben auf Leukozytenpopulationen der angeborenen Abwehr, die eine lokale Gewebsinflammation hervorrufen (Sallusto and Lanzavecchia 2009). Welche genaue physiologische Funktion sie im Rahmen humaner Immunantworten haben, ist bislang ungeklärt.

Die regulatorische Beeinflussung von Immunantworten nach Elimination des Zielantigens ist eine weitere zentrale Funktion von CD4⁺ T Zellen. Regulatorische T_{reg} Zellen können die anhand ihres Mastertranskriptionsfaktors FoxP3 identifiziert werden (Fontenot, Gavin et al. 2003). Durch von ihnen freigesetzten Zytokine wie z.B. IL10 sowie TGF β üben sie einen

hemmenden Einfluss auf die Bildung proinflammatorisch bzw. proliferationsfördernder Zytokine aus (Jutel, Akdis et al. 2003). Zudem exprimieren T_{reg} s CD25 in hohem Maße auf ihrer Oberfläche und neutralisieren so lymphoproliferativ wirksames IL2, welches sie im Gegensatz zu konventionellen $CD4^+$ T Zellen nicht selbst produzieren (Pandiyana, Zheng et al. 2007) Es kann hier unterschieden werden zwischen *natürlichen* nT_{reg} s, die direkt im Thymus entstehen, und *induzierten* iT_{reg} s, die im Rahmen eines Immungeschehens aus reifen, aktivierten peripheren $CD4^+$ T Zellen entstehen. nT_{reg} s verfügen über ein breites Repertoire an TCRs, die im Selektionsprozess zumeist eine moderate Affinität für körpereigene Peptide gezeigt haben und so die Aufrechterhaltung der peripheren Selbsttoleranz vermitteln. Aktuelle Forschungsarbeiten zur Rolle der iT_{reg} s legen nahe, dass diese mit ihrem von den nT_{reg} s abweichenden TCR-Repertoire eine entscheidene Erweiterung der regulatorischen Immunkompetenz ausüben (Haribhai, Williams et al. 2011)

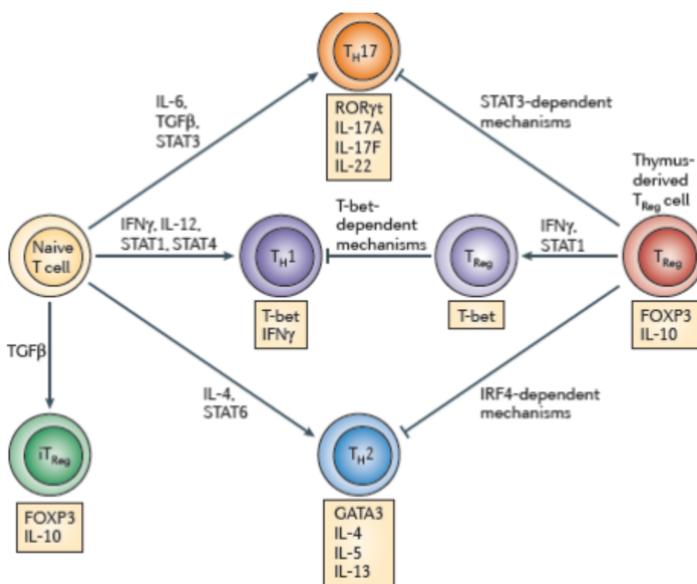


Abb. 2.11: Beeinflusst unter anderem durch das umgebende Zytokinmilieu entwickeln sich naive $CD4^+$ T Zellen zu Effektorzellen der Linien Th_1 , Th_2 und Th_{17} , die aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinproduktion verschiedene Funktionen im Rahmen der Immunantwort übernehmen. Sogenannte *natürliche* regulatorische T_{reg} Zellen treten direkt aus dem Thymus aus und üben einen hemmenden Einfluss auf T-Zell-vermittelte Immunantworten aus.

Aus: Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, et al. (2008). "Regulatory T Cells and Immune Tolerance." *Cell* 133(5): 775-787.

2.12 Helferfunktion für B Zellen

Eines der entscheidenden Elemente einer protektiven Impfantwort ist die Ausbildung spezifischer Antikörper durch aktivierte B Zellen. Im Falle eines Erstkontaktes mit einem neuen Pathogen benötigen diese in der Regel zusätzlich zur Bindung des Antigens durch den B Zellrezeptor (BCR) weitere Aktivierungssignale durch $CD4^+$ T Helferzellen. Wenn eine B Zelle ein passendes Antigen mit ihrem BCR erkennt, so führt dies zur Aufnahme

des gebundenen Proteins und nach intrazellulärer Verarbeitung des Antigens zur MHC-II-Präsentation von Peptidfragmenten auf der B Zell-Oberfläche. Eine durch den Kontakt mit anderen APCs voraktivierte $CD4^+$ T Zelle mit gleicher Spezifität kann dies erkennen und tritt einen engen Zell-Zellkontakt (Murphy 2011). Aktivierte $CD4^+$ Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche CD40L (CD154). Dies ist ein Protein der Tumornekrosefaktor-/Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie und fördert in der Interaktion mit dem auf B Zellen vorhandenen Molekül CD40 unter anderem die Ausbildung von Keimzentren im Lymphknoten, den Immunglobulin-Klassenwechsel sowie die B-Zell-Differenzierung hin zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen.

Zusätzlich sezernieren insbesondere aktivierte Th_2 Zellen das Zytokin IL4, welches die klonale B-Zellexpansion anregt. Auch im Anschluss an die initiale Aktivierungsphase wird die B-Zellantwort durch $CD4^+$ T Zellen weiter verstärkt. IL4 begünstigt den Isotypenklassenwechsel vom initial produzierten IgM hin zu IgG₁ und IgE (Jeppson, Patel et al. 1998). Parallel hierzu fördern Th_2 Zellen ebenfalls die Synthese von IgA, welches insbesondere für die Erregerabwehr an Schleimhautoberflächen und im Magen-Darmtrakt von Bedeutung ist (van Vlasselaer, Punnonen et al. 1992). Des Weiteren moderieren $CD4^+$ T Zellen als folliculäre T Helferzellen (T_{FH}) die Keimzentrumsreaktion. Die in der B-Zellzone lymphatischer Follikel gelegenen Keimzentren sind Ort rascher Proliferation und Differenzierung von aktivierten B Zellen. Mittels somatischer Rekombination des BCRs entstehen B Zellen mit unterschiedlicher Passgenauigkeit für das betreffende Antigen und T_{FH} Zellen wirken steuernd auf den B Zelldifferenzierungsprozess steuernd ein (Fazilleau, Mark et al. 2009).

2.13 Einfluss von $CD4^+$ T Zellen auf die $CD8^+$ T Zellantwort

Zytotoxische $CD8^+$ T Lymphozyten (CTL) sind in der Lage intrazelluläre Pathogene, virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen zu erkennen und diese durch die Freisetzung zytotoxisch wirksamer Moleküle wie Perforin und Granzym zu lysieren. Sie können dies in der Regel ohne Hilfe von $CD4^+$ T Zellen, allerdings haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass sowohl die Effektorphase als auch insbesondere die Ausbildung langlebiger Gedächtniszellen positiv durch T Helferzellen beeinflusst wird oder in Abwesenheit dieser nur unzureichend verläuft.

Ihre Helferfunktion üben CD4⁺ T Zellen hier zum einen *parakrin* über die von ihnen produzierten Zytokine wie z.B. IL2 und IFN γ aus. Andererseits fördern sie über die direkte Interaktion von CD40L und dem auch von professionellen APCs exprimierten CD40 deren vollständige Differenzierung. Diese können dann in Folge einer gesteigerten ihrer Antigenpräsentation sowie der Ausbildung ko-stimulatorischer Moleküle CTLs effizienter aktivieren (Schoenberger, Toes et al. 1998; Shedlock und Shen 2003).

3 AUSBLICK FÜR DIE ARBEIT

In dieser Arbeit sollten altersabhängige Veränderungen der Qualität und Kinetik der adaptiven Immunantwort nach Gelbfieberimpfung mithilfe detaillierter durchflusszytometrischer und serologischer Analysen untersucht werden und so im Modell einer viralen Primärinfektion ein tieferes Verständnis die verringerte Immunkompetenz älterer Menschen erlangt werden.

Die Analyse der YFV-17D Virämie sowie der Gelbfieber-spezifischen Antikörperantwort sollte hierbei den Rahmen für die Bewertung der Qualität der Immunantwort schaffen. Hierauf aufbauend sollte mithilfe multidimensionaler Durchflusszytometrie die Kinetik und Qualität der induzierten T-Zell-Antwort untersucht werden. CD4⁺ T Zellen stehen in einer zentralen Vermittlerrolle zwischen weiteren, an der Impfantwort beteiligten Lymphozytenpopulationen wie B Zellen oder zytotoxischen T Zellen und rücken zunehmend in den Fokus der Entwicklung neuer Impfstoffe. In Bezug auf die Gelbfieberimpfung wurden sie bislang jedoch wenig untersucht. Inwiefern Alterungsprozesse wie die abnehmende Thymusfunktion und die damit einhergehende Veränderung des T-Zell-Repertoires sowie eine zunehmende Dysfunktion der Zellen selbst einen Einfluss auf eine antivirale Primärantwort hat, sollte hier geklärt werden. Von Interesse war außerdem inwiefern das erregerspezifische immunologische Gedächtnis im Langzeitverlauf beeinflusst wird.

4 METHODIK

4.1 Technische Laborausstattung

Tabelle 4.1: Technische Laborausstattung

Bezeichnung	Hersteller
CO ₂ -Inkubator Innova CO-170	New Brunswick Scientific (Enfield, USA)
Durchflusszytometer BD™ LSR II Flow Cytometer	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Pipette eppendorf research® 0,5-10 µL, 10-100µL, 50-200 µL, 100-1000 µL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetboy®	INTEGRA Biosciences (Fernwald, Deutschland)
Sterilarbeitsbank HERAsafe®	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Vortex Mixer	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifuge 5804R und 5810R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Allegra® X-15R und X-22	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge Microfuge® 22R	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
BD Safety-Lok™ Blutentnahmeset 21G	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Trucount® Rörchen	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Vacutainer® 170 U/mL Lithium-Heparin- Blutentnahmerörchen 10 mL	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Vacutainer® EDTA-Rörchen	Becton Dickinson GmbH

(K ₂ EDTA 1,8 mg/mL) 2,5 mL	(Heidelberg, Deutschland)
BD Vacutainer® SST™ Advance Serumröhrchen 8.5 ML	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Leucosep™ Röhrchen 50 mL zur PBMC Isolation	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Polystyren-Rundbodenröhrchen Cellstar® mit 2-Positionendeckel 12mL	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Polystyren-Rundbodenröhrchen 5 mL	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Polystyren-Schraubdeckelröhrchen mit konischem Boden 50mL	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Reaktionsgefäße Safe-Lock™ 0,5 mL und 1,5 mL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

4.3 Puffer

Tabelle 4.3: Puffer

Bezeichnung	Hersteller	Vorliegende Zubereitung
PBS	Life Technologies (Carlsbad, USA)	pH 7,2-7,4 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl
PBS/BSA	Zusatz von BSA und anschließende Sterilfiltration AG Thiel, BCRT (Berlin, Deutschland)	Zusatz von BSA 5 g/L pH 7,2-7,4
PBS/BSA/NP-40 0,05%	Zusatz von BSA und NP-40 und anschließende Sterilfiltration AG Thiel, BCRT (Berlin, Deutschland)	Zusatz von BSA 5 g/L und 0.05% NP-40 pH 7,2-7,4

4.4 Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Tabelle 4.4: Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Vorliegende Zubereitung
BD FACS Lysing Solution™	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)	1:10 mit Aqua dest.
BD FACS Permeabilizing Solution 2™	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)	1:10 mit Aqua dest.
BD FACSTflow™	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)	
Beriglobin	Aventis	1,44 mg/mL in PBS
Bovines Serum Albumin	Roche (Basel, Schweiz)	
Brefeldin A	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)	5 mg/mL in 70% Ethanol
Casy@ton	Roche (Basel, Schweiz)	
DAPI	Roche (Basel, Schweiz)	1 µg/mL in PBS
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)	
Erythrocyte Lysis Buffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)	
Gelbfieberimpfstoff YFV-17-D Stamaril®	Sanofi Pasteur MSD GmbH	
Humanes AB-Serum	Lonza (Walkersville/USA)	Inaktiviert bei 56°C für 30min
LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit für 405 nm Excitation	Life Technologies (Carlsbad, USA)	50 µL DMSO pro Aliquot, 1:10 in PBS vor Gebrauch
Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077	PAA (Pasching, Österreich)	
Mouse-α-human-CD28 purified	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)	0.2 mg/mL in PBS
NP 40		
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom (Berlin, Deutschland)	Penicillin 10000 U/mL Streptomycin 10000 µg/mL

Staphylococcus Entrotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)	1 mg/mL in PBS
Toxic-shock-syndrome-Toxin 1 (TSST-1)	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)	1 mg/mL in PBS
Zellkulturmedium Gibco® RPMI 1640 GlutaMAX™	Life Technologies (Carlsbad, USA)	Zusatz von 10% humanem AB-Serum und 1% Penicillin/Streptomycin
Fox-P3 Fixation Buffer	eBioscience (San Diego, USA)	Reagent : Dilutent = 1:3
Fox-P3 Permeabilization Buffer	eBioscience (San Diego, USA)	1:9 mit Aqua dest.

4.5 Auswahl der Probandenkohorte

Die Probandensuche erfolgte durch Information der Mitarbeiter und Studenten in verschiedenen Einrichtungen der Charité, des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums sowie des Robert Koch-Institutes in Berlin. Es wurden insgesamt 24 gesunde Probanden im Alter von 23-68 Jahren in die Studie eingeschlossen, die sich auf Grund einer Reise oder dem beruflichen Umgang mit dem Gelbfieber-Virus impfen lassen wollten.

	n	Altersspanne	Mittleres Alter	Weiblich	Männlich
Alt	13	55-68 Jahre	60.3 Jahre	6	7
Jung	11	23-28 Jahre	26.2 Jahre	5	6

Ausschlusskriterien waren neben einer akuten Erkrankung das Vorliegen einer immunologisch relevanten Grunderkrankung. Des Weiteren wurden keine Personen in die Studie aufgenommen, die in der Vergangenheit eine Impfung gegen Gelbfieber, Japanische Enzephalitis, oder Frühsommer-Meningoenzephalitis erhalten haben bzw. eine natürliche Flavivirusinfektion durchgemacht haben. Dies wurde durch unsere Kooperationspartner mithilfe einer indirekten Immunfluoreszenztestung (IIFA) gegen vorbestehende *Flavivirus* Antikörper überprüft (s. 4.17). Personen mit einer bekannten Allergie gegen das im Impfstoff enthaltene Hühnereiweiß sowie schwangere und stillende

Frauen wurden ebenfalls von einer Teilnahme ausgeschlossen. Zusätzlich wurde eine detaillierte Befragung zu zurückliegenden Fernreisen durchgeführt, die dem Ausschluss von Reisen in endemische Gelbfieber- und Denguefieber-Gebiete diente. Die Aufklärung der Teilnehmer über die potentiellen Risiken einer Studienteilnahme (Blutentnahme) erfolgte durch den Studienarzt. Die Aufklärung über Risiken und Nebenwirkungen der Gelbfieberimpfung selbst wurde durch den impfenden Arzt der Gelbfieberimpfstelle vorgenommen. Von allen Probanden wurde das schriftliche Einverständnis für die Teilnahme an der Studie selbst sowie die anschließende Auswertung und Archivierung der Studiendaten eingeholt. Die Zustimmung der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Durchführung der Studie liegt vor (Antragsnummer: EA2/121/09, letzte Änderung am 02.11.2010).

4.6 Studienablauf – Blutentnahmen und Impfung

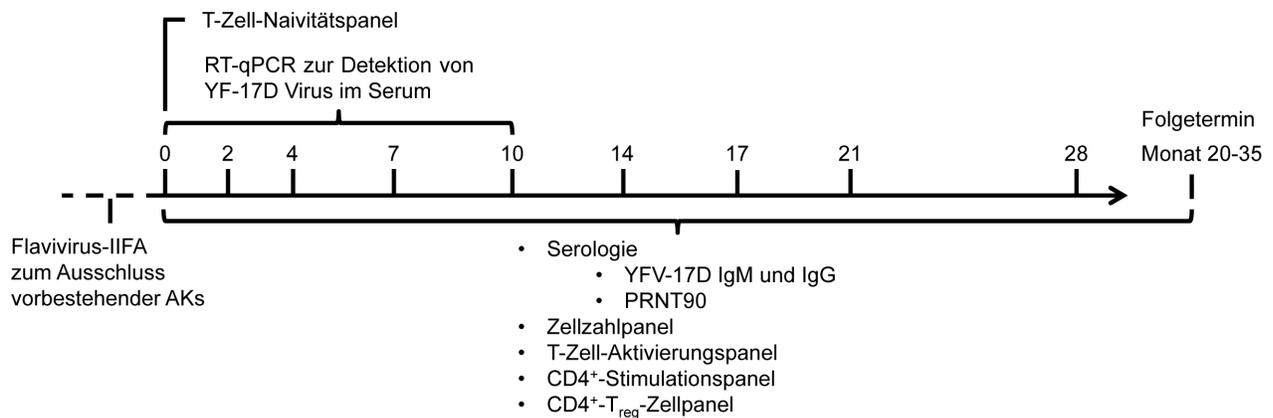
An den im Ablaufplan (Abb. 4.6.) der Studie angegebenen Tagen wurde von allen Probanden jeweils 60 mL Blut aus einer Armvene in sterile, vakuumisolierte Röhrchen entnommen, die entweder einen Zusatz von Heparin oder einem Gerinnungsaktivator für die Analyse des Serums enthielten. Das heparinisierte Blut wurde direkt nach der Abnahme weiterverarbeitet und analysiert. Das aus den Serumgelröhrchen nach Zentrifugation gemäß den Herstellerangaben gewonnene Serum wurde bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Um tageszeitbedingte Schwankungen der Untersuchungsergebnisse zu minimieren, wurden alle Blutentnahmen stets morgens innerhalb eines zweistündigen Zeitfensters durchgeführt. Es fand zudem eine Befragung der Probanden zu etwaigen Nebenwirkungen der Impfung an allen Studientagen statt. Nach der ersten Blutentnahme am Studientag 0 erfolgte innerhalb von acht Stunden die Impfung der Probanden gegen das Gelbfieber-Virus in Form einer subkutanen Injektion in den Oberarm. Diese wurde in anerkannten Gelbfieberimpfstellen des Landes Berlin durch den dort anwesenden Arzt durchgeführt, nachdem dieser zuvor die Impftauglichkeit der Probanden überprüft hatte (Befragung und Untersuchung hinsichtlich akuter und chronischer Erkrankungen, welche die Verträglichkeit der Impfung beeinträchtigen können). Um eine durch die häufigen Blutentnahmen hervorgerufene Anämie der

Probanden ausschließen zu können, wurde an allen Studientagen zusätzlich ein kleines Blutbild durch das klinische Routinelabor aus 1 mL EDTA-Blut erstellt.

Anzumerken ist, dass sich die 24 Probanden aufgrund der praktischen Durchführbarkeit auf drei getrennte Studiendurchgänge verteilen. Das experimentelle Vorgehen wurde hierbei nicht verändert. Vor dem späteren Zusammenführen der Daten wurden diese auf rundenspezifische Abweichungen hin überprüft.

Am späten Folgetermin nach 20-35 Monaten verteilen sich die Teilnehmer der drei Hauptstudienrunden auf zwei Termine, woraus sich die Breite des Zeitfensters ergibt.

Abb. 4.6



4.7 Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Die Isolation und Anreicherung der mononukleären Leukozyten (PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*) aus dem Blut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei wurde ein Lymphozytenseparationsmedium eingesetzt, dessen Dichte (1007 g/mL bei 20 °C) zwischen den dichteren Erythrozyten und Granulozyten und den weniger dichten einkernigen Zellen liegt, die sich vorrangig aus Lymphozyten und Monozyten zusammensetzen.

Das heparinisierte Blut wurde zunächst mit PBS/BSA im Verhältnis 1:1 vorverdünnt und anschließend in 50-mL-Schraubdeckelgefäßen über 15 mL des Separationsmediums zentrifugiert (10min bei 1000G und 20 °C). Nach Zentrifugation setzten sich Erythrozyten und Granulozyten unterhalb des Mediums ab, wohingegen die PBMCs in einem

ringförmigen Film auf dem Medium aufliegen und von dort mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 50-mL-Schraubdeckelgefäß überführt werden konnten. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen mit PBS/BSA, um Reste des Separationsmediums sowie weitere Verunreinigung zu entfernen. Zwischen dem ersten und zweiten Waschschrift wurde die Zellzahl mittels Casy® Counter ermittelt. Dieses Zählverfahren basiert auf der Messung des elektrischen Widerstandes von Zellen in einem schwachen Spannungsfeld. Dieser wird einerseits durch die Zellgröße bestimmt, andererseits ist auch eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich, da die intakte Zellmembran einer lebenden Zelle einen höheren Widerstand erzeugt als die defekte Membran einer toten. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Zellschlag in Zellkulturmedium resuspendiert, dessen Volumen anhand der zuvor ermittelten Zellzahl so gewählt wurde, dass eine Endkonzentration von 1×10^7 lebenden Zellen/mL vorlag.

4.8 *In-vitro*-Kurzzeitstimulation zur Identifikation antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen

Um die durch die Impfung induzierten YFV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und ihr Aktivierungs- und Zytokinprofil untersuchen zu können, wurde eine sechsstündige *in-vitro*-Kurzzeitstimulation in Anlehnung an die Arbeit von Meier und Kollegen durchgeführt (Meier, Stark et al. 2008). Für diesen Versuchsansatz wurde Vollblut eingesetzt, um eine größtmögliche Ähnlichkeit zu den natürlich vorliegenden Zellkonzentrationen im zirkulierenden Blut zu erreichen. Zunächst wurde 1 mL heparinisiertes Blut in 12-mL-Rundboden-Stimulationsröhrchen in Anwesenheit von α CD28 (1 μ g/mL) mit 200 μ L 17-D-Gelbfieberimpfstoff versetzt (gelöst in 500 μ L Zellkulturmedium, 10000 infektiöse Partikel/mL). Die Stimulation mit α CD28 und 200 μ L Medium ohne Impfstoff diente als Negativkontrolle zur Untersuchung einer möglichen nicht YFV-spezifischen Hintergrundaktivierung der Zellen. Zur späteren Beurteilbarkeit der Immunfluoreszenzfärbung wurde stets eine Positivkontrolle mit den Superantigenen SEB (1,5 μ g/mL) und TSST-1 (1 μ g/mL) durchgeführt, die über eine direkte Querverbindung des auf der APC befindlichen MHC-II-Komplex' und der Basis des TCRs einen hohen Anteil der T-Zellen unabhängig von der Spezifität ihres TCRs aktivieren. Die Stimulationsröhrchen wurden anschließend mit halb geöffnetem Deckel in einem Winkel von 45° bei 37°C und

5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der ersten zwei Stunden wurde zu allen Versuchsansätzen Brefeldin A (10 µg/mL) hinzugegeben, das den retrograden Transport von Proteinen aus dem Golgi-Apparat in das endoplasmatische Retikulum der Zelle unterbindet. So werden die während der Inkubationszeit von der Zelle gebildeten Proteine nicht sezerniert, sondern verbleiben im Zellinneren und können dort später angefärbt werden. Nach vier weiteren Stunden Inkubationszeit wurde die Stimulation beendet und die Zellen aus dem Inkubator entnommen. Um die vorhandenen Erythrozyten zu eliminieren, wurden alle Proben zwei Mal mit Erythrozytenlyse-Puffer gewaschen. Dies ist eine hypoosmolare Lösung, die den Einstrom von Flüssigkeit in die Erythrozyten bewirkt und zur Ruptur der Zellmembran führt. Im ersten Waschschrift wurden die Proben nach dem Auffüllen mit 9 mL des Erythrozytenlyse-Puffer für 10 min auf Eis gelagert und anschließend gründlich geschwenkt, um das Lösen der Erythrozyten zu fördern. Der zweite Waschschrift erfolgte direkt ohne weitere Inkubationszeit. Der Zelniederschlag wurde nun in 1 mL PBS gelöst und in 5-mL-Rundbodenröhrchen überführt, in welchen ein abschließender Waschschrift mit PBS erfolgte.

4.9 Multidimensionale Zellanalyse in der Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie (*engl. Fluorescence-activated Cell Sorting, FACS*) ist ein Verfahren, das die mehrdimensionale Analyse von Zellen hinsichtlich ihres Volumens und Granularität, sowie weiterer Merkmale auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren ermöglicht, sofern diese zuvor mit speziellen Antikörpern markiert wurden, die an fluoreszierende Farbstoffmoleküle (Fluorochrome) gebunden sind. Es beruht auf dem Prinzip, dass Partikel (Zellen), die von einer Lichtquelle (Laser des Durchflusszytometers) bestrahlt werden, einen Teil der auftreffenden Lichtenergie aufnehmen und anschließend in je nach ihren Eigenschaften veränderter Form wieder abgeben.

Hierfür ist es zunächst erforderlich die in einer Suspension vorliegenden Zellen in einen linear ausgerichteten Strom aus Einzelzellen zu bringen, damit diese den als Lichtquelle eingesetzten Laserstrahl möglichst zentral passieren und so mit konstanter Intensität angestrahlt werden. Durch einen im Analyseröhrchen erzeugten Überdruck steigt die Zellsuspension in die Kapillare des Durchflusszytometers. Die Bündelung des Zellstroms erfolgt dort durch die seitliche Vorbeileitung von schneller fließender Mantelflüssigkeit

(*sheath fluid*) das einen Sogeffekt auf die Zellen ausübt und diese so zu einer aufsteigenden Säule aus Einzelzellen werden lässt, die in die Messzelle eintritt. Der so ausgerichtete Zellstrom passiert nun nacheinander die Lichtquellen des Instruments. Im Falle des für alle Messungen verwendeten Durchflusszytometers BD™ LSR-II sind dies vier verschiedene Laser, die monochromatisches Licht definierter Wellenlängen abgeben (405 nm, 488 nm, 561 nm und 640 nm).

Zellvolumen und –innenstruktur können anhand der Streuung des Lichts des blauen Lasers bestimmt werden, wenn dieses auf die Zelle trifft. Die Streuung im direkten Verlauf der Achse des Lichtstrahls (*Forward Scatter*, FSC) korreliert mit dem Volumen der Zelle – größere Zellen streuen das Licht stärker als kleinere. Das im rechten Winkel seitlich abgestrahlte Licht (*Sideward Scatter*, SSC) gibt Aufschluss sowohl über die Binnenstruktur als auch die Beschaffenheit der Zelloberfläche – Zellen, die über eine unregelmäßige Oberfläche oder über zahlreiche granuläre Strukturen im Zytosol verfügen, streuen das Licht stärker als Zellen mit homogenerem Zellinneren.

Um zusätzliche Merkmale auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren analysieren zu können, können diese mit Fluorochrom-gekoppelten monoklonalen Antikörpern markiert, die durch die eingesetzten Laser zum fluoreszieren angeregt werden. Ist das jeweilige Zielantigen auf oder in einer Zelle vorhanden, so wird der Antikörper gebunden und das angehängte Farbstoffmolekül emittiert nach Anregung durch den Laserstrahl Licht. Dies kann durch die lichtempfindlichen Detektoren (PMT = *photo multiplier tubes*) des Instruments in verschiedenen Fluoreszenzkanälen detektiert werden. Um eine möglichst hohe Anzahl gleichzeitig messbarer Parameter zu erhalten, werden auch Fluorochrome zusammen eingesetzt, deren Emissionsspektren sich überschneiden. Dies macht es erforderlich, dass jedem Detektor spezifische Kombinationen optischer Filter vorangestellt werden, sodass möglichst nur das Lichtsignal jeweils eines Farbstoffes aufgezeichnet wird. Es werden sogenannte *Longpassfilter* (LP) eingesetzt, die nur Licht oberhalb einer definierten Wellenlänge in Richtung des Detektors hin passieren lassen und den kürzerwelligen Anteil zum nachfolgenden Detektor ablenken. Hat das Licht den jeweiligen *Longpassfilter* passiert, trifft es nun auf einen *Bandpassfilter* (BP), der nur Licht eines eng begrenzten Spektralbereich, der dem Emissionsmaximums des ausgewählten Fluorochroms entspricht, zum Detektor hindurch treten lässt.

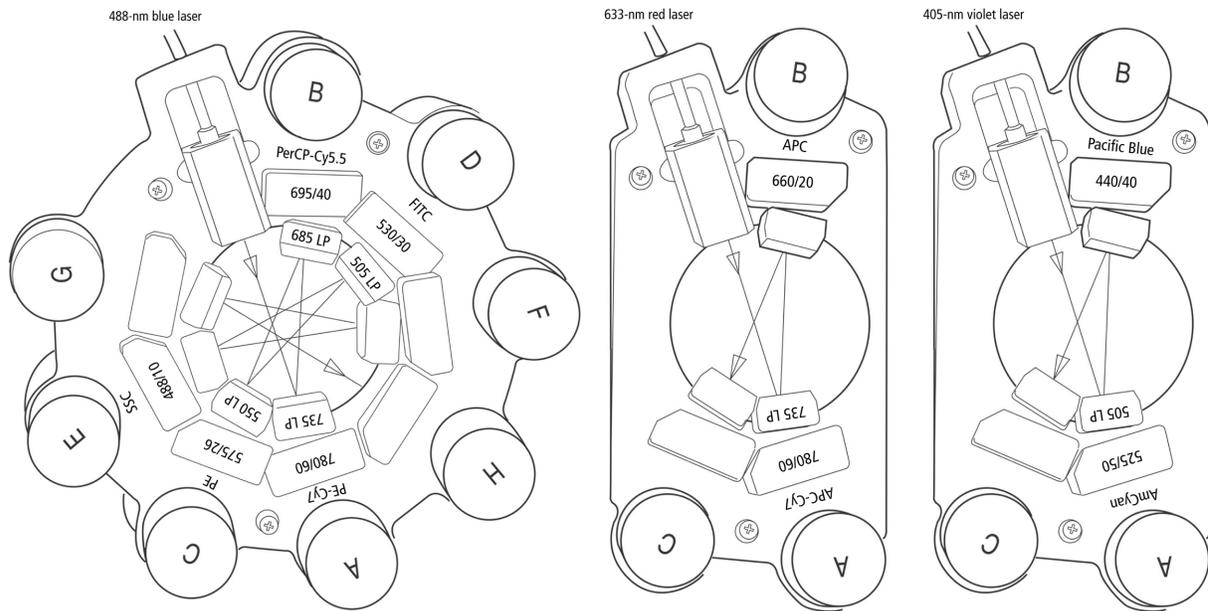


Abb. 4.9: Abgebildet ist der Aufbau der den blauen 488-nm, dem roten 633-nm und dem violetten 405-nm Lasern zugehörigen Filter- und Detektorkonfigurationen. Der Einfall des Lichts erfolgt in Pfeilrichtung und tritt bei passender Wellenlänge zum jeweiligen Detektor durch bzw. wird andernfalls zum nächstfolgenden weiter reflektiert und dort detektiert bzw. erneut reflektiert.
 Aus: BD LSR II User's Guide, BD, 2007, S.125-126

Die für die verwendeten Fluorochrome eingesetzte Filterkonfiguration des BD™ LSR-II ist in Tabelle 4.9 ersichtlich.

Tabelle 4.9: Filterkonfiguration des BD™ LSR II Durchflusszytometers

Fluorochrom	Laser	Fluoreszenz Kanal	PMT	Longpass Filter	Bandpass Filter
SSC	488 nm	SSC	C	-	488/10
FITC Alexa 488	488 nm	B525	B	505LP	525/50
PerCp	488nm	B685	A	670LP	685/35
PerCpCy5.5	488 nm	B685	A	685LP	710/40
PE	561 nm	YG582	E	-	582/15
PeCF594 L/D Red	561 nm	YG610	D	600LP	610/20
PeCy7	561 nm	YG780	A	755LP	780/60
APC A647	660 nm	R660	C	-	660/13
Alexa 700	660 nm	R720	B	685LP	720/30
APCCy7 APCH7	660 nm	R780	A	755LP	780/60
Pacific Blue V450 Brilliant Violet 450	405 nm	V450	E	-	450/50
V500 L/D Aqua DAPI	405 nm	V525	D	505LP	525/50
Qdot 565	405 nm	V610	C	570LP	575/26
Brilliant Violet 570	405 nm	V610	C	570LP	575/26
eFluor 605 Brilliant Violet 605	405 nm	V610 (V710)	C (B)	595LP	610/20
eFluor 650	405 nm	V710 (V780)	B (A)	650LP	661/20

4.10 Mehrfarbenpanels zur Charakterisierung der CD4⁺ T Zellantwort

Um die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden CD4⁺ T-Zellen sowohl vor als auch im Verlauf nach Impfung durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden verschiedene Mehrfarbenpanels eingesetzt, also geeignete Kombinationen von gegen Merkmale auf der Zelloberfläche sowie im Zellinneren gerichteten, fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. Zunächst wurde an Tag 0 mithilfe des T-Zell-Naivitätspanels ein Status der Zusammensetzung des peripheren T-Zell-Pools erstellt, um die Verteilung von RTEs sowie CD31⁻ naiven und den verschiedenen Gedächtnis- CD4⁺-Zellpopulationen vor Impfung zu bestimmen. Das an allen Studientagen verwendete T-Zell-Aktivierungspanel, diente der *ex vivo* Charakterisierung von im Rahmen der Impfung aktivierten und proliferierenden T Zellen. Gleichzeitig lässt sich mit diesem Panel die Populationsdynamik von naiven und Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut nach Vakzinierung erfassen. Mit dem CD4⁺ T-Zell-Stimulationspanel wurden nach *in vitro* Impfstoffstimulation aktivierte YFV-17D-spezifische CD4⁺ T Zellen und ihr Zytokinprofil untersucht. Um für die in der Auswertung der Panel bestimmten Frequenzen auch absolute Zellzahlen/μL angeben zu können, wurde zusätzlich in Vollblut ein Zellzahlpanel gefärbt, das durchflusszytometrischen Zählung verschiedener Leukozytenpopulationen diente. Die für die jeweiligen Panel verwendeten Antikörperzusammenstellungen sind im Folgenden tabellarisch dargestellt.

Tabelle 4.10.1: T-Zell-Naivitätspanel

Zielantigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Konzentration	Eingesetzte Menge (µL) In 100 µL	Hersteller
Oberflächenfärbung						
CCR7	PerCpCy5.5	G043H7	Maus IgG2a	1:50	2	BioLegend
CD3	eFluor 650	OKT3	Maus IgG2a	1:50	2	eBioscience
CD4	Alexa 700	OKT4	Maus IgG2b	1:200	0,5	BioLegend
CD8	Qdot 565	3B5	Maus IgG2a	1:50	2	Invitrogen
CD27	PeCy7	LG.3A10	Hamster IgG	1:50	2	BioLegend
CD31	PE	AC128	Maus IgG1	1:20	5	Miltenyi
CD45RA	eFluor 605	RA3-6B2	Maus IgG2a	1:100	1	eBioscience
CD45RO	Pacific Blue	UCHL1	Maus IgG2a	1:50	2	BioLegend
CD62L	APC	DREG-56	Maus IgG1	1:50	2	BioLegend
HLA-A2	FITC	BB7.2	Maus IgG2b	1:200	0,5	BioLegend
Beriglobin				1:50	2	Aventis
Gesamtvolumen Antikörper-Mix Oberfläche					16	
Lebend-Tot-Diskrimination						
DAPI	wie V500			1:100	1	Roche

Tabelle 4.10.2: CD4⁺-T_{reg}-Zellpanel

Zielantigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Konzentration	Eingesetzte Menge (µL) In 100 µL	Hersteller
Oberflächenfärbung						
CD4	APCH7	RPA-T4	MausIgG1	1:200	0,5	BD
CD8	eFluor 605	RPA-T8	Maus IgG1	1:50	2	eBioscience
CD25	PeCy7	M-A251	Maus IgG1	1:50	2	BD
CD31	PE	AC128	Maus IgG1	1:20	5	Miltenyi
CD45RA	Alexa 700	HI100	Maus IgG2b	1:100	1	BioLegend
CD45RO	Pacific Blue	UCHL1	Maus IgG2a	1:50	2	BioLegend
Beriglobin				1:50	2	Aventis
Gesamtvolumen Antikörper-Mix Oberfläche					14,5	
Lebend-Tot-Diskrimination						
L/D Aqua	Wie V500			1:100	1	Invitrogen
Intrazelluläre Färbung						
CD3	PerCp	SP34-2	Maus IgG1	1:50	2	BD
Fox-P3	Alexa 488	259D/C7	Maus IgG1	1:5	20	BD
Helios	Alexa 647	22F6	Hamster IgG	1:40	2,5	Biolegend
Beriglobin				1:50	2	Aventis
Gesamtvolumen Antikörper-Mix Intrazellulär					26,5	

Tabelle 4.10.3: T-Zell-Aktivierungspanel

Zielantigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Konzentration	Eingesetzte Menge (μL) In 100 μL	Hersteller
Oberflächenfärbung						
CCR7	PerCpCy55	G043H7	Maus IgG2a	1:50	2	BioLegend
CD4	Alexa 700	OKT4	Maus IgG2b	1:200	0,5	BioLegend
CD8	BV570	RPA-T8	Maus IgG1	1:50	2	BioLegend
CD14	PECF594	M ϕ P9	Maus IgG2b	1:100	1	BD
CD19	PECF594	HIB19	Maus IgG2b	1:100	1	BD
CD38	PeCy7	HIT2	Maus IgG1	1:100	1	BioLegend
CD45RA	eFluor 605	RA3-6B2	Maus IgG2a	1:100	1	eBioscience
HLA-DR	APCCy7	L243	Maus IgG2a	1:20	5	BD
$\gamma\delta$ -TCR	PE	B1	Maus IgG1	1:20	5	BioLegend
Beriglobin				1:50	2	Aventis
Gesamtvolumen Antikörper-Mix Oberfläche					20,5	
Lebend-Tot-Diskrimination						
L/D Red	wie TexPe			1:100	1	Invitrogen
Intrazelluläre Färbung						
CD3	V500	SP34-2	Maus IgG1	1:50	2	BD
Fox-P3	Alexa 488	259D/C7	Maus IgG1	1:5	20	BD
Helios	Alexa 647	22F6	Hamster IgG	1:40	2.5	Biolegend
Ki-67	V450	B56	Maus IgG1	1:50	2	BD
Beriglobin				1:50	2	Aventis
Gesamtvolumen Antikörper-Mix Intrazellulär					28,5	

Tabelle 4.10.4: CD4⁺-Stimulationspanel

Zielantigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Konzentration	Eingesetzte Menge (µL) In 100 µL	Hersteller
Oberflächenfärbung						
CD4	Alexa 647	TT1	Maus IgG1	1:300	0,33	BCRT
CD8	eFluor 605	RPA-T8	Maus IgG1	1:50	2	eBioscience
CD14	V500	M5E2	Maus IgG2a	1:100	1	BD
CD19	V500	HIB19	Maus IgG1	1:100	1	BD
Beriglobin				1:50	2	Aventis
Gesamtvolumen Antikörper-Mix Oberfläche					6,33	
Lebend-Tot-Diskrimination						
L/D Aqua	Wie V500			1:100	1	Invitrogen
Intrazelluläre Färbung						
CD3	eFluor 650	OKT3	Maus IgG2a	1:50	2	eBioscience
CD40L	Pacific Blue	24-31	Maus IgG1	1:100	1	BioLegend
IL2	PeCy7	MQ1-17H12	Ratte IgG2a	1:200	0,5	BioLegend
IL4	Alexa 488	MP4-25D2	Ratte IgG1	1:100	1	Invitrogen
IL17a	APCCy7	BL168	Maus IgG1	1:50	2	BioLegend
IFN γ	Alexa 700	B27	Maus IgG1	1:100	1	BioLegend
RANKL	PE	MIH24	Maus IgG2b	1:200	0,5	BioLegend
TNF α	PerCpCy5.5	MAB11	Maus IgG1	1:30	3,3	eBioscience
Beriglobin				1:50	2	Aventis
Gesamtvolumen Antikörper-Mix Intrazellulär					13,3	

Tabelle 4.10.5: Zellzahlpanel

Zielantigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Konzentration	Eingesetzte Menge (μL) In 50 μL	Hersteller
Oberflächenfärbung						
BDCA2	APC	AC144	Maus IgG1	1:10	5	Miltenyi
CD3	Pacific Blue	OKT3	Maus IgG2a	1:50	1	BioLegend
CD4	PerCpCy5.5	OKT4	Maus IgG2b	1:400	0,125	BioLegend
CD8	eFluor 605	RPA-T8	Maus IgG1	1:50	1	eBioscience
CD14	FITC	M5E2	Maus IgG2a	1:50	1	BD
CD19	PE			1:200	0,25	DRFZ
CD45	APCH7	2D1	Maus IgG1	1:200	0,25	BD
CD56	PeCy7	NCAM16.2	Maus IgG2b	1:50	1	BD
Beriglobin				1:50	1	Aventis
PBS					39,25	
Gesamtvolumen Antikörper-Mix Oberfläche					50	
Lebend-Tot-Diskrimination						
DAPI	wie V500			1:100	1	Roche

4.11 Färbung von Oberflächenmerkmalen

Um Oberflächenmoleküle auf den verschiedenen Lymphozytenpopulationen durchflusszytometrisch untersuchen zu können, erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Zelloberfläche. Für das CD4⁺ T-Zell-Stimulationspanel wurden die nach der Erythrozytenlyse verbleibenden Zellen gefärbt. Für das T-Zell-Naivitäts- und das T-Zell-Aktivierungspanel wurden jeweils 5×10^6 PBMCs eingesetzt. Um unspezifische Bindungen der eingesetzten monoklonalen Antikörper mit ihrem konstanten Teil (F_c -Region) an den auf diversen Leukozyten oberflächlich exprimierten F_c -Rezeptor zu unterbinden, wurde in jeder Färbung Beriglobin (2 mg/mL) eingesetzt, das diese Rezeptoren besetzt. Die in den Tabellen 4.10.1 – 5 genannte Menge des Antikörpermixes für die Oberflächenfärbung der verschiedenen Panels wurde zum in 100 μL PBS gelösten Zelniederschlag hinzugegeben und gründlich resuspendiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubationszeit in Dunkelheit bei

Raumtemperatur (RT). Die Färbereaktion wurde durch das Waschen mit PBS/BSA abgestoppt.

4.12 Lebend-Tot-Diskrimination

Um auch nach Zellfixierung zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können wurde vor Fixierung eine Färbung mit LIVE/DEAD® *Fixable Dead Cell Stain* vorgenommen. In tote Zellen kann der Farbstoff durch die nicht mehr intakte Zellmembran eindringen und diese so intrazellulär markieren. Die Färbung erfolgte zeitgleich mit der Oberflächenfärbung. Hierfür wurde der gemäß den Herstellerangaben in DMSO gelöste Farbstoff im Verhältnis von 1:10 mit PBS vorverdünnt und anschließend in der Konzentration 1:100 eingesetzt.

Da das T-Zell-Naivitätspanel im Gegensatz zu den anderen Panels ausschließlich oberflächengefärbt wurde und daher keine spätere Fixierung der Zellen erforderlich war, wurden diese Proben zur Lebend-Tot-Diskrimination unmittelbar vor der Messung am Durchflusszytometer mit DAPI (4',6'-Diamino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid, 0.01µg/mL) gefärbt.

4.13 Zellfixierung und -permeabilisierung

Zur Fixierung der Zellen nach Abschluss der Oberflächen- und Lebend-Tot-Färbung wurde der Zellniederschlag in 2 mL BD FACS Lysing Solution™ gelöst und anschließend für 10 min in Dunkelheit bei RT inkubiert. Anschließend wurde ohne Zugabe von Waschpuffer direkt zentrifugiert. Die fixierten Zellen für das CD4⁺ T-Zell-Stimulationspanel wurden im nächsten Schritt in 500 µL BD FACS Permeabilizing Solution 2™ resuspendiert und erneut für 10 min bei 20 °C und Dunkelheit inkubiert, um die Zelloberfläche für die anschließende intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung durchlässig zu machen. Abschließend erfolgte das einmalige Waschen mit PBS/BSA, um den Permeabilisationsprozess zu unterbrechen.

Die Fixierung des T_{reg} Zell- und des T Zell-Aktivierungspanels erfolgte durch das Inkubieren des in 1 mL eBioscience Fox-P3 Fixationspuffers resuspendierten Zellpellets für 30 min bei 4 °C in Dunkelheit. Nun wurde einmal mit PBS/BSA und anschließend mit 2mL eBioscience Fox-P3 Permeabilisationspuffer gewaschen.

4.14 Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen und Aktivierungsmarkern im CD4⁺ T Zell-Stimulationspanel sowie dem Zellproliferationsmarker Ki-67 im T-Zell-Aktivierungspanel wurde der Zellniederschlag in 100 µL PBS/BSA (CD4⁺ T Zell-Stimulationspanel) bzw. in 100 µL eBioscience Fox-P3 Permeabilisationspuffer (T_{reg} Zell- und T Zell-Aktivierungspanel) gelöst und mit den in den Tabellen Xc und Xd angegebenen Menge des intrazellulären Antikörpermixes resuspendiert. Die Färbung erfolgte für 30 min bei RT und Dunkelheit. Um den Färbeprozess zu unterbrechen wurde abschließend mit PBS/BSA (CD4⁺ T Zell-Stimulationspanel) bzw. mit eBioscience Fox-P3 Permeabilisationspuffer (T_{reg} Zell- und T Zell-Aktivierungspanel) gewaschen.

4.15 Durchflusszytometrische Zellzählung

Um für die in der Durchflusszytometrie gemessenen relativen Verteilungen der Zellpopulationen und ihrer Untergruppen auch absolute Zellzahlen im peripheren Blut zu bestimmen, wurde das BD Trucount™ Verfahren gewählt. Hierbei wurden die gleichnamigen Analyseröhrchen eingesetzt, die eine definierte Anzahl von *beads* enthalten, fluoreszierende Partikel, die im Durchflusszytometer detektiert werden können. In diese wurden 50µL Vollblut gegeben, welche dann für 15 min mit der in Tab Xe angegebenen Menge des Antikörpermixes bei 20 °C in Dunkelheit gefärbt. Danach wurden 500 µL Erythrozytenlyse-Puffer hinzugegeben, um die vorhandenen Erythrozyten zu lysieren und den Färbeprozess zu unterbrechen.

Die Berechnung der Zellzahlen erfolgte anhand der folgenden Gleichung:

$$\frac{\text{\# der events in Ziel-Zellregion}}{\text{\# der events in bead-Region}} \times \frac{\text{\# der beads im Trucount-Tube}}{\text{Probenvolumen (\mu L)}} = \text{Absolute Zellzahl pro } \mu\text{L Vollblut}$$

Die sowohl im Zellzählungspanel als auch in allen weiteren Panels vorhandenen Marker CD3 und CD4 stellten die Verbindung zwischen den aus dem Vollblut ermittelten,

absoluten Zellzahlen und den relativen Verteilungen der CD4⁺ Population und ihrer Untergruppen in den anderen Panels dar.

4.16 Messung der Viruslast durch RT-qPCR

Mittels *Real-time reverse transcription-quantitative* PCR (RT-qPCR) wurde die Höhe der im Serum vorliegenden YFV-17D Viruslast an den Tagen 0, 2, 4, 7 und 10 nach Impfung bestimmt. Die Messungen wurden von unserem Kooperationspartner im Robert Koch-Institut, Berlin (RKI) aus eingefrorenen, bei -80°C gelagerten Serumproben durchgeführt gemäß des von Domingo und Kollegen etablierten Protokolls (Domingo, Patel et al. 2012).

4.17 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis Gelbfieber-spezifischer Antikörper

YFV-spezifische IgM und IgG Antikörper wurden an allen Studientagen mit dem YFV-spezifischen indirekten Immunfluoreszenzassay (IIFA) von EUROIMMUN durch unseren Kooperationspartner im RKI (semi-quantitativ bestimmt (0 entspricht negativ, positiv nach aufsteigender Fluoreszenzintensität in drei Stufen von 1-3). Hierbei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt

4.18 Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT90)

Ebenso wie die YFV-Antikörper-Bestimmung wurde der PRNT90 durch unseren Kooperationspartner im RKI durchgeführt. Hierzu wurden PS-Zellen in Leibowitz-Medium unter Zugabe von 5% FCS und 1% Glutamin kultiviert. Jede Serumprobe beginnend ab Tag 4 nach Impfung (Stichprobenkontrolle an Tag 0) wurde vierfach getestet in aufsteigender Verdünnung von 1:10 bis 1:320. Die Seren wurden mit 100 *Plaque-forming units* (PFU) des Virusstamms YF-17D versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden jeweils 6×10^5 /mL PS-Zellen in 24-well Platten mit dem erhaltenen Serum-Virus-Gemisch für insgesamt 4 Tage bei 37°C kultiviert. Nach Abschluss der ersten 4 Stunden wurde eine Carboxymethylcellulose-Lösung (CMC/L-15) in einer Endkonzentration von 0.8% hinzugegeben. Nach 4 Tagen erfolgte die Fixierung der Zellen mit 3.7% Formaldehyd und die anschließende Färbung mit Naphtalen-Schwarz über 30

min. Abschließend wurden die Plaques gezählt und die 90%-Neutralisierungstiter (NT) anhand der Formel von Reed und Münch berechnet (Reed and Muench 1938).

4.19 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von Antikörper gegen Flaviviren vor Impfung

Zur Bestimmung potentiell kreuzreaktiver, vorbestehender Antikörper gegen weitere Viren der Gattung *Flaviviridae* wurde aus am Tag 0 vor Impfung gewonnenem Serum der Flaviviren-Mosaik 1-IIFA (Euroimmun) mit Nachweismöglichkeit für Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, Japanische Enzephalitis-Virus, West-Nil-Virus 1, und YFV-spezifische Antikörper gemäß den Herstellerangaben durch unseren Kooperationspartner im RKI durchgeführt.

4.20 Datenanalyse und statistische Auswertung

Alle Durchflusszytometrie-Daten wurden mit Flowjo™ Version 9.4.11 ausgewertet. Die zur Analyse der verschiedenen Zellpopulationen verwendeten Auswahlfenster (*Gates*) und ihre hierarchische Anordnung (*Gating*-Strategie) sind im Ergebnisteil den Auswertungen der verschiedenen Panels vorangestellt. Das in 5.10. angewandte Verfahren des *Boolean Gatings* zur Analyse höherfunktionaler CD4⁺ T Zellen wurde mithilfe der Anwendung SPICE 5.3 durchgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen von Graphen wurden sofern nicht anders angegeben mit Graphpad Prism® Version 5 für Mac OS X erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mit Graphpad Prism®. Für die Untersuchung des Verlaufs bestimmter durch die Impfung induzierter Veränderungen der betrachteten Zellpopulationen wurde der zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Die Betrachtung von Unterschieden zwischen den anhand von Alter und dem Vorhandensein einer im Serum detektierbaren Virämie gebildeten Probandengruppen wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben analysiert. Für Korrelationsanalysen wurde sofern nicht anders angegeben der Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman* für nicht normalverteilte Daten angewendet. Der Exakte Test nach Fisher diente der Untersuchung, von kategorischen Daten (Eintreten

bzw. Ausbleiben einer Virämie) und ihrer Verteilung auf gebildete Gruppen (männlich/weiblich). Als statistisch signifikant wurde bei allen Analysen $p \leq 0.05$ (*) angesehen; $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***).

5 ERGEBNISSE

5.1 YFV-17D-Serumvirämie

Der verabreichte Gelbfieberimpfstoff Stamaril® enthält den attenuierten Virusstamm YFV-17D. Dieser ist in der Lage, menschliche Zellen zu infizieren und sich so zu replizieren. Bei der Mehrheit der geimpften Probanden ließ sich dies mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) im Serum nachweisen. 20 der 24 Probanden (83%) zeigten an einem oder mehreren der analysierten Tage (2, 4, 7, 10) eine Viruslast oberhalb der Detektionsgrenze. Diese werden im Folgenden als „Virämie-positiv“, die verbleibenden vier als „Virämie-negativ“ bezeichnet. In Abb. 5.1.A ist der prozentuale Anteil der Virämie-positiven Probanden im Verlauf der ersten zehn Tage nach Impfung dargestellt. Bei 12 von 13 (92,3%) der älteren Probanden gelang an mindestens einem Studientag der Nachweis von YFV-17D-Viruspartikeln im Serum, in der jüngeren Gruppe war dies bei 7 von 11 (72,8%) Teilnehmern der Fall (Abb. 5.1.B). Interessanterweise waren alle Virämie-negativen Spender Frauen ($p=0.03$, Exakter Test nach Fisher). Da Übersichtsarbeiten und Fallstudien eine anhaltende bzw. quantitativ stark ausgeprägte Serumvirämie als Risikofaktor für das Auftreten einer schwer verlaufenden Impfkomplication diskutieren, wurden sowohl die jeweilige Zahl der nachweisbaren Viruskopien (GE=*Genomic Equivalents*) als Ausmaß der Virämie untersucht sowie der Zeitpunkt und die absolute Höhe des Virämiemaximums. Die geschlechtsgetrennte Analyse ergab eine signifikant niedrigere maximale Viruslast bei weiblichen Teilnehmern ($p=0.025$, Mann Whitney Test), jedoch keine Unterschiede bezüglich des Zeitpunktes des Höhepunkts (Abb. 5.1.C & D). Die absolute Höhe der maximal detektierten Viruslast unterschied sich im Median nicht zwischen alten und jungen Probanden (Abb. 5.1.C), allerdings bestand eine signifikante, positive Korrelation zwischen dem Probandenalter und dem Tag der maximalen Viruslast ($R=0.47$, $p=0.04$, Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman*) (Abb. 5.1.E). So wurde die maximal detektierte Viruslast bei zwei Teilnehmern der älteren Gruppe erst an Tag 10 (letzter Analysetag) erreicht, was für keinen der jungen Probanden zutraf.

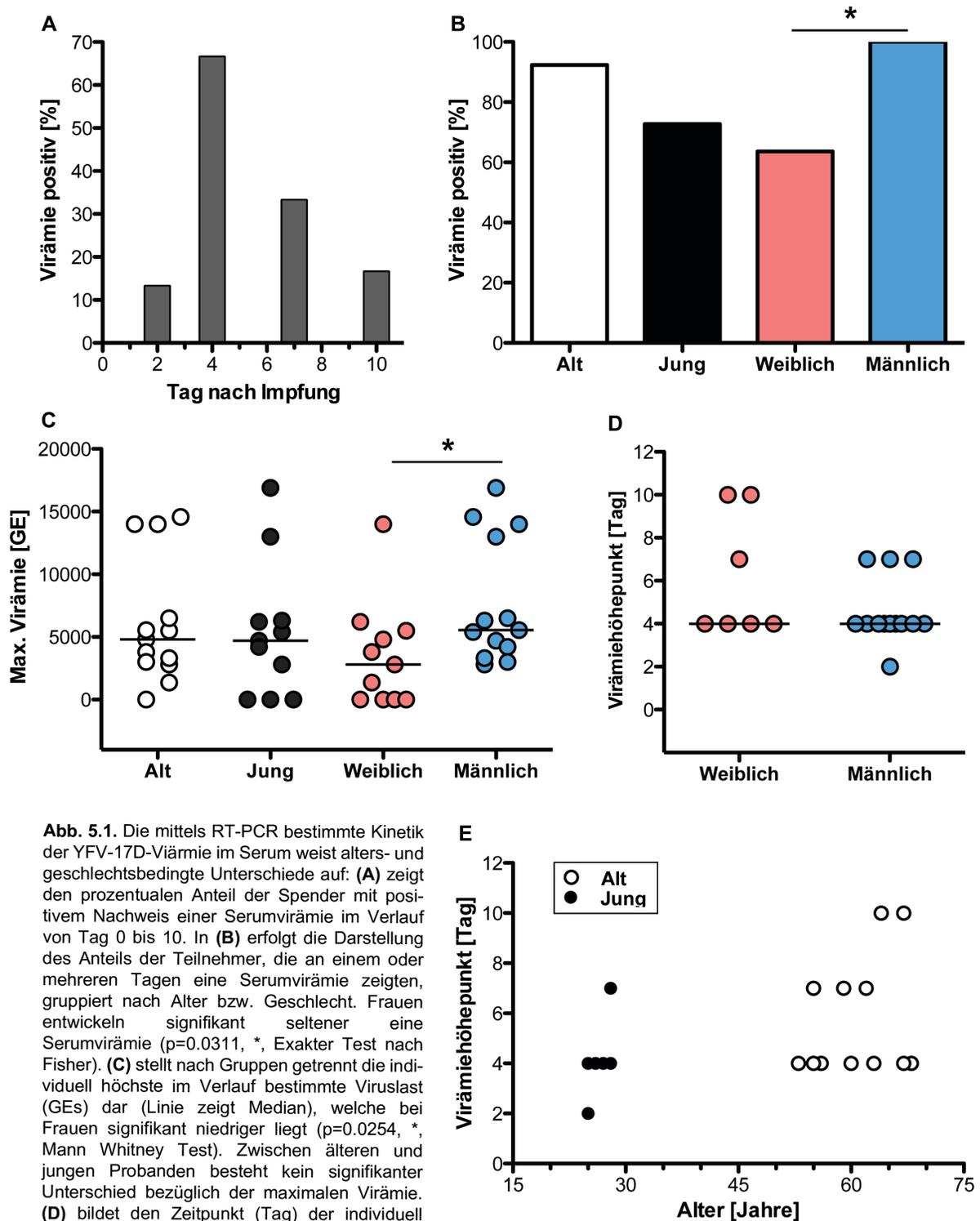


Abb. 5.1. Die mittels RT-PCR bestimmte Kinetik der YFV-17D-Virämie im Serum weist alters- und geschlechtsbedingte Unterschiede auf: **(A)** zeigt den prozentualen Anteil der Spender mit positivem Nachweis einer Serumvirämie im Verlauf von Tag 0 bis 10. In **(B)** erfolgt die Darstellung des Anteils der Teilnehmer, die an einem oder mehreren Tagen eine Serumvirämie zeigten, gruppiert nach Alter bzw. Geschlecht. Frauen entwickeln signifikant seltener eine Serumvirämie ($p=0.0311$, *, Exakter Test nach Fisher). **(C)** stellt nach Gruppen getrennt die individuell höchste im Verlauf bestimmte Viruslast (GEs) dar (Linie zeigt Median), welche bei Frauen signifikant niedriger liegt ($p=0.0254$, *, Mann Whitney Test). Zwischen älteren und jungen Probanden besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der maximalen Virämie. **(D)** bildet den Zeitpunkt (Tag) der individuell höchsten Viruslast ab, der sich zwischen Männern und Frauen nicht unterscheidet (Linie zeigt Median). In **(E)** ist die signifikante Korrelation nach Spearman ($R=0.4691$, $p=0.0369$,*) zwischen aufsteigendem Probandenalter (Jahre) und später eintretendem Virämiemaximum (Tage nach Impfung).

5.2 Neutralisierende Antikörper

Ein wichtiger Bestandteil des protektiven Effekts der YFV-17D Impfung beruht auf der Bildung spezifischer Antikörper durch B-Lymphozyten, die in der Lage sind, Viren zu binden und diese so entweder direkt zu neutralisieren oder für andere Zellen des Immunsystems leichter identifizierbar zu machen („Opsonisierung“). Ob und in welchem Maße die nach Impfung gebildeten Antikörper in der Lage sind, das Referenzvirus YFV-17D zu neutralisieren und so Zellen vor einer Infektion zu schützen, kann mit einem Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT90) überprüft werden, der ab Tag 4 an jedem Studientag durchgeführt wurde. Alle Spender verfügten ab Tag 14 über neutralisierende Antikörper, und erreichten unabhängig des Alters das Maximum ihrer Neutralisationskapazität an Tag 17. Es zeigte sich, dass jüngere Probanden tendenziell schneller und insgesamt auch höhere Titer ausbildeten (Abb. 5.2.A). So verfügte die junge Gruppe an Tag 14 im Median über einen PRNT90-Titer von 100. In der älteren Gruppe lag dieser im Vergleich signifikant niedriger bei 70 ($p=0.05$, Mann Whitney Test) (Abb. 5.2.B). Zwischen weiblichen und männlichen Teilnehmern zeigten sich bis Tag 21 annähernd parallele Verläufe der NT-Kinetik, wobei Frauen an Tag 14 tendenziell höhere NTs ausbildeten. Eine deutliche Divergenz ergab sich dann jedoch am letzten Studienzeitpunkt ($p=0.06$, Mann Whitney Test): Weibliche Probanden erreichten an Tag 28 die im Gesamtverlauf höchste Neutralisationskapazität. In der männlichen Teilnehmergruppe war hingegen ein Abfall gegenüber Tag 21 zu verzeichnen (Abb. 5.2.C).

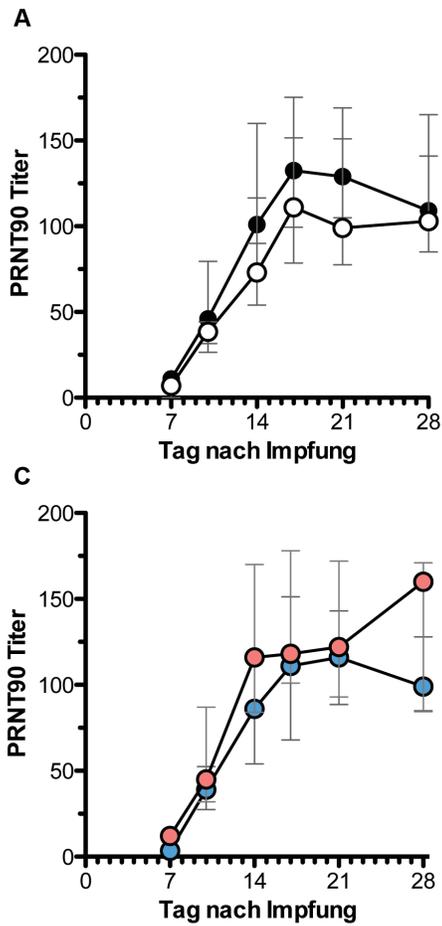


Abb. 5.2. In (A) ist die Titer-Kinetik YFV-17D neutralisierender Antikörper (NTs) abgebildet, die mittels PRNT bestimmt wurde. Bei allen Probanden lassen sich ab Tag 14 neutralisierende AKs nachweisen. Jüngere Probanden (●) erreichten protektive NTs tendenziell früher nach Impfung aus und erzielten ein höheres Maximalniveau als Ältere (○); dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. Besonders deutlich zeigt sich diese Differenz an Tag 14 ($p=0.0556$, Mann Whitney Test) (B). Die geschlechtsgetrennte Analyse in (C) ergibt bis eine ähnliche Kinetik der NTs bis Tag 21, allerdings besteht ein deutlicher Unterschied im weiteren Verlauf bis Tag 28 ($p= 0.0597$, Mann Whitney Test). Die weibliche Probandengruppe (○) erreicht hier im Median die maximale Neutralisationskapazität, wohingegen diese bei männlichen Teilnehmern (●) gegenüber Tag 21 bereits wieder abfällt.

5.3 YFV-17D-spezifische Antikörper-Antwort (IgM und IgG)

Mithilfe des indirekten α -YFV-Immunfluoreszenzassay (IIFA) konnten YFV-17D-spezifisches IgM und IgG getrennt semiquantitativ bestimmt werden. Bei allen Probanden war ab Tag 17 ein positiver Nachweis Gelbfieber-spezifischer Antikörper beider Immunglobulinklassen möglich. Spezifische IgM-AKs, die von reifen, naiven B Zellen initial gebildet werden, konnten bei nahezu allen Probanden (92%) ab Tag 14 bestimmt werden (Abb. 5.3.A). Die von langlebigen Plasma-B-Zellen nach Vollendung des Isotypen-Klassenwechsels sezernierten IgG-Antikörper wurden im Vergleich hierzu etwas verzögert im Serum nachweisbar. So verfügten an Tag 14 nur 50% der Individuen über YFV-17D-IgG (Abb. 5.3.B). Im altersgetrennten Gruppenvergleich zeigten sich im Verlauf keine signifikanten Unterschiede. Auch die semiquantitativ (0 entspricht negativ, positiv nach aufsteigender Fluoreszenzintensität in drei Stufen von 1-3) erhobene Kinetik der IgM- und IgG-Titer Höhe, wies keine signifikanten Differenzen zwischen älteren und jungen Probanden auf (Abb. 5.3.C & D). Es zeigte sich bei Betrachtung des Probandenalters in Jahren allerdings die Tendenz, dass mit steigendem Lebensalter eine später nach Impfung einsetzende Produktion von spezifischem IgM einhergeht ($R=0.33$, $p=0.11$, Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman*) (Abb. 5.3.E). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Teilnehmern.

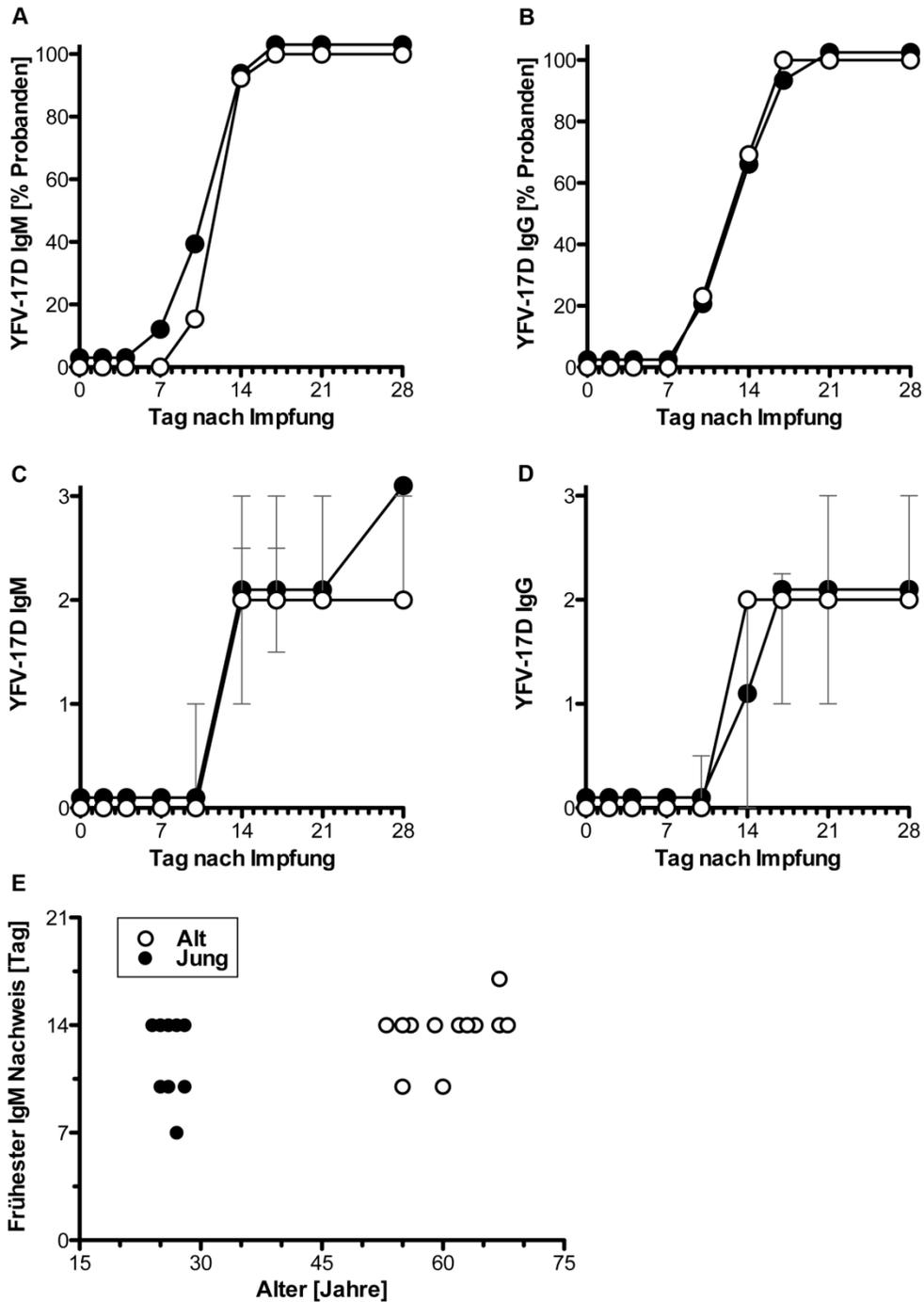


Abb. 5.3. Mittels YFV-IIFA wurde die Kinetik von spezifischem IgM und IgG im Serum analysiert. **(A)** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Probanden im Verlauf nach Impfung, bei denen ein positiver Nachweis von YFV-17D-IgM erfolgte. **(B)** zeigt dies analog zu (A) für YFV-IgG. Es sind keine signifikanten Differenzen zwischen der jungen (●) und älteren (○) Teilnehmergruppe ersichtlich. Die Bestimmung der Titerhöhe erfolgte semi-quantitativ, 0 entspricht negativ, positiv nach aufsteigender Fluoreszenzintensität von 1-3 **(C)** und **(D)**. Auch hier ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen, dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde der Graph jeweils der jungen Probanden in den Abb. 5.3. A & B um 5 Datenpunkte auf der Y-Achse angehoben, in C & D um 0.5. **(E)** zeigt den frühesten Tag nach Impfung, an dem für den jeweiligen Teilnehmer ein positiver Nachweis von YFV-17D-IgM stattfand in Relation zum Alter in Jahren. Bei älteren Individuen lag dieser Zeitpunkt tendenziell später ($R=0.3313$, $p=0.1137$, Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman).

5.4 Absolute CD4⁺ T Zellzahlen im peripheren Blut

Die Zahl der im peripheren Blut zirkulierenden CD4⁺ T Zellen wurde an allen Studientagen mithilfe des Zellzahlpanels bestimmt. Die *Gating*-Strategie ist in Abb. 5.4.A dargestellt.

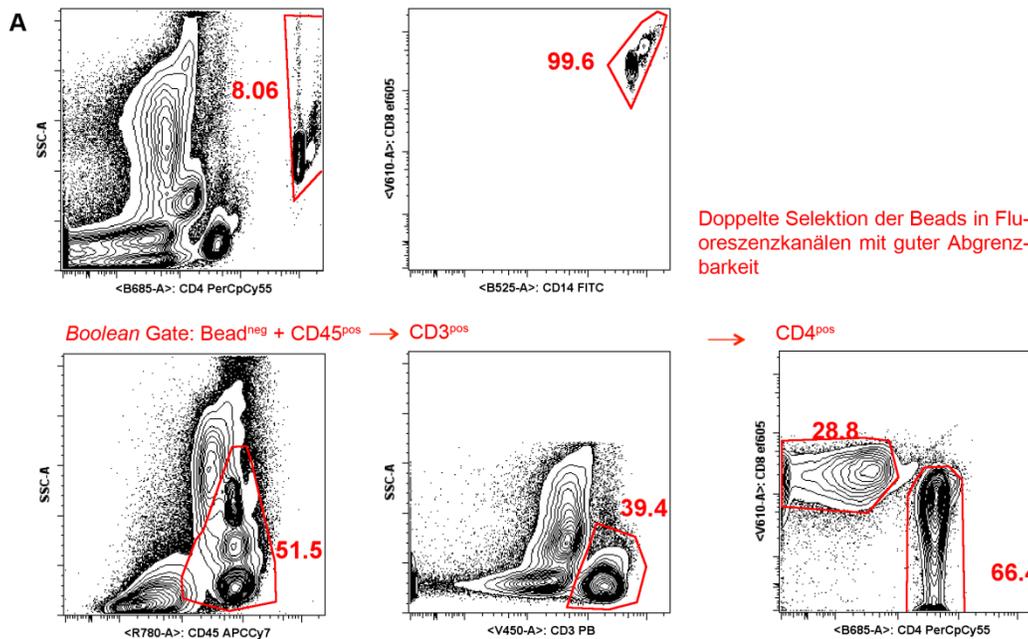


Abb. 5.4. Mithilfe des Trucount-Verfahren wurde die Zahl zirkulierender CD4⁺ T Zellen im Verlauf nach Impfung analysiert. **(A)** zeigt die Gating-Strategie: Zunächst wurden die beads in Fluoreszenzkanälen mit guter Abgrenzbarkeit 2-fach selektiert. CD4⁺ T Zellen wurden als Bead^{neg}/CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺ definiert. Die im bead-Gate erhobene Event-Zahl erlaubt einen Rückschluss auf das analysierte Probenvolumen, die Berechnung der Zellzahl erfolgte gemäß der in 4.15. beschriebenen Formel.

Die CD4⁺ T Zellzahlen waren vor Impfung bei allen Probanden normwertig und zeigten keine Differenzen zwischen den Altersgruppen. Die CD4⁺ T-Zellzahl nahm innerhalb der ersten sieben Tage nach Impfung zunächst drastisch ab und fiel um ca. ein Drittel in Bezug auf das Ausgangsniveau (710/μL vs. 490/μL). Dieser Abfall zeigte sich äußerst konsistent bei 22 von 24 Individuen. Bis Tag 17 stiegen die Zellzahlen dann signifikant an auf 115% des Anfangswertes (710/μL vor Impfung vs. 830/μL an Tag 17) und fielen bis Tag 28 wieder auf das Ausgangsniveau (B) (Angaben in Bezug auf den Median). In der betrachteten Kinetik ließen sich weder alters- noch geschlechtsspezifische Differenzen feststellen (Abb. 5.4.C & D). Allerdings verfügten Probanden ohne nachweisbare Serumvirämie im Gesamtverlauf über tendenziell höhere Zellzahlen und zeigten einen weniger drastischen Rückgang der zirkulierenden CD4⁺ T Zellen an Tag 7, der im Median nur 20% betrug (vgl. 65% für Virämie-positive Spender) (Abb. 5.4.E).

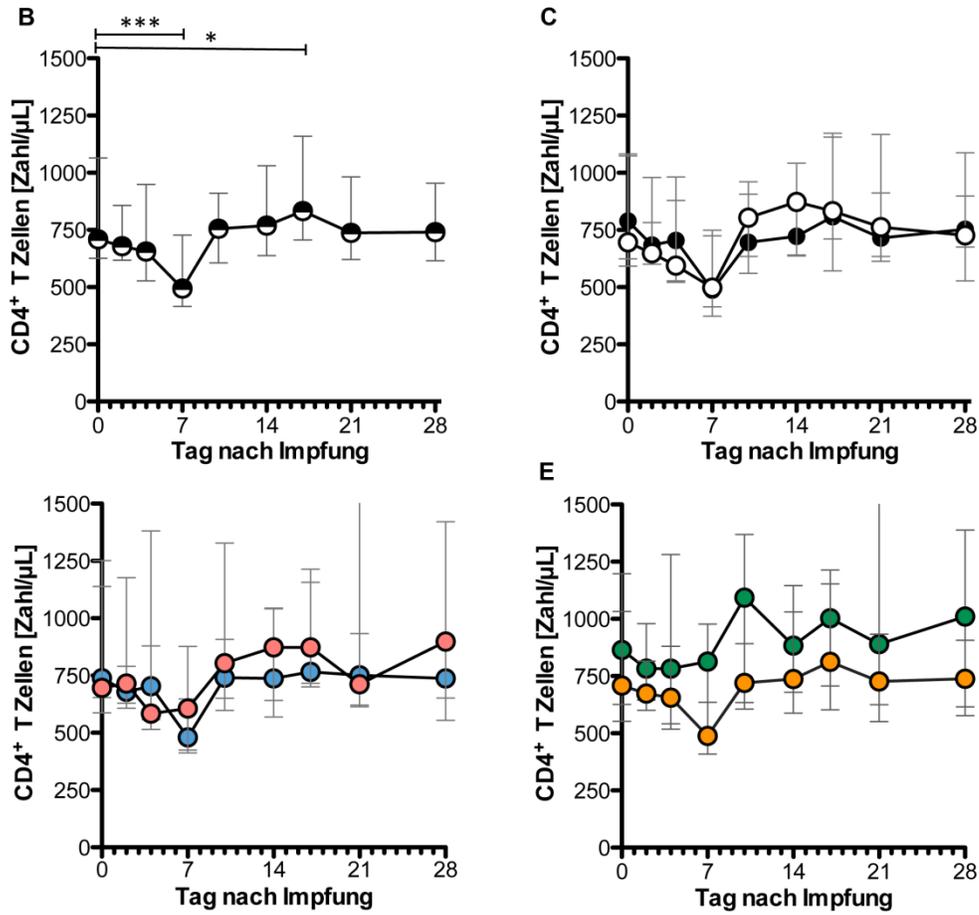


Abb. 5.4. (B) Nach Impfung ist bei nahezu allen Probanden (●) ein deutlicher Abfall der zirkulierenden CD4+ T Zellen bis Tag 7 zu verzeichnen, der unabhängig von Alter (C) oder Geschlecht (D) eintritt. Im weiteren Verlauf bis Tag 28 steigen die Zellfrequenzen wieder an und kehren auf das Ausgangsniveau vor Impfung zurück. Die in (B) angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf Veränderungen der CD4+ T Zellzahl/ μ L an den jeweiligen Tagen im Vergleich zu Tag 0 vor Impfung (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$). Virämie-negative Spender (●) verfügen tendenziell über etwas höhere CD4+ T Zellzahlen und zeigen einen moderateren Rückgang in der ersten Woche als Virämie-positive (●) (D). Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand (B-D).

5.5 Recent Thymic Emigrants

Nach ihrer Bildung im Knochenmark durchlaufen unreife T Zellen weitere Entwicklungsschritte im Thymus, bevor sie im Anschluss als reife, naive T Zellen im menschlichen Körper im Blut und den lymphatischen Organen zirkulieren. Mit zunehmendem Lebensalter sinkt die Anzahl der aus dem Thymus austretenden CD4⁺ T Zellen kontinuierlich ab (*Recent Thymic Emigrants* = RTE). Die Gesamtzahl der im Blut zirkulierenden CD4⁺ T Zellen bleibt jedoch bis ins hohe Alter relativ konstant, was unter anderem auf die Fähigkeit naiver T Zellen zur homöostatischen Proliferation in der Peripherie zurückgeführt werden kann. Die Unterscheidung zwischen RTEs und homöostatisch proliferierten naiven CD4⁺ T Zellen ist mithilfe des Oberflächenmarkers CD31 (PECAM-1) möglich. Dieser wird von RTEs exprimiert, wohingegen er auf homöostatisch proliferierten CD4⁺ T Zellen fehlt. Der Anteil CD31⁺ CD4⁺ T Zellen im peripheren Blut gibt somit Aufschluss über das Aktivitätsniveau des Thymus’.

In Abb. 5.5.A ist die *Gating*-Strategie zur Bestimmung der RTE-Frequenz vor Impfung abgebildet, die neben CD31 auf der Positivselektion weiterer Naivitätsmarker (CD45RA, CD62L und CD27) beruht.

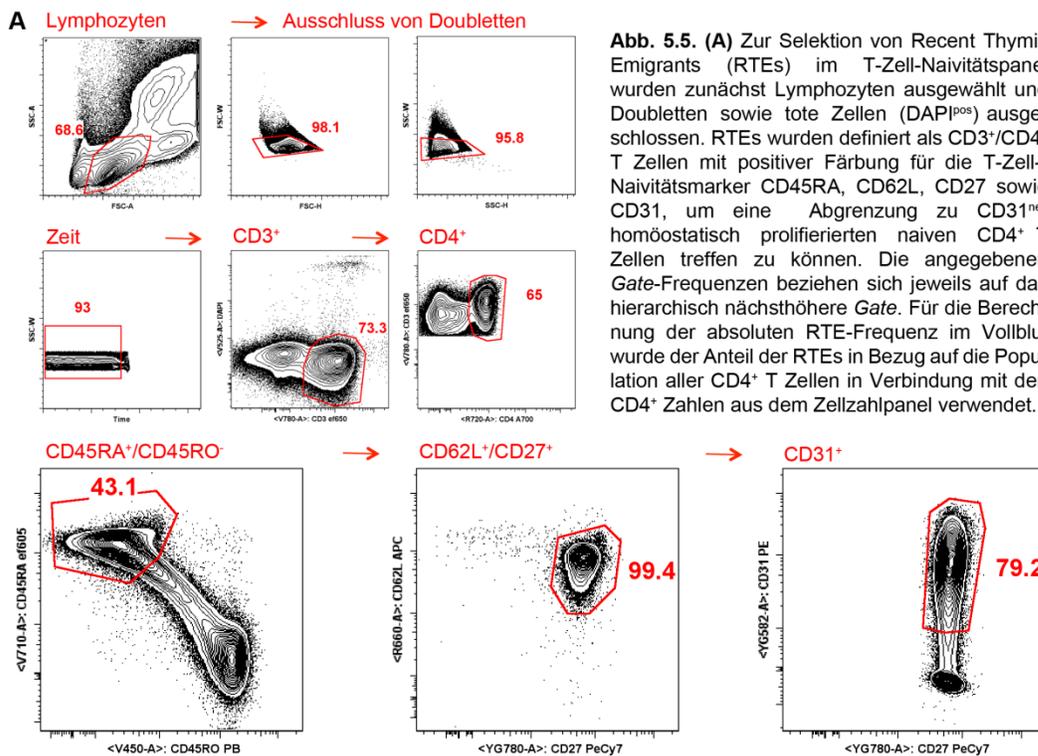


Abb. 5.5. (A) Zur Selektion von Recent Thymic Emigrants (RTEs) im T-Zell-Naivitätspanel wurden zunächst Lymphozyten ausgewählt und Doubletten sowie tote Zellen (DAPI^{pos}) ausgeschlossen. RTEs wurden definiert als CD3⁺/CD4⁺ T Zellen mit positiver Färbung für die T-Zell-Naivitätsmarker CD45RA, CD62L, CD27 sowie CD31, um eine Abgrenzung zu CD31^{neg} homöostatisch proliferierten naiven CD4⁺ T Zellen treffen zu können. Die angegebenen *Gate*-Frequenzen beziehen sich jeweils auf das hierarchisch nächsthöhere *Gate*. Für die Berechnung der absoluten RTE-Frequenz im Vollblut wurde der Anteil der RTEs in Bezug auf die Population aller CD4⁺ T Zellen in Verbindung mit den CD4⁺ Zahlen aus dem Zellzahlpanel verwendet.

Die Probanden der jüngeren Gruppe verfügten bei vergleichbaren Gesamt-CD4⁺-T-Zellzahlen über doppelt so viele RTEs (Median) zum Zeitpunkt vor Impfung als die ältere Probandengruppe (Abb. 5.5.B). Es zeigte sich eine deutliche negative Korrelation zwischen dem Lebensalter der Probanden und der Zahl der RTEs (Abb. 5.5.C) ($R=-0.49$, $p=0.014$, Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman). Zudem ließ sich die Tendenz verzeichnen, dass Individuen, die keine Virämie nach Impfung entwickelten, an Tag 0 über eine höhere Zahl an RTEs verfügten, als Virämie-positive Spender (Abb. 5.5.D). Interessanterweise ergab sich innerhalb der höheren Altersgruppe eine Aufteilung anhand des Geschlechts der Spender, Frauen verfügten hier über signifikant mehr RTEs als Männer. In der jüngeren Altersgruppe hingegen war die RTE-Frequenz bei weiblichen und männlichen Teilnehmern vergleichbar (Abb. 5.5.E).

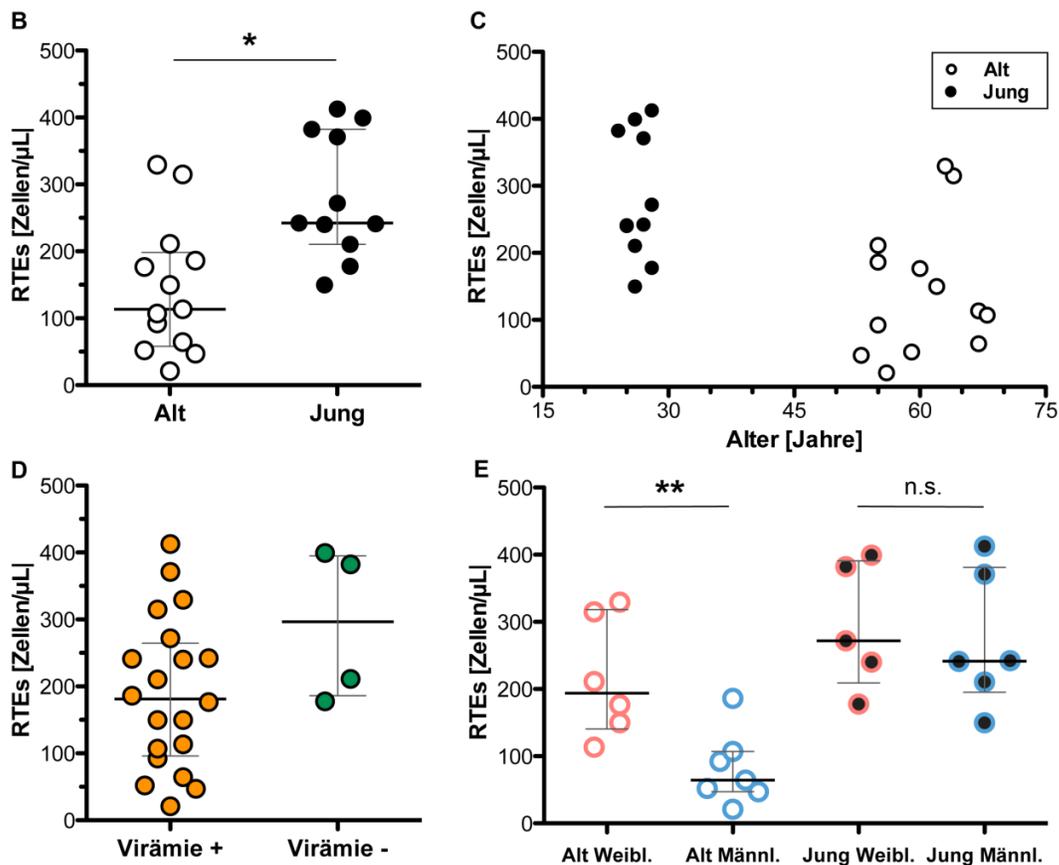


Abb. 5.5. (B) Die vor Impfung ermittelte Frequenz von RTE CD4⁺ T Zellen im peripheren Blut liegt bei älteren Probanden im Median um mehr als die Hälfte niedriger als bei jungen ($p=0.0031$, **, Mann Whitney Test). (C) Dies zeigt sich auch deutlich bei Betrachtung des realen Lebensalters (Jahren), die eine Binnendifferenzierung in der älteren Probandengruppe ersichtlich macht ($R=-0.4912$, $p=0.0148$, *, Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman). (D) Probanden, die im Verlauf keine Serumvirämie entwickelten, verfügten an Tag 0 über tendenziell höhere RTE-Frequenzen als Virämie-positive Teilnehmer. Die in (E) abschließend dargestellte Auftrennung nach Alter und Geschlecht verdeutlicht, dass zwischen Frauen und Männern der höheren Altersgruppe ein signifikanter Unterschied in der RTE-Zellzahl besteht ($p=0.0082$, **, Mann Whitney Test), wohingegen junge Frauen und Männer über vergleichbare Frequenzen verfügen. Darstellung von Median und Interquartilsabstand in B, D und E.

5.6 Oberflächen-Phänotypisierung von naiven und Gedächtnis- CD4⁺ T Zellpopulationen im Verlauf

Die Kombination der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA erlaubt eine Unterteilung der CD4⁺ T Zellen in vier Populationen – naive (CCR7⁺ CD45RA⁺), zentrale „CM“ Gedächtnis- (CCR7⁺ CD45RA⁻), Effektor-Gedächtnis- (CCR7⁻ CD45RA⁻) und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis- (CCR7⁻ CD45RA⁺) T Zellen – die sich hinsichtlich ihrer Proliferations-, Migrations- und Aktivierungseigenschaften voneinander unterscheiden lassen (Sallusto, Lenig et al. 1999). Abb. 5.6.A zeigt die für diese Analyse für das T-Zell-Aktivierungspanel angewandte *Gating*-Strategie.

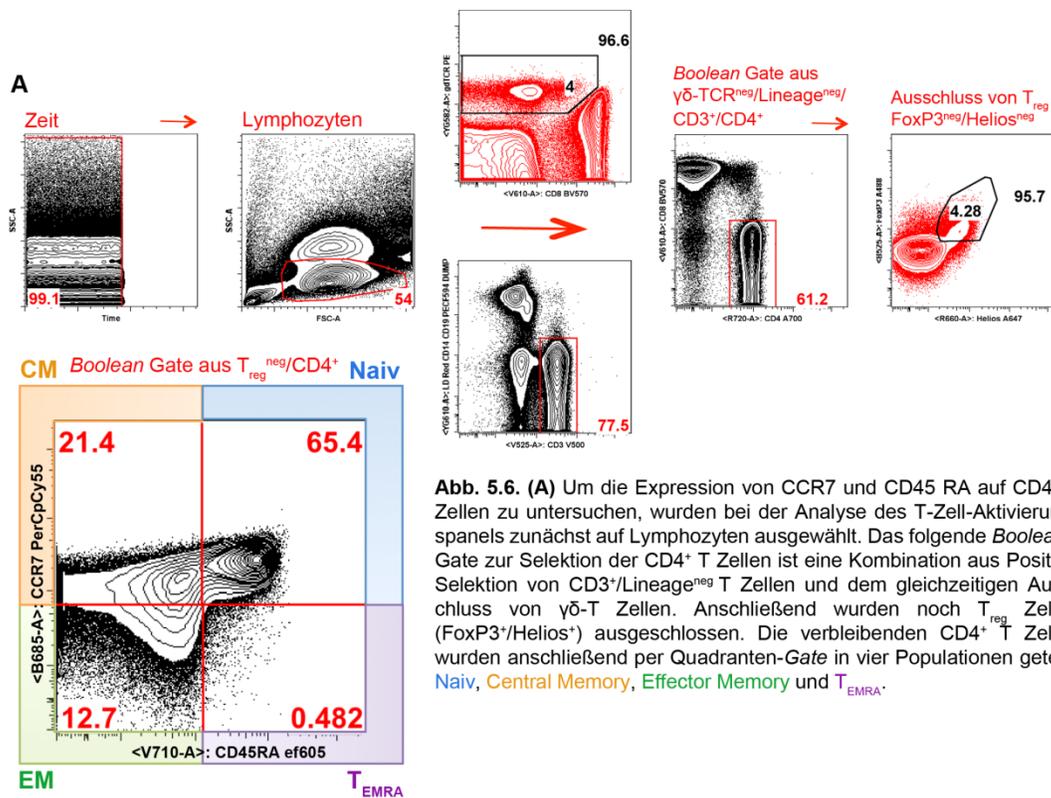


Abb. 5.6. (A) Um die Expression von CCR7 und CD45 RA auf CD4⁺ T Zellen zu untersuchen, wurden bei der Analyse des T-Zell-Aktivierungspanels zunächst auf Lymphozyten ausgewählt. Das folgende *Boolean*-Gate zur Selektion der CD4⁺ T Zellen ist eine Kombination aus Positiv-Selektion von CD3⁺/Lineage^{neg} T Zellen und dem gleichzeitigen Ausschluss von $\gamma\delta$ -T Zellen. Anschließend wurden noch T_{reg} Zellen (FoxP3⁺/Helios⁺) ausgeschlossen. Die verbleibenden CD4⁺ T Zellen wurden anschließend per Quadranten-Gate in vier Populationen geteilt, Naiv, Central Memory, Effektor Memory und T_{EMRA}.

Nach Gelbfieberimpfung wiesen die vier Subgruppen unterschiedliche Verläufe ihrer Frequenz im peripheren Blut auf, die aus der relativen Verteilung und der im Zellzahlpanel ermittelten CD4⁺ T Zellzahl bestimmt werden konnte. Aufgrund eines technischen Fehlers an Tag 0 stehen für diesen Datensatz erst ab Tag 2 nach Impfung Ergebnisse zur Verfügung. Naive und zentrale Gedächtnis-CD4⁺ T Zellen (CM) zeigten bis Tag 7 gegenüber Tag 2 eine signifikante Abnahme und einen anschließenden Wiederanstieg zurück auf das Ausgangsniveau bis Tag 21. Am deutlichsten fiel der initiale Abfall in der Population der naiven CD4⁺ T Zellen aus (CCR7⁺/CD45RA⁺) aus, der hier einen Rückgang auf die Hälfte des Ausgangsniveaus darstellte (Naiv: p<0.001, CM: p<0.001). Im Gegensatz hierzu blieb die Populationsgröße der Effektor-Gedächtnis-Zellen (CCR7⁻/CD45RA⁻) bis Tag 7 zunächst konstant und stieg im erst im weiteren Verlauf bis Tag 14 signifikant auf das 1.5-fache des Ausgangswertes an (p<0.001). Die sehr kleine Population der terminal-differenzierten Effektor-Gedächtnis-Zellen (T_{EMRA}) wies eine ähnliche Kinetik mit einem signifikanten Maximum gegenüber Tag 2 an Tag 14 auf (p=0.001, alle Analysen mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests) (Abb. 5.6.B). Die altersgetrennte Betrachtung der Subpopulationen zeigte annähernd parallele Verläufe der zwei Gruppen (Abb. 5.5.C – F), jedoch bei einem umgekehrten Verhältnis der Verteilung zentraler Gedächtnis- und naiver Zellen bei älteren und jungen Spendern. Letztere verfügten im Einklang zu den in 5.5. gezeigten RTE-Frequenzen über tendenziell größere Populationen naiver CD4⁺ T Zellen an Tag 2 (Abb. 5.6.C) und weniger CM-CD4⁺ T Zellen. Bei Effektor-Gedächtniszellen (EM) und T_{EMRA} ließen sich keine Differenzen zwischen den Altersgruppen nach Impfung feststellen (Abb. 5.6.E & F).

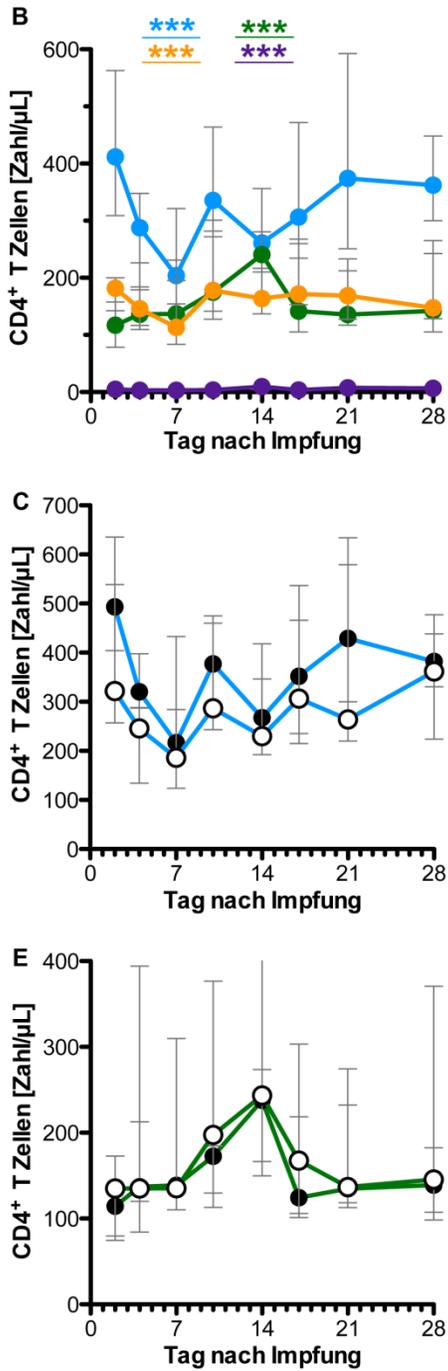


Abb. 5.6. (B) Die Verläufe der Zellfrequenz (Zellen/ μ L) der vier Subpopulationen nach Impfung weisen erhebliche Unterschiede auf im Vergleich zueinander: Die beiden CCR7^{pos} Populationen der CD45RA^{pos} naiven (●) und der CD45RA^{neg} CM (●) CD4⁺ T Zellen nehmen zunächst drastisch innerhalb der ersten Woche ab und kehren im weiteren Verlauf auf ihr Ausgangsniveau zurück (Tag 0-7, Naiv: p=0.0001, ***; CM: 0.0009, ***, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die CCR7^{neg} Gedächtniszellpopulationen der CD45RA^{neg} EM (●) und CD45RA^{pos} T_{EMRA} (●) CD4⁺ T Zellen bleiben in der ersten Woche konstant und steigen bis Tag 14 signifikant auf das 1.5-fache der Zellzahl vor Impfung an (EM: p=0.0005, ***; p=0.001, ***, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die Kinetiken für die getrennt betrachteten Altersgruppen verlief für die vier Subpopulationen annähernd parallel und sind in (C – Naiv), (D – CM), (E – EM) und (F – TEMRA) dargestellt. Allerdings lag zwischen älteren und jungen Spendern ein umgekehrtes Verhältnis der Ausgangsverteilung zwischen naiven und CM CD4⁺ T Zellen vor. Abgebildet sind Median und Interquartilsabstände.

5.7 Ex-vivo-Identifikation von YFV-17D-spezifischen CD4⁺ T Zellen

Um die durch die YFV-17D-Immunisierung aktivierten CD4⁺ T Zellen identifizieren und ihre Kinetik im Verlauf der Immunantwort untersuchen zu können, wurde für Identifikation in der Durchflusszytometrie eine Kombination aus dem Aktivierungsmarker CD38 sowie dem Proliferationsmarker Ki-67 gewählt. Das Transmembran-Glykoprotein CD38, das unter anderem der Zelladhäsion dient, findet sich in gesteigertem Maße auf der Zelloberfläche auf aktivierter Lymphozyten. Ki-67 in ein im Zellkern vorhandenes Protein dient als Identifikationsmarker sich teilender Zellen dient. Es kann in sämtlichen aktiven Phasen (G1, S, G2 und Mitose) des Zellzyklus intrazellulär detektiert werden, ist jedoch in ruhenden Zellen (G0) nicht vorhanden. Die *Gating*-Strategie, die zur Identifikation der YFV-17D-spezifischen T Zellen im T-Zell-Aktivierungspanel angewandt wurde, entspricht der in Abb. 5.6.A beschriebenen Selektion von konventionellen CD4⁺ T Zellen. Die *Gates* zur Auswahl der Population der doppelt-positiven Zellen (CD38/Ki-67) sind in Abb. 5.7.A für einen Spender an den Tagen 0, 10, 17 und 28 exemplarisch abgebildet.

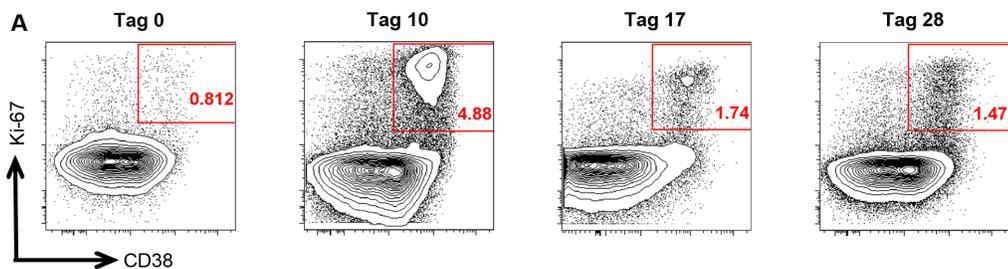


Abb. 5.7. (A) zeigt anhand eines exemplarischen Spenders die Kinetik YFV-17D-spezifischer CD4⁺ T Zellen an den Tagen 0, 10, 17 und 28. Den gezeigten *Dotplots* liegt die identische *Gating*-Strategie zur Auswahl von CD4⁺ T Zellen zugrunde, die in Abb. 5.6.A beschrieben wurde. Die in den Quadranten-*Gates* angegebenen Frequenzen von Ki-67⁺ CD38⁺ doppelt-positiven Zellen beschreiben den Anteil der CD4⁺ T Zellen, die im Rahmen nach Impfung aktiviert wurden und proliferierten.

Bei allen Probanden fand sich ab Tag 10 eine erhöhte Zahl von Ki-67⁺ CD38⁺ CD4⁺ T Zellen gegenüber dem Zeitpunkt vor Impfung. Die altersgetrennte Analyse zeigte, dass ältere Probanden zwar vergleichbar hohe Frequenzen aktivierter, proliferierender CD4⁺ T Zellen ausbilden, das Maximum jedoch tendenziell um einen Studientag verzögert erreichen ($p=0.06$, Mann Whitney Test) (Abb. 5.7.B & C). Bei Betrachtung der Kinetik zwischen Tag 10 und 14 wurde deutlich, dass bei jungen Teilnehmern in dieser Phase die Anzahl doppelt-positiver Zellen bereits wieder abnimmt ($p=0.007$, *Wilcoxon*-Vorzeichen-Rang-Test), bei den älteren hingegen zeigte sich ein gemischtes Bild aus abfallenden und

ansteigenden Verläufen (Abb. 5.7.D). Bezug auf die vor Impfung bestimmte RTE-Frequenz ergaben sich interessante Korrelationen: RTE-Zellzahlen standen in einem positiven statistischen Zusammenhang mit der Zahl der Ki-67⁺ CD38⁺ CD4⁺ T Zellen in der Expansionsphase nach Impfung (Tag 4: $R=0.53$ $p=0.007$, Tag 7: $R=0.48$, $p=0.016$, Korrelationsanalyse nach *Pearson*) (Tag 4 und 7, Abb. 5.7.E). Bei Personen mit höheren Frequenzen von Ki-67⁺ CD38⁺ CD4⁺ T Zellen an Tag 7 war ein signifikant früherer Höhepunkt der Serumvirämie nach Impfung zu verzeichnen ($R=-0.44$, $p=0.05$ Korrelationsanalyse nach *Pearson*) (Abb. 5.7.F). Ebenfalls bestand ein positiver statistischer Zusammenhang zwischen der Zahl YFV-17D-spezifischer CD4⁺ T Zellen (Ki-67⁺ CD38⁺) eines Individuums an Tag 10 und des Titers neutralisierender Antikörper am Endpunkt der Studie an Tag 28 ($R=0.5$, $p=0.01$, Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman*) (Abb. 5.7.G). Insgesamt legten diese Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen RTE-Zahl vor Impfung, der Akutphase der CD4⁺ T-Zellantwort sowie des Impferfolges im Hinblick auf Viruskontrolle und Antikörperantwort nahe.

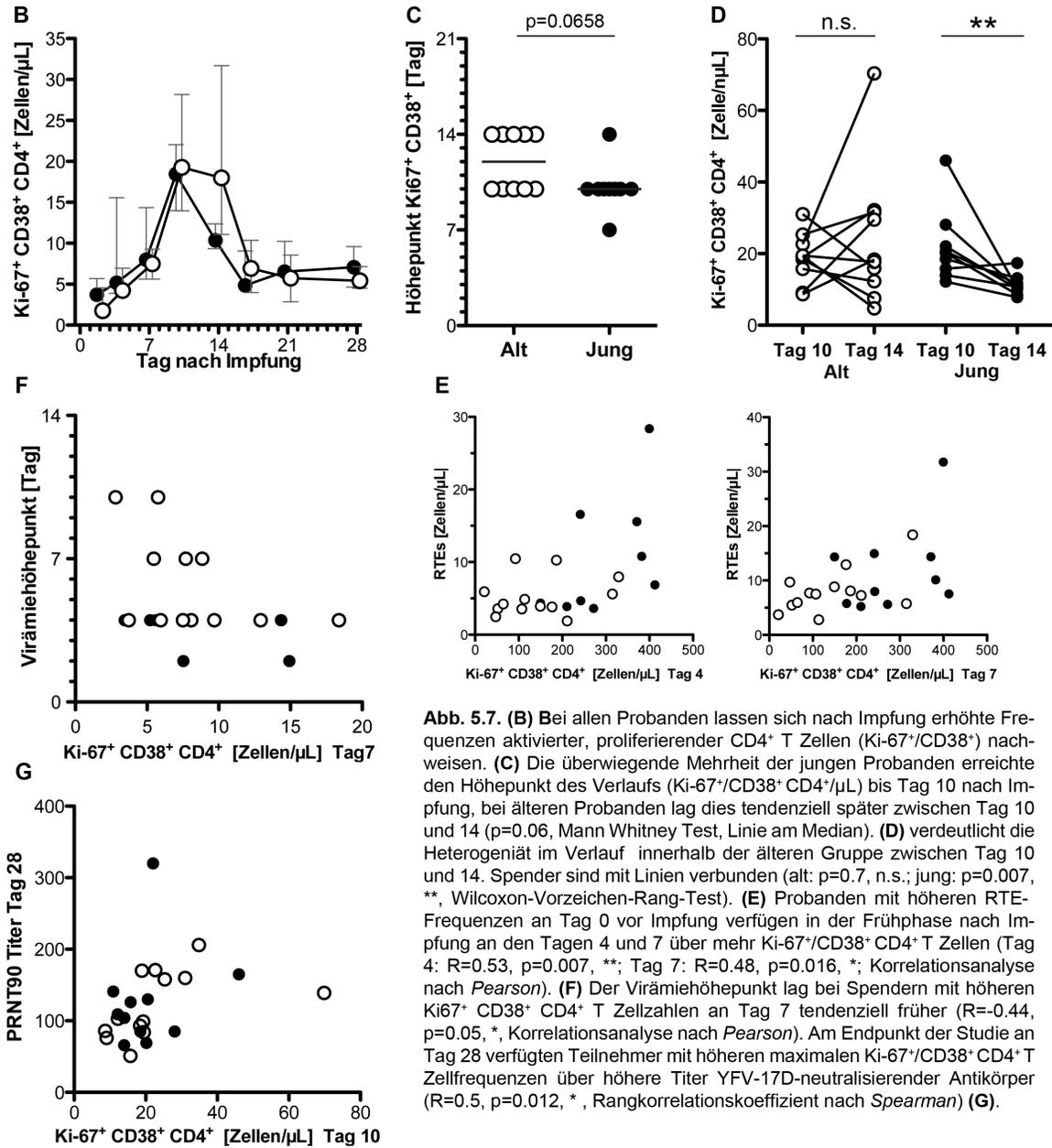


Abb. 5.7. (B) Bei allen Probanden lassen sich nach Impfung erhöhte Frequenzen aktivierter, proliferierender CD4⁺ T Zellen (Ki-67⁺/CD38⁺) nachweisen. (C) Die überwiegende Mehrheit der jungen Probanden erreichte den Höhepunkt des Verlaufs (Ki-67⁺/CD38⁺CD4⁺/ μ L) bis Tag 10 nach Impfung, bei älteren Probanden lag dies tendenziell später zwischen Tag 10 und 14 ($p=0.06$, Mann Whitney Test, Linie am Median). (D) verdeutlicht die Heterogenität im Verlauf innerhalb der älteren Gruppe zwischen Tag 10 und 14. Spender sind mit Linien verbunden (alt: $p=0.7$, n.s.; jung: $p=0.007$, **, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). (E) Probanden mit höheren RTE-Frequenzen an Tag 0 vor Impfung verfügen in der Frühphase nach Impfung an den Tagen 4 und 7 über mehr Ki-67⁺/CD38⁺CD4⁺ T Zellen (Tag 4: $R=0.53$, $p=0.007$, **; Tag 7: $R=0.48$, $p=0.016$, *; Korrelationsanalyse nach Pearson). (F) Der Virämiehöhepunkt lag bei Spendern mit höheren Ki67⁺ CD38⁺ CD4⁺ T Zellzahlen an Tag 7 tendenziell früher ($R=-0.44$, $p=0.05$, *, Korrelationsanalyse nach Pearson). Am Endpunkt der Studie an Tag 28 verfügten Teilnehmer mit höheren maximalen Ki-67⁺/CD38⁺CD4⁺ T Zellfrequenzen über höhere Titer YFV-17D-neutralisierender Antikörper ($R=0.5$, $p=0.012$, *, Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman) (G).

5.8 Zytokinproduktion durch YFV-17D-spezifischer CD4⁺ T Zellen nach *in-vitro*-Kurzzeitstimulation

Wie von Frentsch und Kollegen gezeigt, ermöglicht CD40L die Identifikation antigenspezifischer CD4⁺ T Zellen (Frentsch, Arbach et al. 2005). Hierfür wurde in Anlehnung an die Arbeit von Meier et al. eine sechsstündige *in vitro* Stimulation mit YFV-17D Impfstoff durchgeführt und anschließend durchflusszytometrisch die Expression von CD40L auf T Zellen mittels intrazellulärer Färbung analysiert (Meier, Stark et al. 2008). In Abb. 5.8.A & B sind die im CD4⁺ T Zell-Stimulationspanel angewandte *Gating*-Strategie und die Färbungen für CD40L und verschiedene Zytokine im Verlauf nach Impfung anhand eines exemplarischen Spenders gezeigt.

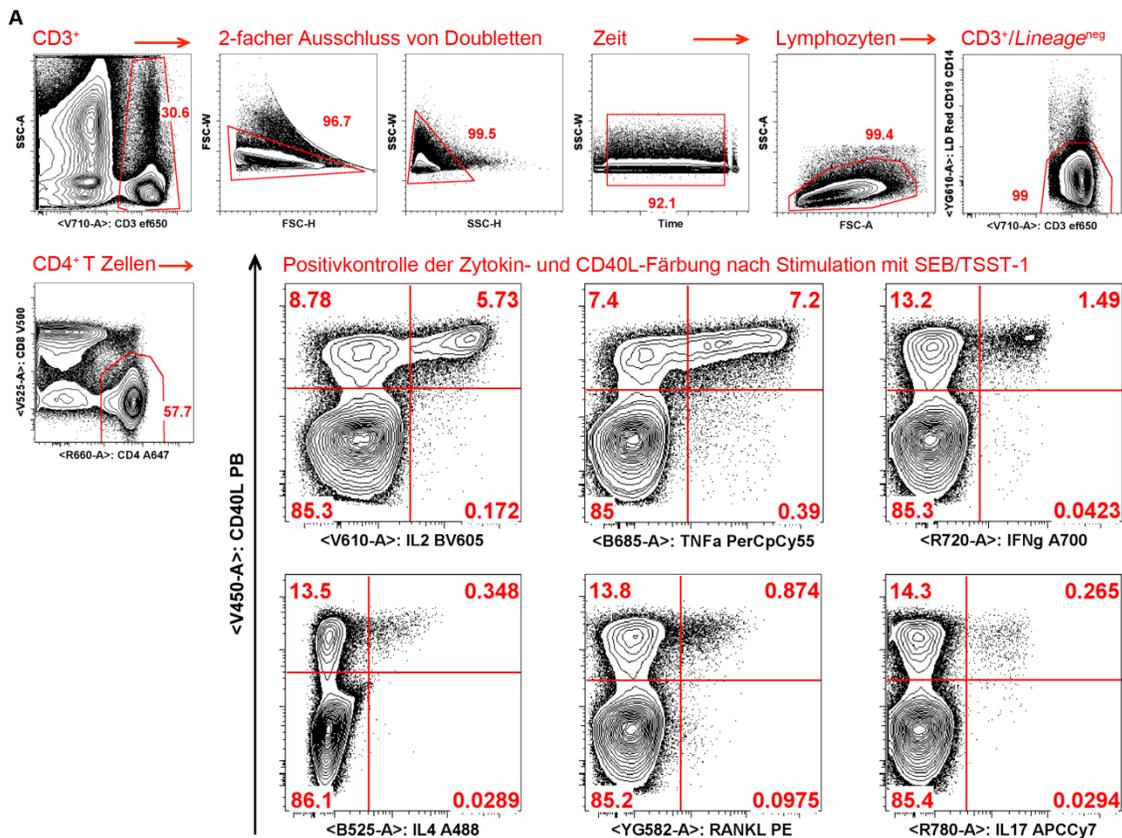


Abb. 5.8. (A) ist eine Darstellung der *Gating*-Strategie im CD4⁺ T Zell-Stimulationspanel. Es wurden zunächst T Zellen anhand ihrer CD3⁺ Färbung vorausgewählt. Anschließend erfolgte der Ausschluss von Doubletten, sowie die zeitliche Begrenzung. Im Folgenden wurden Lymphozyten und CD3⁺ T Zellen positiv selektiert; tote Zellen, sowie CD14⁺ und CD19⁺ Zellen ausgeschlossen. Die Analyse von CD40L sowie der Zytokine IL2, TNFα, IFNγ, IL4, RANKL sowie IL17 erfolgte auf CD4⁺ T Zellen. Die hier exemplarisch gezeigten intrazellulären Zytokinfärbungen wurden in einer mit SEB-TSST-1 über 6h unter Zugabe von Brefeldin-A stimulierten Probe (Positivkontrolle) angefertigt.



Abb. 5.8. (B) Anhand eines exemplarischen Spenders (männlich, 27 Jahre) sind hier die CD40L-Zytokinkinetiken im Verlauf nach Impfung dargestellt. Der jeweils obere, rechte Quadrant beschreibt die in (C-J) analysierten Populationen der doppelt-positiven CD4⁺ T Zellen. Um YFV-17D-spezifische Zellen unabhängig von ihrer Zytokinproduktion zu quantifizieren, wurde ein kombinatorisches Gate der beiden oberen Quadranten CD40L⁺/IL2⁺ und CD40L⁺/IL2⁻ gebildet.

Ein signifikanter Anstieg YFV-17D spezifischer CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen zeigte sich ab Tag 10 mit einem Höhepunkt an Tag 14 von im Median 0.97 Zellen/ μ L (Abb. 5.8.C). Dies entsprach einer Frequenz von 0.16% aller CD4⁺ T Zellen (Abb. 5.8.D). Anschließend blieb die Zahl nach CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen bis Studienende (Tag 28) auf halber Höhe des Maximalwertes konstant detektierbar. Für den gezeigten Verlauf waren keine Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen ersichtlich, die Kinetiken unterlagen eher einer hohen interindividuellen Variabilität in Bezug auf Zeitpunkt und Größe des Höhepunktes. Um die Funktionalität und *Lineage*-Polarisation der über CD40L identifizierten YFV-17D-spezifischen CD4⁺ T Zellen untersuchen zu können, wurden zusätzlich die Zytokine IL2, TNF α , IFN γ , IL4, IL17 und RANKL intrazellulär mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Im gesamten Verlauf der Immunantwort entfällt der größte Teil der Zytokinproduktion auf die für Th₁-CD4⁺ T Zellen charakteristischen Zytokine IL2, IFN γ und TNF α . Der Höhepunkt wird hier im Median an Tag 14 erreicht. Hier bildet jeweils ein Viertel der CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen IL2 bzw. TNF α , 11% produzieren IFN γ (Abb. 5.8.E-G). Nach anschließendem graduellem Rückgang waren auch noch an Tag 28 erhöhte Frequenzen an Zytokin-produzierenden Zellen nach Impfstoffstimulation nachweisbar. Zusätzlich zu den betrachteten Th₁-Zytokinen, nahm auch der Anteil der das für Th₂-Zellen charakteristische Zytokin IL4-produzierenden CD4⁺ T Zellen ab Tag 7 signifikant zu und wurde an Tag 14 von einem Zehntel der CD40L⁺ Zellen gebildet (Abb. 5.8.H). In dieser Studie wurden zum ersten Mal die Produktion von IL17 und RANKL durch YFV-17D-spezifische CD4⁺ T Zellen im Verlauf nach Impfung untersucht. Beide Zytokine wurden zwar nur von einem äußerst kleinen Anteil der CD40L⁺ Zellen gebildet, aber konnten ab Tag 10 signifikant erhöht gegenüber den an Tag 0 erhobenen Ausgangswerte detektiert werden (RANKL: 6.0% an Tag 14; IL17: 1.3% an Tag 7) (Abb. 5.8.I & J). Aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität der Verläufe und der begrenzten Probandenzahl ließen sich auch für die Zytokin-Antwort keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Altersgruppen erheben. Es zeigte sich jedoch die Tendenz, dass jüngere Spender über eine höhere Frequenz Zytokin-produzierender YFV-17D-spezifischer CD4⁺ T Zellen verfügten als ältere.

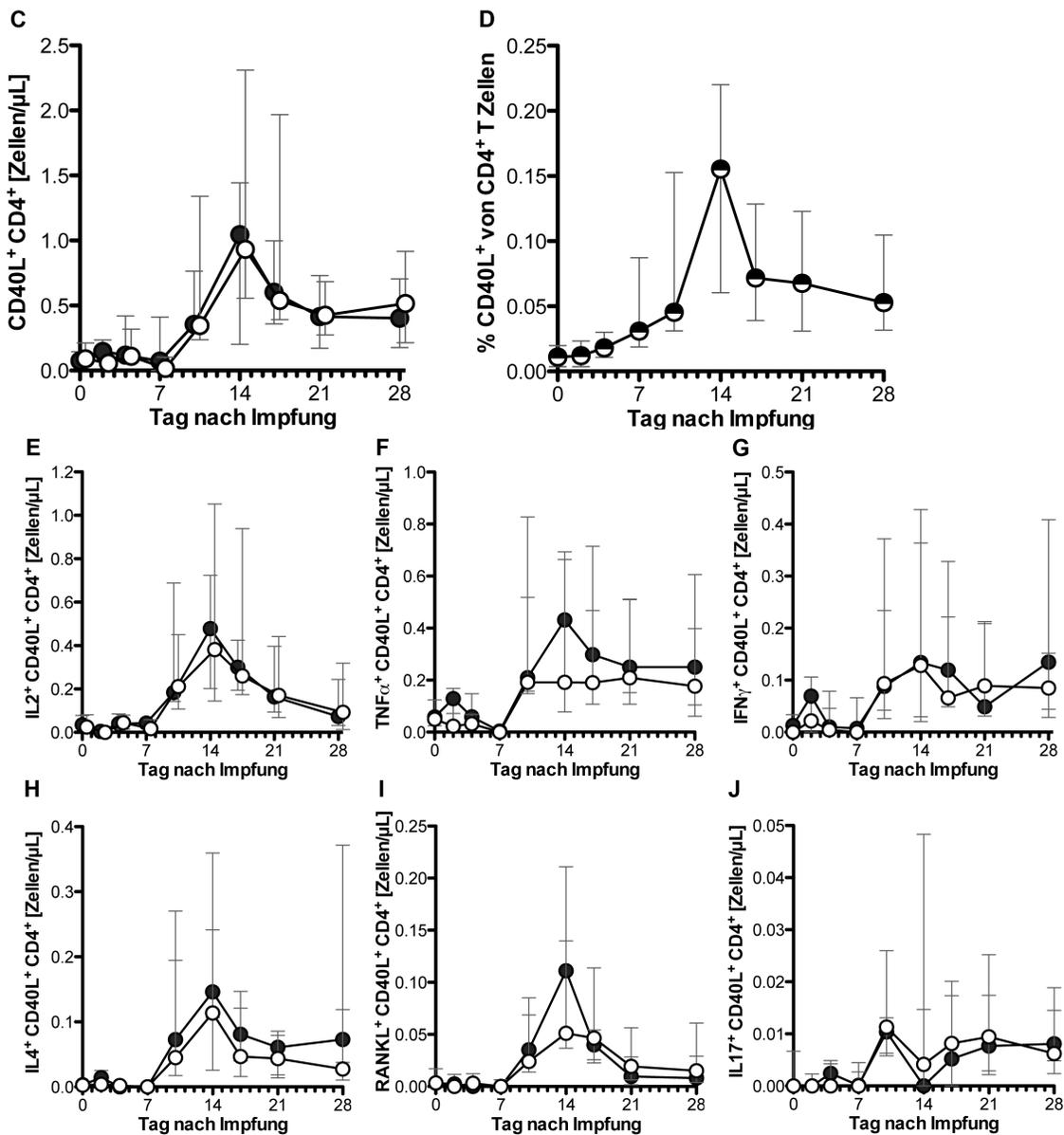


Abb. 5.8. (C) YFV-17D-spezifische CD4⁺ T Zellen können nach Impfstoffstimulation anhand ihrer Expression von CD40L identifiziert werden. Signifikant gegenüber dem Ausgangsniveau erhöhte Frequenzen dieser Zellen können bei allen Spendern unabhängig des Lebensalters ab Tag 10 nachgewiesen werden. Der Höhepunkt liegt klar umschrieben an Tag 14 bei 1 Zelle/μL, gefolgt von einem Rückgang auf ein Zehntel des Maximums bis Tag 28. **(D)** An Tag 14 exprimieren 0.16% aller CD4⁺ T Zellen im peripheren Blut nach Stimulation (● = alle Spender). Die Zytokinantwort der CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen nach YFV-17D-Impfung ist charakteristisch für eine Th₁-polarisierte T-Helferzellantwort. YFV-17D-spezifische Zellen sind im Verlauf vorrangig Produzenten von IL2 **(E)**, TNF_α **(F)** sowie IFN_γ **(G)**. Auch hier liegt für alle 3 Zytokine der Höhepunkt an Tag 14. Das Maximum IL4-bildender CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen (Th₂ Zytokin) wird an Tag 14 bei ca. 0.15 Zellen/μL erreicht **(H)**. Auf noch niedrigerem Frequenzniveau - jedoch signifikant erhöht gegenüber den Ausgangswerten - ließen sich die Verläufe von RANKL- bzw. IL17-produzierender Zellen nachverfolgen **(I & J)**. Die gezeigten Kinetiken **(C-J)** sind das Ergebnis der Subtraktion aus Zell/Zytokinfrequenzen nach YFV-17D-Impfstoff-Stimulation abzüglich der Werte, die in den unstimulierten Kontrollproben zu detektieren waren und als 'unspezifische Aktivierung' gewertet wurden. Abgebildet sind stets Median und Interquartilsabstand.

5.9 Die Gelbfieber-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort und neutralisierende Antikörper im Langzeitverlauf

Um zu untersuchen, inwiefern ein altersabhängiger Einfluss auf Stärke und Qualität der Gelbfieber-spezifischen Immunantwort im Langzeitverlauf vorliegt, luden wir alle Teilnehmer zu einem Folgetermin ein, welcher frühestens 20 und maximal 35 Monaten nach Impfung lag. An diesem nahmen 9 Probanden der jüngeren und 12 Probanden der älteren Gruppe teil. Es wurde analog zum Studienprotokoll eine Stimulation von Vollblut mit Gelbfieberimpfstoff durchgeführt um die YFV-17D spezifische CD4⁺ T-Zellantwort *ex vivo* zu analysieren. Die angewendete *Gating*-Strategie entspricht der in Abb. 5.8.A dargestellten Hierarchie.

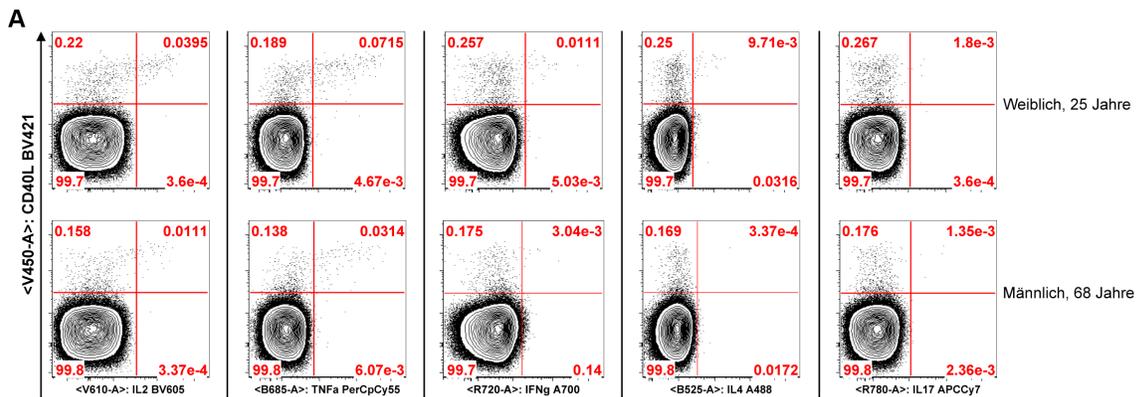


Abb. 5.9. (A) Nach 6-stündiger Stimulation von Vollblut mit YFV-17D Impfstoff wurde die Expression von CD40L sowie die Produktion der Zytokine IL2, TNF α , IFN γ , IL4 sowie IL17 durch CD4⁺ T Zellen mittels intrazellulärer Färbung untersucht. Auch zum späten Folgetermin konnten so bei allen Probanden antigenspezifische Zellen identifiziert werden. Dargestellt sind die Expressionsprofile von zwei repräsentativen Probanden 30 Monate nach Impfung, gated auf CD4⁺ T Zellen.

Auch zu diesem späten Zeitpunkt ließen sich bei allen Probanden anhand der Expression von CD40L in Kombination zur Produktion von einem oder mehreren Zytokinen Zellpopulationen abgrenzen, die während der Stimulation antigenspezifisch aktiviert wurden (Abb. 5.9.A). Für CD40L⁺/TNF α ⁺ sowie CD40L⁺/IL4⁺ doppelpositive Zellen bestanden keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen sowohl im Hinblick auf ihren prozentualen Anteil als auch auf ihre absolute Zellzahl. Für IL2⁺ produzierende CD4⁺ T Zellen ließ sich die deutliche Tendenz verzeichnen, dass jüngere Teilnehmer zu diesem Zeitpunkt über eine höhere Frequenz dieser Zellen verfügten als ältere. Als hochsignifikant zeigten sich die Unterschiede für CD40L⁺/IFN γ ⁺ CD4⁺ T Zellen: Diese lagen bei älteren Individuen sowohl in ihrer medianen Frequenz als auch absoluten Zahl um mehr als das

Vierfache erniedrigt vor im Vergleich zu den jungen Spendern. Für ein Viertel der älteren Probanden war überhaupt keine IFN γ ⁺ produzierende Zellpopulation detektierbar, deren Größe über der unspezifischen Hintergrundaktivierung der parallel analysierten unstimulierten Kontrollprobe lag. Dies traf auf keinen der jüngeren Teilnehmer zu (Abb. 5.9.B&C) CD40L⁺/IL17⁺ CD4⁺ T Zellen ließen sich zu diesem Zeitpunkt für keine der Gruppen nachweisen.

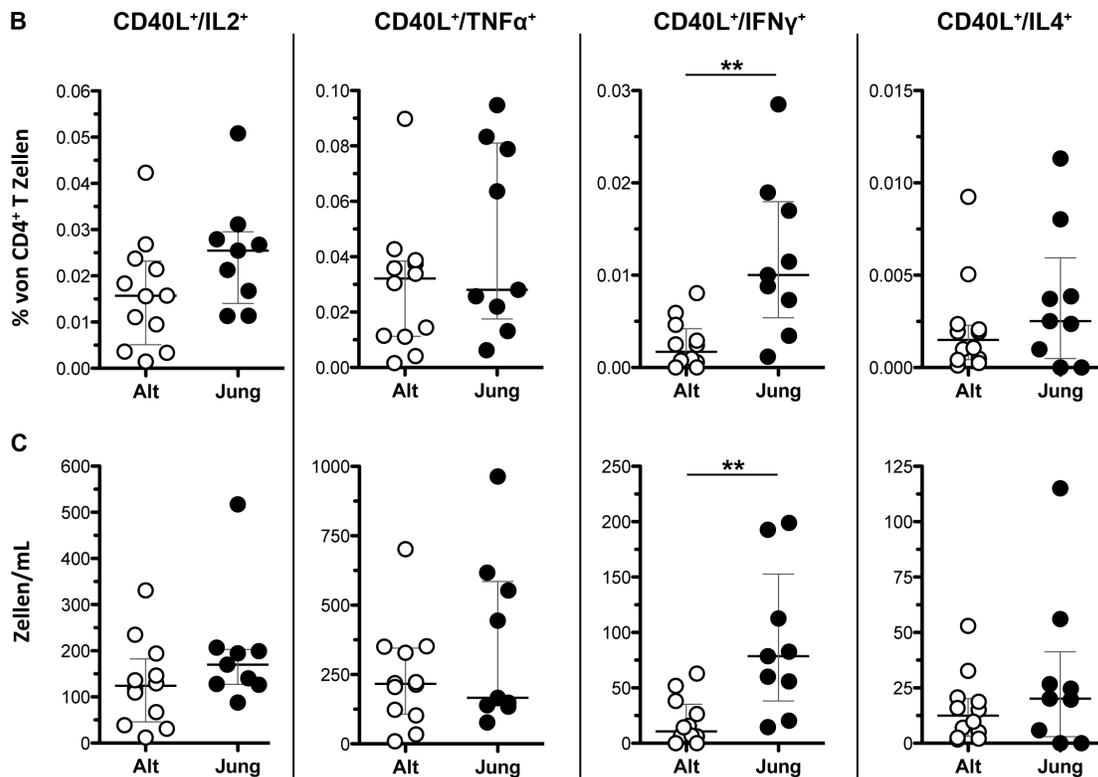


Abb. 5.9. Dargestellt ist der prozentuale Anteil (B) bzw. die absolute Zahl (Zellen/mL) (C) der CD4⁺ T Zellen, die nach Impfstoffstimulation sowohl CD40L exprimieren als auch eines der Zytokine IL2, TNF α , IFN γ bzw. IL4 produzieren. Ältere Probanden verfügten am Folgetermin 20-35 Monate nach Impfung über tendenziell weniger CD40L⁺/IL2⁺ Zellen ($p=0.08$ (B)) sowie signifikant weniger IFN γ -bildende Zellen ($p=0.002$, **, Mann Whitney Test für (B) und (C)). Keine signifikanten Unterschiede lagen für TNF α oder IL4-produzierende Zellen vor. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median, die Fehlerbalken umfassen den Interquartilsabstand.

Im Vergleich zum letzten Tag der Hauptstudie (Tag 28) fiel der Anteil der nach Stimulation IL2 produzierenden CD40L⁺/CD4⁺ T-Zellen bis zum Folgetermin (20-35 Monate) bei nahezu allen Probanden ab. Die Frequenz ging bei den jüngeren Individuen auf im Median 0.03% aller CD4⁺ T Zellen zurück sowie auf 0.015% bei den älteren. Dies stellte für beide Altersgruppen einen Abfall auf ca. 70% des Tag-28-Niveaus dar. Im Gegensatz hierzu ergab sich für die Abnahme von IFN γ Produzenten ein hochsignifikanter Unterschied

zwischen den älteren und jungen Probanden ($p=0.0006$, Mann Whitney Test): In der jüngeren Gruppe blieb der Anteil im Median konstant bei 0.01% der $CD4^+$ T Zellen. Es zeigte sich hier ein gemischtes Bild von vier Individuen bei denen zum späten Termin gegenüber Tag 28 ein Abfall auf ca. 70% zu verzeichnen war gegenüber vier weiteren, die einen Anstieg der Frequenz um bis auf das Zweifache erhöht zeigten. Bei den älteren Teilnehmern war im Gegensatz hierzu einheitlich ein deutlicher Einbruch des Anteils von IFN γ Produzenten auf Frequenzen zu verzeichnen, die im Median bei 12% des Tag-28-Wertes lagen (5.9.D).

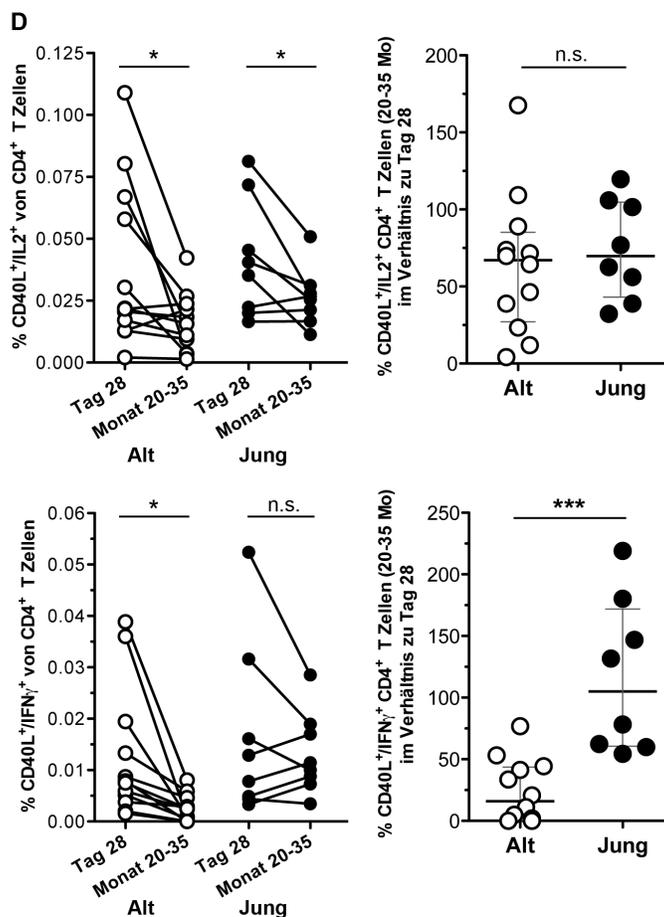


Abb. 5.9. (D) Die Frequenz von $CD4^+$ T Zellen, die am Folgetermin (Monat 20-35) durch Impfstoffstimulation aktiviert werden können und $CD40L$ und $IL2$ bilden, ist in beiden Altersgruppen gegenüber Tag 28 der Hauptstudie signifikant erniedrigt (alt: $p=0.04$; *, jung: 0.03 ; *) und liegt im Median bei ca. 70% des 28-Werts. Für IFN γ produzierende $CD40L^+ CD4^+$ T Zellen zeigen sich am späten Termin in der Gruppe der jungen Probanden keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu Tag 28 ($p=0.37$; n.s.; Median: 100). Im Gegensatz hierzu ist bei den älteren Teilnehmern am Folgetermin ein drastischer Rückgang zu verzeichnen ($p=0.012$; *, jeweils gepaarter t-Test für den Vergleich von Tag 28 vs. Monat 20-35). Der Median der gemessenen Veränderung liegt hier signifikant erniedrigt im Verhältnis zur jüngeren Gruppe bei 12% des Tag 28-Wertes ($p=0.0006$, ***, Mann Whitney Test).

Die absolute Höhe der Titer YFV-17D neutralisierender Antikörper, die auch am Folgetermin mittels PRNT bestimmt wurden, zeigte keine signifikanten Abweichungen zwischen den Altersgruppen, (Abb. 5.9. E). Ältere Probanden verfügten tendenziell über höhere Titer als jüngere. Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch im Hinblick auf das Verhältnis zwischen den Titern am Folgetermin und den Titer-Werten an Tag 28 nach Impfung (Abb. 5.9. F).

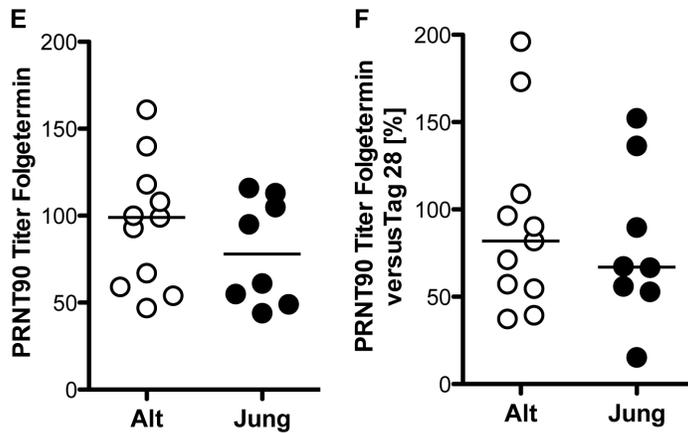


Abb. 5.9. (E) Am Folgetermin (20-35 Monate nach Impfung) können bei allen Probanden noch YFV-17D neutralisierende Antikörper per Plaque.Reduktions-Neutralisationstest nachgewiesen werden. Ältere Probanden verfügen tendenziell über etwas höhere Titer, es bestehen aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen (Linie kennzeichnet den Median. Auch bei Betrachtung im Verhältnis zu Tag 28 lassen sich keine signifikanten Differenzen feststellen, ältere Teilnehmer verfügen am Folgetermin über Titer, die annähernd auf Ausgangsniveau liegen, bei der jüngeren Gruppe liegen diese etwas tiefer bei ca. 70% des Tag-28-Wertes (F).

5.10 Polyfunktionalität YFV-17D-spezifischer CD4⁺ T Zellen

Zusätzlich zu den gezeigten Einzelverläufen der sechs untersuchten Zytokine, wurden die mittels der Expression von CD40L identifizierten YFV-17D-spezifischen CD4⁺ T Zellen hinsichtlich ihres Vermögens untersucht, zwei oder mehr Zytokine gleichzeitig zu bilden. Diese als „Polyfunktionalität“ beschriebene Eigenschaft wurde in bei Seder et al. als wichtiges Kriterium der Qualität von T-Zell-Antworten im Rahmen von Impfungen beschrieben. So verfügen höherfunktionale Th₁ CD4⁺ und CD8⁺ Zellen über bessere Effektor-Qualitäten und korrelieren positiv mit dem Ausbilden einer protektiven Immunantwort (Seder, Darrah et al. 2008).

Boolean Gating ermöglicht die mehrdimensionale Analyse von verschiedenen, zusammen in einem Panel untersuchten Parametern. Hierbei werden zunächst für jeden Parameter die Grenzen von Positiv- und Negativpopulation bestimmt und anschließend alle Kombinationen definierten Einzel-Gates gebildet. Bei den hier betrachteten vier Zytokinen IL2, TNF α , IFN γ und IL4 ergeben sich 16 mögliche Populationen, in welche die nach YFV-17D Stimulation aktivierten CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen anhand ihres Expressionsprofils eingeordnet werden können.

In der Expansionsphase der Immunantwort an Tag 10 nach Impfung bildet ca. die Hälfte der CD40L⁺ Population zwei oder mehr Zytokine (Abb. 5.10.A). Der größte Anteil entfällt hier auf Doppelproduzenten von IL2 und TNF α . Mehr als 10% der Zellen bilden zusätzlich IFN γ . Bei ebenfalls ca. einem Zehntel liegt der Anteil der IL4-Produzenten. Ungefähr ein Drittel der Zellen bildet lediglich CD40L. Diese Population nimmt im weiteren Verlauf zu und beträgt an Tag 28 ca. 45%, am Folgetermin nach 20-35 Monaten ca. 75%. Auch an Tag 28 können insbesondere bei jüngeren Probanden noch Vierfachproduzenten nachgewiesen werden, am Folgetermin sind diese nicht mehr vorhanden. Hier bildet ca. ein Zehntel der CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen zwei oder mehr Zytokine. Junge Probanden verfügen an diesem Tag über signifikant mehr dreifach-positive Zellen (TNF α /IL2/IFN γ) als ältere ($p=0.011$, Wilcoxon Rank Test). Weitere altersabhängige Unterschiede zeigten sich an den betrachteten Tagen nicht.

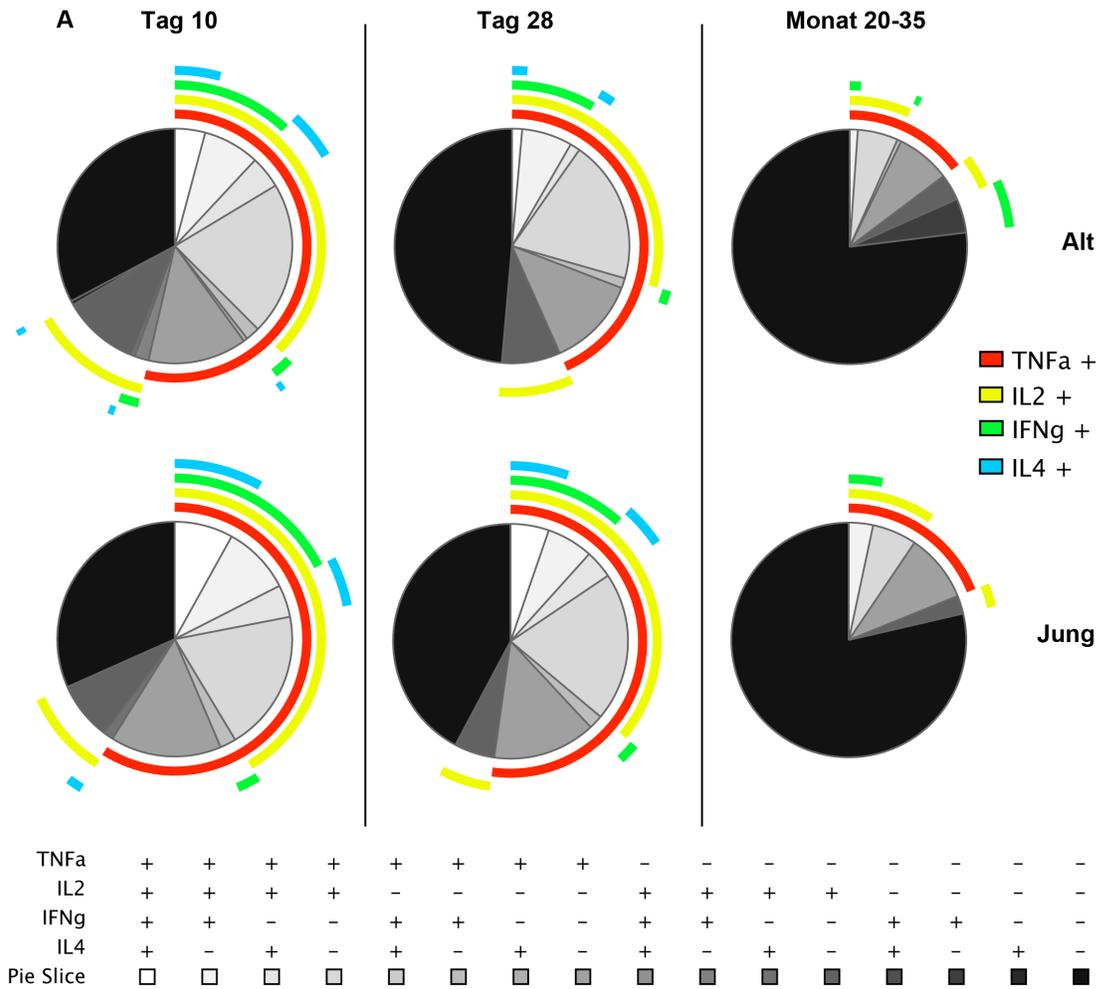


Abb. 5.10. (A) Die mehrdimensionale Analyse des Zytokinprofils erfolgte mithilfe der Anwendung SPICE. Jedes Stück des Kreisdiagrammes repräsentiert den Anteil (Median) einer der 16 möglichen Kombinationen aus den vier hier betrachteten Zytokinen TNFα, IL2, IFNγ oder IL4 in Bezug auf die CD40L⁺ CD4⁺ T-Zellpopulation. Die farbigen Bögen kennzeichnen, welches der Zytokine im jeweiligen Abschnitt gebildet wird. In der Expansionsphase an Tag 10 bilden ca. die Hälfte der CD40L⁺ Zellen zwei oder mehrere Zytokine aus. An Tag 28 geht dieser Anteil auf ca. 40% zurück. Zum Folgetermin nach 20-35 Monaten produzieren mehr als drei Viertel der Zellen keine Zytokine, der Anteil der Zellen, die zwei oder mehr Zytokine bilden, beträgt ca. 10%. Junge Probanden verfügen zu diesem Zeitpunkt über einen signifikant höheren Anteil an TNFα,IL2,IFNγ-Dreifachproduzenten als ältere (p=0.011;*; Wilcoxon Rank Test). An den Tagen 10 und 28 bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen.

Unter Ausschluss der Zellen, die lediglich CD40L nach Stimulation exprimieren ist die Dynamik der Zytokincomposition für das gesamte Probandenkollektiv in Abb. 5.10.B abgebildet. Hier zeigt sich, dass IL4-produzierende Subpopulationen am späten Folgetermin nahezu verschwunden sind, Monoproduzenten von TNF α hingegen anteilig zugenommen haben und für Monoproduzenten von IFN γ erstmals als Population nachweisbar sind.

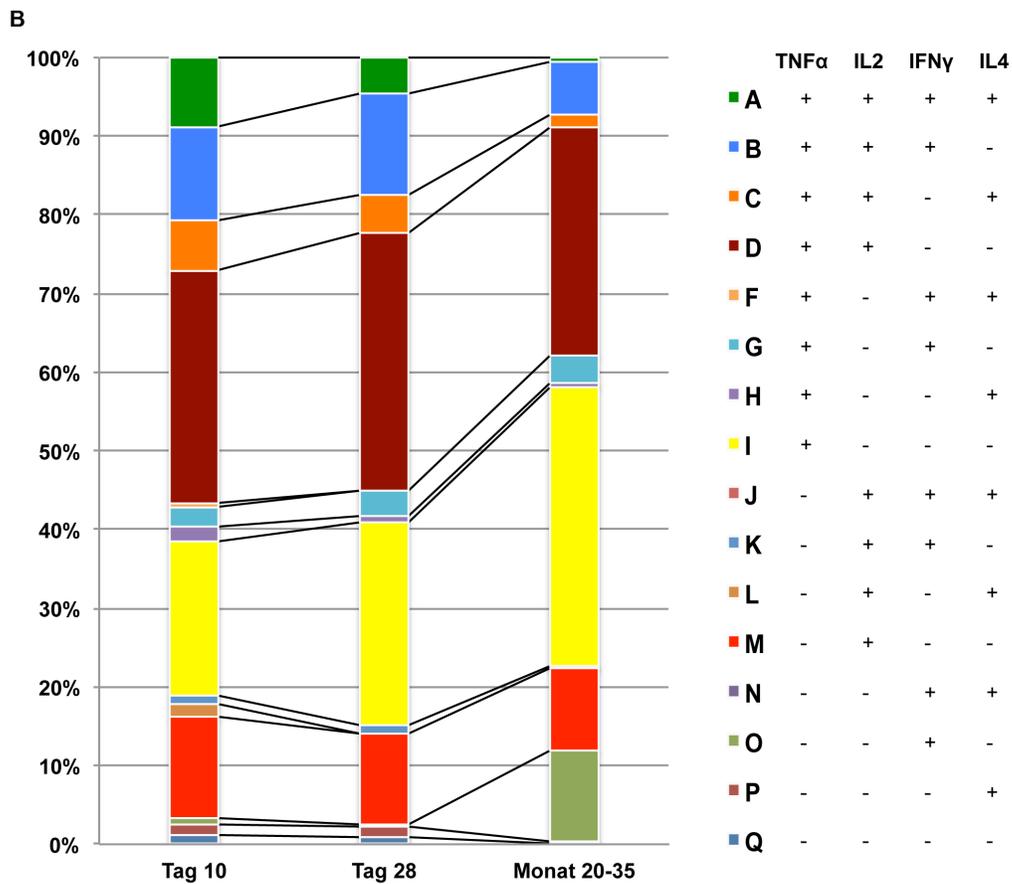


Abb. 5.10. (B) Im Verlauf nach Impfung verändert sich die Komposition des Zytokinprofils der CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen nach Stimulation mit YFV-17D-Impfstoff. Der Anteil höherfunktionaler Zellen (mehr als 2 Zytokine) nimmt nach Tag 10 ab. Insbesondere IL4-bildnede Subpopulationen sind am Folgetermin deutlich reduziert. Die Anteile der Monoproduzenten von TNF α und IFN γ nehmen im Gegenzug zu. Konstant bleiben Doppelproduzenten von TNF α /IFN γ bzw. TNF α /IL2. Jeder Balken illustriert die Zusammensetzung der zytokinbildenden Zellen an den Studientagen 10 und 28 sowie am Folgetermin nach 20-35 Monaten. Dargestellt ist der mediane Anteil ohne Berücksichtigung des Probandenalters.

6 DISKUSSION

Eine erhöhte Anfälligkeit für schwer verlaufende Infektionskrankheiten sowie eine zunehmende Inzidenz von Autoimmun- und Tumorerkrankungen im höheren Lebensalter weisen auf eine Abnahme der Immunkompetenz älterer Menschen hin. Ein großer Teil der zur Alterung des Immunsystems (Immunoseneszenz) vorhandenen Datengrundlage stammt aus tierexperimentellen Arbeiten und ist nur eingeschränkt auf den alternden Menschen übertragbar, da dieser über eine annähernd 40-fach höhere durchschnittliche Lebenserwartung verfügt als eine Maus hat und in der Regel einem deutlich komplexeren immunologischen Umfeld ausgesetzt ist. Vorliegende humanbiologische Immunoseneszenz-Studien behandeln häufig chronische Virusinfektionen wie z. B. mit CMV oder auch akut verlaufende Infektionserkrankungen wie z.B. die epidemisch auftretende Influenza. In beiden Kontexten ist die Vergleichbarkeit von Alterskohorten aufgrund der zumeist bereits abgelaufenen Erstinfektion und der daraus resultierenden unterschiedlichen Immungedächtnis-Situation erschwert.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse von altersbedingten Veränderungen der humanen Immunantwort nach Impfung mit dem Gelbfieberimpfstoff YFV-17D. Die Impfung simulierte hier modellhaft eine Erstinfektion mit einem viralen Krankheitserreger und ermöglichte eine detaillierte Studie des Verlaufs der zellulären und humoralen Immunantwort in einer altersgetrennten Probandenkohorte. Die bereits zur Gelbfieberimpfung vorliegenden Veröffentlichungen gewähren Einblicke in die komplexen immunologischen Prozesse nach Impfung (Querec, Bennouna et al. 2006; Miller, van der Most et al. 2008; Akondy, Monson et al. 2009) Es existiert bislang jedoch wenig Kenntnis über altersbedingte Modifikationen der Immunantwort. Im Kontext der im höheren Alter vermehrt auftretenden, schwer verlaufenden Impfkomplication im Sinne einer YFV-AVD oder YFV-AND ist dies gleichwohl von besonderem Interesse. Eine mit 50 Probanden durchgeführte prospektive Studie zur Gelbfieberimpfantwort demonstrierte eine verlängerte Serumvirämie sowie Verzögerungen in der Antikörperantwort in der Altersgruppe der 60-81-jährigen (Roukens, Soonawala et al. 2011).

Im Zentrum der hier vorliegenden Arbeit sollte die Kinetik und Qualität der YFV-17D-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort stehen. Als multifunktionale Koordinatoren des zellulären

und humoralen adaptiven Immunsystems sowie als entscheidendes Verbindungsglied zum angeborenen Abwehrsystem sind CD4⁺ T Zellen in den vergangenen Jahren zunehmend in den Fokus der Entwicklung neuer Impfstoffe gerückt (Seder, Darrah et al. 2008). Ebenfalls im Fokus steht die altersbedingte Abnahme der Thymusfunktion, eine der grundlegenden, bereits bekannten Veränderungen des alternden, menschlichen Immunsystems, deren Auswirkungen im Kontext einer antiviralen Erstantwort noch nicht eingehend untersucht wurde.

6.1 Serumvirämie

Da der im Gelbfieberimpfstoff enthaltene Virusstamm YFV-17D in der Lage ist, nach Verabreichung Zellen im menschlichen Körper zu infizieren und sich dort zu replizieren, ist das Auftreten und die Kinetik einer im Serum nachweisbaren Virämie ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Kompetenz des Immunsystems, die Infektion zu kontrollieren. In unserer Studie entwickelten ca. 80% der Probanden eine detektierbare Virämie. Dieses Ergebnis liegt etwas höher als bei Reinhardt et al. beschrieben, welche die Inzidenz einer Serumvirämie mit 60% angeben (Reinhardt, Jaspert et al. 1998). Dies könnte einerseits auf eine abweichende Altersstruktur unserer Probandenkohorte zurückzuführen sein als auch auf eine erhöhte Sensitivität der RT-qPCR, die von unserem Kooperationspartner zur Virusdetektion durchgeführt wurde. Drei der insgesamt vier Spender (75%), die in unserer Studie an allen Analysetagen negativ getestet wurden, gehörten der jungen Probandengruppe an. Zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Spenderalter und dem Zeitpunkt der maximalen Viruslast im Verlauf. Diese Ergebnisse unterstützen die Resultate der Arbeit von Roukens et al., die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen fortgeschrittenem Alter und verlängert auftretender Serumvirämie beobachteten. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund einiger Fallberichte zu schweren Impfkomplicationen (YFV-AVD und YFV-AND) interessant, die eine mangelnde Kontrolle der viralen Replikation als Auslöser diskutieren (Pulendran, Miller et al. 2008). Die maximale Viruslast (*Genomic Equivalents*), die mittels RT-qPCR bestimmt wurde, zeigte sich in beiden Altersgruppen gleich. Dies weicht von den Ergebnissen von Roukens et al. ab, die an Tag 7 und 10 eine höhere Viruslast bei ihren älteren Probanden beobachteten. Ein möglicher Erklärungsansatz, könnte neben unserer

kleineren Studienkohorte auch das um 6 Jahre höhere mediane Alter (66 vs. 60 Jahre) der Probanden der Roukens-Studie sein, deren Fähigkeit zur Kontrolle der Replikation unter Umständen im höheren Maße beeinträchtigt ist. Die geschlechtergetrennte Auswertung zeigte interessanterweise sowohl für das Auftreten einer Virämie, als auch für deren Kinetik und die Höhe der maximalen Viruslast deutliche Differenzen zwischen weiblichen und männlichen Spendern. Frauen verfügten über eine signifikant bessere Kontrolle in den betrachteten Parametern. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als dass aus Übersichtsarbeiten zu SAE-Fallberichten hervorging, dass Männer ein erhöhtes Risiko hatten, ein SAE zu entwickeln und bislang keine prospektiven Daten zu geschlechtsspezifischen Unterschieden nach YFV-17D-Impfung vorliegen (Guimard, Minjolle et al. 2009).

6.2 Antikörperantwort

Um den Erfolg einer durchgeführten Impfung beurteilen zu können, wird sowohl in der klinischen Routinediagnostik als auch in der Forschung auf die Qualität und Kinetik der induzierten Antikörperantwort zurückgegriffen. Die hoch-immunogene Gelbfieberimpfung führt bei ca. 95% aller Geimpften zum Ausbilden eines protektiven Antikörpertiters, der über viele Jahre hinweg erhalten bleibt (Reinhardt, Jaspert et al. 1998). unserer Studie konnten ab Tag 14 für alle Probanden YFV-17D-spezifische neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Jüngere Probanden bildeten diese signifikant früher aus und erreichten insgesamt etwas höhere Titer. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Roukens et al., die den beobachteten Zusammenhang in einer größeren Probandenkohorte als statistisch signifikant nachweisen konnten. Zusätzlich führten wir eine getrennte Analyse der verschiedenen Immunglobulinklassen von Gelbfieber-spezifischem IgM und IgG durch, um einen detaillierteren Einblick in den Ablauf der B-Zell-Antwort zu erhalten. Roukens et al. zeigten, dass YFV-17D spezifisches IgM im Median ab Tag 8 nach Impfung nachweisbar war. Dies konnten wir mit unseren Resultaten bestätigen. Mit steigendem Lebensalter unserer Probanden setzte die IgM Produktion tendenziell später ein. Ähnliches wurde in größeren Studien zur saisonalen Influenza-Impfung beobachtet und wurde in diesem Kontext als Anhaltspunkt für eine eingeschränkte Immunkompetenz im höheren Lebensalter gewertet (Goodwin, Viboud et al. 2006). Die

Bildung von spezifischem IgG setzte ab Tag 10 ein und verlief in beiden Altersgruppen ähnlich, sodass am ehesten auf einen unbeeinträchtigten Antikörperklassenwechsel geschlossen werden kann. Die Auswertung für IgM und IgG erfolgte jedoch im Gegensatz zu den neutralisierenden Antikörpern lediglich semi-quantitativ, sodass der quantitative und kinetische Verlauf nur eingeschränkt beurteilbar sind.

6.3 Absolute Zellzahlen

Die Betrachtung der mithilfe des Zellzahlpanels bestimmten $CD4^+$ T Lymphozytenzahl im peripheren Blut zeigte nach Impfung einen äußerst dynamischen Verlauf, der sich bei nahezu allen Probanden nachverfolgen lässt. Die $CD4^+$ T Zellzahlen waren zu Beginn der Studie bei allen Teilnehmern normwertig und zeigten keine Differenzen zwischen den Altersgruppen. Wir beobachteten, dass am Tag 7 nach Impfung nahezu ein Drittel aller zirkulierenden $CD4^+$ T Zellen nicht im peripheren Blut anzutreffen ist und ihre Zahl erst mit zeitlicher Verzögerung wieder ansteigt. Diese Kinetik wurde in unabhängigen Versuchsansätzen bestätigt, sodass analysebedingte Schwankungen als unwahrscheinlich einzuordnen sind. Korrespondierende Daten liegen aus einer zur Studie zur Pocken-Impfung mit dem Vaccinia-Virus vor, die in einer kleinen Kohorte nach Impfung ebenfalls einen klar umschriebenen Abfall und anschließenden Wiederanstieg der Gesamt $CD4^+$ T Zellzahl beobachteten (Zaunders, Dyer et al. 2006).

Für die Frühphase nach Gelbfieberimpfung ist bekannt, dass eine umfassende Aktivierung des angeborenen Immunsystems erfolgt, welche insbesondere eine vielseitige Aktivierung von APCs beinhaltet (Querec, Akondy et al. 2009). Schätzungen von Kwok et al. gehen davon aus, dass die vorbestehende Frequenz naiver $CD4^+$ T Zellen für ein bestimmtes Antigen im Menschen je nach Struktur des Ziel-Epitops zwischen 0.2 und 10/1.000.000 $CD4^+$ T Zellen liegt (Kwok, Tan et al. 2012). Es erscheint dementsprechend naheliegend, dass zunächst eine breite Vielfalt von $CD4^+$ T Zellen unabhängig von ihrer Antigen-spezifität in sekundäre lymphatische Organe migriert und anschließend wieder in die periphere Zirkulation zurückkehrt, insofern sie nicht auf ein für sie passendes Antigen getroffen ist. In tierexperimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass die vor Immunisierung im Blut zirkulierenden T Zellen im Rahmen eines akuten, immunologischen Prozesses in

sekundäre lymphatische Organe migrieren, um dort in den Kontakt mit aktivierten APCs zu treten und gegebenenfalls ihr Zielantigen zu erkennen (Ciabattini, Pettini et al. 2011).

Nach Tag 7 beobachteten wir einen Wiederanstieg der Zellzahl bis Tag 17, der sogar signifikant das Ausgangsniveau überschritt. Dies werteten wir als Rückkehr der nicht antigenspezifischen T Helfer-Zellen in die Zirkulation, der zeitgleich mit der Expansion der Population der YFV-17D spezifischen CD4⁺ T Zellen erfolgte. Die Rückkehr der Zellzahl auf Ausgangsniveau bis Tag 28 weist auf den selbstlimitierenden Charakter der Immunantwort hin und korrespondiert mit den Ergebnissen von Kohler et al. (Kohler, Bethke et al. 2012). Interessanterweise zeigte die getrennte Analyse Virämie-positiver und -negativer Spender einen deutlicheren Rückgang der CD4⁺ Gesamtzellzahl bei jenen Spendern, die eine Serumvirämie entwickelten. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte eine Virämie-bedingte stärkere Aktivierung des angeborenen Immunsystems sein, die zu einer umfassenderen Rekrutierung von T Zellen in lymphatische Organe führt.

Eine alternative Hypothese zur drastischen Abnahme der CD4⁺ T Zellzahl an Tag 7 wäre ein Zugrundegehen von Lymphozyten nach Impfung, für welches jedoch nach heutiger Datenlage zur Gelbfieberimpfung kein Anhalt vorliegt.

6.4 Recent Thymic Emigrants

Eine der am besten beschriebenen altersassoziierten Veränderungen des adaptiven Immunsystems ist der Rückgang der Zahl von aus dem Thymus austretenden, neu generierten naiven T Zellen (RTEs). Diese identifizierten wir zusätzlich zur auf allen naiven Zellen vorhandenen kombinierten Expression von CCR7 und CD45RA anhand von des Oberflächenmarkers CD31, den Kimming et al. als spezifisches Kennzeichen von RTEs etablieren konnten (Kimmig, Przybylski et al. 2002). Im Einklang mit den Daten von Kushner et al. konnten wir in bei unseren älteren Probanden vor Impfung signifikant niedrigere RTE-Frequenzen finden (Kushner, Weil et al. 2010). Kohler et al. zeigten, dass RTEs über ein breiteres TCR-Repertoire verfügen als homöostatisch proliferierte CD31^{neg} CD4⁺ T Zellen. Obwohl direkte TREC oder TCR-Repertoireanalysen für unsere Studie nicht durchgeführt wurden, gestatten unsere Daten die Annahme, dass ältere Menschen eine geringere TCR-Repertoire-Vielfalt aufweisen als jüngere. Da die Gelbfieberimpfung ein Modell der antiviralen Erstantwort darstellt müssen die rekrutierten CD4⁺ T Zellen

vorrangig aus der Population der naiven $CD4^+$ T Zellen hervorgehen. Ein breites Ausgangsrepertoire, repräsentiert durch eine größere RTE-Frequenz vor Impfung, erhöht also die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen mit passender TCR-Spezifität zeitnah aktiviert werden können. In der Tat ergaben sich positive Korrelationen zwischen der individuellen Ausgangs-RTE-Frequenz und der Höhe der zugehörigen YFV-17D-spezifischen $CD4^+$ Antwort während der Expansionsphase nach Impfung (Tag 4 & 7).

Eine geschlechtsgetrennte Betrachtung an Tag 0 zeigte signifikante Differenzen der RTE-Frequenz zwischen männlichen und weiblichen Probanden innerhalb der höheren Altersgruppe, wohingegen in der jüngeren Gruppe keine Unterschiede zu verzeichnen waren. Pido-Lopez und Kollegen untersuchten RTE Frequenzen anhand von TRECs und beobachteten ebenfalls neben einem altersassoziierten Rückgang von RTEs eine mit dem Alter zunehmende Differenz zwischen Männern und Frauen (Pido-Lopez, Imami et al. 2001). Insbesondere im Zusammenhang mit den von uns beobachteten Unterschieden zwischen den Geschlechtergruppen in der Entwicklung einer messbaren Virämie könnte die abweichende $CD4^+$ RTE-Populationsgröße einen weiteren Erklärungsbestandteil der erhöhten Inzidenz von SAEs bei älteren und männlichen Impfungen bieten (Lindsey, Schroeder et al. 2008).

6.5 Naive und Gedächtnis-T-Zell-Subpopulationen

Um ein tieferes Verständnis der induzierten $CD4^+$ T-Zellmigration und -proliferation zu erlangen, betrachteten wir im Folgenden die vier anhand der Expression von CCR7 und CD45RA zu unterscheidenden Subpopulationen und ihr Verhalten nach Impfung: Naiv, Effektor-Gedächtnis, zentrale Gedächtnis- und T_{EMRA} $CD4^+$ T Zellen. Diese wurden von Sallusto et al. als Lymphozytensubsets mit einzigartigen Aktivierungs- und Migrationseigenschaften definiert (Sallusto, Lenig et al. 1999). Dass sie sich im Rahmen einer antiviralen Erstantwort kinetisch unterschiedlich verhalten, konnten wir in unserer Studie zum ersten Mal im Menschen nachverfolgen. Am deutlichsten betroffen vom anfänglichen Rückgang aus dem peripheren Blut bis Tag 7 zeigten sich naive $CD4^+$ T Zellen ($CCR7^+/CD45RA^+$). In geringerem Umfang, jedoch ebenfalls signifikant abnehmend gegenüber dem Ausgangsniveau, reduzierte sich die Zahl zentraler Gedächtnis T Zellen ($CCR7^+/CD45RA^-$). Da CCR7 als Rezeptor für die Migration (*Homing*) in lymphatische

Organe fungiert, legt dieses Resultat nahe, dass in der Frühphase nach Impfung eine umfassende Rekrutierung von peripheren Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe stattfindet und so auch der Abfall der Gesamt-CD4⁺-Zellzahl an Tag 7 zu erklären ist (Müller and Lipp 2003). Im Gegensatz hierzu zeigten die CCR7-negativen Populationen der Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁻) und T_{EMRA} (CD45RA⁺) keinen Abfall ihrer Zellfrequenzen in der ersten Woche und blieben konstant auf ihrem Ausgangsniveau. Bis Tag 14 stiegen die Effektor-Gedächtniszellen dann signifikant an, was wir der einsetzenden Neubildung Gelbfieber-spezifischer CD4⁺ Effektor-Zellen zuordneten.

Die unterschiedlich verlaufende Rekrutierung der einzelnen Subsets sowie die dynamische Kinetik der CD4⁺ Gesamtzellzahl, legen die Frage nahe, inwiefern peripheres Blut grundsätzlich dazu geeignet ist, antigenspezifische Immunantworten akkurat nachzuverfolgen, wenn unter Umständen bevorzugt jene Zellen aus der Zirkulation verschwinden, die nach Impfung aktiviert wurden. Diese Fragestellung kann jedoch bei begrenzter Zugänglichkeit sekundärer lymphatischer Organe des Menschen nicht direkt beantwortet werden.

6.6 Die *ex-vivo*-Identifikation antigenspezifischer CD4⁺ T Zellen

Die *ex vivo* Identifikation von YFV-17D-spezifischen aktivierten CD4⁺ T-Zellen erfolgte analog zu der von Akondy et al. für CD8⁺ T Zellen gewählten Kombination des Aktivierungsmarkers CD38 sowie des Proliferationsmarkers Ki-67, den Blom et al. auch für die Analyse von CD4⁺ T Zellen verwendeten (Akondy, Monson et al. 2009; Blom, Braun et al. 2013).

Wir fanden bei allen Probanden ab Tag 10 nach Impfung einen signifikanten Anstieg der Ki-67⁺ CD38⁺ CD4⁺ T Zellen. Die Anzahl dieser Zellen lag hierbei im Median bei 20/μL und somit 10-fach erhöht gegenüber dem Ausgangswert von Tag 0. Dies entspricht ca. 2% aller zirkulierenden CD4⁺ T Zellen und unterstreicht so abermals das Ausmaß der induzierten Aktivierung. Das Zellzahl-Maximum aktivierter Zellen wurde im Median an Tag 14 erreicht. Diese Latenzzeit ist durchaus vergleichbar mit anderen humanen antiviralen Erstantworten wie zum Beispiel nach Pockenimpfung (Jing, Chong et al. 2007). Interessanterweise zeigt die altersgetrennte Auswertung, dass ältere Probanden im Durchschnitt den Höhepunkt des Verlaufes erst um einen Studientag verzögert an Tag 17

erreichen, dieser dann jedoch auf etwas höheren Niveau liegt als bei jüngeren Probanden. Dies könnte als leicht eingeschränkte Kompetenz im Aufbau der T-Helferzellantwort gewertet werden. Ähnliches wurde bereits im Rahmen der Influenzaimpfung beschrieben (Deng, Jing et al. 2004). Die Korrelationsanalyse zur protektiven Antikörperantwort (NTs) zeigte, dass eine höhere T-Helferzellaktivierung in der Expansionsphase der Antwort in einem positiven Verhältnis zur Höhe am Studienendpunkt nachweisbaren NTs steht. Daten, die von Lee et al. im Mausmodell zur Immunantwort nach Influenzainfektion erhoben wurden, legen nahe, dass CD4⁺ T Zellen diesen Prozess in hohem Maße unterstützen (Lee, Rangel-Moreno et al. 2005).

Die *ex-vivo* Methode identifizierte 10-mal mehr Zellen als YFV-17D-spezifisch als anhand der Expression von CD40L nach Impfstoffstimulation. Es kann also davon ausgegangen werden, dass nicht in allen antigenspezifischen CD4⁺ T Zellen nach 6-stündiger Stimulation bereits CD40L in messbarer Quantität vorliegen kann, da sich diese zum Beispiel gerade in Teilung befinden oder anerg sind. Ein alternativer Erklärungsansatz besteht in der Annahme, dass ein Teil der *ex vivo* identifizierten Zellen nicht YFV-17D spezifisch sind, sondern im Rahmen der systemischen Aktivierung quasi mitreagieren. Dieses als *Bystanderaktivierung* bezeichnete Phänomen ist eine interessante Hypothese zur Erklärung der langfristigen Aufrechterhaltung eines breiten *Pools* an Gedächtniszellen ohne Kontakt mit dem eigentlichen Pathogen, wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt (Bangs, Baban et al. 2009).

Kohler und Kollegen beobachteten nach Gelbfieberimpfung eine parallel einsetzende Zunahme von CD4⁺ T Zellen anderer Antigen-spezifität (hier Tetanus-Toxoid-spezifisch), bestimmt anhand ihres Anteils an Zytokinproduzenten. Diese waren jedoch im Gegensatz zu den Gelbfieber-spezifischen Zellen an keinem der Zeitpunkte positiv für Ki-67, sodass dies eher als Ausschwemmen nicht Antigen-spezifischer Zellen gewertet wurde, die durch die akut verlaufende Immunreaktion aus den lymphatischen Organen verdrängt wurden.

6.7 *In vitro* Stimulation

Um die Funktionalität der im Zuge der Impfantwort gebildeten CD4⁺ T Zellen beurteilen zu können, führten wir eine *in vitro*-Kurzzeitstimulation durch. Dies erfolgte im Vollblut mit komplettem Gelbfieberimpfstoff, um eine möglichst natürliche Zellkomposition sowie einen

physiologischen Prozess der Antigenpräsentation eines kompletten Virus' zu erzielen. So waren wir in der Lage mithilfe einer mehrdimensionalen, durchflusszytometrischen Analyse, die durch die Stimulation aktivierten CD4⁺ T Zellen zu identifizieren und ihre Zytokinproduktion zu erfassen. Die YFV-17D-spezifischen CD4⁺ T Zellen bestimmten wir anhand ihrer Expression des Oberflächenmoleküls CD40L, das von Frentsch et al. als spezifisch für CD4⁺ T Zellen nach TCR-Stimulation beschrieben wurde (Frentsch, Arbach et al. 2005). Die Betrachtung aller CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen ergab einen ab Tag 10 signifikant ansteigenden Verlauf mit Höhepunkt an Tag 14 bei einer Frequenz von nahezu 1 Zelle/ μ L. Der Zeitpunkt des Maximums stimmte überein mit der in unserem *ex vivo*-Panel ermittelten Kinetik. CD40L ist das zentrale Interaktionsmolekül zwischen T Helferzellen und B Zellen sowie zu professionellen APCs. Es bestand allerdings keine signifikante Korrelation zwischen der Höhe oder dem Zeitpunkt des Maximums an detektierten CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen und der einsetzenden Produktion neutralisierender Antikörper. Dies könnte in unserer begrenzten Zahl von Probanden begründet sein, die statistisch robuste Korrelationsanalysen erschwert. Andererseits beschrieben Kohler et al. eine positive Korrelation zwischen YFV-17D spezifischen CD4⁺ T Zellen und der Antikörperbildung lediglich für Tag 1, also deutlich vor unserem ersten Analysetag nach Impfung (Tag 4). Der überwiegende Anteil der von den CD40L⁺ Zellen produzierten Zytokine entfiel wie für eine antivirale Antwort zu erwarten auf die Th₁ Zytokine IFN γ und TNF α sowie auf das stark proliferationsfördernde IL2 (Gaucher, Therrien et al. 2008). Insbesondere innerhalb der ersten 10 Tage nach Impfung ließen sich jedoch zudem auch die Produktion von IL4 als auch im geringen Maße von RANKL und IL17 durch CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen nachweisen, was für die Breite der induzierten T-Zellantwort spricht. Dies könnte als Resultat der hohen Immunogenität des YFV-17D Impfung mit umfassender Aktivierung der angeborenen Abwehr ist gewertet werden, wie sie von Querec und Kollegen beschrieben wurde (Querec, Bennouna et al. 2006).

Insgesamt sahen wir uns bei der Auswertung der Zytokinantwort mit einer relativ hohen interindividuellen Variabilität der Verläufe und niedrigen Zellfrequenzen konfrontiert. Um die Impfstoff-spezifische Antwort von unspezifischer Hintergrundaktivierung abgrenzen zu können, führten wir eine „Hintergrundsubtraktion“ durch, bei der die in Stimulationsansätzen ohne Impfstoffzugabe ermittelten Frequenzen zytokinbildender

Zellen jeweils subtrahiert wurden. Dies ist ein gängiges Verfahren in der Analyse antigenspezifischer Antworten nach *in vitro* Stimulation (Roederer, Nozzi et al. 2011). Eine hohe systemische Hintergrundaktivierung kann folglich die im Fokus stehende antigenspezifische Antwort unkenntlich machen. Dies stellte hier jedoch bei gleichbleibend niedrigen Frequenzen aktivierter Zellen in den Kontrollproben und gut abgrenzbaren Populationen in den YFV-17D-stimulierten Ansätzen keine Schwierigkeit bei der Auswertung dar.

Im Gegensatz zu den Resultaten von Gillis et al., die altersabhängige Veränderungen in der Zytokinproduktion (Abnahme von IL2, Zunahme von u.a. TNF α) im höheren Lebensalter zeigten (Gillis, Kozak et al. 1981), konnten wir keine signifikanten, altersabhängigen Differenzen in den zwei-dimensionalen Verläufen (CD40L vs Zytokin) erkennen, was am ehesten auf hohen Variabilität der Einzelverläufe und der begrenzten Probandenzahl zurückzuführen ist. Dass YFV-17D spezifischer CD4⁺ T Zellen nach Kurzzeitstimulation bis Tag 28 konstant nachgewiesen werden konnten, kann als erster Anhaltspunkt für die Entstehung von langlebigen Gedächtniszellen über das Einsetzen der Kontraktionsphase hinaus gewertet werden.

6.8 Die Gelbfieber-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort und neutralisierende Antikörper im Langzeitverlauf

Um untersuchen zu können, inwiefern sich die Fähigkeit zur Ausbildung eines robusten immunologischen Gedächtnisses mit zunehmendem Alter verändert, luden wir alle Studienprobanden zu einem Folgetermin ein, der frühestens 20 und spätestens 35 Monate nach Impfung stattfand und an dem 21 der anfänglich 25 Personen teilnahmen. Für die Gelbfieberimpfung liegen bislang keine Daten zur CD4⁺ T Zellantwort über den Zeitraum von einem Jahr nach Impfung hinaus vor. Bestanden an Tag 28 nach Impfung nur marginale Unterschiede zwischen den Altersgruppen hinsichtlich ihrer Zytokinantwort und CD40L-Expression, so zeigten sich am Folgetermin deutlichere Differenzen. Insbesondere die Frequenz der IFN γ -produzierenden CD40L⁺ CD4⁺ T Zellen war bei älteren Teilnehmern drastisch vermindert bzw. gar nicht mehr als Population nach Impfstoffstimulation detektierbar. Bei jungen Probanden blieb sie hingegen im Durchschnitt gegenüber dem

Ende der Hauptstudie größenstabil. Auch bei IL2-bildenden Zellen fielen die am Folgetermin bestimmten Frequenzen in beiden Altersgruppen gegenüber Tag 28 signifikant ab. Diese Population war ebenfalls bei älteren Probanden tendenziell kleiner. Die langfristige Erhaltung der Gelbfieber-spezifischen Immunantwort scheint also auf Ebene der T-Helferzellen mit zunehmendem Alter beeinträchtigt. In einer Studie zur Impfung gegen das Varizella-Zoster-Virus im höheren Lebensalter ist ein altersabhängiger Verlust von CD4⁺ Gedächtniszellen nach initial erfolgreicher Primärantwort beschrieben worden, der im Verlauf eine Reaktivierung des Virus begünstigt (Levin 2012). Mögliche Erklärungsansätze bestehen sowohl in der Veränderung des T-Zell-Repertoires durch chronische Virusinfektionen wie CMV als auch in intrinsischen Zelldefekten, wie einer verminderten DNA-Reparatur-Kapazität oder auch der negativen Beeinflussung von Signalwegen, die zu einer Abnahme der Expression von CD40L nach Aktivierung führt (Li, Yu et al. 2012). Inwiefern dieser Verlust von antigenspezifischen CD4⁺ T Zellen jedoch die Protektion gegenüber einer natürlichen Infektion beeinflusst und ob unter Umständen für ältere Personen kürze Impfintervalle zu empfehlen wären, muss im Zusammenhang mit weiteren immunologischen Parametern wie neutralisierenden Antikörpertitern oder zytotoxischen T Zellen betrachtet werden. Für YFV-17D neutralisierende Antikörper ergaben sich am Folgetermin unserer Studie keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen in Hinblick auf absolute Titerhöhe sowie deren Konstanz im Vergleich zu Tag 28, sodass wir von einer hohen Langzeitstabilität der Antikörperantwort ungeachtet des Probandenalters ausgehen, wie sie unter anderem von Poland und Kollegen beschrieben wurde (Poland, Calisher et al. 1981).

6.9 Polyfunktionalität der T-Helferzellantwort

Um die Qualität einer CD4⁺ T Zell-Antwort nach Impfung beurteilen zu können, wird häufig auf die Frequenz der IFN γ -produzierenden CD4⁺ T Zellen zurückgegriffen, für welche eine Rolle in der Kontrolle und Beseitigung bakterieller und viraler Infektionen gezeigt werden konnte (Darrah, Patel et al. 2007). Aus den von uns ermittelten zweidimensionalen Zytokinverläufen nach Impfung wurde allerdings ersichtlich, dass ein bedeutender Teil der CD40L exprimierenden T Zellpopulation weitere Zytokine wie TNF α , IL2 oder auch IL4 produziert, deren Funktion in der Bekämpfung von Infektionen ebenfalls beschrieben ist.

Ebenfalls wurde für im Kontext bakterieller Infektionen beobachtet, dass T Zellen, die simultan IFN γ und TNF α produzierten, zu einer verbesserten Infektionskontrolle beitrugen. Es konnte hier außerdem gezeigt werden, dass höherfunktionale CD4⁺ T Zellen bis zu 10-fach mehr IFN γ pro Zelle produzierten und so im höheren Maße protektiv wirken als monofunktionale Zellen (Kannanganat, Ibegbu et al. 2007). In Anlehnung an die von Seder et al. als bedeutend für die Qualität einer T Helferzellantwort eingestufte Polyfunktionalität von CD4⁺ T Zellen erstellten wir also ein mehrdimensionale Zytokinprofil der YFV-17D spezifischen CD4⁺ T Zellen (Seder, Darrah et al. 2008). Den höchsten Anteil polyfunktionaler Zellen beobachteten wir in der Expansionsphase am Tag 10 nach Impfung mit mehr als 50% der Zellen, die zwei und mehr Zytokine produzierten. Der größte Anteil entfiel hierbei auf TNF α -IL2-Koproduzenten, was der Differenzierungsphase von naiven CD4⁺ T Zellen hin zu T_{CM} Zellen des von Seder et al vorgeschlagenen Modells entspricht. Bis Tag 28 nahm der Anteil der IL2 ko-produzierenden Zellen unter den aktivierten Zellen ab, was im Modell mit der zunehmenden Ausdifferenzierung in Richtung von Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) korrespondiert. Ältere Probanden verfügten zu diesem Zeitpunkt tendenziell über weniger polyfunktionale Zelle als jüngere. In Studien zum Vergleich verschiedener Virusinfektionen konnte gezeigt werden, dass akut verlaufende, vom Immunsystem kontrollierte Infektionen wie EBV, Influenza oder nicht progrediente HIV-Infektionen mit einem höheren Anteil polyfunktionaler Zellen (hier: TNF α , IL2, IFN γ) einhergingen als chronische CMV- oder progrediente HIV-Infektionen (Kannanganat, Ibegbu et al. 2007; Tilton, Luskin et al. 2007). Ob die Existenz dieser Zellen jedoch Voraussetzung für eine Viruskontrolle ist oder aber Ausdruck derer, bleibt unklar (Jansen, De Cuyper et al. 2006). Alle unsere Probanden wiesen nach Tag 10 keine im Serum messbare Virämie auf, kontrollierten also die Modellinfektion erfolgreich. Auch zum Folgetermin nach 20-35 Monaten konnten höherfunktionale antigenspezifische CD4⁺ T Zellen, detektiert werden, was für die Stabilität der induzierten Immunantwort spricht. Eine Studie zur Impfung mit dem Vaccinia-Virus (VV) konnte auch 50 Jahre eine kleine VV-spezifische mehrfunktionale CD4⁺ T Zellpopulation nachweisen (Hammarlund, Lewis et al. 2003). Eine erneute Untersuchung unserer Probandenkohorte im Verlauf könnte hier weitere Einblicke in die Gelbfieber-spezifischen Impfantwort im Langzeitverlauf gewähren.

6.10 Fazit und Ausblick

In verschiedenen aufeinander aufbauenden Analyseschritten wurde die CD4⁺ T Zellantwort nach Gelbfieberimpfung in zwei altersgetrennten Probandenkohorten detailliert charakterisiert. Die vorangestellte Betrachtung der Kinetik aller im Blut zirkulierenden CD4⁺ Zellen und ihrem Verschwinden aus der Peripherie lieferte einen Einblick in das Ausmaß des immunologischen Aktivierungsprozesses nach Lebendimpfung. Es bleibt zu untersuchen, ob dieses Phänomen auch in der Frühphase nach natürlich erworbenen Infektionen vorliegt und wohin genau die Zellen im menschlichen Organismus zwischenzeitlich migrieren. Zudem sollte geklärt werden, ob das Ausmaß des Abfalls und die Höhe des anschließenden Maximums Rückschlüsse über die Immunkompetenz des Individuums sowie die Art des Pathogens bzw. die Effizienz der Impfung erlauben. Inwiefern ein derartiger Abfall der zirkulierenden T Helferzellen eine temporäre Erhöhung der Anfälligkeit für eine Sekundärinfektion darstellt, bleibt ebenfalls zu klären.

In der hier vorliegenden Studie wurde untersucht, inwiefern das Differenzierungsstadium der T Helferzelle das Rekrutierungsprofil nach Impfung beeinflusst. Zellen, die den CCR7-Rezeptoren exprimierten, welcher das *Homing* in lymphatische Organe fördert, waren in einem höheren Maße vom anfänglichen Zell-Rückgang betroffen, als Zellen, die diesen Rezeptor nicht ausprägten und für die auch keine primäre Funktion in diesen Organen beschrieben ist. Zusammengenommen festigte dies unsere Annahme, dass der Rückgang der Gesamthelferzellzahl in der ersten Woche am ehesten eine Migration der rekrutierbaren naiven und T_{CM} Zellen in lymphatische Organe oder andere Körpergewebe darstellt und sich im peripheren Blut lediglich ein Abbild der an anderer Stelle ablaufenden Prozesse der Antigenpräsentation sowie Lymphozytenaktivierung und –proliferation zeigt.

Als Ausgangspunkt der weiteren Analyse der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellantwort, wurde die für die Ausbildung neuer T Zellen essentielle Thymusaktivität vor Impfung für alle Probanden bestimmt. Da darauf geachtet wurde, dass keine vorbestehenden Antikörper gegen Gelbfieber oder verwandte Flaviviren bei unseren Spendern vorlagen, konnten wir davon ausgehen, eine überwiegend von naiven T Zellen getragene Primärantwort zu beobachten. Zum ersten Mal konnten wir für eine humane Immunantwort zeigen, dass die Frequenz von RTEs vor Impfung sowohl positiv mit der Größe der späteren antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellantwort als auch mit der Höhe der

neutralisierenden Antikörper zum Endpunkt der Hauptstudie korrelierte. Da die Abnahme der Thymusaktivität zum physiologischen Alterungsprozess gehört, bleibt zu untersuchen, inwiefern eine Beeinträchtigung der CD4⁺ T Zell-Erstantwort bei noch älteren Personen oder Individuen nach Thymektomie vorliegt und gegebenenfalls Kompensationsmechanismen greifen. Außerdem zeigte sich, dass im höheren Lebensalter eine signifikante Differenz in der RTE-Frequenz zwischen männlichen und weiblichen Probanden besteht. Zusammengenommen mit den zuvor beschriebenen Korrelationen zu Effektorzell-T-Zellantwort sowie der Höhe der neutralisierenden Antikörper zu Studienende und den bei Frauen seltener auftretenden YFV-17D-Serumvirämie wirft dies die Frage auf, ob Männer im höheren Lebensalter im gesteigerten Maß vom vielschichtigen Prozess der Immunoseneszenz betroffen sind.

Das von uns erhobene Zytokinprofil der YFV-17D-spezifischen CD4⁺ T Zellen unterstreicht mit seiner robusten Größe sowie des hohen Anteils polyfunktionaler Zellen sowohl in der Primärantwort als auch im Langzeitverlauf die bereits bekannte hohe Immunogenität der Gelbfieberimpfung. Kritisch zu betrachten bleibt der signifikant höhere Verlust von Zytokinbildenden Zellen, insbesondere von IFN γ -Produzenten. Ob eine Gefährdung des Impferfolges hieraus resultiert, sollte im Zusammenhang mit weiteren Parametern der Protektion wie neutralisierenden Antikörpern oder zytotoxischen T Zellen im Langzeitverlauf untersucht werden.

Im Hinblick auf die Serumvirämie ist anzunehmen, dass die erfolgreiche Kontrolle der Modellinfektion entscheidend von Abwehrmechanismen beeinflusst wird, die dem angeborenen Immunsystem zugehörig sind, was Gegenstand einer Folgestudie sein könnte.

Letztendlich wäre eine systembiologische Integration der Studienergebnisse denkbar, anhand derer die komplexen Veränderungen des alternden Immunsystems besser nachvollzogen werden können. Um altersabhängige Veränderungen der Immunantwort auf die hoch immunogene Gelbfieberimpfung noch deutlicher herauszuarbeiten, bleibt zu diskutieren, für eine zukünftige Studie ein höheres Alter der älteren Probandenkohorte anzustreben, unter Berücksichtigung des steigenden Risikos einer Impfkomplication sowie des Einflusses von vorliegenden chronischen Erkrankungen.

7 LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Professor Andreas Thiel bedanken, der es mir ermöglicht hat, mit viel wissenschaftlicher Freiheit eine faszinierende Fragestellung zu untersuchen und eine spannende Studie mitzugestalten. Vielen Dank für die fachkundige, ermutigende Betreuung in allen Etappen der Arbeit.

Mein riesengroßer Dank gilt Axel Schulz, ohne den dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Deine Begeisterung für die Wissenschaft hat mich wirklich angesteckt. Du hast mir unglaublich viel beigebracht, mich in jeder Situation unterstützt und motiviert. Es war und es ist ein Vergnügen mit dir gemeinsam zu forschen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für ihre vielfältige Unterstützung in allen Abschnitten des Entstehens dieser Arbeit danken. Ich danke euch für die nette Atmosphäre im Labor, hilfreiche Tipps und tolle Diskussionen.

Danken möchte ich auch Dr. Cristina Domingo Carrasco und den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Professor Matthias Niedrig vom Robert Koch-Institut für die Analyse der serologischen Parameter und ihre Hilfe bei Fragen zu virologischen Aspekten der Arbeit.

Dr. Désirée Kunkel möchte ich danken für die exzellente Betreuung und technische Unterstützung im Bereich der Durchflusszytometrie, die im Zentrum dieses Projektes stand.

Einen großen Dank möchte ich meinen Eltern und Freunden aussprechen, die mich in den Jahren des Studiums und der Doktorarbeit ermutigt, unterstützt und begleitet haben.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Abehsira-Amar, O., M. Gibert, et al. (1992). "IL-4 plays a dominant role in the differential development of Tho into Th1 and Th2 cells." The Journal of Immunology **148**(12): 3820-3829.
- Akondy, R. S., N. D. Monson, et al. (2009). "The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8+ T Cell Response." The Journal of Immunology **183**(12): 7919-7930.
- Al-Harhi, L., G. Marchetti, et al. (2000). "Detection of T cell receptor circles (TRECs) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction–enzyme linked immunosorbent assay (PCR–ELISA)." Journal of Immunological Methods **237**(1–2): 187-197.
- Bangs, S. C., D. Baban, et al. (2009). "Human CD4+ Memory T Cells Are Preferential Targets for Bystander Activation and Apoptosis." The Journal of Immunology **182**(4): 1962-1971.
- Barrett, A. D. T. and D. E. Teuwen (2009). "Yellow fever vaccine-how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place?" Current Opinion in Immunology **21**(3): 308-313.
- Berger, N. A., P. Savvides, et al. (2006). "Cancer in the Elderly." Trans Am Clin Climatol Assoc. **117**: 147–156.
- Blom, K., M. Braun, et al. (2013). "Temporal Dynamics of the Primary Human T Cell Response to Yellow Fever Virus 17D As It Matures from an Effector- to a Memory-Type Response." The Journal of Immunology **190**(5): 2150-2158.
- Buchow, H., E. Cayotte, et al. (2012). Eurostat - Circulatory diseases - Main causes of death for persons aged 65 and more in Europe, 2006, Eurostat, EU.
- Cantrell, D. A. and K. A. Smith (1984). "The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model." Science **224**(4655): 1312-1316.
- Ciabattini, A., E. Pettini, et al. (2011). "Distribution of Primed T Cells and Antigen-Loaded Antigen Presenting Cells Following Intranasal Immunization in Mice." PLoS ONE **6**(4): e19346.
- Cooper, G. S. and B. C. Stroehla (2003). "The epidemiology of autoimmune diseases." Autoimmunity Reviews **2**(3): 119-125.
- Curtsinger, J. M., C. S. Schmidt, et al. (1999). "Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4+ and CD8+ T Cells." The Journal of Immunology **162**(6): 3256-3262.

- Darrah, P. A., D. T. Patel, et al. (2007). "Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*." Nat Med **13**(7): 843-850.
- Deng, Y., Y. Jing, et al. (2004). "Age-Related Impaired Type 1 T Cell Responses to Influenza: Reduced Activation Ex Vivo, Decreased Expansion in CTL Culture In Vitro, and Blunted Response to Influenza Vaccination In Vivo in the Elderly." The Journal of Immunology **172**(6): 3437-3446.
- Domingo, C., P. Patel, et al. (2012). "Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories." Journal of Clinical Microbiology **50**(12): 4054-4060.
- Douek, D. C., R. McFarland, D., et al. (1998). "Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection." Nature **396**(6712): 690-695.
- Fazilleau, N., L. Mark, et al. (2009). "Follicular Helper T Cells: Lineage and Location." Immunity **30**(3): 324-335.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.
- Frentsch, M., O. Arbach, et al. (2005). "Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression." Nat Med **11**(10): 1118-1124.
- Gaucher, D., R. Therrien, et al. (2008). "Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses." The Journal of Experimental Medicine **205**(13): 3119-3131.
- Gershman, M. and J. E. Staples (2011). Yellow Fever. 2012 - Yellow Book Travelers' Health. C. f. D. Control.
- Gillis, S., R. Kozak, et al. (1981). "Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans." The Journal of Clinical Investigation **67**(4): 937-942.
- Goodwin, K., C. c. Viboud, et al. (2006). "Antibody response to influenza vaccination in the elderly: A quantitative review." Vaccine **24**(8): 1159-1169.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, et al. (1999). "The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation." Science **285**(5425): 221-227.
- Grogan, J. L., M. Mohrs, et al. (2001). "Early Transcription and Silencing of Cytokine Genes Underlie Polarization of T Helper Cell Subsets." Immunity **14**(3): 205-215.
- Guimard, T., S. Minjolle, et al. (2009). "Incidence of Yellow Fever Vaccine-Associated Neurotropic Disease." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **81**(6): 1141-1143.

- Hammarlund, E., M. W. Lewis, et al. (2003). "Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination." *Nat Med* **9**(9): 1131-1137.
- Haribhai, D., Jason B. Williams, et al. (2011). "A Requisite Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity." *Immunity* **35**(1): 109-122.
- He, X.-S., T. H. Holmes, et al. (2008). "Baseline Levels of Influenza-Specific CD4 Memory T-Cells Affect T-Cell Responses to Influenza Vaccines." *PLoS ONE* **3**(7): e2574.
- Heon Park, Zhaoxia Li, et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nature Immunology* **6**: 1133-1141.
- Jansen, C. A., I. M. De Cuyper, et al. (2006). "Prognostic value of HIV-1 Gag-specific CD4+ T-cell responses for progression to AIDS analyzed in a prospective cohort study." *Blood* **107**(4): 1427-1433.
- Jeppson, J. D., H. R. Patel, et al. (1998). "Requirement for Dual Signals by Anti-CD40 and IL-4 for the Induction of Nuclear Factor- κ B, IL-6, and IgE in Human B Lymphocytes." *The Journal of Immunology* **161**(4): 1738-1742.
- Jing, L., T. M. Chong, et al. (2007). "Dominance and Diversity in the Primary Human CD4 T Cell Response to Replication-Competent Vaccinia Virus." *The Journal of Immunology* **178**(10): 6374-6386.
- Jutel, M., M. Akdis, et al. (2003). "IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy." *European Journal of Immunology* **33**(5): 1205-1214.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry, et al. (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." *Nat Rev Immunol* **2**(4): 251-262.
- Kannanganat, S., C. Ibegbu, et al. (2007). "Multiple-Cytokine-Producing Antiviral CD4 T Cells Are Functionally Superior to Single-Cytokine-Producing Cells." *Journal of Virology* **81**(16): 8468-8476.
- Kearney, E. R., T. L. Walunas, et al. (1995). "Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4." *The Journal of Immunology* **155**(3): 1032-1036.
- Khromava, A. Y., R. B. Eidex, et al. (2005). "Yellow fever vaccine: An updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events." *Vaccine* **23**(25): 3256-3263.
- Kimmig, S., G. K. Przybylski, et al. (2002). "Two Subsets of Naive T Helper Cells with Distinct T Cell Receptor Excision Circle Content in Human Adult Peripheral Blood." *The Journal of Experimental Medicine* **195**(6): 789-794.

- Kohler, S., N. Bethke, et al. (2012). "The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination." European Journal of Immunology **42**(9): 2363-2373.
- Kohler, S., U. Wagner, et al. (2005). "Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults." European Journal of Immunology **35**(6): 1987-1994.
- Kroon FP, v. D. J., de Jong JC, van Furth R. (1994). "Antibody response to influenza, tetanus and pneumococcal vaccines in HIV-seropositive individuals in relation to the number of CD4+ lymphocytes." AIDS **8**(4): 469-476.
- Kroon FP, v. D. J., Labadie J, van Loon AM, van Furth R. (1995). "Antibody response to diphtheria, tetanus, and poliomyelitis vaccines in relation to the number of CD4+ T lymphocytes in adults infected with human immunodeficiency virus." Clin Infect Dis. **21**(5): 1197-1203.
- Kushner, E. J., B. R. Weil, et al. (2010). "Human aging and CD31+ T-cell number, migration, apoptotic susceptibility, and telomere length." Journal of Applied Physiology **109**(6): 1756-1761.
- Kwok, W. W., V. Tan, et al. (2012). "Frequency of Epitope-Specific Naive CD4+ T Cells Correlates with Immunodominance in the Human Memory Repertoire." The Journal of Immunology **188**(6): 2537-2544.
- Lang, J., J. Zuckerman, et al. (1999). "Comparison of the immunogenicity and safety of two 17D yellow fever vaccines." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **60**(6): 1045-1050.
- Lee, B. O., J. Rangel-Moreno, et al. (2005). "CD4 T Cell-Independent Antibody Response Promotes Resolution of Primary Influenza Infection and Helps to Prevent Reinfection." The Journal of Immunology **175**(9): 5827-5838.
- Levin, M. J. (2012). "Immune senescence and vaccines to prevent herpes zoster in older persons." Current Opinion in Immunology **24**(4): 494-500.
- Li, G., M. Yu, et al. (2012). "Decline in miR-181a expression with age impairs T cell receptor sensitivity by increasing DUSP6 activity." Nat Med **18**(10): 1518-1524.
- Lindsey, N. P., B. A. Schroeder, et al. (2008). "Adverse event reports following yellow fever vaccination." Vaccine **26**(48): 6077-6082.
- Mackall, C. L., T. A. Fleisher, et al. (1995). "Age, Thymopoiesis, and CD4+ T-Lymphocyte Regeneration after Intensive Chemotherapy." New England Journal of Medicine **332**(3): 143-149.

- Mason, R. A., N. M. Tauraso, et al. (1973). "Yellow Fever Vaccine: Direct Challenge of Monkeys Given Graded Doses of 17D Vaccine." Appl Microbiology **25**(4): 539-544.
- McMahon, A. W., R. B. Eidex, et al. (2007). "Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: A report of 15 cases." Vaccine **25**(10): 1727-1734.
- Meier, S., R. Stark, et al. (2008). "The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4+ T cells." Cytometry Part A **73A**(11): 1035-1042.
- Miller, J. D., R. G. van der Most, et al. (2008). "Human Effector and Memory CD8+ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines." Immunity **28**(5): 710-722.
- Monath, T. P. (2008). "Treatment of yellow fever." Antiviral Research **78**(1): 116-124.
- Müller, G. and M. Lipp (2003). "Shaping Up Adaptive Immunity: The Impact of CCR7 and CXCR5 on Lymphocyte Trafficking." Microcirculation **10**(3-4): 325-334.
- Murphy, K. (2011). Janeway's Immunobiology. New York, USA, Garland Science, 201-203, 337-338, 290.
- Naylor, K., G. Li, et al. (2005). "The Influence of Age on T Cell Generation and TCR Diversity." The Journal of Immunology **174**(11): 7446-7452.
- Pandiyan, P., L. Zheng, et al. (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nat Immunol **8**(12): 1353-1362.
- Pido-Lopez, J., N. Imami, et al. (2001). "Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age." Clinical & Experimental Immunology **125**(3): 409-413.
- Poland, J. D., C. H. Calisher, et al. (1981). "Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine." Bull World Health Organ **59**(6): 895-900.
- Poulin, J.-F., M. N. Viswanathan, et al. (1999). "Direct Evidence for Thymic Function in Adult Humans." The Journal of Experimental Medicine **190**(4): 479-486.
- Pulendran, B., J. Miller, et al. (2008). "Case of Yellow Fever Vaccine-associated Viscerotropic Disease with Prolonged Viremia, Robust Adaptive Immune Responses, and Polymorphisms in CCR5 and RANTES Genes." Journal of Infectious Diseases **198**(4): 500-507.
- Querec, T., S. Bennouna, et al. (2006). "Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity." The Journal of Experimental Medicine **203**(2): 413-424.

- Querec, T. D., R. S. Akondy, et al. (2009). "Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans." Nat Immunol **10**(1): 116-125.
- Reed, L. J. and H. Muench (1938). "A simple method of estimating fifty per cent endpoints." American Journal of Epidemiology **27**(3): 493-497.
- Reinhardt, B., R. Jaspert, et al. (1998). "Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: A model of human flavivirus infection." Journal of Medical Virology **56**(2): 159-167.
- Roederer, M., J. L. Nozzi, et al. (2011). "SPICE: Exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets." Cytometry Part A **79A**(2): 167-174.
- Roukens, A. H., D. Soonawala, et al. (2011). "Elderly Subjects Have a Delayed Antibody Response and Prolonged Viraemia following Yellow Fever Vaccination: A Prospective Controlled Cohort Study." PLoS ONE **6**(12): e27753.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (2009). "Human Th17 cells in infection and autoimmunity." Microbes and Infection **11**(5): 620-624.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature.
- Schoenberger, S. P., R. E. M. Toes, et al. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**(6684): 480-483.
- Seder, R. and R. Ahmed (2003). "Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation." Nature Immunology **4**: 853-842.
- Seder, R. A., P. A. Darrah, et al. (2008). "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design." Nat Rev Immunol **8**(4): 247-258.
- Shedlock, D. J. and H. Shen (2003). "Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory." Science **300**(5617): 337-339.
- Steinmann, G. G., B. Klaus, et al. (1985). "The Involution of the Ageing Human Thymic Epithelium is Independent of Puberty." Scandinavian Journal of Immunology **22**(5): 563-575.
- Thompson, W., D. K. Shay, et al. (2003). "Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the united states." JAMA **289**(2): 179-186.
- Tilton, J. C., M. R. Luskin, et al. (2007). "Changes in Paracrine Interleukin-2 Requirement, CCR7 Expression, Frequency, and Cytokine Secretion of Human Immunodeficiency Virus-Specific CD4+ T Cells Are a Consequence of Antigen Load." Journal of Virology **81**(6): 2713-2725.

United Nations (2011). World Population Prospects: The 2010 Revision, Highlights and Advanced Tabela. New York, United Nations: 6-8; 17-20.

van Vlasselaer, P., J. Punnonen, et al. (1992). "Transforming growth factor-beta directs IgA switching in human B cells." The Journal of Immunology **148**(7): 2062-2067.

WHO (2011). Yellow Fever. WHO Fact Sheet **100**.

Yager, E. J., M. Ahmed, et al. (2008). "Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus." The Journal of Experimental Medicine **205**(3): 711-723.

Zaunders, J. J., W. B. Dyer, et al. (2006). "CD127+CCR5+CD38+++ CD4+ Th1 Effector Cells Are an Early Component of the Primary Immune Response to Vaccinia Virus and Precede Development of Interleukin-2+ Memory CD4+ T Cells." Journal of Virology **80**(20): 10151-10161

Zhu, J., H. Yamane, et al. (2006). "GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors." Cell Res **16**(1): 3-10.

10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Julia Nora Mälzer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Altersabhängige Veränderungen der CD4⁺ T-Zell-Antwort nach Gelbfieberimpfung“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift