

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

DISSERTATION

„Charakterisierung und Kinetik der CD4⁺ T-Zell-Antwort nach Influenzaimpfung bei alten und jungen Erwachsenen“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dominika Rachwalik

aus Görlitz

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

I.	Abstract	I
II.	Zusammenfassung.....	III
III.	Abkürzungen.....	V
1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Die Influenzainfektion	2
1.2.1	Das Influenzavirus.....	3
1.2.2	Die Besonderheiten des Influenza A /H1N1-Virus.....	5
1.2.3	Der Influenzaimpfstoff	6
1.3	Das Immunsystem.....	7
1.3.1	Das angeborene Immunsystem.....	7
1.3.2	Das adaptive Immunsystem.....	7
1.3.3	B-Lymphozyten.....	8
1.3.4	T- Lymphozyten.....	9
1.3.5	Aktivierung und Differenzierung der CD4 ⁺ T-Zellen	10
1.4	Impfimmunologie und ihre Auswirkungen auf die Immunoseneszenz.....	14
1.5	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Technisches Equipment und Material	18
2.2	Chemikalien und allgemeine Reagenzien	20
2.3	Auswahl der Probandenkohorte.....	22
2.4	Studiendesign und Studienablauf.....	23
2.5	Isolierung mononuklearer Zellen aus peripherem Blut	25
2.6	<i>In-vitro</i> -Stimulation von antigenspezifischen CD4 ⁺ T- Zellen.....	26
2.7	Die multiparametrische Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie	27
2.8	Charakterisierung der CD4 ⁺ T-Zellen	30
2.9	Markierung von Zelloberflächenstrukturen	32
2.10	Zellfixierung und Zellpermeabilisierung	32
2.11	Intrazelluläre Färbung von fixierten Zellen	33
2.12	Berechnung der absoluten CD4 ⁺ T-Zellanzahl.....	33
2.13	Phänotypisierung der Plasmablasten	34

Inhaltsverzeichnis

2.14	Hämagglutinationshemmtest (HHT)	35
2.15	Immunstatus der Probanden vor der Impfung	35
2.16	Datenanalyse und statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Der serologische Immunstatus vor und nach der Influenzaimpfung	38
3.2	Kinetik der Plasmablasten im peripheren Blut.....	40
3.3	Absolute CD4 ⁺ T-Zellzahl im peripheren Blut.....	42
3.4	Phänotypische Charakterisierung der zentralen Gedächtnis- und naiven CD4 ⁺ T-Zellen und ihre Kinetik.....	43
3.5	Proliferationsmarker Ki-67 ⁺ der CD4 ⁺ T-Zellen am Tag 7.....	48
3.6	Charakterisierung antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen und ihre Kinetik	50
3.7	Zytokinprofil der antigenspezifischen CD4 ⁺ T-Zellen	53
3.8	Polyfunktionalität antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen	54
3.9	Korrelationen	58
3.10	Protektiver Immunschutz.....	61
4	Diskussion.....	63
4.1	Serologische Immunantwort	63
4.2	Plasmablasten als Marker zur Bestätigung der humoralen Immunantwort	65
4.3	Die absoluten CD4 ⁺ T-Zellzahlen.....	66
4.4	Phänotypisierung der CD4 ⁺ T-Zellen in T _{NC} und T _{CM}	67
4.5	Proliferationsmarker Ki-67.....	68
4.6	NSSN-abhängige antigenspezifische CD4 ⁺ CD40L ⁺ T-Zellen.....	69
4.7	Zytokinprofil der antigenspezifischer CD4 ⁺ CD40L ⁺ T-Zellen.....	71
4.8	Polyfunktionalität der T-Zellen	72
4.9	Zusammenhänge der einzelnen Zellpopulationen	73
4.10	Protektive Immunität.....	74
5	Ausblick und Fazit der Arbeit	75
6	Literaturverzeichnis	76
7	Eidesstattliche Versicherung.....	84
8	Lebenslauf	86
9	Publikationsliste.....	88
10	Danksagung.....	89

I. Abstract

The WHO estimates that Influenza viruses cause at about 5 to 15 percent of the population an annual influenza infections. In particular, the elderly is affected by the morbidity and mortality of infections. At present, the annual influenza vaccination against current influenza strains is the most effective prophylaxis. Nevertheless some people from the age of 60 do not develop an effective immune protection. The lack of protective vaccination is due to recent studies by the presumably reduced immune competence (immunosenescence). However, the causality between the age and the immune system is not understood by now and needs further research.

In the present work a portion of the research project „PRIMAGE“ (Protective Immunity in Ageing) was investigated. The aim was to analyze the changes of the humoral and adaptive immune response over time and thus the vaccination failure in the elderly population. Two groups of healthy volunteers between the age of 53 to 65 and 18 to 30 were vaccinated against seasonal influenza with a trivalent inactivated influenza vaccine (TIV). These two groups of donors were compared to reveal and understand the putative immune competence of elderly. In addition to the old-age dependency a new aspect, the influenza strain (NSSN-) specificity was detected. The NSSN-specificity is the number of influenza strains seronegative at the time prior to vaccination. The influenza vaccine used in this study contained three virus strains A/California/H1N1, B/Brisbane and A/Perth/H3N2. While for B/Brisbane and A/Perth/H3N2 crossreactivities and an existing immunological memory were expected, we suspected for the re-encountered strain A/California/H1N1 little or no cross-reactivity and a naive immune response.

At 10 different points in time blood samplings and the analysis of various cell populations were carried out. In the serological analysis we were able to show significantly decreased formation of the HI titers to A/California/H1N1 in the elderly donors. For further quantitative and qualitative analysis of different cell populations, flow cytometry was performed. Clear changes in humoral response, such as reduced plasmablast formation could be confirmed in the elderly. Other age-specific differences were detected over time in the analysis of the proliferation marker Ki-67 in CD4⁺ T cells and in the phenotyping of naive and central memory cells. In contrast, NSSN-specific differences of the influenza specific CD4⁺CD40L⁺ T cells were observed after *in-vitro* stimulation.

The findings of this study will help to better understand the immune response following influenza vaccination and to optimize the vaccination strategy, particularly for the elderly population.

II. Zusammenfassung

Influenza-Viren verursachen nach Schätzungen der WHO etwa bei fünf bis 15 Prozent der Bevölkerung alljährliche Influenzainfektionen mit schwerwiegenden Komplikationen. Besonders die immer älter werdende Bevölkerung ist stark durch die Morbidität und Mortalität von Infektionen betroffen. Gegenwärtig stellt die alljährliche Influenzaimpfung gegen aktuelle Influenzastämme die effektivste Prophylaxe gegen die Viren dar. Dennoch besteht bei einer Vielzahl von Menschen ab dem 60. Lebensjahr trotz Influenzaimpfung kein effektiver Immunschutz. Der ausbleibende Schutz der Impfung wird in bisherigen Studien durch die vermutlich verminderte Immunkompetenz (Immunosensenz) begründet. Jedoch wird die Kausalität zwischen dem Alter und dem Immunsystem noch nicht verstanden und Bedarf weiteren Forschungen.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Teilbereich des Forschungsprojekts „PRIAMGE“ (Protective Immunity in Ageing) untersucht. Ziel war es, die Veränderungen der humoralen und adaptiven Immunantwort im Zeitverlauf und damit das Impfversagen bei der älteren Bevölkerung, zu erforschen und zu analysieren. Es wurden zwei gesunde Probandengruppen zwischen 53 und 65 sowie 18 und 30 Jahren gegen die saisonale Influenza mit einem trivalenten inaktivierten Influenza-Impfstoff (TIV), Mutagrip 2011/2012. Diese beiden Probandengruppen wurden miteinander verglichen, um die vermutliche Immunkompetenz der älteren Probanden aufzudecken und zu verstehen. Neben der Altersabhängigkeit wurde als ein neuer Aspekt, die Influenza-Stamm-(NSSN-)Spezifität beleuchtet. Die von uns bezeichnete NSSN-Spezifität (*number of strain sero-negative*) entspricht der Anzahl an seronegativen Influenzastämmen zum Zeitpunkt vor der Impfung. Der für diese Studie verwendete Influenzaimpfstoff enthielt drei Virenstämme A/California/H1N1, B/Brisbane und A/Perth/H3N2. Während für die Stämme B/Brisbane und A/Perth/H3N2 Kreuzreaktivitäten sowie ein bestehendes immunologisches Gedächtnis zu erwarten war, vermuteten wir bei dem wieder neu aufgetretenen Stamm A/California/H1N1 eine geringe bzw. keine Kreuzreaktivität sowie eine naive Immunantwort.

An zehn verschiedenen Zeitpunkten wurden Blutentnahmen und die Analyse verschiedener Zellpopulationen durchgeführt. In der serologischen Analyse konnten wir bei älteren Probanden eine signifikant verminderte Ausbildung des HI-Titers zum Stamm A/California/H1N1 zeigen. Für weitere quantitative und qualitative Analysen der verschiedenen Zellpopulationen wurde die Durchflusszytometrie durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode konnten neben der Serologie eindeutige Veränderungen der humoralen Antwort wie die verringerte Plasmablastenbildung, der

Zusammenfassung

CD19⁺ B-Zellen bei den älteren Probanden, bestätigt werden. Weitere altersspezifische Unterschiede der CD4⁺ T-Zellen konnten durch die Analyse des Proliferationsmarkers Ki-67 und in der Phänotypisierung der naiven und zentralen Gedächtniszellen im Zeitverlauf nachgewiesen werden. Dagegen konnten Stamm-(NSSL-) spezifische Unterschiede bei den influenzaspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen nach *in-vitro* Stimulation beobachtet werden.

Die Erkenntnisse dieser Studie sollen zum besserem Verständnis der Immunantwort nach einer Influenzaimpfung dienen mit dem Ziel, die Impfstrategie insbesondere für die ältere Bevölkerung zu optimieren.

III. Abkürzungen

α	anti
Abb.	Abbildungen
APC	Antigen präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
ASC	Antibody-secreting cells, Antikörper sezernierende Zelle
BCL-6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
BCR	<i>B cell receptor</i> , B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
DAMP	<i>Damage-associated Molecular Pattern</i>
DAPI	4',6'-Diamino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid
DC	Dendritische Zelle
EOMES	<i>Eomesodermin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> , Durchflusszytometrie
FASL	<i>Fas Ligand</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Zentrifugalkraft: $g = 9.81 \text{ m/s}^2$
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
GATA-3	GATA-binding protein 3
HA	Hämagglutinin
HHT	Hämagglutinationshemmtest
HI-Titer	Hämagglutinin Inhibition Assay Titer

Abkürzungen

IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
NK	Natürliche Killerzelle
NSSN	<i>number of strain sero-negative</i> , Anzahl seronegativer Stämme
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i> , Pathogen-assoziiertes molekulare Muster
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , periphere mononukleare Blutzellen
PBS	Phosphate-buffered-Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
Prot	<i>Protected</i> , geschützt
RNA	Ribonukleinsäure
ROR- γ t	retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t
RT	Raumtemperatur
RTE	<i>recent thymic emigrants</i>
SEB	<i>staphylococcal enterotoxin B</i>
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
STIKO	Ständige Impfkommission
Tab.	Tabelle
T-bet	<i>T box transcription factor</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
T _{CM}	<i>central memory T cell</i> , Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
T _{NC}	<i>naive T cell</i> , Naive T-Zelle

TIV	<i>trivalent inactivated Vaccine</i> , trivalenter inaktivierter Impfstoff
TLR	<i>Toll-like-Receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSST-1	<i>Toxic Shock Syndrome Toxine-1</i>
u.a.	unter anderem
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Einführung

Impfungen gehören nach Einschätzungen des Robert-Koch-Instituts (RKI) zu den „wichtigsten und wirksamsten präventiven Maßnahmen, die in der Medizin zur Verfügung stehen“ (<http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/impfen.html>). Ziel dieser kosteneffektiven Präventionsmaßnahme ist es Infektionskrankheiten vorzubeugen, um damit einhergehende Komplikationen zu minimieren. Seit Jahrzehnten werden Impfungen erfolgreich zur Prophylaxe verschiedener Infektionskrankheiten sowie auch zu deren globalen Bekämpfung eingesetzt. Einer der größten Erfolge der Medizingeschichte ist zum Beispiel die Ausrottung der Pocken im Jahre 1798 durch Edward Jenner (Jenner, 1798). Viele weitere erfolgreiche Impfungen wie z.B. gegen Tetanus, Masern und Polio folgten, die zur Minimierung des Erkrankungsrisikos beitrugen. Impfungen gegen Inflenzaviren dagegen stellen bis heute eine Herausforderung dar, da bisher noch kein dauerhaft wirksamer Impfstoff entwickelt wurde. Influenza ist bekannt als eine weltweit verbreitete respiratorische Infektionskrankheit. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind etwa fünf bis 15 Prozent der Bevölkerung von alljährlichen Influenzaepidemien betroffen. Weltweit kommt es zu etwa drei bis fünf Millionen schweren Krankheitsfällen mit schwerwiegenden Komplikationen, die bei 250 000 bis 500 000 Menschen zum Tode führen (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>). Die meisten Todesfälle wurden bei den älteren Menschen über 65 Jahren festgestellt. Die WHO empfiehlt daher Impfungen gegen die saisonale Influenza durchzuführen. Die jährliche Influenzaimpfung im Herbst wird mit einem stets aktualisierten saisonalen Impfstoff angeboten. Sofern die Stämme der Influenzaimpfung identisch mit den zirkulierenden Stämmen sind, können Influenzainfektionen zu 90% verhindert werden (Fiore et al., 2007). Allerdings nimmt die Impferfolgsrate bei älteren Menschen ab dem 60. Lebensjahr je nach Studie um 17% bis 53% ab (Goodwin et al., 2006). Das größere Impfversagen bei älteren Menschen ist vor allem auf eine eingeschränkte Immunkompetenz zurückzuführen (Bernstein et al., 1998; Goodwin et al., 2006). Mit steigendem Lebensalter werden die immunologischen Abwehrfunktionen zunehmend reduziert, ein Phänomen, das auch als Immunoseneszenz bezeichnet wird (Reber et al., 2011). Die Ursachen der Immunoseneszenz sind bisher unbekannt und vermutlich multifaktoriell zu erklären. Ob die immunologischen Veränderungen aber auf der zellulären Ebene oder durch äußere Faktoren bedingt sind, ist noch unklar. Die Folge der abnehmender immunologische

Funktionsfähigkeit ist eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Infektionskrankheiten. Besonders ältere Menschen sind von vermehrten Hospitalisierungen, Komplikationen und Todesfällen betroffen. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung und der niedrigen Geburtenziffer wird der Anteil der über 60 Jährigen in der deutschen Bevölkerung nach Schätzungen des Statistischen Bundesamts von 23,6% im Jahr 2010 auf 36,2% im Jahr 2030 steigen. (Statistisches Bundesamt: Lange Reihen: 12. Koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung, 2012). Daher stellt die Influenza-Impfung ein gutes Modell für die Analyse altersabhängiger Unterschiede in der Immunantwort dar. Es ist von großer Bedeutung die Immunoseneszenz besser zu verstehen, um dementsprechend die Influenza-Impfung für diese Altersgruppe zu verbessern. Die folgenden Kapitel geben eine Übersicht über die Influenzainfektion, das Influenzavirus und die Besonderheiten des Influenza-Subtyps H1N1. Im Anschluss werden die Grundzüge des Immunsystems und deren Auswirkungen auf die Immunoseneszenz beschrieben. Abschließend wird die Zielsetzung dieser Arbeit formuliert.

1.2 Die Influenzainfektion

Der Name „Influenza“ ist italienischen Ursprungs und bedeutet „Einfluss“. Er lässt sich auf die bis ins Mittelalter herrschende Annahme zurückführen, dass bestimmte Planetenstellungen das Auftreten von Krankheiten beeinflussen. Influenza bezeichnete daher bis ins 14. Jahrhundert eine Reihe verschiedener Krankheiten. Erst ab dem 15. Jahrhundert wurde der Begriff „Influenza“ nur noch für die Grippe verwendet. Da die Influenza in der Regel in den kalten Jahreszeiten auftritt, sprach man ab dem 18. Jahrhundert zusätzlich vom Einfluss der Kälte (Schindler & Untermann, 1999). Dabei muss beachtet werden, dass Influenzainfektionen nur in gemäßigten Zonen hauptsächlich in den Wintermonaten auftreten, in tropischen Ländern sind Influenzainfektionen ganzjährig verbreitet. Nach der heutigen Definition wird die Influenza auch als die „echte Grippe“ bezeichnet, die sich als eine akut auftretende, fieberhafte Infektionskrankheit darstellt. Die Übertragung erfolgt überwiegend durch Tröpfchen, insbesondere beim Husten und Niesen. Dabei gelangt das Virus über die Schleimhaut der Atemwege, des Mundes und der Augen in den Körper. Ausgehend von den oberen Atemwegen (Nase, Mund, Pharynx) verbreiten sich die Viren in die unteren Atemwege (Larynx, Trachea, Bronchien). Bei Kälte und Trockenheit können die Erreger sogar einige Stunden außerhalb des Körpers überleben. Die Inkubationszeit, die Zeit zwischen Infektion mit dem Krankheitserreger und dem Auftreten der ersten Symptome, beträgt

ein bis zwei Tage. Die Dauer der Ansteckungsfähigkeit, gemessen an der Ausscheidung vermehrungsfähiger Viren, beträgt im Durchschnitt vier bis fünf Tage (http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza.html). Die typische Symptomatik einer Influenzainfektion ist gekennzeichnet durch einen plötzlichen Erkrankungsbeginn mit Fieber ($\geq 38,5$ °C), trockenem Reizhusten sowie Muskel- und/oder Kopfschmerzen. Als weitere Symptome können allgemeine Schwäche, Schweißausbrüche und Halsschmerzen auftreten (Monto et al., 2000). In der Regel liegt die Krankheitsdauer bei fünf bis sieben Tagen. Mit dem Auftreten von Komplikationen kann sich der Krankheitsverlauf jedoch deutlich verlängern. Betroffen sind vor allem ältere Personen und Personen mit Grunderkrankungen. Zu diesen zählen z.B. chronische Herzerkrankungen, chronische Lungenerkrankungen, Diabetes mellitus, Immundefekte und neurologische bzw. neuromuskuläre Erkrankungen. Für die Komplikationen sind oftmals nicht nur die Influenzaviren selbst ursächlich, sondern die bakteriellen Superinfektionen bzw. Sekundärinfektionen mit Pneumokokken, *Haemophilus influenzae* oder Staphylokokken. Dabei stehen pulmonale Komplikationen im Vordergrund (<http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/impfen.html>).

1.2.1 Das Influenzavirus

Das Influenzavirus ist ein 80 – 120 nm großes, kugeliges bis polymorphes Virus und gehört zur Familie der Orthomyxoviridae. Das Genom dieser Virusfamilie besteht aus einzelsträngigen, segmentierten RNA mit negativer Polarität (Baltimore, 1971). Es werden drei verschiedene Typen von Influenzaviren unterschieden: Typ A, B, und C. Für die länder- und kontinentübergreifende Ausbreitung (Pandemie) der Infektion ist der Influenzavirus Typ A verantwortlich. Im Vergleich zu den anderen Influenzotypen besitzt Typ A eine hohe Mutationsrate und befällt nicht nur Menschen, sondern auch zahlreiche Vögel und verschiedene Säugetierarten wie Schweine und Pferde. Dagegen befällt der Influenzavirus Typ B nur Menschen und Typ C Menschen und Schweine. Allerdings verlaufen die Infektionen vom Typ C sehr milde und spielen deshalb keine relevante Rolle. Influenzavirus Typ A und B tragen auf der Oberfläche charakteristische und spikeartige Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), die aufgrund ihrer Spezifität serologisch von besonderem Interesse sind. Bei Influenza Typ A sind 16 HA und neun verschiedene NA bekannt. Influenza Typ B besitzt dagegen keine Subtypen. Das HA wird in Kopf und Stamm unterteilt und dient als Teil der

Einleitung

Immunantwort, da die Antikörper sich vor allem gegen HA richten. Es besitzt die Fähigkeit sich an Rezeptoren des Bronchialsystems zu binden, um anschließend in die Wirtszelle einzudringen und diese zu infizieren (Bouvier et al., 2008). Eine Schlüsselfunktion der Immunabwehr ist es, das Virus zu neutralisieren. Dies geschieht mit Hilfe der gegen HA gerichteten neutralisierenden Antikörper (Reperant et al., 2014). Im Gegensatz zu HA dient das zweite Glykoprotein NA zur Freisetzung neugebildeter Viren aus der infizierten Wirtszelle (Suzuki, 2005). Die zur Therapie eingesetzten antiviralen Medikamente, sogenannte Neuraminidasehemmer, greifen an dieser Stelle an. Des Weiteren besitzt das Influenzavirus Typ A ein Matrixprotein 2 (M2). Dieses Protein ist ein Protonenkanal zur Ansäuerung des Inneren des Viruspartikels, um das Eindringen des HA zu erleichtern (Lindstrom et al., 1999). Charakteristisch für das Influenzavirus ist die hohe genetische Variabilität, die die strukturelle Vielfalt des Virus verursachen. Grund sind hierfür die hohen Mutationsraten innerhalb der Viren-RNA, sowie die frei kombinierbaren acht Gensegmente, die zu einem Genaustausch (Reassortment) führen können. Zudem zeichnen sich auch HA und NA durch eine erhöhte Antigenvariabilität aus. Dabei werden Antigen shift und – drift unterschieden. Bei dem Antigen shift entsteht ein neuer Subtyp durch plötzlich auftretende Veränderung der Spezifität des Antigens. Dies geschieht durch die Vermischung zweier Genomsegmente eines Influenzavirus mit Segmenten eines anderen Influenzavirus. Dies wird auch als eine genetische Reassortierung bezeichnet. Die Antigen drift bezeichnet eine Anhäufung von Punktmutationen, die schrittweise zu einer Veränderung der Oberflächenantigene bzw. Epitope des HA Kopfes führen. Das Ergebnis ist eine neue Variante desselben Virus-Subtyps. Die Epitope des HA Stammes, NA und M2 sind dagegen unverändert und werden als „konservierte Epitope“ bezeichnet (Reperant et al., 2014). Die Klassifizierung der einzelnen Virusstämme erfolgt folgendermaßen: Influenzotyp / Ort der erstmaligen Isolierung (Virusanzucht) / Nummer des Isolats / Isolierungsjahr (Beispiel: Influenza B/Brisbane/60/2008). Bei Influenza A werden zusätzlich die Subtypen der Oberflächenproteine angegeben (Beispiel: Influenza A/California/7/2009 (H1N1)).

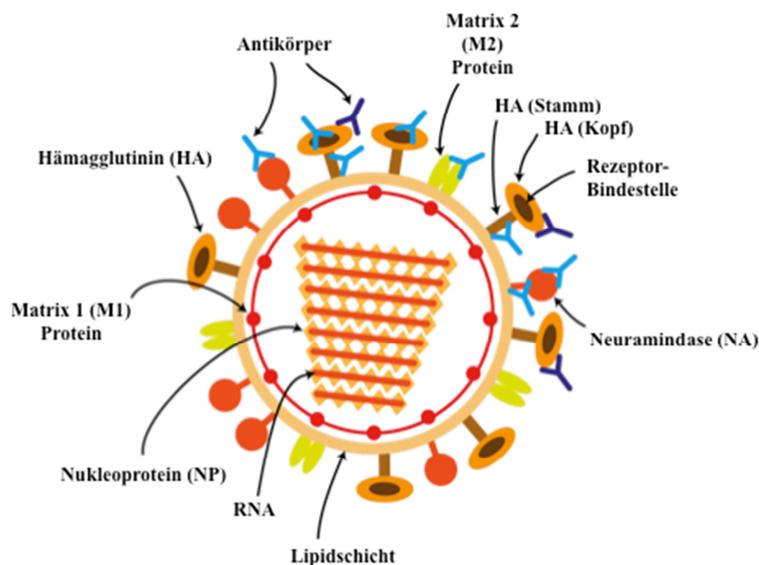


Abb. 1: Schematische Darstellung des Influenzavirus Typ A. An der Oberfläche ragen die Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuramindase (NA), sowie das Matrixprotein 2 (M2) hervor. Der (HA) Stamm, NA und M2 besitzen unveränderte bzw. konservierte Epitope und induzieren neutralisierende Antikörper (hell, blau). Die Epitope an HA (Kopf) sind dagegen variabel und abhängig von der Antigendrift (Angriffsziel der dunkelblauen Antikörper). (Abgeändert von Reperant et al., 2014).

1.2.2 Die Besonderheiten des Influenza A/H1N1-Virus

Der Subtyp H1N1 ist bekannt für seine globale Verbreitung von Influenzainfektionen. Im Jahr 1918 verursachte dieser neu aufgetretene Subtyp die „Spanische Grippe“ mit mehreren Millionen Todesopfern, wobei insbesondere Menschen zwischen 20 und 50 Jahren betroffen waren (Taubenberger, Morens, 2006). Unter dem Namen „Russische Grippe“ kam es 1977 zu einem erneuten weltweiten Ausbruch (Heartland Kidney Network, 2006). Allerdings besaßen Menschen, die vor 1957 geboren waren einen gewissen Immunschutz für den Subtyp H1N1 (Hancock et al., 2009). Begründet wurde dies durch die bereits existierenden Antikörper, resultierend aus einer durchlaufenen Infektion mit der „Spanischen Grippe“. Außerdem erklärten Experten, dass der Subtyp A/H1N1 durch einen anderen Subtyp, nämlich A/H2N2, dem Erreger der Asiatischen Grippe im Jahre 1957, abgelöst wurde. Webster et al. (1992) vertreten die These, dass das Virus aufgrund der geringen Mutationen womöglich jahrzehntelang eingefroren war und Mitte der 1970er-Jahre aus einem russischen oder chinesischen Labor entwichen ist. Im April 2009 wurde der Subtyp H1N1 dann wieder in Mexiko entdeckt, der sich zunächst bis nach Nordamerika und schließlich weltweit ausbreitete. Die Besonderheit dieser sogenannten „Schweinegrippe“ war der große antigenetische Unterschied zu den bisherigen H1N1-Subtypen. Vermutlich entstand dieser Subtyp über einen längeren Zeitraum durch mehrere Reassortments und aus Gensegmenten aus aviären, Schweine- und humanpathogenen Influenzaviren

(Antigenshift). Die Folge dieser Pandemie 2009 waren 2,9 Millionen Menschen mit H1N1-Infektion in Deutschland, die einen Arzt konsultierten und 5000 Menschen, die in ein Krankenhaus eingewiesen wurden. Mehrere hunderte Todesfälle wurden mit labordiagnostisch gesicherten Erkrankungen an H1N1 an das Robert-Koch-Institut (RKI) gemeldet (http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza.html).

1.2.3 Der Influenzaimpfstoff

Zur Prophylaxe der Influenzainfektionen sollten idealerweise Immunisierungen durchgeführt werden, um zum einen die Infektion zu vermeiden und zum anderen die mit ihr einhergehenden Komplikationen zu minimieren. Die Influenzaimpfung gilt als gut wirksam und gut verträglich. Nach Empfehlungen der WHO wird die jährliche Influenzaimpfung im Herbst mit der aktuellen Antigenkombination der zirkulierenden Influenzaviren angeboten. Hierzu wird der trivalente Impfstoff (TIV) oder seit 2013 sogar ein quadrivalenter Impfstoff verwendet. Zielgruppe der Influenzaimpfung nach Empfehlung sind der STIKO Personen ab dem 60. Lebensjahr und bestimmte Risikogruppen. Zu den bestimmten Risikogruppen zählen alle Schwangere ab dem 2. Trimenon, Kinder, Jugendliche und Erwachsene mit erhöhter gesundheitlicher Gefährdung infolge eines chronischen Grundleidens wie z.B. Diabetes mellitus, chronische Krankheiten der Atmungsorgane oder des Herz-Kreislauf-Systems. Weitere Indikationsgruppen mit erhöhter Gefährdung sind z.B. medizinisches Personal, Personen mit umfangreichen Publikumsverkehr und Personen mit direktem Kontakt zu Geflügel und Wildvögeln (http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza.html). Es wird empfohlen, Personen ab dem 65. Lebensjahr einen Impfstoff mit einem pharmazeutischen Hilfsstoff, einem sogenannten Adjuvans, zu verabreichen, um die Wirkung der Immunantwort zu verstärken. In einer Studie zeigten Probanden über 65 Jahre eine verbesserte T-Zellantwort nach Impfung von TIV kombiniert mit dem Adjuvans AS03 (Couch et al., 2014). In einer anderen Arbeit konnte nach Gabe des adjuvanten Influenza-Impfstoffes MF59 (ATIV) eine reduzierte Hospitalisierungsrate bei Probanden über 75 Jahren gezeigt werden (Spadea et al., 2014).

1.3 Das Immunsystem

Jeder Organismus ist einer Vielzahl von Krankheitserregern (Pathogene) sowie Umwelteinflüssen ausgesetzt, die zu einer Bedrohung werden können. Zum Schutz gegen solche Krankheitserreger, sowie zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz, existiert ein effektives und komplexes Abwehrsystem: das Immunsystem.

Das Immunsystem des Menschen kann in zwei verschiedene Mechanismen unterteilt werden, das **angeborene, unspezifische** und das **adaptive, spezifische Immunsystem**. Beide Systeme wirken jedoch nicht getrennt voneinander, sondern interagieren und kooperieren miteinander, um einen bestmöglichen Schutz gegen Erreger und Fremdstoffe zu erreichen.

1.3.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem wirkt schnell und effizient und ist die erste Schutzreaktion im Organismus, um Pathogene zuverlässig zu eliminieren. Innerhalb von Minuten werden die eingedrungene Pathogene erkannt und meistens in wenigen Stunden vollständig beseitigt. Zu den Bestandteilen des angeborenen Immunsystems zählen mechanische Barrieren (z.B. Flimmerepithel in der Trachea), zelluläre und humorale Bestandteile. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems zählen Neutrophile Zellen, Natürliche Killerzellen (NK), Monozyten/Makrophagen und Dendritische Zellen (DC). DCs sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) und spielen eine zentrale Rolle bei der Verknüpfung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem. Nach der Phagozytose und Präsentation der Pathogene auf der Zelloberfläche migrieren DCs in den nächsten Lymphknoten und treten mit T-Zellen in Kontakt, um so eine spezifische Immunantwort gegenüber dem von ihnen präsentierten Antigen zu induzieren (Banchereau et al., 1998, 2000). Die Makrophagen, auch als Riesenfresszellen bekannt, entwickeln sich aus Monozyten und erkennen und phagozytieren eingedrungene Pathogene. Sie schütten pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine aus und locken so neutrophile Granulozyten und NKs zum Ort der Entzündung an.

1.3.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem dient der Eliminierung von Pathogenen, die durch die Mechanismen des angeborenen Immunsystems nicht abgewehrt werden können, sowie der Etablierung eines

immunologischen Gedächtnisses. Es zeichnet sich durch die besondere Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen Krankheitserregern aus. Die Erkennung von spezifischen Antigenen führt gezielten zellulären Abwehrmechanismen und der Bildung von Antikörpern. Die Einteilung des spezifischen Immunsystems lässt sich in eine humorale und eine zelluläre Immunantwort unterteilen. Die **humorale Immunantwort** (lat. *humor* = Flüssigkeit) basiert auf nicht-zellulären Teilen des Immunsystems und dient der Neutralisierung bzw. Bekämpfung von Toxinen und extrazellulären Pathogenen. Die **zelluläre Immunantwort** dient vor allem der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen, die vom humoralen Immunsystem nicht eliminiert werden konnten. Zur Bekämpfung dieser Pathogene sind Lymphozyten notwendig. Dabei werden B- und T-Lymphozyten unterschieden. Diese werden zunächst als Vorläuferzellen aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet, um anschließend auszureifen.

1.3.3 B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten (B-Zellen) und Plasmazellen bilden als einzige Zellen Antikörper und sind so für die humorale Immunantwort verantwortlich. Die Ausreifung der B-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen findet im Knochenmark statt. Die gebildeten Prä-B-Zellen weisen dabei noch keine Immunglobuline auf ihrer Zelloberfläche auf. Im weiteren Verlauf der Entwicklung werden membrangebundene Immunglobuline, die sogenannten B-Zell-Rezeptoren (*B cell receptor*, BCR) durch eine Kodierung bestimmter Genabschnitte gebildet. Nur mit diesem Rezeptor ist die reife B-Zelle erst fähig, fremde Antigene zu erkennen und spezifische Antikörper gegen sie zu bilden. Zuerst muss aber eine Aktivierung der naiven B-Zellen, die zuvor noch keinen Antigenkontakt hatten, erfolgen. Diese zirkulieren im peripheren Blut und in lymphatischen Organen, wie Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark. Erst nach Bindung eines fremden Antigens mit Hilfe des BCR, wandern die B-Zellen zur Reifung in ein Keimzentrum in Lymphknoten oder Milz. Mit Hilfe der CD4⁺ T-Helfer-Zellen erfolgt dann die B-Zellen Aktivierung. Dabei wird das gebundene Antigen von BCR intrazellulär aufgenommen, zu Peptidfragmenten verarbeitet und anschließend mit Hilfe des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) an der Oberfläche präsentiert. An das MHC-Molekül kann anschließend eine T-Helfer-Zelle mit einem entsprechenden TCR (*T cell receptor*, TCR) binden. Eine weitere Interaktion erfolgt über das von

aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimierte Oberflächenmolekül CD40L (CD154), welches zu der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie gehört und sich an den auf B-Zellen vorhandenem Molekül CD40 bindet (Parker, 1993). Es folgt eine Vermehrung der B-Zellen (klonale Expansion), sowie die Differenzierung zu Plasmablasten und schließlich zu Plasmazellen. Während die Plasmablasten noch teilungsfähig sind und bereits Antikörper sezernieren, sind die Plasmazellen terminal differenziert und nicht mehr teilungsfähig. Einen anderen Teil der aktivierten B-Zellen bilden die differenzierten B-Gedächtniszellen. Diese Gedächtniszellen ermöglichen beim zweiten Kontakt mit dem Antigen eine schnellere Immunantwort. Die Reifung spezifischer und hochaffiner Antikörper verschiedener Immunglobulin-Klassen der Plasmazellen, wie auch der B-Gedächtniszellen findet im Keimzentrum statt. Dort durchlaufen die B-Zellen eine Affinitätsreifung sowie einen Isotypenwechsel (Klassenwechsel) (LeBien, Tedder, 2008). Es existieren verschiedene Isotypen von Immunglobulinen, die in verschiedenen Kompartimenten des Körpers zu finden sind und unterschiedliche Aufgaben haben. Im Zuge des Isotypenwechsels beispielsweise von IgM zu IgG mit Hilfe von IL-4 werden bereits funktionsfähige Antikörper während einer Infektionsbekämpfung verändert. Mit zunehmender Dauer der Immunantwort steigt der IgG-Spiegel und die Affinität der IgG-Antikörper zum Antigen, während IgM durch den Isotypenwechsel sinkt.

1.3.4 T- Lymphozyten

Die T-Lymphozyten (T-Zellen) reifen im Thymus aus. Dabei entwickeln sich zwei Typen von T-Zellen. Diese unterscheiden sich im T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR), einem Proteinkomplex, der auf der Oberfläche von T-Zellen verankert und für die Erkennung von Antigenen zuständig ist. T-Zellen mit $\gamma\delta$ -TCR besitzen eine geringere Variabilität, sind dem angeborenen Immunsystem zugeordnet und halten sich hauptsächlich in Haut und in Schleimhäuten auf. Einen weit größeren Anteil bilden T-Zellen mit $\alpha\beta$ -TCR, welche eine höhere Variabilität aufweisen (Willi et al., 2013). Der TCR ist mit dem Molekül CD3 assoziiert, welches für die Weiterleitung des TCR-Signals ins Zellinnere verantwortlich ist (Kuhns et al., 2006). Die T-Zellen können mit Hilfe des TCR nur Antigenfragmente erkennen, die von anderen Zellen in Verbindung mit den MHC-Molekülen präsentiert werden. Während der Reifung im Thymus überleben jene T-Zellen, die die körpereigenen MHC-Moleküle erkennen (positive Selektion), denn nur das Erkennen von körpereigenen MHC-Molekülen und körperfremden Antigenen soll

später eine spezifische Immunantwort auslösen. Bei der negativen Selektion werden Zellen durch einen programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert, die eine zu starke Bindung zu körpereigenen MHC-gebundenen Peptiden haben. Die Selbsttoleranz schützt so die T-Zellen vor Bekämpfung des körpereigenen Gewebes. Außerdem ermöglicht die MHC-Restriktion eine spezifische Aktivierung der T-Zelle und die damit einhergehende spezifische Funktion dieser T-Zelle. Dabei erfolgt die Einteilung der T-Zellen durch die immunphänotypische Oberflächenmerkmale (*Cluster of Differentiation*, CD), die so genannten Korezeptoren. Dabei werden positive CD4 (CD4⁺) und CD8 (CD8⁺) T-Zellen unterschieden, die den größten Teil der $\alpha\beta$ -TCR bilden. Die CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche infizierter Zellen präsentiert werden. Als zytotoxische Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) schütten sie eine Vielzahl von Substanzen wie Granzyme und Perforin aus, die zur Apoptose der infizierten Zellen führen. Die CD4⁺ T-Zellen erkennen dagegen nur Antigenpeptide auf MHC-Klasse-II Molekülen. Im Gegensatz zu MHC-I Molekülen, die von nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, werden MHC-II Komplexe meist nur von professionellen APCs, wie B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen gebildet (Neeffjes et al., 2011).

1.3.5 Aktivierung und Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen

Nach der Reifung im Thymus wandern die T-Zellen als naive T-Zellen (T_{NC} oder T_{H0}) ins lymphatische Gewebe, in dem sie über postkapilläre Venolen in die Kortex der Lymphknoten gelangen. Dabei überprüfen die T-Zellen, welche Antigene auf den APC präsentiert werden. Die Aktivierung durch bestimmte Antigene bewirkt die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen zu antigenspezifischen Effektorzellen. Dies erfolgt über mehrere Signale gleichzeitig. Zuerst findet die Interaktion zwischen TCR der T-Zelle und MHC-II der APC statt. Die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen erfolgt durch die Bindung von CD40L (CD154) der T-Zelle an CD40 der APC. Die Interaktion von CD80/CD86 der APC mit CD28 der T-Zelle ist entscheidend für die initiale T-Zell-Kostimulation und die Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivität. Die von APC produzierten Zytokine als weitere Oberflächenmarker, bewirken die weitere Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen (O'Hagan, Valiante, 2003; Yamane, Paul, 2012) (Abb. 2). Durch bestimmte Zytokine und Transkriptionsfaktoren (TF) werden die Effektor T-Zellen phänotypisch determiniert und in verschiedene Gruppen von T-Helferzellen Typ 1

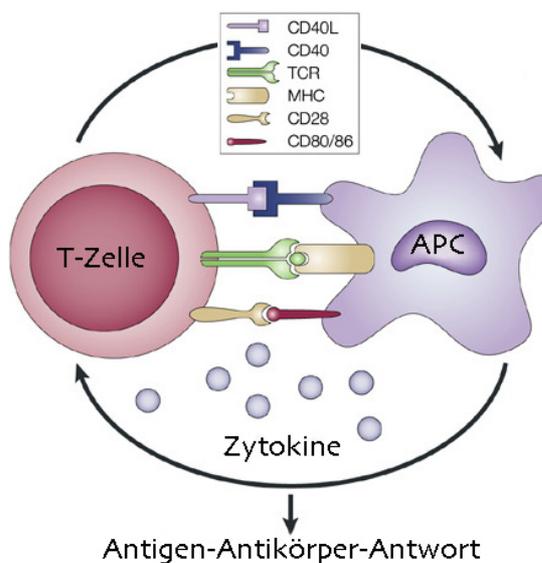
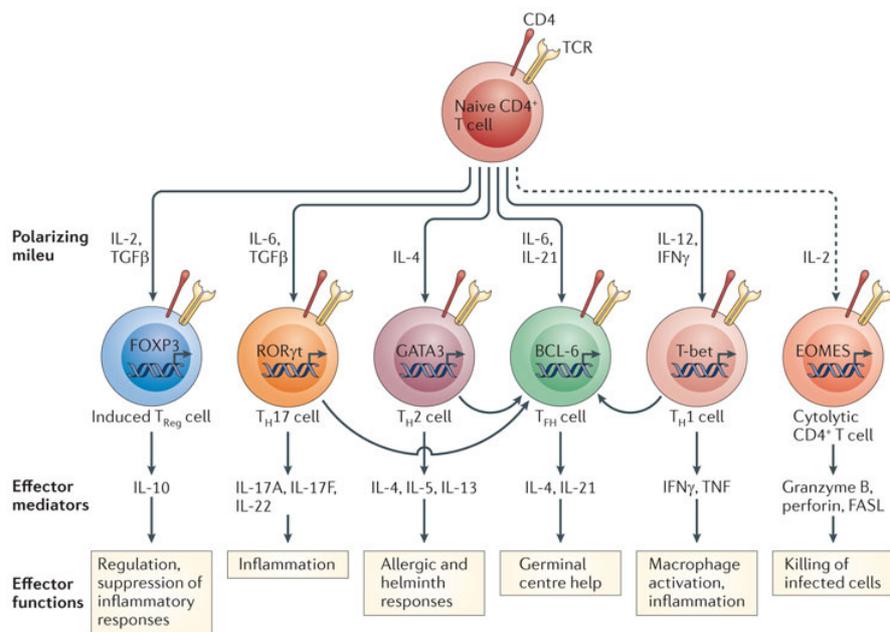


Abb. 2: Interaktion zwischen einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) und einer antigenspezifischen T-Zelle. Die Wechselwirkung wird durch die Erkennung von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der T-Zellen mit Hilfe des T-Zell-Rezeptor (TCR) induziert. Verstärkt wird die Wirkung durch CD28 der T-Zelle durch die Erkennung der kostimulierenden Signale CD80/CD86 der APC. Weitere kostimulierende Moleküle sind Zytokine, welche die Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen bewirken. Die vollständige Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen wird anschließend durch die Bindung von CD40L der T-Zelle an CD40 der APC herbeigeführt. (Abgeändert von O'Hagan, Valiante, 2003).

(T_h1), Typ 2 (T_h2), Typ 17 (T_h17), folliculäre Helfer- (T_{fh}) und induzierte regulatorische T-Zellen (iT_{reg}) unterteilt (Swain et al., 2012) (Abb. 3). So differenzieren sich naive T-Zellen zu T_h1 T-Zellen durch Einwirkung von IL-12 und IFN- γ , welche von APC bei Erkennung eines Pathogens mit Hilfe ihrer Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) sezerniert werden. Die T_h1 T-Zellen, charakterisiert durch die Expression des TF T-bet führen zur zellvermittelten Immunität durch die Sekretion der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α (Broere et al., 2011; O'Garra et al., 2011). Diese Zytokine regulieren entzündliche Prozesse, sowie die Abwehr von Pathogenen durch die Aktivierung natürlicher Killerzellen und Makrophagen. Im Vergleich zu den T_h1 T-Zellen entstehen die T_h2 T-Zellen durch die Induktion von IL-4. T_h2 T-Zellen exprimieren den TF GATA-3 und sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13 (Zhu et al., 2006; O'Garra et al., 2011). Diese Zellen sind insbesondere an der humoralen Immunität beteiligt, da die Sekretion von IL-4 eine Aktivierung der B-Zellen und damit die Bildung neutralisierender Antikörper bewirkt, welche dem Isotypenswitch von IgM und IgG ermöglichen. Die T_h2-Antwort betrifft vor allem allergische Erkrankungen und parasitäre, sowie bakterielle Infektionen. Inzwischen wurden weitere Differenzierungsgruppen der T-Helferzellen entdeckt. Beispielsweise sind T_h17 T-Zellen, induziert durch IL-6, TGF- β , sowie dem TF ROR- γ t, an Entzündungsvorgängen und Autoimmunerkrankungen durch die Sekretion von IL-17 und IL-22 beteiligt (O'Garra et al., 2011). IL-17 unterdrückt effizient die T_h1-Antwort und führt damit zur Chronifizierung der Immunprozesse. Allerdings ist die Funktion der T_h17 T-Zellen noch nicht abschließend geklärt.

Weitere funktionelle T-Helfer-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), die anhand des TF FoxP3 identifiziert werden können (Fontenot et al., 2003). Dabei werden zwei Subtypen der T_{reg} Zellen unterschieden: natürliche und indizierte T_{reg} . Die natürlichen T_{reg} entstehen in erster Linie während der T-Zell Differenzierung im Thymus und werden mit dem Oberflächenmarker CD25 charakterisiert. Die zweite Gruppe der iT_{reg} , diese entsteht nach der Induktion aktivierter $CD4^+$ T-Zellen in der Peripherie, wobei ihre CD25 Expression variabel ist. Eine weitere Zellgruppe sind die folliculären T-Helferzellen (T_{fh}), die bei der B-Zell Aktivierung im Keimzentrum der sekundären lymphatischen Organe eine Rolle spielen (O`Garra et al., 2011). Die in der Abbildung (Abb. 3) gezeigte zytotoxischen $CD4^+$ T-Zelle wurde in einigen Modellen viraler Infektionen beschrieben. Aufgrund der Sekretion von Granenzym B, Perforin und FASL sind diese T-Helfer-Zellen eher den $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen zugeordnet und unterscheiden sich von den T_{h1} $CD4^+$ T-Zellen (Soghoin et al., 2010).



Nature Reviews | Immunology

Abb. 3: Einteilung der $CD4^+$ T-Helferzellen Subpopulationen. Die naiven $CD4^+$ T-Zellen werden unter anderem durch die Beeinflussung der umgebenden Zytokine zu Effektorzellen der Typen T_{h1} , T_{h2} , T_{h17} , T_{fh} und T_{reg} differenziert. Die unterschiedliche Zytokinproduktion der einzelnen T-Helferzellen ruft verschiedene Funktionen im Rahmen der Immunantwort hervor. BCL-6=B cell lymphoma 6; EOMES=Eomesodermin; FASL=Fas ligand; FoxP3=Forkhead-Box-Protein P3, GATA3= GATA-binding protein 3; ROR- γ t=retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t; T-bet= T box transcription factor; TGF β = transforming growth factor- β (Swain et al., 2012).

Um den Schutz eines Individuums bei erneuter Infektion mit dem identischen Antigen zu verbessern, werden die aktivierten Effektorzellen zu Effektor-Gedächtnis- und zentralen Gedächtniszellen gebildet (Pepper et al., 2011). Die Effektorzellen haben meistens nur eine kurze Lebenszeit und unterliegen nach der primären Immunantwort der Apoptose. Die länger lebenden Gedächtniszellen speichern die gelernte spezifische Immunreaktion ab und vermitteln beim Kontakt mit dem gleichen Antigen eine spezifische schnellere sekundäre Immunantwort. Wie genau die Differenzierung der Gedächtniszellen abläuft, ist bis jetzt noch nicht genau geklärt. Mit Hilfe der Expression der Marker CD45RA und C-C Chemokin Rezeptor Typ 7 (CCR7) können die einzelnen Zellen klassifiziert werden. So exprimieren die T_{NC} sowohl $CD45RA^+$ als auch $CCR7^+$. Bei den Gedächtniszellen unterscheidet man zwei funktionelle Gruppen, die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory T cells*, T_{EM}) und die zentralen Gedächtnis-T-Zellen (*central memory T cells*, T_{CM}) (Sallusto et al., 1999). Nach dem Modell von Sallusto et al. halten sich die T_{EM} im Blut und mukosalen Gewebe auf und wandern in das entzündete Gewebe, wo sie ihre Effektorfunktionen entfalten. Die T_{CM} sind dagegen unter anderem in lymphatischen Organen lokalisiert. Mit Hilfe des CCR7 Rezeptors und CD62L sind die T_{CM} wie auch die im Blut zirkulierenden T_{NC} fähig, über hochendotheliale Venolen und Lymphbahnen in die lymphatischen Organe zu wandern (Sallusto et al., 1999, 2004). Daher ist die Phänotypisierung der T_{CM} mit Verlust der CD45RA, aber einer Expression von CCR7 charakterisiert. Dagegen exprimiert T_{EM} weder CD45RA noch CCR7. Vermutlich existiert noch ein weiterer dritter Gedächtniszell-Typ, die sogenannte terminal differenzierte Effektor-Gedächtniszelle (T_{EMRA}) mit $CCR7^+CD45RA^+$ (D'Asaro et al., 2006). Diese sehr weit ausdifferenzierten Zellen sind empfindlicher für Apoptosen und sezernieren zytotoxische Moleküle. Neben der beschriebenen Phänotypisierung der T-Zellen ist zusätzlich aber auch die Multi- bzw. Polyfunktionalität der einzelnen T-Zellen von großer Bedeutung, um auf die Qualität der T-Zellen zu schließen. Nach dem Modell von Seder et al. (Abb. 4) kann die $CD4^+$ T-Zell Differenzierung als ein linearer Prozess beschrieben werden, in dem Zellen schrittweise an Funktionalität zunehmen bei weiterer Differenzierung bis zum Zustand einer optimalen Effektorfunktion. Die $CD4^+$ T-Zellen sezernieren dabei unabhängig TNF oder IL-2 oder beides gleichzeitig und können sich nach einem längeren Zeitraum in produzierende IFN- γ Zellen umwandeln. Sobald die Ausschüttung aller drei Zytokine erfolgt, können diese Zellen entweder als Gedächtnis- oder Effektor-T-Zellen persistieren oder sie entwickeln sich zu weniger funktionsfähigen T-Zellen oder es folgt eine Apoptose nach der Aktivierung. Somit ist ein

optimaler Schutz vor Infektionen gegeben, in dem multifunktionale T-Zellen schnell Effektorfunktionen vermitteln und ein Reservoir an zentralen Gedächtniszellen bilden (Seder et al., 2008).

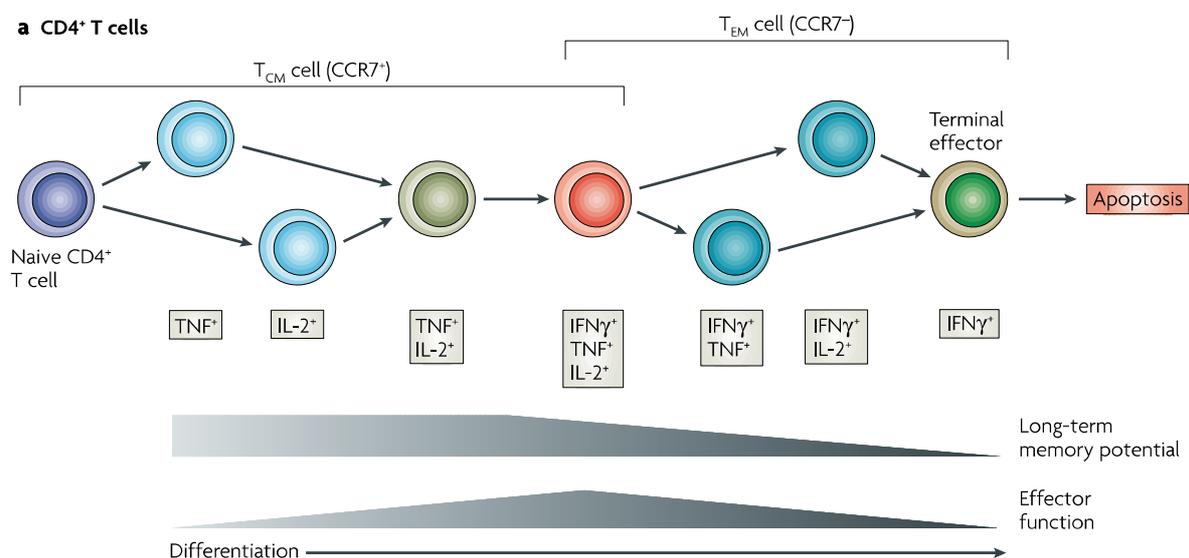


Abb. 4: Model für Differenzierung von Effektor- und Gedächtniszellen. CD4⁺ T-Zell-Differenzierungen werden als ein linearer Prozess beschrieben. Bei der Differenzierung nehmen die Zellen schrittweise an Funktionalität zu durch die Produktion verschiedener Zytokine wie TNF, IL-2 und IFN- γ . Eine optimal differenzierte Zelle bildet dabei alle drei Zytokine aus. Im weiteren Verlauf der Antigenstimulation nimmt die langzeitige Gedächtnisantwort, die Zytokin-Produktion und die Effektorfunktion ab. Im Anschluss folgt die Entwicklung zur terminal differenzierten Effektorzelle, die der Apoptose unterliegt (Seder et al., 2008).

1.4 Impfimmunologie und ihre Auswirkungen auf die Immunoseneszenz

Es gibt zwei verschiedene Formen der Immunisierung, die aktive und die passive. Bei der passiven Immunisierung werden spezifische Antikörper (Immunglobuline) aus menschlichem oder tierischem Serum verwendet. Bei der aktiven Immunisierung dagegen werden dem Patienten präparierte, abgeschwächte Krankheitserreger als Impfung injiziert, so dass dem Organismus eine Infektion vorgetäuscht wird und dieser mit einer Immunantwort gegen den Erreger und damit mit der Bildung von Antikörpern reagiert. Zur aktiven Impfung werden Lebend- und Totimpfstoffe verwendet. Der in dieser Arbeit benutzte Totimpfstoff besteht aus fragmentierten, inaktiven Teilen des Krankheitserregers und ist ein sogenannter aktiver

Impfstoff. Mit dieser Art der Impfung wird das Immunsystem vorbereitet, eine spezifische Immunantwort für das verabreichte Antigen zu entwickeln. Das gebildete **immunologische Gedächtnis** stellt somit die Grundlage der spezifischen Abwehr dar, um einen optimalen Schutz gegen Infektionen zu entwickeln, so dass beim zweiten Kontakt mit demselben Antigen das spezifische Immunsystem stärker und schneller reagiert. Sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort werden dabei durch die aktive Immunisierung stimuliert. Die naiven B-Zellen werden nach Kontakt mit dem Antigen und mit Hilfe von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen aktiviert. Die Optimierung zu Antikörpern mit hoch affinen Bindungseigenschaften erfolgt mit Hilfe des Isotypenswitch von IgM zu IgG und IgA und damit zur Reifung zu Gedächtniszellen (Van Zelm, 2014). Die Gedächtnisbildung der T-Zellen erfolgt in drei Phasen. In der Expansionsphase proliferieren und differenzieren sich die T-Zellen zu antigenspezifischen Effektor T-Zellen. In der folgenden Kontraktionsphase werden die meisten Effektor-T-Zellen durch Apoptose und Phagozytose eliminiert. Nur ein geringer Teil der Lymphozyten mit ihrer Antigenespezifität überleben und gehören am Ende zu dem Repertoire der Gedächtniszellen. Anschließend folgt die Erhaltungsphase, welche durch langsame homöostatische Proliferation charakterisiert ist. Ziel der Impfung ist also langlebige Plasmazellen und Gedächtnis-T-Zellen zu induzieren (Ehl, 2006). Zusätzlich ist die Fähigkeit eines Antikörpers mit unterschiedlichen Antigenen bzw. Epitopen eine Bindung einzugehen (Kreuzreaktivität) von Relevanz, da so Antigene anderen Ursprungs eliminiert werden. Für eine optimale Immunreaktion nach einer Impfung ist allerdings ein vollständig intaktes Immunsystem von Vorteil. Die zunehmend ältere Bevölkerung zeigt dagegen ein verändertes Immunsystem mit u.a. Ausbleiben einer adäquaten Immunantwort nach Impfungen und damit verbundene Häufung der Empfindlichkeit gegenüber Infektionen. Sowohl die altersbedingten Veränderungen des unspezifischen als auch des spezifischen, adaptiven Immunsystems können Ursachen oder Folgen der verminderten Immunkompetenz sein (Grubeck-Loebenstein et al., 2009). Es wird vermutet, dass das zunehmende Alter sich auf die Menge und die Qualität der Antikörperbildung auswirkt, wobei insbesondere die Spezifität, Isotypen und Affinität der Antikörper beeinflusst wird (Weksler, 2000). Ein verändertes B- oder T-Zell Repertoire mit reduzierter B-Zellaktivierung führen zur veränderten Antikörperantwort. Zum anderen beschreiben Reber et al. (2012) die Involution des Thymus in der Pubertät als einen wichtigen Punkt der Immunalterung. Durch die Ersetzung des Thymus durch Fettgewebe resultiert eine Abnahme der Neubildung von naiven T-Zellen. Dies wird deutlich durch die abnehmende Expression des Marker CD31 auf

naiven T-Zellen, den sogenannten RTE-Zellen (*recent thymic emigrants*) (Kohler et al., 2009). Dadurch besitzen ältere Menschen einen geringeren Anteil an naiven T-Zellen und im Gegensatz dazu einen höheren Anteil an T-Gedächtniszellen. Ebenso von großem Interesse ist die verminderte T-Zell Aktivierung und die mit ihr einhergehende verminderte Proliferation von CD4⁺ T-Zellen bei älteren Menschen. Ursächlich sind mehrere Faktoren wie das Fehlen von kostimulierenden Molekülen, die verminderte Bindungsfähigkeit zwischen TCR und MHC-Molekülen auf der Oberfläche der APC, die zu schwache intrazelluläre Zellaktivierung und die verminderte Bildung von Oberflächenmarkern (Reber et al., 2012). Der Alterungsprozess umfasst aus immunologischer Sicht also verschiedene Veränderungen. Von Bedeutung ist zudem die mit dem Alter auftretende hohe Bildung freier Radikale, aufgrund verminderter Reparaturenzyme, welche zu DNA-Schäden führen können (Harman, 2006). Zusätzlich werden die Enden der Chromosomen, bestehend aus repetitiver DNA und Proteinen mit jeder Zellteilung verkürzt, so dass die Telomerverkürzung im Alter zum Wachstumsstopp und programmiertem Zelltod führt (Mayer et al., 2006).

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurden Veränderungen der Quantität und Qualität der adaptiven Immunantwort nach Influenzaimpfung in zwei Probandenkohorten alt und jung untersucht. Dabei konnten Alterungsprozesse des Immunsystems anhand der Influenza-Impfung exemplarisch dargestellt werden. Im Rahmen der Studie wurde zusätzlich ein neuer Aspekt, die Influenzastamm-Spezifität aufgedeckt. Zum Zeitpunkt vor der Impfung wurden die Probanden entsprechend ihrer Anzahl an seronegativen Influenzastämmen, die NSSN-Spezifität (*number of strain seronegative*) in Gruppen unterteilt. Der für diese Studie verwendete Influenzaimpfstoff (Saison 2011/2012) enthielt drei Virenstämme A/California/H1N1, B/Brisbane und A/Perth/H3N2. Die Stämme B/Brisbane und A/Perth/H3N2 zirkulierten bis 2009 und waren weniger von der Antigendrift beeinflusst. Für diese beiden Stämme sind daher Kreuzreaktivitäten, sowie ein immunologisches Gedächtnis zu erwarten. Dagegen handelt es sich bei A/California/H1N1 um einen wieder neu aufgetretenen Stamm mit geringer bzw. keiner Kreuzreaktivität und deshalb ist am ehesten eine naive Immunantwort zu vermuten. Daher richtet sich das Augenmerk dieser Arbeit auf die Probanden mit serologischer Negativität bezüglich des Stammes A/California/H1N1. Mit Hilfe serologischer Analysen und Anwendung der Durchflusszytometrie

zur genaueren Beurteilung der Zellen soll ein tieferes Verständnis des Zusammenspiels der verminderten Immunkompetenz älterer Menschen und der NSSN-Spezifität erlangt werden. Die serologische Analyse mit Hilfe des Hämagglutinationshemmtests (HHT) dient der Beurteilung des Immunstatus vor der Immunisierung wie auch als Kontrolle des Impferfolges nach der Impfung. Zur weiteren Analyse und Bestätigung der humoralen Immunantwort werden Daten der induzierten Plasmablasten im Blut hinzugezogen. Darüberhinaus wird die Quantität und Qualität der CD4⁺ T-Zellantwort an zehn verschiedenen Zeitpunkten analysiert, dabei werden unspezifische von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellantworten unterschieden. Insgesamt sollen damit die unterschiedlichen Veränderungen zwischen älteren und jüngeren Probanden im Zeitverlauf nach der Influenzaimpfung aufgezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Technisches Equipment und Material

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen erfolgten im Forschungslabor der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Andreas Thiel (AG Thiel) im Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien (BCRT) am Campus Virchow Klinikum der Universitätsmedizin Berlin. Das benötigte technische Equipment und Material für die Experimente ist in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Technisches Equipment und Material

Bezeichnung	Hersteller
BD Safety-Lok™ Blutentnahmeset 21G	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Trucount® Röhren	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Vacutainer® 170 U/mL Lithium-Heparin- Blutentnahmeröhrchen 10 mL	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Vacutainer® EDTA-Röhren (K ₂ EDTA 1,8 mg/mL) 2,5 mL	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Vacutainer® SST™ Advance Serumröhren 8,5mL	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator Innova CO-170	New Brunswick Scientific (Enfield, USA)
Durchflusszytometer MACSQuant® Analyser	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Leucosep™ Separationsröhren 50 mL zur PBMC Isolation	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

96er Mikro Tube Rack System – Volumen 1,2 ml / Tube	HJ-Bioanalytik GmbH (Erkelenz, 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)
Polystyren-Rundbodenröhrchen Cellstar® mit 2-Positionendeckel 12 mL	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Polystyren-Rundbodenröhrchen 5 mL	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Polystyren-Schraubdeckelröhrchen mit konischem Boden 50 mL	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Reaktionsgefäße Safe-Lock™ 0,5 mL und 1,5 mL	Eppendorf AG (Hamburg, 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)

2.2 Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Die Übersicht der verwendeten Chemikalien und allgemeinen Reagenzien ist in der folgenden Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
BD FACS Lysing Solution™	1:10 mit Aqua dest.	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
BD FACS Permeabilizing Solution 2™	1:10 mit Aqua dest.	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Beriglobin	1,44 mg/mL in PBS	Aventis Behring GmbH (Marburg, Deutschland)
Brefeldin A	5 mg/mL in 70% Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)
Casy®ton		Roche (Basel, Schweiz)
DMSO		Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)
Erythrocyte Lysis Buffer		Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Mutagrip® 2011/2012		Sanofi Pasteur MSD GmbH (Leimen, Deutschland)
LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit für 405 nm Excitation		Life Technologies Corporation (Carlsbad, USA)

LIVE/DEAD® Fixable Red Dead Cell Stain Kit für 488nm Excitation		Life Technologies (Carlsbad, USA)
Lymphocyte Separation Medium LSM1077		PAA Laboratories GmbH, (Cölbe, Deutschland)
Mouse α -human-CD28 purified		Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
PBS pH 7,2-7,4	1,5 mM KH_2PO_4 2,7 mM KCl 8,1 mM Na_2HPO_4 137 mM NaCl	Life Technologies (Carlsbad, USA)
PBS Azid	0,2% BSA und 0,2% Azid (10%)	Zusatz von BSA und Azid und anschließende Sterilfiltration AG Thiel, BCRT (Berlin, Deutschland)
PBS/BSA (PBS mit 0,1% BSA)	1g/l BSA in PBS	Zusatz von BSA und anschließende Sterilfiltration AG Thiel, BCRT (Berlin, Deutschland)
Propidiumiodid	Endkonzentration 400 nM	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	1,5 $\mu\text{g/ml}$	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)

Toxic-shock-syndrome-Toxin 1 (TSST-1)	1µg/ml Toxin aus Staphylococcus aureus, Molekulares Gewicht 24kDA	Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland)
---------------------------------------	---	---

2.3 Auswahl der Probandenkohorte

Die Rekrutierung der Probanden fand durch eine interne Ausschreibung in der Charité Universitätsmedizin Berlin und dem Deutschen Rheuma- Forschungszentrum in Berlin statt. Insgesamt wurden 50 freiwillige Probanden/-innen im Alter von 18 bis 65 Jahren in die Studie eingebunden und in zwei Gruppen unterteilt (siehe Tab. 3 für eine Altersbeschreibung der beiden Gruppen). Die Genehmigung der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin (Antragsnummer: EA1/175/11) zur Durchführung der Studie bezieht sich auf folgende Einschlusskriterien: Die Probanden/-innen sind gesund, im Alter von 18 bis 65 Jahren und wurden seit Beginn 2009 weder gegen die saisonale Influenza noch gegen die Schweinegrippe (A/California/H1N1/7/2009) geimpft. Die Aufklärung über potentielle Risiken einer Studienteilnahme und die Nebenwirkungen einer Influenzaimpfung erfolgte durch den Studienarzt. Alle Studienteilnehmer haben eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben. Die Ausschlusskriterien waren fehlende Einverständniserklärung, das Vorhandensein einer immunologisch relevanten chronischen Grunderkrankung, ein Hämoglobinwert unter 12 g/dl, sowie das Vorliegen einer Schwangerschaft. Des Weiteren wurden keine Personen berücksichtigt mit bekannter Überempfindlichkeit gegen Hühnereiweiß oder gegen einen Bestandteil des Impfstoffes Mutagrip® 2011/2012 (Sanofi-Pasteur).

Tab. 3: Probandenkohorte

	Alt	Jung
<i>n</i>	26	24
Altersbereich	53 – 65	18 – 30
Alter [Median]	57	26
Geschlecht	16♀/10♂	13♀/11♂

2.4 Studiendesign und Studienablauf

Als Teil dieser Studie und unter dem Namen **PRIMAGE** (*Protective Immunity in Aging*, protektive/schützende Immunität während des Alterns) wurde ein Netzwerk von Wissenschaftlern gegründet, die an verschiedenen Aspekten zum Thema PRIMAGE arbeiteten. In unserer Arbeitsgruppe konzentrierten wir uns auf die Zeitpunkte ab dem Tag der Impfung und untersuchten unter anderem die Kinetik, Seneszenz und die Funktion verschiedener Immunzellen. Der Fokus meiner Arbeit ist dabei die Serologie und Kinetik der Immunantwort an verschiedenen Zeitpunkten nach der Influenzaimpfung. Die folgende Abbildung 5 zeigt das Studiendesign:

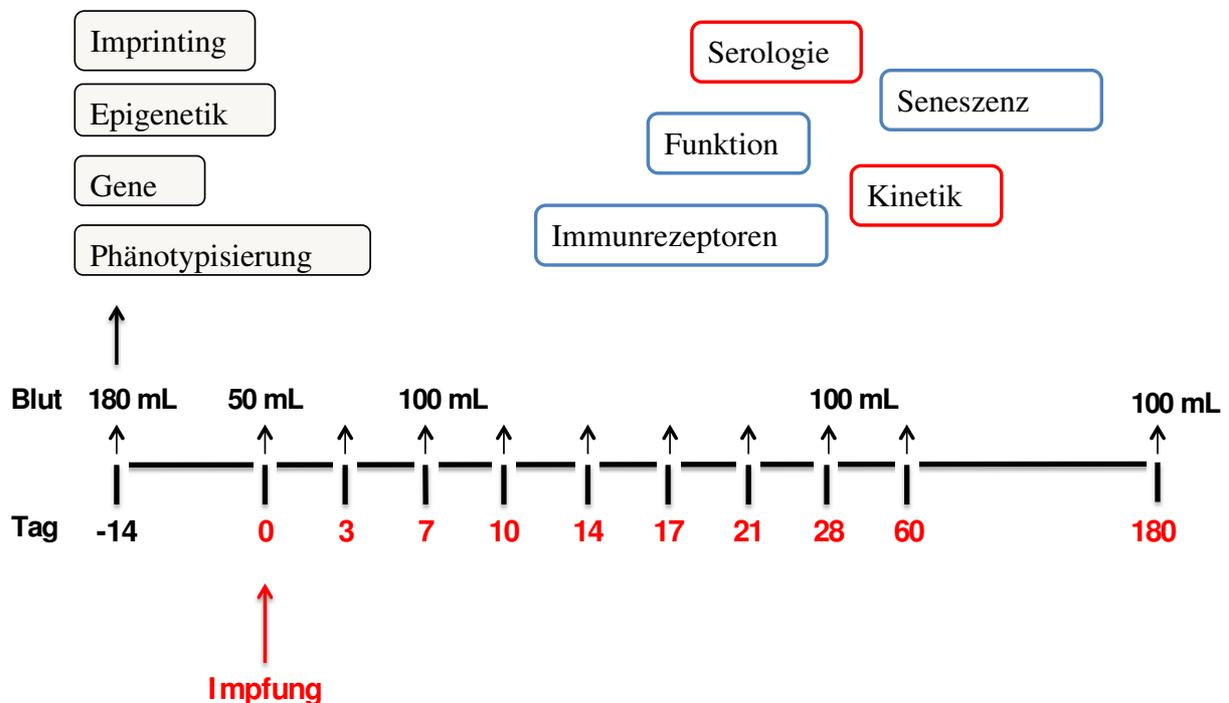


Abb. 5: Studiendesign von PRIMAGE (*Protective Immunity in Aging*)

Es wurde ein Netzwerk von Wissenschaftlern gegründet, die an Aspekten der protektiven/schützenden Immunität während des Alterns arbeiteten. Unsere Arbeitsgruppe AG Thiel konzentrierte sich auf die Analyse ab dem Zeitpunkt der Impfung. Die Impfung erfolgte bei allen 50 Probanden mit dem Influenza-Spaltimpfstoff (Mutagrip® 2011/2012 von Sanofi Pasteur MSD) am Tag 0. Insgesamt wurde an 11 verschiedenen Zeitpunkten allen 50 Probanden jeweils 50 mL bzw. 100mL Blut abgenommen. Mein Fokus sind die rotmarkierten Kästchen „Serologie“ und „Kinetik“ an den rotmarkierten Zeitpunkten.

Den insgesamt 50 Probanden wurde am Tag 0 der Influenzaimpfstoff durch eine Studienärztin in Form einer subkutanen Injektion in den Oberarm gemäß den Angaben des Herstellers verabreicht. Aus logistischen Gründen wurden die Patienten in zwei Gruppen unabhängig vom Alter mit jeweils 25 Probanden aufgeteilt. Der erste Studiendurchgang erfolgte in Oktober 2011 und der zweite in November 2011. Für unsere Untersuchungen wurde an insgesamt zehn im Studienplan (Abb.5) angegebenen Zeitpunkten jeweils 50 mL (bzw. 100 mL aufgrund zusätzlicher Untersuchungen) peripheres Blut aus einer Armvene in vorgesehene vakuumisolierte Röhrchen entnommen, die entweder einen Zusatz von Heparin oder einem Gerinnungsaktivator für die Analyse des Serums erhielten. Das heparinisierte Blut wurde direkt nach der Abnahme weiterverarbeitet und analysiert. Das aus den Serumröhrchen erhaltene Serum wurde bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die Blutentnahme fand morgens innerhalb eines zweistündigen Zeitfensters statt, um tageszeitliche Schwankungen zu minimieren. Jeder Proband wurde zu eventuell aufgetretenen Nebenwirkungen der Impfung befragt. Der in dieser Studie verwendete Impfstoff wird als ein Influenza-Spaltimpfstoff (Mutagrip® 2011/2012 von Sanofi Pasteur MSD) bezeichnet. Es handelt sich um einen inaktivierten Impfstoff bestehend aus isolierten Oberflächenantigenen (Hämagglutinin und Neuramindase) der Influenza A und Influenza B Virusstämme. Die Empfehlungen über die Zusammensetzung von Influenza-Impfstoffen werden einmal jährlich von der WHO modifiziert und veröffentlicht. Auf dieser Basis enthielt jede Impfdosis von 0,5 mL jeweils 15 µg Hämagglutinin entsprechend der in Tabelle 4 dargestellten Virusstämme. Um frühzeitig eine herbeigeführte Anämie der Probanden durch die Blutentnahme auszuschließen zu können, wurden zusätzlich an den Studientagen -14, 0 und 21 der Hämoglobinwert der Probanden durch das klinische Routinelabor aus 1 mL EDTA-Blut bestimmt.

Tab. 4: Zusammensetzung des verwendeten Influenzaimpfstoffes

A/California/7/2009 (H1N1)	davon abgeleiteter verwendeter Stamm NYMC X-179A
A/Perth/16/2009 (H3N2)	entsprechender verwendeter Stamm NYMC X-187, abgeleitet von A/Viktoria/210/2009
B/Brisbane/60/2008	

2.5 Isolierung mononuklearer Zellen aus peripherem Blut

Zu den peripheren mononuklearen Zellen (PBMC = *peripheral blood monocuclear cells*) zählen B- und T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten, und die natürlichen Killerzellen. Diese lassen sich mittels Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Bestandteilen des Blutes (Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen) trennen. Zur Gewinnung von PBMCs wurden Leucosept Falcons verwendet, welche eine Trennschreibe aus Polyethylen enthalten. Während der Zentrifugation werden Lymphozyten und PBMCs aufgrund ihrer Dichte von anderen Zellen separiert. Das hierbei verwendete Lymphozytenseparationsmedium Ficoll ist ein stark verzweigtes Polymer aus Saccarosemonomeren, die über Epichlorhydrin vernetzt sind. Es hat eine Dichte von 1,077 g/mL, die damit größer ist als die der Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, jedoch geringer als die der Erythrozyten und der meisten Granulozyten. Durch die Trennschreibe wird eine Rekontamination der verschiedenen Zellfraktionen nach Zentrifugation vermieden. Das Leucosept Falcon mit 15 mL Ficoll wurden zur Vorbereitung gefüllt und für 30 sec bei 1000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 40 mL bzw. 90 mL heparinisertes Blut auf zwei bzw. vier 50 mL Leucosept Falcons verteilt. Das Blut wurde 1:1 mit PBS/BSA verdünnt und anschließend für 10 Minuten bei 1000 g (A7/D1) und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde das Blutplasma-Puffer-Gemisch bis auf den Interphasenring abgesaugt und der die PBMCs enthaltene Interphasenring vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Dieser wurde dann in ein neues 50 mL Tube übergeführt. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit PBS/BSA (Zentrifugation: 10 min bei 490 g (A9/D9) und 4 °C), um die Überstände und weitere Verunreinigungen zu entfernen. Nach den Waschschrten wurde die Zellzahl mittels Casy® Counter ermittelt. Dieses Zählverfahren erfolgt nach dem elektrischen Widerstandsprinzip. Die Zellen werden durch eine Pore angesaugt und einem schwach elektrischen Feld ausgesetzt. Jede Zelle, die durch das elektrische Feld hindurch tritt, verursacht in Abhängigkeit von seinem Volumen eine variierende Widerstandsänderung. Nach dem zweiten Waschschrte erfolgte die Resuspension des entstandenen Pellets in 1mL PBS und anschließend eine Verdünnung mit PBS anhand der zuvor ermittelten Zellzahl auf eine Endkonzentration von 5×10^6 Zellen/100 μ L.

2.6 *In-vitro*-Stimulation von antigenspezifischen CD4⁺ T- Zellen

Zur Charakterisierung der durch die Impfung aktivierten Influenza- bzw. antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen und ihrem Zytokinprofil wurde eine sechsstündige *in-vitro*-Stimulation durchgeführt. Für diese Analyse wurde Vollblut verwendet, um eine möglichst realitätsnahe Situation zu simulieren, welche die natürlich vorliegenden Zellkonzentrationen im Blut gewährleisten sollte. Für den Versuchsansatz wurde 1 mL heparinisiertes Blut verwendet, welches jeweils mit 33 µL Mutagrip® 2011/2012 versetzt wurde. Als negative Kontrolle zur Untersuchung der Hintergrundaktivierung der T-Zellen wurde 33 µL PBS ohne Impfstoff eingesetzt. Ebenso wurde als Positivkontrolle das Superantigen SEB (1,5 µg/mL), sowie TSST-1 (1 µg/mL) verwendet, welches zur antigen-unabhängigen Aktivierung von T-Lymphozyten führen sollte. Durch die direkte Bindung von TCR und MHC-Molekülen ohne vorherige Prozessierung eignet sich das Superantigen zur Aktivierung von einer Vielzahl an T-Zellen unterschiedlichster Antigen-spezifität. Den Versuchsansätzen wurde zusätzlich jeweils 5 µL Anti-CD28 zugegeben, um kostimulierende Signale, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind zu induzieren und so die Stimulation zu optimieren (Lenschow et al., 1996). Die Stimulationsröhrchen wurden anschließend mit halb geöffneten Deckel in einem Winkel von 45° bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der ersten zwei Stunden wurde allen Versuchsansätzen 10 µg/mL Brefeldin A zugesetzt. Brefeldin A greift in den intrazellulären Proteintransport im Golgiapparat ein, führt zu einer Akkumulation der Proteine im endoplasmatischen Retikulum und hemmt so die Ausschüttung der Zytokine (Sciaky et al., 1997). Dadurch können die von der Zelle gebildeten Proteine nicht sezerniert werden, sondern verbleiben im Zellinneren. Nach vier weiteren Stunden wurde die Inkubation beendet und es folgten zwei Waschschrte. Das Blut in den Stimulationsröhrchen wurde mit 9 mL Qiagen Buffer EL lysiert, um die vorhandenen Erythrozyten zu entfernen. Dabei wird durch den Einstrom der hypoosmolaren Lösung in die Erythrozyten, die Zellmembran dieser rupturiert. Die Röhrchen mit dem Qiagen Buffer wurden dabei 10 min auf Eis gelagert und währenddessen behutsam geschwenkt. Der zweite Waschrte erfolgte direkt ohne Inkubationszeit mit 5 mL Qiagen Buffer EL. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 800 µL PBS resuspendiert und auf 96-deep Wellplatten übertragen. Abschließend erfolgte ein Waschrte mit PBS.

2.7 Die multiparametrische Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie

Mit der Methode der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen nach ihrem Phänotyp anhand ihrer Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften zu identifizieren und zu charakterisieren. Das Grundprinzip dieser multiparametrischen Analyse ist es, Zellen an einem Laserstrahl vorbei fließen zu lassen. Mit einer Nadel wird die zu untersuchende Zellsuspension in eine Mikrokanalküvette aus Glas aufgesogen und einem laminären Fluss des Strahlenganges zugeführt, wobei die Zellen das auftreffende Licht des Lasers streuen (Abb. 6).

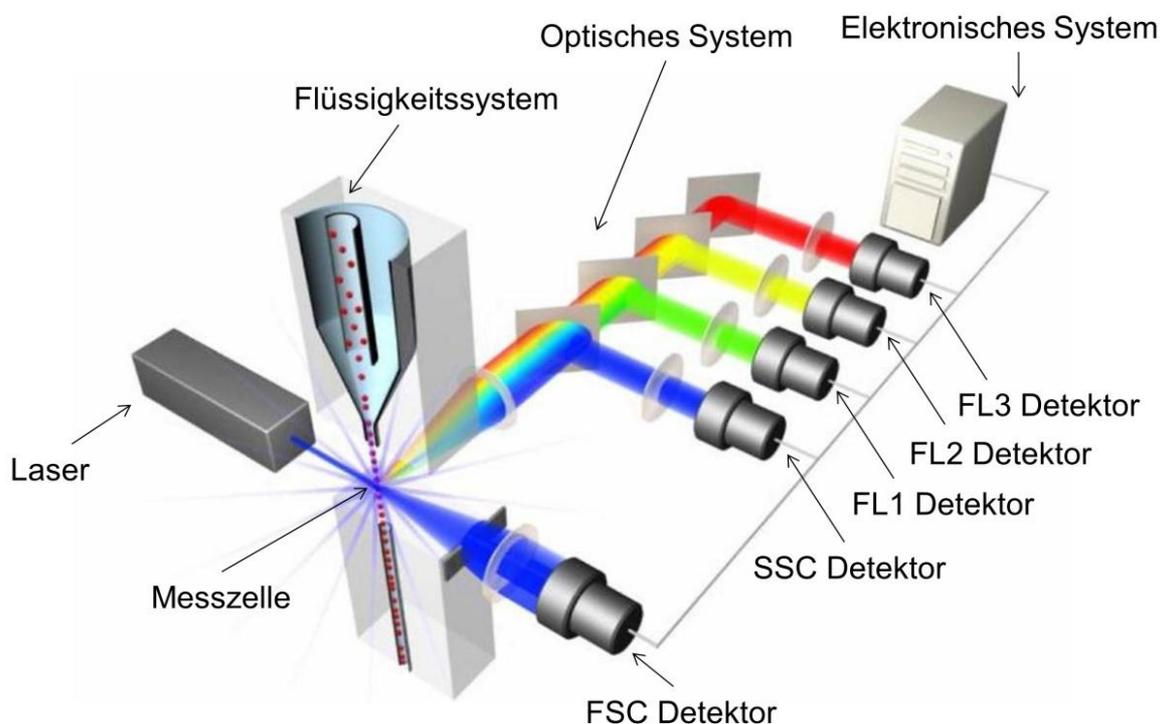


Abb. 6: Durchflusszytometrische Messung. Die Zellsuspension wird mit einer speziellen Nadel in eine Mikrokanalküvette aus Glas aufgesogen, so dass jede Zelle einzeln nacheinander durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt wird. Das dabei entstehende Streulicht wird von einem Detektor ausgewertet und man erhält quantitative Informationen über jede einzelne analysierte Zelle. Zugleich können durch verschiedene Laser und Filter die Fluoreszenzsignale aufgetrennt werden. Die Messergebnisse werden anschließend mittels eines Computers ausgewertet (<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/support/tutorials.html>).

Auf diese Weise gibt das Streulicht (*Scatter*) Informationen über die Zelle. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen sich in ihrem Inneren befinden, desto größer ist das entstehende Streulicht. Da die Zellen das Licht in verschiedene Richtungen streuen, unterscheidet man zwei Streulichtmessungen. Das in einem geringen Winkel ($3-10^\circ$) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* = FSC) und das um 90° reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (*side scatter* = SCA) bezeichnet. Das Vorwärtsstreulicht ist abhängig von der Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht zusätzlich zu der Größe auch von dem Inhalt der Zelle (Granularität) abhängt. Zellen mit hoher Granularität besitzen somit ein hohes Seitwärtsstreulicht und Zellen mit niedriger Granularität ein niedriges Seitwärtsstreulicht. Die detektierten Signale werden dann am Computer in einen Messwert umgewandelt. Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern ermöglicht zusätzlich eine weitere Differenzierung des Zellphänotyps. Diese Antikörper sind u.a. gegen bestimmte Oberflächenantigene der Zelle gerichtet. Durch das monochromatische Licht kommt es zu einer Anregung der gekoppelten Farbstoffe, die Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses Licht wird durch verschiedene Filter und Spiegel gebündelt und in einzelne Wellenlängenpakete zerlegt. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff entsteht ein spezifisches Lichtsignal, welches durch die lichtempfindlichen Detektoren (PMT = photo multiplier tubes) in ein elektronisches Signal umgewandelt wird. Da die PTMs aber keine Wellenlängen unterscheiden können, erfolgt die Zuordnung der einzelnen Spektralbereiche zu den Detektoren über die vorgeschalteten Spiegel und Filter. Um eine große Anzahl an gleichzeitig messbaren Parametern zu erhalten, werden Fluorochrome zusammen eingesetzt, deren Emissionsspektren sich möglichst nicht oder wenig überschneiden. Hierdurch ist eine Aussage über die vorhandenen Oberflächenantigene einer Zelle sowie eine Beurteilung der Herkunft, des Reifegrad- sowie Aktivitätszustandes möglich. Für alle Experimente in dieser Arbeit wurde das Gerät MACSQuant (Miltenyi Biotec) mit der in der Tabelle 5 dargestellten Filterkonfiguration verwendet. Die Messergebnisse wurden anschließend mit der Software FlowJo (Tree Star, USA) ausgewertet. Dabei ist die elektronische Kompensation der digital umgewandelten Signale von Wichtigkeit. Die optischen Filter beseitigen nicht alle spektralen Überschneidungen der einzelnen Fluorochrome, so dass eine elektronische Subtraktion zur Entfernung der Fluoreszenzen nötig war. Die Zellpopulationen konnten dann durch gezieltes Setzen von Analysefenstern, sogenannten „Gates“ selektiv analysiert werden. Für die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen wurden Punktwolkendiagramme (Dot-plot) gewählt (Abb. 7).

Tab. 5: Filterkonfiguration des Durchflusszytometers MACS Quant (Miltenyi Biotec)

Laser	Fluoreszenzkanal	Longpass Filter (LP)	Bandpass Filter (BP)
Blue 488 nm	SSC	Leer	488/10
Blue 488 nm	B1 B525	Leer	525/50
Blue 488 nm	B2 B585	Leer	585/40
Blue 488 nm	B3 B655	655 LP	Leer
Blue 488 nm	B4 B750	750 LP	Leer
Red 633nm	R1 R655	655 LP	Leer
Red 633nm	R2 R750	750 LP	Leer
Violet 405 nm	V1 V450	Leer	450/50
Violet 405 nm	V2 V525	Leer	525/50

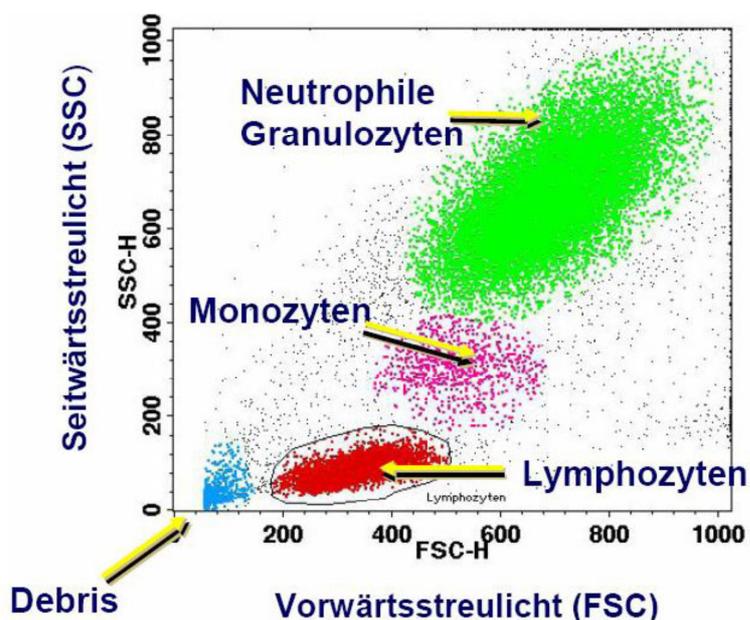


Abb. 7: Exemplarische Auswertung einer durchflusszytometrischen Messung. Zur Veranschaulichung werden die Zellen in einem Punktwolkendiagramm (Dot-Plot) dargestellt. Auf der x-Achse wird das Vorwärtsstreulicht (FSC) und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht (SSC) aufgetragen. Die Anhäufung von Zellen entspricht einer ähnlichen Streulichteigenschaft. Die rote Ansammlung sind den Lymphozyten (klein, kaum Granula), die pinke den Monozyten (groß, kaum Granula) und die grüne den Neutrophilen Granulozyten (groß, viel Granula) zugeordnet. Die blaue Anhäufung sind nicht verwertbare Zelltrümmer (Debris) (<http://www.inflammatio.de/en/clinical-trials/cell-analyses-by-facs/das-testprinzip-der-durchflusszytometrie.html>)

2.8 Charakterisierung der CD4⁺ T-Zellen

Für die multiparametrische Messung wurden eine Vielfalt an Fluoreszenz-Antikörper-Kombinationen, sogenannte „Panels“ zur Detektion der verschiedenen Zellpopulationen zusammengestellt. Für die Analyse der CD4⁺ T-Zellen wurden Panels mit geeigneten Kombinationen aus fluoreszenzgekoppelten Antikörpern definiert, die sich nicht in den einzelnen Emissionsspektren störten. Die in der Durchflusszytometrie verwendeten Marker richten sich sowohl gegen membrangebundene Moleküle an der Zelloberfläche als auch gegen Moleküle im Zytoplasma. Durch die Analyse verschiedener Expressionsmuster der Zellen konnte die Kinetik der CD4⁺ T-Zellen erfasst werden. Zunächst wurde aus Vollblut ein Zellzahlpanel zur Berechnung der absoluten CD4⁺ T-Zellanzahl herangezogen (Tab. 6). Zur Phänotypisierung der Subpopulationen der naiven und zentralen Gedächtnis- CD4⁺ T-Zellen, sowie der Bestimmung des Proliferations- (Ki-67) und des Aktivierungsmarkers (CD38) vor und nach der Impfung wurde das $\gamma\delta$ -TCR-Panel verwendet (Tab. 7). Dabei stand die Analyse der weitaus häufiger vorkommenden $\alpha\beta$ -TCR T-Zellen im Mittelpunkt. Hierfür wurden PBMC verwendet. Für die Analyse von Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde nach einer sechsstündigen *in-vitro*-Vollblutstimulation von PBMCs mittels Influenzaimpfstoffes das Zytokinprofil dieser Zellen untersucht (Tab. 8). Die verwendeten monoklonalen Antikörperkombinationen für die jeweiligen Panels sind im Folgenden tabellarisch dargestellt:

Tab. 6: Zellzahlpanel zur Bestimmung der absoluten CD4⁺ T-Zellen

Antigen	Kopplung	Anwendung	Klon	Isotyp	Firma
BDCA2 (CD303)	Fitc	1:100	AC144	Maus IgG1	Miltenyi
CD3	APCH7	1:50	SK7	Maus IgG ₁	BD
CD4	APC	1:20	VIT4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD8	V500	1:50	RPA-T8	Maus IgG1	BD
CD14	VioBlue	1:100	TUEK4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD19	PE vio770	1:20	LT19	Maus IgG1	Miltenyi
CD45	Viogreen	1:20	5B1	Maus IgG2a	Miltenyi

Tab. 7: $\gamma\delta$ -TCR-Panel zur Bestimmung der T_{NC} und T_{CM} $CD4^+$ T-Zellen

Antigen	Kopplung	Anwendung	Klon	Isotyp	Firma
Oberflächenfärbung					
CCR7	A488	1:100	TG8/CCR7	Maus IgG2a	Biolegend
CD3	APCH7	1:50	SK7	Maus IgG ₁	BD
CD4	PerCp	1:20	VIT4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD8	V500	1:50	RPA-T8	Maus IgG1	BD
CD45RA	PeCy7	1:100	HI100	Maus IgG2b	Biolegend
gdTCR	APC	1:50	B1	Maus IgG1	BD
Intrazelluläre Färbung					
Ki-67	V450	1:50	B56	Maus IgG1	

Tab. 8: Antigen-spezifische $CD4^+$ T-Zellen nach Influenzastimulation

Antigen	Kopplung	Anwendung	Klon	Isotyp	Firma
Oberflächenfärbung					
CD4	APC H7	1:200	3G8	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen
CD8	PerCp	1:10	BW135/80	Maus IgG2a	Miltenyi
CD14	VioGreen	1:20	TUEK4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD20	VioGreen	1:20	LT20	Maus IgG1	Miltenyi
Intrazelluläre Färbung					
CD40L (CD154)	VioBlue	1:20	5C8	Maus IgG2a	Miltenyi
IL-2	APC	1:200	MQ1-17H12	Ratte IgG2a	BD
IL-4	PE	1:200	MP4-25D2	Ratte IgG1	Biolegend
IFN- γ	Fitc	1:20	45-15	Maus IgG1	Miltenyi
TNF- α	PE V770	1:100	cA2	Human IgG1	Miltenyi

2.9 Markierung von Zelloberflächenstrukturen

Für die Markierung der Zelloberflächenstrukturen wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper der jeweiligen Panels in einem Ansatz vereint. Für alle zu untersuchenden Studientage wurde dieser eine Ansatz verwendet, was einen homogenen Versuchsansatz über einen längeren Zeitraum gewährleistete und einen erleichterten Versuchsablauf ermöglichte. Das den Ansätzen hinzugefügte Beriglobin (2 mg/mL) blockiert die Fc-Rezeptoren der Zellen und verhindert so eine unspezifische Antikörperbindung. Alle fluoreszenzgekoppelten Antikörper wurden in Vorversuchen austitriert, um die optimale Konzentration zu ermitteln (Tab. 6-8).

Für die Oberflächenmarkierung der Zellen im $\gamma\delta$ -TCR-Panel wurden jeweils 5×10^6 PBMCs in 100 μ L/well PBS resuspendiert und in eine Wellplatte überführt. Für die Fluoreszenzfärbung wurde dann der fertige Mastermix hinzugefügt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit in Dunkelheit bei Raumtemperatur (RT) erfolgte ein Waschschrift mit 800 μ L PBS/BSA (10-minütige Zentrifugation bei 490 g und 4°C). Für das antigenspezifische CD4⁺ T-Zellpanel erfolgte die Färbung der Oberflächenstrukturen an Zellen nach der Erythrozytenlyse und im Anschluss folgte die sechsstündige *in-vitro*- Vollblutstimulation. Die Färbung wurde 15 Minuten in Dunkelheit und bei RT durchgeführt. Zusätzlich wurde nach fünf Minuten 1 μ L/100 μ L LIVE/DEAD® Aqua dazugegeben und weitere zehn Minuten inkubiert. Dies dient zum Ausschluss toter Zellen nach Zellfixierung, da der Farbstoff nicht mehr in die intakten Zellmembranen toter Zellen eindringen und diese entsprechend markieren kann. Gemäß den Herstellerangaben wurde der Farbstoff in DMSO im Verhältnis von 1:10 mit PBS vorverdünnt und anschließend in der Konzentration 1:100 eingesetzt. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit 825 μ L/well PBS/BSA.

2.10 Zellfixierung und Zellpermeabilisierung

Im Anschluss an die Oberflächenmarkierung wurden die Zellen mit 825 μ L/well FACS Lysing Solution™ in einem Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, resuspendiert und 10 Minuten in Dunkelheit und bei RT inkubiert. Nach der Fixierung erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit BD FACS Permeabilizing Solution 2™ gemäß nach dem Herstellerprotokoll. Die Permeabilisierung ist für eine durchlässige intrazelluläre Immunofluoreszenzfärbung entscheidend. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS/BSA, um den Permeabilisierungsprozess abzustoppen. Die Zellen wurden anschließend in 100 μ L/well PBS/BSA resuspendiert.

2.11 Intrazelluläre Färbung von fixierten Zellen

Die intrazelluläre Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie der von den antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen produzierten Zytokine erfolgte mit entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. Für die Färbung wurden die Zellen erneut in 100 µL/well PBS/BSA resuspendiert und die entsprechenden Antikörperansätze zu den Zellen hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation in Dunkelheit und bei RT erfolgte ein Waschschrift mit 800 µL/well PBS/BSA. Die Analyse erfolgte in 250 µL/well mit Hilfe des Durchflusszytometers MACSQuant .

2.12 Berechnung der absoluten CD4⁺ T-Zellanzahl

Zur Bestimmung der absoluten CD4⁺ T-Zellanzahl und anderer Subpopulationen der Lymphozyten wurde heparinisieretes Blut verwendet. Dafür wurden jeweils 50 µL Vollblut durch reverses Pipettieren in die deep-Wellplatte übergeführt und mit entsprechendem 50 µL Antikörperansatz angereichert. Der Antikörperansatz wurde zuvor zusätzlich mit PBS/PSA in einem Verhältnis 1:12 verdünnt und mit Beriglobin versetzt. Nach leichtem Schwenken der Wellplatte wurden die Zellen für 15 Minuten in Dunkelheit und bei RT inkubiert. Anschließend wurde 500 µL/well Erythrozytenlyse-Puffer (Qiagen) zugegeben und die Wellplatte vorsichtig hin- und herbewegt. Danach wurden die Zellen 30 Minuten in Dunkelheit und auf Eis inkubiert, um die vorhandenen Erythrozyten zu lysieren. Im Anschluss wurden die Zellen umgehend mittels MACSQuant analysiert. Es wurde keine Zentrifugation durchgeführt, um den daraus resultierenden Zellverlust zu verhindern, der eine verfälschte Zellzahl zur Folge hätte. Die Berechnung der Zellanzahl erfolgte anhand der folgenden Gleichung:

$$\text{absolute Zellzahl} = \frac{\text{Prozente der Zellsuppopulationen}}{\text{Aufnahmenvolumen (350 µL)}} * \text{Verdünnung (12)}$$

2.13 Phänotypisierung der Plasmablasten

Die verwendeten Daten der Plasmablasten für diese Arbeit habe ich dankenswerter Weise von Cecilia Bozzetti (Mitglied unserer Arbeitsgruppe AG Thiel) erhalten. Die Phänotypisierung der Plasmablasten erfolgte mit Hilfe des von ihr untersuchten B-Zellpanels. Die Oberflächenmarkierung der isolierten PBMCs wurde ebenfalls mit einem entsprechenden Mastermix durchgeführt (Tab. 9). Die Inkubation erfolgte 15 Minuten in Dunkelheit und bei RT. Nach fünf Minuten Inkubation wurde LIVE/DEAD® Infrared zum Ausschluss toter Zellen hinzugegeben. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 825 μ L/well PBS/BSA. Nach der Zellfixierung und -permeabilisierung wie bereits unter 2.20 beschrieben, wurde die intrazelluläre Färbung durchgeführt. Nach 30 Minuten Inkubation in Dunkelheit und bei RT erfolgte der Waschschrift mit 800 μ L/well PBS/BSA. Für die Messung am MacsQuant wurden die Zellen mit 250 μ L/well resuspendiert.

Tab. 9: B-Zellpanel zur Phänotypisierung der Plasmablasten

Antigen	Kopplung	Anwendung	Klon	Isotyp	Firma
Oberflächenfärbung					
CD3	APCH7	1:50	SK7	Maus IgG1	BD
CD14	APC Vio770	1:10	TUEK4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD19	PE Vio770	1:20	LT19	Maus IgG1	Miltenyi
CD20	VioGreen	1:20	LT20	Maus IgG1	Miltenyi
CD27	APC	1:20	M-T271	Maus IgG1	Miltenyi
CD38	PE	1:40	SK7	Maus IgG2a	Miltenyi
IgD	V450	1:50	IB6-2	Maus IgG2a	BD
IgM	FITC	1:20	IA6-2	IgG1	Biologend
Intrazelluläre Färbung					
Ki67	PerCp 5.5	1.400	B56	Maus IgG1	BD

2.14 Hämagglutinationshemmtest (HHT)

Zum Nachweis von Antikörpern gegen das Influenzavirus wurde der Hämagglutinationshemmtest (HHT) von unseren Kooperationspartnern im Robert-Koch-Institut (RKI) in Berlin durchgeführt. Mit Hilfe dieses Testverfahrens zur Bestimmung des HI-Titers (*Hämagglutinin Inhibition Assay Titer*) konnte eine quantitative Bestimmung des influenzaspezifischen Immunstatus der Probanden vor und nach der Impfung bestimmt werden.

Das Testprinzip erfolgt folgendermaßen: Es wird eine Verdünnungsreihe vom Patientenserum hergestellt und diese mit Virussuspension, die eine definierte Menge an Influenzaviren enthält, angereichert. Nach 24-stündiger Inkubation wird die Virussuspension auf eine Zellkultur gegeben. Eventuell vorhandene neutralisierende Antikörper binden sich an das Virus und verhindern so eine Infektion der Zellkulturzellen. Die antikörpergebundenen Viren führen zur Infektion der Zellen. Die infizierten Zellen synthetisieren vermehrt Virusproteine, welche mittels monoklonaler Antikörper gefärbt und damit visualisiert werden können. So entspricht eine gefärbte Zelle einem infektiösen Viruspartikel. Die im Patientenserum enthaltenen neutralisierenden Antikörper verhindern dagegen eine Infektion. Zur Ermittlung des HI-Titers wird der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung verwendet, bei der die Hämagglutination noch verhindert werden kann.

2.15 Immunstatus der Probanden vor der Impfung

Für die Erfassung des Immunstatus der Probanden vor der Impfung und zur Festlegung einer stammspezifischen Baseline wurde ein Hämagglutinationshemmtest (HHT) am Tag 0 (Blutabnahme am Tag der Impfung) durchgeführt. Ein HI-Titer unter 10 wird als serologisch negativ, ein HI-Titer unter 40 als nicht schützend (*non-protected*) und ein HI-Titer über 40 als Indikator für einen wirksamen Schutz (*protected*) gewertet (de Jong et al., 2003; Beyer et al., 2004).

Mit Hilfe dieser Grundlagen wurde eine serologische Baseline zu den Stämmen definiert (Tab. 10). Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei, aufgrund der zu vermutenden verstärkten Immunreaktion nach der Impfung, auf den wieder neu aufgetretenen Stamm A/California/H1N1. Dafür wurden alle Probandengruppen mit einer serologisch negativen Baseline für A/California/H1N1, die also bisher keine Immunität gegenüber A/California/H1N1 ausgebildet hatten, zusammengefasst. Probanden mit einer serologischen negativen Baseline zu allen 3

Stämmen wurden als NSSN=3 (n=14) bezeichnet. Als NSSN=2 (n=11) wurden Probanden mit serologisch negativem Stamm für A/California/H1N1 und entweder für Brisbane oder Perth/H3N2 definiert. Als Kontrollgruppe wurden alle Probanden mit serologischer Positivität zu allen drei Stämmen klassifiziert (NSSN=0). Allerdings ist diese Gruppe sehr klein und umfasst nur sechs Probanden. Ausgeschlossen wurden Probanden mit nur einem serologisch positiven Stamm (NSSN=1). Diese Probanden konnten zu keiner der o.g. Gruppe zusammengefasst werden. Die weiteren Analysen wurden mit den definierten Probandengruppen NSN=0 und NSN=2+3 durchgeführt.

Tab. 10: Einteilung in stammspezifische serologische negative Baseline

(+ = HI-Titer über 10, - = HI-Titer unter 10)

	A/California/H1N1	B/Brisbane	A/Perth/H3N2
NSSN=0, n=6 davon n=3 alt, n=3 jung	+	+	+
NSSN=1, n=9 davon n=5 alt, n=4 jung	+	+	-
	+	-	+
	-	+	+
NSSN=2, n=11 davon n=8 alt, n=3 jung	-	+	-
	-	-	+
NSN=3, n=24 davon n=10 alt, n=14 jung	-	-	-

2.16 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Analyse der Durchflusszytometriemessdaten wurde mit dem Softwareprogramm FlowJo™ Version 9.4.10 durchgeführt. Die Auswertung verschiedener Zellpopulationen erfolgte durch entsprechende Gating-Strategien, welche im Ergebnisteil vorgestellt werden. Die statistische Auswertung und daraus resultierende Graphen wurde mit Graphpad Prism® Version 6 für Mac OS X erstellt. Für die Analyse gepaarter Stichproben wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Wilcoxon-Test) verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für die

statistische Untersuchung unabhängiger Stichproben genutzt. Zusätzlich wurde der Exakte Fisher-Test bei einem geringen Stichprobenumfang angewandt. Verwendet wurden Medianwerte mit Interquartilsabständen. Für Korrelationsanalysen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman eingesetzt. Darüber hinaus wurde die Graphik in Abbildung 22 von Karsten Jürchott mit Hilfe des Statistik-Software Programms R erstellt. Als statistisch signifikant wurden bei allen Analysen folgende p-Werte betrachtet: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,005$ (**), $p \leq 0,0005$ (***) und $p \leq 0,0001$ (****).

3 Ergebnisse

3.1 Der serologische Immunstatus vor und nach der Influenzaimpfung

Zunächst wurde der serologische Immunstatus der Probanden mit Hilfe des HHT am Tag 0 untersucht. Von den 50 Probanden zeigten 37, davon 20 der 26 älteren (76%) und 17 der 24 jüngeren Probanden (70%) eine negative serologische Baseline für A/California/H1N1. Für Brisbane zeigten 31 (13 der 26 älteren (50%) und 18 der 24 jüngeren (75%) Probanden) und für Perth/H3N2 36 (19 der 26 älteren (73%) und 17 der 24 jüngeren (71%) Probanden) der 50 Probanden eine serologische Negativität für den jeweiligen Stamm (Tab. 11). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alters und des HI-Titers am Tag 0 (Abb. nicht gezeigt). Um die Impferfolgskontrolle nachzuweisen, wurde der HI-Titer am Tag 21 bestimmt. Dieser zeigte, dass von den 50 Probanden 9 für California/H1N1 (18%), 6 für Brisbane (12%) und 12 für Perth/H3N2 (24%) trotz Influenzaimpfung keinen Immunschutz für den jeweiligen Stamm entwickelt haben. Auffallen ist, dass lediglich 12% (2/17) der jüngeren, jedoch 35% (7/20) der älteren Probanden keinen protektiven Immunschutz bei serologisch negativer Baseline gegen A/California/H1N1 entwickelt haben (Tab. 11).

Tab. 11: Immunstatus am Tag 0 und am Tag 21 nach der Influenzaimpfung

		Seronegativ HI-Titer < 10 Tag 0	Non-protected HI-Titer < 40 Tag 0	Non-responder HI-Titer < 10 Tag 21	Non-protected HI-Titer < 40 Tag 21
A/Calif/H1N1	alt <i>n</i> =26	20	22	4	7
	jung <i>n</i> =24	17	18	2	2
B/Brisbane	alt <i>n</i> =26	13	23	0	3
	jung <i>n</i> =24	18	20	1	3
A/Perth/H3N2	alt <i>n</i> =26	19	22	1	4
	jung <i>n</i> =24	17	20	3	8

In Abbildung 8 wurde der HI-Titer der untersuchten Influenzastämme am Tag 21 in Relation zum Alter gesetzt. Die älteren Probanden (Medianwert: 40) der Gruppe NSSN=0 und NSSN=2+3 zeigen einen signifikant verminderten HI-Titer ($p \leq 0,005$) für A/California/H1N1 im Gegensatz zu den jüngeren Probanden (Medianwert: 320). Während bei Brisbane und Perth/H2N2 keine Unterschiede zwischen den beiden Probandengruppen zu verzeichnen sind. Die verminderte humorale Immunantwort im Vergleich zwischen älteren und jüngeren Probanden bestand somit nur für den Stamm A/California/H1N1.

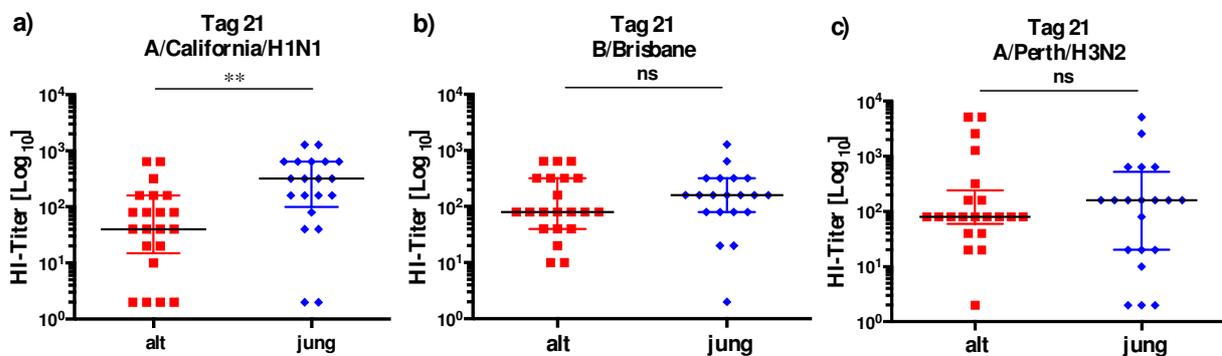


Abb. 8: HI-Titer der untersuchten Influenzastämme am Tag 21 nach Impfung mit TIV Mutagrip 2011/2012: a) A/California/H1N1, b) B/Brisbane, c) A/Perth/H3N3. Dargestellt sind alte (rot) und junge (blau) Probanden der jeweiligen Gruppen NSN=0 und NSN=2+3. Ältere Probanden haben einen verminderten HI-Titer für A/California/H1N1 im Gegensatz zu jüngeren Probanden ($p \leq 0,005$). Abgebildet sind Medianwerte mit Interquartilsabständen.

3.2 Kinetik der Plasmablasten im peripheren Blut

Als nächstes wurde die humorale Immunantwort anhand der Induktion der Plasmablasten mittels Durchflusszytometrie näher analysiert. Plasmablasten wurden mit einer erniedrigten Expression von CD19 und einer starken Expression von CD27 und CD38 bei gleichzeitiger Nichtexpression von CD 20 charakterisiert ($CD19^{low}CD27^{+}CD38^{+}CD20^{-}$).

In der folgenden Abb. 9 a) – f) ist die Kinetik der Plasmablasten nach der Influenzaimpfung dargestellt. Am Tag 7 konnte im Vergleich zu den Ausgangswerten ein deutlicher prozentualer als auch zahlenmäßiger Anstieg der Plasmablasten verzeichnet werden. Jedoch bestanden auch hier altersspezifische Unterschiede. Die älteren Probanden zeigten prozentual (Medianwert: 2,8), ($p \leq 0,005$), wie auch in der Zellzahl (Medianwert: 3,75), ($p \leq 0,05$) eine signifikante verminderte Plasmablastenbildung am Höchstpunkt Tag 7 im Gegensatz zu jüngeren Probanden (Medianwert: 7,2 für %; Medianwert: 10,58 für Zellen). Nach dem Höhepunkt am Tag 7 fallen die Werte der Plasmablasten auf das Ausgangsniveau von Tag 0 zurück. Bei der weiteren Betrachtung der NSSN-spezifischen Gruppen zeigte sich eine Tendenz der Erhöhung der Plasmablasten in Prozentwerten, wie auch in der Zellanzahl bei der Gruppe NSSN=2+3 am Tag 7 (Abb. 9 c - d). In der NSSN=0 Gruppe bestanden keine altersspezifischen Unterschiede (Abb. 9 e - f), während bei der NSSN=2+3 ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,005$) zwischen älteren und jüngeren Probanden am Tag 7 zu verzeichnen war.

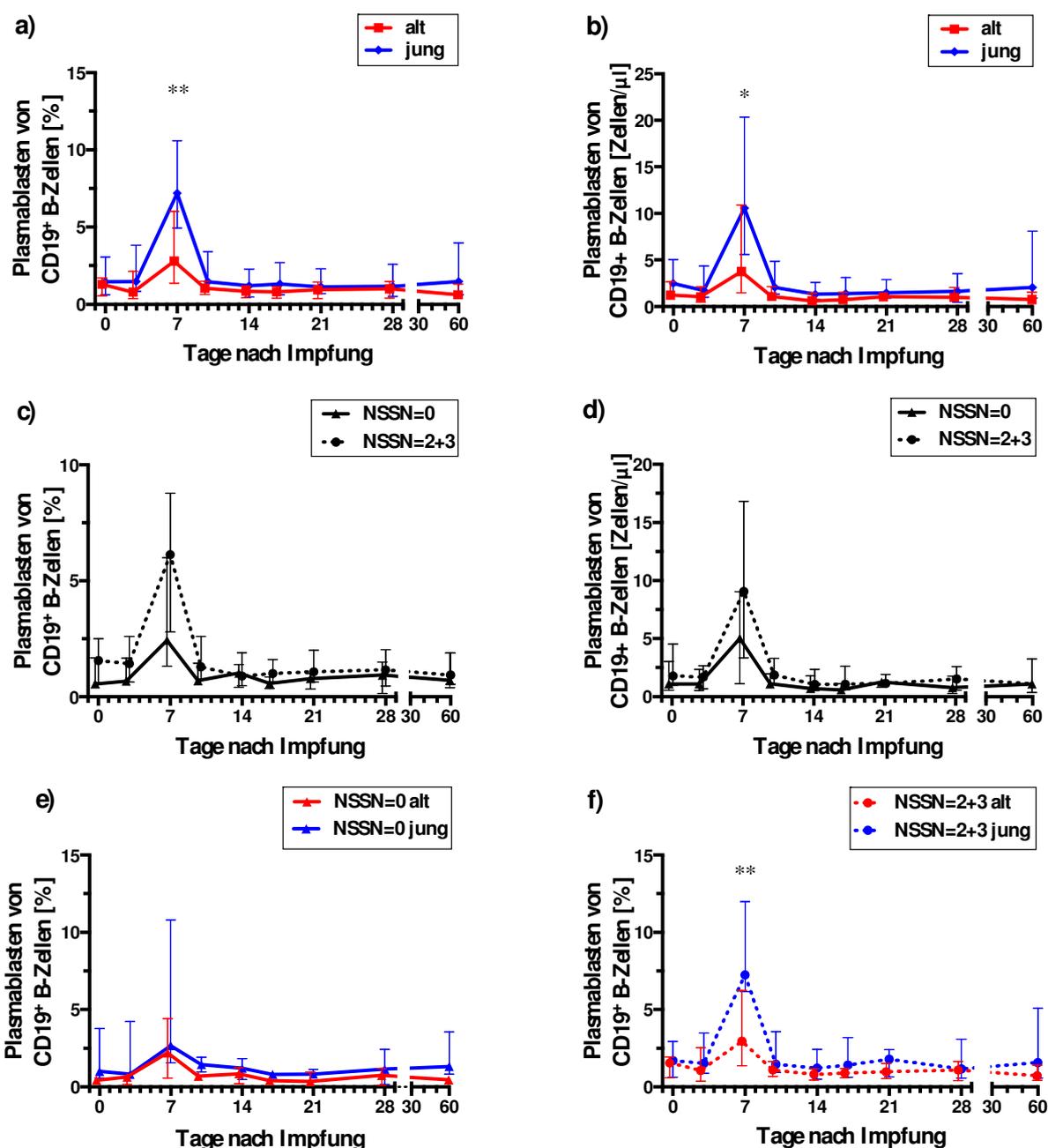


Abb. 9: Vergleich der Kinetik der Plasmablasten im peripheren Blut mit verschiedenen Probandengruppen. Die Plasmablasten sind als CD19^{low}CD27⁺CD38⁺CD20⁻ Zellen definiert. Ältere Probanden der jeweiligen Gruppe NSSN=0 und NSSN=2+3 haben eine verminderte Plasmablastenbildung am Tag 7 (Höhepunkt liegt am Tag 7 nach der Impfung) **a)** in Prozentwerten ($p \leq 0,005$), wie auch **b)** in der Zellanzahl ($p < 0,05$) im Gegensatz zu jüngeren Probanden (blau). Die NSSN=2+3 Probandengruppe zeigt tendenziell eine erhöhte Plasmablastenbildung am Tag 7 **c)** in Prozentwerten und **d)** in der Zellanzahl als die Kontrollgruppe NSSN=0. Bei weiteren Differenzierungen der Gruppen bestehen bei **e)** NSSN=0 keine altersspezifischen Unterschiede während **f)** die älteren Probanden der Gruppe NSSN=2+3 eine prozentuelle Verminderung der Plasmablasten ($p \leq 0,005$) am Tag 7 aufzeigen.

3.3 Absolute CD4⁺ T-Zellzahl im peripheren Blut

Die absolute Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut wurde an allen Studientagen (Tag 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 60 und 180) bestimmt. Die Gatingstrategie zur Detektion der absoluten CD4⁺ T-Zellen wurde in Abb. 10 dargestellt.

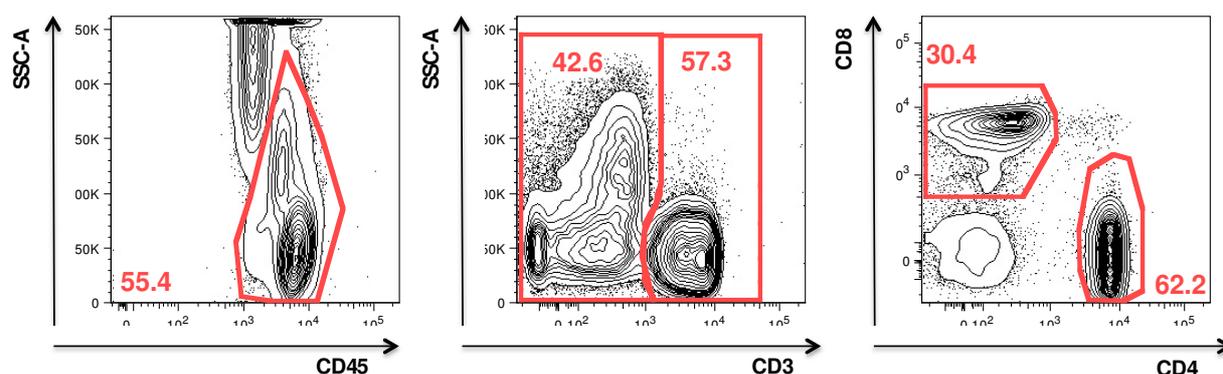


Abb. 10: Gating-Strategie eines exemplarischen Probanden (04ViFe) am Tag 7. Anhand des CD45 Marker können alle Leukozyten selektiert werden. Anschließend wurden alle CD3⁺ T-Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen differenziert.

Im Einzelnen wurden keine Differenzen zwischen den Altersgruppen alt und jung und keine auffälligen Schwankungen im Zeitverlauf beobachtet (Abb. 11 a). Die Medianwerte der CD4⁺ T-Zellzahlen pro μL lagen über die Studientage verteilt zwischen 632 und 818 bei beiden Altersgruppen. Beim Vergleich der NSSN-Gruppen zeigten sich bis auf dem Tag 21 auch keine wesentlichen Unterschiede. Hier zeigte die Gruppe NSSN=0 eine höhere Anzahl an CD4⁺ T-Zellen (Medianwert: 964,85) als die Gruppe NSSN=2+3 (Medianwert: 639,24) (Mann-Whitney-Test, $p \leq 0,005$) (Abb. 11 b). Allerdings gab es Unterschiede bei der differenzierten Betrachtung der alters- und NSSN-spezifischen Gruppen. Die älteren Probanden der Gruppe NSSN=2+3 zeigten eine verminderte CD4⁺ T-Zellzahl im Unterschied zu den älteren Probanden der Gruppe NSSN=0. Am Tag 7 (Mann-Whitney-Test, $p \leq 0,05$) und am Tag 21 (Mann-Whitney-Test, $p \leq 0,05$) konnten diese Unterschiede auch signifikant belegt werden. Im Gegensatz zu den älteren konnten bei den jüngeren Probanden der Gruppen NSSN=0 und NSSN=2+3 keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 11 c - d).

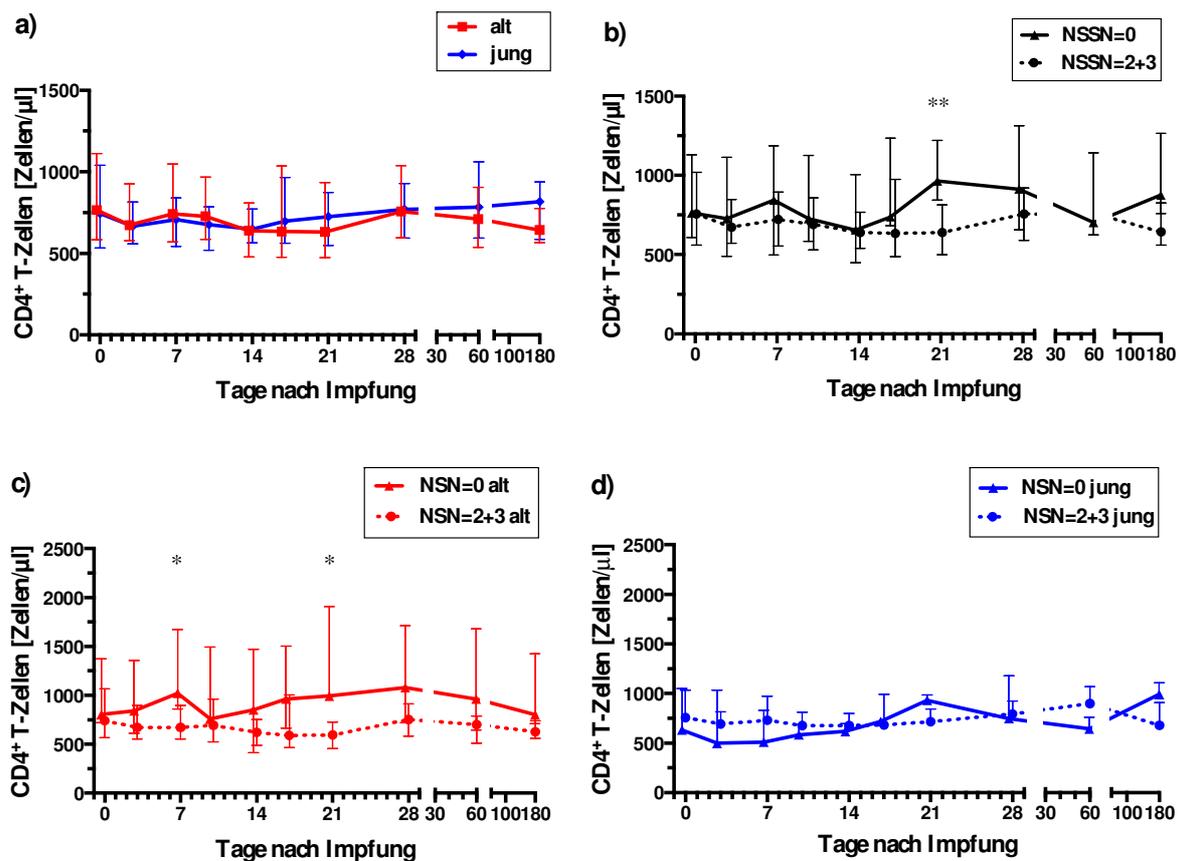


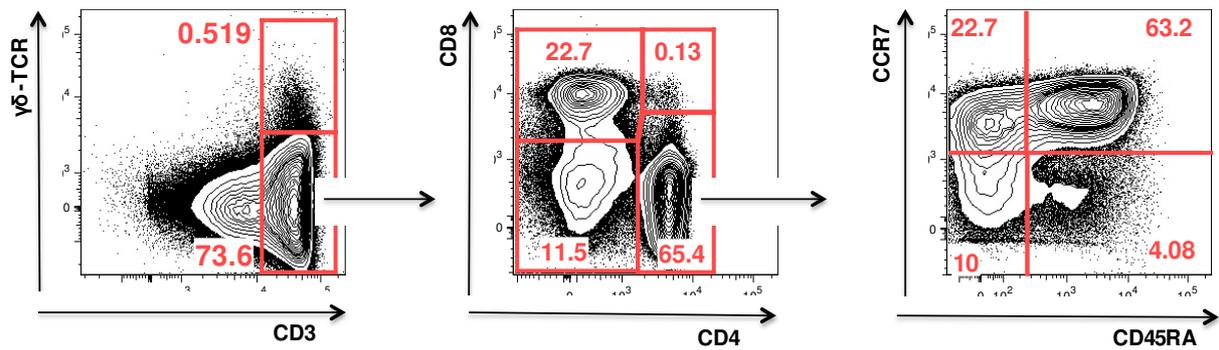
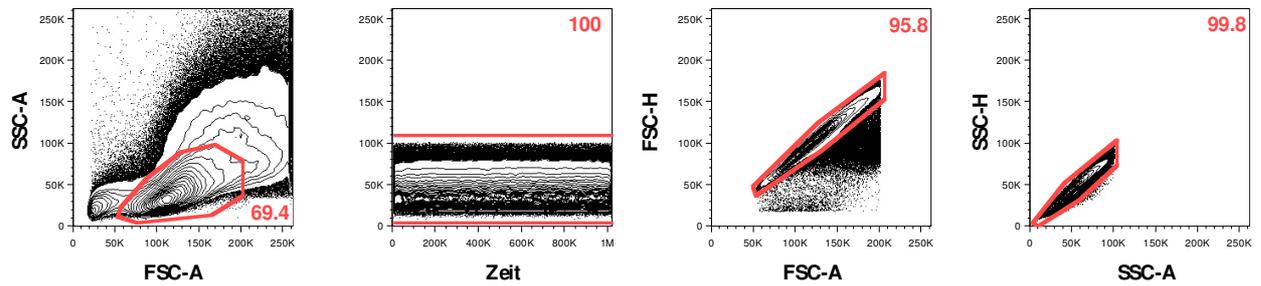
Abb. 11: Absolute CD4⁺ T-Zellanzahl im peripheren Blut. a) Es zeigten sich keine Unterschiede in der CD4⁺ T-Zellanzahl zwischen den älteren und jüngeren Probanden der Gruppe N=0 und N=2+3. b) Im Vergleich der Gruppen N=0 und N=2+3 bestehen ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen bis auf den Tag 21 (Mann-Whitney- Test; $p \leq 0,005$). c) Ältere Probanden der Gruppe N=2+3 haben eine signifikant verminderte CD4⁺ T-Zellanzahl am Tag 7 und am Tag 21 im Gegensatz zu älteren Probanden der Gruppe N=0. d) Dagegen gibt es keine stammspezifischen Unterschiede zwischen den jungen Probanden. Abgebildet sind Medianwerte mit Interquartilsabständen.

3.4 Phänotypische Charakterisierung der zentralen Gedächtnis- und naiven CD4⁺ T-Zellen und ihre Kinetik

Als nächstes wurden die zentralen Gedächtniszellen und die naiven CD4⁺ T-Zellen untersucht. Hierfür wurden zunächst alle Lymphozyten aus den Leukozyten selektiert. Die positiven CD3-Lymphozyten wurden unter Ausschluss von $\gamma\delta$ -TCR-T-Zellen als $\alpha\beta$ -TCR-T-Zellen definiert. Die CD4⁺ T-Zellen konnten anhand der Kombination der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA in vier Populationen differenziert werden – T_{NC}: naive (CCR7⁺CD45RA⁺), T_{CM}: zentrale Gedächtnis- (CCR7⁺CD45RA⁻), T_{EM}: Effektor-Gedächtnis- (CCR7⁻CD45RA⁺) und T_{EMRA}: terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis- (CCR7⁻CD45RA⁺) T-Zellen (Champagne et

Ergebnisse

a)



b)

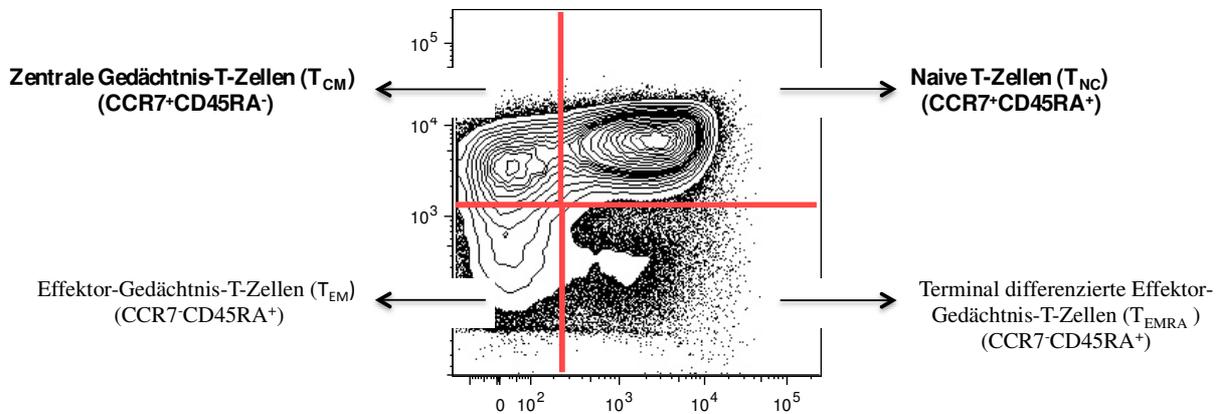


Abb. 12: Exemplarische Gating-Strategie des $\gamma\delta$ -TCR-Panels eines Probanden (12MaEh) am Tag 10. a) Zunächst wurden die Lymphozyten ausgewählt und die Doubletten ausgeschlossen. Die $CD4^+$ T-Zellen wurden aus $\alpha\beta TCR^+/CD3^+$ T-Zellen definiert und diese gegen CCR7 und CD45RA angeschaut. **b)** Anhand der CCR7 und CD45RA Marker konnten die $CD4^+$ T-Zellen in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden.

Für die beiden T_{CM} und T_{NC} Subpopulationen wurden die jeweiligen Zellzahlen als auch die prozentuelle Verteilung aus der absoluten Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen ermittelt. Die dargestellten Abbildungen zeigen nur die Prozentwerte. Im gesamten Zeitverlauf konnten altersspezifische Unterschiede der gesamten Probanden der Gruppe $NSSN=0$ und $NSSN=2+3$ verzeichnet werden. Ältere Probanden zeigten eine Verminderung der T_{NC} an fast allen Studientagen bis auf Tag 10 und Tag 60 im Vergleich zu den jüngeren Probanden ($p \leq 0,05$). Im Einzelnen wiesen beide Probandengruppen eine ähnliche Kinetik auf. Die bereits bestehenden höheren Werte an T_{NC} bei den jüngeren Probanden stiegen am Tag 3 signifikant an ($p \leq 0,005$) und fielen am Tag 7 wieder ab ($p \leq 0,005$). Am Tag 10 erhöhten sich die prozentuellen Werte der T_{NC} auf das Niveau der Werte am Tag 3. Am stärksten sieht man graphisch den Abfall der T_{NC} am Tag 7 bei den älteren Probanden ($p \leq 0,05$). Ab dem Tag 10 blieb die Kinetik der T-Zellen im peripheren Blut ohne großen Schwankungen (Abb. 13 a). Im Gegensatz zu den Altersgruppen wurde keine Unterschiede bei der Analyse der $NSSN$ -spezifischen Probandengruppen gesehen (Abb. 13 b). Betrachtet man dagegen die $NSSN$ - und altersspezifischen Probandengruppen (ältere und jüngere Probanden der Gruppen $NSSN=0$ und $NSSN=2+3$) sind altersabhängige Unterschiede wieder erkennbar. Aufgrund der verminderten Anzahl an Probanden in der Gruppe der $NSSN=0$ mit jeweils drei alten und drei jungen Probanden, war ein statistisches Ergebnis erschwert. Graphisch erkennt man allerdings den tendenziellen Unterschied, dass ältere Probanden der $NSSN=0$ Gruppe verminderte prozentuelle Werte an T_{NC} hatten (Abb. 13 c). Ein signifikanter Unterschied konnte dagegen bei der Gruppe $NSSN=2+3$ bestätigt werden. Die älteren Probanden der $NSSN=2+3$ zeigten eine Verminderung an T_{NC} an mehreren Studientagen (Tag 0, 3, 7, 17, 21 und 28), (Tag 0, 3, 7, 17, 21: $p \leq 0,05$; Tag 28: $p \leq 0,0005$) (Abb. 13 d).

Im Gegensatz zu den T_{NC} zeigte der Verlauf der T_{CM} umgekehrte Verhältnisse der Verteilung. Im Vergleich zu Tag 0 ist am Tag 3 ein deutlicher Abfall der T_{CM} (alt: $p \leq 0,0005$; jung: $p \leq 0,0001$) und am Tag 7 eine signifikante Erhöhung (alt: $p \leq 0,0001$; jung: $p \leq 0,005$) bei beiden Altersgruppen zu verzeichnen. Anschließend fielen die Werte an T_{CM} am Tag 10 wieder ab und blieben konstant über die weiteren Studientage (Abb. 14 a). Ähnlich wie bei den T_{NC} wurden keine $NSSN$ -spezifischen Differenzen festgestellt (Abb. 14 b). Dagegen zeigten die einzelnen $NSSN$ -spezifischen Probandengruppen eine tendenzielle Altersabhängigkeit. So bestanden höhere prozentuelle Werte an T_{CM} bei den älteren Probanden der $NSSN=0$ Gruppe und der

Ergebnisse

statistisch besser auswertbaren NSSN=2+3 Gruppe. Am Tag 28 konnte bei der NSSN=2+3 Gruppe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p \leq 0,0005$) (Abb. 14 d). Betrachtet man Werte verschiedener Zeitpunkte im Verhältnis zu Ausgangswerten am Tag 0 der beiden Subpopulationen TNC und TCM, erkennt man keinen Altersunterschied in den beiden Zellpopulationen in der Kinetik (Abb. 15a-b).

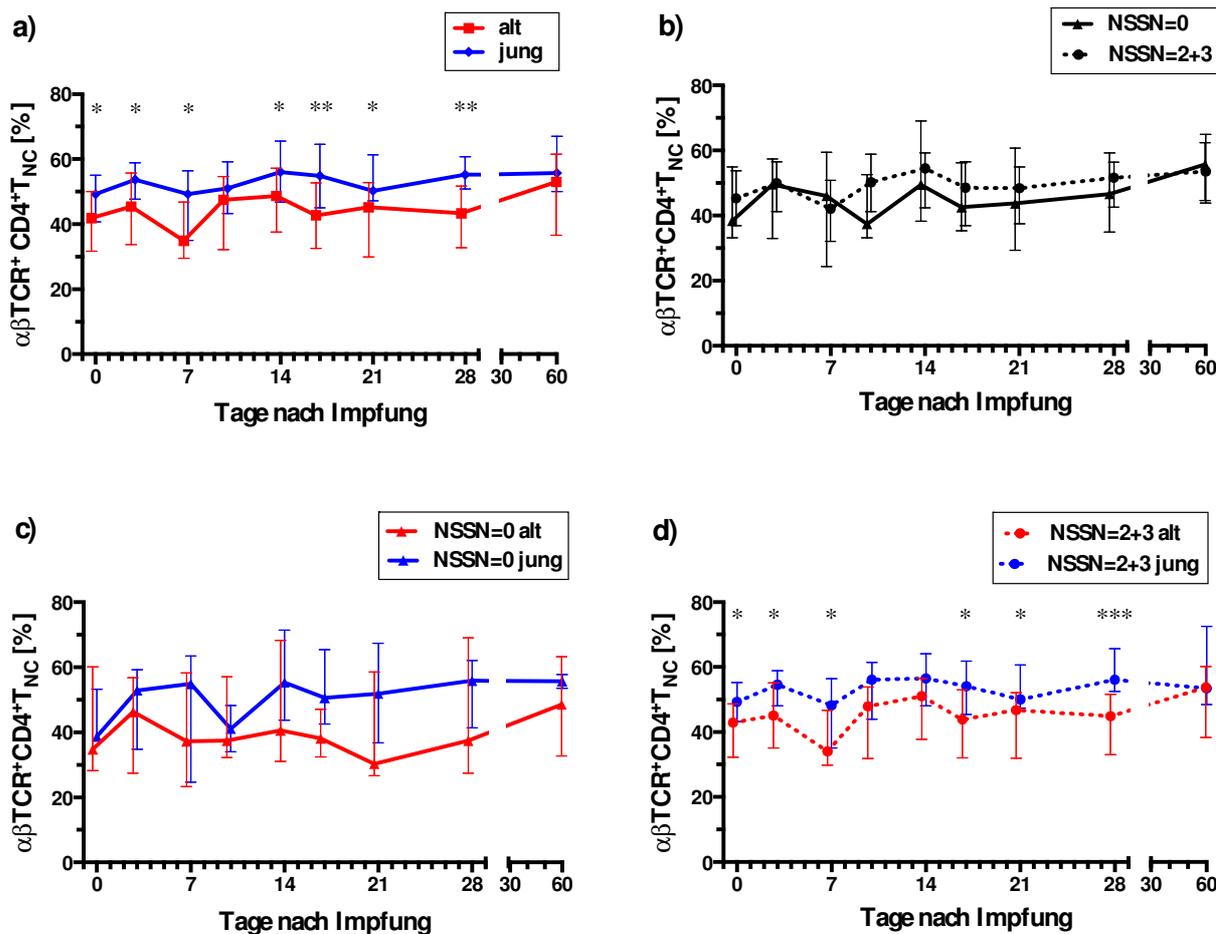


Abb. 13: Kinetik der naiven CD4+ T-Zellen der CD3 T-Zellen. a) Ältere Probanden in der NSSN=0 und NSSN=2+3 Gruppe haben signifikant verminderte prozentuelle Werte an T_{NC} im gesamten Verlauf im Vergleich zu den jüngeren Probanden, b) während beim Vergleich der beiden NSSN-Gruppen keine Unterschiede bestehen. c) Bei den älteren Probanden der Gruppe NSSN=0 sieht man ebenfalls tendenzielle Unterschiede, allerdings sind beide Gruppen sehr klein. d) In der Gruppe NSSN=2+3 bestehen signifikante altersspezifische Unterschiede.

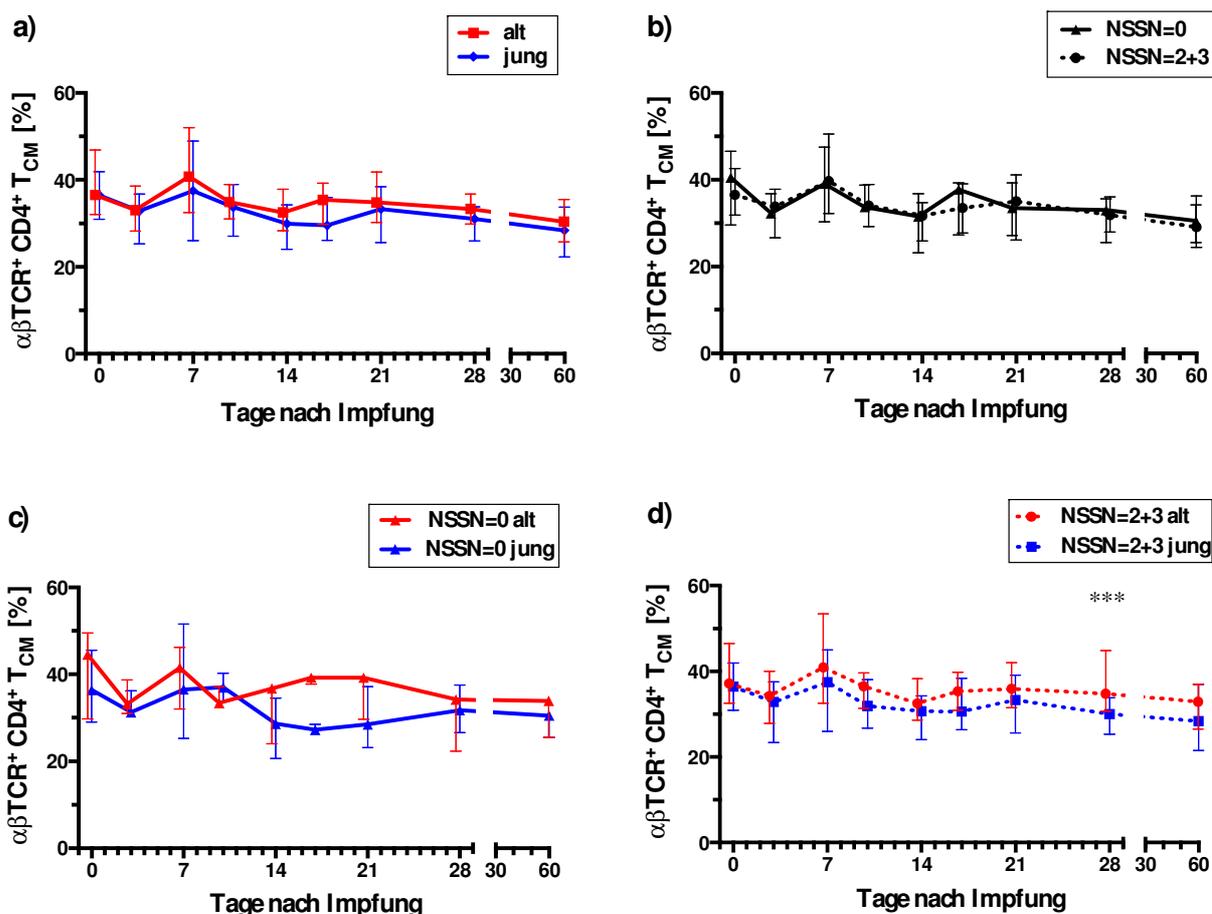


Abb. 14: Kinetik der zentralen Gedächtnis- CD4+ T-Zellen der CD3 T-Zellen. a) Beide Altersgruppen weisen keine Unterschiede im gesamten Zeitverlauf auf. b) Ähnlich sieht man keine Unterschiede bei den stammspezifischen Probandengruppen. c) In der NSSN=0 Gruppe, wie auch d) in der NSSN=2+3 Gruppe erkennt man Tendenzen zu höheren prozentuellen Werten an TCM. Bei den älteren Probanden der NSSN=2+3 Gruppe gibt es einen signifikanten Unterschied am Tag 28 ($p \leq 0,0005$).

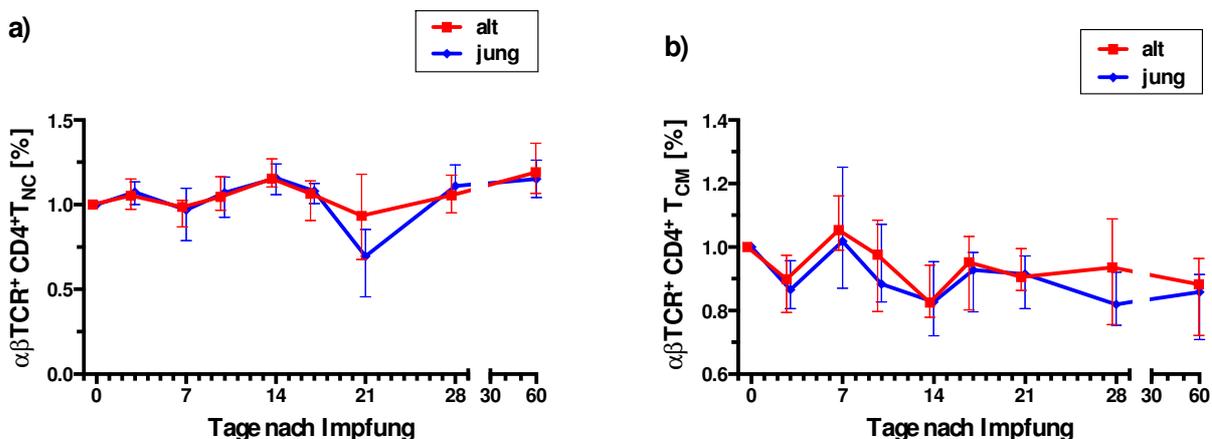


Abb. 15: Dargestellt ist das Verhältnis Tag (X) / Tag 0. a) Sowohl die naiven T-Zellen, als auch b) die zentralen Gedächtnis-T-Zellen zeigen keine Unterschiede zwischen älteren und jüngeren Probanden.

3.5 Proliferationsmarker Ki-67⁺ der CD4⁺ T-Zellen am Tag 7

Zur Identifikation von sich teilenden Zellen in der Durchflusszytometrie wurde die Kombination aus dem Replikationsmarker Ki-67 sowie dem Aktivierungsmarker CD38 verwendet. In der folgenden Abbildung 16 ist die Gating-Strategie eines Probanden exemplarisch dargestellt.

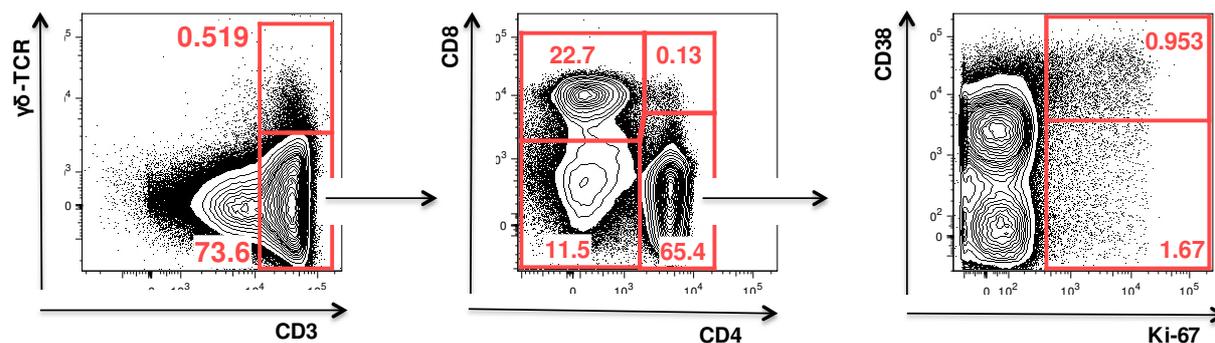


Abb. 16: Exemplarische Gating-Strategie zur Erfassung von Ki-67⁺CD38⁺ (0,953%) bei einem Probanden (12MaEh) am Tag 7.

Betrachtet wurden die doppelt-positiven (Ki67⁺CD38⁺) CD4⁺ T-Zellen prozentual, wie auch in der Zellanzahl. Prozentual konnte ein deutlicher altersabhängiger Zusammenhang nach Influenzaimpfung vermerkt werden. Im Vergleich zu den jüngeren Probanden exprimierten die älteren Probanden signifikant weniger Ki-67 am Höhepunkt Tag 7 ($p \leq 0,05$) (Abb. 17 a). An allen anderen Studientagen wurden bei beiden Altersgruppen ähnliche niedrige Prozentsätze gemessen. Der Vergleich der NSSN-spezifischen Gruppen zeigte dagegen keine prozentualen Unterschiede an Ki-67 (Abb. 17 b). Ebenfalls wurden keine Differenzen in der Zellzahl zwischen den Altersgruppen, sowie den NSSN-spezifischen Gruppen beobachtet (Abb. 17 c - d). Bei der Betrachtung der einzelnen NSSN-spezifischen Altersgruppen erkennt man allerdings wieder einen sehr deutlichen Unterschied. Die älteren Probanden der Gruppe NSSN=0 ($p \leq 0,05$) wie auch der Gruppe NSSN=2+3 ($p \leq 0,05$) zeigten eine signifikante Erniedrigung von Ki-67 am Tag 7 im Gegensatz zu den jüngeren Probanden der jeweiligen NSSN-Gruppe (Abb. 17 e - f).

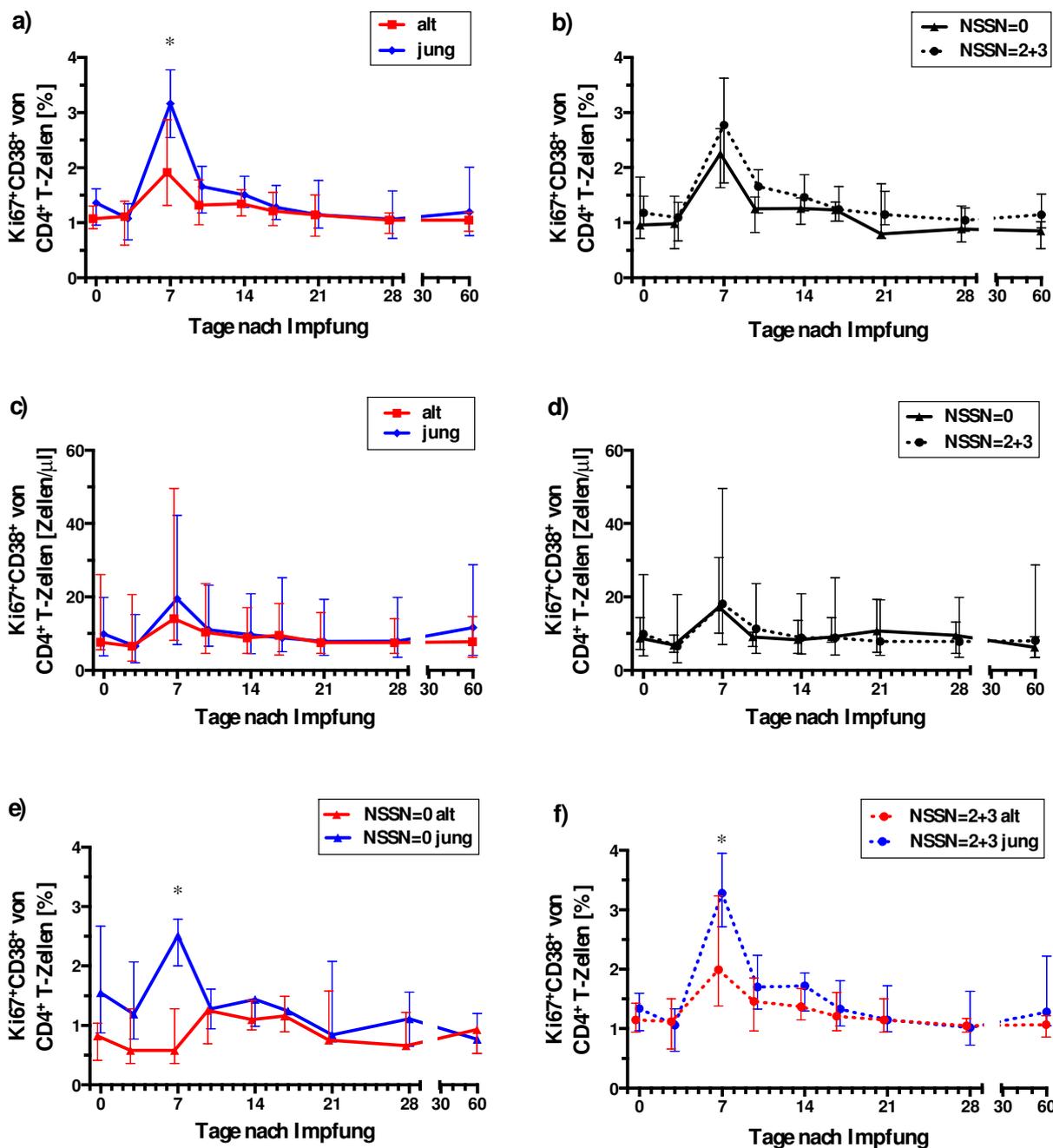


Abb. 17: Kinetik von Ki67⁺CD38⁺ der CD4⁺ T-Zellen. a) Ältere Probanden der N=0 und N=2+3 Gruppe haben verminderte prozentuale Anteile an den Replikationsmarker Ki67 am Höchstpunkt Tag 7. b) Es bestehen keine Unterschiede zwischen N=0 und N=2+3 Gruppen. c) In der Zellanzahl gibt es weder altersspezifische noch d) stammspezifische Unterschiede. e) In der N=0 Gruppe wie auch f) in der N=2+3 Gruppe gibt es signifikante Unterschiede zwischen den älteren und den jüngeren Probanden.

3.6 Charakterisierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen und ihre Kinetik

Für die Analyse der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde Vollblut mit TIV Mutagrip 2011/12 sechs Stunden *in-vitro* stimuliert. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression von CD40L auf T-Zellen zur Identifikation von Influenza-spezifischen T-Zellen charakterisiert. CD40L ist dabei ein kostimulierendes Molekül und gehört zu der Tumornekrose-Faktor-Superfamilie. Die Positivkontrolle wurde mit dem Superantigen SEB (Staphylococcal Enterotoxin B) und TSST₁ (Toxic Shock Syndrome Toxin 1) und die Negativkontrolle mit PBS stimuliert. In der Abb. 18 ist die im CD4⁺ T-Zell-Stimulationspanel angewandte Gating-Strategie anhand eines exemplarischen Probanden gezeigt.

Der Verlauf der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen zeigte im Wesentlichen keine altersabhängigen Unterschiede in Prozent, wie auch in der Zellzahl aller CD4⁺ T-Zellen. Beobachtet wurden bei beiden Altersgruppen zwei Höhepunkte am Tag 7 und am Tag 10 (Medianwerte: Tag 7: alt: 0,64 Zellen/ μ L; jung: 0,68 Zellen/ μ L, Tag 10: alt: 0,61 Zellen/ μ L; jung: 0,67 Zellen/ μ L) im Vergleich zu den Ausgangswerten am Tag 0 (Medianwerte: alt: 0,02 Zellen/ μ L; jung: 0,03 Zellen/ μ L) (Wilcoxon-Test, alt & jung: $p \leq 0,0001$) (Abb. 19). Dies entspricht im Mittel für ältere Probanden 0,08% am Tag 7 und 0,07% am Tag 10 und für jüngere Probanden 0,09% und 0,1% der gesamten CD4⁺ T-Zellen. Ab Tag 21 normalisierte sich der Zustand wieder in der Zellzahl wie auch prozentual und blieb im weiteren Verlauf bis Tag 180 konstant stabil (Abb. 19a-b). Bei dem Vergleich der Probandengruppen NSSN=0 und NSSN=2+3 dagegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied am Tag 10. Die Probanden mit NSSN=2+3 hatten prozentual höhere Anteile an antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen (Fisher-Test, $p \leq 0,05$) im Gegensatz zu der Kontrollgruppe NSSN=0 (Abb. 19c). Verdeutlicht wurde dies in der Abb. 19 d) in Bezug auf das Verhältnis der Messwerte am Tag 0 und Tag 10. Die Tendenz der Probandengruppe NSSN=2+3 einen erhöhten prozentualen Anteil an antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen ohne eine Altersabhängigkeit zu besitzen wurde in Abb. 19 e) – f) dargelegt.

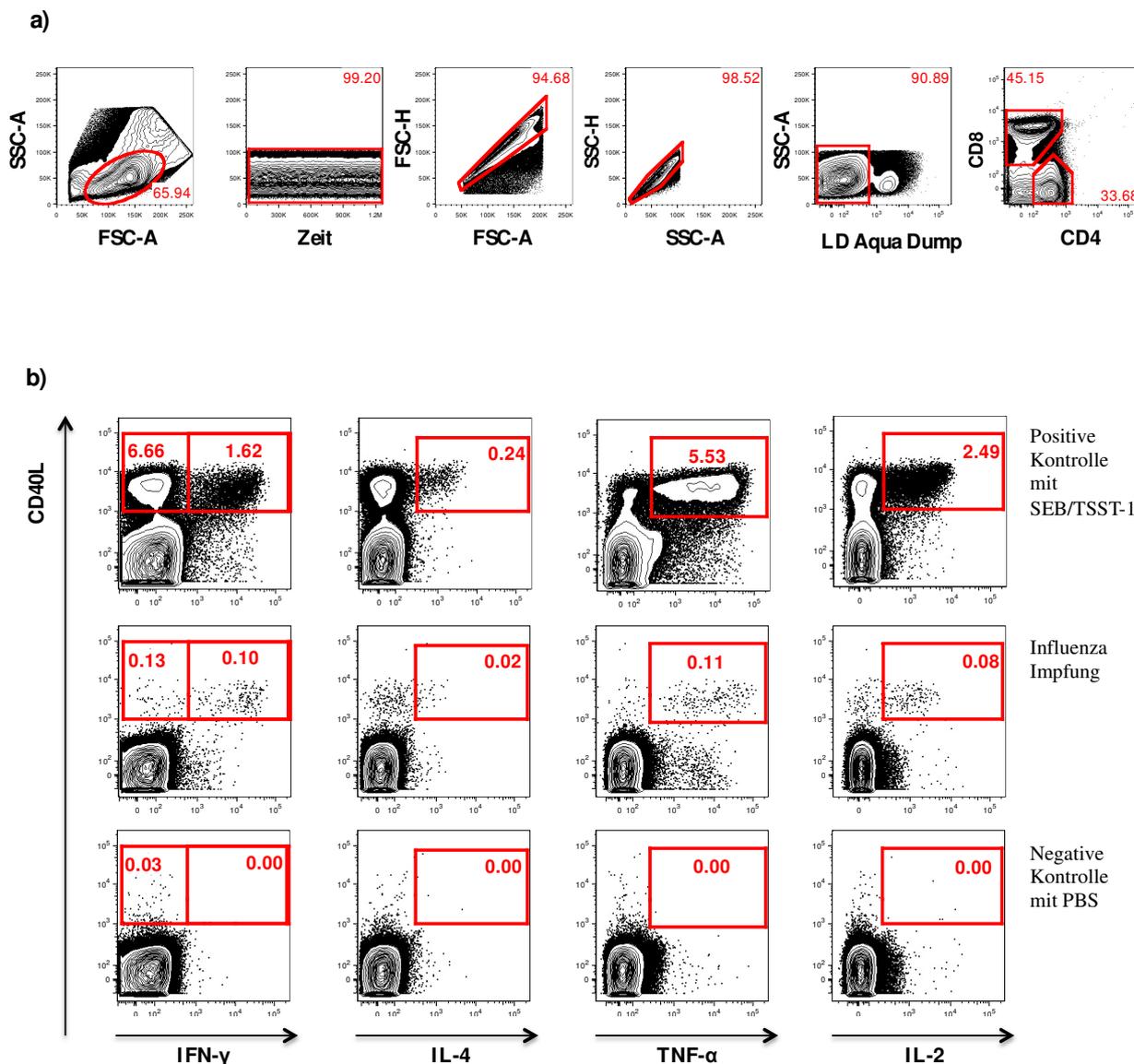


Abb. 18: Die Gating-Strategie antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen der CD3⁺ T-Zellen am exemplarischen Beispiel eines Probanden (03JuMu) am Tag 7. a) Nach Selektion der Lymphozyten und Ausschluss von zeitlicher Begrenzung, Doubletten, sowie toten Zellen (LD Aqua Dump) wurden die CD4⁺ T-Zellen definiert. b) Im weiteren Schritt erfolgte die Analyse der CD4⁺ T-Zellen mit dem Aktivierungsmarker CD40L und den Zytokinen IFN- γ , IL-4, TNF- α und IL-2. Die hiergezeigte intrazelluläre Färbung nach 6-stündiger *in-vitro* Stimulation wurde in einer Positivkontrolle mit SEB/TSST-1, sowie in einer Negativkontrolle mit PBS und durch die Gabe der Influenzaimpfung Mutagrip 2011/12 durchgeführt. Die Ergebnisse der negative Kontrollen mit PBS wurden mit den Ergebnissen der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen subtrahiert.

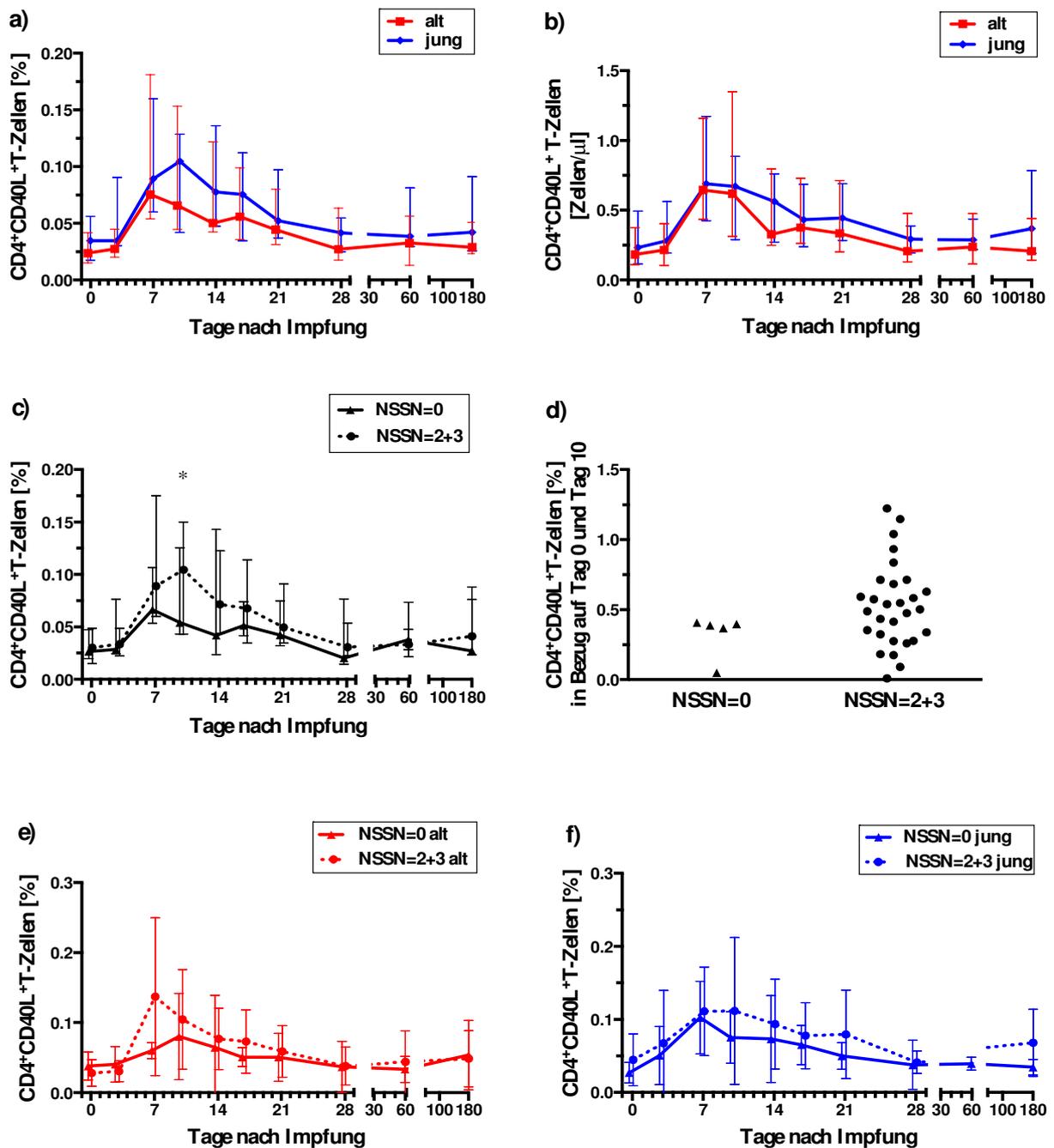


Abb. 19: Kinetik der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen nach Vollblutstimulation. Dargestellt sind antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen, welche aus den absoluten CD4⁺ T-Zellen errechnet wurden. Die älteren (rot) und jüngeren (blau) Probanden zeigen weder **a)** prozentual noch **b)** in der Zellanzahl Unterschiede auf. Die Höhepunkte der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen sind bei beiden Altersgruppen am Tag 7 und Tag 10. **c)** Beim Vergleich der beiden stammspezifischen Gruppen N=0 und N=2+3 konnte signifikant ein prozentualer Unterschied am Höhepunkt Tag 10 erfasst werden (Fisher-Test, $p \leq 0,05$). **d)** Zur Verdeutlichung wurden die Messwerte der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen am Tag 0 und Tag 10 ins Verhältnis gesetzt. **e) - f)** Tendenziell zeigen sich stammspezifische und keine altersspezifischen Abhängigkeit in den prozentualen Anteilen der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen. Dargestellt sind Medianwerte mit Interquartilsabständen.

3.7 Zytokinprofil der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen

Im weiteren Schritt der Analyse der antigenspezifischen CD4⁺ CD40L⁺ T-Zellen wurden verschiedene intrazelluläre Zytokine im Verlauf nach der Impfung untersucht. Dabei betrachteten wir das Zytokinprofil der älteren und jüngeren Probanden mit seronegativer Baseline zu A/California/H1N1 (NSSN=2+3). Für die exprimierenden Zytokine **IFN- γ** , **IL-2**, **TNF- α** und **IL-4** in CD40L⁺ T-Zellen wurden entsprechende fluoreszenzgekoppelte Antikörper zur intrazellulären Markierung verwendet. Eine exemplarische Darstellung der Gating-Strategie ist in Abbildung 18 im vorherigen Abschnitt dargestellt.

Im gesamten Zeitverlauf bildeten die T_h1-CD4⁺ T-Zellen den größten Anteil an charakteristischen Zytokinen IFN- γ , IL-2, TNF- α . Es fällt auf, dass die älteren Probanden (Medianwert: 0,016%) prozentual weniger IFN- γ am Tag 0 aufzeigten als die jüngeren Probanden (Medianwert: 0,03%) ($p \leq 0,05$). Dies ließ sich auch in der Zellzahl bestätigen (Medianwerte: alt: 0,017 Zellen/ μ L; jung: 0,3 Zellen/ μ L) ($p \leq 0,05$) (Abb. nicht gezeigt). Insgesamt wurden keine Differenzen aller Zytokine zwischen den Altersgruppen gemessen. Die Höhepunkte der Zytokine der T_h1-CD4⁺ T Zellen lagen bei Tag 7 und 10. Dabei zeigte sich die Zytokinproduktion älterer Probanden an einem früheren Höhepunkt am Tag 7, während es bei jüngerer Probanden zum späteren Zeitpunkt am Tag 10 erfolgte. Nach einem signifikanten Anstieg von Tag 0 auf Tag 7 von IFN γ -, IL-2 und TNF- α bei den älteren Probanden, nahm der Anteil ab dem Tag 10 wieder stark ab (Abb. 20a-c). Des Weiteren wurde auch das Zytokin IL-4 analysiert, welches von den T_h2-CD4⁺ T Zellen exprimiert wird. Im Vergleich zu den Zytokin produzierenden T_h1-CD4⁺ T Zellen wurde IL-4 von den T_h2-CD4⁺ T Zellen nur in geringem Maße produziert. Dies zeigte sich vor allem in der Messung am Tag 0, an dem nur wenige Probanden eine IL4-Produktion aufwiesen. Jedoch konnten am Tag 7 bei beiden Altersgruppen signifikante Höhepunkte gemessen werden (Abb. 20d). Anschließend erfolgte ein schneller Abfall von Tag 7 auf Tag 10. Dieser setzte sich kontinuierlich bei den jüngeren Probanden fort, während bei den älteren Probanden der IL4-Anteil sich normalisierte und konstant blieb.

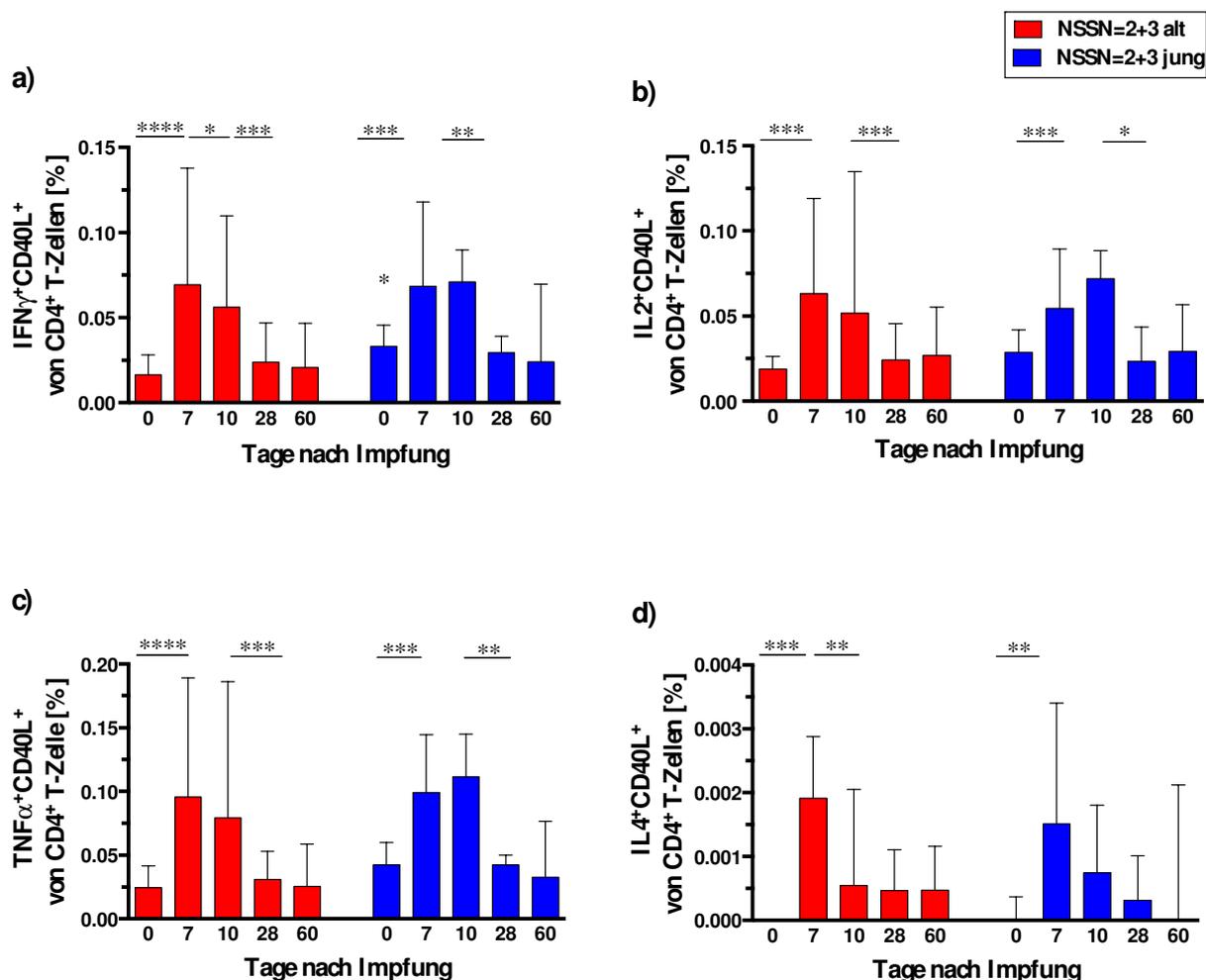


Abb. 20: Zytokinprofil der antigenspezifischen CD4 $^+$ T-Zellen der NSSN=2+3 Gruppe. Dargestellt sind Zytokine der antigenspezifische CD4 $^+$ T-Zellen der absoluten CD4 $^+$ T-Zellen. **a)** Die T_h1-CD4 $^+$ T Zellen der älteren Probanden (rot) sezernieren einen geringeren Anteil an IFN- γ als die jüngeren Probanden (blau) ($p \leq 0,05$). Bei beiden Altersgruppen liegen die Höhepunkte am Tag 7 und Tag 10. **b)** IL-2 und **c)** TNF- α zeigen ebenfalls signifikante Höhepunkte am Tag 7 und 10. **d)** Die IL4-sezernierenden T_h2-CD4 $^+$ T Zellen bilden den geringsten Anteil der Zytokine und zeigen einen Höhepunkt am Tag 7.

3.8 Polyfunktionalität antigenspezifischer CD4 $^+$ T-Zellen

Ein weiteres Kriterium zur Beschreibung der Qualität der T-Zell-Antwort nach Impfungen ist die Polyfunktionalität der antigenspezifischen CD4 $^+$ T-Zellen. Sie verfügen über die besondere Eigenschaft, zwei oder mehr Zytokine gleichzeitig zu bilden. Dies stellt eine verbesserte Effektor-Qualität der CD4 $^+$ T Zellen dar und korreliert positiv mit der Ausbildung einer protektiven Immunantwort (Seder et al., 2008). Mit Hilfe des Boolean-Gatings wurde eine Analyse der verschiedenen in einem Panel untersuchten Parameter ermöglicht. Bei den hier

betrachteten vier Zytokinen (IFN- γ , IL-2, TNF- α und IL-4) handelt es sich um 16 mögliche Populationen. In dem exemplarischen Beispiel wird die Gating-Strategie der einzelnen möglichen Kombinationen der Zytokine gezeigt (Abb. 21).

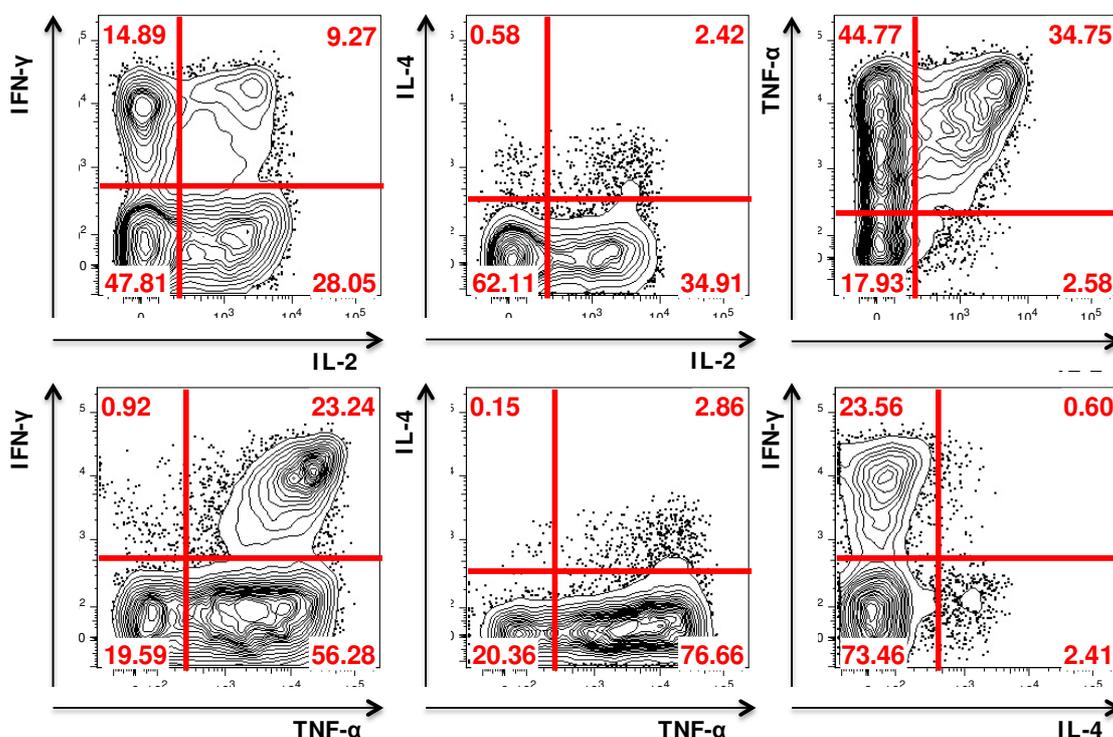
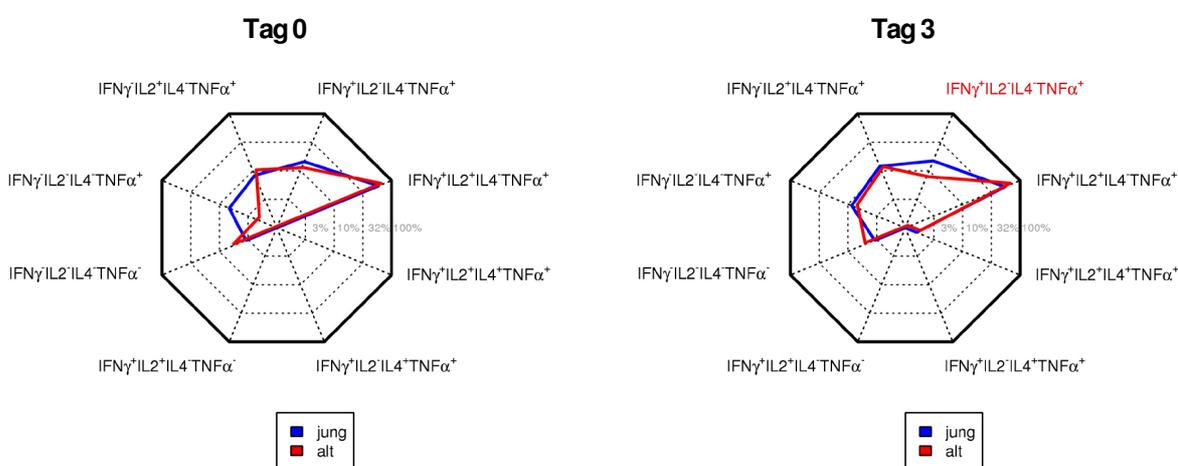


Abb. 21: Exemplarisches Beispiel eines Boolean-Gatings eines Probanden (03JuMu) am Tag 7 in der Positivkontrolle mit SEB/TSST-1. Nach 6-stündiger *in-vitro* Stimulation wurde die Expression von Zytokinen IFN- γ , IL-2, TNF- α und IL-4 von CD40L⁺ CD4⁺ T-Zellen untersucht.

Die Ergebnisse der Polyfunktionalität der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen an bestimmten Tagen wurden in Spinnennetzen, sogenannten Spider Plots dargestellt. Gezeigt sind die Medianverläufe in logarithmischer Skaleneinteilung der zwei Altersgruppen der Gruppe NSSN=2+3. Die abgebildeten Spider Plots haben einen explorativen Charakter und beantworten die Frage, wie wahrscheinlich sich die Gruppen im Median unterscheiden, nicht aber wie stark. Die rot dargestellten Populationen zeigen Unterschiede zwischen den älteren und jüngeren Probanden und sind abhängig von der Verteilung der einzelnen Daten. Da in Spider Plots nur die Medianverläufe und nicht die Verteilung abgebildet sind, können kleine Unterschiede signifikant sein und große Unterschiede nicht. Insgesamt ergaben sich 16 Populationen, davon sind acht nicht in der Abbildung dargestellt, da sie einen Medianwert von nahezu 0 zeigten. Die hier

Ergebnisse

dargestellten acht Populationen dagegen zeigten Unterschiede im Zeitverlauf in beiden Altersgruppen. Während am Tag 0 keine Unterschiede in fünf von acht Populationen bestanden, zeigten sich am Tag 3 Unterschiede in der Population $\text{IFN-}\gamma^+ \text{IL-2}^- \text{IL-4}^- \text{TNF-}\alpha^+$ ($p < 0,005$). Am Tag 7 verhielten sich die Verteilungen aller Populationen der beiden Altersgruppen identisch. Dabei ist es aufgefallen, dass im Verlauf die Vierfachproduzenten $\text{IFN-}\gamma^+ \text{IL-2}^+ \text{IL-4}^+ \text{TNF-}\alpha^+$, welche am Tag 0 nicht nachgewiesen wurden, ab Tag 3 und 7 wieder vorhanden waren. In der Expansionsphase Tag 10 konnten Unterschiede von zwei Populationen dargestellt werden, dem Zweifachproduzenten $\text{IFN-}\gamma^+ \text{IL-2}^- \text{IL-4}^- \text{TNF-}\alpha^+$ ($p < 0,05$), der bereits am Tag 3 höhere Anteile bei den jüngeren Probanden bildete und dem Dreifachproduzenten $\text{IFN-}\gamma^+ \text{IL-2}^+ \text{IL-4}^- \text{TNF-}\alpha^+$ ($p < 0,05$), der höhere Anteile bei älteren Probanden aufwies. Am Tag 14 zeigten sich erneut keine Unterschiede. Im weiteren zeitlichen Verlauf am Tag 21, 28 und 60 blieb der Unterschied des Zweifachproduzenten $\text{IFN-}\gamma^+ \text{IL-2}^- \text{IL-4}^- \text{TNF-}\alpha^+$ bei den jüngeren Probanden bestehen (Tag 21, 28, 60, $p < 0,05$). Bei den älteren Probanden bildeten weiterhin die dreifach-positiven Zellen $\text{IFN-}\gamma^+ \text{IL-2}^+ \text{IL-4}^- \text{TNF-}\alpha^+$ Unterschiede am Tag 28 aus ($p < 0,05$).



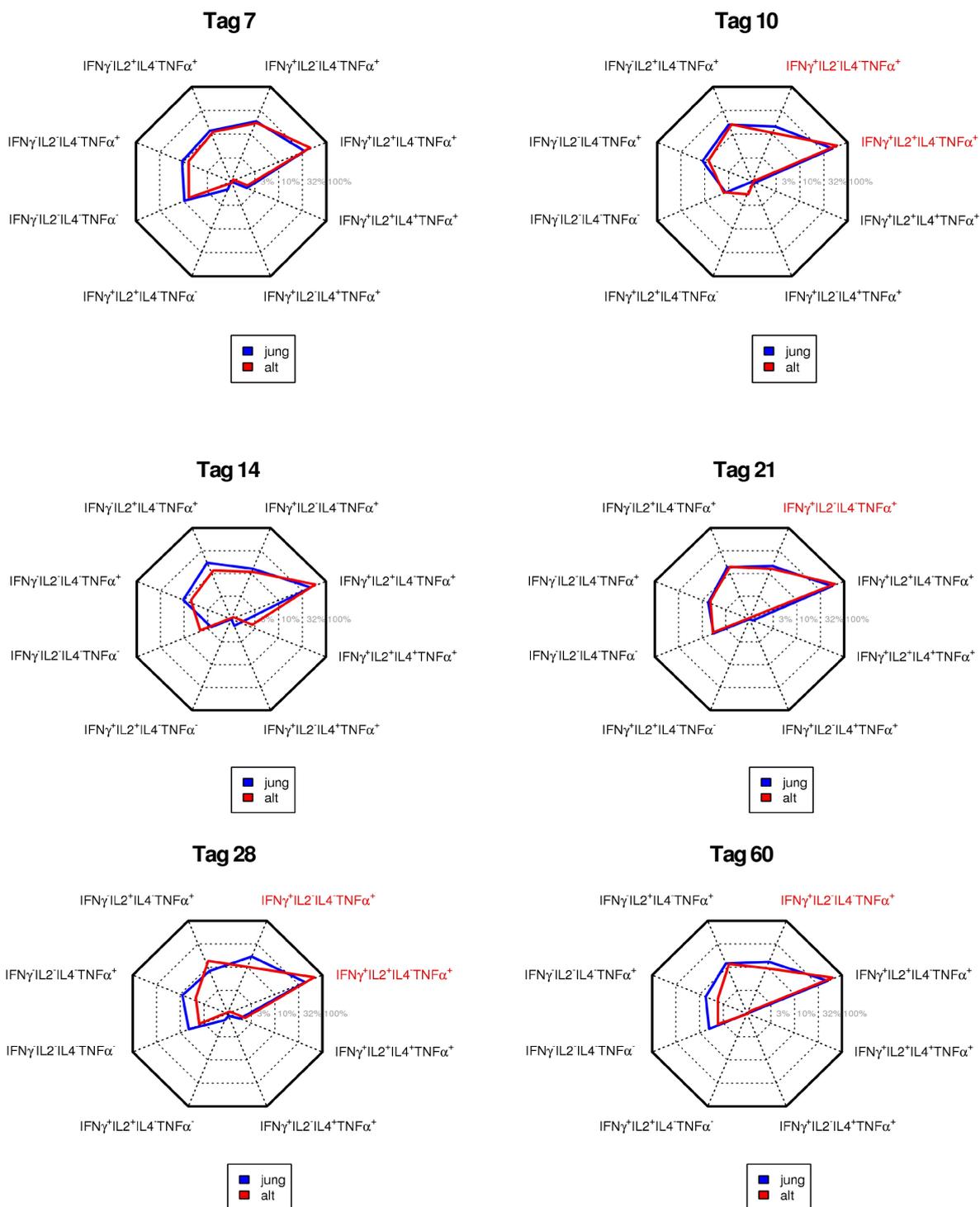


Abb. 22: Polyfunktionalität der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen an bestimmten Tagen dargestellt in Spider-plots. Abgebildet sind Probanden der Gruppe NSSN=2+3 unterteilt in alt (rot) und jung (blau). Die Werte sind im Log10 der Medianwerte gezeigt.

3.9 Korrelationen

Nach der Einzelanalyse wurden die verschiedenen Zellpopulationen in einen Zusammenhang gebracht. Betrachtet wurden jeweils die Höhepunkte der untersuchten Parameter in der NSSN=2+3 Gruppe. In der Gesamtanalyse konnte gezeigt werden, dass der Replikationsmarker Ki-67 in Relation zu antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen steht ($r = 0,48$, $p \leq 0,005$) (Abb. 23a). Die Korrelation blieb bei den älteren Probanden signifikant ($r = 0,72$, $p \leq 0,005$) bestehen im Gegenteil zu den jüngeren Probanden. So verfügten ältere Probanden einen geringeren Anteil an Ki-67⁺CD4⁺ T-Zellen bei einem gleichzeitig geringeren Anteil an antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen. Bei der Analyse der Plasmablasten gab es ebenfalls einen Zusammenhang mit Ki-67⁺CD4⁺ T-Zellen bei allen Probanden zusammen ($r = 0,60$, $p \leq 0,0005$). Allerdings zeigte sich auch hier ein altersspezifischer Unterschied mit Auffälligkeiten bei den älteren Probanden ($r = 0,72$, $p \leq 0,005$) (Abb. 23b). Die Proliferation der Plasmablasten verringerte sich somit bei einem geringeren Anteil an Ki-67⁺CD4⁺ T-Zellen, aber nur bei älteren Probanden. Ähnlich sieht der Zusammenhang von Plasmablasten und antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen aus. Nur bei den älteren Probanden korrelierten diese beiden Zellpopulationen ($r = 0,52$, $p \leq 0,05$) (Abb. 23c). Je weniger antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen aktiviert wurden, desto weniger Plasmablasten wurden ausgebildet.

In der weiteren Analyse wurde der HI-Titer am Tag 21 für A/California/H1N1 (Abb. nicht gezeigt), sowie für alle drei Stämme angeschaut. Errechnet wurde der HI-Titer für alle drei Stämme mittels Geometrischem Mittel. Weder der HI-Titer für A/California/H1N1, noch der kombinierte HI-Titer aller drei Stämme zeigten einen Zusammenhang mit den Plasmablasten am Tag 7 oder mit den antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen am Tag 7 oder am Tag 10 (Abb. für Tag 10 nicht gezeigt). Bei der Gesamtbetrachtung aller Probanden wurde eine Korrelation des HI-Titer mit Ki-67⁺CD4⁺ T-Zellen in Prozent ($r = 0,48$, $p \leq 0,005$), wie auch in der Zellzahl ($r = 0,37$, $p \leq 0,05$) festgestellt. So verfügten Probanden mit geringen Ki-67⁺CD4⁺ T-Zell Anteilen einen ebenso verminderten Anteil an HI-Titer. In der Abb. 23b wurden sogar zwei getrennten Populationen der beiden Altersgruppen beobachtet. Besondere Auffälligkeiten zeigte ein Proband mit der Kennung 07ReBr (schwarzer Pfeil), der sowohl niedrige HI-Titer zu allen drei Stämmen als auch niedrige Werte von Plasmablasten, antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ und Ki-67⁺CD4⁺ T-Zellen aufwies.

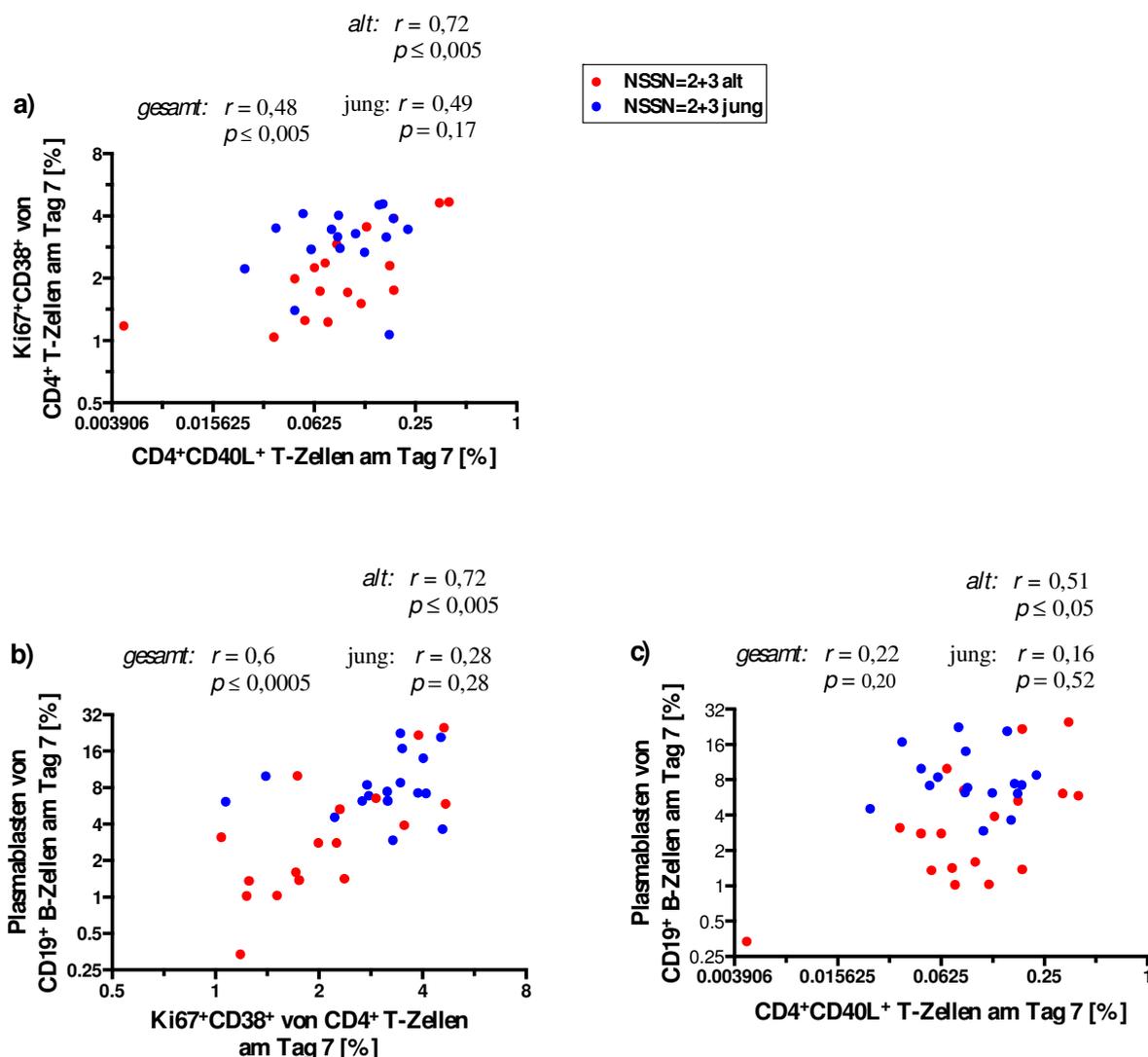


Abb. 23: Korrelationen von Ki67+CD38+ von CD4+ T-Zellen, antigenspezifischen CD4+CD40L+ T-Zellen und Plasmablasten (CD19^{low}CD27+CD38+CD20⁻). Alle Graphiken sind in log₂ angezeigt. a) Gezeigt wird der Zusammenhang von Ki-67+CD4+ T-Zellen und antigenspezifischen CD4+ T-Zellen. Bei geringerem Anteil an antigenspezifischen CD4+ T-Zellen besteht auch ein verminderter Anteil an Ki-67+CD4+ T-Zellen am Tag 7. b) Die Plasmablasten am Tag 7 korrelieren mit dem Replikationsmarker Ki-67+CD4+, sowie c) mit den antigenspezifischen CD4+ T-Zellen jeweils am Tag 7. Je geringer der Anteil an Plasmablasten ist, desto geringer ist auch der Anteil an Ki-67+CD4+ T-Zellen und den antigenspezifischen CD4+CD40L+ T-Zellen.

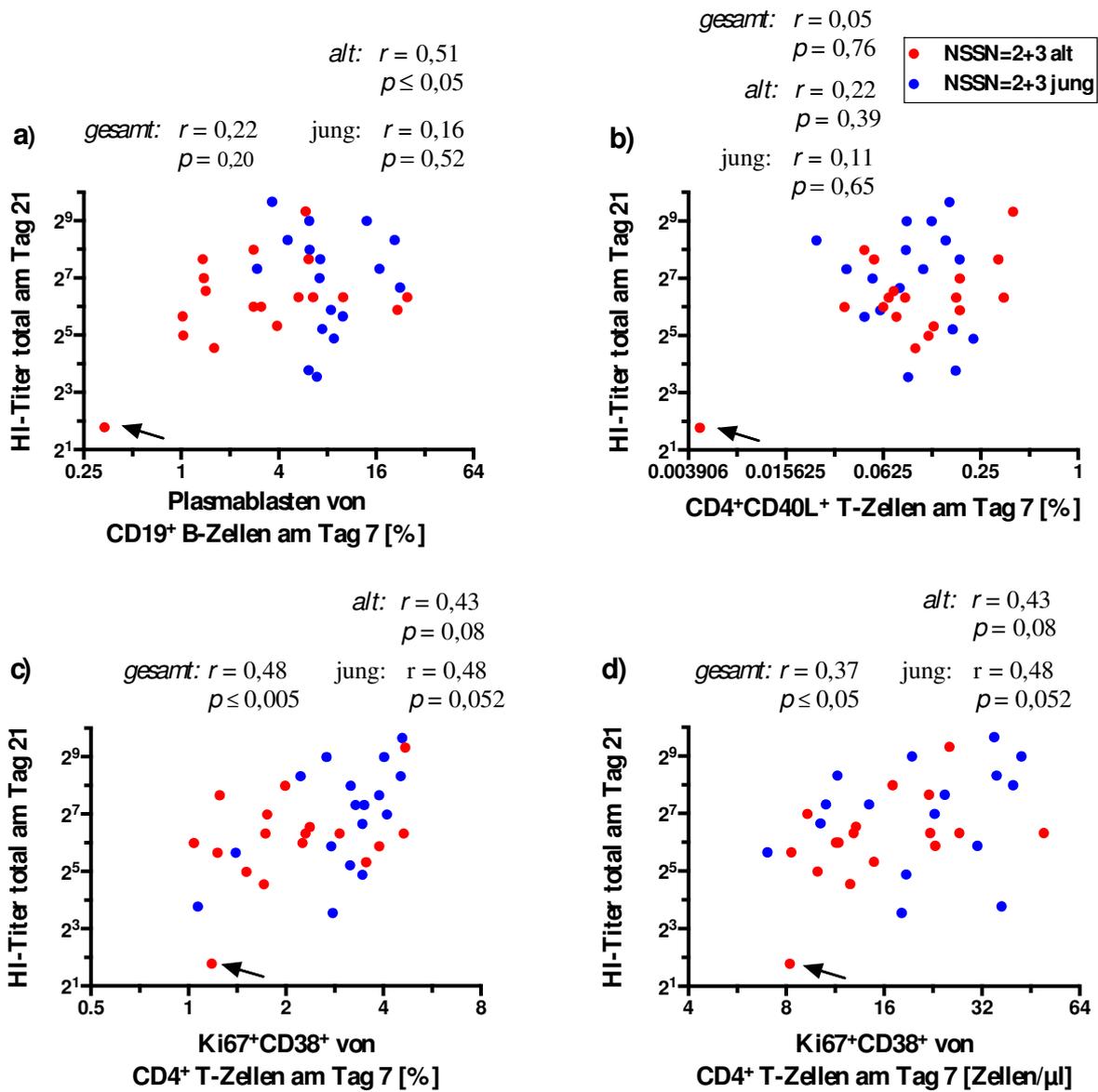


Abb.: 24: Korrelationen mit HI-Titer und einzelnen Zellpopulationen. Verwendet wurde das Geometrische Mittel aller drei HI-Titer A/California/H1N1, Brisbane und Perth/H3N2 am Tag 21. Analysiert wurde die NSSN=2+3 Gruppe. Gezeigt werden konnte, dass zwischen dem HI-Titer und den **a)** Plasmablasten oder den **b)** antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen am Höhepunkt Tag 7 keine Zusammenhänge bestehen. **c)** Es besteht aber eine Korrelation zwischen dem HI-Titer und dem Replikationsmarker Ki-67⁺CD4⁺ in Prozent ($r = 0,48$, $p \leq 0,005$), wie auch **d)** in der Zellzahl ($r = 0,37$, $p \leq 0,05$) am Tag 7. Ein älterer Proband (schwarzer Pfeil) zeigt einen niedrigen HI-Titer und entsprechend niedrige Anteile an alle abgebildeten Zellpopulationen.

3.10 Protektiver Immunschutz

Zum Abschluss der Untersuchungen wurde der entwickelte Immunschutz gegen die einzelnen Stämme der NSSN=2+3 Gruppe in Bezug auf die einzelnen Zellpopulationen genauer analysiert. Ein protektiver Immunschutz (Prot = *protected*) wurde mit einem HI-Titer über 40 bei allen drei Stämmen California/H1N1, Brisbane und Perth/H3N2 am Tag 21 definiert. 54% der Probanden der NSSN=2+3 Gruppe entwickelten einen protektiven Immunschutz gegen alle drei Influenzastämme (NSSN Prot 3, n=19). 28% zeigten gegen zwei Stämme (NSSN Prot 2, n=10) und 14% für einen Stamm (NSSN Prot 1, n=5) einen Immunschutz. Lediglich ein Proband bildete keinen Schutz gegen alle drei Stämme aus (NSSN Prot 0, n=1). Dieser bereits aufgefallene, ältere Proband mit der Kennung 07ReBr wurde näher hinsichtlich der zellulären Immunantwort und ihrer Kinetik untersucht. Der Verlauf der antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen bei 07ReBr verhielt sich gegensätzlich im Vergleich zu den anderen Probanden. Bereits am Tag 0 hatte 07ReBr weniger antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen als die anderen Probanden. Die besondere Auffälligkeit findet sich jedoch am Tag 7, als die antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen auf nahe 0% und 0 Zellen pro μ L fielen. Ein weiterer, wenn auch nicht annähernd so starker Abfall, fand am Tag 17 statt. Alle anderen Probandengruppen (NSSN Prot 2, 3) zeigten einen identischen Verlauf mit einer Aktivierung der antigenspezifischen CD4⁺ CD40L⁺ T-Zellen am Tag 7 (Abb. 25a). Ein ähnlicher Verlauf war bei den Plasmablasten zu beobachten. 07ReBr hatte kaum Plasmablasten über die gesamten Studientage ausgebildet, obwohl er mit einer hohen Anzahl an Zellen und sogar einem höheren prozentuellen Anteil gestartet war (Abb. 25b). Der Replikationsmarker Ki-67⁺CD4⁺ war im Vergleich zu NSSN Prot 2 und 3 vermindert aktiviert. Neben 07ReBr ist ebenfalls NSSN Prot 1 im Vergleich zu den anderen Probanden aufgefallen. Der Anteil der aktivierten antigenspezifischen CD4⁺ CD40L⁺ T-Zellen am Tag 7 war prozentuell am höchsten, zudem bestand eine niedrige Anzahl an Plasmablasten und kaum eine Ausbildung von Ki67⁺/CD4⁺ im Vergleich zu NSSN Prot 2 und 3 (Abb. 25a-f).

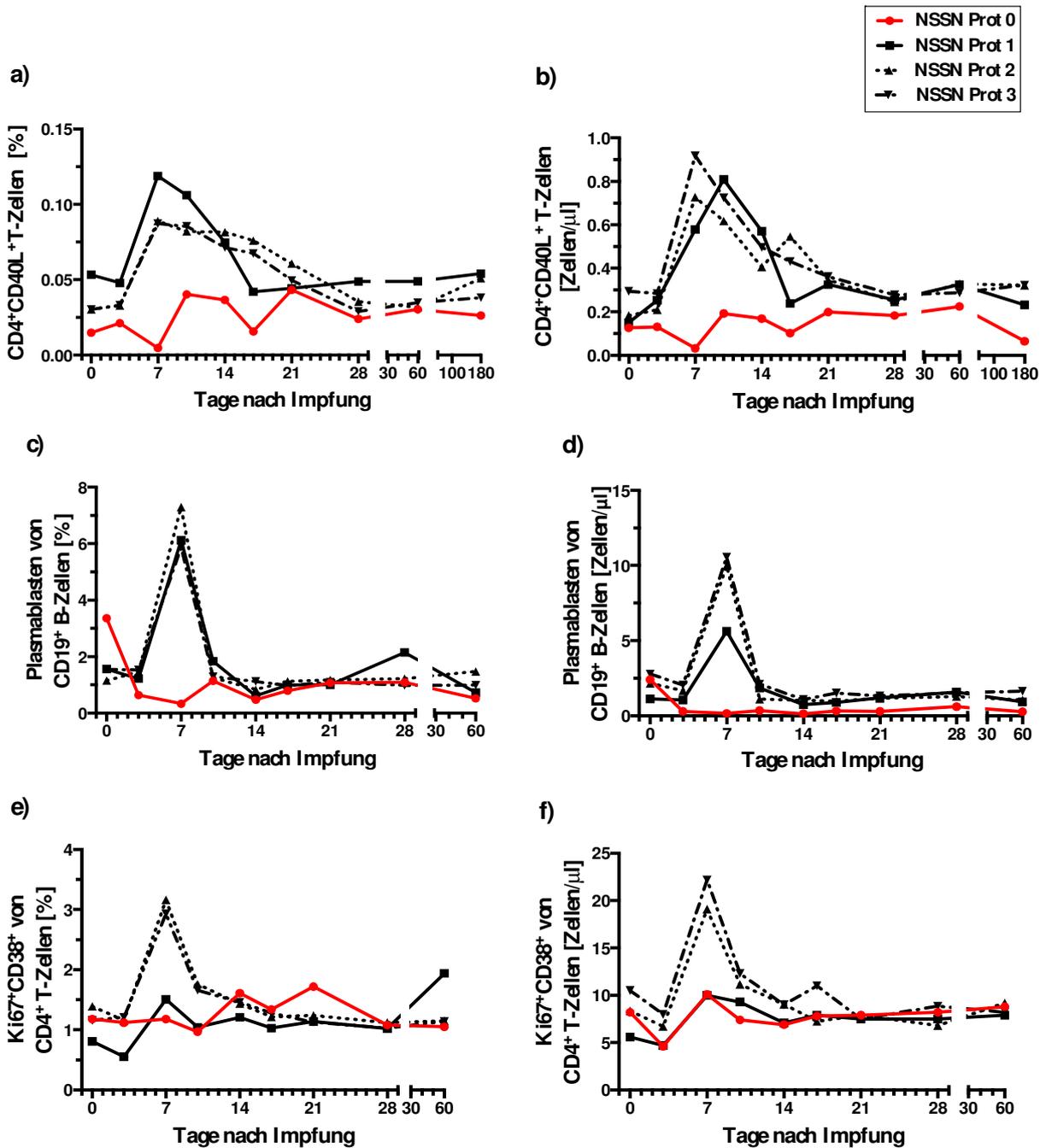


Abb. 25: Protektiver Immunschutz und seine Zellpopulationen. Betrachtet wurde die NSSN=2+3 Gruppe und deren ausgebildeter Immunschutz gegen die jeweiligen Stämme. Prot steht für *protected* und ist mit einem HI-Titer über 40 am Tag 21 definiert. Die Zahl steht für die Anzahl an schützender Immunantwort gegen die drei Stämme California, Brisbane und Perth. So bedeutet NSSN Prot 3 (n=19) einen Immunschutz gegen alle drei Stämme, NSSN Prot 2 (n=10) gegen zwei Stämme, NSSN Prot 1 (n=5) gegen einem Stamm und NSSN Prot 0 (n=1) gegen keinem Stamm. Der Proband 07ReBr, der keinen Schutz gegen die drei Stämme hat, zeigt in allen Abbildungen a) – f) eine verminderte Ausbildung aller Zellpopulationen (antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen, Plasmablasten und Ki-67). Abgebildet ist nur der Median. Aufgrund nur eines einzigen nicht-geschützten Probanden konnten keine statistischen Vergleichstests durchgeführt werden.

4 Diskussion

Die alljährliche Influenzaimpfung dient dem Schutz vor saisonalen Influenzainfektionen. Es besteht jedoch die Herausforderung, einen Schutz für alle Altersgruppen zu gewährleisten. Insbesondere bei der älteren Bevölkerung ab dem 60. Lebensjahr fällt der Schutz vor Influenzainfektionen geringer aus. Nach der aktuellen Studienlage liegt die Ursache vermutlich in den altersbedingten Veränderungen in der Immunantwort (Goodwin et al., 2006). Zusätzlich scheint die bereits ausgebildete Immunität gegen die aktuellen Influenzastämme durch natürliche Infektionen von Bedeutung zu sein. Neben der Altersabhängigkeit wurde als ein neuer Aspekt, die Stamm-Spezifität (NSSN-Spezifität) der Influenzaviren hinzugefügt. Die NSSN-Spezifität (*number of strain sero-negative*) entspricht der Anzahl an seronegativen Influenzastämmen zum Zeitpunkt vor der Impfung.

Folglich war das Ziel dieser Arbeit die Analyse von alters-, sowie NSSN-spezifischen Veränderungen der Immunantwort nach der Impfung mit einem trivalenten inaktivierten Influenza-Impfstoff (TIV), Mutagrip 2011/2012 in zwei verschiedenen Altersgruppen durchzuführen. Im Fokus standen dabei nicht nur das Alter, sondern auch die Probanden mit einer seronegativen Baseline zu A/California/H1N1 (NSN=2+3). Alle Probanden waren in den letzten zwei Jahren nicht gegen die Schweinegrippe geimpft worden. Damit der Organismus die neuen Krankheitserreger spezifisch zu erkennen lernt und gegen diese effektiv zu reagieren, wird im gesunden und jungen Organismus das adaptive Immunsystem entsprechend aktiviert. Sowohl humorale als auch zelluläre Immunantwort des adaptiven Immunsystems sind Schwerpunkte dieser vorliegenden Arbeit. Eine zentrale Bedeutung wird den CD4⁺ T-Zellen in der aktuellen Forschung beigemessen (Wilkinson et al., 2012), so dass das Augenmerk der Analyse auf unspezifische und antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen gerichtet ist und deren Auswirkungen auf das Alter und die NSSN-Spezifität, sowie ihre Auswirkungen auf die protektive Immunität.

4.1 Serologische Immunantwort

Klassischerweise stellen die gebildeten neutralisierenden Antikörper gegen das HA-Molekül einen wichtigen Immunschutz gegen Influenzainfektionen dar (Siegel et al., 1945; de Jong et al., 2003). Die Höhe des Antikörperanstiegs nach der Impfung reduziert das Risiko einer Infektion bei guter Übereinstimmung der Antigenkombination mit den zirkulierenden Stämmen

(<http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/impfen.html>). Dabei ist entscheidend, dass der Impfstoff möglichst bei allen Geimpften eine protektive Antwort entwickelt. Jedoch zeigt die Influenzaimpfung nur bei 30 bis 50% der älteren Menschen Wirksamkeit (Murasko et al., 2001), da mehreren Studien zufolge ältere Menschen einen geringeren Antikörperanstieg nach der Influenzaimpfung entwickelten (Keren et al., 1988; Beyer et al., 1989; Bernstein et al., 1999). Auch die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass die älteren Probanden einen geringeren HI-Titer nur für den Stamm A/California/H1N1 ausgebildet haben im Gegensatz zu den jüngeren Probanden. Für die Stämme B/Brisbane und A/Perth/H3N2 waren dagegen keine Unterschiede in den Altersgruppen zu verzeichnen. Der Grund dafür könnten mögliche natürliche Infektionen mit verschiedenen Influenzaviren in der Vorgeschichte sein, so dass eine Immunität zu verschiedenen Influenzaantigenen bestand. Daher konnten die vorhandenen Antikörper sich an die neuen Influenzaviren binden und mit ihnen kreuzreagieren (He et al., 2011; Xie et al., 2011). Für den Stamm A/California/H1N1 bestand dagegen wahrscheinlich kaum bzw. keine Kreuzreaktion, da insbesondere die älteren Probanden keinen ausreichenden Schutz nach der Impfung entwickelt haben. Dies deckt sich mit der Aussage von Katz et al. (2009). Die Ergebnisse zeigten keine Erhöhung der Kreuzreaktivität zum neuen Stamm H1N1 bei älteren Probanden über 60 Jahren nach der Impfung. Dennoch wird vermutet, dass insbesondere Personen ab dem 60. Lebensjahr eine bestehende Immunität zu diesem Stamm ausgebildet haben könnten aufgrund natürlicher Infektionen (Katz et al., 2009). Fox et al. (2014) diskutieren über die vorbestehende Immunität für H3N2 und Influenza B durch einen bereits bestehenden hohen HI-Titer aufgrund natürlich vorkommender Infektionen. Sie schlussfolgern, dass der vorhandene hohe HI-Titer das Risiko einer Infektion reduziert, was jedoch nicht auf den H1N1 Stamm zu trifft. Trotz geringer Detektion des HI-Titers für A/California/H1N1 wurde ein wirksamer Immunschutz für H1N1 Infektion mit höherem Alter und früheren H1N1-Infektionen in Verbindung gebracht. Daher besteht die Notwendigkeit die HI-Titer Bestimmung im Rahmen der Influenzaimpfung näher zu erforschen. Beispielsweise wurde in den ersten Publikationen über die Korrelation der HI-Titer und der Wirksamkeit der Influenzaimpfung der Stamm A/California/H1N1 gar nicht berücksichtigt (Hobson et al., 1972; Dowdle et al., 1973; McDonald et al., 1962), da der Stamm H1N1 nach seinem letzten Auftreten im Jahre 1951/52 für über 20 Jahre nicht in Erscheinung getreten war. Ein weiterer Einwand der Bestimmung des HI-Titers ist, dass ältere Menschen anfälliger für Influenzainfektionen sind, trotz eines scheinbar protektiven Immunschutzes (HI-Titer > 40) nach Influenzaimpfung (Murasko et al., 2002). In

einer Studie entwickelten 72 von 400 geimpften älteren Probanden eine im Labor bestätigte Influenzainfektion. 60% dieser 72 Probanden hatten nach Impfung einen HI-Titer von über 40 und 31% einen HI-Titer von über 640 (Gravenstein et al., 1994). So entspricht ein Antikörperanstieg nicht unbedingt einem klinischem Immunschutz (McEhaney, 2011). Schlussfolgernd kann man sagen, dass der HI-Titer kritisch zu betrachten ist und nicht als alleiniger Faktor zur Bestimmung des Immunschutzes in Betracht gezogen werden kann (Ohmit et al., 2011). Dem zu Folge sollten zusätzliche Parameter (Plasmablasten, Ki-67, CD4⁺ T-Zellen) betrachtet werden.

4.2 Plasmablasten als Marker zur Bestätigung der humoralen Immunantwort

Die Quantität der humoralen Antwort ist bestimmt durch die Anzahl der Antikörpersezernierenden Zellen (ASC) und die Anzahl der Antikörper jeder einzelnen ASC, während die Qualität von den Komponenten der Immunglobuline abhängt (Sasaki et al., 2011). Die zu den ASC gehörenden Plasmablasten zeigen einen konstanten Verlauf nach Impfung jeglicher Art. Dabei ist die primäre von der sekundären Immunantwort zu unterscheiden. Bei der primären bzw. naiven Immunantwort verläuft die Reaktion nach dem Erstkontakt mit dem Antigen verzögert ab. Blanchard-Rohner et al. (2009) beobachteten die in Erscheinung tretenden Plasmablasten im peripheren Blut am Tag 10 nach einer „single shot“ Tollwut-Impfung. In einer Gelbfieberimpfstudie wurde der Höhepunkt der Plasmablasten am Tag 14 detektiert (Kohler et al., 2012). Dabei handelte es sich um „naive“ Patienten, die bisher keinen Kontakt mit dem Antigen hatten. Daher verläuft die primäre Immunisierung („Priming“) verzögert ab im Vergleich zu der sekundären Immunreaktion, welche viel schneller und spezifischer abläuft. Die Patienten, die bereits einen Antigenkontakt z.B. durch eine bereits vorhandene Impfung oder durchgemachte Infektionen besaßen, entwickelten bereits am Tag 7 den Höchstpunkt der Plasmablastenbildung nach einer erneuten Impfung mit einem identischen Antigen (Blanchard-Rohner et al., 2009). Beobachtet wurde dies bei der Impfung gegen Tetanus (Qian et al., 2010). Das Ergebnis unserer Studie betätigte den Verlauf der Plasmablasten mit dem Höchstpunkt am Tag 7 im peripheren Blut. Dies würde für einen erneuten Kontakt mit bereits bekannten Antigenen durch natürliche Infektionen, in dem Fall B/Brisbane und A/Perth/H3N2 sprechen. Ein weiteres Merkmal der sekundären Immunantwort ist die Sezernierung spezifischer IgGs von

den B-Gedächtniszellen nach dem Isotypenswitch der Antikörper (Fink et al., 2012). Dies wurde allerdings in dieser Studie nicht untersucht. Die in dieser Arbeit beobachteten altersspezifischen Unterschiede in der Bildung von Plasmablasten am Tag 7 zeigten signifikant verminderte Werte bei älteren Probanden im Vergleich zu den jüngeren Probanden. Begründet kann dies durch eine verminderte Quantität der ACS bei den älteren Probanden (Sasaki et al., 2011). Des Weiteren zeigten sich tendenzielle Unterschiede zwischen den NSSN-Gruppen. Die seropositiven Probanden zu allen Stämmen (NSSN=0) zeigten eine verminderte Plasmablastenbildung, da wahrscheinlich bereits ein Repertoire an Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen bestand. Die Probanden mit negativer serologischer Baseline A/California/H1N1 (NSSN=2+3) zeigten dagegen Indizien einer gemischten primären und sekundären Immunantwort. Dies lag an der Verabreichung der Impfstoffkombination aller drei Stämme, wobei zwei Virusstämme H3N2 und Influenza B sich bereits länger in Zirkulation befanden.

Insgesamt kann man sagen, dass die Betrachtung der Plasmablasten am Tag 7 ein geeigneter Anhaltspunkt sein könnte, um eine Aussage über den protektiven Immunschutz in Altersabhängigkeit zu geben. Genauere Aussagen würden sicherlich Messungen stammspezifischer Plasmablasten zulassen. Dies wurde allerdings in unserer Studie nicht untersucht.

4.3 Die absoluten CD4⁺ T-Zellzahlen

Die Interaktion der T-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems, insbesondere mit B-Zellen spielt eine wichtige Rolle. Ausserdem ist die Ausbildung der Funktion der T-Zellen im Rahmen der Impfung von Relevanz. Der genauere Zusammenhang zwischen der T-Zell-Immunität und dem Immunschutz ist noch ein Gegenstand aktueller Forschung. Wir untersuchten die Kinetik und Funktion der CD4⁺ T-Zellen im Hinblick auf die Alters- und NSSN-Spezifität, um die Bedeutung dieser Faktoren besser zu verstehen. Als ersten Schritt betrachten wir die absolute CD4⁺ T-Zellanzahl. Es zeigten sich über den Zeitverlauf weder alters- noch NSSN-spezifische Unterschiede. Es ist jedoch auffallend, dass ältere Probanden mit seronegativer Baseline zu A/California/H1N1 (NSSN=2+3) eine signifikant verminderte Anzahl an CD4⁺ T-Zellen an bestimmten Tagen im Vergleich zu älteren Probanden der Gruppe NSSN=0 zeigten. Dies könnte ein Zufallsbefund sein oder aber im Zusammenhang mit einem verminderten Immunschutz stehen. In einer Studie konnte bereits eine verringerte absolute CD4⁺ T-Zellzahl nach Gabe eines

monovalenten Influenzaimpfstoffes A(H1N)pdm09 bei kontrollierten HIV-Patienten, welche einen verminderten Immunschutz entwickelten, gezeigt werden (Yang et al., 2013).

4.4 Phänotypisierung der CD4⁺ T-Zellen in T_{NC} und T_{CM}

Um ein besseres Verständnis der T-Zell Population nach der Impfung zu erlangen, betrachteten wir die unterschiedlichen Subpopulationen der Lymphozyten anhand definierter Expressionsmuster von CCR7 und CD45RA (Sallusto et al., 1999). Anhand dieser Marker konnten weitere Differenzierungen der naiven, zentralen Gedächtnis-, Effektor-Gedächtnis- und terminal differenzierter Effektor-Gedächtnis- CD4⁺ T Zellen erfolgen (Champagnest et al., 2001). In dieser Arbeit sollte insbesondere das Verhalten der naiven T-Zellen (T_{NC}) (CCR7⁺CD45RA⁺) und der zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) (CCR7⁺CD45RA⁻) der CD4⁺ T-Zellen nach der Impfung genauer betrachtet werden. Da CCR7 als Rezeptor für die Migration (*Homing*) der T_{NC} und T_{CM} in die sekundären lymphatischen Organe agiert, erklärt dies die deutliche Bewegung der zwei Subpopulationen im peripheren Blut. Am Tag 3 fand eine deutliche Erhöhung der T_{NC} statt mit einem nachfolgenden Abfall am Tag 7 und mit einem darauffolgenden Höhepunkt am Tag 14. Der Verlauf der T_{CM} verhielt sich umgekehrt, da am Tag 3 ein Abfall und am Tag 7 ein Höhepunkt zu verzeichnen war. Dies würde erklären, dass vermutlich eine verlängerte Expansion und Differenzierung der T_{NC} nach Antigenkontakt in den lymphatischen Organen besteht. Die T-Zellen, die kein passendes Peptid erkennen, werden wahrscheinlich wieder ins Blut geschleust und wandern zu anderen Lymphorganen, um einen zweiten Versuch der Antigenerkennung zu starten. Erkennen die T_{NC} ihr passendes Peptid, proliferieren sie zu Effektorzellen und verlassen den Lymphknoten, um ins Blut zurück zu kehren. Die T_{CM} dagegen reagieren schneller und effizienter als die T_{NC}. Die Aktivierungsschwelle ist herabgesetzt, da bereits ein Antigenkontakt standfand, so dass ohne zeitliche Verzögerung ihre Funktion ausgebildet wird. Um eine genaue Erklärung der Zirkulation der Lymphozyten zwischen Blut und lymphatischen Gewebe zu beschreiben, stellt sich die Frage, ob das periphere Blut grundsätzlich geeignet ist zur Beantwortung dieser Frage. Viele Lymphozyten zirkulieren in Lymphgefäßen und wandern ins befallene lymphatische Gewebe. Dazu zählen neben den Lymphnoten und der Milz, Mukosa-assoziiertes Gewebe (*mucosa associated lymphoid tissue* = MALT) in der Lunge, im Magen und in der Haut. Bei der weiteren Betrachtung der altersabhängigen Unterschiede der T_{NC} und T_{CM} zeigten ältere Probanden einen

deutlich verminderten Anteil an T_{NC} , jedoch keine wie zu erwartende gegenteilige Erhöhung der T_{CM} der $CD4^+$ T-Zellen im Zeitverlauf. Allerdings stellten wir fest, dass der ins Verhältnis gesetzte Ausgangswert vom Tag 0 zu den Werten der einzelnen Studientagen der beiden Subpopulationen keine Unterschiede weder für T_{NC} noch für T_{CM} in der Kinetik aufzeigten. Dieses Resultat legt nahe, dass die gesehenen altersspezifischen Unterschiede der T_{NC} lediglich von der Baseline bzw. dem Ausgangswert am Tag 0 abhängig waren. Studien belegen die herabgesetzte Anzahl der naiven T-Zellen und eine Erhöhung der Gedächtniszellen im Zusammenhang mit dem Alter oder einer Thymusunterfunktion (Akbar & Fletcher, 2005; Dorshkind et al., 2009; Linton et al., 2004). Da signifikante Unterschiede der beiden Subpopulationen am Tag 0 zwischen beiden Altersgruppen bestanden, gehen wir davon aus, dass dies auf die Rückbildung des Thymus (Involution) zurückzuführen ist (Aspinall & Andrew, 2000; Zhou & McElhaney, 2011).

4.5 Proliferationsmarker Ki-67

Der monoklonale Antikörper Ki-67 erkennt ein nukleäres Antigen, das in aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) exprimiert wird. Da Ki-67 in der G0-Phase von ruhenden Zellen fehlt, ist es ein guter Marker zur Bestimmung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation (Gerdes et al., 1983). Daher ist Ki-67 ein häufig verwendeter Proliferationsmarker in der pathologischen Routinediagnostik. Obwohl die Funktion des Ki-67 nicht genau bekannt ist, besteht eine Verknüpfung der Ki-67 Expression mit der Zellproliferation (Scholzen et al., 2000). Um in unserer Studie die proliferierenden $CD4^+$ T-Zellen zu analysieren, setzten wir zusätzlich zu Ki-67 den Aktivierungsmarker CD38 ein. Das Transmembranmolekül CD38 ist ein multifunktionales Protein, das sich in gesteigertem Maße auf der Zelloberfläche der aktivierten Lymphozyten findet und starke Wachstums- und Differenzierungssignale an Zellen senden kann (Franco et al., 1998; Mehta et al., 1996). In unseren Untersuchungen zeigten beide Marker den Höhepunkt der Proliferation am Tag 7, während an allen anderen Studientagen nur geringe Werte bestanden. Diese Ergebnisse stehen in Konkordanz zu Wilkinson et al. (Wilkinson et al., 2012). In dessen Studie wurden PBMCs von H1N1-positiven Probanden generiert, um die Kinetik der $CD38^+Ki-67^+$ der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu untersuchen. Beide Marker zeigten eine Aktivierung am Tag 7. Der Abfall der beiden Marker auf das Niveau der Ausgangswerte konnte allerdings erst ab Tag 28 verzeichnet werden. In einer anderen Studie wurde der Höchstpunkt

zwischen Tag 4 und Tag 6 und ein Rückgang zwischen Tag 9 und Tag 10 beschrieben (Li et al., 2012). Da in unserer Studie keine Untersuchungen zwischen Tag 3 und Tag 7 durchgeführt wurden, kann keine genaue Aussage über einen womöglich anderen Höhepunkt als am Tag 7 gemacht werden. Nichtsdestotrotz konnten wir signifikante altersspezifische Unterschiede am Tag 7 unabhängig von der NMSN-Spezifität zeigen. Die älteren Probanden aller Gruppen (alt vs. jung; NMSN=0 alt vs. NMSN=0 jung; NMSN=2+3 alt vs. NMSN=2+3 jung) zeigten einen verminderten prozentuellen Anteil von CD38⁺Ki-67⁺ der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den jüngeren Probanden. Das Ergebnis verminderter Expansion des Proliferationsmarker Ki-67 bei älteren Probanden legt nahe, dass ein Zusammenhang mit der Immunoseneszenz bestehen müsste. Da es bis dato keine Forschungsergebnisse zu diesem Thema und somit keine Literatur gibt, können nur Vermutungen angestellt werden. Eine mögliche Erklärung der verminderten Expansion des Ki-67 bei älteren Probanden könnte in einer veränderten Proteinstruktur aufgrund hoher Produktion freier Radikaler, mit einer abnehmender Produktion von Radikalfängern liegen. Im höheren Alter werden die Proteine und andere Zellkomponente durch die Oxidationen geschädigt und dadurch ihre Funktionen entsprechend gehemmt (Harman, 2006). Des weiteren werden mit jeder Zellteilung die Enden der Chromosomen, bestehend aus repetitiver DNA und Proteinen verkürzt, so dass die Telomerverkürzung im Alter zu Wachstumstopp und programmiertem Zelltod führt (Mayer et al., 2006). In der Literatur wird ebenfalls ein enger Zusammenhang zwischen der Telomerverkürzung und der Funktion der T-Zellen beschrieben (Effros et al., 2005).

4.6 NMSN-abhängige antigenspezifische CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen

Zur Beurteilung der Funktionalität der CD4⁺ T-Zellen nach der Influenzaimpfung führten wir eine *in vitro*-6h-Stimulation durch. Hierfür verwendetes Vollblut wurde mit TIV (Mutagrip 2011/12) inkubiert, um möglichst eine physiologische Antigenpräsentation des saisonalen Virus zu gewährleisten. Mit Hilfe der multiparametrischen Durchflusszytometrie konnten die durch die Stimulation aktivierten CD4⁺ T-Zellen und ihre Zytokinproduktion identifiziert werden. Aus unserer Analyse geht hervor, dass bei der Betrachtung aller CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen die Höhepunkte am Tag 7 und Tag 10 zu verzeichnen waren. Dabei ist es aufgefallen, dass die älteren Probanden den Höhepunkt schon am Tag 7 und die jüngeren Probanden dagegen erst am Tag 10 besaßen. Als Ursache für die frühere Expansion der CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen wäre die zu

Diskussion

erwartende Gedächtnisantwort bei älteren Probanden zu vermuten. Insgesamt sahen wir keine signifikante Altersspezifität, allerdings eine NSSN-Spezifität in der Kinetik der T-Zellen. Am Höchstpunkt Tag 10 bestand eine signifikante prozentuale Erhöhung der antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen der Gruppe NSSN=2+3 im Vergleich zu der Gruppe NSSN=0. Die Probanden mit seronegativer Baseline zu A/California/H1N1 zeigten somit eine höhere Aktivierung der antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen als die Probanden mit einem vorherigen Kontakt zu allen drei Stämmen. Schmidt et al. beschrieben eine ähnliche Übereinstimmung einer Erhöhung antigenspezifischer CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen (4,6-fache Erhöhung) nach einer Woche nach Verabreichung der Impfung mit pdmH1N1 (Pandemrix) bei Probanden ohne vorherigen Influenzaimpfungen. Die Probanden, die bereits eine Impfung in der Vergangenheit erhielten, zeigten dagegen eine geringere Induktion antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen (2,7-fache Erhöhung) (Schmidt, 2012). Yang et al. bestätigten ebenfalls diese Ergebnisse mit der Expansion der T-Zellen nach der Erkennung der H1N1/09 HA Epitope im Vergleich zu den bereits vorhandenen, sogenannten „konservierten“ Epitopen (Yang et al., 2013). Die Probanden mit bereits vorhandenem Antigen-Kontakt zu allen drei Stämmen besaßen somit eine verminderte Aktivierung der antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen im Vergleich zu den Probanden mit seronegativer Baseline zu A/California/H1N1. Die verminderte Aktivierung der antigenspezifischen CD4⁺ CD40L⁺ T-Zellen könnte begründet sein in einen vorhandenen immunologischen Gedächtnis oder einer erhöhten Kreuzreaktivität zu den verschiedenen Influenzastämmen. Die Kreuzreaktivität scheint besonders in der zellulären Immunität eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Unterscheidung liegt in der Antigenerkennung. Während die T-Zellen nur kleine, fragmentierte Antigenpeptide an den MHC-Molekülen der APCs erkennen, erkennen die Antikörper der B-Zellen komplexe Epitope und sind dadurch sensibler für die verschiedenen Virusstämme. Greenbaum et al. (2009) waren der Meinung, dass in der Bevölkerung einige einen gewissen Immunschutz durch natürliche Infektionen im Hinblick auf die ausgebrochene Schweinegrippe A/H1N1 im Jahre 2009 hatten. Die untersuchte Immunantwort richtete sich gegen 31% konservierte B-Zell- und 41% konservierte T-Zell Epitope des neuen Stammes. Ein weiterer Aspekt ist der Zusammenhang zwischen der zellulären Immunität und der Protektivität. In aktuellsten Studien konnten bereits eine Relation zwischen CD4⁺ T-Zellen und einer geringeren Ausprägung der Erkrankung gezeigt werden (Wilkinson et al., 2012; Sidhar et al., 2013). Des Weiteren ist bei der Aktivierung der antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen bei Probanden, welche keinen vorherigen Kontakt zu A/California/H1N1

gehabt haben, die Rolle der CD4⁺ T-Zellen als zytotoxische Zelle zu diskutieren. Die Aufgabe einer CD4⁺ T-Zelle ist zwar als zytotoxische Zelle wenig bekannt, da vielmehr die CD8⁺ T-Zellen die zytotoxische T-Zellen sind, welche durch die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen die Pathogene zerstören. Allerdings zeigte eine Studie bei gesunden Spendern eine geringe Anzahl an zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen, während eine erhöhte Anzahl der Zellen bei chronischen viralen Infektionen gemessen wurde (Appay, 2002). Dies würde bedeuten, dass die CD4⁺ T-Zellen nicht nur als eine Helferzelle fungieren, um spezialisierte T-Helfer-Zellen zu bilden, sondern auch eine zytotoxische Aktivität ausüben (Wilkinson, 2012). Ausserdem stellt sich die Frage, ob die CD4⁺ T-Zellen eine mögliche protektive Wirkung besitzen, was bisher nur in *in-vitro* Studien durchgeführt wurde. Beispielsweise wurde die Kreuzaktivierung der CD4⁺ T-Zellen aufgrund neuer Stämme, wie beispielsweise der Vogelgrippe H5N1, demonstriert (Lee et al., 2008; Roti et al., 2008).

4.7 Zytokinprofil der antigenspezifischer CD4⁺ CD40L⁺ T-Zellen

Um ein tieferes Verständnis der Funktion der aktivierten antigenspezifischen CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen in Bezug auf die Altersspezifität zu erlangen, betrachteten wir das Zytokinprofil der älteren und jüngeren Probanden mit seronegativer Baseline zu A/California/H1N1 (NSSN=2+3). Der Hauptanteil der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α entfiel auf die T-Helferzellen Typ 1 (T_H1). Insbesondere auf die Frequenz der IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen wird häufiger zurückgegriffen, um den Immunschutz nach der Impfung beurteilen zu können, da IFN- γ eine Relevanz bei der Kontrolle und Beseitigung bakterieller und viraler Infektionen hat (Flynn et al., 1993; Wang et al., 1994). Ebenso ist TNF- α ein multifunktionales Zytokin, welches fähig ist, zielgerichtete Apoptose einzuleiten sowie die Aktivität anderer Immunzellen zu regeln (Rath et al., 1999). Obwohl das dritte Zytokin IL-2 nur eine geringe direkte Effektorfunktion besitzt, fördert es die Expansion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort. In dieser Arbeit konnte die Immunantwort nach der Influenzaimpfung durch die Aktivierung der drei Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α am Tag 7 und Tag 10 gezeigt werden. In den neunziger Jahren gab es mehrere Untersuchungen über die Zytokinprofile der T_H1 und T_H2 Zellen und deren Effekte auf die Alterung in Menschen und Tieren. Allerdings waren die Ergebnisse dieser Studien uneinheitlich. Einige Studien beschrieben eine Zunahme von IFN- γ Produktion der T-Zellen (Sakata-Kaneko et al., 2000; Yen et al., 2000), andere keine Änderung (Hessen et al., 1991; Sindermann et al., 1993)

oder aber eine Abnahme der $\text{INF-}\gamma$ in der älteren Population (Abb et al., 1984; Karanfilov et al., 1999). In unserer Studie zeigte sich lediglich am Tag 0 ein verminderter $\text{INF-}\gamma$ Anteil der CD40L^+ T-Zellen bei den älteren Probanden im Vergleich zu den jüngeren Probanden. Dies entspricht zum Teil den Analysen von Bernstein et al. (1998), die zusätzlich bei den älteren Probanden eine geringere $\text{INF-}\gamma$ Produktion im weiteren Zeitverlauf beobachteten. Nach unseren Ergebnissen ist die Produktion bei den älteren Probanden vor der Influenzaimpfung zwar vermindert, aber dennoch findet eine ähnliche Produktion von $\text{INF-}\gamma$ bei älteren und jüngeren Probanden im weiteren zeitlichen Verlauf statt. Ebenfalls konnte die von McElhaney et al. (1992) beschriebene geringere IL-2 Produktion vor der Influenzaimpfung bei den älteren Probanden in unserer Studie nicht bestätigt werden. An den beiden Höhepunkten Tag 7 und Tag 10 waren ebenfalls keine Altersunterschiede zu verzeichnen. Es ist aber eine frühere Aktivierung der Zytokine bei den älteren Probanden aufgefallen, welche wahrscheinlich auf die vorbestehende immunologische Gedächtnisantwort zurückzuführen ist. Die Studienlage der IL-4 Produktion von $\text{T}_\text{H}2$ T-Zellen, welche in erster Linie die Effektorfunktionen für den Isotypenswitch von B-Lymphozyten übernehmen, ist ebenfalls inkonsistent. In der älteren Population ist die IL-4 Sekretion höher (Nijhuis et al., 1994), geringer (Karanfilov et al., 1999), oder gleich (Candore et al., 1993) im Vergleich zu der jüngeren Population. Allerdings wurden die mononukleären Zellen aller drei Studien mit Phytohämagglutinin, einem pflanzlichen Eiweiß der Gruppe der Lektine stimuliert. Wir konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede der IL-4 Sekretion zwischen den beiden Altersgruppen im Zeitverlauf nach der Impfung erkennen.

4.8 Polyfunktionalität der T-Zellen

Die Qualität der antigenspezifischen CD4^+ T-Zellen unterscheidet sich von dem Phänotyp oder der Frequenz der T-Zellen und bezieht sich auf eine spezifische Kombination der T-Helfer-Funktionen. Dabei dient als Parameter zur Beschreibung der qualitativen Funktion der T-Zellen die Identifizierung antigenspezifischer CD4^+ T-Zellen hinsichtlich ihres Vermögens zwei oder mehr Zytokine simultan zu bilden. Die hierfür eingesetzte multiparametrische Durchflusszytometrie eignet sich am besten zur Detektion von einfach-, zweifach-, dreifach- oder sogar vierfachproduzierenden T-Zellen. In einigen Modellen konnte bereits eine positive Korrelation der verbesserten Qualität der T-Zell-Antwort mit der Ausbildung einer protektiven Immunantwort gezeigt werden (Seder et al., 2008). Die multifunktionalen Zellen scheinen die

Effektorfunktionen zu optimieren und so einen protektiven Immunschutz auszubilden. Besonders starke Korrelation mit dem Immunschutz zeigte die Sekretion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α bei der Impfung oder nach Erstkontakt mit *Leishmania major* Antigenen im Mausmodell (Darrah et al., 2007). Dabei konnte gezeigt werden, dass die alleinige hohe Produktion von IFN- γ keinen ausreichenden Immunschutz geboten hat, sondern die Kombination von mehreren Zytokinen. Infizierte Mäuse mit *Leishmania major* zeigten insbesondere eine dreifache (IFN- γ^+ IL-2 $^+$ TNF- α^+) und zweifache (IFN- γ^+ TNF- α^+) Zytokinproduktion der T-Zellen. Die in dieser Arbeit untersuchte Polyfunktionalität der CD4 $^+$ CD40L $^+$ T-Zellen zeigte, dass sowohl jüngere als auch ältere Probanden einen hohen Anteil an zweifach- oder dreifachpositiven T-Zellen ausbildeten. Dabei produzierten ältere Probanden einen höheren Anteil an dreifach-positiven T-Zellen (IFN- γ^+ IL-2 $^+$ IL-4 $^-$ TNF- α^+), während die jüngeren einen höheren Anteil an zweifach-positiven T-Zellen (IFN- γ^+ IL-2 $^-$ IL-4 $^-$ TNF- α^+) aufzeigten. Die Daten legen nahe, dass das Alter keinen negativen Effekt auf die Polyfunktionalität der CD4 $^+$ T-Zellen hat und daher ist dies kein wesentlicher Faktor für die im Alter beschriebene Immunosensenz. Dies deckt sich mit der Aussage von van Epps et al. (2014), welche sogar eine höhere Polyfunktionalität von TNF- α und IL-2 der CD4 $^+$ T-Zellen in der älteren Gruppe im Vergleich zu der jüngeren Gruppe nach Stimulation mit Superantigen (SEB) beobachteten.

4.9 Zusammenhänge der einzelnen Zellpopulationen

Eines der Ziele dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, im welchem Zusammenhang die altersspezifischen Veränderungen zu den hier untersuchten Zellpopulationen am Modell der Influenzaimpfung stehen. Von weiterer Relevanz ist der Zusammenhang von Ursachen und Mechanismen der verminderten Immunantwort bei Älteren herauszufinden.

Die bereits im oberen Kapitel beschriebenen zwei Marker, die Plasmablasten, der CD19 $^+$ B-Zellen und der Proliferationsmarker Ki-67, der CD4 $^+$ T-Zellen zeigten altersabhängige Unterschiede und wurden deshalb in Beziehung gesetzt. Diese zeigten eine positive Korrelation in der Gesamtgruppe sowie in der älteren Probandengruppe. Offensichtlich besteht eine vermehrte Proliferation der Plasmablasten bei einem erhöhten Ki-67-Anteil. Dieser Anhaltspunkt wurde bereits in einem Review publiziert (Fink et al., 2012). Eine verminderte Bildung der Plasmablasten bei einem erniedrigten Ki-67-Anteil wurde bei den älteren Probanden in dieser Arbeit beobachtet. Ebenfalls korrelierten in unserer Studie die antigenspezifischen CD4 $^+$ T-

Zellen mit Ki-67, der unspezifischen CD4⁺ T-Zellen sowie mit den Plasmablasten, der CD19⁺ B-Zellen und dies insbesondere bei den älteren Probanden. Es liegt nahe, dass bei einem geringen Anteil an Ki-67 die Expansion der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen geringer ausfällt. Da die T-Zellhilfe dadurch verringert ist, ist ebenso die Aktivierung der B-Zellen vermindert, was eine verminderte Plasmablastenbildung zur Folge hat. Insgesamt sieht man also einen altersabhängigen Zusammenhang von den zwei Zellpopulationen Ki-67 der CD4⁺ T-Zellen und Plasmablasten, der CD19⁺ B-Zellen. Des Weiteren konnten in weiteren Analysen Zusammenhänge zwischen dem geometrisch gemittelten HI-Titer aller drei Influenzastämme und Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Deutlich zu erkennen waren zwei separierte Populationen, wobei die geringe Anzahl der Ki-67 Produzenten auf die älteren Probanden entfallen ist. Die positive Korrelation von Ki-67 und dem HI-Titer steht kontrovers zu der Aussage von Li et al. (2012). Allerdings wurde in dieser Studie eine antigenspezifische Ki-67-Analyse durchgeführt und diese zeigte keine Korrelationen mit existierenden oder geboosterten Antikörper Titern.

4.10 Protektive Immunität

Als Indikator für die Ausbildung eines protektiven Immunschutzes nach der Influenzaimpfung galt ein HI-Titer von über 40 (*protected*) (de Jong et al., 2003; Beyer et al., 2004). Die Probanden mit der seronegativen Baseline zu A/California/H1N1 (NSSN=2+3) wurden hinsichtlich der Protektivität zu den einzelnen Stämmen untersucht. Knapp die Hälfte dieser Probanden entwickelte einen Immunschutz zu allen drei Stämmen. Nur ein Proband mit der Kennung 07ReBr entwickelte gegen alle drei Stämme am Tag 21 keinen protektiven Immunschutz (NSSN Prot 0). Der HI-Titer lag für alle drei Stämme unter 40. Zur Differenzierung der humoralen und zellulären Immunantwort betrachteten wir diesen Probanden (NSSN Prot 0) im Vergleich zu anderen Probanden, die entweder geschützt waren gegen (NSSN Prot 1), gegen zwei (NSSN Prot 2) oder gegen drei (NSSN Prot 3) Stämme. Es ist deutlich aufgefallen, dass 07ReBr eine verminderte Proliferation bzw. Aktivierung aller untersuchten Zellpopulationen hatte. Insgesamt zeigte dieser ältere Proband weder einen schützenden HI-Titer, noch eine CD4⁺ T-Zellaktivierung. Des Weiteren blieben die Plasmablastenbildung und die Ki-67 Expansion am Tag 7 aus. Das Ergebnis zeigte deutliche Veränderungen der humoralen, wie auch der zellulären Immunantwort beim nicht schützenden HI-Titer gegen drei Stämme.

5 Ausblick und Fazit der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war quantitative und qualitative Veränderungen der spezifischen Immunantwort nach Influenzaimpfung bei älteren im Vergleich zu jüngeren Probanden zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur das Alter, sondern auch die NSSN-Spezifität eine Bedeutung für die Immunantwort nach der Influenzaimpfung hat. Bereits mit Hilfe eines Algorithmus anhand der NSSN-Spezifität, dem Alter und der absolute CD4⁺ T-Zellanzahl konnte eine Prädiktion der Immunantwort für A/California/H1N1 in unserer Studie gezeigt werden (Jürchott et al., 2015). Die Relevanz der NSSN-Spezifität hat ggf. neue Möglichkeiten geschaffen, um die protektive Immunkompetenz der zu Impfenden vor der Impfung vorherzusagen. Bestätigt wurde unsere Hypothese durch die NSSN-spezifischen Unterschiede der aktivierten Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Das Alter als ein weiterer Parameter der Immunkompetenz und Immunantwort auf die Impfung konnte insbesondere gut in der Analyse der Plasmablasten, der CD19⁺ B-Zellen und dem Proliferationsmarker Ki-67⁺, der CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden. Da bisher der Proliferationsmarker Ki-67 im Zusammenhang mit der Immunosensenz noch nicht betrachtet wurde, sind weitere Untersuchungen zur Bestätigung der Ergebnisse notwendig. Zusammengefasst ist eine Betrachtung verschiedener Parameter immer notwendig, um eine detaillierte Auskunft über die Immunkompetenz z.B. nach der Influenzaimpfung zu geben. Für weitere Analysen empfiehlt es sich jedoch, die Immunität für die Influenzastämme getrennt zu betrachten, um die Komplexität der Immunreaktion besser aufzuschlüsseln. Zudem wäre es von Vorteil, eine Analyse der Probanden höheren Alters ab dem 65. Lebensjahr durchzuführen, um gegebenenfalls stärkere Effekte der Immunosensenz zu erreichen. Nach Empfehlungen des RKI's werden Influenzaimpfungen mit Adjuvantien ab dem 65. Lebensjahr zur Wirkungsverbesserung verabreicht. Aus diesem Grund war die Rekrutierung ältere Probanden ab dem 65. Lebensjahr in unserer Studie nicht möglich. Dies könnte ein limitierender Faktor dieser Studie sein. Nichtsdestotrotz ist eine Impfung laut der WHO ab dem 60. Lebensjahr und insbesondere für bestimmte Risikogruppen und medizinisches Personal sinnvoll. Dies erfordert eine höhere Impfbereitschaft in der Bevölkerung zum Schutz jedes einzelnen Individuums, welche durch mehr Aufklärung durch Ärzte erzielt werden kann. Ein weiteres anzustrebendes Ziel für die Zukunft ist aber vor allem, einen Impfstoff gegen ein möglichst breites Spektrum von Influenzaviren herzustellen, sowie die Impfung für die insbesondere ältere Bevölkerung zu optimieren.

6 Literaturverzeichnis

- Abb J, Abb H, Deinhardt F. Age-related decline of human interferon alpha and interferon gamma production. *Blut*. 1984; 48: 285–89.
- Akbar AN, Fletcher JM. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 480-485.
- Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, et al. Characterization of CD4+ CTLs Ex Vivo. *The Journal of Immunology*. 2002; 168(11): 5954-8.
- Aspinall R, Andrew D. Thymic involution in aging. *J Clin Immunol*. 2000; 20(4): 250-6.
- Baltimore D. Viral genetic systems. *Trans N Y Acad Sci*. 1971; 33(3): 327-32.
- Banchereau JI, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392(6673):245-52.
- Banchreau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:767-811.
- Bernstein ED, Gardner EM, Abrutyn E , Gross P, Muasko DM. Cytokine production after influenza vaccination in a healthy elderly population. *Vaccine*. 1998; 16(18): 1722-31.
- Bernstein E, Kaye D, Abrutyn E, Gross P, Dorfman M, Murasko DM. Immune response to influenza vaccination in a large healthy elderly population. *Vaccine*. 1999; 17(1): 82-94.
- Beyer WE, Palache AM, Baljet M, Masurel N. Anti- body induction by influenza vaccines in the elderly: a review of the literature. *Vaccine*. 1989; 7: 385-394.
- Beyer WE, Palache AM, Lüchters G, Nauta J, Osterhaus AD. Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? *Virus Res*. 2004; 103(1-2): 125-32.
- Blanchard-Rohner G, Pulickal AS, Jol-van der Zijde CM, Snape MD, Pollard AJ. Appearance of peripheral blood plasma cells and memory B cells in a primary and secondary immune response in humans. *Blood*. 2009; 114(24): 4998-5002.
- Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008; 26 Suppl 4: D49-53.
- Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, van Eden W. T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology*. 2011; 31: 728-29.
- Candore G, Di Lorenzo G, Melluso M, et al. gamma-Interferon, interleukin-4 and interleukin-6 in vitro production in old subjects. *Autoimmunity*. 1993; 16: 275–80.
- Champagne P, Ogg GS, King AS, Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*. 2001; 410(6824): 106-11.

- Couch RB, Bayas JM, Caso C, et al. Superior antigen-specific CD4+ T-cell response with AS03-adjuvantation of a trivalent influenza vaccine in a randomised trial of adults aged 65 and older. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:425.
- Darrah PA, Patel DT, De Luca PM. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med.* 2007; 13(7): 843-50.
- D'Asaro M, Dieli F, Caccamo N, Musso M, Porretto F, Salerno A. Increase of CCR7-CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease. *Leukemia.* 2006; 20(3): 545-7.
- Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 57-62.
- Dowdle WR, Coleman MT, Mostow SR, Kaye HS, Schoenbaum SC. Inactivated influenza vaccines. 2. Laboratory indices of protection. *Postgrad Med J* 1973; 49(569): 159e63.
- Ehl S. Immunologische Grundlagen der Impfung gegen Viren. *Hessisches Ärzteblatt.* 2006; Übernahme aus: *Monatsschrift für Kinderheilkunde* 2005; 153: 1111-22. (Abgerufen am 21. Dezember 2014 von http://www.laekh.de/upload/Hess._Aerzteblatt/2006/2006_03/2006_03_04.pdf).
- Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev.* 2005; 205: 147-57.
- Epidemiologisches Bulletin, Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health, 15. November 2010/Nr. 45. (abgerufen am 24. September 2014 von http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza.html)
- Fink K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front Immunology.* 2012; 3:78.
- Fiore AE1, Shay DK, Haber P, et al. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2007. *MMWR Recomm Rep.* 2007; 56(RR-6): 1-54.
- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* 1993; 178(6): 2249-54.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4(4): 330-6.
- Fox A, Mai LQ, Thanh LT et al. Hemagglutination inhibiting antibodies and protection against seasonal and pandemic influenza infection. *J Infect.* 2014; pii: S0163-4453(14)00282-5.

- Franco L, Guida L, Bruzzone S, Zocchi E, Usai C, De Flora A. The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *FASEB J.* 1998; 12(14):1507-20.
- Frentsch, M., O. Arbach, et al. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med.* 2005; 11(10): 1118-24.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984; 133(4): 1710-5.
- Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol.* 1990; 1(3): 199-206.
- Goodwin K, Viboud C, Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine.* 2006;24(8):1159-69.
- Gravenstein S, Drinka P, Duthie EH et al. Efficacy of an influenza hemagglutinin-diphtheria toxoid conjugate vaccine in elderly nursing home subjects during an influenza outbreak. *J. Am. Geriat. Soc.* 1994; 42(3): 245-251.
- Greenbaum JA, Kotturi MF, Kim Y et al. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(48): 20365-70.
- Grubeck-Loebenstien B, Della Bella S, Iorio AM, Michel JP, Pawelec G, Solana R. Immunosenescence and vaccine failure in the elderly. *Aging Clin Exp Res.* 2009; 21(3): 201-9.
- Hancock K, Veguilla V, Lu X, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med.* 2009; 361(20): 1945–1952.
- Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1067: 10–21.
- He XS, Sasaki S, Narvaez CF, et al., Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. *J Immunol Methods.* 2011; 365(1-2): 67-75.
- Heartland Kidney Network 12/06 QI. Pandemics & Threats 1900–2006. (Abgerufen am 20. Dezember 2014 von http://www.esrdnetwork18.org/pdfs/QI%20-%20Pandemic_Flu/PandFlu_Threats1900to2006.pdf).
- Hessen MT, Kaye D, Murasko DM. Heterogeneous effects of exogenous lymphokines on lymphoproliferation of elderly subjects. *Mech Ageing Dev.* 1991; 58: 61–73.
- Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J Hyg (Lond)* 1972; 70(4): 767e77.

- Jenner E. An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, Or Cow-Pox. 1798. The Three Original Publications on Vaccination Against Smallpox, The Harvard Classics, 1909-14. (Accessed October 23, 2014, at <http://www.bartleby.com/38/4/1.html>).
- de Jong JC, Palache AM, Beyer WE, Rimmelzwaan GF, Boon AC, Osterhaus AD. Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Dev Biol.* 2003; 115: 63-73.
- Jürchott K, Schulz A, Bozzetti C, Rachwalik D. Highly predictive model for response to A(H1N1)pdm2009 influenza strain after seasonal influenza vaccination (will be published 2015 in PlosOne, already reviewed).
- Karanfilov CI, Liu B, Fox CC, Lakshmanan RR, Whisler RL. Age-related defects in Th1 and Th2 cytokine production by human T cells can be dissociated from altered frequencies of CD45RA+ and CD45RO+ T cell subsets. *Mech Ageing Dev.* 1999; 109: 97–112.
- Katz J, Hancock K, Veguilla V et al., Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58(19): 521-4.
- Keren G, Segev S, Morag A, Zakay-Rones Z, Barzilai A, Rubenstein E. Failure of influenza vaccination in the aged. *J. Med. Virol.* 1988; 25: 85-89.
- Kohler S, Bethke N, et al. The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination. *European Journal of Immunology.* 2012; 42(9): 2363-73.
- Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood.* 2009; 113(4):769-774
- Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity.* 2006; 24(2): 133-9.
- Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nishimura H, et al. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J. Virol.* 1999; 73(5): 4413-4426.
- Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004; 5: 133-139.
- LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blodd.* 2008; 112(5): 1570-80.
- Lee LY, Ha do LA, Simmons C et al. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(10), 3478–90.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 233-58.

Literaturverzeichnis

- Li X, Miao H, Henn A, Topham DJ, Wu H, Zand MS, et al. Ki-67 expression reveals strong, transient influenza specific CD4 T cell responses after adult vaccination. *Vaccine*. 2012; 30(31): 4581-4.
- McDonald JC, Zuckerman AJ, Beare AS, Tyrrell DA. Trials of live influenza vaccine in the Royal Air Force. *Br Med J* 1962; 1(5284): 1036e42.
- Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J*. 1996; 10(12): 1408-17.
- Murasko DM, Bernstein ED, Gardner EM, et al. Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Exp Gerontol*. 2002; 37(2-3): 427-39.
- Mayer S, Brüderlein S, Perner S, et al. Sex-specific telomere length profiles and age-dependent erosion dynamics of individual chromosome arms in humans. *Cytogenet Genome Res*. 2006; 112(3-4): 194–201.
- McElhaney JE, Meneilly GS, Beattie BL. et al. The effect of influenza vaccination on IL-2 production in healthy elderly: implications for current vaccination practices. *J. Gerontol*. 1992; 47(1): M3-8.
- McElhaney JE. Influenza vaccine responses in older adults. *Ageing Res Rev*. 2011; 10(3): 379-88.
- Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J: Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch Intern Med* 2000; 160(21): 3243 – 3247.
- Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(12): 823-36.
- Nijhuis EW, Remarque EJ, Hinloopen B, et al. Age-related increase in the fraction of CD27-CD4+ T cells and IL-4 production as a feature of CD4+ T cell differentiation in vivo. *Clin Exp Immunol*. 1994; 96:528–34.
- O'Garra A1, Gabryšová L, Spits H. Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells. *Nat Immunol*. 2011;12(4): 288-94.
- O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature reviews Drug discovery*. 2003; 2(9): 727-35.
- Ohmit SE, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Monto AS. Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection. *J Infect Dis*. 2011; 204(12): 1879-85.
- Parker DC. T Cell-Dependent B Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. 1993; 11: 331-360.

- Pepper M, Jenkins MK, Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol.* 2011; 12(6): 467-71.
- Qian Y, Wei C, Eun-Hyung L, et al. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density- based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2010; 78(Suppl. 1): 69–82.
- Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol.* 1999; 19(6):350-64.
- Reber AJ, Chirkova T, Kim JH, et al. Immunosenescence and Challenges of Vaccination against Influenza in the Aging Population. *Aging Dis.* 2012 Feb; 3(1): 68-90.
- Reperant LA, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Advances in influenza vaccination. *F1000prime reports.* 2014; 6:47.
- Roti M, Yang J, Berger D, Huston L, James EA, Kwok WW. Healthy human subjects have CD4+ T cells directed against H5N1 influenza virus. *J. Immunol.* 2008; 180(3), 1758–68.
- Sakata-Kaneko S, Wakatsuki Y, Matsunaga Y, Usui T, Kita T. Altered Th1/Th2 commitment in human CD4+ T cells with ageing. *Clin Exp Immunol.* 2000; 120:267–73.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999; 401(6754): 708-12.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology.* 2004; 22: 745-63.
- Sasaki S, Sullivan M, Narvaez CF et al. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J. Clin. Invest.* 2011; 121(8): 3109–19.
- Schindler W, Untermann J. Grippe, Kamm und Eulenspiegel. *Festschrift für Elmar Seebold zum 65. Geburtstag.* Berlin/New York 1999; 333-34.
- Schmidt T, Dirks J, Enders M et al., CD4+ T-cell immunity after pandemic influenza vaccination cross-reacts with seasonal antigens and functionally differs from active influenza infection. *Eur J Immunol.* 2012; 42(7): 1755-66.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3): 311-22.
- Sciaky N, Presley J, Smith C, Zaal KJM, et al. Golgi Tubule Traffic and the Effects of Brefeldin A Visualized in Living Cells. *J Cell Biol.* 1997; 139(5): 1137-55.
- Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(4): 247-58.

Literaturverzeichnis

- Sindermann J, Kruse A, Frercks HJ, Schutz RM, Kirchner H. Investigations of the lymphokine system in elderly individuals. *Mech Ageing Dev.* 1993; 70: 149–59.
- Sridhar S, Begom S, Bermingham A et al. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat Med* 2013; 19: 1305–12.
- Sigel MM, Shaffer FW, Kirber M, Light AB, Henle WW. Influenza A in a vaccinated population. *JAMA.* 1948; 136(7): 437-441.
- Soghoian DZ, Streeck H. Cytolytic CD4 (+) T cells in viral immunity. *Expert Rev. Vaccines.* 2010; 9(12): 1453–1463.
- Spadea A, Unim B, Colamesta V, Meneghini A, D'Amici AM, Giudiceandrea B, La Torre G. Is the adjuvanted influenza vaccine more effective than the trivalent inactivated vaccine in the elderly population? Results of a case-control study. *Vaccine.* 2014 Sep; 32(41):5290-5294.
- Statistisches Bundesamt: Lange Reihen: Bevölkerung Deutschlands bis 2060. 12. Koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung, 2012 (Abgerufen am 20.12.2014 von https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Bevoelkerung/VorausberechnungBevoelkerung/BevoelkerungDeutschland2060Presse5124204099004.pdf;jsessionid=DEB845DB194689676EC3134062119524.cae4?__blob=publicationFile).
- Suzuki Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28(3): 399–408.
- Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nature reviews Immunology.* 2012; 12(2): 136-48.
- Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(1): 15-22.
- Van Epps P, Banks R, Aung H, Betts MR, Canaday DH. Age-related differences in polyfunctional T cell responses. *Immunity & Ageing* 2014; 11:14.
- Van Zelm MC. B cells take their time: sequential IgG class switching over the course of an immune response? *Immunol Cell Biol.* 2014; 92(8): 645-6.
- Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med.* 1994; 179(4): 1367-71.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and Ecology of Influenza A viruses. *Microbiology Review.* 1992; 56(1): 152-79.

- Weksler ME, Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine*. 2000; 18(16): 1624-8.
- Wilkinson TM, Li CK, Chui CS, Huang AK, Perkins M, Liebner JC, et al. Preexisting influenza specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nature medicine*. 2012; 18(2): 274-80.
- Willi K Born, M Kemal Aydintug, Rebecca L O'Brien. Diversity of $\gamma\delta$ T-cell antigens. *Cell Mol Immunol*. 2013; 10(1): 13–20.
- Xie H, Jing X, Li X, Lin Z, Plant E, Zoueva O, Yang H, Ye Z. Immunogenicity and cross-reactivity of 2009-2010 inactivated seasonal influenza vaccine in US adults and elderly. *PLoS One*. 2011; 6(1): e16650.
- Yamane H, Paul WE. Cytokines of the $\gamma(c)$ family control CD4+ T cell differentiation and function. *Nat Immunol*. 2012; 13(11): 1037-44.
- Yang J, James E, Gates TJ, et al. CD4+ T cells recognize unique and conserved 2009 H1N1 influenza hemagglutinin epitopes after natural infection and vaccination. *International immunology*. 2013; 25(8): 447-57.
- Yen CJ, Lin SL, Huang KT, Lin RH. Age-associated changes in interferon-gamma and interleukin-4 secretion by purified human CD4+ and CD8+ T cells. *J Biomed Sci*. 2000; 7: 317–21.
- Zhu J1, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. 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*. 2006; 16(1): 3-10.
- Zhou X, McElhaney JE. n in memory and effector T cells responding to influenza A/H3N2 and pandemic A/h1N1 strains in humans. *Vaccine*. 2011; 29(11): 2169-77.
- Das Testprinzip der Durchflusszytometrie. Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam MVZ GbR (Abgerufen am 21.12.2014 von <http://www.inflammatio.de/en/clinical-trials/cell-analyses-by-facs/das-testprinzip-der-durchflusszytometrie.html>).
- Fluorescence Tutorials von Life Technologies (Abgerufen am 01.03.2015 von (<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/support/tutorials.html>)).
- Impfen. Informationsangebot vom Robert-Koch-Institut. (Abgerufen am 20.12.2014 von <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/impfen.html>).
- Influenza (Seasonal). World Health Organization. (Abgerufen am 02.01.2015 von <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en>)

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, **Dominika Rachwalik**, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Charakterisierung und Kinetik der CD4⁺ T-Zell-Antwort nach Influenzaimpfung bei alten und jungen Erwachsenen“** 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 Betreuer, 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.“

Berlin, den

.....

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Dominika Rachwalik hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Stervbo U, Meier S, Mälzer J, Baron U, Bozzetti C, Jürchott J, Nienen M, Olek S, Rachwalik D, Schulz A, Babel N, Grützkau, Neumann A, Thiel A. Immunophenotyping of the ageing immune system in men: I. Innate immunoscience. Age (Dordr). 2015 Oct; 37(5): 9828.

Stervbo U, Bozzetti C, Baron U, Jürchott J, Meier S, Mälzer J, Nienen M, Olek S, Rachwalik D, Schulz A, Neumann A, Babel N, Grützkau, , Thiel A. Effects of aging on human leukocytes (part II): Immunophenotyping of adaptive immune B and T cell subsets Age (Dordr). 2015 Oct; 37(5):9829.

Jürchott K, Schulz A, Bozzetti C, Rachwalik D, Stervbo U, Meier S, Mälzer J, Waldner J, Schweiger B, Olek S, Radbruch A, Grützkau A, Babel N, Thiel A, Neumann A. Highly predictive model for a protective immune response to the A(H1N1)pdm2009 influenza strain after vaccination (will be published soon (2015) in PLoS One, already reviewed).

Schulz A, Meier S, Bozzetti C, Rachwalik D, Waldner J, Mälzer J, Möwes B, El-Ahmad L, Herber M, Babel N, Thiel A. Multiparametric high-throughput characterization of the immune response after seasonal influenza vaccination (2011/12) in young and elderly adults, Poster at Congress of International Society for Advancement of Cytometry (CYTO) in Leipzig on 23-27/06/2012. TOP Poster Award Winner.

Beitrag im Einzelnen:

Patientenrekrutierung, Blutentnahmen an allen Studientagen, selbständige Präparierung der PBMCs sowie in-vitro Zellstimulierung, Messungen mittels Durchflusszytometrie, selbständige Analyse der Daten von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen, absoluten CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des $\gamma\delta$ -TCR-Panel mittels FlowJo, selbständige statistische Analyse der Daten in der vorliegenden Dissertation

Berlin, den

.....

8 Lebenslauf

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

9 Publikationsliste

Rachwalik D, Pleyer U, Bakterielle Keratitis [Bacterial Keratitis]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2015 Jun; 232(6):738-44.

Rachwalik D, Pleyer U. Okuläre Allergien [Ocular allergies]. *Z. prakt. Augenheilkd.* 2015 Mai; 36: 169-182.

Pleyer U, Rachwalik D. Keratokonjunktivitis epidemica (KCE). Schwerpunkt Uveitis / Entzündungen. *Der Augenspiegel.* 2015 Mar; 50-54.

Stervbo U, Meier S, Mälzer J, Baron U, Bozzetti C, Jürchott J, Nienen M, Olek S, Rachwalik D, Schulz A, Babel N, Grützkau, Neumann A, Thiel A. Effects of aging on human leukocytes (part I): Immunophenotyping of innate immune cells. *Age (Dordr).* 2015 Oct;37(5):9828.

Stervbo U, Bozzetti C, Baron U, Jürchott J, Meier S, Mälzer J, Nienen M, Olek S, Rachwalik D, Schulz A, Neumann A, Babel N, Grützkau, , Thiel A. Effects of aging on human leukocytes (part II): Immunophenotyping of adaptive immune B and T cell subsets *Age (Dordr).* 2015 Oct; 37(5):9829.

Jürchott K, Schulz A, Bozzetti C, Rachwalik D, Stervbo U, Meier S, Mälzer J, Waldner J, Schweiger B, Olek S, Radbruch A, Grützkau A, Babel N, Thiel A, Neumann A. Highly predictive model for a protective immune response to the A(H1N1)pdm2009 influenza strain after vaccination (submitted to PLoS One on 05/2015).

Schulz A, Meier S, Bozzetti C, Rachwalik D, Waldner J, Mälzer J, Möwes B, El-Ahmad L, Herber M, Babel N, Thiel A. Multiparametric high-throughput characterization of the immune response after seasonal influenza vaccination (2011/12) in young and elderly adults, Poster at Congress of International Society for Advancement of Cytometry (CYTO) in Leipzig on 23-27/06/2012. TOP Poster Award Winner.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Thiel danke ich für die Bereitstellung dieser Arbeit im Rahmen des Forschungsprojekts PRIMAGE, seine Unterstützung und Motivation, seine Fähigkeit, ein inspirierendes wissenschaftliches Umfeld zu schaffen und die Bereitschaft zur Diskussion und konstruktiver Kritik.

Für die exzellente Zusammenarbeit im Labor danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Thiel. Vor allem gilt der Dank an meine Mentoren Axel Schulz und Sarah Meier, die eine hervorragende Einarbeitung in die angewandten Methoden und Unterstützung in der gesamten Zeit geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Avidan Neumann und Dr. Karsten Jürchott für die stetige Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse, die interessanten Diskussionen und hilfreiche Anregungen bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Nina Babel, die mich als Person inspiriert, den wissenschaftlichen Weg weiterzugehen.

Cecilia Bozzetti danke ich für die gute Zusammenarbeit als Mitstreiterin, Labor- und feierabendliche Laufpartnerin. Ein weiterer Dank gilt Julia Mälzer für die professionelle Planung und reibungslose Organisation der Studie.

Meinem Bruder Milos danke ich für seinen grandiosen IT-Support zur jeder Zeit.

Besonderer Dank gilt meinem Verlobten Ulf Pohlmann für seine tägliche Unterstützung, für seine Liebe und Geduld mit mir.

Nicht zuletzt gilt mein tiefster Dank meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit bedingungslos mit voller Hingabe gefördert und unterstützt haben. Ich danke für ihre stetige Motivation und ihr Vertrauen in mich.