

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Impfantwort gegen Influenza von
Patienten mit primären Antikörpermangelkrankungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Florian Mieves

aus Nürnberg

Datum der Promotion: 01.03.2019

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
Abstract	5
1) Einleitung	7
1.1) Definition, Charakteristika und Einteilung von Immundefekten	7
1.2) Diagnosekriterien der ESID für CVID und UAD	9
1.3) Epidemiologie und Ätiologie von CVID und UAD	11
1.4) Klinik von CVID und UAD	12
1.5) Klassifikationen für CVID	15
1.6) Therapie und Prognose von CVID und UAD.....	18
1.7) Influenzaimpfung bei CVID- und UAD-Patienten	20
1.8) Fragestellung der Arbeit.....	23
2) Materialien	24
2.1) Patienten und Kontrollprobanden	24
2.2) Verbrauchsmaterialien	27
2.3) Reagenzien, Chemikalien, Puffer und Medien.....	28
2.4) Antikörper	29
2.5) Software.....	29
2.6) Geräte.....	30
3) Methodik	31
3.1) Erhebung von Patientendaten	31
3.2) Impfung mit TIV	31
3.3) Bestimmung der zellulären Immunität gegen Influenzaviren.....	32
3.3.1) Isolierung von mononukleären Zellen	32
3.3.2) Auftauen der Proben.....	33
3.3.3) In vitro Stimulation der Proben.....	34
3.3.4) Prinzip und Methodik der Durchflusszytometrie.....	35
3.3.5) Immunfärbung für die durchflusszytometrisch Messung	36
3.3.6) Gating-Strategie.....	38
3.4) Bestimmung der humoralen Immunität gegen Influenzaviren.....	40
3.4.1) Isolierung von Blutseren	40
3.4.2) Hämagglutinationshemmtest	40
3.5) Statistische Analyse.....	41

4) Ergebnisse	42
4.1) Charakterisierung der Kohorten.....	42
4.1.1) Demographische Daten der Kohorten.....	42
4.1.2) Immunologische Parameter der CVID- und UAD-Kohorte	43
4.1.3) Krankheitsmanifestation der CVID- und UAD-Kohorte.....	45
4.2) Fehlende humorale Impfantwort der CVID- und UAD-Patienten.....	47
4.2.1) Seroprotektion	47
4.2.2) Serokonversion	48
4.2.3) Höhe der HI-Titer	49
4.3) Dosisfindungsversuch.....	51
4.4) T-zelluläre Impfantwort bei Kontrollprobanden und Patienten nachweisbar	52
4.4.1) Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen	54
4.4.2) x-facher Anstieg der Frequenzen Zytokin-produzierender T-Zellen	55
5) Diskussion.....	58
5.1) Interpretation der Ergebnisse und Einordnung in die bestehende Studienlage	58
5.1.1) Serologische Impfantwort gegen TIV	58
5.1.2) Zelluläre Impfantwort gegen TIV	61
5.2) Bewertung des generierten Impfschutzes.....	66
5.3) Limitationen	69
5.4) Ausblick	71
6) Literaturverzeichnis.....	73
7) Abbildungsverzeichnis	88
8) Tabellenverzeichnis.....	89
Eidesstattliche Versicherung.....	90
Lebenslauf.....	93
Publikationsliste	95
Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

A.u.	Alopecia universalis
APC-H7	Allophycocyanin-H7
BFA	Brefeldin A
CD	engl. cluster of differentiation
CD40L	CD40 Ligand
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cs memBc	engl. class-switched memory B cell
CVID	engl. common variable immunodeficiency disorders
Cy	Cyanin
D.m.	Diabetes mellitus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISpot	Enzyme-Linked ImmunoSpot
ESID	European Society for Immunodeficiencies
EuroClass	European classification
FITC	engl. fluorescein isothiocyanate
FSC	engl. forward scatter
FSC-A	engl. forward scatter area
FSC-H	engl. forward scatter height
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLILD	engl. granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease
HA	Hämagglutinin
HI	engl. hemagglutination inhibition assay
ID	Immundefekt
IFN _γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL2	Interleukin 2
IMDM	engl. Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ITP	Immunthrombozytopenie
KI	Konfidenzintervall
LJ	Lebensjahr
MHC	engl. major histocompatibility complex
NA	Neuraminidase

n.a.	nicht anwendbar
n.s.	nicht signifikant
PBMCs	engl. peripheral blood mononuclear cells
PBS	engl. phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	engl. peridinin-chlorophyll protein
r.A.	rheumatoide Arthritis
RT	Raumtemperatur
SD	engl. standard deviation
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SSC	engl. side scatter
STIKO	Ständige Impfkommision
T _H 1/T _H 2	T-Helferzellen Typ 1/2
TIV	trivalent inaktiviertes Vakzin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TZR	T-Zell-Rezeptor
UAD	engl. unclassified antibody deficiency
WHO	World Health Organization
g	Zentrifugalbeschleunigung ($g = 9,81\text{m/s}^2$)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter

Zusammenfassung

Einleitung:

Patienten mit primären Immundefekten, darunter die Krankheitsbilder common variable immunodeficiency disorders (CVID) und unclassified antibody deficiency (UAD), tragen ein erhöhtes Risiko für schwere Verläufe einer Influenzainfektion. Die ständige Impfkommission des Robert Koch-Institutes empfiehlt bei diesen Patienten jedes Jahr die saisonale Influenzaimpfung durchzuführen. Die Daten zur diesbezüglichen Impfantwort von CVID-Patienten sind spärlich und teilweise widersprüchlich. Aktuell existieren keine Studien, die explizit die Impfantwort von UAD-Patienten gegen Influenza untersuchen.

Zielsetzung:

Ziel dieser Arbeit war es die humorale und T-zelluläre Impfantwort nach der Gabe des Influenzavakzins der Saison 2013/2014 von CVID- und UAD-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollprobanden zu untersuchen.

Methodik:

Zwischen Oktober 2013 und Januar 2014 wurden neun gesunde Kontrollprobanden und je acht CVID- und UAD-Patienten mit einer Dosis des nicht-adjuvantierten saisonalen Influenzavakzins geimpft. Zur Analyse wurde vor und drei bis sechs Wochen nach der Impfung Blut abgenommen. Mittels Hämagglutinationshemmtest (HI) wurden Antikörpertiter gegen die Impfstämme A/California/7/2009 (H1N1), A/Texas/50/2012 (H3N2) und B/Massachusetts/02/2012 bestimmt. Zur Interpretation der HI-Titer wurden die Kriterien der Serokonversion (Vervierfachung des HI-Titers nach erfolgter Impfung oder Titer-Anstieg auf $\geq 1:40$ bei vorheriger Serumnegativität) und der Seroprotektion (HI-Titer $\geq 1:40$) verwendet. Zur Messung der T-zellulären Impfantwort und Immunität wurde nach Stimulation mit dem Vakzin *in vitro* durchflusszytometrisch die Produktion der Zytokine Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$), Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) und Interleukin 2 (IL2) von $\text{CD4}^+\text{CD40L}^+$ -T-Zellen bestimmt.

Ergebnisse:

Während alle Kontrollprobanden ein humorales Impfansprechen zeigten, konnte nur bei einem CVID-Patienten eine serologische Impfantwort gegen die Influenza-A-Stämme nachgewiesen werden. In der UAD-Kohorte zeigten nur vier Patienten gegen

mindestens einen der Impfstämme eine positive humorale Impfantwort. Zusätzlich waren die HI-Titer vieler Patienten zwar definitionsgemäß protektiv, jedoch generell deutlich niedriger als die der Kontrollprobanden.

Bei sieben CVID- und sechs UAD-Patienten konnte eine den Kontrollprobanden entsprechende T-zelluläre Impfantwort und Immunität für $\text{IFN}\gamma$ -, $\text{TNF}\alpha$ - und IL2-produzierende antigenspezifische $\text{CD4}^+\text{CD40L}^+$ -T-Lymphozyten gemessen werden.

Schlussfolgerung:

Ein Großteil der CVID- und UAD-Patienten entwickelte eine den gesunden Kontrollprobanden entsprechende T-zelluläre Impfantwort und Immunität. Für die humorale Impfantwort ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen. Die Untersuchungsergebnisse bekräftigen, dass die saisonale Impfung gegen Influenzaviren bei beiden Krankheitsbildern von Nutzen ist und daher klar zu empfehlen ist.

Abstract

Introduction:

Patients with primary immunodeficiencies, including patients suffering from common variable immunodeficiency disorders (CVID) or unclassified antibody deficiency (UAD), are considered to be at high risk for severe influenza infections. Annual vaccination against seasonal influenza is recommended by the German Standing Committee on Vaccination in these patients. There is no specific knowledge of humoral or cellular response following influenza vaccination in UAD-patients. Humoral responses to influenza vaccination in CVID-patients have been shown to be severely hampered. However, data about the induction of an influenza-specific cellular immunity in patients with CVID is sparse and contradictory.

Objective:

This study evaluated humoral and T cell-mediated response to the seasonal influenza vaccine 2013/2014 of CVID- and UAD-patients compared to healthy controls.

Methods:

Between October 2013 and January 2014 nine healthy controls, eight CVID-patients and eight UAD-patients were given a single dose of non-adjuvanted seasonal influenza vaccine. Prior to and three to six weeks after vaccination blood samples were taken. Humoral immunity was assessed by hemagglutination inhibition assay (HI) through measuring antibody titers against the strains A/California/7/2009 (H1N1), A/Texas/50/2012 (H3N2) and B/Massachusetts/02/2012 included in the vaccine. Criteria for humoral response were seroconversion (HI titer increase pre/postvaccination \geq fourfold or a HI titer of at least 1:40 with antibodies being absent prior to vaccination) and seroprotection (HI titer \geq 1:40).

T cell-mediated immunity was evaluated by stimulating with the complete vaccine *in vitro* followed by measuring the production of interferon gamma (IFN γ), tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 2 (IL2) from CD4⁺CD40L⁺ T cells.

Findings:

In contrast to healthy controls, only one CVID-patient developed a humoral response against both A strains. Similarly, only four UAD-patients showed a humoral response

against at least one of the strains included in the vaccine. Additionally, measured antibodies were protective in many patients but generally low compared to healthy controls.

Nevertheless, in seven CVID-patients and six UAD-patients frequencies of vaccine-induced IFN γ -, TNF α - and IL2-producing CD4⁺CD40L⁺ T cells comparable to healthy controls were detected.

Conclusion:

Despite an impaired humoral response most CVID-patients and UAD-patients mounted a T cell-mediated immunity comparable to healthy controls. These data suggest that seasonal influenza vaccination is beneficial in these patients and should therefore be recommended.

1) Einleitung

1.1) Definition, Charakteristika und Einteilung von Immundefekten

Erkrankungen, die mit einer permanenten oder vorübergehenden Schwächung des Immunsystems einhergehen, werden unter dem Begriff Immundefekte (*Abkürzung: ID*) zusammengefasst. Ätiologisch werden primäre von sekundären ID unterschieden, wobei erstere angeboren und letztere erworben sind. Mögliche Gründe für sekundäre ID sind unter anderem Infektionen, Therapieverfahren oder andere Erkrankungen.

Primäre ID werden durch Defekte in Genen verursacht, die an der Kontrolle des Immunsystems beteiligt sind (1). Mittlerweile sind über 300 verschiedene Gendefekte beschrieben (2). Sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität können singulär oder kombiniert betroffen sein. Primäre ID werden gemäß der International Union of Immunological Societies in Anlehnung an die zugrundeliegende Ursache in neun Gruppen eingeteilt (2):

- ID mit beeinträchtigter zellulärer und humoraler Immunität
- Kombinierte ID mit assoziierten oder syndromalen Merkmalen
- ID mit vordergründigem Antikörpermangel
- Erkrankungen mit Immundysregulation
- Kongenitale Defekte der Phagozytenzahl und/oder -funktion
- Defekte der angeborenen Immunität
- Autoinflammatorische Syndrome
- Komplementdefekte
- Phänokopien von primären ID

Kardinalsymptom von ID ist eine generell gesteigerte Infektanfälligkeit, wobei der verursachende Erreger Hinweise auf die zugrundeliegende Problematik gibt. Wiederkehrende virale Infektionen oder chronischer Pilzbefall der Haut sind eher typisch für T-zelluläre Defekte (1). Rezidivierende Infektionen mit pyogenen bakteriellen Erregern treten gehäuft bei Störungen der Antikörper-, Komplement- oder Phagozytenfunktion auf (1). Infektionen per se sprechen jedoch nicht unbedingt für einen Defekt, sondern vielmehr zählen infektiöse Erkrankungen zum normalen Alltag eines intakten Immunsystems. Die Unterscheidung zwischen physiologischer und pathologischer Infektanfälligkeit ist dabei durchaus schwierig, wobei unterschiedliche

Charakteristika der Infektionen bei der Differenzierung helfen können (Tabelle 1).

Tabelle 1: Eigenschaften physiologischer und pathologischer Infektanfälligkeit.

In Anlehnung an (3). Die Begriffe Minor-Infektionen (z.B. grippaler Infekt, Tonsillitis und leichter Infekt der oberen Atemwege) und Major-Infektionen (z.B. Pneumonie, Sepsis und Meningitis) bezeichnen unterschiedliche Schweregrade einer Infektion.

Infektionseigenschaften	Physiologische Infektanfälligkeit	Pathologische Infektanfälligkeit
Häufigkeit	Bis zu 8 Minor-Infektionen/Jahr bis zum Kleinkindesalter, danach seltener	Mehr als 8 Minor-Infektionen/Jahr bis zum Kleinkindesalter und darüber hinaus
Schweregrad	leicht, Minor-Infektionen	teilweise schwer, Major-Infektionen
Verlauf	akut	chronisch, rezidivierend
Residuen	nein	ja
Rezidiv mit demselben Erreger, opportunistische Infektionen	nein	ja

Generell sind primäre ID seltene Erkrankungen. Laut epidemiologischen Schätzungen aus den Vereinigten Staaten wird diese Diagnose bei einem von 1200 Menschen gestellt (4). Den größten Anteil machen die antikörperbezogenen ID mit einer Häufigkeit von 56 bis 65% aus (5, 6). Am häufigsten ist der selektive Immunglobulin A-Mangel bei dem im Serum erniedrigtes bis fehlendes Immunglobulin (*Abkürzung: Ig*) A bei normaler Konzentration von IgG und IgM vorliegt. Dieser ID ist meist asymptomatisch. Zweithäufigster primärer ID ist das variable Immundefektsyndrom (*engl. common variable immunodeficiency disorders; Abkürzung: CVID*) (7). Eine aufgrund der ähnlichen Beschwerdesymptomatik (siehe Abschnitt 1.2) schwierige Differentialdiagnose zu CVID ist der insgesamt wenig untersuchte unklassifizierte Antikörpermangel (*engl. unclassified antibody deficiency; Abkürzung: UAD*). CVID und UAD zählen zu den humoralen ID, deren Kennzeichen signifikant erniedrigte Antikörperspiegel von mindestens einer Ig-Klasse im Blut sind (7). Beide Erkrankungen zählen dementsprechend zu der Kategorie der ID mit vordergründigem Antikörpermangel (2).

1.2) Diagnosekriterien der ESID für CVID und UAD

CVID

Laut den Kriterien der European Society for Immunodeficiencies (*Abkürzung: ESID*) wird für die Diagnose CVID eine um mindestens zwei Standardabweichungen (*engl. standard deviation; Abkürzung: SD*) vom altersbezogenen IgG-Spiegel abweichende Konzentration bei zweimaliger Messung gefordert (8). Daneben müssen erniedrigte IgA- mit oder ohne erniedrigte IgM-Werte vorliegen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei adulten CVID-Patienten liegt die gemessene IgG-Konzentration in über 90% der Fälle unter 4,5 g/l, während IgA bei 49 bis 70% der Patienten vollständig fehlend ist (9). IgM ist in bis zu 80% der Fälle erniedrigt (10).

Andere Ursachen eines Antikörpermangels müssen ausgeschlossen werden. Daneben dürfen keine labormedizinischen Befunde eines schweren T-Zell-Defektes vorliegen, die den Antikörpermangel bedingen könnten. Die Diagnose darf aufgrund des Reifungsprozesses des kindlichen Immunsystems erst ab dem vierten Lebensjahr (*Abkürzung: LJ*) gestellt werden, obwohl Symptome schon früher auftreten können.

Klinisch muss mindestens eines der folgenden Symptome vorliegen: erhöhte Infektanfälligkeit, granulomatöse Veränderungen, Autoimmunität, unerklärliche polyklonale lymphoproliferative Erkrankung oder eine positive Familienanamnese für Antikörpermangelsyndrome.

Zudem müssen entweder erniedrigte Konzentrationen von B-Gedächtniszellen nach Ig-Klassenwechsel (*engl. class-switched memory B cell; Abkürzung: cs memBc*) und/oder ein reduziertes Impfansprechen nachgewiesen werden. Von reduzierten cs memBc ist gemäß der ESID ab einer Verminderung auf unter 70% des altersbezogenen Normalwertes auszugehen. Hingegen werden die Kriterien zur Beurteilung der Impfantwort nicht näher charakterisiert. In der Praxis wird häufig das humorale Impfansprechen gegenüber Protein- und Polysaccharid-Antigenen, beispielsweise anhand der Tetanus- und Pneumokokken-Impfung, evaluiert (9-11). In Abbildung 1 sind die beschriebenen Diagnosekriterien schematisch dargestellt.

CVID – Diagnosekriterien nach ESID

<p><u>Erniedrigte Antikörperspiegel</u></p> <p>IgG + IgA ± IgM</p>	<p><u>Klinik (mindestens 1/5)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Infektanfälligkeit • Granulomatöse Veränderungen • Autoimmunität • Lymphoproliferative Erkrankungen • Positive Familienanamnese 	<p><u>Ausschluss schwerer T-Zell-Defekte (mindestens 2/3)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • CD 4⁺/μl > 300 (2-6 LJ) • CD 4⁺/μl > 250 (6-12 LJ) • CD 4⁺/μl > 200 (>12 LJ) • % naive CD 4⁺ > 25% (2-6 LJ) • % naive CD 4⁺ > 20% (6-16 LJ) • % naive CD 4⁺ > 10% (>16 LJ) • Keine Zeichen einer T-Zell-Proliferation 	<p><u>Eingeschränkte Impfantwort</u></p> <p>(und/oder kein Nachweis von Isohämagglutininen)</p> <p>UND/ODER</p> <p><u>cs memBc < 70%</u></p>
<p><u>Ausschluss eines sekundären ID</u></p> <p>UND</p> <p><u>Diagnosestellung nach dem 4 LJ</u></p>			

Abbildung 1: CVID-Diagnosekriterien gemäß der ESID (8).

Für Details siehe Text. Abkürzungen: CD (cluster of differentiation), cs memBc (class-switched memory B cell), ESID (European Society for Immunodeficiencies), ID (Immundefekt), Ig (Immunglobulin), LJ (Lebensjahr).

UAD

Patienten mit erniedrigten Konzentrationen mindestens einer Ig-Klasse (IgG, IgM oder IgA) oder IgG-Subklasse und/oder einer eingeschränkten IgG-Impfantwort, die keiner anderen Diagnose zugeordnet werden können, werden gemäß der ESID unter der Ausschlussdiagnose UAD zusammengefasst (8).

Die differentialdiagnostische Abgrenzung zu CVID ist aufgrund des ähnlichen klinischen Phänotyps teilweise sehr schwierig. Zur UAD-Diagnosestellung wird zusätzlich eine erhöhte Infektanfälligkeit in Form rezidivierender schwerer bakterieller Infektionen, der Nachweis einer positiven Familienanamnese, das Vorliegen von Autoimmunerkrankungen (insbesondere von Autoimmunzytopenien) oder von lymphoproliferativen Erkrankungen gefordert (8). Auch bei dieser Erkrankung müssen andere ID und eine eingeschränkte T-zelluläre Immunität ausgeschlossen werden (8). In Abbildung 2 sind die beschriebenen Diagnosekriterien zusammengefasst.

UAD – Diagnosekriterien nach ESID

<p><u>Erniedrigte Antikörperspiegel</u> Mindestens eine Ig-Klasse (IgG, IgA oder IgM) oder IgG-Subklasse</p> <p>UND/ODER</p> <p><u>Eingeschränkte IgG-Impfantwort</u></p>	<p><u>Klinik (mindestens 1/4)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Rezidivierende schwere bakterielle Infektionen • Autoimmunität (insbesondere Zytopenien) • Lymphoproliferative Erkrankungen • Positive Familienanamnese 	<p><u>Keine klinischen Zeichen einer eingeschränkten T-zellulären Immunität</u></p>	<p><u>Keine Zuordnung zu einer anderen Diagnose möglich</u></p> <p>UND</p> <p><u>Ausschluss eines sekundären ID</u></p>
--	---	--	---

Abbildung 2: UAD-Diagnosekriterien gemäß der ESID (8).

Für Details siehe Text. Abkürzungen: ESID (European Society for Immunodeficiencies), ID (Immundefekt), Ig (Immunglobulin).

1.3) Epidemiologie und Ätiologie von CVID und UAD

CVID

Die Krankheit CVID tritt mit einer geschätzten Prävalenz von 1/10.000 bis 1/50.000 auf (9, 10, 12). Beide Geschlechter sind gleichermaßen betroffen (13-16). In der hellhäutigen Bevölkerung wird CVID am häufigsten diagnostiziert (13, 17, 18). Die Erkrankung kann prinzipiell in jedem Lebensalter manifest werden (14, 16, 19). In manchen Studien ist für die Erstmanifestation ein zweiphasiger Verlauf beschrieben (18, 20). Erste Symptome treten zumeist in der zweiten und dritten Lebensdekade auf, wohingegen die Diagnose am häufigsten in der dritten und vierten Lebensdekade gestellt wird (14, 15, 17-19). Zwischen Krankheitsbeginn und Diagnosestellung liegen je nach Studie durchschnittlich 4 bis 9 Jahre (14-16, 18).

Der Begriff CVID beschreibt eine Gruppe von phänotypisch ähnlichen Antikörpermangelsyndromen, deren Ätiologie wahrscheinlich sehr heterogen ist. Die Erkrankung tritt meist sporadisch auf. In bis zu 20% der Fälle liegt eine familiäre Assoziation vor (17, 21), wobei am häufigsten ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster beschrieben wird (21, 22). Aktuell ist die Ätiologie der Erkrankung nicht vollständig bekannt. Bei einigen Patienten konnten spezifische genetische Veränderungen detektiert werden, die jedoch nur für schätzungsweise 30% der

Erkrankungen verantwortlich sind (23).

UAD

Insgesamt wurde das Krankheitsbild UAD bisher nur sehr wenig untersucht, sodass zur Prävalenz und Ätiologie aktuell keine genauen Daten vorliegen.

1.4) Klinik von CVID und UAD

CVID

Das klinische Bild ist, wie der Name CVID impliziert, äußerst variabel. Sowohl infektiöse als auch nichtinfektiöse Komplikationen werden beobachtet. Die Erkrankung kann neben dem Immunsystem zahlreiche andere Organsysteme betreffen (Abbildung 3).

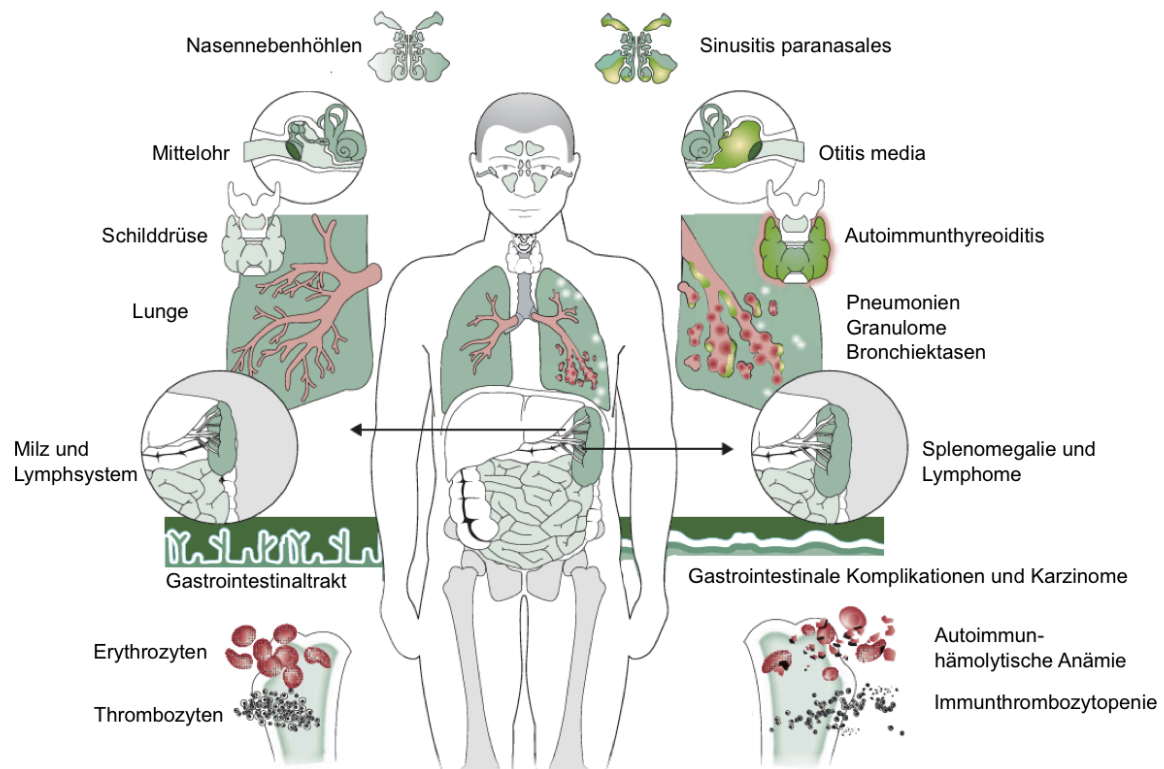


Abbildung 3: Überblick über die betroffenen Organsysteme bei CVID-Patienten.

In Anlehnung an Park und Kollegen (5). Auf der linken Seite sind die Organe von gesunden Personen dargestellt. Auf der rechten Seite sind mögliche Komplikationen bei CVID-Patienten abgebildet.

a) Pathologische Infektanfälligkeit

Kardinalsymptom primärer ID ist allgemein eine pathologische Infektanfälligkeit. Circa 86 bis 94% der CVID-Patienten leiden unter rezidivierenden Infektionen, wobei am

häufigsten der Respirationstrakt betroffen ist (15, 17, 18, 24). Das Spektrum reicht von leichten Atemwegsinfekten bis hin zu schwerwiegenden Lungenentzündungen. Bronchitiden erleiden bis zu circa 60 bis 70% der Erkrankten (15, 17). Sinusitiden, Otitiden und Mastoiditiden werden bei circa 35 bis 65% der Patienten beobachtet (15, 17, 20). Pneumonien treten bei 32 bis 78% der Fälle auf (15-18, 20). Auslösend sind meist bakterielle Infektionen. Zu den typischen Erregern zählen *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* (17, 25). Neben einem atypischen Erregerspektrum ist die pathologische Infektanfälligkeit folglich vor allem durch Häufigkeit, Intensität und Verlauf der Infektionen charakterisiert (26). Durch die wiederholten Entzündungen entwickeln 23 bis 37% der Fälle Bronchiektasen (15-19). In Folge der Lungenschädigung kann eine respiratorische Insuffizienz mit der Notwendigkeit einer Sauerstoffgabe bis hin zu einer Lungentransplantation entstehen (18, 24).

Infektionen des Gastrointestinaltraktes (*Abkürzung: GIT*) manifestieren sich vor allem in vorübergehenden oder dauerhaften Episoden von Diarrhöen. Betroffen sind bis zu 20 bis 40% der Patienten (15, 17, 20). Häufigster nachgewiesener Erreger ist der Endoparasit *Giardia lamblia* (15, 17, 20). Andere auslösende Pathogene sind Kryptosporidien, *Campylobacter*, Salmonellen, Yersinien und Clostridien (17, 20).

Sepsis, Arthritis und Meningitis sind weitere infektiöse Komplikationen (15, 17, 18). Insgesamt sind opportunistische Infektionen eher untypisch und treten nur bei bis zu 6% der Patienten auf (17, 18).

b) Nichtinfektiöse gastrointestinale Komplikationen

Zahlreiche COVID-Patienten erleiden nichtinfektiöse Komplikationen des GIT. Eine noduläre lymphoide Hyperplasie kann den gesamten Darm betreffen und lässt sich bei vielen Patienten nachweisen (15, 17, 18, 20). Als Folge chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, die gehäuft auftreten, und der Diarrhöen kann sich ein Malabsorptionssyndrom entwickeln (15, 18). Ebenso können Veränderungen im Sinne einer Zöliakie und einer villösen Atrophie auftreten (17, 18), die jedoch nicht mit Ernährungsumstellung therapierbar sind (18).

Auffälligkeiten der Leber sind bei vielen Patienten serologisch, bildmorphologisch oder histologisch nachweisbar. Nichtinfektiöse Hepatopathien entwickeln schätzungsweise bis zu 10% der Patienten (26). In Leberbiopsien lässt sich häufig eine noduläre regenerative Hyperplasie nachweisen, die sich trotz teilweiser unauffälliger klinischer

Verläufe in serologischen Veränderungen der Leberenzyme äußern kann (27, 28). Als Folge können eine portale Hypertension oder eine Cholestase auftreten (28). Aufgrund der erhöhten Infektanfälligkeit sollten Auffälligkeiten der Leber immer Anlass zur Suche nach bakteriellen und viralen Erregern einer Hepatitis geben.

c) Autoimmunerkrankungen

Ein Teil der Patienten präsentiert sich initial mit Autoimmunphänomenen und diese treten insgesamt bei circa 20 bis 30% der COVID-Kohorte auf (14-16, 18, 24). Dies liegt darin begründet, dass neben einer Immundefizienz auch eine Immundysregulation besteht. Trotz mangelnder Fähigkeit suffiziente Antikörper gegen Erreger zu bilden, konnten in einigen Fällen Autoantikörper nachgewiesen werden (14, 24, 29). Die Entwicklung von Autoimmunität ist mit erniedrigten *cs memBc* assoziiert (30, 31). Am häufigsten sind die Immunthrombozytopenie (*Abkürzung: ITP*) und die autoimmunhämolytische Anämie mit Häufigkeiten bis zu 8% und 6% (32-35). Daneben sind zahlreiche andere Autoimmunphänomene beschrieben. Darunter unter anderem rheumatoide Arthritis (*Abkürzung: r.A.*), Sicca-Syndrom, Diabetes mellitus (*Abkürzung: D.m.*) Typ I, atrophische Gastritis, Zöliakie, Alopecia universalis (*Abkürzung: A.u.*) und Autoimmunthyreoiditis (15, 18, 19, 24).

d) Granulomatöse Veränderungen, Lymphadenopathie und Splenomegalie

Granulomatöse Veränderungen betreffen 8 bis 22% der COVID-Patienten (16-19, 36, 37). In der Histologie gleichen die nicht-verkäsenden Granulome dem Bild einer Sarkoidose (38, 39). Ein Erreger lässt sich typischerweise nicht nachweisen (36). Granulome können gleichzeitig in mehreren Organen auftreten (24, 36-38, 40). Am häufigsten ist die Lunge befallen. Interstitielle pulmonale Manifestationen werden unter dem Begriff granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (*Abkürzung: GLILD*) zusammengefasst. Bates und Kollegen konnten zeigen, dass diese Komplikation mit einer deutlichen Prognoseverschlechterung verbunden ist (41). Ein Befall der Lunge kann sich in chronischem Husten und Ruhedyspnoe äußern (40-42). Zur Diagnosesicherung sollten eine Computertomographie und Lungenfunktionstests durchgeführt werden (39). Die endgültige Diagnose kann jedoch nur histologisch gestellt werden (40, 41, 43).

Persistierende Lymphadenopathie und Splenomegalie sind mit 15 bis 26% und 30 bis 41% zwei sehr häufig erhobene Befunde (14, 19). In einigen Fällen ist sogar eine

Splenektomie erforderlich, häufig zur Therapie von rezidivierenden Zytopenien als Folge eines Hypersplenismus (15, 18, 24).

e) Malignomerkrankungen

ID mit vordergründigem Antikörpermangel stellen einen Risikofaktor für die Entwicklung von Malignomen dar (44). COVID-Patienten zeigen erhöhte Inzidenzen von soliden und hämatologischen Tumoren, wobei je nach Studie insgesamt circa 3 bis 17% der Patienten an einem Malignom erkrankten (15-18, 24, 44-46). Das gehäufte Auftreten von Malignomen scheint in der Mehrzahl der Fälle nicht durch spezifische genetische Veränderungen, sondern vielmehr sekundär durch die Störung des Immunsystems bedingt zu sein (45). Insbesondere für Magenkarzinome und Lymphome wurde eine erhöhte Inzidenz beschrieben (15-18, 24, 44-46). Die Angaben zur Risikoerhöhung für die Entwicklung eines Lymphoms bzw. Magenkarzinoms liegen je nach Studie in einem Bereich von 12 bis 30 bzw. von 7 bis 47 (15, 44-46). Die mit COVID assoziierten Lymphome sind zumeist Non-Hodgkin-Lymphome, treten vor allem extranodal auf und insbesondere ältere Patienten sind betroffen (9).

UAD

Zur klinischen Manifestation des Krankheitsbildes UAD existieren bisher nur sehr wenig Daten. Am bedeutendsten ist eine Untersuchung von Driessen und Kollegen an 21 UAD- und 44 COVID-Patienten (47). Alle Patienten litten an einer erhöhten Infektanfälligkeit (47). Schwerwiegende Pneumonien und Bronchiektasen traten in beiden Kohorten mit einer Häufigkeit von circa 50% und 25% vergleichbar häufig auf (47). Im Gegensatz zu den COVID-Patienten wurden bei keinem der 21 untersuchten UAD-Patienten nichtinfektiöse krankheitsassoziierte Komplikationen beobachtet (47). Aufgrund der geringen Fallzahl dieser Untersuchung ist jedoch von einer eingeschränkten Aussagekraft auszugehen. Aktuell wird die Erkrankung UAD im Rahmen einer noch nicht abgeschlossenen multizentrischen prospektiven Kohortenstudie, der unPAD-Studie, näher charakterisiert (48).

1.5) Klassifikationen für COVID

Zur Klassifikation des heterogenen COVID-Patientenkollektives existieren zahlreiche Konzepte. Klinisch am bedeutendsten sind die Freiburger-Klassifikation (31) und die

European classification (*Abkürzung: EuroClass*) (14). In beiden Ansätzen wird die prozentuale Verteilung von peripheren B-Lymphozytenpopulationen analysiert. Zur Unterscheidung der B-Zellpopulationen wird die quantitative Verteilung von Antigenen gemessen, die unter dem Begriff cluster of differentiation (*Abkürzung: CD*) zusammengefasst werden. CD-Antigene sind eine Gruppe von Molekülen mit charakteristischer Funktion und zellulärer Expression, die zumeist membranständige Glykoproteine darstellen. Beide Klassifikationen beziehen sich aber grundsätzlich nur auf quantitative und nicht auf qualitative Defekte. Jedoch sind in beiden Konzepten Untergruppen gehäuft mit bestimmten Krankheitsmanifestationen assoziiert.

Freiburger-Klassifikation

Das Freiburger-Klassifikationsschema (Tabelle 2) unterscheidet auf der Grundlage einer Untersuchung an 30 CVID-Patienten die zwei Hauptgruppen Typ I und II (31).

Tabelle 2: Freiburger-Klassifikation der CVID-Kohorte (31).

Für Details siehe Text. Abkürzungen: CD (cluster of differentiation), Ig (Immunglobulin).

Typ	Immunphänotypische Charakterisierung	Vermutete Problematik
Typ I	B-Lymphozyten > 1% und CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ < 0,4%	Störung der Keimzentrumsreaktion
Typ Ia	und CD19 ⁺ CD21 ⁻ > 20%	
Typ Ib	und CD19 ⁺ CD21 ⁻ < 20%	
Typ II	B-Lymphozyten > 1% und CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ > 0,4%	Störung der Antikörperproduktion Störung des Ig-Katabolismus

Patienten mit B-Zell-Zahlen unter 1% können laut den Autoren aufgrund der geringen Zellzahl nicht näher charakterisiert werden und werden deshalb von der Klassifikation nicht erfasst. Die berücksichtigten Oberflächenmarker sind CD19, CD21 und CD27, sowie membrangebundenes IgM und IgD. Das Membranprotein CD19 wird nur auf B-Lymphozyten exprimiert und bildet zusammen mit den Molekülen CD21, CD81 und Leu13 den B-Zell-Korezeptor-Komplex (49). In der B-Zell-Entwicklung wird CD21 erst relativ spät synthetisiert und fungiert daher als Reifemarker (50). Das Molekül CD27 wird zur Identifizierung von B-Gedächtniszellen genutzt (51).

Die zwei Patientengruppen Typ I und II werden anhand der Population der

CD19⁺CD27⁺IgM⁻IgD⁻-B-Zellen unterschieden. Bei diesem zellulären Phänotyp handelt es sich um cs memBc, die nach erfolgter B-T-Zell-Interaktion im Rahmen der Keimzentrumsreaktion entstehen (52). Bei Patienten der Gruppe Typ I liegt der gemessene Anteil dieser Zellen unter dem festgelegten Referenzwert von 0,4% der peripheren Blutlymphozyten, sodass hier eine gestörte Keimzentrumsreaktion vermutet wird (31). Circa 25% der Patienten der Untersuchung von Warnatz und Kollegen zeigten normale Frequenzen (> 0,4%) von cs memBc (Gruppe Typ II) (31). Als zugrundeliegende Problematik werden insbesondere eine gestörte Antikörperproduktion oder ein erhöhter Ig-Katabolismus angenommen (31).

Die Patienten des Typ I können durch Analyse der Population von unreifen B-Zellen, die durch den Phänotyp CD19⁺CD21⁻ charakterisiert sind, weiter unterteilt werden. Anhand des prozentualen Anteils dieser Zellen an den gesamten B-Zellen werden Typ Ia (CD19⁺CD21⁻ > 20%) und Ib (CD19⁺CD21⁻ < 20%) unterschieden. In der Untergruppe Typ Ia der Studie von Warnatz und Kollegen wurden die höchsten Inzidenzen von Splenomegalien und Autoimmunzytopenien beobachtet (31).

EuroClass-Klassifikation

Die EuroClass-Klassifikation (Abbildung 4) basiert auf der Untersuchung von 303 CVID-Patienten und definiert über die quantitative Bestimmung von B-Zellen zwei Hauptgruppen B⁺ und B⁻ (14).

Bei einem Anteil der B-Zellen an den gesamten Lymphozyten von $\leq 1\%$ erfolgt die Zuteilung in die Gruppe B⁻. Dies trifft auf circa 10% der CVID-Patienten zu (14). Bei einigen dieser Patienten konnte ursächlich eine Störung der frühen B-Zell-Differenzierung nachgewiesen werden (14). Ähnlich wie bei der Freiburger-Klassifikation werden diese CVID-Patienten nicht weiter untersucht. Die restlichen 90% der CVID-Kohorte können der Gruppe B⁺ zugeordnet werden und lassen sich anhand der cs memBc weiter unterteilen (14). Patienten mit stark reduzierten cs memBc, d.h. einem Anteil von $\leq 2\%$ an der gesamten B-Zellpopulation, werden als smB⁻ definiert (14). Alle anderen B⁺-Patienten werden als smB⁺ bezeichnet. Ähnlich dem Typ I der Freiburger-Klassifikation wird bei der Untergruppe smB⁻ eine Störung der Keimzentrumsreaktion vermutet (14). Im Einklang damit zeigte die smB⁻-Kohorte der EuroClass-Studie signifikant niedrigere IgA- und IgG-Spiegel als die smB⁺-Kohorte (14). Bei einer Untergruppe der smB⁻-Patienten kann eine Expansion von transitionalen B-Zellen (Phänotyp: CD38^{high}IgM^{high}) detektiert werden. Diese Zellpopulation verlässt nach

abgeschlossener Entwicklung in einer spezifischen Mikroumgebung das Knochenmark, um im sekundären lymphatischen Gewebe die Differenzierung zu Marginalzonen-B-Zellen und folliculären B-Zellen abzuschließen (53). Machen transitionale B-Zellen mindestens 9% der CD19⁺-Zellen aus, dann werden diese Patienten als smB⁻Tr^{high} klassifiziert. Alle anderen werden als smB⁻Tr^{norm} bezeichnet. In der EuroClass-Studie wurde eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten einer Lymphadenopathie und der Expansion von transitionalen B-Zellen beobachtet (14). Über die Quantifizierung von aktivierten B-Zellen (Phänotyp: CD21^{low}CD38^{low}) erfolgt eine weitere Differenzierung der smB⁺- und smB⁻-Kategorien. Liegt der Anteil dieser Zellen bei mindestens 10% der CD19⁺-Zellen erfolgt die Klassifizierung als smB⁺21^{low} bzw. smB⁻21^{low}, ansonsten als smB⁺21^{norm} bzw. smB⁻21^{norm}. In der EuroClass-Studie konnten insgesamt bei smB⁻-Patienten höhere Inzidenzen von Splenomegalien und granulomatösen Veränderungen detektiert werden, wobei eine Splenomegalie am häufigsten in den Untergruppen smB⁺21^{low} bzw. smB⁻21^{low} diagnostiziert wurde (14).

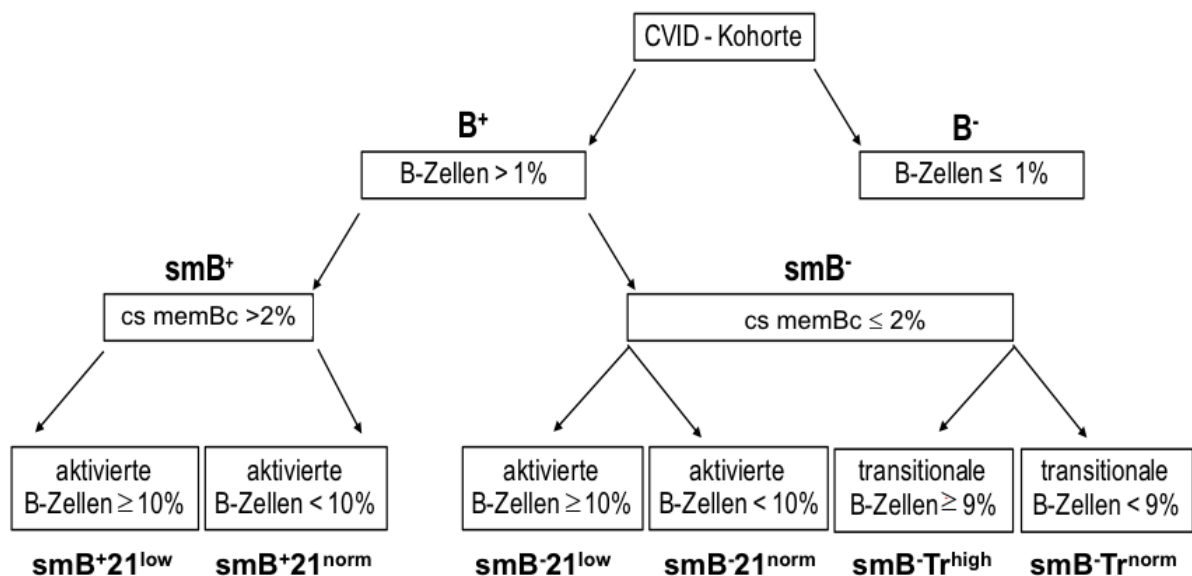


Abbildung 4: Einteilung der CVID-Kohorte gemäß der EuroClass-Klassifikation (14).

Für Details siehe Text. Abkürzungen: cs memBc (class-switched memory B cell).

1.6) Therapie und Prognose von CVID und UAD

Die Behandlung von CVID und UAD umfasst vor allem Therapie und Prophylaxe von Infektionen. Wichtigstes Therapiekonzept ist die Substitution der erniedrigten bzw. fehlenden Antikörper durch Transfusion von IgG. Zur Herstellung von Ig-Präparaten

wird das Blutserum von über 1000 Spendern gesammelt und aufbereitet (54). Der Schutz ergibt sich aus den Titern und dem Spektrum der enthaltenen Antikörper. In die Entscheidung über den Beginn einer Substitutionstherapie fließen neben der Frequenz und der Schwere der Infektionen auch die Antikörperantwort nach Vakzination und die aktuelle Ig-Konzentration ein (11). Der erreichte IgG-Spiegel unter Substitution sollte mindestens 5 g/l und idealerweise zwischen 6,5 und 10 g/l betragen (55). Insbesondere Patienten mit bestehenden Lungenschäden benötigen höhere Konzentrationen (56, 57). Unter Substitution nimmt die Häufigkeit von Infektionen der unteren Atemwege und Pneumonien signifikant ab (25, 56, 58, 59), wobei es trotz optimaler Therapie zur Entstehung oder Aggravation von pulmonalen Schädigungen kommen kann (15, 56). Für Ig-Präparate wurden auch zahlreiche immunmodulatorische Effekte beschrieben, die über den reinen Ersatz von Ig hinausgehen (60). Ergänzend benötigen viele Patienten eine antimikrobielle Therapie (15, 47). Im Vergleich zu immunkompetenten Patienten müssen Antibiotika in bestimmten Fällen längerfristig und höher dosiert gegeben werden.

Nichtinfektiöse Problematiken werden je nach Komplikation und Patient unterschiedlich behandelt. Sowohl granulomatöse Veränderungen als auch Autoimmunphänomene werden meist mit Glukokortikoiden therapiert (29, 32, 36, 40). Als Alternative oder Ergänzung werden in einzelnen Fällen monoklonale Antikörper wie Rituximab (40, 61) oder Infliximab (62) eingesetzt.

Insgesamt hat sich in den letzten Jahrzehnten die Prognose von CVID-Patienten deutlich gebessert (9), wobei verglichen mit der Normalbevölkerung immer noch eine erhöhte Mortalitätsrate besteht (24). Häufige krankheitsassoziierte Todesursachen sind Malignome, Infektionen, Lebererkrankungen und chronische Lungenerkrankungen mit oder ohne konsekutivem Cor pulmonale (15, 18, 19, 24). In einer amerikanischen Längsschnittstudie an 473 CVID-Patienten war das Auftreten von nichtinfektiösen Komplikationen mit einer deutlichen Prognoseverschlechterung verbunden (24). CVID-Patienten sollten deshalb engmaschig überwacht und regelmäßig gezielt auf Begleitkomplikationen untersucht werden (63).

Zur Prognose von UAD-Patienten existieren aktuell keine verlässlichen Daten, wobei diese Gegenstand der noch nicht abgeschlossenen unPAD-Studie ist (48).

1.7) Influenzaimpfung bei COVID- und UAD-Patienten

Influenzaviren

Unter den Begriff Influenza fällt eine durch gleichnamige RNA-Viren ausgelöste Infektion, die in der nördlichen Hemisphäre gehäuft in den Wintermonaten auftritt. Jährlich sind 5 bis 20% der deutschen Bevölkerung betroffen (64). Eine Infektion verläuft jedoch schätzungsweise in bis zu 66% der Fälle milde bis asymptomatisch (64). Insbesondere bei eingeschränkter Immunität, im höheren Alter sowie bei chronischen Erkrankungen können schwere und komplikationsträchtige Verläufe mit möglicherweise letalem Ausgang vorkommen.

Prinzipiell können anhand interner Virusproteine die Typen A, B und C differenziert werden. Typ C kommt wegen seiner geringeren Häufigkeit und milden Klinik eine untergeordnete Relevanz zu. Pathophysiologisch sind insbesondere die beiden Oberflächenmoleküle Hämagglutinin (*Abkürzung: HA*) und Neuraminidase (*Abkürzung: NA*) der Typen A und B bedeutsam. Virales HA vermittelt über die Interaktion mit Sialinsäuren von Membranproteinen die Bindung an die Wirtszelle. Das Enzym NA dient nach abgeschlossenem Vermehrungszyklus der Freisetzung der neu replizierten Viren aus der Zelle. Aus der Kombination der insgesamt 9 NA- und 18 HA-Varianten ergeben sich die jeweiligen Influenza-A-Subtypen (64). Für Influenza-B-Viren existieren keine Subtypen. In der Saison 2013/2014 bedeutend waren die Yamagata- und Victoria-Linie (65). Zur Angabe des Virusstammes existiert folgende Systematik, die auch in dieser Arbeit verwendet wird: Virustyp/Ort der erstmaligen Virusisolierung/ Nummer des Virusstammes/Jahr der Isolierung (bei Influenza A zusätzlich: Subtyp in der Form HxNx) (66). Influenzaviren unterliegen einer hohen genetischen Variabilität durch Punktmutationen (Antigendrift) und durch Austausch genetischen Materials zwischen Viren beim simultanen Befall einer Wirtszelle von unterschiedlichen Virussubtypen (Antigenshift). Bei ersterem entstehen nur Varianten eines Subtyps, während sich bei letzterem durch Neukombination von HA und NA neue Subtypen ergeben können.

Influenzaimpfung

Die bedeutendste medizinische Maßnahme liegt in der Schutzimpfung. Die Ständige Impfkommission (*Abkürzung: STIKO*) des Robert Koch-Institutes empfiehlt die Influenzaimpfung unter anderem als Indikationsimpfung bei Personen mit angeborenen oder erworbenen ID (67). Dies gilt auch für Patienten unter Ig-Substitution (68). Wegen

der häufigen genetischen Modifikationen zirkulierender Stämme durch die Phänomene Antigendrift und Antigen shift muss die Zusammensetzung des saisonalen Vakzins von der World Health Organization (*Abkürzung: WHO*) jährlich überprüft und entsprechend angepasst werden. Auch wenn die Zusammensetzung des Impfstoffes der vorhergehenden Saison entspricht, sollte im Herbst die saisonale Impfung mit dem aktuellen Vakzin gemäß der Empfehlung der WHO durchgeführt werden (67). Prinzipiell besteht die Möglichkeit eines Lebend- oder Totimpfstoffes. Ersterer ist bei COVID- und UAD-Patienten kontraindiziert (68, 69). Saisonale Totimpfstoffe enthalten Antigene zweier Influenza-A-Stämme und eines oder zweier Influenza-B-Stämme (trivalent oder tetravalenter Impfstoff).

Für den Schutz gegen Influenzaviren sind sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem relevant.

Die humorale Immunität wird vor allem durch Antikörper gegen HA vermittelt. Der Impferfolg kann über den Antikörpertiter durch das Verfahren des Hämagglutinationshemmtestes (*engl. hemagglutination inhibition assay; Abkürzung: HI*) quantifiziert werden. Gemäß der Kriterien des Ausschusses für Humanarzneimittel der Europäischen Arzneimittel-Agentur wird erst ab einer Vervierfachung des HI-Titers oder einem Titer-Anstieg auf $\geq 1:40$ bei vorheriger Serumnegativität nach erfolgter Impfung von einem serologischen Impfansprechen (Serokonversion) ausgegangen (70). Jedoch gibt das Kriterium der Serokonversion keine Auskunft über den vermittelten Schutz. Als protektiv wird allgemein ein Titer über 1:40 (Seroprotektion) gewertet (71), wobei höhere Titer insgesamt mit einer niedrigeren Rate an Influenzaerkrankungen assoziiert sind (71, 72).

Bei Kontakt mit Influenzaviren spielt auch die T-zelluläre Immunität eine wichtige Rolle (73), die über antigenspezifische T-Zellen vermittelt wird. Eine bedeutende Rolle in der Virusabwehr spielen spezifische T-Helferzellen Typ 1 und 2 (*Abkürzung: T_H1/T_H2 -Lymphozyten*), die nach Aktivierung aus naiven $CD4^+$ -T-Zellen entstehen. Vor allem T_H1 -Lymphozyten werden durch den Kontakt mit Influenzaviren stimuliert und sind für den Schutz gegen Influenza relevant (74, 75). Diese Zellen können anhand ihrer Zytokinproduktion identifiziert werden. Bedeutend sowohl für die Funktion als auch für die Charakterisierung dieser Zellen sind insbesondere die Zytokine Interferon gamma (*Abkürzung: $IFN\gamma$*), Tumornekrosefaktor alpha (*Abkürzung: $TNF\alpha$*) und Interleukin 2 (*Abkürzung: $IL2$*), die in unterschiedlichen Kombinationen produziert werden (76). In der Praxis wird die Höhe der T-zellulären Impfantwort und Immunität häufig anhand der

Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen und deren Zytokinproduktion bestimmt (76).

Stand der Forschung

Obwohl die CVID- und UAD-Diagnosekriterien ein eingeschränktes Impfansprechen aufführen, ist eine erfolgreiche humorale oder zelluläre Impfantwort durchaus möglich (45). Trotz fehlender Daten zur Häufigkeit und Schwere von Influenzainfektionen bei beiden Patientengruppen wird von einem erhöhten Risiko ausgegangen und die Impfung im Allgemeinen empfohlen (69). Das Ansprechen der Influenzaimpfung bei UAD-Patienten wurde bis dato noch nicht untersucht. Hinsichtlich der Effektivität dieser Impfung bei CVID-Patienten existieren insgesamt nur wenige Studien und die Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich.

In einer Studie von van Assen und Kollegen an 18 CVID-Patienten zeigten diese nach Gabe des trivalenten inaktivierten Vakzins (*Abkürzung: TIV*) der Saison 2006/2007 eine stark eingeschränkte humorale Impfantwort (77). Im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden wurden signifikant niedrigere Serokonversions- und Seroprotektionsraten gegen die Influenza-A-Subtypen A/H1N1 und A/H3N2 detektiert und die Impfung führte insgesamt in der CVID-Kohorte zu keiner statistisch signifikanten Zunahme der HI-Titer gegen die Impfstämme (77). Bei 15 dieser Patienten wurde zusätzlich durchflusszytometrisch die zelluläre Anti-Influenzaimmunität ermittelt. Nur in der Kontrollgruppe konnte eine Zunahme von A/H1N1- und A/H3N2-spezifischen CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺-T-Zellen nachgewiesen werden, während in der Patientenkohorte stattdessen im Verlauf eine Abnahme dieser Zellen beobachtet wurde (78). Auch in einem durchgeführten Enzyme-Linked ImmunoSpot (*Abkürzung: ELISpot*), bei dem sezerniertes IFN γ über gebundene Antikörper mithilfe eines Farbstoffes sichtbar gemacht wurde, konnte nur bei den Kontrollprobanden eine Zunahme der IFN γ -Produktion durch die Impfung beobachtet werden (78).

In Fallberichten aus Norwegen konnte hingegen bei zwei von drei CVID-Patienten eine spezifischen T-zelluläre Impfantwort gegen den A/California/7/2009 (H1N1) - ähnlichen Spaltvirus (X179a) nachgewiesen werden (79). Zur Bestimmung der zellulären Immunität wurde durchflusszytometrisch die Produktion von T_H1-Zytokinen gemessen. Mittels HI konnte ein humorales Impfansprechen in Form einer Serokonversion und Seroprotektion bei zwei Patienten nachgewiesen werden (79).

1.8) Fragestellung der Arbeit

Das Risiko für schwere und komplikationsträchtige Verläufe einer Influenzainfektion ist bei Patienten mit ID deutlich erhöht. Die bedeutendste medizinische Schutzmaßnahme liegt in der Impfung. Aus diesem Grund wird die saisonale Influenzaimpfung bei CVID- und UAD-Patienten empfohlen. Mit beiden Krankheiten kann jedoch gemäß der ESID-Diagnosekriterien eine erheblich eingeschränkte Impfantwort verbunden sein (8). Trotz des erhöhten Infektionsrisikos ist insgesamt über das Ansprechen der Influenzaimpfung bei beiden Erkrankungen nur wenig bekannt und die Datenlage ist teilweise widersprüchlich.

In der vorliegenden Arbeit wird daher die humorale und T-zelluläre Impfantwort von CVID- und UAD-Patienten nach Gabe des saisonalen TIV näher charakterisiert und mit gesunden Kontrollprobanden verglichen.

Zu diesem Zwecke wird Patienten und Kontrollprobanden der kommerziell erhältliche Grippeimpfstoff der Saison 2013/2014 verabreicht und deren Immunität gegen Influenza vor und nach der Impfung gemessen. Für die humorale Immunität wird der HI und für die zelluläre Impfantwort das Verfahren der Durchflusszytometrie verwendet.

2) Materialien

2.1) Patienten und Kontrollprobanden

Die Patientenrekrutierung erfolgte über die Immundefektambulanz für Erwachsene des Institutes für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Professor Dr. med. Carmen Scheibenbogen. Die Auswahl und Betreuung der Patienten wurden von Dr. med. Leif Gunnar Hanitsch wahrgenommen. Das durchgeführte Projekt wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (1964) und ihren späteren Erweiterungen akzeptiert. Von allen Patienten und Kontrollprobanden wurde vor Teilnahme an der Untersuchung nach erfolgter Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet.

Insgesamt wurden acht CVID-Patienten und acht UAD-Patienten in die Untersuchung eingeschlossen (Tabelle 3). Die Diagnosestellung und Klassifikation der Patienten erfolgte entsprechend der ESID-Kriterien (8) anhand der erhobenen immunologischen Parameter (Tabelle 4).

Tabelle 3: Charakterisierung der einzelnen CVID- und UAD-Patienten.

Zeichen der Enteropathie umfassen histologisch nachgewiesene Veränderungen oder rezidivierende nichtinfektiöse Diarrhöen. Abkürzungen: A.u. (Alopecia universalis), D.m. (Diabetes mellitus), GLILD (granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease), Ig (Immunglobulin), ITP (Immunthrombozytopenie), r.A. (rheumatoide Arthritis).

Patient	Geschlecht	Alter bei der Impfung	Letzte Influenza-impfung	Krankheitsmanifestation	Ig-Therapie
CVID 1	männlich	24 Jahre	2012/2013	Erhöhte Infektanfälligkeit	ja
CVID 2	männlich	37 Jahre	-	Erhöhte Infektanfälligkeit Zeichen der Enteropathie	ja
CVID 3	weiblich	54 Jahre	2012/2013	Erhöhte Infektanfälligkeit GLILD r.A. und A.u.	ja
CVID 4	weiblich	44 Jahre	-	Erhöhte Infektanfälligkeit ITP Hepatosplenomegalie	ja
CVID 5	weiblich	40 Jahre	2012/2013	Erhöhte Infektanfälligkeit	ja
CVID 6	männlich	51 Jahre	2009/2010	Erhöhte Infektanfälligkeit GLILD pulmonale Granulome Splénomegalie	ja
CVID 7	männlich	41 Jahre	-	Erhöhte Infektanfälligkeit Zeichen der Enteropathie Typ-A-Gastritis	ja
CVID 8	weiblich	53 Jahre	2012/2013	Erhöhte Infektanfälligkeit D.m. Typ I	ja
UAD 1	weiblich	67 Jahre	2012/2013	Erhöhte Infektanfälligkeit	nein
UAD 2	männlich	44 Jahre	2009/2010	Erhöhte Infektanfälligkeit	ja
UAD 3	weiblich	51 Jahre	-	Erhöhte Infektanfälligkeit	ja
UAD 4	weiblich	25 Jahre	-	Erhöhte Infektanfälligkeit	ja
UAD 5	männlich	24 Jahre	-	Erhöhte Infektanfälligkeit Zeichen der Enteropathie	ja
UAD 6	männlich	21 Jahre	-	Erhöhte Infektanfälligkeit Zeichen der Enteropathie Splénomegalie	ja
UAD 7	weiblich	21 Jahre	2010/2011	Erhöhte Infektanfälligkeit Hashimoto-Thyreoiditis und D.m. Typ I	ja
UAD 8	weiblich	27 Jahre	-	Erhöhte Infektanfälligkeit Hepatosplenomegalie	ja

Tabelle 4: Immunologische Parameter der einzelnen CVID- und UAD-Patienten.

Die angegebenen Ig-Werte wurden vor dem Beginn einer Substitutionstherapie erhoben. Abkürzungen: CD (cluster of differentiation), cs memBc (class-switched memory B cell), Ig (Immunglobulin).

Patient	Klassifikation		IgG (g/l)	IgA (g/l)	IgM (g/l)	CD4 ⁺ pro µl	CD19 ⁺ pro µl	% cs memBc von CD19 ⁺	% aktivierte B-Zellen von CD19 ⁺
	Frei- burg	Euro- Class							
CVID 1	II	smB ⁺ 21 ^{norm}	6,53	0,38	0,25	690	240	3,60	1,65
CVID 2	Ib	smB ⁺ 21 ^{low}	6,00	0,50	0,21	270	110	0,20	14,00
CVID 3	-	B ⁻	0,10	0,03	0,00	570	20	0,00	0,00
CVID 4	Ib	smB ⁺ 21 ^{low}	3,58	0,25	0,18	430	80	2,36	16,04
CVID 5	Ib	smB ⁺ 21 ^{norm}	3,69	0,59	0,40	690	190	1,00	2,70
CVID 6	Ia	smB ⁺ 21 ^{low}	0,50	0,01	0,04	670	30	1,42	23,93
CVID 7	-	B ⁻	0,10	0,01	0,01	560	0	0,00	0,00
CVID 8	Ib	smB ⁺ 21 ^{norm}	3,01	0,01	0,04	310	370	1,78	6,06
UAD 1	-	-	5,12	0,96	0,37	840	140	14,42	8,41
UAD 2	-	-	6,22	1,62	0,30	890	140	15,17	1,85
UAD 3	-	-	5,27	0,33	0,40	600	140	16,03	4,52
UAD 4	-	-	4,64	0,55	0,65	650	160	19,96	1,71
UAD 5	-	-	3,25	0,74	0,31	1260	230	24,51	3,31
UAD 6	-	-	3,72	0,31	0,03	600	230	18,69	3,80
UAD 7	-	-	4,03	0,36	0,82	370	490	7,12	2,26
UAD 8	-	-	6,15	1,47	0,22	820	190	5,60	1,25

Als gesunde Kontrollprobanden wurden neun Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin rekrutiert (Tabelle 5). Bei der Auswahl der Kontrollgruppe wurde nach Möglichkeit versucht eine vergleichbare Geschlechterverteilung und Altersstruktur zu erreichen (Tabelle 8).

Tabelle 5: Charakterisierung der einzelnen Kontrollprobanden.

Abkürzungen: Ig (Immunglobulin).

Kontrolle	Geschlecht	Alter bei der Impfung	Letzte Influenza-impfung	Krankheits-manifestation	Ig-Therapie
Kontrolle 1	männlich	26	2007/2008	-	nein
Kontrolle 2	weiblich	55	-	-	nein
Kontrolle 3	weiblich	29	-	-	nein
Kontrolle 4	weiblich	30	-	-	nein
Kontrolle 5	weiblich	30	2011/2012	-	nein
Kontrolle 6	männlich	36	2009/2010	-	nein
Kontrolle 7	männlich	25	2009/2010	-	nein
Kontrolle 8	männlich	58	2007/2008	-	nein
Kontrolle 9	männlich	30	2011/2012	-	nein

2.2) Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Sitz, Land
CombiTips Advanced® (5 ml;10 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Compensation Beads Anti-Mouse Ig, k	BD Biosciences, New Jersey, USA
Cryotubes (1.6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Heparinröhrchen Vacutainer® (10 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Konische Zentrifugenröhrchen Falcon® (50 ml)	Corning Incorporation, Corning, USA
Kulturröhrchen (14 ml)	Corning Incorporation, Corning, USA
Pipettenspitzen (10 µl;100 µl;1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße SafeSeal® (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rundbodengefäße (5 ml) (Polystyrene)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Serologische Pipetten Falcon® (2 ml;5 ml;10 ml;25 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Serumröhrchen Vacutainer® (8,5 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA

2.3) Reagenzien, Chemikalien, Puffer und Medien

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller, Sitz, Land
AB Serum (human)	Valley Biomedical, Virginia, USA
Ampuwa Spüllösung	Fresenius, Sèvres, Frankreich
Ampuwa Wasser für Injektionszwecke	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Biocoll Separating Solution	Biochrom, Berlin, Deutschland
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Dimethylsulfoxid (100%)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
FACS™ Clean Solution	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACSFlow™	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS™ Permeabilizing Solution 2	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS™ Rinse Solution	BD Biosciences, New Jersey, USA
Flebogamma, humanes IgG	BioTest, Dreieich, Deutschland
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
LIVE/DEAD Pacific Orange Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
PBS Dulbecco	Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA, New Jersey, USA
Staphylococcal Enterotoxin B von Staphylococcus aureus	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Trypanblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
VAXIGRIP® 2013/2014 (0,5 ml/Spritze)	Sanofi Pasteur MSD GmbH, Lehmen, Deutschland

Puffer und Medien	Inhaltsstoffe
EDTA	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Einfriermedium	IMDM, 1% L-Glutamin, 40% AB Serum, 10% Dimethylsulfoxid
FACS-Puffer	PBS, 2% Flebogamma
Formalin 37%	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Stimulationsmedium	IMDM, 1% L-Glutamin, 10% AB Serum, 1% Penicillin/Streptomycin

2.4) Antikörper

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Spezies	Hersteller, Sitz, Land
Anti-Human CD3	SK7	PerCP/Cy5.5	Maus	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Human CD4	RPA-T4	APC-H7	Maus	BD Bioscience, New Jersey, USA
Anti-Human CD154	TRAP1	PE	Maus	BD Bioscience, New Jersey, USA
Anti-Human IFN- γ	25723.11	FITC	Maus	BD Bioscience, New Jersey, USA
Anti-Human TNF- α	MAb11	PE-Cy7	Maus	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Human IL-2	MQ1-17H12	APC	Ratte	BD Bioscience, New Jersey, USA

2.5) Software

Software	Hersteller, Sitz, Land
EndNote X7	EndNote, Philadelphia, USA
FACSDiva™ Software Version 6.2	BD Biosciences, New Jersey, USA
FlowJo Version 9.6.4	Tree Star, Oregon, USA
GraphPad Prism Version 6.00	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SAP Version 7300.1.2.1080	SAP AG, Walldorf, Deutschland

2.6) Geräte

Gerät	Hersteller, Sitz, Land
Brutschrank Forma Steri-Cycle	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Durchflußzytometer LSRII	BD Biosciences, New Jersey, USA
Gefrierschrank -80°C UF755G	Dometic Medical Systems, Hosingen, Luxemburg
Gefrierschrank Premium NoFrost GN2553	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	Lec, Prescott, United Kingdom
Kühl-/Gefrierschrank Kombination KGK2833	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühl-/Gefrierschrank Kombination	Siemens, Berlin/München, Deutschland
Mikropipetten (0.5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop BX300	Will, Wetzlar, Deutschland
Multipipette Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus® Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Sterilbank HERAsafe® (Klasse II)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Sterilbank LaminAir 2010 1.2 (Klasse II)	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad WBT12	Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Zellzählkammer Neubauer (0.100 mm/0.0025 mm ²)	Laboroptik, Lancing, United Kingdom
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

3) Methodik

3.1) Erhebung von Patientendaten

Die Dokumentation von klinischen und labormedizinischen Patientendaten der Immundefektambulanz für Erwachsene des Institutes für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin erfolgt mit dem Programm SAP. Um eine bestehende Infektanfälligkeit näher zu charakterisieren, wurde bei der Sichtung der Krankenakten gezielt auf das Vorhandensein unterschiedlicher rezidivierender Infekte des Respirationstraktes, des GIT und des Urogenitaltraktes, sowie die Notwendigkeit einer Ig-Substitution und anderer Therapieverfahren geachtet. Darüber hinaus wurde das Vorliegen von klinischen oder histologischen Zeichen einer Enteropathie, von Autoimmunität, von Hepatosplenomegalien, von Lymphadenopathien, von granulomatösen Veränderungen und von Malignomerkrankungen berücksichtigt. An laborchemischen Parametern wurden die Zellzahlen der B- und T-Lymphozytenpopulationen sowie die Serumspiegel von IgG, IgM und IgA vor dem Start einer Ig-Substitution erfasst. Falls im Krankheitsverlauf eine Ig-Substitutionstherapie begonnen werden musste, wurden nur die Spiegel vor dem Beginn einer Substitution berücksichtigt. Zudem wurde die Entwicklung der Laborparameter im Verlauf der Betreuung durch das ärztliche Team der Immundefektambulanz begutachtet, um Therapieeffekte und Krankheitsentwicklung zu berücksichtigen. Für die Einteilung der Patienten gemäß der EuroClass- und der Freiburger-Klassifikation wurden die zum Zeitpunkt der Sichtung aktuellen Laborparameter verwendet.

Um den Einfluss vorheriger Impfungen auf das Messergebnis zu berücksichtigen, wurde bei den Patienten und den Kontrollprobanden die zuletzt durchgeführte Influenzaimpfung bis einschließlich der Saison 2007/2008 erfasst. Zur Evaluation des Impferfolges gegen Polysaccharid-Antigene wurden retrospektiv die im Rahmen der Routinediagnostik gemessenen spezifischen IgG und IgG₂-Serumspiegel vor und nach der Impfung mit dem Vakzin PNEUMOVAX® 23 begutachtet.

3.2) Impfung mit TIV

Die Influenzaimpfung der Patienten und der gesunden Kontrollprobanden wurde im Zeitraum von Oktober 2013 bis Januar 2014 durchgeführt. Das TIV VAXIGRIP® 2013/2014, welches zu den nicht-adjuvantierten Spaltimpfstoffen zählt, wurde

intramuskulär mit einer Impfdosis von 0,5 ml verabreicht. Die Injektionssuspension einer Fertigspritze des Jahres 2013/2014 enthielt entsprechend den Empfehlungen der WHO gespaltene und inaktivierte Bestandteile der folgenden drei Virusstämme:

- A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 - davon abgeleiteter verwendeter Stamm NYMC X-179A (15 µg HA)
- A/Victoria/361/2011 (H3N2) - entsprechender verwendeter Stamm NYMC X-223A, abgeleitet von A/Texas/50/2012 (15 µg HA)
- B/Massachusetts/02/2012 (15 µg HA)

Die Impfung wurde von allen Patienten und Kontrollprobanden gut vertragen.

Patienten und Kontrollprobanden wurde vor und nach intramuskulärer Applikation des Vakzins jeweils 10 ml Blut über ein Serumröhrchen und 20 ml Blut über ein Heparin-Röhrchen abgenommen. Die erste Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor der Impfung. Lediglich bei zwei Kontrollprobanden wurde diese aus organisatorischen Gründen um 3 Tage und um 18 Tage vorgezogen. Die zweite Blutprobe wurde circa drei bis sechs Wochen nach der Impfung abgenommen.

Zum Zeitpunkt der Impfung erhielten mit Ausnahme eines UAD-Patienten alle Patienten eine regelmäßige Substitutionstherapie mit IgG. Um eine Einflussnahme möglicherweise enthaltener Influenzaantikörper in den Ig-Präparaten auf das Messergebnis zu minimieren, wurden Impfung und Blutentnahmen immer unmittelbar vor der Gabe der Substitution durchgeführt.

3.3) Bestimmung der zellulären Immunität gegen Influenzaviren

3.3.1) Isolierung von mononukleären Zellen

Im Anschluss an die Blutentnahme erfolgte die Aufbereitung der Blutproben unter sterilen Bedingungen. Zu den abgenommenen 20 ml heparinisiertem Vollblut wurde zunächst 15 ml phosphatgepufferte Salzlösung (*engl. phosphate buffered saline; Abkürzung: PBS*) hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe vorsichtig auf 15 ml Ficoll überschichtet. In der nachfolgenden Dichtegradientenzentrifugation für 15 Minuten bei 20°C und 850g verteilten sich die Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte entlang eines Dichtegradienten (Abbildung 5).

Das synthetisch hergestellte Ficoll ist ein neutrales, hochmolekulares und hydrophiles

Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin. Dieses fungiert als Trennschicht für zelluläre Bestandteile, welches nur Zellen höherer Dichte passieren lässt. Dazu zählen Erythrozyten, tote Zellen und Granulozyten. Zwischen der Ficoll-Schicht und der darüberliegenden Blutplasma-/Thrombozyten-Schicht bildet sich die Schicht der peripheren mononukleären Blutzellen (*engl. peripheral blood mononuclear cells; Abkürzung: PBMCs*). Zu PBMCs zählen Lymphozyten und Monozyten. Zwecks Isolierung dieser Zellen wurde mit einer Pipette diese Interphase (PBMCs) vorsichtig abgesaugt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend mit PBS aufgefüllt. Nach Zentrifugation mit 2000g bei 20°C für 10 Minuten wurde der Überstand abgossen und das Zellpellet mit 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in zwei vorgekühlte Einfriereröhrchen überführt und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

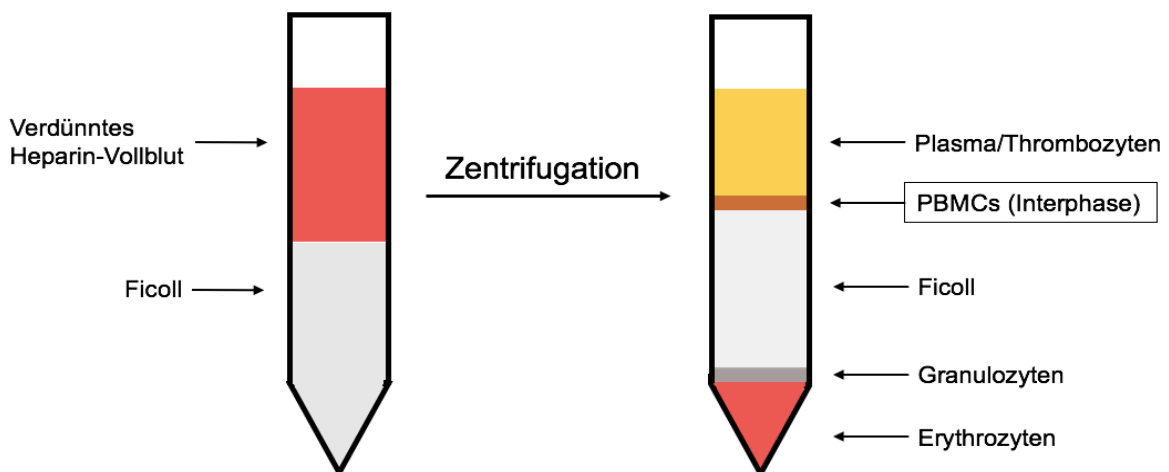


Abbildung 5: Isolierung von peripheren mononukleären Zellen.

Nach Überschichtung des heparinisierten Vollbluts auf das Polysaccharid Ficoll verteilen sich die Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte in der anschließenden Zentrifugation. PBMCs bilden die Interphase zwischen der Ficoll-Schicht und der darüberliegenden Plasma-/Thrombozyten-Schicht. Abkürzungen: PBMCs (peripheral blood mononuclear cells).

3.3.2) Auftauen der Proben

Um die Proben möglichst schonend aufzutauen, wurden die tiefgefrorenen Zellpellets unter Einsatz von 20 ml eines erwärmten IMDM-Mediums mit 5% AB Serum und 1% L-Glutamin resuspendiert. Die folgende Zentrifugation erfolgte für 10 Minuten bei 2000g und 20°C. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in ein

Zentrifugenröhrchen mit 1,5 ml Stimulationsmedium überführt. Bis zur Weiterbehandlung wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.3.3) In vitro Stimulation der Proben

Nach Ablauf von drei Stunden wurden die Zellen jeder Probe auf drei Ansätze verteilt, wobei pro Ansatz ein Endvolumen von 0,5 ml verwendet wurde. Zu Ansatz eins, der Negativkontrolle, wurde kein Stimulans hinzugegeben. Ansatz zwei, die Positivkontrolle, wurde mit 3 µg/ml Staphylokokken Enterotoxin B (*Abkürzung: SEB*) versetzt. Dieses Protein wird von Stämmen des Staphylococcus aureus produziert. SEB führt als Superantigen zu einer starken antigenunabhängigen Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten. Zentraler Bestandteil der Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten und der nachfolgenden Zytokinfreisetzung ist die Interaktion zwischen dem spezifischen T-Zell-Rezeptor (*Abkürzung: TZR*) und dem major histocompatibility complex II (*Abkürzung: MHC*) nach erfolgter Antigenprozessierung. SEB bindet an den MHC-Klasse-II-Komplex außerhalb der Antigenbindungsstelle und an den variablen Anteil der β-Kette des TZR (80). Diese Bindung führt zu einer starken Aktivierung von bis zu 30% der T-Lymphozyten und bewirkt darüber eine vermehrte Freisetzung von Zytokinen (80).

In dem dritten Ansatz wurden die Zellen zur Ermittlung der influenzaspezifischen Immunantwort *in vitro* mit dem Vakzin VAXIGRIP® 2013/2014 stimuliert. Zur Bestimmung der optimalen Stimulationsdosis wurde vorab ein Dosisfindungsversuch an PBMCs von drei gesunden Kontrollprobanden durchgeführt, dessen Arbeitsschritte und Auswertung dem im Folgenden beschriebenen Versuchsaufbau entsprachen. Eingesetzt wurden 1 µg/ml, 3 µg/ml und 6 µg/ml des Vakzins, wobei sich bei 3 µg/ml im Durchschnitt das beste Ergebnis zeigte (siehe Abschnitt 4.5) und somit diese Dosis in allen weiteren Versuchen verwendet wurde.

Nach Zugabe des Impfstoffes und des Superantigens SEB wurden alle Ansätze für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde 7,5 µg/ml Brefeldin A (*Abkürzung: BFA*) pro Ansatz hinzugegeben. Dieses Lacton-Antibiotikum ist ein potenter Inhibitor der zellulären Proteinsekretion. Unter der Exposition von BFA zerfallen die Strukturen des Golgi-Apparats und es kommt zur Rückverlagerung von dessen Bestandteilen in das Endoplasmatische Retikulum (81). In der Folge kommt es zur intrazellulären Akkumulation von sekretorischen Proteinen. Alle Ansätze wurden danach für 18 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.3.4) Prinzip und Methodik der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Zellen anhand ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften.

Grundsätzlich besitzt ein Durchflusszytometer ein Flüssigkeitssystem, das der Fokussierung und dem Transport der Zellen in eine Messzelle dient (Abbildung 6).

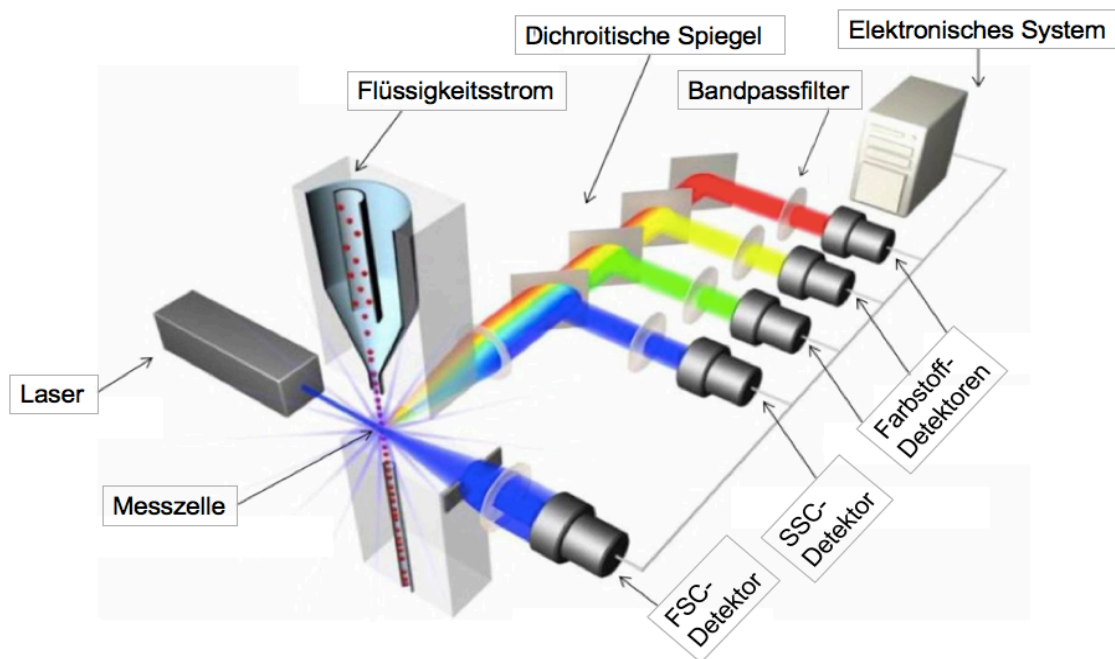


Abbildung 6: Prinzip der Durchflusszytometrie.

In Anlehnung an (82). Für Details siehe Text. Abkürzungen: FSC (forward scatter), SSC (side scatter).

Durch hydrodynamische Fokussierung werden einzelne Zellen aus einer Suspension nacheinander in eine lichtdurchlässige Küvette gesaugt und an Detektoren der Messzelle vorbeigeführt. Als Lichtquelle fungiert ein Laser, der auf den Flüssigkeitsstrom gerichtet ist. Durchquert eine einzelne Zelle oder zelluläre Struktur die Messzelle, dann wird das Lasersignal gestreut. Dabei wird nur die Richtung, nicht jedoch die Wellenlänge verändert. Jedes Durchflusszytometer verfügt über zwei Streulichtdetektoren, die das gemessene Signal in Form eines Spannungsimpulses erfassen. Der Vorwärtstreulicht-Detektor (*engl. forward scatter; Abkürzung: FSC*) detektiert das Lichtsignal, das in derselben Achse wie der Lichtstrahl gebeugt wird. Der Seitwärtstreulicht-Detektor (*engl. side scatter; Abkürzung: SSC*) registriert das Streulicht, das im rechten Winkel zur Achse des Laserstrahls abgelenkt wird. Das

Vorwärtstreulicht entsteht durch Beugung an der Zelloberfläche und korreliert somit insbesondere mit dem Zellvolumen. Das Seitwärtstreulicht hingegen ist zusätzlich abhängig von der zellulären Komplexität. Aus der Kombination der beiden morphologischen Messparameter FSC und SSC können einzelne Zellpopulationen voneinander abgegrenzt werden.

Zur genaueren Bestimmung des zellulären Immunphänotyps werden fluoreszierende Farbstoffe genutzt. Wird die Zelle mit einem solchem Farbstoff markiert, dann entsteht neben dem Streulicht auch Fluoreszenzlicht. Fluoreszierende Moleküle werden durch Licht einer charakteristischen Wellenlänge über die Anhebung eines Elektrons in einen aktivierten Zustand versetzt und emittieren bei Rückkehr in den energieärmeren Grundzustand ein Photon. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist dabei immer langwelliger als das anregende Lichtsignal. Das abgegebene Signal wird durch variabel positionierte dichroitische Spiegel und Bandpassfilter gefiltert, auf die entsprechenden Detektoren gelenkt und von diesen in Form eines Spannungsimpulses erfasst. Durch die synchrone Messung von mehreren Farbstoffen können multiple zelluläre Eigenschaften untersucht und miteinander korreliert werden.

Die Bindung des Farbstoffes an die Zelle erfolgt durch Koppelung an Antikörper, die spezifisch die entsprechenden intra- oder extrazellulären Antigene binden. Bei dem Einsatz mehrerer Farbstoffe kommt es zur teilweisen Überlagerung der Absorptions- und Emissionsspektren. Zur Korrektur wird vor der Messung daher eine Kompensation durchgeführt. Mit dieser wird rechnerisch der Anteil des Signales eliminiert, der durch spektrale Überschneidung entsteht.

Zur Messung wurde das Durchflusszytometer LSRII (BD Biosciences) unter Einsatz der Software FACSDiva™ verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo.

3.3.5) Immunfärbung für die durchflusszytometrische Messung

Nach der Stimulation der Proben erfolgte die Immunfärbung für die spätere durchflusszytometrische Messung. Ziel dieser Färbung war es zum einen durch Einsatz von extrazellulären Antikörpern aktivierte CD4⁺-T-Lymphozyten zu identifizieren. Zum anderen konnte anhand der durchgeführten intrazellulären Färbung über die Messung der Zytokinexpression diese Aktivierung quantifiziert werden.

Zunächst wurden die Proben im Anschluss an die Inkubation mit 1 ml PBS mit 2% Flebogamma versetzt und für zwei Minuten bei 1200g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellpellets in 500 µl Ethylendiamintetraessigsäure

(Abkürzung: EDTA) aufgenommen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur (Abkürzung: RT) belassen. EDTA ist ein Chelator und diente der Loslösung der Zellen des Pellet voneinander. Nach einem anschließenden Waschschrift mit 500 µl kaltem PBS mit 2% Flebogamma und einer Zentrifugation für zwei Minuten bei 1200g erfolgte die extrazelluläre Färbung bei 4°C im Dunkeln für 30 Minuten. Durch den eingesetzten Farbstoff LIVE/DEAD Pacific Orange können durchflusszytometrisch tote von vitalen Zellen unterschieden werden. Dieser Farbstoff kann nur bei beschädigter Zellmembran in die Zelle eindringen und mit intrazellulären Proteinen (Amine) interagieren. Bei intakter Zellmembran können nur Membranproteine gebunden werden, wodurch sich eine deutlich schwächere Anfärbung der Zelle ergibt. Die restlichen Antikörper dienten der Phänotypisierung der Leukozyten in der späteren Durchflusszytometrie. Die Zusammensetzung der extrazellulären Färbung ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der extrazellulären Färbung.

Substrat	µl Volumen/Ansatz
LIVE/DEAD Pacific Orange	2
Anti-Human CD3 PerCP/Cy5.5	1
Anti-Human CD154 PE	20
Anti-Human CD4 APC-H7	3

Nach 30 Minuten erfolgte durch Zugabe von 500 µl FACS™ Lysing Solution pro Ansatz die Lyse verbliebener Erythrozyten. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten bei RT wurden durch einen wie oben beschriebenen Waschschrift nicht gebundene Antikörper entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 250 µl FACS™ Permeabilizing Solution 2 für 10 Minuten bei RT im Dunkeln aufgenommen. Ziel dieses Schrittes war die Permeabilisierung der lymphozytären Zellmembran, damit die danach zugegebenen Antikörper zu deren intrazellulären Zielantigenen gelangen konnten. An einen weiteren Waschschrift schloss sich die intrazelluläre Färbung an. Die korrespondierenden Antigene der verwendeten Antikörper umfassten die drei Zytokine IFN γ , TNF α und IL2. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper der intrazellulären Färbung und deren Volumina gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Zusammensetzung der intrazellulären Färbung.

Substrat	µl Volumen/Ansatz
Anti-Human IFN- γ FITC	15
Anti-Human TNF- α PE-Cy7	0,5
Anti-Human IL-2 APC	1

Die Färbung erfolgte unter Lichtausschluss bei 4°C für insgesamt 45 Minuten. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit 100 µl 0,5% Formalin in PBS fixiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

3.3.6) Gating-Strategie

Ziel der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten war die Evaluation von IFN γ -, TNF α - und IL2-produzierenden aktivierten CD4⁺-T-Lymphozyten als Korrelat der spezifischen zellulären Immunität gegen Bestandteile des Vakzins VAXIGRIP® 2013/2014.

In Abbildung 7 ist beispielhaft die Gating-Strategie einer Messprobe dargestellt.

Bei der Auswertung wurde der Datensatz durch Anlage unterschiedlicher Messparameter schrittweise gefiltert, um schlussendlich darüber die gesuchten Zielpopulationen zu erhalten.

Zunächst erfolgte die morphologische Charakterisierung der Zellen durch Analyse des Streulichtverhaltens. Auf der Abszisse wurde die FSC und auf der Ordinate die SSC aufgetragen. Jeder Punkt entsprach einer Zelle. Durch die graphische Darstellung entstanden Anhäufungen von Zelltypen mit ähnlichen Streueigenschaften und die Leukozytenpopulation konnte so in typischer Lage und Konfiguration identifiziert werden. Jeder durch Zellen generierte Spannungsimpuls ist definiert durch Weite, Höhe (*engl. height*) und Fläche (*engl. area*) als Produkt aus den ersteren beiden. Dies findet Ausdruck in den Messparametern forward scatter height (*Abkürzung: FSC-H*) und forward scatter area (*Abkürzung: FSC-A*). Nur einzelne Zellen gruppieren sich in einem FSC-H-FSC-A-Graphen entlang der Diagonalen und können so von Zelldoubletten und Zellhaufen abgegrenzt werden. Nach Identifizierung von einzelnen Leukozyten wurden mit Hilfe des Farbstoffes LIVE/DEAD Pacific Orange tote stark gefärbte von vitalen gering gefärbten Zellen unterschieden. Anschließend wurden zunächst über die

Expression von CD3⁺ T-Lymphozyten selektiert und dann die Subpopulation von CD4⁺-T-Lymphozyten identifiziert.

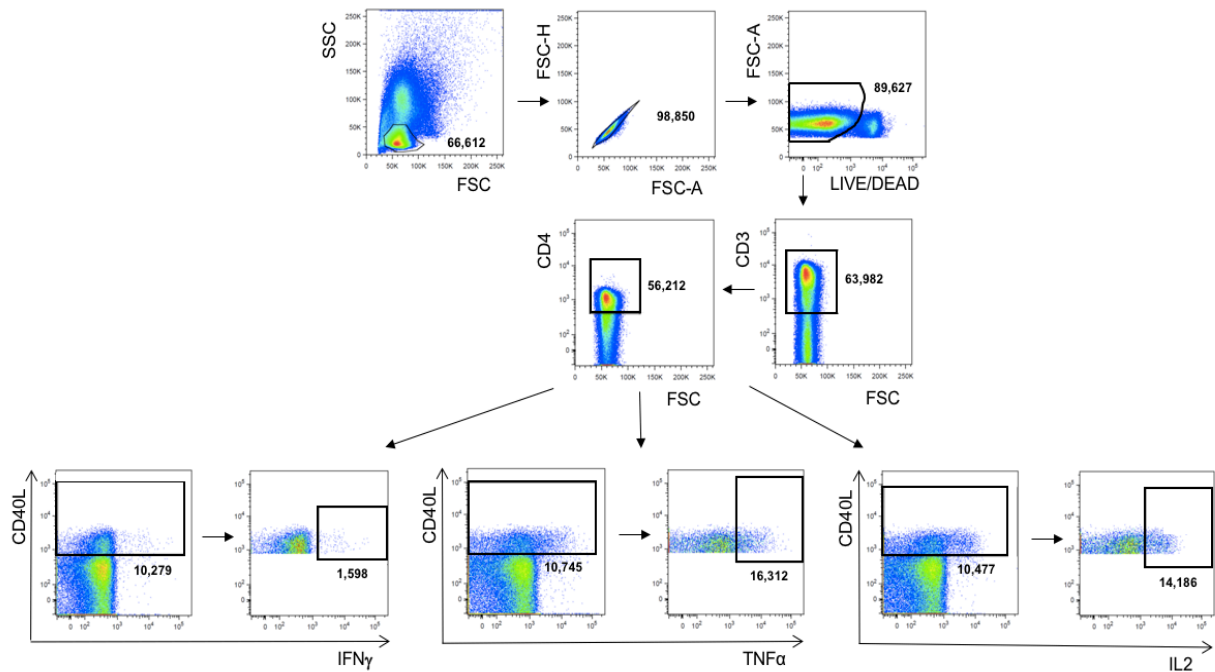


Abbildung 7: Überblick über die gewählte Gating-Strategie.

Die Zellen jeder Probe wurden nach den an den Achsen dargestellten Parametern schrittweise analysiert. Der schwarz umrahmte Bereich stellt die identifizierte Zellpopulation dar, die im nächsten Diagramm weiter untersucht wurde. Die angegebenen Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil der ausgewählten Zellen an der Gesamtzellzahl des Graphen. In den unteren CD40L/Zytokin-Graphen sind die drei gesuchten Zielpopulationen abgebildet. Für Details siehe Text. Abkürzungen: CD40L (CD40 Ligand), FSC (forward scatter), FSC-A (forward scatter area), FSC-H (forward scatter height), SSC (side scatter).

Zur Bestimmung von aktivierten CD3⁺CD4⁺-T-Lymphozyten wurde die gewählte Zellpopulation anhand der Expression von CD40 Ligand (*Abkürzung: CD40L*), welches auch als CD154 bezeichnet wird, weiter untersucht. Dieses Oberflächenmolekül kann innerhalb einiger Stunden nach Stimulation nachgewiesen werden und spielt als kostimulatorisches Signal eine zentrale Rolle in der T-B-Zell-Kooperation (83). Die Interaktion zwischen CD40L (T-Zelle) und CD40 (B-Zelle) aktiviert in beiden Zellen intrazelluläre Signalwege, die zur Differenzierung und Proliferation führen (83). Über die Auftragung von CD40L/Zytokin konnten anschließend die jeweils gesuchten aktivierten CD3⁺CD4⁺CD40L⁺IFN γ ⁺/TNF α ⁺/IL2⁺-T-Zellen identifiziert werden.

Das Ergebnis der unstimulierten Negativkontrolle entsprach der unspezifischen

Zellstimulation. Die spezifische Immunität gegen das Vakzin ergab sich aus der Differenz der Ergebnisse der mit VAXIGRIP® 2013/2014 stimulierten Probe und der entsprechenden Negativkontrolle.

Die bei jeder Messprobe mitgeführte Positivkontrolle fungierte als Qualitätskontrolle. Als Kriterium einer erfolgreichen Positivkontrolle wurde mindestens eine Verdopplung des Messergebnisses der Negativkontrolle angesetzt.

3.4) Bestimmung der humoralen Immunität gegen Influenzaviren

3.4.1) Isolierung von Blutseren

Zur Messung der antikörpervermittelten Immunität gegen Influenzaviren wurde gemeinsam mit der Entnahme von Heparin-Blut bei den Patienten und den Spendern jeweils vor und nach der Impfung 10 ml Blut über ein Serumröhrchen abgenommen. Im Anschluss an die Blutentnahme wurde nach einer Zwischenlagerung von 30 Minuten bei RT das Serumröhrchen bei 20°C für 10 Minuten bei 2000g zentrifugiert. Der klare Überstand (Blutserum) wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

3.4.2) Hämagglutinationshemmtest

Die Messung der humoralen Impfantwort erfolgte mittels HI. Dieser wurde freundlicherweise von der Arbeitsgemeinschaft Influenza des Robert Koch-Institutes durchgeführt. Zur Bestimmung des Impferfolges wurde der HI-Titer gegen das Virusprotein HA der Stämme A/California/7/2009, A/Texas/50/2012 und B/Massachusetts/02/2012 ermittelt. Vor der Messung wurden zunächst mögliche enthaltene unspezifische Inhibitoren in den Blutseren enzymatisch zerstört, wodurch sich eine initiale Verdünnung von 1:10 ergab. Anschließend wurden die Blutseren seriell in der Reihe 1:20, 1:40 und so weiter bis 1:2560 verdünnt. Nach der Zugabe einer Virussuspension mit den Antigenen der oben genannten Virusstämme wurden die Proben für 30 Minuten bei RT belassen. Danach wurden frisch präparierte Erythrozyten aus Putenblut hinzugegeben und für weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Bei Kontakt von viralem HA mit Strukturen der Erythrozytenmembran kommt es zu einer Agglutinationsreaktion. Enthielt die untersuchte Probe Antikörper, dann führte die einsetzende Antigen-Antikörper-Reaktion zur Inaktivierung des viralen HA und die Agglutination unterblieb. Die letzte Verdünnungsstufe bei der es zu keiner Agglutination

kam, entsprach dem Kehrwert des gesuchten Antikörpertiters. Ein Titer unter 1:10 wurde als serologisch negativ aufgefasst.

3.5) Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse und zur graphischen Darstellung wurden die Programme GraphPad Prism und Microsoft Excel verwendet. Es wurden nicht-parametrische statistische Verfahren angewendet. Unter der Annahme einer nicht-gaußschen Wahrscheinlichkeitsverteilung bei gepaarten Stichproben erfolgte die Auswertung der Daten mit dem Wilcoxon matched-pairs signed rank Test. Zur Analyse ungepaarter nicht-normalverteilter Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Ergebnisse wurden einzeln, als Median oder als Mittelwert unter Berücksichtigung des Interquartilsabstandes oder der SD angegeben. Zur Analyse des x-fachen Anstieges der Frequenzen Zytokin-produzierender CD4⁺CD40L⁺-Zellen wurde das 95%-Konfidenzintervall (*Abkürzung: KI*) des geometrischen Mittels berechnet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ gewertet.

4) Ergebnisse

Die Rekrutierung der Kontrollprobanden und deren Blutentnahmen erfolgte durch Jan Florian Mieves. Die Patientenrekrutierung erfolgte durch das ärztliche Personal über die Immundefektambulanz für Erwachsene des Institutes für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin. An der Charakterisierung der drei Stichproben war Jan Florian Mieves wesentlich beteiligt.

Alle Untersuchungen mit Ausnahme des Hämagglutinationshemmtestes sowie die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden von Jan Florian Mieves eigenständig durchgeführt. Die graphische Darstellung und Interpretation der Ergebnisse erfolgte maßgeblich durch Jan Florian Mieves.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

1) Leif Gunnar Hanitsch, Madlen Löbel, Jan Florian Mieves, Sandra Bauer, Nina Babel, Brunhilde Schweiger, Kirsten Wittke, Patricia Grabowski, Hans-Dieter Volk, Carmen Scheibenbogen, Cellular and humoral influenza-specific immune response upon vaccination in patients with common variable immunodeficiency and unclassified antibody deficiency, *Vaccine*, 2016.

2) Jan Florian Mieves, Kirsten Wittke, Helma Freitag, Hans-Dieter Volk, Carmen Scheibenbogen, Leif Gunnar Hanitsch, Influenza Vaccination in Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID), *Current Allergy and Asthma Reports*, 2017.

Die nachfolgenden Tabellen und Abbildungen sind zum Teil in der erstgenannten Veröffentlichung zu finden oder wurden an dieser orientiert.

4.1) Charakterisierung der Kohorten

4.1.1) Demographische Daten der Kohorten

Die Geschlechterverteilung betrug 1:1 bei den CVID-Patienten. Drei UAD-Patienten waren männlich, fünf weiblich. Das durchschnittliche Alter bei der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014 betrug bei dem CVID-Kollektiv 43 Jahre bei einer Altersspanne von 24 bis 54 Jahren (SD: 10 Jahre; Median: 43 Jahre) und bei dem UAD-Kollektiv 35 Jahre bei einer Altersspanne von 21 bis 67 Jahren (SD: 17 Jahre; Median: 26 Jahre).

Als gesunde Kontrollprobanden konnten fünf Männer und vier Frauen rekrutiert werden, wobei bei einem Alter von 25 bis 58 Jahre der Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Impfung bei 35 Jahren lag (SD: 12 Jahre; Median: 30 Jahre).

Sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollprobanden wurde nur die zuletzt durchgeführte Influenzaimpfung bis einschließlich der Saison 2007/2008 berücksichtigt. Vor Teilnahme an der Untersuchung war die Impfquote in der CVID-Kohorte (63%) und Kontroll-Kohorte (67%) vergleichbar. Bei einer Impfquote von 37% wurden UAD-Patienten im Vergleich weniger häufig geimpft.

Die demographischen Daten aller Kohorten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Demographische Daten der Kontrollprobanden, der CVID- und der UAD-Patienten.

Abkürzungen: n.a. (nicht anwendbar), SD (standard deviation).

	CVID-Patienten	UAD-Patienten	Kontrollprobanden
Anzahl	8	8	9
Geschlechterverteilung (männlich/weiblich)	4 (50%)/ 4 (50%)	3 (37%) /5 (63%)	5 (56%) /4 (44%)
Mittleres Alter bei der Impfung ± SD (Median)	43 ± 10 Jahre (43 Jahre)	35 ± 17 Jahre (26 Jahre)	35 ± 12 Jahre (30 Jahre)
Mittleres Alter bei Erst-diagnose ± SD (Median)	42 ± 10 Jahre (42 Jahre)	33 ± 17 Jahre (25 Jahre)	n.a. (n.a.)
Impfquote bis einschließlich Der Saison 2007/2008	5/8 (63%)	3/8 (37%)	6/9 (67%)

4.1.2) Immunologische Parameter der CVID- und UAD-Kohorte

Immunglobuline

Bei allen CVID- und UAD-Patienten wurden die Ig-Spiegel der Klassen IgG, IgA und IgM erfasst. Mediane und Mittelwerte unter Beachtung der SD der oben genannten Ig-Klassen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Gemäß der ESID-Kriterien (8) wurden bei allen CVID-Patienten erniedrigte Konzentrationen von IgG und IgA mit erniedrigtem (87%) oder grenzwertig normalem (13%) IgM gemessen. Die UAD-Patienten zeigten zu 100% (IgG), zu 50% (IgA) und zu 63% (IgM) erniedrigte Ig-Spiegel. Entsprechend konnten im UAD-Kollektiv insgesamt höhere Serumkonzentrationen von IgA (p=0,0204) und IgM (p=0,0298) nachgewiesen werden, während für IgG keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet

wurden (p=0,1009).

Tabelle 9: Mediane und Mittelwerte von IgG, IgA und IgM der CVID- und UAD-Patienten vor der Einleitung einer Ig-Substitution.

Referenzwerte nach Angaben des durchführenden Labors (Labor Berlin-Charité Vivantes GmbH). Abkürzungen: Ig (Immunglobulin), SD (standard deviation).

Ig-Klasse	Mittelwert ± SD	Median	Bereich	Einheit	Referenzbereich
IgG	2,94 ± 2,54 (CVID)	3,30 (CVID)	0,10 - 6,53 (CVID)	(g/l)	7,00 - 16,00
	4,80 ± 1,09 (UAD)	4,88 (UAD)	3,25 - 6,22 (UAD)		
IgA	0,22 ± 0,24 (CVID)	0,14 (CVID)	0,01 - 0,59 (CVID)	(g/l)	0,70 - 4,00
	0,79 ± 0,52 (UAD)	0,65 (UAD)	0,31 - 1,62 (UAD)		
IgM	0,14 ± 0,14 (CVID)	0,11 (CVID)	0,00 - 0,40 (CVID)	(g/l)	0,40 - 2,30
	0,39 ± 0,25 (UAD)	0,34 (UAD)	0,03 - 0,82 (UAD)		

B- und T-Zellen

In Tabelle 10 sind für die beiden Patientengruppen die erhobenen Zellzahlen von B- und T-Lymphozyten sowie deren Subpopulationen dargestellt.

Tabelle 10: Mediane und Mittelwerte der Lymphozytenpopulationen der CVID- und UAD-Patienten.

Referenzwerte nach Angaben des durchführenden Labors (Labor Berlin-Charité Vivantes GmbH). Abkürzungen: CD (cluster of differentiation), cs memBc (class-switched memory B cell), Ig (Immunglobulin).

Zelltyp (Phänotyp)	Mittelwert	Median	Bereich	Einheit	Referenzbereich
CD4 ⁺ -Zellen	520 (CVID) 750 (UAD)	570 (CVID) 740 (UAD)	270 - 690 (CVID) 370 - 1260 (UAD)	x/μl	500 - 1200
CD19 ⁺ -Zellen	130 (CVID) 220 (UAD)	100 (CVID) 180 (UAD)	0 - 370 (CVID) 140 - 490 (UAD)	x/μl	100 - 400
cs memBc (CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	1,30 (CVID) 15,19 (UAD)	1,21 (CVID) 15,60 (UAD)	0,00 - 3,60 (CVID) 5,60 - 24,51 (UAD)	% von CD19 ⁺	6,50 - 29,10
aktivierte B-Zellen (CD21 ^{low} CD38 ^{low})	8,05 (CVID) 3,39 (UAD)	4,38 (CVID) 2,79 (UAD)	0,00 - 23,93 (CVID) 1,25 - 8,41 (UAD)	% von CD19 ⁺	0,90 - 7,60
transitionale B-Zellen (CD38 ^{high} IgM ^{high})	5,35 (CVID) 3,89 (UAD)	3,23 (CVID) 3,07 (UAD)	0,00 - 19,75 (CVID) 0,88 - 8,64 (UAD)	% von CD19 ⁺	0,60 - 3,40

Die Anzahl der cs memBc der CVID-Kohorte lag bei einem Median von 1,21%

(Mittelwert: 1,30%) in einem Bereich zwischen 0 und 3,6%. Alle CVID-Patienten zeigten demgemäß verminderte cs memBc mit Frequenzen unter 4,55% und damit eine Verminderung auf unter 70% des Referenzwertes von 6,5%.

Im Vergleich wurden in der UAD-Kohorte höhere Frequenzen von cs memBc gemessen ($p=0,0002$). Kein UAD-Patient wies cs memBc unter 4,55% auf, wobei bei einem Median von 15,60% (Mittelwert: 15,19%) 5,60% den niedrigsten und 24,51% den höchsten Wert darstellte. Insgesamt zeigten die CVID-Patienten im Trend höhere Frequenzen von transitionalen und aktivierten B-Zellen, wobei die Unterschiede keine statistische Signifikanz erlangten ($p>0,9999$ und $p=0,6968$).

Sowohl für CD19⁺-Zellen als auch für CD4⁺-Zellen wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten detektiert ($p=0,1677$ und $p=0,0775$).

Bei allen teilnehmenden Patienten lagen die CD4⁺-T-Lymphozyten über 200/ μ l, so dass eine stark eingeschränkte T-zelluläre Immunität unwahrscheinlich ist.

Impfantwort auf Polysaccharid-Antigene

Zur Evaluation der Impfantwort auf Polysaccharide wurde retrospektiv die humorale Immunität gegen Pneumokokken vor und nach erfolgter Impfung mit PNEUMOVAX® 23 begutachtet. Bei sieben der teilnehmenden acht CVID-Patienten ließ sich keine positive Impfantwort beobachten, wobei als Kriterium mindestens eine Verdopplung der initialen IgG- und IgG₂-Konzentration der spezifischen Anti-Pneumokokken-Kapsel-Polysaccharid-Antikörper gefordert wurde. Lediglich CVID-Patient 1 erfüllte dieses Kriterium. Hingegen zeigten alle UAD-Patienten eine erfolgreiche Impfantwort nach der Gabe von PNEUMOVAX® 23 als Ausdruck der nach ESID (8) möglichen normalen Impfreaktion.

4.1.3) Krankheitsmanifestation der CVID- und UAD-Kohorte

Die Krankheitsmanifestation der CVID- und UAD-Kohorte ist in Tabelle 11 zusammengefasst. Erwartungsgemäß war der häufigste erhobene Befund eine erhöhte Infektanfälligkeit. Trotz Ig-Substitution litten alle Patienten (100%) unter rezidivierenden Infekten der Atemwege. Nur UAD-Patient 1 erhielt keine Substitutionstherapie. Das Spektrum der dokumentierten Infekte der CVID- bzw. UAD-Patienten umfasste daneben wiederkehrende Episoden von Otitiden (13% bzw. 13%), von Sinusitiden (63% bzw. 50%) und von Harnwegsinfekten (13% bzw. 0%). Komplizierend entwickelten drei CVID-Patienten (37%) und ein UAD-Patient (13%) rezidivierende Pneumonien.

Erregerbedingte Diarrhöen traten bei einem CVID-Patienten (13%) und bei zwei UAD-Patienten (25%) auf.

Tabelle 11: Klinische Manifestationen der CVID- und UAD-Kohorte.

Zeichen der Enteropathie umfassen histologisch nachgewiesene Veränderungen oder rezidivierende nichtinfektiöse Diarrhöen. Abkürzungen: GLILD (granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease), * vor dem Beginn einer Immunglobulin-Substitution.

Klinische Manifestation	% der CVID-Kohorte	% der UAD-Kohorte
Erhöhte Infektanfälligkeit	100%	100%
• rezidivierende Infekte der Atemwege	100%	100%
• rezidivierende Otitis media*	13%	13%
• rezidivierende Sinusitis paranasales*	63%	50%
• rezidivierende Pneumonien*	37%	13%
• rezidivierende Harnwegsinfekte*	13%	0%
• infektiöse Diarrhöen*	13%	25%
Zeichen der Enteropathie (klinisch oder histologisch)	25%	25%
Autoimmunologische Erkrankungen	50%	13%
Hepatosplenomegalie	13%	13%
• Hepatomegalie	13%	13%
• Splenomegalie	25%	25%
Lymphadenopathie	0%	0%
Granulome	13%	0%
GLILD	25%	0%
Malignome	0%	0%

Als Folge der Erkrankung entwickelten zwei CVID-Patienten (25%) eine GLILD, während diese Komplikation im UAD-Kollektiv nicht nachgewiesen werden konnte. Granulome wurden nur bei einem CVID-Patienten in der Lunge (13%) detektiert.

Eine Enteropathie in Form von rezidivierenden nichtinfektiösen Diarrhöen und/oder histologisch nachgewiesenen Veränderungen des GIT zeigten jeweils 25% beider Kohorten.

Autoimmunität wurde häufiger in der CVID-Kohorte (50%) als in der UAD-Kohorte (13%) beobachtet.

Eine Splenomegalie wurde bei zwei Patienten (25%) jeder Gruppe beobachtet und lag jeweils in einem Fall (13%) in Kombination mit einer Lebervergrößerung als

Hepatosplenomegalie vor. Eine Lymphadenopathie oder Malignomerkrankung konnte bei keinem der Patienten nachgewiesen werden.

4.2) Fehlende humorale Impfantwort der CVID- und UAD-Patienten

Die serologische Impfantwort nach der Gabe von VAXIGRIP® 2013/2014 der Kontrollprobanden und der Patienten wurde anhand der Kriterien der Seroprotektion, der Serokonversion und der Höhe der HI-Titer beurteilt.

4.2.1) Seroprotektion

HI-Titer bei einer Verdünnung von mindestens 1:40 wurden als protektiv gewertet (71). Die Seroprotektionsraten vor und nach der Impfung der teilnehmenden Patienten und Kontrollprobanden sind in Abbildung 8 dargestellt.

Initial war die Anzahl der Kontrollprobanden mit protektiven Titern bezüglich der drei Impfstämme niedriger als in den Patientengruppen. Vor der Impfung lag der Prozentsatz an Kontrollprobanden mit HI-Titern $\geq 1:40$ bei 22% (A/Texas/50/2012 und B/Massachusetts/02/2012) und bei 44% (A/California/7/2009). Lediglich ein Kontrollproband erfüllte gegen den Stamm A/California/7/2009 nicht das Kriterium der Seroprotektion. Ansonsten entwickelten alle teilnehmenden Kontrollprobanden protektive Titer gegen alle drei Stämme. Dies entspricht einer Zunahme der Seroprotektionsraten um 44% (A/California/7/2009) und 78% (A/Texas/50/2012 und B/Massachusetts/02/2012).

Gemäß der Definition der Seroprotektion zeigten viele der teilnehmenden Patienten gegen A/California/7/2009 (CVID: 87%; UAD: 75%), gegen A/Texas/50/2012 (CVID: 63%; UAD: 87%) und gegen B/Massachusetts/02/2012 (CVID: 63%; UAD: 100%) nach der Impfung protektive Titer.

Bei vielen Patienten waren protektive Werte jedoch bereits vor der Gabe des Vakzins nachweisbar. Alle diese Patienten wurden unter regelmäßiger Ig-Substitution geführt. Die Steigerung der Seroprotektion durch die Impfung lag jeweils bei 13% (CVID und UAD) gegen die Influenza-A-Stämme und bei 25% (CVID) und 37% (UAD) gegen den Influenza-B-Stamm.

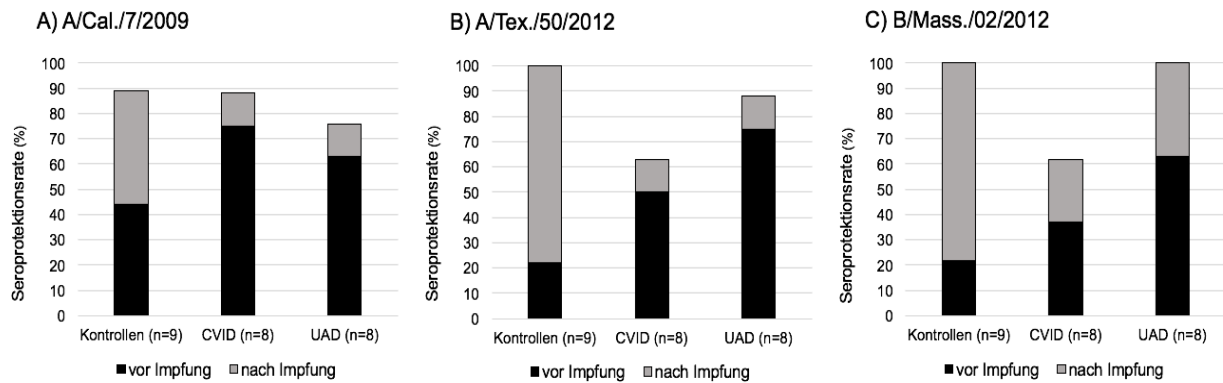


Abbildung 8: Seroprotektionsraten gegen Influenza vor und nach der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil seroprotektiver Titer der Kontrollprobanden (n=9), der CVID- und der UAD-Patienten (jeweils n=8) gegen die Stämme A/California/7/2009 (A), A/Texas/50/2012 (B) und B/Massachusetts/02/2012 (C). Als protektiv wurde ein Titer von mindestens 1:40 gewertet (71). Die Messung erfolgte mittels HI (hemagglutination inhibition assay).

4.2.2) Serokonversion

Ein Anstieg der Anti-Influenzaiter auf $\geq 1:40$ bei vorheriger Serumnegativität oder eine mindestens vierfache Steigerung des HI-Titers durch die Impfung wurde als serologische Impfantwort (Serokonversion) gewertet (70). Im Vergleich zu den Kontrollprobanden war der x-fache Titeranstieg des CVID- und UAD-Kollektives gegen alle drei Stämme tendenziell niedriger und diese Unterschiede erreichten mit einer Ausnahme statistische Signifikanz (Abbildung 9).

Insgesamt zeigten von neun gesunden Kontrollprobanden gegen A/Texas/50/2012 alle, gegen A/California/7/2009 fünf und gegen B/Massachusetts/02/2012 acht mindestens eine Titer-Vervierfachung durch die Influenzaimpfung.

Gemäß der oben genannten Definition erfüllte nur CVID-Patient 1 die Kriterien einer positiven Impfantwort bezüglich der beiden Influenza-A-Stämme. Die Impfung bewirkte jedoch bei keinem der CVID-Patienten eine Steigerung des Titers um mehr als das Vierfache gegen den enthaltenen Influenza-B-Stamm.

In der UAD-Kohorte hingegen führte die Impfung insgesamt in drei Fällen zu einer Vervierfachung des Ausgangstiters gegen B/Massachusetts/02/2012 (UAD 4, UAD 6 und UAD 8). Zwei Patienten entwickelten eine Titer-Vervierfachung bezüglich A/California/7/2009 (UAD 4 und UAD 7), wohingegen nur UAD-Patient 6 die Kriterien der Serokonversion gegen den Stamm A/Texas/50/2012 erfüllte.

Es wurden insgesamt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den UAD-Patienten und den CVID-Patienten beobachtet.

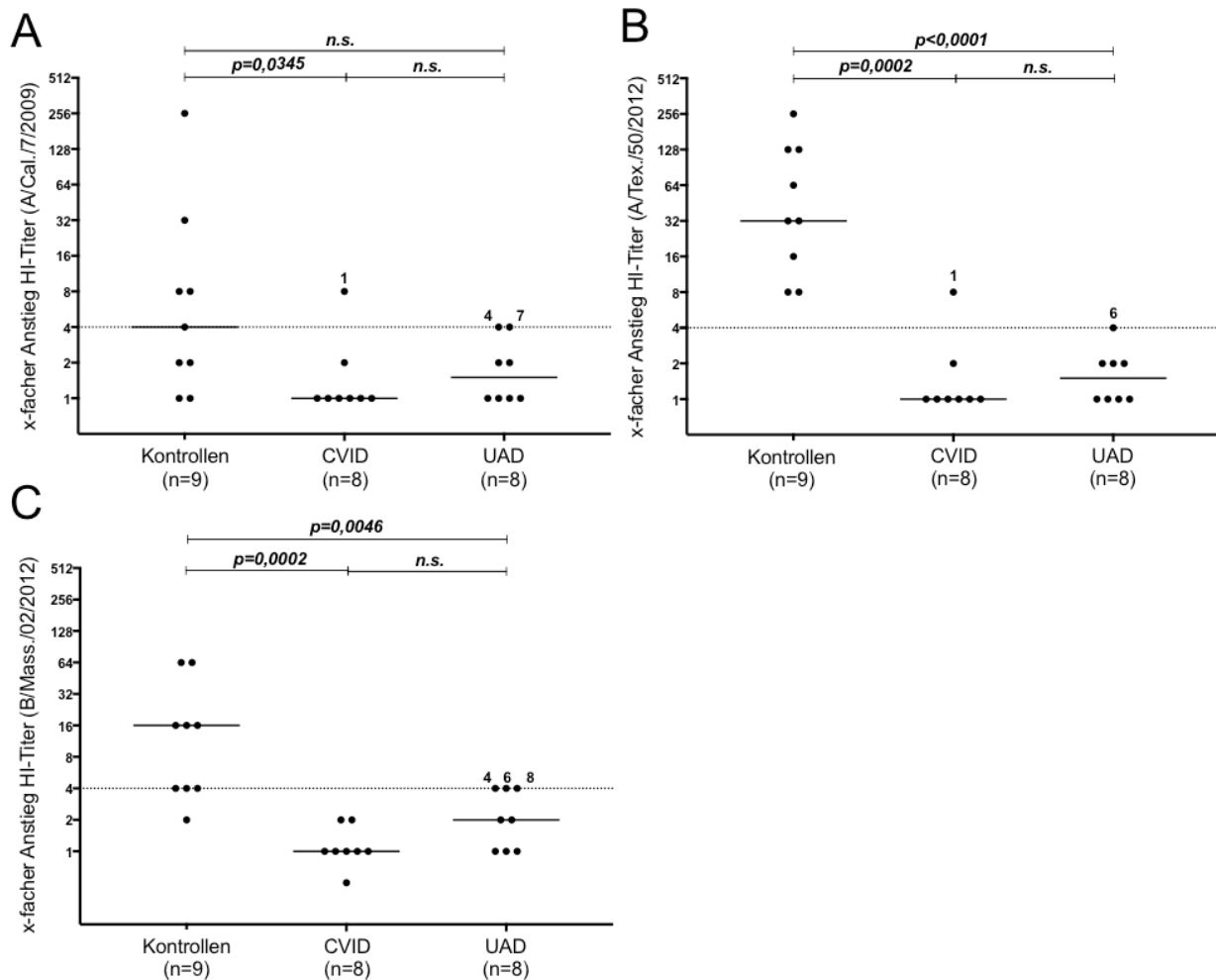


Abbildung 9: Anstieg der Anti-Influenzaziter nach erfolgter Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014.

Dargestellt ist der x-fache Anstieg der Kontrollprobanden (n=9) verglichen mit den CVID- und den UAD-Patienten (jeweils n=8) gegen die Stämme A/California/7/2009 (A), A/Texas/50/2012 (B) und B/Massachusetts/02/2012 (C). Die Messung erfolgte mittels HI (hemagglutination inhibition assay). Die in den Abbildungen angegebenen Zahlen entsprechen der Patientenzuordnung aus Tabelle 3. Die Vervierfachung des Ausgangswertes, als Korrelat der unteren Grenze einer Serokonversion (70), ist als gestrichelte Linie markiert. Der schwarze Balken entspricht dem Median. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Nicht signifikante p-Werte sind als n.s. angegeben.

4.2.3) Höhe der HI-Titer

Die Höhe der gemessenen HI-Titer der drei Kohorten sind in Abbildung 10 dargestellt.

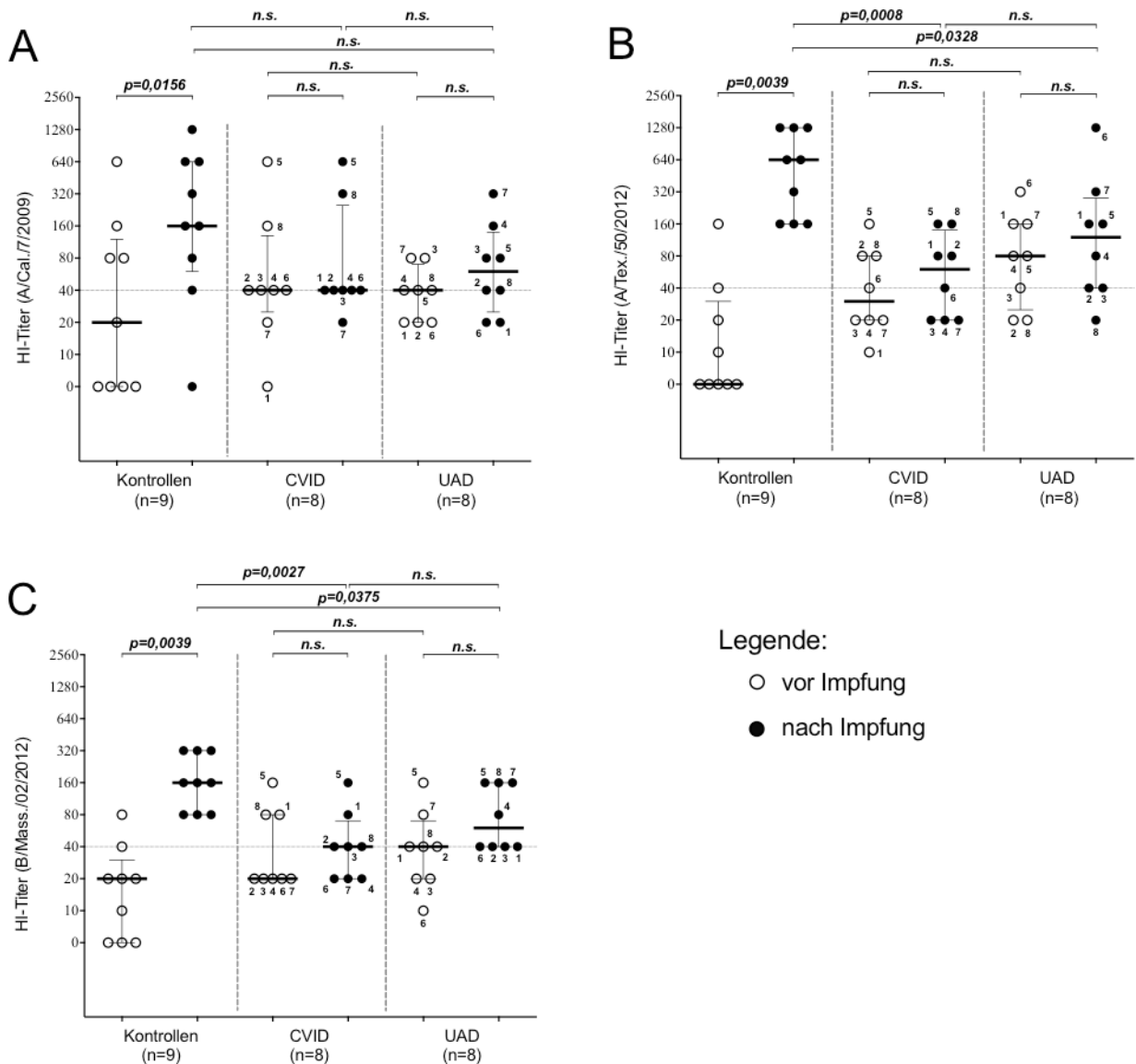


Abbildung 10: Anti-Influenzazititer vor und nach der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014.

Abgebildet sind die Antikörpertiter der Kontrollprobanden (n=9), der CVID- und der UAD-Patienten (jeweils n=8) gegen die Stämme A/California/7/2009 (A), A/Texas/50/2012 (B) und B/Massachusetts/02/2012 (C). Die Messung erfolgte mittels HI (hemagglutination inhibition assay). Die gestrichelte Linie markiert die untere Grenze seroprotektiver Titer (71). Die in den Abbildungen angegebenen Zahlen entsprechen der Patientenzuordnung aus Tabelle 3. Zur statistischen Analyse für gepaarte Stichproben wurde der Wilcoxon matched-pairs signed rank Test verwendet. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe, der CVID- und der UAD-Gruppe vor und nach der Impfung wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Die angegebenen Fehlerbalkendiagramme zeigen den Median sowie das zugehörige obere und untere Quartil einschließlich des Interquartilsabstandes. Abkürzungen: n.s. (nicht signifikant).

Insgesamt entwickelten die Kontrollprobanden durch die Impfung eine signifikante Erhöhung der HI-Titer gegen die Stämme A/California/7/2009 (Bereich: 0-1:1280;

Mittelwert: 1:369; Median: 1:160; $p=0,0156$), A/Texas/50/2012 (Bereich: 1:160-1:1280; Mittelwert: 1:658; Median: 1:640; $p=0,0039$) und B/Massachusetts/02/2012 (Bereich: 1:80-1:320; Mittelwert: 1:187; Median: 1:160; $p=0,0039$). Die HI-Titer der Kontrollgruppe nach der Impfung waren verglichen mit den beiden Patientengruppen bezüglich der Impfstämme A/Texas/50/2012 (Kontrollprobanden und CVID: $p=0,0008$; Kontrollprobanden und UAD: $p=0,0328$) und B/Massachusetts/02/2012 (Kontrollprobanden und CVID: $p=0,0027$; Kontrollprobanden und UAD: $p=0,0375$) signifikant höher. Für den Stamm A/California/7/2009 erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz, zeigten im Trend aber eine ähnliche Entwicklung.

Hingegen führte die Impfung der Patienten insgesamt zu keiner statistisch signifikanten Zunahme der HI-Titer. Trotz hoher Seroprotektionsraten lag die serologische Impfantwort der CVID-Patienten gegen die Stämme A/California/7/2009 (Bereich: 1:20-1:640; Mittelwert: 1:148; Median: 1:40), A/Texas/50/2012 (Bereich: 1:20-1:160; Mittelwert: 1:73; Median: 1:60) und B/Massachusetts/02/2012 (Bereich: 1:20-1:160; Mittelwert: 1:53; Median: 1:40) jeweils in niedrigen Bereichen. Insgesamt zeigten die UAD-Patienten zu beiden Messzeitpunkten tendenziell etwas höhere Titer als die CVID-Patienten, wobei diese Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichten und auch die Antikörpertiter der UAD-Kohorte nach der Impfung vergleichsweise niedrig waren.

4.3) Dosisfindungsversuch

PBMCs von den gesunden Kontrollprobanden und den Patienten wurden vor und nach der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014 stimuliert, gefärbt und anschließend die Frequenzen $IFN\gamma$ -, $TNF\alpha$ - und IL2-produzierender $CD4^+$ -Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Um die optimale Menge Vakzin für die Stimulation zu ermitteln, wurde vorab ein Dosisfindungsversuch mit drei unterschiedlichen Konzentrationen mit PBMCs von drei gesunden Kontrollprobanden durchgeführt. Eingesetzt wurde pro Ansatz 1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ und 6 $\mu\text{g/ml}$ des Impfstoffes. Insgesamt ergab sich bei Stimulation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ im Durchschnitt die höchste Produktion von $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL2 (Abbildung 11).

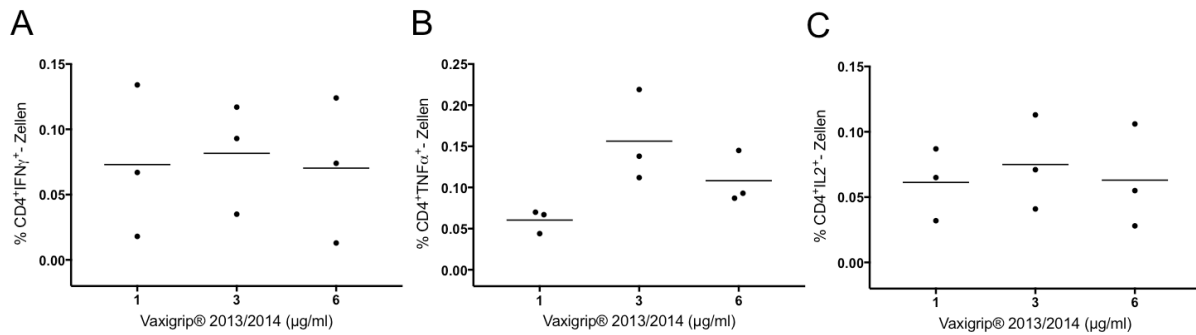


Abbildung 11: Ergebnisse des Dosisfindungsversuches.

PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) von gesunden Kontrollprobanden (n=3) wurden zur Bestimmung der optimalen Stimulationsdosis *in vitro* für 20 Stunden mit 1 µg/ml, 3 µg/ml und 6 µg/ml des Impfstoffes VAXIGRIP® 2013/2014 stimuliert, gefärbt und anschließend die Frequenzen Zytokin-produzierender CD4⁺-Zellen gemessen. Abgebildet sind die durchflusszytometrischen Daten für IFN γ (A), TNF α (B) und IL2 (C). Der schwarze Balken markiert den Mittelwert.

4.4) T-zelluläre Impfantwort bei Kontrollprobanden und Patienten nachweisbar

Die T-zelluläre Impfantwort wurde durchflusszytometrisch anhand der Produktion der Zytokine IFN γ , TNF α und IL2 durch aktivierte CD3⁺CD4⁺-T-Zellen bestimmt. Zur Qualitätskontrolle wurde für jeden Messzeitpunkt eine Positivkontrolle mitgeführt. Für die Positivkontrolle wurden PBMCs der Kontrollprobanden und der Patienten vor und nach der Influenzaimpfung *in vitro* mit 3 µg/ml des bakteriellen Superantigens SEB stimuliert und gefärbt. In der anschließenden durchflusszytometrischen Messung konnten nach Stimulation mit SEB vor und nach der Impfung keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollprobanden und den Patienten nachgewiesen werden (Abbildung 12). In der Positivkontrolle wurden in der COVID-Kohorte für die Zytokine IFN γ und TNF α an beiden Messzeitpunkten die höchsten Frequenzen gemessen.

Zur Messung der Immunität gegen Bestandteile des Influenzavakzins vor und nach erfolgter Impfung wurden PBMCs von den Kontrollprobanden und den Patienten *in vitro* mit 3 µg/ml VAXIGRIP® 2013/2014 stimuliert. Zur Evaluation der Güte einer T-zellulären Immunität wurden die Frequenzen von antigenspezifischen IFN γ -, TNF α - und IL2-produzierenden CD3⁺CD4⁺CD40L⁺-T-Zellen an beiden Messzeitpunkten betrachtet. Zur Beurteilung einer Impfantwort wurde die Veränderungen der Frequenzen Zytokin-produzierender CD4⁺CD40L⁺-Zellen durch die Impfung in Form eines x-fachen

Anstieges begutachtet.

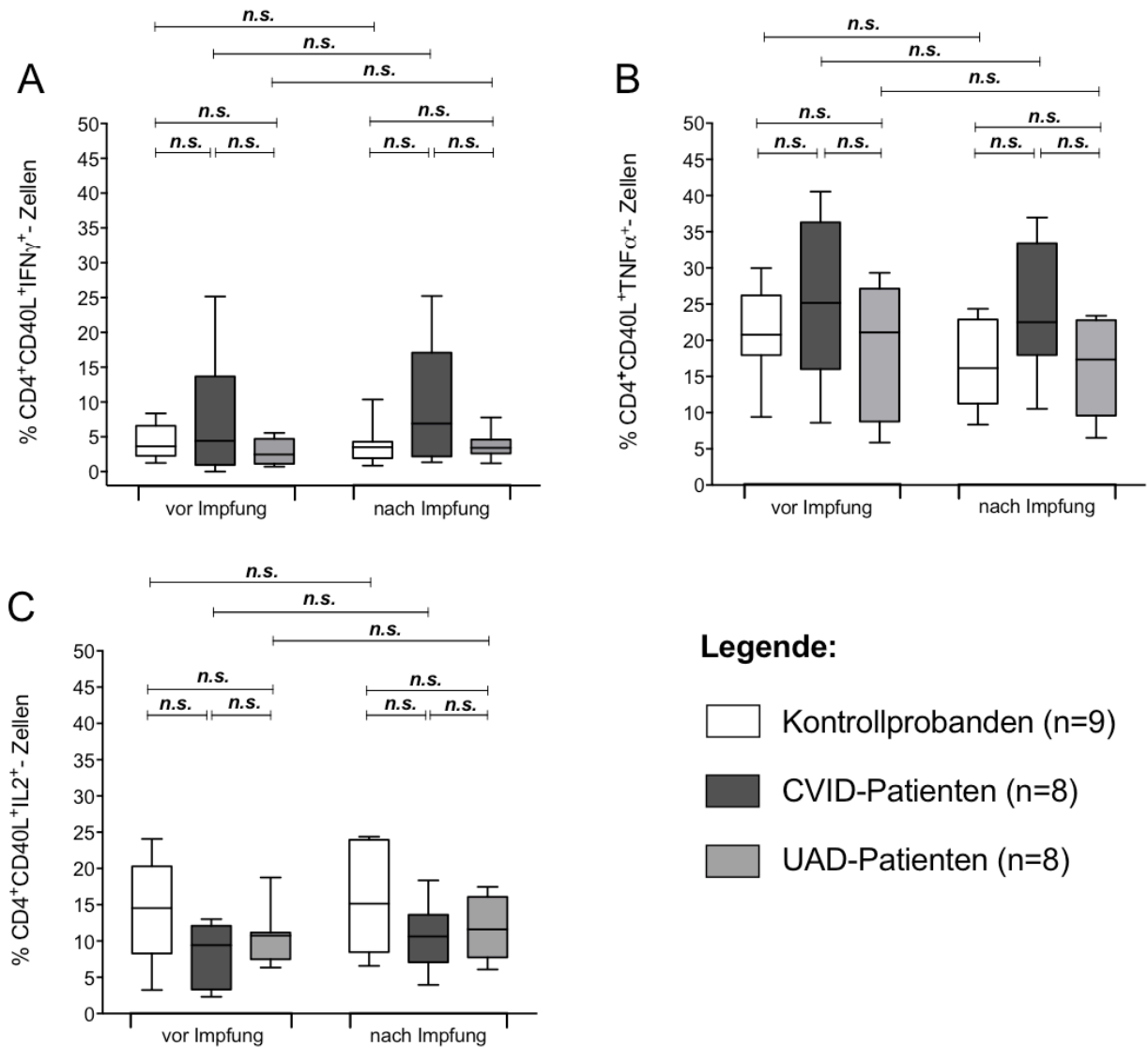


Abbildung 12: Frequenzen Zytokin-produzierender aktivierter CD4⁺-Zellen nach Stimulation mit SEB vor und nach der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014.

PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) von Kontrollprobanden (n=9), CVID- und UAD-Patienten (jeweils n=8) wurden vor und nach der Impfung *in vitro* für 20 Stunden mit 3 μ g/ml des Superantigens SEB (Staphylokokken Enterotoxin B) stimuliert. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten für IFN γ (A), TNF α (B) und IL2 (C) erfolgte wie in Abbildung 7 dargestellt. Zur statistischen Analyse zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Unterschiede zwischen gepaarten Stichproben vor und nach der Impfung wurden mit dem Wilcoxon matched-pairs signed rank Test untersucht. Die angegebenen Fehlerbalkendiagramme zeigen den Median sowie das zugehörige obere und untere Quartil einschließlich des Interquartilsabstandes. Abkürzungen: n.s. (nicht signifikant).

4.4.1) Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen

Wie in Abbildung 13 dargestellt, lagen die gemessenen Frequenzen der drei Gruppen nach der Impfung für alle drei Zytokine in einem ähnlichen Bereich, sodass von einer vergleichbaren T-zellulären Immunität ausgegangen werden kann.

Bei allen Kontrollprobanden und Patienten konnte nach der Impfung eine T-zelluläre Immunität gegen Vakzin-Bestandteile gemessen werden. Insgesamt entwickelte die UAD-Kohorte im Trend die höchsten Frequenzen durch die Influenzaimpfung. Unterschiede nach der Impfung erreichten nur zwischen den UAD-Patienten und den Kontrollprobanden für $\text{IFN}\gamma^+$ -produzierende aktivierte T-Zellen statistische Signifikanz ($p=0,0360$). Alle Kontrollprobanden und Patienten zeigten schon vor der Impfung messbare spezifische aktivierte T-Zellen, wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar waren.

Die niedrigsten Frequenzen für alle drei Zytokine entwickelten die Patienten CVID 1, CVID 7 und UAD 1.

Insgesamt führte die Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014 in der Kontrollgruppe zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Frequenzen von $\text{IFN}\gamma^-$, $\text{TNF}\alpha^-$ und IL2 -produzierenden aktivierten T-Zellen ($p=0,0117$, $p=0,0039$ und $p=0,0039$).

In der Gruppe der CVID-Patienten konnte für $\text{TNF}\alpha^-$ -produzierende aktivierte T-Zellen eine statistisch signifikante Zunahme durch die Impfung beobachtet werden ($p=0,0234$), währenddessen die Veränderungen für $\text{IFN}\gamma$ keine statistische Signifikanz erreichten.

Hingegen bewirkte die Impfung in der UAD-Kohorte eine statistisch signifikante Steigerung von $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden aktivierten T-Zellen ($p=0,0156$), wohingegen die Änderungen bezüglich der $\text{TNF}\alpha$ -Expression keine statistische Signifikanz erlangten.

Die Veränderungen beider Patientengruppen für IL2 -produzierende aktivierte T-Zellen fielen mit einem p-Wert von jeweils 0,0547 in den grenzwertig statistisch signifikanten Bereich.

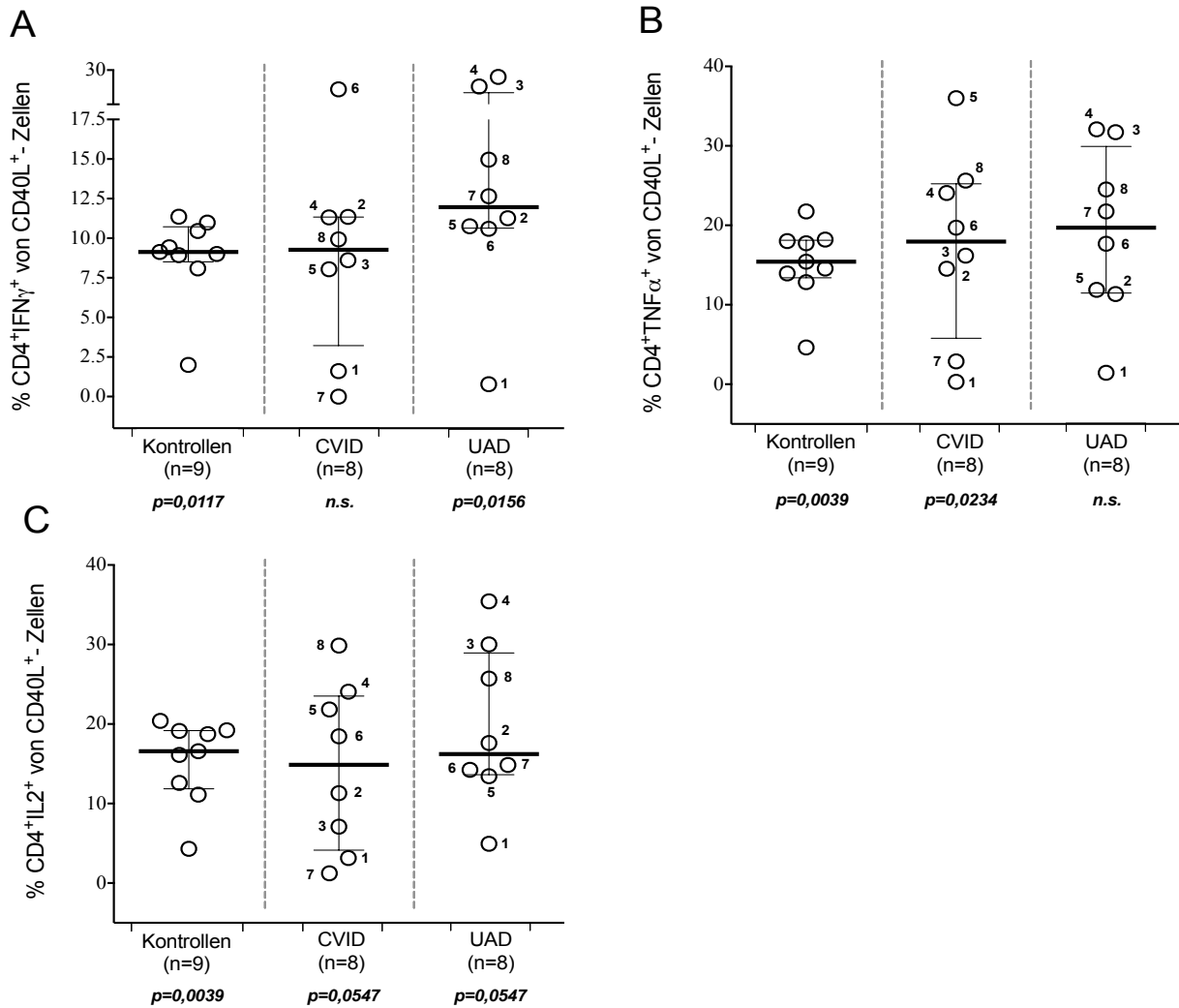


Abbildung 13: Frequenzen Zytokin-produzierender aktivierter CD4⁺-Zellen als Korrelat der zellulären Immunität nach der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014.

PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) von gesunden Kontrollprobanden (n=9), CVID- und UAD-Patienten (jeweils n=8) wurden vor und nach der Impfung *in vitro* für 20 Stunden mit 3 μ g/ml des Vakzins VAXIGRIP® 2013/2014 stimuliert und anschließend gefärbt. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten für IFN γ (A), TNF α (B) und IL2 (C) erfolgte wie in Abbildung 7 dargestellt. Die in den Abbildungen angegebenen Zahlen entsprechen der Patientenzuordnung aus Tabelle 3. Zur statistischen Analyse einer Änderung durch die Impfung wurde der Wilcoxon matched-pairs signed rank Test genutzt. Die entsprechenden p-Werte sind unterhalb des Graphen angegeben. Die abgebildeten Fehlerbalkendiagramme zeigen den Median sowie das zugehörige obere und untere Quartil einschließlich des Interquartilsabstandes. Abkürzungen: n.s. (nicht signifikant).

4.4.2) x-facher Anstieg der Frequenzen Zytokin-produzierender T-Zellen

Als Grundlage für die Definition der T-zellulären Impfantwort wurden die Ergebnisse der Kontrollprobanden verwendet. Ein Messergebnis wurde als positive Impfantwort

gewertet, wenn dieses die untere Grenze des 95%-KI des geometrischen Mittels der entsprechenden Zytokinantwort der Kontrollprobanden überschritt (IFN γ : 95%-KI = [1,32; 2,60]; TNF α : 95%-KI = [1,38; 3,24]; IL2: 95%-KI = [1,29; 5,73]).

Wie in Abbildung 14 gezeigt, bestanden bezüglich des x-fachen Anstieges der Frequenzen Zytokin-produzierender Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollprobanden und den Patientengruppen. Folglich kann von einer vergleichbar guten T-zellulären Impfantwort der drei Kohorten ausgegangen werden.

Gemäß der obigen Definition entwickelten alle Teilnehmer der Kontrollkohorte eine positive Impfantwort für mindestens eines der Zytokine. Sechs Kontrollprobanden zeigten eine zelluläre Impfantwort für alle Zytokine, einer für zwei Zytokine und zwei für ein Zytokin.

Von den acht teilnehmenden CVID-Patienten reagierte nur CVID-Patient 7 für keines der drei Zytokine und zeigte insgesamt die niedrigsten Veränderungen bezüglich der Frequenzen Zytokin-produzierender Zellen aller drei Gruppen. Von den verbleibenden sieben entwickelten drei Patienten (CVID 3, CVID 4 und CVID 6) für alle und vier Patienten (CVID 1, CVID 2, CVID 5 und CVID 8) für zwei Zytokine eine positive Impfreaktion.

In der UAD-Kohorte entwickelten zwei Patienten (UAD 5 und UAD 7) für keines der untersuchten Zytokine eine zelluläre Impfantwort. Von den restlichen sechs Patienten reagierten vier (UAD 2, UAD 3, UAD 4 und UAD 8) mit drei Zytokinen, einer (UAD 6) mit zwei Zytokinen und einer (UAD 1) mit einem Zytokin.

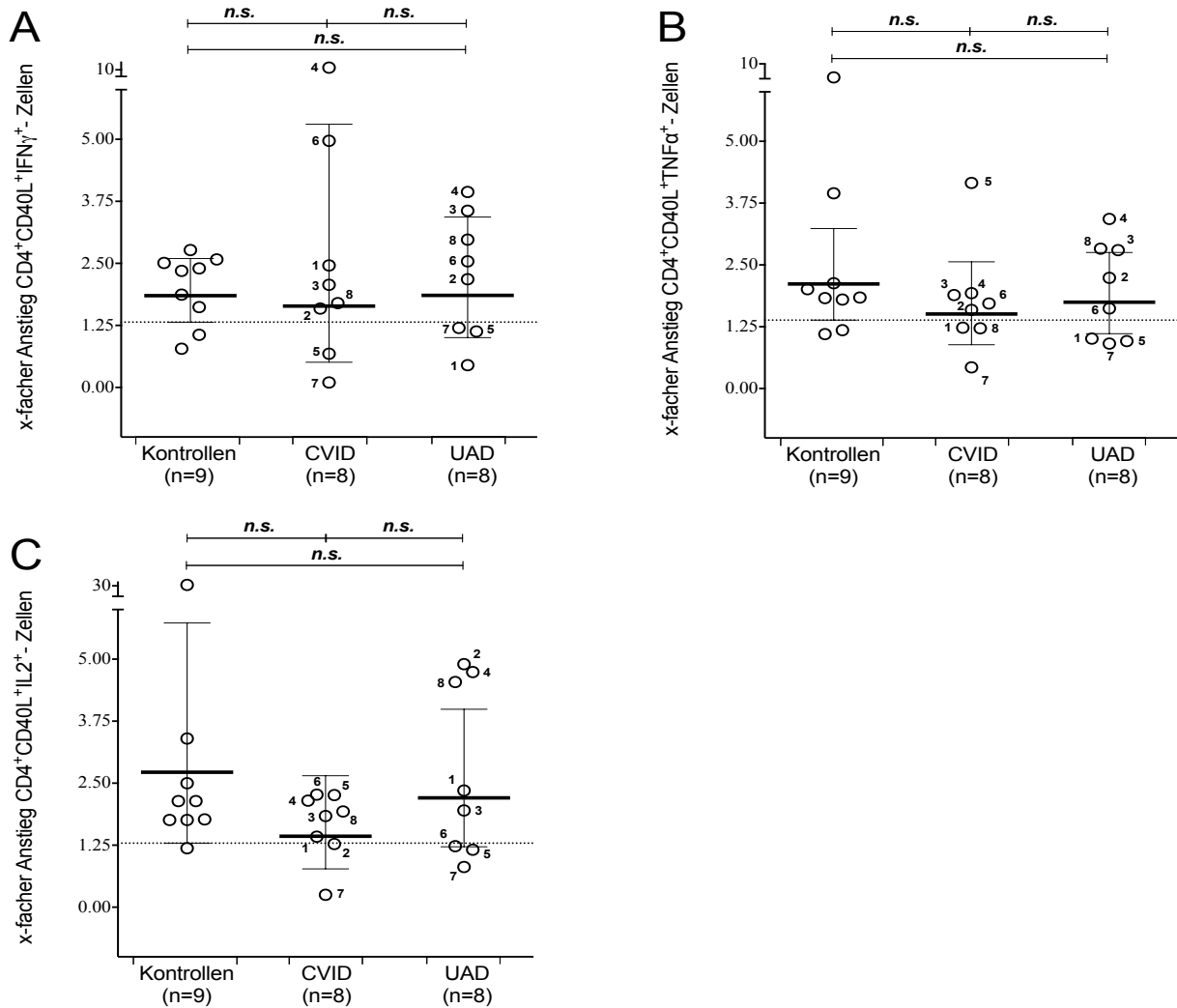


Abbildung 14: Anstieg der Frequenzen Zytokin-produzierender aktivierter $CD4^+$ -Zellen durch die Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014.

PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) von gesunden Kontrollprobanden (n=9), CVID- und UAD-Patienten (jeweils n=8) wurden vor und nach der Impfung *in vitro* für 20 Stunden mit 3 $\mu\text{g/ml}$ des Vakzins VAXIGRIP® 2013/2014 stimuliert und anschließend gefärbt. Dargestellt ist der x-fache Anstieg für $IFN\gamma$ (A), $TNF\alpha$ (B) und $IL2$ (C). Die Auswertung erfolgte wie in Abbildung 7 dargestellt. Die in den Abbildungen angegebenen Zahlen entsprechen der Patientenzuordnung aus Tabelle 3. Die gestrichelte Linie markiert die untere Grenze des 95%-Konfidenzintervall (KI) des geometrischen Mittels der T-zellulären Impfantwort der gesunden Kontrollprobanden für das jeweilige Zytokin. Dieser Wert wurde als Korrelat der unteren Grenze einer positiven Impfantwort definiert. Zur statistischen Analyse von Unterschieden zwischen den Kontrollen und den Patienten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die angegebenen Fehlerbalkendiagramme zeigen das geometrische Mittel sowie das 95%-KI. Abkürzungen: n.s. (nicht signifikant).

5) Diskussion

In dieser Arbeit wurden das humorale und T-zelluläre Impfansprechen von CVID- und UAD-Patienten nach der Gabe des saisonalen TIV 2013/2014 untersucht. Im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe war die humorale Impfantwort sowohl der CVID- als auch der UAD-Kohorte gering bis fehlend. Jedoch entwickelte der Großteil beider Patientengruppen eine den gesunden Kontrollprobanden vergleichbare T-zelluläre Impfantwort und Immunität.

Die Diskussion der folgenden Publikation ist inhaltlich und formal im Wesentlichen an der vorliegenden Arbeit orientiert:

Leif Gunnar Hanitsch, Madlen Löbel, Jan Florian Mieves, Sandra Bauer, Nina Babel, Brunhilde Schweiger, Kirsten Wittke, Patricia Grabowski, Hans-Dieter Volk, Carmen Scheibenbogen, Cellular and humoral influenza-specific immune response upon vaccination in patients with common variable immunodeficiency and unclassified antibody deficiency, *Vaccine*, 2016.

5.1) Interpretation der Ergebnisse und Einordnung in die bestehende Studienlage

Insgesamt gibt es nur wenige Studien, die das Ansprechen einer Influenzaimpfung bei CVID-Patienten untersuchen. Über die Literaturlatenbank PubMed wurden eine norwegische Studie von Pedersen und Kollegen (79) sowie eine niederländische Studie von van Assen und Kollegen (77, 78) identifiziert, die das humorale und zelluläre Impfverhalten untersuchten. Hingegen gibt es für das Krankheitsbild UAD bis dato keine Studien, die explizit die Impfantwort nach Gabe des saisonalen Impfstoffes evaluieren.

5.1.1) Serologische Impfantwort gegen TIV

Im Gegensatz zu den gesunden Kontrollprobanden entwickelte die Mehrheit der teilnehmenden Patienten keine oder nur eine deutlich eingeschränkte serologische Impfantwort nach der Gabe von VAXIGRIP® 2013/2014. Dies steht im Einklang mit den ESID-Diagnosekriterien nach denen das Impfansprechen beider Patientengruppen möglicherweise eingeschränkt sein oder vollständig fehlen kann (8).

Von den acht CVID-Patienten entwickelte nur CVID-Patient 1 eine Serokonversion

gegen die Influenza-A-Stämme des Vakzins als Ausdruck eines serologischen Impfansprechens. Nur dieser CVID-Patient zeigte auf das Polysaccharid-Antigen PNEUMOVAX® 23 eine positive Impfantwort und wies mit 3,60% der CD19⁺-Zellen die größte Population von cs memBc als Hauptquelle der Antikörperproduktion auf. Zudem lag die IgG-Konzentration vor dem Beginn der Ig-Substitutionstherapie mit 6,53 g/l vergleichsweise knapp unterhalb des unteren Grenzwertes des Normalbereiches. Als einziger der CVID-Kohorte wies dieser Patient den lymphozytären Phänotyp II nach Freiburg bzw. smB⁺21^{norm} nach EuroClass auf. Sowohl die häufig eingeschränkte humorale Impfantwort als auch der Zusammenhang zwischen erfolgreicher Impfung gegen Polypeptid- bzw. Polysaccharid-Antigene und der tendenziellen Einordnung dieser Patienten in die Gruppe Typ II nach Freiburg sind in Studien beschrieben (30, 84). Unter Zusammenschau dieser Daten liegt bei CVID-Patient 1 am ehesten ein milderer Phänotyp mit erhaltener serologischer Impfantwort vor.

Die UAD-Kohorte der vorliegenden Untersuchung entwickelte gegen das Influenzavakzin eine zwar etwas bessere, aber letztendlich ebenfalls erheblich eingeschränkte serologische Impfantwort. Obwohl insgesamt vier UAD-Patienten das Kriterium der Serokonversion gegen mindestens einen Impfstamm erfüllten, führte die Impfung in diesen Fällen nur zu einer Vervierfachung des Ausgangstiters. Im Gegensatz zu den CVID-Patienten zeigten alle UAD-Patienten normale bis nur geringfügig verminderte Frequenzen von cs memBc und ein erfolgreiches serologisches Impfansprechen auf das Polysaccharid-Vakzin PNEUMOVAX® 23. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt eine Untersuchung an 21 UAD-Patienten von Driessen und Kollegen, die nur in drei Fällen eine eingeschränkte Impfantwort gegen das Pneumokokken-Vakzin und lediglich in zwei Fällen cs memBc < 2% beobachten konnte (47). Ähnlich wie in dieser Arbeit litten alle UAD-Patienten an einer erhöhten Infektanfälligkeit und benötigten in vielen Fällen eine Ig-Substitution (47). Im Gegensatz zu der UAD-Kohorte dieser Arbeit wurden jedoch keine nichtinfektiösen Komplikationen von Driessen und Kollegen beobachtet (47).

In der vorliegenden Untersuchung waren tendenziell an beiden Messpunkten höhere Titer bei den UAD-Patienten nachweisbar. Dennoch führte die Impfung in beiden Patientenkohorten zu keiner statistisch signifikanten Zunahme und insgesamt waren die HI-Titer der Patienten nach der Impfung niedriger als die der Kontrollgruppe. Im Durchschnitt waren bei den Patienten und den Kontrollprobanden die Antikörpertiter gegen den Influenza-B-Stamm des Vakzins am niedrigsten. Dies ist ein beschriebenes

methodisches Phänomen, dass bei der Messung von Antikörpern gegen Influenza B mittels HI beobachtet werden kann (85).

Interessanterweise zeigte der Großteil der untersuchten CVID- und UAD-Patienten in dieser Arbeit schon vor der Impfung Anti-Influenzaititer, die in vielen Fällen definitionsgemäß protektiv waren. Ursächlich könnten vorherige Impfungen gewesen sein, da circa zwei Drittel der CVID- und ein Drittel der UAD-Patienten in den Jahren zuvor das saisonale Vakzin erhalten hatte. Jedoch waren auch bei fehlender Impfung in den letzten Saisons vor der Gabe von VAXIGRIP® 2013/2014 Antikörper gegen die enthaltenen Influenzastämme nachweisbar. Zudem konnten van Assen und Kollegen keinen Zusammenhang zwischen vorherigen Influenzaimpfungen und präexistenten Antikörpern bei CVID-Patienten nachweisen (77). Die gemessenen HI-Titer vor der Impfung könnten auch Folge von transferierten Antikörpern gewesen sein, da mit Ausnahme von UAD-Patient 1 alle Patienten unter Ig-Substitution geführt wurden. Obwohl Antikörper gegen Influenza in Ig-Präparaten enthalten sind, liegen diese jedoch nur in geringer Konzentration vor (77, 79). Als mögliche Erklärung kommt daher auch ein vorheriger Kontakt mit saisonalen Influenzastämmen in Betracht, da die zirkulierenden Influenzaviren in den vorherigen Jahren weitgehend vergleichbar waren. Neben den Influenza-A-Subtypen H1N1 und H3N2 zirkuliert seit 1990 die Yamagata-Linie, zu der auch der Influenza-B-Stamm von VAXIGRIP® 2013/2014 zählt (65).

Insgesamt stehen die serologischen Daten dieser Arbeit im Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen an CVID-Patienten. Ebenso wie bei CVID-Patient 1 der vorliegenden Arbeit beschrieben Pedersen und Kollegen bei zwei von drei Studienpatienten eine schwache, aber nachweisbare, humorale Impfantwort in Form einer erfolgreichen Serokonversion und Seroprotektion (79). Wie in der vorliegenden Untersuchung waren die HI-Titer dieser beiden Patienten trotz Mehrfachgabe und höherer Dosierung des Impfstoffes jedoch deutlich niedriger als die der teilnehmenden Kontrollprobanden (79).

In der niederländischen Studie von van Assen und Kollegen an 18 CVID-Patienten und 26 gesunden Kontrollprobanden wurde eine erheblich eingeschränkte serologische Impfantwort beschrieben (77). Im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen konnte nach Gabe des Vakzins der Saison 2006/2007 bei keinem der Patienten eine Serokonversion gegen die Stämme A/Neu Caledonien/20/99 (H1N1), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) und B/Malaysia/2506/2004 nachgewiesen werden (77). Trotz vergleichbarer HI-Titer vor der Impfung zeigte nur die Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme der Antikörpertiter

gegen die Impfstämme (77). Protektive Titer nach der Impfung konnten bei 77% (A/H1N1), 12% (A/H3N2) und 12% (B) der CVID-Patienten gemessen werden, wobei mit einem Durchschnitt von 1:41 (A/H1N1), 1:17 (A/H3N2) und 1:17 (B) die Titer nach der Impfung für alle drei Stämme in niedrigen Bereichen lagen (77). Im Vergleich zeigten die CVID-Patienten in der vorliegenden Arbeit nach erfolgter Impfung sowohl höhere Seroprotektionsraten als auch durchschnittlich höhere Titer gegen die drei Impfstämme. Ein ähnlicher Unterschied ergibt sich bei dem Vergleich der Antikörpertiter der gesunden Kontrollprobanden beider Untersuchungen. Demzufolge sind die höheren Titer und Seroprotektionsraten in dieser Arbeit tendenziell nicht Folge von bedeutenden Differenzen bezüglich der humoralen Impfantwort zwischen beiden CVID-Kohorten. Aufgrund der vergleichbaren Vorimpfungsraten von circa 50 bis 60% kommt neben methodischen Unterschieden am ehesten ein häufigerer Kontakt mit den Virusstämmen als mögliche Erklärung in Frage.

5.1.2) Zelluläre Impfantwort gegen TIV

Trotz der eingeschränkten humoralen Impfantwort entwickelte die Mehrheit der CVID- und UAD-Patienten eine den gesunden Kontrollprobanden entsprechende T-zelluläre Impfantwort gegen einen oder mehrere Influenzastämme des verwendeten TIV. Insgesamt konnte bei sieben von acht Patienten der CVID-Kohorte eine influenzaspezifische Impfantwort beobachtet werden. Nur CVID-Patient 7 reagierte für keines der drei untersuchten Zytokine. Dieser Patient wurde mit B-Lymphozyten < 1% in die Hauptgruppe B⁻ nach EuroClass eingeordnet und zeigte bei nicht-vorhandenen cs memBc stark reduzierte Konzentrationen aller drei Ig-Klassen vor Ig-Substitution. Im Einklang mit der fehlenden T-zellulären Impfantwort dieses Patienten zählten dessen HI-Titer gegen alle drei Impfstämme zu den niedrigsten der CVID-Kohorte. Allerdings konnte bei dem zweiten B⁻-Patient (CVID-Patient 3) trotz geringer Antikörperkonzentrationen nach der Impfung eine T-zelluläre Impfantwort für alle drei Zytokine nachgewiesen werden. Hingegen reagierte CVID-Patient 1 trotz schwacher, aber nachweisbarer, humoraler Impfreaktion nur für zwei Zytokine. Zusammen mit CVID-Patient 7 zeigte dieser Patient nach erfolgter Impfung die niedrigsten Frequenzen bezüglich IFN γ , TNF α und IL2 der CVID-Kohorte. Hieraus lässt sich ableiten, dass aus einer verminderten humoralen nicht zwangsläufig auf eine entsprechend eingeschränkte zelluläre Impfantwort gegen Influenza geschlossen werden kann. Dies wurde auch von van Assen und Kollegen beschrieben (78).

Verglichen mit den Kontrollprobanden und den restlichen Patienten konnte bei CVID-Patient 4 und 6 die größte Zunahme von IFN γ -produzierenden CD4⁺CD40L⁺-T-Lymphozyten gemessen werden. Zusammen mit CVID-Patient 2, dessen Steigerung bezüglich IFN γ durch die Impfung jedoch deutlich weniger stark ausgeprägt war, wurden nach der Impfung bei diesen Patienten die höchsten Frequenzen von aktivierten spezifischen CD4⁺IFN γ ⁺-T-Zellen der CVID-Kohorte beobachtet. Diese drei CVID-Patienten zeigten auch die stärkste Expansion von aktivierten B-Zellen der CVID- und UAD-Kohorte.

Von den untersuchten acht konnte bei insgesamt sechs UAD-Patienten eine T-zelluläre Impfantwort nachgewiesen werden. Die Patienten UAD 2, UAD 4 und UAD 8 zeigten für IL2 eine höhere Impfantwort als acht der neun Kontrollprobanden und als alle CVID-Patienten. Auch die IFN γ - und TNF α -Impfantwort dieser drei Patienten lag in den oberen Bereichen des x-fachen Anstieges der Kontrollprobanden. Unter Berücksichtigung der mit den Kontrollprobanden vergleichbaren Frequenzen für alle drei Zytokine muss insbesondere für diese drei Patienten von einer sehr guten T-zellulären Impfantwort ausgegangen werden. Die Patienten UAD 5 und 7 reagierten für keines der Zytokine. Nach der Impfung zeigten diese aber mit der Kontrollgruppe vergleichbare Frequenzen von antigenspezifischen Zellen. Bei nur schwacher Reaktion für IL2 entwickelte UAD-Patient 1 die geringsten Frequenzen für alle drei Zytokine der UAD-Kohorte und zeigte bei niedrigen HI-Titern keinerlei humorale Impfreaktion. Auch bei diesem Patienten muss daher von einer stark eingeschränkten Impfantwort ausgegangen werden.

Schon vor der Impfung konnten bei allen Patienten und Kontrollprobanden für mindestens eines der Zytokine antigenspezifische aktivierte CD4⁺-T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Diese Tatsache wurde bei CVID-Patienten (79) und anderen immunsupprimierten Patientengruppen beobachtet (86). In einer Studie über Veränderungen von T-zellulären Epitopen der Stämme A/H1N1 und A/H3N2 wurden bei fast 30% der Epitope nur leichte Modifikationen beobachtet, während bis zu 15% vollständig konserviert wurden (87). Ähnlich den präexistenten HI-Titern in dieser Arbeit (siehe Abschnitt 5.1.1) kommen daher als Erklärung vorherige Impfungen oder Infektionen in Betracht.

Eine mögliche T-zelluläre Impfreaktion von CVID-Patienten wurde auch im Rahmen von drei norwegischen Fallberichten von Pedersen und Kollegen beschrieben (79). Zwei

von drei Patienten entwickelten eine T-zelluläre Impfantwort gegen den A/California/7/2009 (H1N1) - ähnlichen Spaltvirus (X179a). Beide Patienten, die auf die Impfung ansprachen, wurden gemäß der Freiburger-Klassifikation dem Typ Ia zugeordnet. Hingegen wurde der dritte Patient als Typ II klassifiziert.

Im Gegensatz hierzu konnten van Assen und Kollegen nur bei Kontrollprobanden eine Zunahme von spezifischen IFN γ -produzierenden CD4⁺CD69⁺-T-Zellen gegen A/H1N1 und A/H3N2 als Ausdruck einer T-zellulären Impfreaktion nachweisen (78). In der CVID-Kohorte wurde stattdessen eine Abnahme dieser Zellen beschrieben (78). Auch in einem durchgeführten ELISpot konnte nur in der Kontrollgruppe eine Steigerung der influenzaspezifischen IFN γ -Produktion beobachtet werden (78). Jedoch zeigten sowohl die Kontrollprobanden als auch die CVID-Patienten bei insgesamt niedrigen Frequenzen keine Zunahme von TNF α -produzierenden CD4⁺CD69⁺-T-Zellen (78). Über die IL2-Antwort der CVID-Patienten sowie deren lymphozytäre Klassifikation machen die Autoren keine genauen Angaben (78).

Für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der T-zellulären Impfantwort dieser Arbeit und der Studie von van Assen und Kollegen kommen unterschiedliche Aspekte in Frage.

Eine naheliegende, jedoch unwahrscheinliche Erklärung wären quantitative oder qualitative Unterschiede der T-zellulären Komponente des Immunsystems beider CVID-Kohorten. Bei keinem der Patienten konnte ein quantitativer T-Zell-Defekt nachgewiesen werden, da entsprechend den ESID-Kriterien (8) die Zahl der gemessenen CD4⁺-Lymphozyten auch in der Studie von van Assen und Kollegen bei keinem der Patienten 200/ μ l unterschritt (78). Zudem lag der Median der CD4⁺-Zellen der vorliegenden Untersuchung bei 570/ μ l und war dementsprechend mit dem der Studie von van Assen und Kollegen (Median: 510/ μ l) vergleichbar (78). Alle Patienten reagierten auf die Stimulation mit dem Superantigen SEB, wodurch ein schwerwiegender qualitativer T-Zell-Defekt ausgeschlossen werden konnte. In der Positivkontrolle wurden hierbei in der CVID-Kohorte die höchsten Frequenzen für IFN γ und TNF α gemessenen. Sowohl die erfolgreiche Positivkontrolle als auch die höhere Produktion von IFN γ bei Stimulation mit SEB wurden in der niederländischen Studie beschrieben (78).

Auch epidemiologische Unterschiede erscheinen als Ursache der diskrepanten Ergebnisse nicht plausibel. Das Geschlechterverhältnis war in beiden Untersuchungen

ausgewogen. Das mediane Alter in dieser Arbeit war mit 43 Jahren deutlich niedriger als das der niederländischen Studie mit 55 Jahren (78). In der Literatur ist eine Abnahme der zellulären und humoralen Impfantwort gegen Influenza mit zunehmendem Alter beschrieben (88, 89). Insgesamt ist von einer hohen Variabilität auszugehen, da beispielsweise in den norwegischen Fallberichten bei dem ältesten CVID-Patienten (52 Jahre) im Verlauf die höchsten HI-Titer und die größte Produktion von $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL2 gemessen wurden (79).

Wesentliche Differenzen in der Therapieführung, die Einfluss auf die zelluläre Impfantwort gehabt haben könnten, lagen nicht vor. Aufgrund der erhöhten Infektanfälligkeit benötigten alle acht CVID-Patienten eine regelmäßige Ig-Substitution (siehe Abschnitt 4.3). Eine immunsuppressive Therapie war bei keinem Patienten notwendig. In der niederländischen CVID-Kohorte wurden nur drei Patienten mit Glukokortikoiden behandelt und Ig-Präparate erhielten 12 der 15 Patienten (78). Analog zu der durchgeführten Arbeit erhielt in den Fallberichten aus Norwegen kein Patient eine immunsuppressive Therapie und alle CVID-Patienten wurden unter regelmäßiger Ig-Substitution geführt (79). Die verschiedenen Impfstämme der Saisons 2006/2007 und 2013/2014 sind aufgrund der Zugehörigkeit zu den gleichen Influenza-A-Subtypen H1N1 und H3N2 wahrscheinlich auch nicht Ursache des unterschiedlichen Impfansprechens beider CVID-Kohorten. Selbiges gilt für die mit 50% dieser Untersuchung und die mit 87% der niederländischen Studie unterschiedlichen Impfungsraten in der jeweils vorherigen Saison (78).

Unter Berücksichtigung der oben erläuterten Punkte erscheinen methodische Unterschiede als die plausibelste Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse bezüglich des T-zellulären Impfansprechens. Der Studienaufbau war prinzipiell ähnlich. In beiden Arbeiten wurden vor und drei bis sechs Wochen nach erfolgter Impfung PBMCs abgenommen, stimuliert, gefärbt und anschließend die Frequenzen antigenspezifischer Zytokin-produzierender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (78). Um den Einfluss von Therapieverfahren auf das Messergebnis zu minimieren, wurden bei Patienten unter Ig-Substitution in beiden Untersuchungen Impfung und Blutentnahme zeitlich entsprechend angepasst (78).

Van Assen und Kollegen nutzten zur Impfung eine Dosis eines nicht-adjuvantierten Untereinheitenimpfstoffes (78). Hingegen wurde in dieser Untersuchung ein nicht-adjuvantierter Spaltimpfstoff verabreicht. In Spaltimpfstoffen konnten interne Virusproteine, die zu den wesentlichen Antigenen der influenzaspezifischen T-zellulären

Immunität zählen (siehe Abschnitt 5.2), in höheren Konzentrationen als in Untereinheitenimpfstoffen, die vor allem aus aufbereitetem HA und NA bestehen, nachgewiesen werden (90, 91). Bei Stimulation mit Spaltimpfstoffen wurde *in vitro* eine bessere T-zelluläre Impfantwort gemessen (91). Sinngemäß wurde in einer kürzlich publizierten Studie ein besserer Infektionsschutz durch Spalt- gegenüber Untereinheitenimpfstoffen beschrieben (92). Jedoch wurden von den Autoren keine Angaben über die zelluläre und humorale Immunität gemacht (92). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Impfstoffen bezüglich der Effektivität in anderen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden (93). Für die humorale Impfantwort wurde prinzipiell keine Abhängigkeit vom verwendeten Impfstofftyp beobachtet (94).

Auffällige methodische Unterschiede, die das Messergebnis beeinflusst haben könnten, lagen in der Stimulation vor der Färbung. PBMCs der niederländischen Studie wurden zwei Stunden weniger stimuliert (insgesamt 18 Stunden) als in dieser Arbeit (78). Zudem wählten van Assen und Kollegen mit 1 µg/ml eine deutlich niedrigere Stimulationsdosis (78). Im Dosisfindungsversuch der vorliegenden Arbeit wurde im Durchschnitt bei 1 µg/ml für alle drei Zytokine etwas geringere Frequenzen Zytokinproduzierender CD4⁺-Zellen als bei 3 µg/ml gemessen. Zur Stimulation wurden in der niederländischen Studie durch β-Propiolacton inaktivierte Influenza-A-Viren verwendet, die im Impfstoff enthalten waren (78). Hingegen wurden PBMCs vor und nach der Impfung in dieser Arbeit *in vitro* mit dem Vakzin selbst stimuliert. Im Mausmodell ist eine signifikante Reduktion von peripheren Blutlymphozyten innerhalb von 16 Stunden nach der Impfung mit inaktivierten Influenza-A-Viren durch eine erhöhte Apoptoserate beschrieben worden (95). Bei der Gabe eines Spaltimpfstoffes ließ sich dieser Effekt nicht beobachten (95).

Ein weiterer wichtiger Unterschied betrifft die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Frequenzen von Zytokin-produzierenden aktivierten CD4⁺-T-Lymphozyten untersucht. In der niederländischen Untersuchung wurde zur Identifizierung von aktivierten CD4⁺-T-Zellen das Oberflächenmolekül CD69 gewählt (78). Hingegen wurde in dieser Arbeit CD40L gewählt, da dieser Aktivierungsmarker spezifischer als CD69 ist (96, 97). In den norwegischen Fallberichten wurde kein Aktivierungsmarker gewählt, sondern direkt die Zytokinexpression von CD4⁺-T-Zellen analysiert (79). Die unterschiedlichen Gating-Strategien erklären am ehesten die niedrigeren Frequenzen antigenspezifischer T-Lymphozyten der niederländischen und norwegischen COVID-Kohorten (78, 79).

5.2) Bewertung des generierten Impfschutzes

Die Effektivität der Impfung gegen eine laborbestätigte Influenzainfektion liegt in Abhängigkeit von der Übereinstimmung der Antigene der Impfstämme mit denen der zirkulierenden Stämme bei circa 40 bis 70% (93, 98-100). Der Schutz gegen Influenzaviren ergibt sich aus dem Zusammenspiel der spezifischen humoralen und zellulären Immunität.

Der serologische Schutz wird insbesondere durch spezifische Antikörper gegen virales HA vermittelt (101). Diese eliminieren das Virus auf der Schleimhautoberfläche und verhindern somit eine Infektion der Wirtszelle. Antikörper gegen virale NA hingegen verhindern eine Virusfreisetzung nach erfolgter Infektion der Zelle (101).

Ein Anti-Influenzatiter über 1:40 gilt allgemein als protektiv (71). Grundlage dieses Referenzwertes ist eine Studie von Hobson und Kollegen aus dem Jahr 1972, in der ein HI-Titer von 1:18 bis 1:36 mit einer Reduktion der Infektionsrate um 50% verbunden war (102). In einer neueren Studie wurde jedoch beobachtet, dass Titer von 1:40 nur 31% der Personen gegen eine laborbestätigte Virusinfektion schützten (103). Bei Kindern unter sechs Jahren ist zur Senkung der Infektionsrate um 50% vielmehr ein HI-Titer von 1:110 nötig, während Titer von 1:40 nur 22% der Fälle vor einer klinisch manifesten Infektion schützen (72). In einer Studie an Patienten über 65 Jahren konnte bei nachgewiesener Influenzainfektion trotz erfolgter Impfung bei circa 60% ein HI-Titer \geq 1:40 und bei 31% ein HI-Titer \geq 1:640 gemessen werden (104). Insgesamt sind höhere Titer mit geringeren Infektionsraten verbunden (71, 72). Trotz der hohen Seroprotektionsraten in dieser Arbeit muss folglich aufgrund der insgesamt niedrigen Antikörpertiter der Patienten gegen alle Impfstämme von einem erheblich eingeschränkten serologischen Schutz ausgegangen werden.

Im Gegensatz zur humoralen existieren für die zelluläre Immunität gegen Influenzaviren aktuell keine konkreten Referenzwerte oder standardisierten Messverfahren (76, 105). Allgemein wird angenommen, dass die spezifische zelluläre Immunität nicht direkt vor einer Virusinfektion schützt, sondern vielmehr für die Schwere, den Verlauf und die Dauer einer Infektion relevant ist (105). Die zelluläre Immunität gegen Influenza richtet sich vor allem gegen virusinterne Strukturen (101), darunter Matrixproteine, Polymerasen und Nukleoproteine (106-108). Diese Proteine sind auch in saisonalen inaktivierten Influenzaimpfstoffen enthalten (90). Im Vergleich zu humoralen Antigenen unterliegen T-zelluläre Antigene von Influenza-A-Viren weniger starken genetischen Modifikationen (87, 109). Viele dieser Antigene werden von unterschiedlichen Influenza-

A-Subtypen exprimiert. Spezifische T-Zellen, die gegen einen Subtyp gerichtet sind, können daher Strukturen eines anderen Subtyps erkennen (Kreuzreaktivität) und darüber einen Schutz gegen beide Subtypen vermitteln (110-113).

Träger der spezifischen zellulären Immunität gegen Influenza sind insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten, die durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD8 charakterisiert sind. Nach Aktivierung in den Lymphknoten wandern diese zum Ort der Infektion und erkennen infizierte Wirtszellen anhand viraler Peptide, die über den MHC-Klasse-I-Komplex präsentiert werden (75). Zytotoxische T-Lymphozyten eliminieren im Wesentlichen über zwei Mechanismen infizierte Wirtszellen. Freigesetzte Granzyme gelangen über die Bildung einer Pore in der Wirtsmembran durch sezerniertes Perforin in die infizierte Zelle und lösen deren Apoptose aus (75). Daneben führt die Erkennung von Virusbestandteilen zur Rekrutierung proapoptotischer Oberflächenmoleküle, welche über intrazelluläre Signalkaskaden zum Zelltod führen (75). Bekanntermaßen sind spezifische antivirale CD4⁺-T-Lymphozyten vor allem indirekt an der Immunität gegen Influenzaviren beteiligt (75). Über die Bereitstellung von T_H1-Zytokinen wirken diese auf zytotoxische T-Lymphozyten und sind über die Interaktion mit B-Lymphozyten an der Produktion von Antikörpern beteiligt (75, 114, 115). Auch spezifische CD4⁺-T-Lymphozyten mit zytotoxischem Potenzial durch perforinabhängige Mechanismen konnten identifiziert werden (108, 116-118). Die genaue physiologische Funktion dieser Zellen im Verlauf einer Influenzainfektion ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Im Tierversuch konnte in B-Zell- und CD8⁺-T-Zell-defizienten Mäusen nach Infektion mit Influenzaviren ein Schutz durch CD4⁺-T-Zellen beobachtet werden (119, 120). Auch am Menschen konnte trotz geringer bis fehlender Antikörper der Schutz durch eine vorhandene T-zelluläre Immunität nachgewiesen werden (108, 121, 122). Eine eingeschränkte zelluläre Impfantwort war dementsprechend in Studien mit einem erhöhten Risiko für Influenzainfektionen verbunden (73, 89). In einer Studie von Wilkinson und Kollegen entwickelten seronegative Probanden mit präexistenten influenzaspezifischen CD4⁺-T-Zellen, die gegen virusinterne Proteine gerichtet waren, mildere Krankheitsverläufe und eine niedrigere Virusausscheidung nach erfolgter Infektion mit Influenza-A-Viren (108). Interessanterweise waren nach einer Woche immer noch keine Antikörper mittels HI nachweisbar, obwohl zu diesem Zeitpunkt weder Virus noch Krankheitssymptome vorhanden waren (108). Aufgrund der gesteigerten T-zellulären Immunität in dieser Untersuchung ist daher von einem potentiellen Schutz durch die Impfung auszugehen.

Ein weiteres Qualitätskriterium einer T-zellulären Impfantwort stellt die Generierung von polyfunktionalen T-Zellen dar (76). Dieser Zelltyp besitzt die Fähigkeit mehrere Zytokine simultan zu produzieren. Der verbesserte Schutz vor diversen Virusinfektionen durch multifunktionale antigenspezifische T_H1 -Lymphozyten wurde am Menschen (123-125) und im Tiermodell (126) beschrieben. Neben einem umfassenderen Repertoire an Zytokinen konnte eine gesteigerte Zytokinsekretion und Expression von kostimulatorischen Signalen auf Einzelzellebene bei multifunktionalen T_H1 -Lymphozyten gegen unterschiedlichste virale Erreger beobachtet werden (124, 126, 127). Zusätzlich sind $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ in Kombination wirksamer (128, 129). In einer weiteren Analyse unserer Arbeitsgruppe an den beschriebenen Kohorten, die allerdings nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, konnten sowohl bei Kontrollen als auch bei UAD- und COVID-Patienten antigenspezifische polyfunktionale $CD4^+$ -T-Zellen nach der Impfung gemessen werden (130).

Trotz der erheblich eingeschränkten serologischen Impfantwort und in der Literatur beschriebener zahlreicher T- und B-zellulärer Defekte von COVID-Patienten (131) ist wegen der insgesamt vergleichbaren T-zellulären Immunität der Patienten von einem Nutzen durch die Impfung auszugehen. Aufgrund der generell guten Verträglichkeit und des geringen Nebenwirkungsspektrums von Totimpfstoffen bei Patienten mit primärem ID (68, 69) ist demzufolge die saisonale Impfung bei COVID- und UAD-Patienten klar zu empfehlen.

Eine wichtige Rolle spielt allgemein auch die Umgebungsprophylaxe bei Patienten mit primärem ID, denen bestimmte Impfstoffe nicht verabreicht werden können oder die ein deutlich eingeschränktes Impfansprechen zeigen (68). Um das Risiko einer Übertragung des Virus zu vermindern, empfiehlt die STIKO auch die Influenzaimpfung unmittelbarer Kontaktpersonen (67). Dieser Ansatz ist in der Prävention von Influenzainfektionen bei Risikopatienten wirksam (132-134). Daneben können auch antivirale Substanzen zur Therapie eingesetzt werden. Aufgrund von Resistenzen gegen M2-Membranproteinhemmer sollten insbesondere Neuraminidase-Inhibitoren genutzt werden (135, 136). Diese Medikamente können sowohl zur prä- als auch zur postexpositionellen Prophylaxe eingenommen werden, wobei die mögliche Förderung von Resistenzen beachtet werden muss (135-137). Neben Impfungen und Medikamenten sollten auch nicht-medikamentöse Maßnahmen, wie allgemeine hygienische Verhaltensregeln oder das Meiden menschlicher Kontakte während einer Influenzapandemie, berücksichtigt werden (64, 135, 137).

5.3) Limitationen

Die durchgeführte Untersuchung zur Impfantwort von CVID- und UAD-Patienten weist eine Anzahl von Limitationen auf, die es bei der Bewertung der Ergebnisse und der Schlussfolgerungen zu berücksichtigen gilt.

Insgesamt wurde das Impfansprechen kleiner Patientenpopulationen untersucht, welche aus je acht CVID- und acht UAD-Patienten bestanden. Kleine Fallzahlen stellen vor allem für komplexere statistische Verfahren einen beschränkenden Faktor dar und die Möglichkeit eines zufälligen Zusammenhanges muss daher bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Zusätzlich waren beide Krankheitsbilder aufgrund der geringen Fallzahl nicht in ihrem kompletten Krankheitsspektrum vertreten. Viele mögliche Krankheitsmanifestationen oder Therapieverfahren, die zu einer Immundysfunktionen führen können und darüber einen Einfluss auf die Impfantwort haben könnten, waren nicht vorhanden. Entsprechend den Beobachtungen von Goldacker und Kollegen (84) wurde während der Teilnahme an dieser Untersuchung bei den Patienten weder eine Malignomkrankung noch eine fortgeschrittene renale, hepatische oder kardiopulmonale Erkrankung beobachtet. Zudem erhielt zum Zeitpunkt der Untersuchung keiner der Patienten eine immunsuppressive Therapie. Insgesamt beziehen sich die existenten Daten zum Ansprechen einer Influenzaimpfung bei CVID-Patienten ebenfalls auf Kohorten mit kleinen Fallzahlen und die klinischen Krankheitsmanifestationen der Patienten werden in diesen Arbeiten nicht näher charakterisiert (77-79). Die geringe Fallzahl beider Kohorten in dieser Untersuchung ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass beide Erkrankungen seltene Krankheitsbilder sind. Die Angaben zur Prävalenz von CVID liegen je nach Quelle in einem Bereich von 1/10.000 bis 1/50.000 (9, 10, 12). Zur Prävalenz von UAD fehlen aktuell konkrete Zahlen.

Eine weitere Einschränkung ergibt sich aus den verwendeten Diagnosekriterien. Wie in der Einleitung erwähnt, ist es in der Praxis in einigen Fällen durchaus schwierig Patienten eindeutig in die Kategorien CVID oder UAD einzuordnen. Ursächlich dafür ist unter anderem die uneinheitliche Definition der Impfantwort, die der Unterscheidung zwischen den beiden Erkrankungen dienen kann. Aktuell mangelt es an klaren Vorgaben, welche diagnostischen Impfungen durchgeführt werden sollten und wie die Ergebnisse konkret zu bewerten sind. Daneben ist bis dato das Krankheitsbild UAD in Abgrenzung zu CVID insgesamt wenig untersucht worden, so dass insbesondere für Grenzfälle keine klaren differentialdiagnostischen Vorgaben existieren.

Aus dem Prozedere der durchgeführten Untersuchung ergeben sich mehrere Einschränkungen.

Zwei wesentliche methodische Limitierungen sind Folge der gewählten Inkubationszeit und Gating-Strategie. In der vorliegenden Arbeit wurden PBMCs insgesamt für 20 Stunden mit dem Impfstoff bzw. mit SEB inkubiert. In den ursprünglich von Thiel und Kollegen entwickelten Färbeprotokollen für CD40L wurde mit kürzeren Inkubationszeiten von 6 bis maximal 16 Stunden gearbeitet (96, 97, 138). Folglich könnte es sein, dass bei einer Inkubationszeit von insgesamt 20 Stunden nicht alle aktivierten Zellen CD40L exprimierten und somit relevante Zellen von der Analyse nicht erfasst wurden. Zudem wurden durch die gewählte Gating-Strategie aktivierte Zellen, welche aufgrund der Aktivierung die Expression von CD4 vermindert haben, nicht berücksichtigt. In Folge der beiden genannten Punkte besteht die Möglichkeit, dass weniger aktivierte Zellen gemessen wurden als tatsächlich vorhanden waren.

Eine weitere relevante methodische Einschränkung ist der Tatsache geschuldet, dass zelluläre und humorale Immunität nur zu einem Zeitpunkt nach erfolgter Impfung analysiert wurden. Um den Nutzen einer Influenzaimpfung zu bewerten, sollte die Dynamik der Impfantwort im Verlauf einer Saison untersucht werden.

Zwei weitere methodische Limitierungen ergeben sich aus der Anzahl der durchgeführten Impfungen und dem verwendeten Impfstoff. Patienten mit eingeschränkter Immunität benötigen häufig mehrfache Impfungen um einen ausreichenden humoralen Impfschutz zu entwickeln (86, 139, 140). Die Verbesserung von humoraler und auch zellulärer Impfantwort durch die Mehrfachgabe des Influenzavakzins wurde auch für COVID-Patienten durch Pedersen und Kollegen beschrieben (79). In der vorliegenden Arbeit wurde ein nicht-adjuvantierter Impfstoff verwendet. Adjuvantien in Influenzavakzinen können zu einer besseren humoralen und T-zellulären Impfantwort führen (141, 142).

Das Hauptziel dieser Arbeit war es primär die Sinnhaftigkeit einer Influenzaimpfung von COVID-Patienten im Hinblick auf die widersprüchlichen bestehenden niederländischen und norwegischen Studienergebnisse zu klären. In der niederländischen Arbeit wurde nur eine Dosis eines nicht-adjuvantierten Vakzins verabreicht und zuletzt nach drei bis vier Wochen die Immunität überprüft (78). In der norwegischen Studie wurden die Patienten hingegen zweimal mit einem adjuvantierten Impfstoff geimpft und die Entwicklung der Impfantwort wurde im Verlauf von drei Monaten mehrmals gemessen (79). Da die Untersuchung aus Norwegen letztendlich nur drei COVID-Patienten

beschreibt und damit die Ergebnisse eine eingeschränkte Aussagekraft besitzen, wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Untersuchungsaufbau an der niederländischen Studie orientiert. Die Entscheidung für einen nicht-adjuvantierten Impfstoff wurde außerdem getroffen, um die Möglichkeit einer unspezifischen Stimulation durch Inhaltsstoffe des Vakzins zu minimieren.

5.4) Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Impfantwort von CVID- und UAD-Patienten nach der Gabe des saisonalen TIV 2013/2014 untersucht. Die Messergebnisse zeigen, dass der Großteil beider Patientengruppen trotz erheblich eingeschränktem humoralem Impfansprechen eine den Kontrollprobanden entsprechende T-zelluläre Impfantwort entwickeln kann. In den aktuellen Empfehlungen der STIKO wird die jährliche saisonale Influenzaimpfung bei Patienten mit eingeschränkter Immunität empfohlen (67). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Sinnhaftigkeit dieser Indikation bei den Krankheitsbildern CVID und UAD.

Dennoch sind weiterführende Untersuchungen über die saisonale Influenzaimpfung bei beiden Erkrankungen sinnvoll.

Aktuell existieren für beide Krankheitsbilder keine Daten zur Prävalenz und Schwere von Influenzaerkrankungen. Um den tatsächlichen protektiven Effekt der Impfung zu erfassen sind demzufolge zusätzliche Studien nötig, um diesbezügliche Unterschiede zwischen geimpften und nicht-geimpften Patienten zu erforschen.

Aufgrund der geringen Patientenzahl dieser Untersuchung sollten die Ergebnisse, soweit möglich, an größeren Patientenpopulationen bestätigt werden. Eine größere Fallzahl ist möglicherweise mit einem breiteren Spektrum an unterschiedlichen Krankheitsmanifestationen verbunden. Dies bietet die Möglichkeit potentielle Assoziationen von bestimmten klinischen Phänotypen mit komplikationsreichen Influenzainfektionen aufzudecken und darüber Risikogruppen zu identifizieren.

Um mögliche Verbesserungen der humoralen und der zellulären Impfantwort gegen Influenza zu erfassen, sollte die Impfantwort bei mehrfacher Gabe eines Influenzaimpfstoffes untersucht werden. Auch die potentielle Steigerung durch den Einsatz von adjuvantierten Impfstoffen sollte berücksichtigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde vom gesamten Spektrum der zellulären Immunität nur eine Komponente der T-zellulären Immunität untersucht. Zur näheren Charakterisierung wäre daher die

Analyse anderer Immunzellen sowie weiterer T-Zellpopulationen, wie CD8⁺-T-Zellen oder regulatorischer T-Zellen, sinnvoll.

Weitergehende Studien an gesunden Kontrollprobanden, COVID- und UAD-Patienten bieten generell darüber hinaus die Möglichkeit Kriterien einer erfolgreichen humoralen und zellulären Impfantwort gegen Influenza näher zu charakterisieren und Messtechniken zu standardisieren.

6) Literaturverzeichnis

1. Collins M, Fischer A, Geha R, Klenerman P, Littman D, Malim M, Rowland-Jones S, Trasher A. Failures of Host Defense Mechanisms. In: Murphy K, Travers P, Walport M, Hrsg. Janeway's immunobiology. 7 Auflage. London, UK: Garland Science, 2008:497-554.
2. Bousfiha A, Jeddane L, Al-Herz W, Ailal F, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Gaspar HB, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhendler E, Picard C, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML. The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. Journal of clinical immunology 2015;35(8):727-38.
3. Wahn V. Das infektanfällige Kind. HNO 2000;48(3):231-4.
4. Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. Journal of clinical immunology 2007;27(5):497-502.
5. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. Lancet (London, England) 2008;372(9637):489-502.
6. ESID Registry Database Statistics - Major Immunodeficiency Groups (Stand: 25 Juni 2014). European Society for Immunodeficiencies, 2014. (aufgerufen am 2 Dezember 2017, unter: <http://esid.org/Working-Parties/Registry/ESID-Database-Statistics>).
7. Witte T. Humorale Immundefekte. In: Schmidt RE, Baumann U, Hrsg. Primäre und sekundäre Immundefekte. 2 Auflage. Bremen, Deutschland: UNI-MED Verlag AG, 2009:21-9.
8. ESID Registry - Working Definitions for Clinical Diagnosis of PID (Stand: 25 April 2017). European Society for Immunodeficiencies, 2017. (aufgerufen am 10 Oktober 2017, unter: <https://esid.org/Working-Parties/Registry/Diagnosis-criteria>).
9. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. British journal of haematology 2009;145(6):709-27.
10. Salzer U, Warnatz K, Peter HH. Common variable immunodeficiency: an update. Arthritis research & therapy 2012;14(5):223.
11. Sneller MC. Common variable immunodeficiency. The American journal of the

medical sciences 2001;321(1):42-8.

12. Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. International Union of Immunological Societies. *Clinical and experimental immunology* 1999;118 Suppl 1:1-28.
13. Kokron CM, Errante PR, Barros MT, Baracho GV, Camargo MM, Kalil J, Rizzo LV. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 2004;76(4):707-26.
14. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debre P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008;111(1):77-85.
15. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, Claudio P, Franco D, Maria Pesce A, Borghese F, Guerra A, Rondelli R, Plebani A. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *Journal of clinical immunology* 2007;27(3):308-16.
16. Gathmann B, Mahlaoui N, Gerard L, Oksenhendler E, Warnatz K, Schulze I, Kindle G, Kuijpers TW, van Beem RT, Guzman D, Workman S, Soler-Palacin P, De Gracia J, Witte T, Schmidt RE, Litzman J, Hlavackova E, Thon V, Borte M, Borte S, Kumararatne D, Feighery C, Longhurst H, Helbert M, Szaflarska A, Sediva A, Belohradsky BH, Jones A, Baumann U, Meyts I, Kutukculer N, Wagstrom P, Galal NM, Roesler J, Farmaki E, Zinovieva N, Ciznar P, Papadopoulou-Alataki E, Bienemann K, Velbri S, Panahloo Z, Grimbacher B. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2014;134(1):116-26.
17. Oksenhendler E, Gerard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, Viallard JF, Gardembas M, Galicier L, Schleinitz N, Suarez F, Soulas-Sprauel P, Hachulla E, Jaccard A, Gardeur A, Theodorou I, Rabian C, Debre P. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008;46(10):1547-54.
18. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*

1999;92(1):34-48.

19. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, Fieschi C, Thon V, Abedi MR, Hammarstrom L. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008;112(2):277-86.

20. Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *The Quarterly journal of medicine* 1993;86(1):31-42.

21. Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and experimental immunology* 2000;120(2):225-31.

22. Vorechovsky I, Zetterquist H, Paganelli R, Koskinen S, Webster AD, Bjorkander J, Smith CI, Hammarstrom L. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clinical immunology and immunopathology* 1995;77(2):185-92.

23. Maffucci P, Fillion CA, Boisson B, Itan Y, Shang L, Casanova JL, Cunningham-Rundles C. Genetic Diagnosis Using Whole Exome Sequencing in Common Variable Immunodeficiency. *Frontiers in immunology* 2016;7.

24. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood* 2012;119(7):1650-7.

25. Martinez Garcia MA, de Rojas MD, Nauffal Manzur MD, Munoz Pamplona MP, Compte Torrero L, Macian V, Perpina Tordera M. Respiratory disorders in common variable immunodeficiency. *Respir Med* 2001;95(3):191-5.

26. Warnatz K, Goldacker S. [Common variable immunodeficiency: a clinical challenge]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 2013;72(7):653-60, 62.

27. Ward C, Lucas M, Piris J, Collier J, Chapel H. Abnormal liver function in common variable immunodeficiency disorders due to nodular regenerative hyperplasia. *Clinical and experimental immunology* 2008;153(3):331-7.

28. Malamut G, Zioli M, Suarez F, Beaugrand M, Viallard JF, Lascaux AS, Verkarre V, Bechade D, Poynard T, Hermine O, Cellier C. Nodular regenerative hyperplasia: The main liver disease in patients with primary hypogammaglobulinemia and hepatic abnormalities. *Journal of Hepatology* 2008;48(1):74-82.

29. Michel M, Chanut V, Galicier L, Ruivard M, Levy Y, Hermine O, Oksenhendler E, Schaeffer A, Bierling P, Godeau B. Autoimmune thrombocytopenic purpura and

common variable immunodeficiency: analysis of 21 cases and review of the literature. *Medicine* 2004;83(4):254-63.

30. Ko J, Radigan L, Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2005;116(1):37-41.

31. Warnatz K, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002;99(5):1544-51.

32. Xiao X, Miao Q, Chang C, Gershwin ME, Ma X. Common variable immunodeficiency and autoimmunity--an inconvenient truth. *Autoimmunity reviews* 2014;13(8):858-64.

33. Ramyar A, Aghamohammadi A, Moazzami K, Rezaei N, Yeganeh M, Cheraghi T, Pouladi N, Heydari G, Abolhassani H, Amirzargar AA, Parvaneh N, Moin M. Presence of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura and autoimmune hemolytic anemia in the patients with common variable immunodeficiency. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology* 2008;7(3):169-75.

34. Wang J, Cunningham-Rundles C. Treatment and outcome of autoimmune hematologic disease in common variable immunodeficiency (CVID). *Journal of autoimmunity* 2005;25(1):57-62.

35. Brandt D, Gershwin ME. Common variable immune deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 2006;5(7):465-70.

36. Ardeniz O, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2009;133(2):198-207.

37. Mullighan CG, Fanning GC, Chapel HM, Welsh KI. TNF and lymphotoxin-alpha polymorphisms associated with common variable immunodeficiency: role in the pathogenesis of granulomatous disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1997;159(12):6236-41.

38. Fasano MB, Sullivan KE, Sarpong SB, Wood RA, Jones SM, Johns CJ, Lederman HM, Bykowsky MJ, Greene JM, Winkelstein JA. Sarcoidosis and common variable immunodeficiency. Report of 8 cases and review of the literature. *Medicine* 1996;75(5):251-61.

39. Prasse A, Kayser G, Warnatz K. Common variable immunodeficiency-associated granulomatous and interstitial lung disease. *Current opinion in pulmonary medicine*

2013;19(5):503-9.

40. Boursiquot JN, Gerard L, Malphettes M, Fieschi C, Galicier L, Boutboul D, Borie R, Viallard JF, Soulas-Sprauel P, Berezne A, Jaccard A, Hachulla E, Haroche J, Schleinitz N, Tetu L, Oksenhendler E. Granulomatous disease in CVID: retrospective analysis of clinical characteristics and treatment efficacy in a cohort of 59 patients. *Journal of clinical immunology* 2013;33(1):84-95.
41. Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004;114(2):415-21.
42. Bouvry D, Mouthon L, Brillet PY, Kambouchner M, Ducroix JP, Cottin V, Haroche J, Viallard JF, Lazor R, Lebargy F, Tazi A, Wallaert B, Smail A, Pellegrin JL, Nunes H, Amoura Z, Cordier JF, Valeyre D, Naccache JM. Granulomatosis-associated common variable immunodeficiency disorder: a case-control study versus sarcoidosis. *The European respiratory journal* 2013;41(1):115-22.
43. Morimoto Y, Routes JM. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Current allergy and asthma reports* 2005;5(5):370-5.
44. Vajdic CM, Mao L, van Leeuwen MT, Kirkpatrick P, Grulich AE, Riminton S. Are antibody deficiency disorders associated with a narrower range of cancers than other forms of immunodeficiency? *Blood* 2010;116(8):1228-34.
45. Mellemkjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, Bjorkander J, Olsen JH. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clinical and experimental immunology* 2002;130(3):495-500.
46. Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF, Thompson RA. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet (London, England)* 1985;1(8423):263-6.
47. Driessen GJ, Dalm VA, van Hagen PM, Grashoff HA, Hartwig NG, van Rossum AM, Warris A, de Vries E, Barendregt BH, Pico I, Posthumus S, van Zelm MC, van Dongen JJ, van der Burg M. Common variable immunodeficiency and idiopathic primary hypogammaglobulinemia: two different conditions within the same disease spectrum. *Haematologica* 2013;98(10):1617-23.
48. Unclassified Antibody Deficiency in the European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry - the unPAD study (Stand: 21 Oktober 2015). European Society for Immunodeficiencies, 2015. (aufgerufen am 30 Dezember 2017, unter:

http://www.estherdevries.nl/ewExternalFiles/Protocol_unPAD_v1.1_Signed.pdf).

49. Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L. Das B-Zell-System. In: Holländer GA, Hrsg. Immunologie - Grundlagen für Klinik und Praxis. 1 Auflage. München, Deutschland: Urban & Fischer Verlag, 2006:39-81.
50. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, Lamers MC, Carsetti R. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *The Journal of experimental medicine* 1999;190(1):75-89.
51. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *The Journal of experimental medicine* 1998;188(9):1679-89.
52. Jacquot S, Boyer O. [Heterogeneity and function of human B lymphocytes]. *Medecine sciences : M/S* 2006;22(12):1075-80.
53. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 2008;74(5):261-71.
54. Looney RJ, Huggins J. Use of intravenous immunoglobulin G (IVIg). Best practice & research *Clinical haematology* 2006;19(1):3-25.
55. Roifman CM, Berger M, Notarangelo LD. Management of primary antibody deficiency with replacement therapy: summary of guidelines. *Immunology and allergy clinics of North America* 2008;28(4):875-6, x.
56. de Gracia J, Vendrell M, Álvarez A, Pallisa E, Rodrigo M-J, de la Rosa D, Mata F, Andreu J, Morell F. Immunoglobulin therapy to control lung damage in patients with common variable immunodeficiency. *International immunopharmacology* 2004;4(6):745-53.
57. Lucas M, Lee M, Lortan J, Lopez-Granados E, Misbah S, Chapel H. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: Relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010;125(6):1354-60.e4.
58. Quinti I, Soresina A, Guerra A, Rondelli R, Spadaro G, Agostini C, Milito C, Trombetta AC, Visentini M, Martini H, Plebani A, Fiorilli M. Effectiveness of immunoglobulin replacement therapy on clinical outcome in patients with primary antibody deficiencies: results from a multicenter prospective cohort study. *Journal of clinical immunology* 2011;31(3):315-22.

59. Busse PJ, Razvi S, Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002;109(6):1001-4.
60. Paquin-Proulx D, Sandberg JK. Persistent Immune Activation in CVID and the Role of IVIg in Its Suppression. *Frontiers in immunology* 2014;5:637.
61. Carbone J, Escudero A, Mayayo M, Ballesteros M, Perez-Corral A, Sanchez-Ramon S, Sarmiento E, Micheloud D, Fernandez-Cruz E. Partial response to anti-CD20 monoclonal antibody treatment of severe immune thrombocytopenic purpura in a patient with common variable immunodeficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1051:666-71.
62. Thatayatikom A, Thatayatikom S, White AJ. Infliximab treatment for severe granulomatous disease in common variable immunodeficiency: a case report and review of the literature. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2005;95(3):293-300.
63. Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT, Keller M, Kobrynski LJ, Komarow HD, Mazer B, Nelson RP, Jr., Orange JS, Routes JM, Shearer WT, Sorensen RU, Verbsky JW, Bernstein DI, Blessing-Moore J, Lang D, Nicklas RA, Oppenheimer J, Portnoy JM, Randolph CR, Schuller D, Spector SL, Tilles S, Wallace D. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015;136(5):1186-205.e1-78.
64. RKI-Ratgeber für Ärzte (Stand: 22 Februar 2016). Robert Koch-Institut. *Epid Bull* 2016;7:57-66.
65. Hannoun C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert review of vaccines* 2013;12(9):1085-94.
66. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization* 1980;58(4):585-91.
67. Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut - 2016/2017 (Stand: 29 August 2016). Robert Koch-Institut. *Epid Bull* 2016;34:301-40.
68. Eibl MM, Wolf HM. Vaccination in patients with primary immune deficiency, secondary immune deficiency and autoimmunity with immune regulatory abnormalities. *Immunotherapy* 2015:1-20.
69. Principi N, Esposito S. Vaccine use in primary immunodeficiency disorders. *Vaccine* 2014;32(30):3725-31.
70. Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines

(CPMP/BWP/214/96) (Stand: 12 März 1997). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1997. (aufgerufen am 10 Februar 2017, unter: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/seasonal_influenza/vaccines/Pages/influenza_vaccination.aspx).

71. Hannoun C, Megas F, Piercy J. Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination. *Virus Research* 2004;103(1–2):133-8.
72. Black S, Nicolay U, Vesikari T, Knuf M, Del Giudice G, Della Cioppa G, Tsai T, Clemens R, Rappuoli R. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. *The Pediatric infectious disease journal* 2011;30(12):1081-5.
73. McElhaney JE, Xie D, Hager WD, Barry MB, Wang Y, Kleppinger A, Ewen C, Kane KP, Bleackley RC. T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2006;176(10):6333-9.
74. Strutt TM, McKinstry KK, Marshall NB, Vong AM, Dutton RW, Swain SL. Multipronged CD4 T cell effector and memory responses cooperate to provide potent immunity against respiratory virus. *Immunological reviews* 2013;255(1):149-64.
75. Spitaels J, Roose K, Saelens X. In fl uenza and Memory T Cells: How to Awake the Force. *Vaccines* 2016;4(4).
76. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature reviews Immunology* 2008;8(4):247-58.
77. van Assen S, Holvast A, Telgt DS, Benne CA, de Haan A, Westra J, Kallenberg CG, Bijl M. Patients with humoral primary immunodeficiency do not develop protective anti-influenza antibody titers after vaccination with trivalent subunit influenza vaccine. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2010;136(2):228-35.
78. van Assen S, de Haan A, Holvast A, Horst G, Gorter L, Westra J, Kallenberg CG, Telgt DS, Palache AM, Giezenan KM, Bijl M. Cell-mediated immune responses to inactivated trivalent influenza-vaccination are decreased in patients with common variable immunodeficiency. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2011;141(2):161-8.
79. Pedersen G, Halstensen A, Sjursen H, Naess A, Kristoffersen EK, Cox RJ. Pandemic influenza vaccination elicits influenza-specific CD4+ Th1-cell responses in hypogammaglobulinaemic patients: four case reports. *Scandinavian journal of immunology* 2011;74(2):210-8.
80. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins* 2010;2(8):2177-97.

81. Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 1988;263(34):18545-52.
82. Versuch 2: Grundlagen der Durchflusszytometrie (aufgerufen am 5 November 2016, unter: http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/2081233.PDF).
83. Holländer GA, Barthlott T, Keller M, Krenger W, Piali L. Das T-Zell-System. In: Holländer GA, Hrsg. *Immunologie - Grundlagen für Klinik und Praxis*. 1 Auflage. München, Deutschland: Urban & Fischer Verlag, 2006:82-133.
84. Goldacker S, Draeger R, Warnatz K, Huzly D, Salzer U, Thiel J, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Active vaccination in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2007;124(3):294-303.
85. Kendal AP, Cate TR. Increased sensitivity and reduced specificity of hemagglutination inhibition tests with ether-treated influenza B/Singapore/222/79. *Journal of clinical microbiology* 1983;18(4):930-4.
86. Rambal V, Muller K, Dang-Heine C, Sattler A, Dziubianau M, Weist B, Luu SH, Stoyanova A, Nickel P, Thiel A, Neumann A, Schweiger B, Reinke P, Babel N. Differential influenza H1N1-specific humoral and cellular response kinetics in kidney transplant patients. *Medical microbiology and immunology* 2014;203(1):35-45.
87. Bui HH, Peters B, Assarsson E, Mbawuike I, Sette A. Ab and T cell epitopes of influenza A virus, knowledge and opportunities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(1):246-51.
88. Bernstein ED, Gardner EM, Abrutyn E, Gross P, Murasko DM. Cytokine production after influenza vaccination in a healthy elderly population. *Vaccine* 1998;16(18):1722-31.
89. Murasko DM, Bernstein ED, Gardner EM, Gross P, Munk G, Dran S, Abrutyn E. Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Experimental gerontology* 2002;37(2-3):427-39.
90. Garcia-Canas V, Lorbetskie B, Bertrand D, Cyr TD, Girard M. Selective and quantitative detection of influenza virus proteins in commercial vaccines using two-dimensional high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Analytical chemistry* 2007;79(8):3164-72.
91. Co MD, Orphin L, Cruz J, Pazoles P, Green KM, Potts J, Leporati AM, Babon JA, Evans JE, Ennis FA, Terajima M. In vitro evidence that commercial influenza vaccines are not similar in their ability to activate human T cell responses. *Vaccine*

2009;27(2):319-27.

92. Talbot HK, Nian H, Zhu Y, Chen Q, Williams JV, Griffin MR. Clinical effectiveness of split-virion versus subunit trivalent influenza vaccines in older adults. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2015;60(8):1170-5.
93. Kissling E, Valenciano M, Buchholz U, Larrauri A, Cohen JM, Nunes B, Rogalska J, Pitigoi D, Paradowska-Stankiewicz I, Reuss A, Jimenez-Jorge S, Daviaud I, Guiomar R, O'Donnell J, Necula G, Gluchowska M, Moren A. Influenza vaccine effectiveness estimates in Europe in a season with three influenza type/subtypes circulating: the I-MOVE multicentre case-control study, influenza season 2012/13. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2014;19(6).
94. Beyer WE, Palache AM, Osterhaus AD. Comparison of Serology and Reactogenicity between Influenza Subunit Vaccines and Whole Virus or Split Vaccines: A Review and Meta-Analysis of the Literature. *Clinical drug investigation* 1998;15(1):1-12.
95. Ato M, Takahashi Y, Fujii H, Hashimoto S, Kaji T, Itamura S, Horiuchi Y, Arakawa Y, Tashiro M, Takemori T. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon-alpha-dependent apoptosis. *Vaccine* 2013;31(17):2184-90.
96. Kirchhoff D, Frentsch M, Leclerk P, Bumann D, Rausch S, Hartmann S, Thiel A, Scheffold A. Identification and isolation of murine antigen-reactive T cells according to CD154 expression. *European journal of immunology* 2007;37(9):2370-7.
97. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nature medicine* 2005;11(10):1118-24.
98. Treanor JJ, Talbot HK, Ohmit SE, Coleman LA, Thompson MG, Cheng PY, Petrie JG, Lofthus G, Meece JK, Williams JV, Berman L, Breese Hall C, Monto AS, Griffin MR, Belongia E, Shay DK. Effectiveness of seasonal influenza vaccines in the United States during a season with circulation of all three vaccine strains. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012;55(7):951-9.
99. Talbot HK, Zhu Y, Chen Q, Williams JV, Thompson MG, Griffin MR. Effectiveness of influenza vaccine for preventing laboratory-confirmed influenza hospitalizations in adults, 2011-2012 influenza season. *Clinical infectious diseases : an official publication*

of the Infectious Diseases Society of America 2013;56(12):1774-7.

100. Beran J, Vesikari T, Wertzova V, Karvonen A, Honegr K, Lindblad N, Van Belle P, Peeters M, Innis BL, Devaster JM. Efficacy of inactivated split-virus influenza vaccine against culture-confirmed influenza in healthy adults: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of infectious diseases* 2009;200(12):1861-9.

101. Webster RG. Immunity to influenza in the elderly. *Vaccine* 2000;18(16):1686-9.

102. 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. *The Journal of hygiene* 1972;70(4):767-77.

103. Tsang TK, Cauchemez S, Perera RA, Freeman G, Fang VJ, Ip DK, Leung GM, Malik Peiris JS, Cowling BJ. Association between antibody titers and protection against influenza virus infection within households. *The Journal of infectious diseases* 2014;210(5):684-92.

104. Gravenstein S, Drinka P, Duthie EH, Miller BA, Brown CS, Hensley M, Circo R, Langer E, Ershler WB. Efficacy of an influenza hemagglutinin-diphtheria toxoid conjugate vaccine in elderly nursing home subjects during an influenza outbreak. *Journal of the American Geriatrics Society* 1994;42(3):245-51.

105. Coughlan L, Lambe T. Measuring Cellular Immunity to Influenza: Methods of Detection, Applications and Challenges. *Vaccines* 2015;3(2):293-319.

106. Gotch F, McMichael A, Smith G, Moss B. Identification of viral molecules recognized by influenza-specific human cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 1987;165(2):408-16.

107. Yewdell JW, Bennink JR, Smith GL, Moss B. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985;82(6):1785-9.

108. Wilkinson TM, Li CK, Chui CS, Huang AK, Perkins M, Liebner JC, Lambkin-Williams R, Gilbert A, Oxford J, Nicholas B, Staples KJ, Dong T, Douek DC, McMichael AJ, Xu XN. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nature medicine* 2012;18(2):274-80.

109. Heiny AT, Miotto O, Srinivasan KN, Khan AM, Zhang GL, Brusica V, Tan TW, August JT. Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS One* 2007;2(11):e1190.

110. Hillaire ML, van Trierum SE, Kreijtz JH, Bodewes R, Geelhoed-Mieras MM,

Nieuwkoop NJ, Fouchier RA, Kuiken T, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Cross-protective immunity against influenza pH1N1 2009 viruses induced by seasonal influenza A (H3N2) virus is mediated by virus-specific T-cells. *The Journal of general virology* 2011;92(Pt 10):2339-49.

111. van de Sandt CE, Kreijtz JH, de Mutsert G, Geelhoed-Mieras MM, Hillaire ML, Vogelzang-van Trierum SE, Osterhaus AD, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Human cytotoxic T lymphocytes directed to seasonal influenza A viruses cross-react with the newly emerging H7N9 virus. *Journal of virology* 2014;88(3):1684-93.

112. Roti M, Yang J, Berger DA, Huston L, James EA, Kwok WW. Healthy human subjects have CD4+ T cells directed against H5N1 influenza virus(). *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2008;180(3):1758-68.

113. Tu W, Mao H, Zheng J, Liu Y, Chiu SS, Qin G, Chan PL, Lam KT, Guan J, Zhang L, Guan Y, Yuen KY, Peiris JS, Lau YL. Cytotoxic T lymphocytes established by seasonal human influenza cross-react against 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Journal of virology* 2010;84(13):6527-35.

114. Brown DM, Roman E, Swain SL. CD4 T cell responses to influenza infection. *Seminars in immunology* 2004;16(3):171-7.

115. McElhaney JE. Influenza vaccine responses in older adults. *Ageing research reviews* 2011;10(3):379-88.

116. Brown DM, Dilzer AM, Meents DL, Swain SL. CD4 T cell-mediated protection from lethal influenza: perforin and antibody-mediated mechanisms give a one-two punch. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2006;177(5):2888-98.

117. Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL, Kelleher AD. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002;168(11):5954-8.

118. Brown DM, Lee S, Garcia-Hernandez Mde L, Swain SL. Multifunctional CD4 cells expressing gamma interferon and perforin mediate protection against lethal influenza virus infection. *Journal of virology* 2012;86(12):6792-803.

119. Graham MB, Braciale VL, Braciale TJ. Influenza virus-specific CD4+ T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection. *The Journal of experimental medicine* 1994;180(4):1273-82.

120. Teijaro JR, Verhoeven D, Page CA, Turner D, Farber DL. Memory CD4 T cells direct protective responses to influenza virus in the lungs through helper-independent

mechanisms. *Journal of virology* 2010;84(18):9217-26.

121. Sridhar S, Begom S, Bermingham A, Hoschler K, Adamson W, Carman W, Bean T, Barclay W, Deeks JJ, Lalvani A. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nature medicine* 2013;19(10):1305-12.

122. McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *The New England journal of medicine* 1983;309(1):13-7.

123. Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 2004;103(3):966-72.

124. Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, Chennareddi L, Goepfert P, Robinson HL, Lennox J, Amara RR. Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *Journal of virology* 2007;81(21):12071-6.

125. Mueller K, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, Hinrichs C, Trappe R, Thiel A, Reinke P, Babel N. BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. *Transplantation* 2011;91(1):100-7.

126. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M, Seder RA. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature medicine* 2007;13(7):843-50.

127. Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *Journal of virology* 2007;81(16):8468-76.

128. Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1990;145(12):4306-10.

129. Lichterfeld M, Yu XG, Waring MT, Mui SK, Johnston MN, Cohen D, Addo MM, Zaunders J, Alter G, Pae E, Strick D, Allen TM, Rosenberg ES, Walker BD, Altfeld M. HIV-1-specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8(+) T cells producing both interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Blood* 2004;104(2):487-94.

130. Hanitsch LG, Lobel M, Mieves JF, Bauer S, Babel N, Schweiger B, Wittke K, Grabowski P, Volk HD, Scheibenbogen C. Cellular and humoral influenza-specific

immune response upon vaccination in patients with common variable immunodeficiency and unclassified antibody deficiency. *Vaccine* 2016;34(21):2417-23.

131. Bayry J, Hermine O, Webster DA, Levy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *Trends in molecular medicine* 2005;11(8):370-6.

132. Reichert TA, Sugaya N, Fedson DS, Glezen WP, Simonsen L, Tashiro M. The Japanese experience with vaccinating schoolchildren against influenza. *The New England journal of medicine* 2001;344(12):889-96.

133. Ghendon YZ, Kaira AN, Elshina GA. The effect of mass influenza immunization in children on the morbidity of the unvaccinated elderly. *Epidemiology and infection* 2006;134(1):71-8.

134. Potter J, Stott DJ, Roberts MA, Elder AG, O'Donnell B, Knight PV, Carman WF. Influenza vaccination of health care workers in long-term-care hospitals reduces the mortality of elderly patients. *The Journal of infectious diseases* 1997;175(1):1-6.

135. Fiore AE, Shay DK, Broder K, Iskander JK, Uyeki TM, Mootrey G, Bresee JS, Cox NS. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control* 2008;57(Rr-7):1-60.

136. Poland GA, Jacobson RM, Ovsyannikova IG. Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009;48(9):1254-6.

137. In Zusammenarbeit mit der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft: Empfehlungen zum Einsatz antiviraler Arzneimittel für die Postexpositions- und Langzeitprophylaxe während einer Influenzapandemie (Stand: 14 November 2007). *Dtsch Arztebl International* 2007;104(51-52):3571-81.

138. Meier S, Stark R, Frentsch M, Thiel A. The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4+ T cells. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2008;73(11):1035-42.

139. Gueller S, Allwinn R, Mousset S, Martin H, Wieters I, Herrmann E, Serve H, Bickel M, Bug G. Enhanced immune response after a second dose of an AS03-adjuvanted H1N1 influenza A vaccine in patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American*

Society for Blood and Marrow Transplantation 2011;17(10):1546-50.

140. de Lavallade H, Garland P, Sekine T, Hoschler K, Marin D, Stringaris K, Loucaides E, Howe K, Szydlo R, Kanfer E, Macdonald D, Kelleher P, Cooper N, Khoder A, Gabriel IH, Milojkovic D, Pavlu J, Goldman JM, Apperley JF, Rezvani K. Repeated vaccination is required to optimize seroprotection against H1N1 in the immunocompromised host. *Haematologica* 2011;96(2):307-14.

141. Galli G, Medini D, Borgogni E, Zedda L, Bardelli M, Malzone C, Nuti S, Tavarini S, Sammicheli C, Hilbert AK, Brauer V, Banzhoff A, Rappuoli R, Del Giudice G, Castellino F. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4+ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106(10):3877-82.

142. Baldo V, Baldovin T, Floreani A, Minuzzo M, Trivello R. Response to influenza vaccine in people with non-protective HI antibody titers. *European journal of epidemiology* 2006;21(11):843-5.

7) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CVID-Diagnosekriterien gemäß der ESID	10
Abbildung 2: UAD-Diagnosekriterien gemäß der ESID	11
Abbildung 3: Überblick über die betroffenen Organsysteme bei CVID-Patienten.	12
Abbildung 4: Einteilung der CVID-Kohorte gemäß der EuroClass-Klassifikation	18
Abbildung 5: Isolierung von peripheren mononukleären Zellen	33
Abbildung 6: Prinzip der Durchflusszytometrie.....	35
Abbildung 7: Überblick über die gewählte Gating-Strategie.....	39
Abbildung 8: Seroprotektionsraten gegen Influenza vor und nach der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014.....	48
Abbildung 9: Anstieg der Anti-Influenzatiter nach erfolgter Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014.....	49
Abbildung 10: Anti-Influenzatiter vor und nach der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014.....	50
Abbildung 11: Ergebnisse des Dosisfindungsversuches.....	52
Abbildung 12: Frequenzen Zytokin-produzierender aktivierter CD4 ⁺ -Zellen nach Stimulation mit SEB vor und nach der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014	53
Abbildung 13: Frequenzen Zytokin-produzierender aktivierter CD4 ⁺ -Zellen als Korrelat der zellulären Immunität nach der Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014	55
Abbildung 14: Anstieg der Frequenzen Zytokin-produzierender aktivierter CD4 ⁺ -Zellen durch die Impfung mit VAXIGRIP® 2013/2014	57

8) Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften physiologischer und pathologischer Infektanfälligkeit	8
Tabelle 2: Freiburger-Klassifikation der CVID-Kohorte	16
Tabelle 3: Charakterisierung der einzelnen CVID- und UAD-Patienten	25
Tabelle 4: Immunologische Parameter der einzelnen CVID- und UAD-Patienten.....	26
Tabelle 5: Charakterisierung der einzelnen Kontrollprobanden	27
Tabelle 6: Zusammensetzung der extrazellulären Färbung	37
Tabelle 7: Zusammensetzung der intrazellulären Färbung	38
Tabelle 8: Demographische Daten der Kontrollprobanden, der CVID- und der UAD- Patienten.....	43
Tabelle 9: Mediane und Mittelwerte von IgG, IgA und IgM der CVID- und UAD-Patienten vor der Einleitung einer Ig-Substitution	44
Tabelle 10: Mediane und Mittelwerte der Lymphozytenpopulationen der CVID- und UAD-Patienten	44
Tabelle 11: Klinische Manifestationen der CVID- und UAD-Kohorte.....	46

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan Florian Mieves, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung der Impfantwort gegen Influenza von Patienten mit primären Antikörpermangelkrankungen selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jan Florian Mieves hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1) Leif Gunnar Hanitsch, Madlen Löbel, Jan Florian Mieves, Sandra Bauer, Nina Babel, Brunhilde Schweiger, Kirsten Wittke, Patricia Grabowski, Hans-Dieter Volk, Carmen Scheibenbogen, Cellular and humoral influenza-specific immune response upon vaccination in patients with common variable immunodeficiency and unclassified antibody deficiency, Vaccine, 2016.

2) Jan Florian Mieves, Kirsten Wittke, Helma Freitag, Hans-Dieter Volk, Carmen Scheibenbogen, Leif Gunnar Hanitsch, Influenza Vaccination in Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID), Current Allergy and Asthma Reports, 2017.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

1) Die Rekrutierung der Kontrollprobanden und deren Blutentnahmen erfolgte durch Jan Florian Mieves. An der Charakterisierung der drei Stichproben war Jan Florian Mieves wesentlich beteiligt.

Alle Untersuchungen mit Ausnahme des Hämagglutinationshemmtestes sowie die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden von Jan Florian Mieves eigenständig durchgeführt. Die graphische Darstellung und Interpretation der Ergebnisse erfolgte maßgeblich durch Jan Florian Mieves.

2) Die Abschnitte zur humoralen und zellulären Impfantwort gegen Influenza von CVID-Patienten wurden maßgeblich von Jan Florian Mieves verfasst. Zudem war Jan Florian Mieves an der Korrektur des Manuskriptes beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

1) Leif Gunnar Hanitsch, Madlen Löbel, Jan Florian Mieves, Sandra Bauer, Nina Babel, Brunhilde Schweiger, Kirsten Wittke, Patricia Grabowski, Hans-Dieter Volk, Carmen Scheibenbogen, Cellular and humoral influenza-specific immune response upon vaccination in patients with common variable immunodeficiency and unclassified antibody deficiency, *Vaccine*, 2016.

2) Jan Florian Mieves, Kirsten Wittke, Helma Freitag, Hans-Dieter Volk, Carmen Scheibenbogen, Leif Gunnar Hanitsch, Influenza Vaccination in Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID), *Current Allergy and Asthma Reports*, 2017.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Professor Dr. med. Carmen Scheibenbogen für die freundliche Überlassung des Themas und die stets exzellente Betreuung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch Herrn Dr. med. Leif Gunnar Hanitsch und Frau Dr. rer. nat. Madlen Löbel für die beständige und freundliche Zusammenarbeit und Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Auch Frau Sandra Maria Bauer und Frau Sonya Coralie Becker möchte ich meinen Dank für die Unterstützung bei dem Erlernen der durchgeführten labormedizinischen Techniken und für das stets angenehme Arbeitsklima aussprechen.

Bei den Mitarbeitern der Labor Berlin-Charité Vivantes GmbH und bei Frau Dr. rer. nat. Brunhilde Schweiger der Arbeitsgemeinschaft Influenza des Robert Koch-Institutes möchte ich mich ganz herzlich für die durchgeführten Untersuchungen bedanken.

Ganz besonders dankbar bin ich den beteiligten Patienten der Immundefektambulanz für Erwachsene und den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin. Ohne ihre Bereitschaft an dieser Untersuchung teilzunehmen, wäre diese Promotion nicht möglich gewesen.

Bei der Studienstiftung des deutschen Volkes möchte ich mich ausdrücklich für die großzügige finanzielle und intellektuelle Förderung während des zweiten Abschnittes meines Studiums und dieser Doktorarbeit bedanken.

Mein Dank gilt insbesondere auch meinem privaten Umfeld. Vielen Dank an meinen Vater, an meine Mutter, an meinen Bruder und an meine Freundin, die mich alle während der Promotion auf unterschiedliche Weise begleitet und unterstützt haben.