

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

DISSERTATION

**Charakterisierung von altersabhängigen immunologischen
Signaturen nach Influenza-Impfung**

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

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cecilia Bozzetti

aus Lecco

Datum der Promotion: 30.05.2015

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	3
Abstract	5
Abkürzungen	6
1 Einleitung.....	8
Influenza	9
1.1 Das Immunsystem.....	12
1.1.1 Die Lymphozyten	14
1.2 Veränderte Immunität im Alter.....	21
1.3 Zielsetzung	25
2 Material.....	26
2.1 Probanden.....	26
2.2 Instrumente	27
2.3 Verbrauchsmaterialien	27
2.4 Chemikalien und Reagenzien.....	28
2.5 Antikörper	28
2.6 Der Impfstoff.....	29
3 Methoden	30
3.1 Studienaufbau	30
3.2 Probengewinnung.....	30
3.3 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	30
3.4 Immunfluoreszenzfärbung.....	31
3.4.1 Markierung von Zelloberflächenmoleküle auf lebenden Zellen	31
3.4.2 Intrazelluläre und extrazelluläre Färbung von fixierten Zellen	32
3.5 Die multiparametrische Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie	33
3.6 Charakterisierung der B-Zellen.....	36
3.7 Charakterisierung der T-Zellen.....	40

INHALTSVERZEICHNIS

3.8	Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen - <i>Fast Immune Assay</i>	41
3.9	Zellzahlbestimmung.....	43
3.10	Serologische Analysen.....	45
3.11	Datenanalyse und Statistik.....	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Die serologische Impfantwort	47
4.2	Charakterisierung der B-Zellen.....	50
4.2.1	Plasmablasten	50
4.2.2	CD20 ⁺ B-Zellen.....	52
4.3	Charakterisierung der T-Zellen.....	54
4.3.1	CD4 ⁺ T-Zellen	55
4.3.2	CD8 ⁺ T-Zellen	56
4.3.3	Antigen-spezifische T-Zellen.....	58
4.4	Serologische Analyse von Herpesviren-spezifischen Antikörpern.....	66
4.5	Einfluss des Immunstatus auf das immunologische Alter und die Impfantwort	68
5	Diskussion.....	72
5.1	Die serologische Impfantwort	72
5.2	Charakterisierung der B-Zellen.....	73
5.3	Charakterisierung der T-Zellen.....	74
5.3.1	Antigen-spezifische T-Zellen.....	76
5.4	Einfluss des CMV-Status auf das immunologische Alter und die Impfantwort..	78
5.5	Fazit und Ausblick	80
	Literaturverzeichnis	82
	Eidesstattliche Versicherung	87
	Lebenslauf.....	88
	Danksagung	88

ABSTRAKT

Abstrakt

Die fortschreitende Alterung der Bevölkerung stellt die Medizin vor zahlreiche komplexe Herausforderungen. Neben Verbesserungen im therapeutischen Bereich stehen prophylaktische Maßnahmen mit positivem Kosten-Nutzen-Verhältnis im Fokus eines leistungsstarken Gesundheitssystems. Impfungen sind ein Beispiel prophylaktischer Ansätze, die Morbidität und Mortalität erheblich beeinflussen können. Weil Impfungen im Alter aber an Effektivität verlieren, kommt dem Verständnis für die Mechanismen dieser sogenannten Immunoseneszenz eine große Bedeutung zu.

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation immunologischer Signaturen, die einen Einfluss auf die altersabhängig veränderte Immunität ausüben. Die saisonale Influenza-Impfung weist eine besonders hohe Rate an Impfversagen bei älteren Menschen auf und stellt daher ein gutes Modell für die Untersuchung altersabhängiger Unterschiede in der Immunreaktion nach Vakzinierung dar. In der Studie **Protective Immunity in Ageing (PRIMAGE)** wurden zwei Alterskohorten (18-30 Jahre vs. 55-65 Jahre) mit dem trivalenten inaktivierten Vakzin (TIV) Mutagrip® 2011/2012 geimpft. Die Impfantwort wurde durch serologische Test mittels Hämagglutinin-Inhibition (HI) – Assay sowie durch die Charakterisierung von B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zudem wurden T-Lymphozyten anhand ihres Differenzierungsgrades phänotypisiert und Antigen-spezifische T-Lymphozyten für das Cytomegalie-Virus (CMV) nach *in vitro* Stimulation charakterisiert.

Unseren Daten belegen, dass die Immunantwort bei älteren Menschen geringer ausfällt als bei den Jüngeren, was sich durch verminderte HI-Titer für Influenza H1N1 als auch durch eine geringere Plasmablasten-Expansion darstellte. Zudem fand sich eine im Alter zunehmende relative Anreicherung von Gedächtniszellen im Vergleich zu naiven T-Lymphozyten sowie eine Zunahme an CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, die Erschöpfungsmarkern exprimieren. Wir konnten einen Zusammenhang zwischen dieser Verschiebung des T-Zell-Phänotyps mit dem Vorliegen latenter CMV-Infektionen feststellen. Außerdem wiesen die Antigen-spezifischen T-Lymphozyten in Abhängigkeit ihrer Spezifität für die CMV-Peptide IE-1 und pp65 Unterschiede im Zytokinprofil sowie im Phänotyp auf.

Diese Arbeit erlaubt somit Einblicke in die Mechanismen, die dem Phänomen der Immunoseneszenz zugrunde liegen. Neben einer verminderten humoralen Impfantwort wurde ein Zusammenhang dieser Mechanismen mit dem CMV-Status nachgewiesen.

ABSTRAKT

Diese Erkenntnisse liefern Argumente dafür, bei der Indikationsstellung zur Immunisierung neben dem anagraphischen auch das immunologische Alter sowie den CMV-Status zu berücksichtigen.

ABSTRAKT

Abstract

Demographics of an ageing society will pose significant challenges to present day health care systems. Along with advances in therapy, improvement of prophylactic medicine with favourable cost benefit analysis is urgently needed. Vaccinations are an example for prophylactic approaches capable of significantly reducing morbidity and mortality. As vaccinations are known to be less efficient in age, many efforts have been made to detect underlying mechanisms of what is called immunosenescence.

This study aims at identifying immunological signatures that modulate age-dependent immunity. Flu vaccination has been described to be less efficient in the elderly and is therefore a good model to study the effects of immunosenescence.

In our study **Protective Immunity in Ageing** (PRIMAGE) we vaccinated two age groups with the trivalent inactivated vaccine (TIV) Mutagrip® 2011/2012 and characterised their immune responses. Both serological and cellular responses were determined by either hemagglutinin inhibition assay (HIA) or flow cytometry. Furthermore, we analysed T cell subsets according to their differentiation and specificity towards cytomegalovirus (CMV) after *in vitro* stimulation.

Our data confirms a weaker immune response in the elderly in terms of impaired HI-titer (H1N1) as well as decreased plasmablast-expansion. Age-dependent differences in the T cell compartment were demonstrated by a phenotype shift from naïve to memory and an increase of T cells expressing exhaustion markers in the elderly.

In an effort to describe environmental factors in the genesis of these changes, we analysed the CMV status of our donors and found it to be associated with a memory like T cell phenotype as well as exhaustion.

We also assessed differential effects in cytokine profile and phenotype depending on T cell specificity towards the two CMV peptides IE-1 and pp65.

In summary, this study sheds further light onto the underlying mechanisms of immunosenescence. We could demonstrate an impaired immune response after flu vaccination in the elderly. Ageing as well as CMV infections modulate T cell subsets and may have important implications for the outcome of vaccination. Our data supports the integration of biological age, immunological age and CMV status to further increase the efficacy of vaccination.

ABKÜRZUNGEN

Abkürzungen

APC	Antigen präsentierende Zelle
APC	Allophykozyanin (engl. <i>allophycynine</i>)
BCR	B-Zellrezeptor (engl. <i>B cell receptor</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CMV	Cytomegalievirus
Cy5	Indopentamethyncyanin
DAPI	4',6'-diamino-2-phenyl-indol, dihydrochloride
DC	dendritische Zelle (engl. <i>dendritic cell</i>)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
g	Zentrifugalbeschleunigung: $g = 9.81 \text{ m/s}^2$
H	Hämagglutinin
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (engl. <i>human leucocyte antigen</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KLRG1	engl. <i>Killer-cell lectinlike receptor 1</i>

ABKÜRZUNGEN

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
N	Neuraminidase
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphat-buffered-saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
PI	Propidiumiodid
RT	Raumtemperatur
SSC	Seitenstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (engl. <i>T cell receptor</i>)
T _{NV}	naive T-Zelle (engl. <i>naive T cell</i>)
T _{CM}	T-Gedächtniszelle (engl. <i>central memory T cell</i>)
T _{EM}	Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (engl. <i>effector memory T cell</i>)
T _{EMRA}	Effektor-Zellen (engl. <i>effector memory RA positive T cell</i>)
TIV	trivalente inaktivierte Impfung (engl. <i>trivalent inactivated vaccine</i>)
TLR	Toll like Rezeptor (engl. <i>toll like receptor</i>)
TNF	Tumor Nekrose Faktor

1. EINLEITUNG

1 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit altersspezifischen Merkmalen der Immunantwort nach Influenza-Impfung sowie mit der Identifizierung von immunologischen Signaturen, die zu einer veränderten Immunität im Alter führen können. Im Rahmen der Studie „Protective Immunity in Ageing“ (PRIMAGE) wurde die Abwehrreaktion nach Influenza-Impfung für zwei altersgetrennte Probandenkohorten (jung vs. alt) analysiert.

Trotz Verbesserungen der Impfstoffe ist Influenza immer noch eine der Hauptursachen für Hospitalisierungen weltweit. Besonders Immunsupprimierte können an schweren Verläufen leiden. Zu den Risikogruppen zählen neben älteren Menschen, auch chronisch Kranke, Schwangere und Kinder. Ursache der Hospitalisierung sind letztlich respiratorische und kardiovaskuläre Komplikationen. Als primär prophylaktische Maßnahme gilt eine Impfung mit einem jährlich neu hergestellten Influenza-Impfstoff. Bei der Influenza-Impfung handelt es sich um eine Totimpfung, die inaktivierte virale Proteine beinhaltet. Die Herstellung der saisonalen Impfstoffe in der nördlichen Hemisphäre für die jeweilig kommenden Wintermonate orientiert sich an den viralen Stämmen, die sich zuvor in der südlichen Hemisphäre ausgebreitet hatten.

Schätzungen zufolge erkranken 41% der geimpften Erwachsenen an einer Infektion mit Influenza [1]. Die höhere Rate an Erkrankungen nach Impfung bei Risikogruppen (v.a. bei den > 65-Jährigen) lässt einen Verlust an der protektiven Wirksamkeit der Impfung mit steigendem Alter vermuten [1, 2]. Die Gründe hierfür sind Gegenstand aktueller Forschung sowie dieser Doktorarbeit. Unstrittig ist, dass sich die Alterung des Organismus auch am Immunsystem vollzieht, was sich an der Involution des Thymus oder der Verfettung des Knochenmarks zeigt. Die Chronifizierung von Infekten spiegelt den Verlust an effektiven Abwehrkräften wider. Das Immunsystem ist dabei nicht nur quantitativ (weniger naive Zellen) beeinträchtigt, sondern es wurden auch diverse qualitative Unterschiede aufgezeigt.

1. EINLEITUNG

Influenza

Infektion mit Influenza-Viren

Influenza ist eine akute respiratorische Erkrankung, die durch gleichnamige Viren verursacht wird.

Die Erreger können in den Organismus im oberen und/oder unteren Respirationstrakt eindringen und so nachfolgend eine Infektion verursachen. Diese ist durch systemische Symptome wie Fieber, Kopf- und Halsschmerzen, Husten, muskuläre Beschwerden und allgemeine Schwäche charakterisiert.

Infektionen mit Influenzaviren sind jedes Jahr in den Wintermonaten vermehrt zu beobachten. Von schweren Verläufen betroffen sind Patienten aus Risikogruppen, zu denen Immungeschwächte, Kinder und alte Menschen zählen. Bei diesen Gruppen kommt es häufig zu Komplikationen, die in erster Linie kardiopulmonaler Natur sind. Die Folgen sind eine erhöhte Rate an Hospitalisierungen sowie Todesfälle bei diesen Patientengruppen. Solche schwerwiegenden Infektionen sind zumeist durch Influenza A Viren verursacht. Infektionen durch Influenza B oder C sind weniger häufig. Influenza-B-Viren verursachen einen milderen Krankheitsverlauf. Influenza-C-Viren verursachen ein Krankheitsbild, was gemeinhin als einfache Erkältung bezeichnet wird. In der Bevölkerung ist eine hohe Rate an Immunität gegen diese Viren vorhanden.

Epidemiologie

Influenza-Epidemien finden zumeist während der Wintermonate auf der Nordhalbkugel sowie ganzjährig in den Tropen statt und weisen einen charakteristischen Zeitverlauf auf. Die Faktoren, die den zeitlichen Verlauf, die Dominanz bestimmter Virusstämme und damit die Ausprägung der Infektion beeinflussen, sind weitestgehend unklar. Eine geringe Seropositivität für einen bestimmten Virusstamm unter Kindern in der vergangenen Influenzasaison scheint dabei aber einen Vorhersagewert für das Vorkommen dieses Virusstammes in der folgenden Saison zu haben [3].

Der Ausbruch einer Epidemie beginnt abrupt. Die Infektionen breiten sich über einen Zeitraum von zwei bis drei Monaten aus, wobei die meisten Fälle aber innerhalb von zwei bis drei Wochen zu finden sind, um dann rasch abzuklingen. Zuerst erkranken dabei Kinder oder ältere Menschen, die vor allem unter chronischen kardiopulmonalen Erkrankungen leiden.

In der Saison 2011/12 wurden am Robert-Koch-Institut 9.500 klinisch-labordiagnostisch bestätigte Influenzafälle registriert. Der Höhepunkt der Influenzawelle war im Zeitraum

1. EINLEITUNG

Februar/März 2012 (Woche 8 bis 10). Influenza-A-Viren waren für 83% der Infektionen ursächlich (87% durch Influenza-A H3N2 und 13% Influenza-A H1N1). Hospitalisierungen wurden bei 20% der betroffenen Menschen gemeldet und die Mortalität betrug 0,3% [4]. In der folgenden Abbildung (Abb.1) sind die gemeldeten Influenza Fälle vom Oktober 2011 bis Juni 2012 in Deutschland nach Influenza-Viren Subtypen klassifiziert.

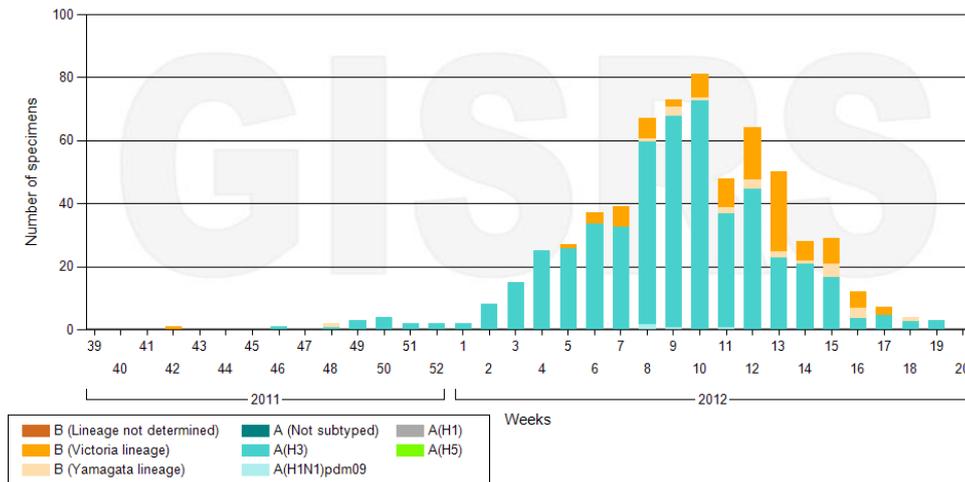


Abb. 1 Gemeldete Influenza-Fälle nach Virusstamm unterteilt in Deutschland in der Zeit Oktober 2011 - Juni 2012. Die Mehrheit der Fälle sind zwischen Woche 8 und Woche 10 des Jahres 2012 gemeldet worden. Der höchste Anstieg wurde in der Woche 10 gemeldet. Die Farbkodierung identifiziert die Influenza-Viren Subtypen. Influenza A (Blau) ist für die meisten Erkrankungen verantwortlich, wobei Influenza A/H3 (Hellblau) die höchste Rate verursachte. Influenza B (Orange) war der zweithäufigste Virusstamm, vor allem nach der 10. Woche des Jahres 2012. (Quelle:WHO) [5].

Influenza-Viren

Influenza-Viren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae-Viren. Charakteristikum dieser Viren ist ein einzelstrang-negatives RNA-Genom, das segmentiert vorliegt. Die Viren bestehen aus einem helikalen Kapsid und besitzen eine Lipidhülle. Sie sind 80-120 nm groß. Man unterscheidet drei Influenza-Viren: Influenza A, Influenza B und Influenza C. Die Typisierung dieser drei Serotypen erfolgt durch die Antigenität des Nukleokapsidproteins (NP) und des Matrixproteins (M). Influenza A-Viren werden weiterhin anhand der Oberflächenmoleküle Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) klassifiziert. Jeder Stamm ist dann durch den Ursprungsort, Isolationsnummer, Jahr der Isolation sowie den Subtyp definiert:

Stamm / Ursprungsort / Isolationsnummer / Jahr der Isolation (Subtyp)

Influenza A / California / 7 / 2009 (H1N1)

Man unterscheidet bei Influenza A-Viren 16 verschiedene Hämagglutinine (H1 bis H16) und 9 verschiedene Neuraminidasen (N1 bis N9). Von diesen sind H1, H2, H3, N1 und N2 bis heute mit menschlichen Infektionen assoziiert worden. Influenza B und Influenza

1. EINLEITUNG

C werden nicht weiter subklassifiziert, da die Stämme viel weniger Variationen unterliegen.

Das virale Genom besteht bei Influenza A und Influenza B aus 8 RNA-Segmenten, bei Influenza C aus 6 RNA-Segmenten. Jedes Segment kodiert für ein einzelnes virales Protein. Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) sind auf verschiedenen Segmenten des viralen Genoms kodiert, sodass sie bei Doppelinfektionen verschiedener Virustypen im gleichen Wirt untereinander getauscht werden können. Dieser Vorgang bezeichnet man als **Reassortment**. Dieser betrifft vor allem Influenza A-Viren, die eine erhebliche Variabilität zeigen. Ein Grund dafür ist die Fähigkeit des Virus nicht nur Menschen sondern auch Tierarten, wie z.B. Vögel und Schweine, infizieren zu können. Die Neukombination von Neuraminidase- und Hämagglutinin-Antigene wird als **Antigen-Shift** bezeichnet. Der Antigen-Shift kann entweder das H- oder N-Antigen allein oder beide Antigene gleichzeitig betreffen und ist auf das Influenza A-Virus begrenzt. Ein Antigen-Shift kann zum Ausbruch von Pandemien mit schweren Krankheitsverläufen führen. Weiterhin entstehen durch Punktmutationen in der viralen RNA kleinere Veränderungen innerhalb der H- und N-Antigensegmente. Dieser Prozess wird als **Antigen-Drift** bezeichnet. Durch diese kontinuierlichen Veränderungen ist die Virusvariante im Selektionsvorteil, deren H- und/oder N- Protein nicht mehr durch Antikörper des Wirtes neutralisiert werden können.

Der Impfstoff

Erkrankungen durch Influenza-Viren können durch Impfungen vorgebeugt werden. Diese primäre Prophylaxe gegen Influenza zählt dabei zu den effektivsten und kostengünstigsten Maßnahmen zur Bekämpfung der Infektion.

Impfstoffe gegen Influenza werden jährlich neu hergestellt [6]. Es gibt einerseits attenuierte Lebendimpfstoffe, bei dem die Pathogenität des Virus, aber nicht das Virus selbst neutralisiert wird. Andererseits gibt es Spaltvakzine, welche durch Zerstörung der Virusstruktur hergestellt werden. Bei den Spaltvakzinen werden die reaktogenen Lipide der Hülle durch mehrere Aufbereitungsschritte entfernt, sodass die eigentlichen Impfstoffe nur die für die Immunantwort entscheidenden Oberflächenmoleküle (i.e. Hämagglutinin und Neuraminidase) enthalten. Der Nachteil dieses Verarbeitungsprozesses ist der partielle Verlust an Immunogenität. Das vermindert die Dauer des Impfschutzes und die Kreuzprotektivität - d.h. die Wirksamkeit gegenüber heterologen Virusstämmen. Aufgrund der besseren Verträglichkeit werden Spalt-Impfstoffe häufiger angesetzt. Man hat weiterhin versucht, eine bessere Immunantwort

1. EINLEITUNG

durch die Zugabe von Adjuvanzen zum Impfstoff zu erzielen, die durch lokale unspezifische Reizung von Komponenten des Immunsystems die eigentliche spezifische Abwehrreaktion verstärken können. Diese Kombinationspräparate werden z.B. bei Menschen nach dem 65. Lebensjahr empfohlen, bei denen man von einer verminderten Wirksamkeit des einfachen Impfstoffes ausgeht.

Klassischerweise werden Influenza-Impfstoffe in Hühnerbruteiern hergestellt. Nur Impfstoffe, welche auf Zellkulturbasis und damit ovalbuminfrei entwickelt werden, können auch im Fall einer seltenen Hühnereiweißallergie verabreicht werden.

Die Ständigen Impfkommission (STIKO) des Robert-Koch Instituts in Berlin empfiehlt in Deutschland die Grippeimpfung *"...für alle Personen über 60 Jahre, für alle Schwangeren, für Personen mit erhöhter gesundheitlicher Gefährdung infolge eines Grundleidens sowie für Bewohner von Alters- oder Pflegeheimen"*. Außerdem sollten Personen mit *„erhöhter Gefährdung (z.B. medizinisches Personal) und Personen, die als mögliche Infektionsquelle für von ihnen betreute ungeimpfte Risikopersonen“* fungieren können, geimpft werden. Dies gilt ebenso für Personen mit direktem Kontakt zu Geflügel und Wildvögeln [6].

Aufgrund der hohen Variabilität der Influenza-Viren werden jedes Jahr neue Impfstoffe hergestellt. Ihre Stammzusammensetzung wird an die epidemiologische Situation angepasst. Die World Health Organisation (WHO) und das Paul-Ehrlich-Institut empfehlen und überprüfen die Zusammensetzungen der Impfungen. Für die Saison 2011/2012 wurde wie bereits im Jahr zuvor die folgende Zusammensetzung vorgegeben:

-> A/California/7/2009 (H1N1)

-> A/Perth/16/2009 (H3N2)

-> B/Brisbane/60/2008

Alle Impfstoffe (von verschiedenen Herstellern) enthalten einen festgelegten Hämagglutiningehalt (15 µg). Zusatzstoffe sind dagegen herstellerabhängig.

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein körpereigenes Abwehrsystem zur Identifikation und Abwehr von fremden Stoffen (Antigenen). Als Antigene können Krankheitserreger wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten fungieren, aber auch transformierte körpereigene Zellen (maligne Zellen) oder anorganisches Material. Antigene weisen molekulare Strukturen auf, die als sogenannte Epitope vom Immunsystem erkannt werden.

1. EINLEITUNG

Das menschliche Immunsystem wird in das angeborene beziehungsweise unspezifische Immunsystem und das adaptive beziehungsweise spezifische Immunsystem unterteilt. Die beiden Systeme wirken gemeinsam und ergänzend in der Bekämpfung der unterschiedlichen Antigene.

Das **angeborene Immunsystem** besteht aus biochemischen und zellulären Abwehrmechanismen, die schon vor dem Kontakt mit einem Antigen in dem Organismus vorhanden sind und sehr schnell nach Infektionen aktiviert werden können. Dazu zählt man physische und chemische Barrieren wie Epithelien, verschiedene lösliche Enzyme, Proteine wie Zytokine, Plasmaproteine, die zum *Komplementsystem* gehören und phagozytierende Zellen (Makrophagen und neutrophile Granulozyten), natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen (*dendritic cells, DC*). Die Aktivierung von löslichen und zellulären Komponenten gewährleistet die erste Abwehr gegen Pathogene und erfolgt oft in einem Zeitraum von Minuten bis Stunden. Diese erste Immunreaktion ist nicht spezifisch: Die unterschiedlichen Rezeptoren auf den Immunzellen und dem Komplementsystem (z.B. *Toll-like receptors, TLR*) sind vielmehr in der Lage, gemeinsame Muster erregerübergreifend zu erkennen und darauf zu reagieren. Bei Immunantworten des angeborenen Immunsystems bildet sich kein Gedächtnis des Kontakts mit dem Erreger, sodass jede Reaktion eine *primäre* Antwort darstellt.

Kann das angeborene Immunsystem den Erreger nicht ausreichend neutralisieren, wird das **adaptive Immunsystem** aktiviert. Die Spezifität für bestimmte Erreger bzw. Erregerbestandteile und die Fähigkeit zum Gedächtnis sind entscheidende Merkmale der adaptiven Immunantwort. Die Reaktion erfolgt erst einige Tage nach dem Kontakt zwischen Antigen und Organismus. Dabei werden zwei Typen der adaptiven Immunantwort unterschieden: die humorale und die zelluläre Immunantwort.

Hauptspieler der adaptiven humoralen (lat. *humor* = Flüssigkeit) Immunabwehr sind Antikörper (auch Immunglobuline genannt) - kleine Moleküle, die in der Lage sind, spezifisch Antigene zu binden. Extrazelluläre Erreger können damit markiert oder gar neutralisiert werden. Durch eine derartige Markierung werden Antigene auch für die Lymphozyten erkennbar. Man unterscheidet dabei zwei Hauptpopulationen: Die T (wie Thymus) -Lymphozyten und die B (wie lat. *bursa fabricii* - Knochenmark) -Lymphozyten. T-Lymphozyten werden von Antigen präsentierenden Zellen (APC - engl. *antigen presenting cells*) des angeborenen Immunsystems aktiviert. Erst dann können sie mit B-Lymphozyten interagieren und letztere zur Antikörper-Synthese anregen.

1. EINLEITUNG

Auf der Oberfläche der APCs sind MHC (*engl. major histocompatibility complex*) - Moleküle vorhanden, die den T-Zellen prozessierte Antigen-Peptide präsentieren. MHC-Klasse-I sind auf allen körpereigenen Zellen vorhanden. Sie sind in der Lage, verarbeitete Peptide intrazellulärer Pathogene zu präsentieren. Somit sind infizierte Zellen für andere Zelle des Immunsystems erkennbar. MHC-Klasse-II Moleküle sind auf APCs wie DCs und Makrophagen zu finden. Sie präsentieren zum Beispiel T-Zellen Antigene, die von außen aufgenommen werden. Außerdem sind B-Lymphozyten in der Lage, prozessierte Antigene über MHC-Klasse-II Moleküle zu präsentieren. Für die Erkennung der fremden Antigene auf MHC-Molekülen sind T-Zell Rezeptoren auf reifen T-Zellen vorhanden, die sogenannten TCR (*engl. T-cell receptors*).

1.1.1 Die Lymphozyten

Lymphozyten bilden sich aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (*engl. hematopoietic stem cells - HSCs*) im Knochenmark. Durch ein fein abgestimmtes Programm aus Aktivierung und Deaktivierung von Genen werden in Stammzellen Entwicklungsprogramme aktiviert, die die Proliferation und Differenzierung in den lymphoiden Vorläufer erlauben. Zytokine, Chemokine, Zell-Zell-Kontakte aber auch epigenetische Mechanismen spielen bei der Regulation dieser Prozesse eine wichtige Rolle.

B-Lymphozyten

B-Lymphozyten durchlaufen zwei Phasen der Reifung: eine antigenunabhängige Phase, die im Knochenmark stattfindet, und eine antigenabhängige Phase, die sich in den sekundären lymphatischen Organen nach Kontakt mit einem Antigen abspielt.

Im Knochenmark durchlaufen die Vorläuferzellen der B-Lymphozyten eine Reihe von Differenzierungsschritten, die durch die Umlagerung und Expression der Gene charakterisiert sind, die für Immunglobuline kodieren.

Immunglobuline (Ig) werden in ihrer membrangebundenen Form als B-Zell Rezeptoren (*engl. B cell receptor - BCR*) bereits auf unreifen B-Zellen exprimiert. Mit ihnen können verschiedenste Antigene erkannt werden. Damit ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen Epitopen erkannt wird, sind die Ig-Genumlagerungen von essentieller Bedeutung. Alle Immunglobuline weisen zunächst dieselbe Grundstruktur aber wichtige Unterschiede in der Antigen-bindenden Region auf.

Der erste Reifungsschritt in der B-Zell-Entwicklung ist die Genumlagerung der sowohl konstanten als auch variablen Regionen der Immunglobuline. Diese laufen in einer

1. EINLEITUNG

definierten Abfolge im Knochenmark ab. Dabei wird zunächst die schwere Kette der Immunglobuline durch Genumlagerungen gebildet. Es folgt die Bildung einer temporären variablen Region. Ein vorläufiger B-Zell Rezeptor (BCR) wird gebildet, der sowohl im Zytoplasma als auch als membranständiges Protein zu finden ist. Das sichert das Überleben und die Proliferation der Zelle. Als nächstes wird die leichte Kette ebenfalls durch Genumlagerung gebildet. Am Ende dieses Vorgangs entsteht eine naive B-Zelle mit membranständigen BCR. Diese erste fertige Ig-Klasse wird IgM genannt und weist die schwere Kette μ auf. In dem letzten antigenunabhängigen Reifungsstadium kann die reife B-Zelle durch Veränderungen auf RNA-Ebene die schwere Kette δ exprimieren und somit zusammen mit IgM einen zweiten membranständigen Ig-Rezeptor, IgD, ausbilden. Die B-Zellen, die das Knochenmark verlassen werden als naive B-Zellen (nBCs) bezeichnet. Damit Aktivierung, Proliferation und weitere Differenzierung stattfinden, müssen die nBCs in die sekundäre lymphatische Organe (Milz, Lymphknoten, Tonsillen und Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe) eintreten. Chemotaktische Signale (z.B. CXCL13) aus follikulären dendritischen Zellen (DCs) und Stromazellen vermitteln durch die Bindung an Chemokinrezeptoren (z.B. CXCR5) auf naiven B-Zellen den Eintritt in die Lymphfollikel. Hier können naive B-Zellen über ihren BCR mit dem Antigen in Kontakt kommen. Das Antigen kann als Immunkomplex gebunden oder frei vorliegen. Die Bindung von BCR zum Antigen leitet über intrazelluläre Signalkaskaden Aktivierungsprozesse ein.

Gleichzeitig wird der BCR-Ag-Komplex internalisiert und prozessiert und auf MHC-II Molekülen T-Zellen präsentiert. Damit die nBCs proliferieren und differenzieren können, sind weitere Signale über Toll-Like-Rezeptoren (TLR) auf und in der B-Zelle beziehungsweise, im Falle von prozessierten Proteinen, von den T-Helfer-Zellen notwendig. Aus diesem Grund wandern die aktivierten B-Zellen zur T-Zell-Zone der lymphatischen Organe, wo sich T-Helfer-Zellen befinden können, die schon Kontakt mit dem von dendritischen Zellen präsentierten selben Antigen hatten. Die Expression von CD40L auf aktivierten T-Zellen, verschiedenen Zytokinen sowie die Präsentation von demselben prozessierten Epitop auf MHC-II der B-Zellen stellen die Voraussetzung für die Interaktion zwischen B- und T-Zellen und damit für die weitere Aktivierung der nBCs und die Entstehung von follikulären T-Helfer Zellen (T_{FH}) dar (Abb. 2).

1. EINLEITUNG

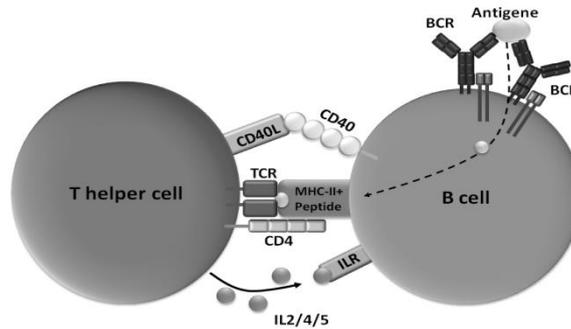


Abb. 2 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen T- und B-Lymphozyten. Der BCR (B cell receptor) ist in der Lage, ein Antigen zu erkennen. Dieser wird intrazellulär prozessiert und über MHC-II Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert. Die T-Zellen, deren TCR (T cell receptor) die Spezifität für dasselbe Antigen aufweisen, erkennen über den TCR und den Ko-Rezeptor CD4 mit dem Antigen beladene MHC-II Moleküle. Außerdem sezerniert die T-Zelle Zytokine (Interleukine - IL), die über einen Rezeptor-vermittelten (ILR) Weg Aktivierungssignalen intrazellulär weiterleitet [7].

Aktivierte B-Zellen und T_{FH} wandern dann in das Zentrum der Lymphfollikel. Hier bildet sich das Keimzentrum, als starke B-Zell Proliferations- und Differenzierungszone aus. Im Keimzentrum findet die Differenzierung der B-Zellen über somatische Hypermutation (s. unten) statt. Die nBCs können dort zu Gedächtniszellen (*engl. memory B cells - mBCs*) und Antikörper-sekretierenden Plasmablasten ausreifen. Dieser Schritt wird durch die Expression des Tumor-Nekrose Faktor Rezeptor CD27 charakterisiert. Außerdem werden langlebige Plasmazellen (*engl. long-lived plasma cells - LLPCs*) induziert, die in das Knochenmark wandern. Diese Aktivierung von nBCs durch den Kontakt mit den für dasselbe Antigen spezifischen T-Zellen wird als T-Zell-abhängige Aktivierung bezeichnet. In einigen Fällen kann der BCR sich wiederholende Polysaccharide auf der Bakterienwand erkennen. Die Aktivierung von B-Zellen erfolgt dabei ohne Hilfe der T-Zellen (T-Zell-unabhängige Aktivierung). Durch die Bindung des BCRs an diese Polysaccharide werden intrazelluläre Signale ausgelöst, die zur Sekretion von spezifischen IgMs führen. Allerdings findet keine somatische Hypermutation statt, sodass keine andere Immunglobulinklasse gebildet wird und auch die Bildung von Gedächtniszellen unterbleibt. Dies führt somit nur zu einem befristeten Schutz vor den jeweiligen beteiligten Erregern.

Damit eine effektive Immunantwort im Rahmen der T-Zell-abhängigen Aktivierung stattfindet, ist die CD40L-CD40 Interaktion entscheidend. Eine intrazelluläre Signalkaskade wird hierdurch in Gang gesetzt: das Enzym AID (*engl. activation-induced deaminase*) wird aktiviert und kann DNA-Veränderungen vornehmen, die zum Klassenwechsel der Immunglobuline führen (*engl. isotype-switch*). Man unterscheidet

1. EINLEITUNG

fünf Klassen von Immunglobulinen, oder Isotypen nach ihren schweren Ketten: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM.

Die von den T-Zellen sekretierten Zytokine entscheiden Antigen-abhängig, welche der schweren Kette exprimiert werden soll. So wird bei Virusinfektionen vornehmlich das Zytokin Interferon γ sekretiert. Das führt zur Expression der schweren Kette γ und IgGs werden synthetisiert. Bei Parasiten wird hauptsächlich das Zytokin Interleukin-4 (IL-4) sezerniert, sodass eine Antikörperantwort mit IgEs dominiert. Ein anderes Beispiel ist TGF- β , welches einen Klassenwechsel auf IgA induziert.

In den proliferierenden B-Zellen des Keimzentrums besteht eine sehr hohe Rate an Punktmutationen in dem Ig-V-Gen, ein Prozess, der als *somatische Hypermutation* bezeichnet wird. Neue Mutationen können die Affinität der Antikörper zum Antigen erhöhen. Eine hinreichende Affinität der neu gebildeten Immunglobuline ist entscheidend für das Überleben der B-Zelle. Nur wenn der BCR das Antigen mit hoher Affinität binden kann, werden Signale zum programmierten Zelltod unterdrückt und z.B. eine weitere Proliferation und Differenzierung dieser Zelle angeregt.

Die Entstehung von Gedächtniszellen ist wesentlich für die sekundäre Immunantwort. Gedächtniszellen sind B-Zellen mit einer hohen Affinität zu einem spezifischen Antigen. Kommt der Organismus erneut in Kontakt zu demselben Antigen, werden diese Zellen aktiviert und können viel schneller als nBCs eine effektive humorale Immunantwort einleiten. Gedächtniszellen bleiben teilweise im lymphatischen Gewebe, teilweise zirkulieren sie in Lymph- und Blutgefäßen.

B-Zell-Subpopulationen können durch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle unterschieden werden [8]. Es lassen sich anhand dieser „Marker“ Aussagen über den Ursprung, die Funktion und den Phänotyp einer Zelle treffen. B-Zellen im peripheren Blut wurden durch den Cluster of Differentiation 19 (CD19) charakterisiert. Naive B-Zellen können in zwei Zellpopulationen differenzieren: Antikörper-sezernierende Zellen und Gedächtniszellen. Antikörper-sezernierende Zellen differenzieren nach Kontakt mit dem Antigen aus proliferierenden Vorstufen der Plasmazellen, den Plasmablasten. Die Plasmablasten sind durch die Ko-Expression der Aktivierungsmarker Glykoprotein CD38, des TNF-Rezeptors CD27, einer niedrigen Expression von CD19 sowie das Fehlen von CD20 (CD19^{low}CD38⁺⁺CD27⁺⁺CD20⁻) definiert. Diese Zellen sind in der Lage, Antigen spezifische Immunglobuline zu sekretieren.

Neben den Antikörper-sezernierenden Zellen können naive B-Zellen (nBCs) in Gedächtniszellen differenzieren. Gedächtniszellen sind lang lebende Zellen, die durch

1. EINLEITUNG

die Expression von CD19, CD20 und CD27 charakterisiert sind (CD19⁺CD20⁺CD27⁺). Bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen können diese Zellen schnell reaktiviert werden und zu Plasmablasten (sekundäre Immunantwort) differenzieren. Aus den Plasmablasten differenzieren dann lang-lebende Plasmazellen, die ihre Fähigkeit zur Antigen-Präsentation verloren haben (sie exprimieren kein MHC-II mehr). Diese Zellen sezernieren weiterhin Immunglobuline, ohne dass jedoch ein weiterer Klassenwechsel möglich ist. Diese letzten Differenzierungsschritte finden im Knochenmark in sogenannten „survival niches“ statt [9].

Sowohl naive B-Zellen als auch Gedächtniszellen exprimieren membranständige Immunglobuline, die als slg (*surface* = Oberfläche) bezeichnet werden: slgD wird auf naiven B-Zellen (IgD⁺CD27⁻) exprimiert. Auch einige Gedächtniszellen exprimieren slgD (IgD⁺CD27⁺) und werden dann als *unswitched* – Gedächtniszellen bezeichnet, da sie keinen Klassenwechsel vollzogen haben. Im Gegensatz dazu geht slgD im Laufe der Reifung der Gedächtniszellen normalerweise verloren und andere Immunglobulinklassen werden exprimiert. Man spricht von *switched* Gedächtniszellen (IgD⁻CD27⁺) [10, 11].

Eine weitere Unterteilung der B-Zell Populationen (CD19⁺CD20⁺) ist die Bm (*engl. mature B cells*)-Klassifikation [10, 12]. Nach der Ko-Expression von CD38 und IgD werden fünf Populationen unterschieden: naive B-Zellen (Bm1: IgD⁺CD38⁻); aktivierte naive B-Zellen (Bm2: IgD⁺CD38⁺); Keimzentrum B-Zellen (Bm3 - Zentroblasten und Bm4 - Zentrozyten: beide IgD⁻CD38⁺⁺)(nicht im peripheren Blut zu finden) und Gedächtniszellen (Bm5: IgD⁻CD38^{+/-}). Bm5 - Gedächtniszellen können anhand der CD38-Expression weiterhin in *early* Bm5 (CD38⁺) und *late* Bm5 (CD38⁻) unterteilt werden. Außerdem kann slgM auf naiven B-Zellen, die gerade das Knochenmark verlassen haben, sowie auf Gedächtniszellen exprimiert werden, die noch keinem Ig-Klassenwechsel unterlaufen haben. Andere seltene Gedächtniszellpopulationen sind in der Literatur beschrieben worden: IgM⁺ ausdifferenzierte Gedächtniszellen - sogenannten *IgM-only* - sowie eine seltene Fraktion (<1%) an IgD⁺ ausdifferenzierten Gedächtniszellen zirkulieren im peripheren Blut [11, 13].

T-Lymphozyten

Wie die B-Lymphozyten stammen auch die T- (*engl. thymus-dependent*) Lymphozyten aus den Stammzellen im Knochenmark. Anders als die B-Lymphozyten wandern die T-Lymphozyten zur Reifung aber nicht in die sekundären lymphatischen Organe, sondern in den Thymus (daher T- wie thymisch). Wenn die Vorläuferzellen in den Cortex des Thymus eindringen, weisen sie weder T-Zell-Rezeptor (*TCR*), CD3-Komplex noch die Ko-

1. EINLEITUNG

Rezeptoren CD4 oder CD8 auf. Für eine bestimmte Dauer weisen diese Zellen ein erhebliches Differenzierungspotential auf und können in linienfremde myeloische Zellen differenzieren. Zellen mit solchen stammzellähnlichen Eigenschaften werden als Early-Thymic-Progenitors (ETPs) bezeichnet. Mit zunehmender Verweildauer im Thymus verlieren diese Zellen ihre stammzellähnlichen Eigenschaften und werden in der Folge aufgrund des Fehlens von CD4 und CD8 als doppelnegativ (DN) bezeichnet. Einmal im Cortex, werden die Genloci des TCRs arrangiert, damit möglichst viele Spezifitäten entstehen. Ähnlich wie der BCR besteht der TCR aus verschiedenen extrazellulären Polypeptidketten, bei denen es sich meistens um α - und β -Ketten handelt. Nur wenige T-Zellen tragen in ihrem Rezeptor γ - und δ -Ketten. Die Polypeptidketten bestehen jeweils aus einer konstanten (C) und einer variablen (V) Domäne.

In der doppelnegativen Phase werden die Genloci für die β -Kette umgelagert und ein vorläufiger TCR erscheint auf die Zellmembran. Dazu wird der transmembranäre CD3 exprimiert. CD3 wird auf allen T-Lymphozyten exprimiert. Der TCR-CD3-Komplex ist in der Lage, Signale von extrazellulär nach intrazellulär weiterzuleiten. Die Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 werden in der Folge gleichzeitig exprimiert, was dem Eintritt der Thymozyten in die doppelpositive Phase entspricht. Die Affinität des TCR für MHC-präsentierte Peptide hängt von der Expression der Ko-Rezeptoren ab: MHC-II-präsentierte Peptide werden von CD4 exprimierenden T-Zellen erkannt, während CD8 die Bindung an MHC-I-assoziierte Epitope gewährleistet. In der doppelpositiven Phase werden die Thymozyten selektiert: Nur die Zellen, die über ihren TCR mit ausreichender Affinität MHC-Moleküle erkennen, differenzieren weiter (positive Selektion). Circa 90% der T-Lymphozyten sterben in diesem Stadium durch Apoptose. In einem weiteren Schritt erfolgt die negative Selektion [7]. Dabei werden die T-Zellen, die den Komplex aus körpereigenen Peptiden und MHC-Molekülen mit hoher Affinität binden, in den programmierten Zelltod getrieben. Nur ca. 2% der doppelpositiven Thymozyten überleben diese Selektionsprozesse und können weiterdifferenzieren. Je nach Affinität der Ko-Rezeptoren CD4 oder CD8 verlassen die Zellen den Thymus als naive T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD8^-$) oder als zytotoxische T-Zellen ($CD4^-CD8^+$). Eine weitere T-Zell-Population sind regulatorische T-Zellen. Diese exprimieren den Korezeptor CD4, sollen jedoch in dieser Arbeit nicht weitergehend beschrieben werden.

1. EINLEITUNG

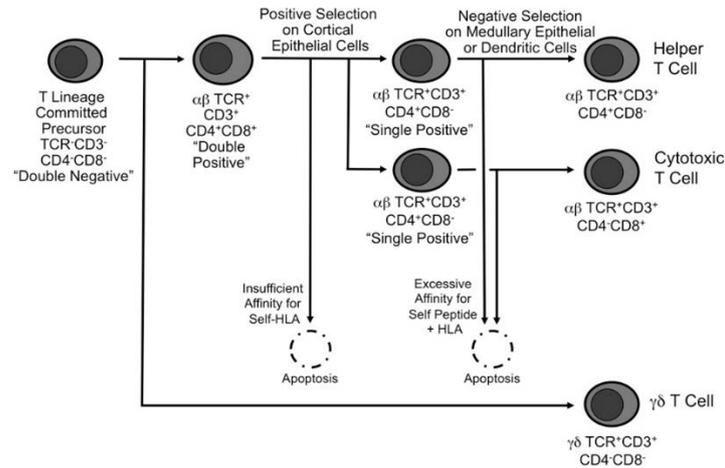


Abb. 3 Differenzierung und Reifung von T-Zellen im Thymus. Vorläufer der T-Zellen gelangen aus dem Knochenmark in den Thymus, wo die Reorganisation der TCR-Gene stattfindet. Da über 90 % der T-Zellen $\alpha\beta$ TCR besitzen, wird sich in dieser Abbildung auch nur auf diese bezogen. Im doppelpositiven ($CD8^+/CD4^+$) Stadium durchlaufen die Zellen zwei Selektionen. Sofern sie eine hohe Affinität zu MHC-Molekülen aufweisen und nicht spezifisch für Selbstpeptide sind, werden sie positiv selektiert, alle anderen Zellen werden durch Apoptose eliminiert. Je nach Spezifität für MHC-I oder MHC-II exprimieren die T-Zellen anschließend entsprechend nur noch CD8 oder CD4 [14].

T-Lymphozyten kann man anhand ihrer Funktion in drei Gruppen unterscheiden: T-Helfer-Zellen, Zytotoxische T-Zellen und Regulatorische T-Zellen. CD4 positive T-Lymphozyten haben die Aufgabe, während der Immunantwort andere Immunzellen in der Bekämpfung der Pathogene zu unterstützen. Sie werden deswegen auch T-Helfer-Zellen genannt. Ihre Hilfe besteht z.B. darin, $CD8^+$ zytotoxische-T-Zellen und APCs über Zytokine und Zell-vermittelten Kontakt zu aktivieren. Je nach Zytokinprofil kann man dabei verschiedene Gruppen unterscheiden: T_{H0} , T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} , T_{FH} . T_{H0} -Zellen sowie T_{FH} können unterschiedliche Zytokine exprimieren. T_{H1} -Zellen sind vor allem durch die Produktion des Zytokins IFN- γ charakterisiert und sind so an der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene beteiligt. T_{H2} -Zellen dagegen stimulieren durch die IL-4-Sekretion humorale Immunreaktionen gegen extrazelluläre Antigene. T_{H17} -Zellen werden durch die Expression von IL-17 charakterisiert. Sie sind in der Bekämpfung von Pilzinfektionen zu beobachten, aber auch an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt [15].

Zytotoxische T-Zellen werden durch die Expression des Ko-Rezeptors CD8 definiert. Sie erkennen MHC-I-präsentierte fremde Peptide auf infizierten Zellen und können in diesen Zellen über verschiedene Mechanismen Apoptose induzieren.

Die Entwicklung von Gedächtniszellen aus den naiven Vorläufern kann durch die Expression des Cluster of Differentiation 45RA (CD45RA) und den C-C Chemokin Rezeptors Typ 7 (CCR7) analysiert werden [16]. Die Koexpression von CCR7 und CD45RA definiert naive T-Zellen, die noch keinen Kontakt zu Antigenen gehabt haben.

1. EINLEITUNG

Der Verlust von CD45RA identifiziert Gedächtniszellen, die schon Kontakt zum Antigen hatten und durch die Expression von CCR7 in den lymphatischen Organen verbleiben: T-Gedächtniszellen (*engl. Central memory T cells – T_{CM}*). Effektor-Gedächtniszellen (*engl. Effector memory T cells – T_{EM}*) exprimieren im Gegensatz dazu weder CCR7 noch CD45RA und proliferieren im Rahmen einer primären Immunantwort. Eine weitere Stufe der Differenzierung kann dann wieder über die Expression von CD45RA in Abwesenheit von CCR7 charakterisiert werden: CCR7⁻CD45RA⁺Gedächtniszellen stellen eine spezielle ausdifferenzierte Gedächtniszell-Population dar (T_{EMRA}). Nach dem ersten Antigen-Kontakt entwickeln sich Effektor-Gedächtniszellen, T-Gedächtniszellen und Effektor-Zellen. Der schnellere erste Schutz gegen fremde Antigene wird von Effektor-Zellen gewährleistet. Bei einem zweiten Kontakt reagieren dann zunächst die Antigen-spezifischen T_{CM}. Da sich diese Gedächtniszellen z.B. im Lymphknoten befinden, können sie durch den erneuten Kontakt mit von DCs präsentierten Antigenen schneller proliferieren als z.B. naive T-Zellen.

1.2 Veränderte Immunität im Alter

Alterungsprozesse des menschlichen Organismus sind nicht nur an äußerlichen Merkmalen wie Haar, Haut oder Stimme zu erkennen. Auf zellulärer Ebene geschehen Alterungsprozesse in allen Organen des Organismus. Hinweise auf eine Dysregulation des Immunsystems im Alter stellt der Anstieg im Risiko für Infektionen und Autoimmunerkrankungen sowie die verminderte Effektivität von Impfungen dar [17]. Viele Veränderungen werden innerhalb des adaptiven Immunsystems beobachtet, wobei sowohl B- als auch T-Lymphozyten betroffen sind [18]. Gleichzeitig steigt aber über die Zeit der Anteil an differenzierten Gedächtniszellen, die den immunologischen „Raum“ besetzen. Das betrifft vor allem CD8⁺ T-Zellen, wird aber auch für CD4⁺ T-Zellen sowie für B-Lymphozyten beobachtet [19, 20].

Zudem kann der kontinuierliche Verbrauch immunologischer Ressourcen durch chronische latente virale Infektionen zur Kumulierung von ausdifferenzierten antigen-spezifischen T-Zellen führen [19]. Mancher dieser Zellen sind nicht mehr in der Lage, auf einen erneuten Stimulus zu reagieren. Die Erschöpfung der zellulären Abwehr ist aber kein alleiniges Ergebnis der physiologischen Alterungsprozesse, sondern es kann durch opportunistische Infektionen beeinflusst und beschleunigt werden. Infektionen durch einige Herpesviren (hier vor allem Cytomegalie-Virus und Epstein-Barr-Virus)

1. EINLEITUNG

verursachen eine kontinuierliche Aktivierung der Immunkräfte und tragen damit erheblich zu deren Erschöpfung bei [21].

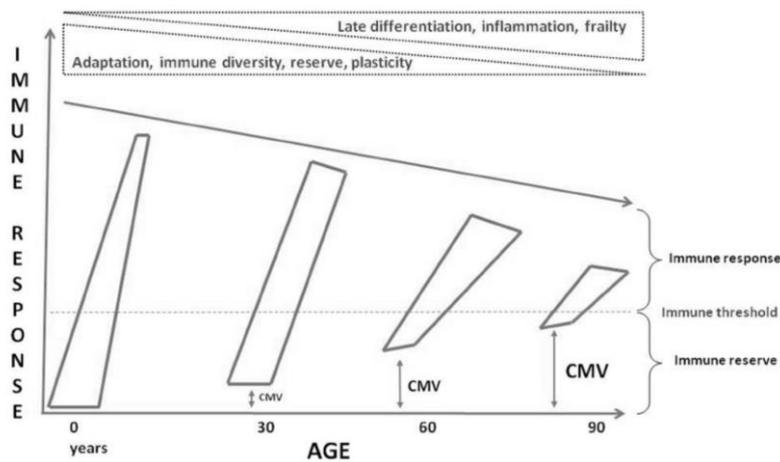


Abb. 4 Schematische Darstellung der Wirkung vom Alter auf das Immunsystem. Die Immunreserven werden durch Zeit sowie durch chronische latente Infektionen (v. a. Cytomegalie-Virus) erschöpft. Die Ausdifferenzierung und Reifung der Immunzellen führt zur Verminderung der Vielfältigkeit sowie des Adaptionvermögens gegenüber neuen immunologischen Herausforderungen. Die Summe dieser Faktoren ist eine verminderte Immunabwehr. [19]

Ein Parameter zur Untersuchung der veränderten Immunität im Alter ist häufig die Effektivität von Impfungen. Als Maß wird zumeist die humorale Serokonversion verwendet. Bei älteren Menschen (> 65 Jahren) ist ein Impfversagen häufiger zu beobachten [1]. Gründe hierfür könnten der Mangel bzw. die Fehlfunktion der Antikörperproduzierenden Zellen sein. Dabei scheint nicht nur die Quantität an produzierten Antikörpern sondern auch die Qualität derselben beeinträchtigt zu sein: Antigen-spezifische Antikörper werden im Alter weniger und unspezifische Antikörper im Alter steigen an [22]. Auch die Gesamtzahl der B-Lymphozyten nimmt im Alter ab. Einerseits ist der Nachschub naiver B-Zellen aus dem Knochenmark vermindert, andererseits ist eine zunehmende Sättigung des „immunologischen Raums“ zu beobachten. Die Knochenmark-Nischen sorgen für das Überleben langlebiger Plasma-Zellen, die ohne Antigen-Stimulus weiter Antikörper sezernieren können. Dazu tragen auch Degenerationsprozesse im Knochenmark bei, die zu einer Abnahme der Hämatopoese führen können [23]. Neben den naiven B-Zellen sind auch B-Gedächtniszellen von den Alterungsprozessen betroffen: antigenspezifische Gedächtniszellen akkumulieren. Zudem kommt, dass die Vielfältigkeit der vorhandenen B-Lymphozyten im Alter verringert ist [13].

B-Lymphozyten benötigen zur Aktivierung den Stimulus von CD4⁺ T-Helferzellen. Dysfunktionen dieser Interaktion sind nicht nur auf B-Zelldefekte, sondern auch auf altersbedingte Veränderungen der T-Lymphozyten zurückzuführen. T-Lymphozyten sind

1. EINLEITUNG

nämlich sehr stark von Alterungsprozessen beeinträchtigt [23]. Vor allem bei T-Lymphozyten kann man eine Abnahme der naiven CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen beobachten, was auf die physiologische Involution des Thymus zurückzuführen ist, die bereits mit der Pubertät beginnt. Andererseits ist eine relative Zunahme an Gedächtniszellen zu beobachten. Vor allem akkumulieren solche CD8⁺-Gedächtniszellen, die unter ständiger Stimulation mit chronischen, latenten Pathogenen ausdifferenzieren [24]. Auch das Verhältnis zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen kann als Parameter für die Einschätzung des immunologischen Alters angewendet werden [20, 25]. In den schwedischen Studien OCTO und NONA wurde ein immunologisches Risikoprofil (*Immune Risk Profile - IRP*) entwickelt. Zum IRP gehören neben dem anagraphischen Alter und dem CMV-Status auch die Umkehrung des CD4:CD8-Verhältnisses zugunsten der CD8⁺-T-Zellen ($CD4:CD8 < 1$) [25]. Die Umkehrung des CD4:CD8-Verhältnis hänge vor allem von der Akkumulation ausdifferenzierter CD8⁺ T-Zellen ab, welche häufig CMV-spezifisch sind. Die Studien zeigten, dass durch diese drei einfachen Parameter eine Assoziation zwischen Immunstatus und Morbidität und Mortalität für Menschen über 65 Jahre besteht [26]. Die Verschiebung von naiv in Richtung Gedächtnis kann zudem durch ein inflammatorisches Milieu bedingt sein, der die fortwährende Differenzierung von inflammatorischen T-Zellen kontinuierlich fördert. Dieser Mechanismus wurde unter dem Stichwort „Inflammaging“ zusammengefasst [27].

Bestimmte Oberflächenmoleküle sind als Marker für Alterung bzw. Erschöpfung von T-Zellen etabliert. Einige dieser Marker (KLRG1, NKG2D, CD57 und CD244) kommen auf Natural-Killer Zellen physiologisch vor. Ihre Expression auf T-Zellen sowie das Fehlen von Aktivierungsmarkern wie CD27 definieren einen erschöpften Phänotyp von T-Lymphozyten.

Ein weiterer Parameter des Immune Risk Profile (IRP) - Score ist neben dem Alter und der CD4:CD8 – Ratio die Infektion mit Cytomegalie-Viren (CMV). Die Durchseuchung der CMV-Infektionen hängt dabei von der Region, vom Alter und vom Sozialstatus der Individuen ab. Allgemein kann man aber eine steigende Inzidenz mit zunehmendem Alter beobachten: Ca. 60% der Bevölkerung im Erwachsenenalter sind seropositiv für CMV [21].

Ein wichtiges Merkmal der CMV-Infektion besteht in der Tatsache, dass der Virus nicht aus dem Organismus eliminiert werden kann. Es kommt bei immunkompetenten Individuen zwar nicht zu klinischen Erscheinungen, aber die unterschwellige kontinuierliche Aktivierung des Immunsystems führt über die Zeit zur Erschöpfung von

1. EINLEITUNG

Immunzellen. Dieses Phänomen könnte in großem Maße zur Alterung des Immunsystems beitragen. Eine Folge davon kann die verminderte Fähigkeit sein, neue Pathogene zu bekämpfen sowie ausreichenden Schutz nach Impfung zu entwickeln [28]. Eine Akkumulation von ausdifferenzierten CMV-spezifischen Gedächtniszellen (vor allem T_{EMRA}) wurde sowohl für die CD4⁺ T-Zellen als auch für CD8⁺ T-Zellen beobachtet [29]. Auch Erschöpfungsmarker wie KLRG1, NKG2D und CD57 zeigen eine höhere Expression auf CMV-spezifischen T-Zellen [30].

Um eine Infektion mit CMV zu detektieren, ist in der klinischen Praxis die serologische Analyse am weitesten verbreitet. Dabei werden sowohl anti-CMV-IgM (zur Identifizierung einer frischen Infektion), als auch anti-CMV-IgG (chronische Infektion) bestimmt. Eine weitere Methode besteht im Nachweis CMV-spezifischer T-Zellen. Bestimmte immundominante Peptide des Virus haben sich für die Identifizierung antigenspezifischer T-Zellen bewährt: das immediate-early-1 (IE1) und das Phosphoprotein 65 (pp65). Hierbei handelt es sich um virale Proteine die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Replikation exprimiert werden. Das IE-1 wird in der frühen Phase (immediate early) des Replikationszyklus exprimiert. Das pp65 wird dagegen während der späten Phase des Replikationszyklus exprimiert [31]. Die Spezifität gegenüber diesen beiden Peptiden kann unterschiedliche immunologische Bedeutungen haben: IE-1-spezifische CD8⁺-Zellen korrelieren mit Protektivität vor CMV-Infektionen bei transplantierten Patienten [32], was nicht für pp65-spezifische T-Zellen gilt.

Auch andere Herpesviren sind in der Lage, eine chronisch latente Infektion im menschlichen Organismus zu verursachen. Eine sehr hohe Durchseuchung (> 90% der adulten Bevölkerung) findet man bei dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Dieser Virus infiziert vor allem B-Lymphozyten. Zur Kontrolle und Bekämpfung der Infektion ist die Hilfe von EBV-spezifischen T-Lymphozyten notwendig, wobei vor allem CD8⁺ T-Zellen beteiligt sind. Auch die EBV-Infektion kann durch ihre Latenz eine Verschiebung im T-Zell-Kompartiment von naiv in Richtung Gedächtnis verursachen. Dabei sind EBV-spezifische T-Zellen weniger ausdifferenziert als CMV-spezifische T-Zellen: es handelt sich meistens um Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) [33]. Es wird aber diskutiert, dass EBV in Abwesenheit von CMV zur Immunoseneszenz beiträgt [34].

Nicht nur die Quantität der T-Zellen wird durch chronische virale Infektionen beeinflusst, sondern auch die Qualität dieser Zellen [23]. Unter qualitativen Veränderungen versteht man Unterschiede des Zytokinprofils der T-Zellen [35] sowie ihrer Polyfunktionalität als Fähigkeit, verschiedene Zytokine zu exprimieren. Veränderungen der Polyfunktionalität

1. EINLEITUNG

der T-Zellen sind im Alter in Abhängigkeit der Spezifität der Zellen für bestimmten Pathogene zu beobachten. Die veränderte Immunität im Alter spiegelt sich also nicht nur in quantitativen Veränderungen (weniger naive Zellen und mehr Gedächtniszellen), sondern auch in qualitativen Unterschieden (Polyfunktionalität) der zellulären Immunabwehr. Diese Veränderungen werden durch das anagraphische Alter und zusätzlich durch chronische latente Infektionen mit CMV, und möglicherweise mit EBV, beeinflusst und beschleunigt [24, 36].

1.3 Zielsetzung

Alte Menschen sind in besonderer Weise durch Infektionskrankheiten gefährdet und die saisonalen Epidemien durch das Influenza-Virus kosten regelmäßig zahlreiche Menschenleben weltweit. Impfungen sind dabei ein wichtiges Element im Kampf gegen die Grippe. Die zunehmende Ineffektivität von Impfungen im Alter führt jedoch zu niedrigen Erfolgsraten gerade bei den Menschen, die von effektiver Prophylaxe am meisten profitieren würden.

In dieser Arbeit soll daher der Einfluss des immunologischen Alterns am Modell der Influenza-Impfung erforscht werden. Dafür sollen Probanden mit dem kommerziell erhältlichen Grippeimpfstoff geimpft und deren Immunantwort untersucht werden. In Abhängigkeit des Impferfolgs, sollen in einem nächsten Schritt mögliche immunologische Signaturen aufgedeckt werden, die eine veränderte Immunität im Alter zugrunde liegen. Aufgrund der klinischen Relevanz wird ein Hauptaugenmerk auf Altersunterschiede zw. jüngeren und älteren Menschen gelegt. Ein weiterer Fokus liegt auf der Untersuchung des adaptiven Immunsystems durch eine detaillierte Charakterisierung der B- und T-Lymphozyten mittels Immunphänotypisierung. Um den Einfluss von Umweltfaktoren auf zelluläre Merkmale der T-Zellen und auf die Entwicklung des humoralen und zellulären Schutzes nach Influenza-Impfung zu analysieren, sollen latente chronische Infektionen mit Herpesviren als Modell dienen.

2. MATERIAL

2 Material

2.1 Probanden

Nach Einwilligung der Ethikkommission wurden 50 freiwilligen Probanden mittels interner Ausschreibung in der Charité (Campus Virchow Klinikum, Campus Mitte, Campus Benjamin Franklin) eingeschlossen. Die Probandenkohorte wurde in zwei Gruppen nach Alter geteilt:

- alt (≥ 55 und ≤ 65 Jahren), $n=26$, 16 Frauen und 10 Männer, Durchschnittsalter 58
- jung (≥ 18 und ≤ 30 Jahren), $n= 24$, 13 Frauen und 11 Männer, Durchschnittsalter 26

Tabelle 1 Studienteilnehmer mit Geschlecht, Geburtsdatum und Alter

Probandenkodierung	Geschlecht	Geburtsdatum	Alter
Y18SvSu	F	1992	19
Y03JuMu	F	1988	23
Y56IsCh	F	1988	23
Y27CIso	F	1986	25
Y58KaLa	F	1986	25
Y10AnLa	F	1985	26
Y53JuZi	F	1985	26
Y25UIWi	F	1984	27
Y26ChWa	F	1984	27
Y14SiVo	F	1983	28
Y08KaSm	F	1982	29
Y44LeJo	F	1982	29
Y55AnUl	F	1982	29
E13AuPl	F	1956	55
E31RiTh	F	1955	56
E36CIHe	F	1955	56
E37BaMa	F	1955	56
E49SaFi	F	1955	56
E01RuSu	F	1954	57
E04ViFe	F	1954	57
E09MaMa	F	1954	57
E11AnRo	F	1954	57
E21BeKr	F	1954	57
E39RoGo	F	1952	59
E32SiHa	F	1950	61
E54MaOb	F	1949	62
E06BaBr	F	1948	63
E42MaLi	F	1947	64
E17InBe	F	1944	67
Y52FaAp	M	1987	24
Y23StAu	M	1986	25
Y57PiGr	M	1986	25
Y22FaFe	M	1985	26
Y30JuNa	M	1985	26
Y45ChSc	M	1985	26

2. MATERIAL

Y51AlJa	M	1985	26
Y05ReBa	M	1983	28
Y15BeLo	M	1983	28
Y47TiGl	M	1982	29
Y38DaDe	M	1981	30
E35RaZi	M	1958	53
E12MaEh	M	1957	54
E16HaSy	M	1957	54
E50EdSt	M	1956	55
E19VoSk	M	1955	56
E41GmZm	M	1954	57
E24RoLu	M	1953	58
E40JoGr	M	1950	61
E43OlMa	M	1947	64
E07ReBr	M	1944	67

Ausgeschlossen wurden die Probanden, die bereits die saisonale Influenza-Impfung oder die Schweinegrippe-Impfung in den zwei vergangenen Jahren erhalten hatten. Außerdem waren Ausschlusskriterien manifeste akute oder chronische Erkrankungen, Hämoglobin-Werte unter 12,0 g/dl, das Vorliegen einer Schwangerschaft, bekannte Allergie gegen Hühnereiweiß oder einer der Bestandteile des Impfstoffs Mutagrip® 2011/2012 (Sanofi Pasteur).

2.2 Instrumente

Tabelle 2 Liste der verwendeten Instrumente

<i>Instrumente</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Kennzeichnung</i>
Sterilbank	Heraeus	HERA safe
Zentrifuge	Beckmann Coulter	Allegra X-15R Allegra X-22 Microfuge 22 R
Zentrifuge	Eppendorf	5810 R 5804 R
CO ₂ -Inkubator	New Brunswick Scientific	Innova CO-170
Zellzahlgerät	Innovatis	Casy TTC
Durchflusszytometer	MiltenyiBiotec	MacsQuant
Durchflusszytometer	BD	FACS LSRII SORP

Des Weiteren wurden andere allgemeine Laborgeräte (Pipetten etc.) benutzt.

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Kennzeichnung</i>
96-well-Platte	RHJ-Bioanalytik GmbH, Deutschland	Riplate low profile – 1,2 ml Deep Well Platte
Stimulationsröhrchen	Cellstar®, Greinert bio-one, Frickenhausen	TC-Tube 12 ml
FACS-Röhrchen	BD, Deutschland	Falcon 5ml, round bottom
Schraubdeckelröhrchen	BD, Deutschland	Falcon-Tubes 15ml und 50ml
Separationsröhrchen	Cellstar®, Greinert bio-one, Frickenhausen	Leukosept-Tubes 50 ml
Venöse Blutentnahmeröhrchen	BD, Deutschland	Lithium-Heparin Vacutainer 10ml Serum Vacutainer 10 ml EDTA Vacutainer 2,5 ml

2. MATERIAL

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4 Liste der Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie und Reagenzien	Hersteller	Zusammensetzung
PBS	Gibco/Invitrogen	pH 7,2-7,4 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) 2,7 mM Kaliumchlorid (KCL) 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 137 mM Natriumchlorid (NaCl)
PBS/BSA 0,2 %	Hergestellt von AG Thiel – BCRT (BSA: Boehringer-Mannheim)	1g/l BSA in PBS
PBS/BSA 0,2 % /Azid 10%	Hergestellt von AG Thiel – BCRT	0,2 % Azid
Permeabilisierungspuffer	BD, Deutschland	FACS™-Perm-Solution 1:10 in Aqua dest.
Zell-Fixierungspuffer	BD, Deutschland	FACS™-Lysing Solution 1:10 in Aqua dest.
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Qiagen	Buffer EL
DMSO	Sigma – Deutschland	
LSM 1077 Lymphocyte	PAA	
Casy® ton	Roche	
LIVE/DEAD® fixable staining for flow cytometry	Invitrogen	Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, for 405 nm Fixable Red Dead Cell Stain Kit, for 488 nm
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Co., USA	Endkonzentration 400 nM
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Co., USA	5mg/ml in 70% Ethanol
Beriglobin	Aventis	1,44 mg/ml in PBS
SEB	Sigma, Deutschland	1,5 µg/ml
TSST₁	Sigma, Deutschland	1 µg/ml aus Staphylococcus aureus Molekulares Gewicht 24 kDa
PepTivator® - EBV-BZLF1, human	MiltenyiBiotec	
PepTivator® - EBV-EBNA, human	MiltenyiBiotec	
PepTivator® - CMV-IE-1, human	MiltenyiBiotec	
PepTivator® - CMV-pp65, human	MiltenyiBiotec	

2.5 Antikörper

Tabelle 5 Liste der eingesetzten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper

Antigen	Kopplung	Verdünnung	Klon	Isotyp	Hersteller
BDCA2 (CD303)	Fitc	1:100	AC144	Maus IgG1	Miltenyi
CCR7	A488	1:100	TG8/CCR7	Maus IgG2a	Biolegend
CCR7	PE	1:20	3D12	Ratte IgG2	BD
CD14	VioBlue	1:100	TUEK4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD14	VioGreen	1:20	TUEK4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD14	APC Vio770	1:10	TUEK4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD16	APC H7	1:200	3G8	Maus IgG1	BD
CD19	PE vio770	1:20	LT19	Maus IgG1	Miltenyi
CD20	VioGreen	1:20	LT20	Maus IgG1	Miltenyi
CD244	PECy5.5	1:40	C1.7	Maus igG1	Biolegend
CD27	APC	1:20	M-T271	Maus IgG1	Miltenyi
CD27	V500	1:200	N-T271	Maus IgG1	BD
CD28	nichtgekoppelt	1ug/1ml	CD28.2	Maus IgG1	BD

2. MATERIAL

CD3	APCH7	1:50	SK7	Maus IgG1	BD
CD3	ef650	1:50	OKT3	Maus IgG2a	eBioscience
CD38	PE	1:40	IB6	Maus IgG2b	Miltenyi
CD4	APCH7	1:200	RPA-T4	Maus IgG1	BD
CD4	APC	1:20	VIT4	MAus IgG2a	Miltenyi
CD4	PerCp	1:400	VIT4	MAus IgG2a	Miltenyi
CD40L (CD154)	VioBlue	1:20	5C8	Maus IgG2a	Miltenyi
CD45	Viogreen	1:20	5B1	Maus IgG2a	Miltenyi
CD45RA	ef605	1:100	HI100	Maus IgG2b	eBioscience
CD56	PE	1:40	AF12/7H3	Maus IgG1	Miltenyi
CD56	PeCy7	1:50	NCAM16	Maus IgG1	BD
CD57	VioBlue	1:40	TB03	Maus IgM	Miltenyi
CD8	PerCp	1:10	BW135/80	Maus IgG2a	Miltenyi
CD8	Qdot565	1:50	3B5	Maus IgG2a	Invitrogen
IFN- γ	Fitc	1:20	45-15	Maus IgG1	Miltenyi
IgD	V450	1:50	IA6-2	Maus IgG2a	BD
IgM	FITC	1:20	MHM-88	Maus IgG1	Biologend
IL-17	PE	1:100	BL168	Maus IgG1	Biologend
IL-2	APC	1:200	MQ1-17H12	Ratte IgG2a	BD
Ki67	PerCpCy5.5	1:400	B56	Maus IgG1	BD
KLRG1	A488	1:100	13FRF2		nicht kommerziell
NKG2D	APC	1:20	BAT221	Maus IgG1	Miltenyi
TNF- α	PE V770	1:100	CA2	Human IgG1	Miltenyi

2.6 Der Impfstoff

Tabelle 6 Zusammensetzung des Influenza-Impfstoffes

<i>Impfstoff</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Mutagrip® 2011/2012	Sanofi Pasteur MSD, Deutschland	Influenza-Viren (inaktiviert, gespalten) der folgenden Stämme: <ul style="list-style-type: none"> - A/California/7/2009 (H1N1) verwendeter Stamm NYMC X-179A (15 μg HA) - A/Perth/16/2009 (H3N2) verwendeter Stamm NYMC X-187, abgeleitet von A/Viktoria/210/2009 (15 μg HA) - B/Brisbane/60/2008 (15 μg HA)

3. METHODEN

3 Methoden

3.1 Studienaufbau

In der PRIMAGE Studie wurde die Immunantwort nach Influenzaimpfung umfassend analysiert. Alle Versuche wurden *in vitro* direkt nach der Blutabnahme und zeitgleich durchgeführt. Aus logistischen Gründen war es notwendig, die Probandenkohorte in zwei Gruppen mit jeweils 25 Personen zu unterteilen und zeitlich versetzt einzubestellen. In Oktober 2011 wurde die erste Gruppe und in November 2011 die zweite Gruppe geimpft. Für die Analyse wurden alle Daten zusammen betrachtet.

3.2 Probengewinnung

Die Blutproben wurden morgens zu gleichen Uhrzeit abgenommen. Die Blutentnahmen erfolgten zu zehn Zeitpunkten vor und nach der Impfung: jeweils am Tag 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 60, 180.

Die Impfung wurde am Tag 0 vor der Blutentnahme verabreicht. Es wurden 10 ml Lithium-Heparin Vakutainer (BD) und 10ml Serum Vakutainer (BD) für die Blutentnahme verwendet. Am Tag 0, 7, 21 und 180 wurden jeweils 100 ml Blut abgenommen; am Tag 3, 10, 14, 28 und 60 waren es 50 ml Blut. Serum-Proben wurden am Tag 0 und 21 für die serologische Untersuchungen eingefroren.

3.3 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Aus peripher gewonnenen heparinisierten Blutproben wurden die mononukleären Zellen - PBMC (engl. *Peripheral blood mononuclear cells*) isoliert. Zu den PBMCs zählt man B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und Monozyten. In dieser Arbeit wurde die Isolierung der PBMC mittels Separationsmediums Ficoll-Hypaque erreicht. Diese Methode basiert auf den Unterschieden in den Dichtegradienten der verschiedenen Blutkomponenten – Plasma, PBMCs, Erythrozyten – und des Mediums Ficoll. Die industriell hergestellte Ficoll-Hypaque Lösung (LSM 1077 Lymphocyte, PAA) besitzt eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, aber eine geringere Dichte als Erythrozyten und die meisten Granulozyten. Außerdem wird durch das Medium die Agglutination der Erythrozyten beschleunigt und damit deren Sedimentation.

Zur Fraktionierung des humanen Blutes wurden sterile 50 ml Separationsröhrchen (Leukosept-Tubes, Cellstar®) mit 15 ml Ficoll-Medium vorbereitet. Diese wurden dann mit in PBS 1:1 verdünntem antikoaguliertem Blut überschichtet. Nach 15 minütiger

3. METHODEN

Zentrifugation mit 800 g bei Raumtemperatur (RT) sedimentiert die Phase mit geringerer Dichte am Boden des Gefäßes unterhalb des Ficoll-Mediums. Die PBMCs reichern sich in der Interphase zwischen Ficoll-Hypaque und Plasma an und die Thrombozyten verbleiben zum größten Teil in Plasma.

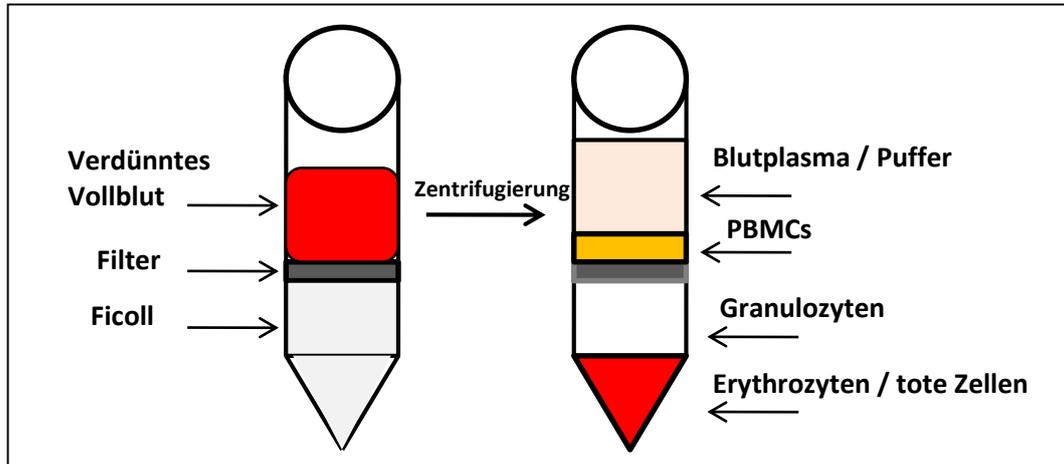


Abb. 5 Graphische Darstellung der Separation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mittels Ficoll-Hypaque Lösung. Nach Zentrifugation der mit Vollblut und Ficoll-Medium gefüllten Röhrchen, sedimentiert die Phase mit der geringeren Dichte am Boden des Gefäßes - Erythrozyten, tote Zellen und Granulozyten - dann reichern sich die PBMCs in der Interphase an und Thrombozyten/Blutplasma verbleiben in der oberen Schicht.

Die PBMC-Schicht wurde vorsichtig abpipettiert und in ein weiteres 50 ml Schraubdeckelröhrchen auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 300 g 10 Minuten bei RT zentrifugiert.

Die entstandene Zellsuspension wurde dann in 96er Well-Platten beziehungsweise FACS-Röhrchen verteilt. Die Proben wurden dann nach verschiedenen Protokollen zur Analyse unterschiedlicher Zellpopulationen verarbeitet.

3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Zur durchflusszytometrischen Analyse werden Moleküle auf der Zelloberfläche so wie auch in dem Zellinneren durch Fluorochrom-gekoppelten Antikörper markiert. Hierfür wurden monoklonale Antikörper verwendet und die optimale Konzentration für jedes Fluorochrom in Vorversuchen titriert.

3.4.1 Markierung von Zelloberflächenmoleküle auf lebenden Zellen

Fluorochrom-gekoppelte Antikörper wurden für die Markierung von Oberflächenmolekülen auf lebenden Zellen in einer Zellsuspension mit bis 10^7 Zellen in 100 μ l PBS zugegeben. Mastermixe mit Antikörpern wurden vorher hergestellt, um alle Strukturen mit einem Pipettierschritt gleichzeitig markieren zu können. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde Beriglobin (ZLB Behring, Deutschland, Endkonzentration

3. METHODEN

1 mg/ml) zu dem Antikörper-Mastermix zugegeben. Dabei handelt es sich um ein Gemisch von normalen humanen Antikörper, das zur Absättigung von F_c Rezeptoren und von unspezifischen Bindungsstellen führt. Die Proben wurden entweder bei Raumtemperatur (RT) oder bei 37°C im Dunkeln 15 Minuten inkubiert. Um bei der FACS-Analyse zwischen lebenden und toten Zellen differenzieren zu können, wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet: Die Zellen wurden entweder mit Life/Dead (LD) oder mit Propidiumiodid (PI) markiert. LD (LIVE/DEAD® *fixable staining for flow cytometry*, Invitrogen, Endkonzentration 1 µg/ml) wurde nach 5 Minuten zu den mit den Antikörper-Mastermix inkubierenden Proben gegeben und nach weiteren 10 Minuten mit PBS/BSA gewaschen. Die LD-Färbung reagiert mit Aminen auf der Oberfläche bei intakter Zellmembran, aber auch im Zellinneren, wenn die Membrangeschädigt ist. LD ist mit Fluoreszenzen gekoppelt und kann dementsprechend Signale unterschiedlicher Intensität exprimieren. Bei toten Zellen ist die Intensität höher. Propidiumiodid (Endkonzentration 400 nM, Sigma-Aldrich Co., USA) wurde kurz vor der Messung hinzugefügt. PI kann durch die geschädigte Zellmembran in die Zelle eindringen und sich in der DNA einlagern. PI-markierte Zellen sind somit als tote Zellen zu betrachten.

3.4.2 Intrazelluläre und extrazelluläre Färbung von fixierten Zellen

Viele Zellstrukturen und Moleküle sind nicht auf der Zelloberfläche sichtbar. Entweder werden sie nur im Zellinneren exprimiert oder kurzzeitig nach Zellaktivierung produziert und anschließend sezerniert. Zytokine werden nach Zellaktivierung rasch sezerniert, sodass zur ihrer Markierung die Inkubation mit einem Sekretionsinhibitor notwendig ist. Dafür wurde in dieser Arbeit Brefeldin A (Sigma, Deutschland) angewendet, welches den Proteintransport verhindert und damit zur intrazellulären Akkumulation der Proteine/Zytokine im Zytoplasma führt.

Um die intrazellulären Strukturen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper markieren zu können, wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert.

Zur Fixierung der Zellen wurden die Proben 10 min bei 390 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in jeweils 875 µl 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnte FACS-Lysing-Solution (BD, USA) pro Ansatz resuspendiert und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde es 10 min bei 490 g zentrifugiert. Zur Permeabilisierung wurde das Pellet in 450 µl 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnter FACS-Perm-Solution (BD, USA) resuspendiert und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Mit 450 µl PBS/BSA wurde es dann aufgefüllt und die Proben bei 490 g 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet nochmals

3. METHODEN

in 875 µl PBS/BSA gewaschen, um den Permeabilisierungsprozess anzuhalten. Das entstandene Pellet wurde dann in 100 µl PBS/BSA resuspendiert und mit den entsprechenden Antikörpern 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde es mit PBS/BSA aufgefüllt und bei 490 g 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann für die Analyse mit dem Durchflusszytometer in 350 µl PBS/BSA resuspendiert.

Auf diese Art und Weise konnten intrazelluläre Zytokine identifiziert werden, sowie die Proliferationsrate der Zellen mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper Markierung von Ki67 vermittelt werden.

3.5 Die multiparametrische Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik, die physikalische, chemische und funktionelle Eigenschaften von einzelnen Zellen gleichzeitig erfassen kann. Zellen werden in einer Suspension an einem optischen Messpunkt in laminaren Fluss vorbeigeführt. An dem Messpunkt trifft ein Lichtstrahl aus einem Laser den Probenstrom. Durch die Passage der einzelnen Zellen wird das Licht gestreut. Die Streuung im engen Winkel zum Laserlicht wird als Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter* – FSC) bezeichnet und die Streuung im 90° Winkel zum Laserlicht als Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*- SSC). Das FSC stellt ein unscharfes Maß für die Größe der Zelle dar, während sich aus dem SSC Informationen über die Granularität einer Zelle gewinnen lassen. Es ist weiterhin möglich, molekulare und funktionelle Eigenschaften einzelner Zellen zu erfassen. Dafür werden zellspezifische Merkmale durch Fluoreszenz-gekoppelte monoklonale Antikörpern markiert. Oberflächenmoleküle, aber auch Zytokine oder Transkriptionsfaktoren, lassen sich somit detektieren.

Die an Antikörper-gekoppelten Fluorochrome werden durch den Lichtstrahl des Lasers am Messpunkt angeregt, absorbieren dabei einen Teil der Lichtenergie und emittieren Fluoreszenzlicht mit höheren Wellenlängen. Das emittierte Licht in Fluoreszenz-spezifischen Wellenlängen wird von Sensoren detektiert. SSC und Fluoreszenzen sind durch Filter und Farbteilerspigel getrennt. Eine Reihe von optischen Filtern ist so ausgelegt, dass sie möglichst viel Licht eines bestimmten Fluorochroms durchlassen und dabei das Licht anderer Fluorochrome aber herausfiltern. Das vereinfacht die notwendige Kompensation.

Die Signale, die durch den Filter ankommen, werden von Photomultiplier (PMTs) in digitale Form umgewandelt und gespeichert.

3. METHODEN

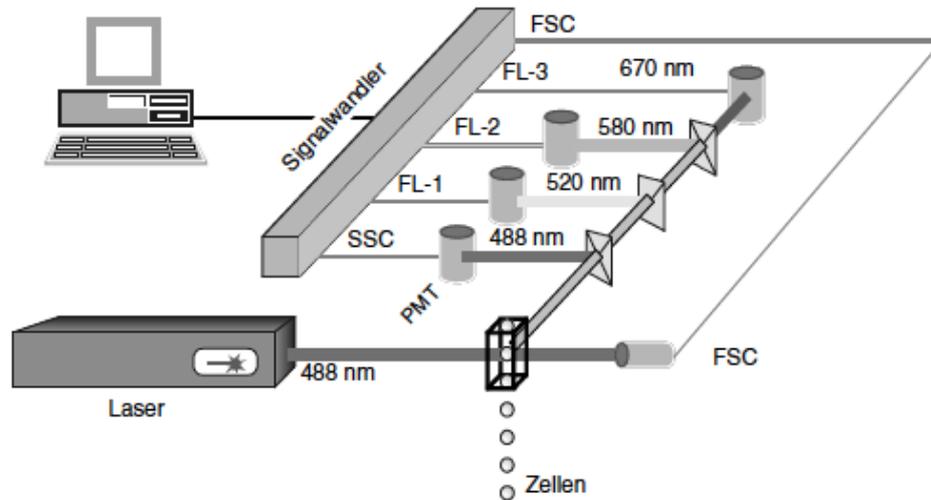


Abb. 6 Schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers. Das Licht aus dem Laser trifft an einem Messpunkt die in laminarem Fluss fließenden Zellen. Die Streuung des Lichtes sowie das emittierte Licht aus den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern werden durch den Forward-Scatter (FSC), Side-Scatter (SSC) sowie die unterschiedliche Filtern erfasst. Die Signale werden dann durch den Signalwandler in digitale Form umgewandelt [37].

Die Analyse der Daten erlaubt dann die Zuordnung von Messsignalen zu Zellpopulationen mit ähnlichen Eigenschaften. Dadurch ist eine statistische Aussage über die Zusammensetzung der Probe sowie die Identifizierung qualitativer und quantitativer Merkmale der Zellpopulation möglich.

3.5.1.1 Datenaufnahme: Messung und Kompensation

Die Qualität der Daten hängt von den spektralen Überlappungen von Fluoreszenzen ab, beziehungsweise deren Korrektur. Das nennt man Kompensation. Das emittierte Licht aus spektral benachbarten Farbstoffen wird von demselben PMT detektiert. Es kann somit passieren, dass Mischsignale aus zwei Detektoren für eine Zelle gespeichert werden, die aber mit nur einem Fluorochrom markiert ist. Zum Ausgleich dieser Messungenauigkeit kann man die Messdaten prozentual vor Digitalisierung und Speicherung korrigieren. Alternativ ist es möglich eine hochauflösende Digitalisierung der unkompensierten Daten zu speichern und diese nachträglich rechnerisch zu kompensieren. Die Kompensationseinstellungen müssen vor jede Messung überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden. Wichtig ist die Einstellung der elektrischen Spannung der verschiedenen Laser, sodass das Fluorochrom emittierte Licht in seinem Emissionsmaximum detektiert werden kann.

Die Daten werden in dem gerätübergreifenden Format FCS (Flow Cytometry Standard) gespeichert. Der aktuelle FCS 3.0 Standard enthält die technischen Messeinstellungen, eine Beschreibung der Probe, der Färbung und des Experiments.

3. METHODEN

Zur Auswertung der Daten können unterschiedliche Darstellungen angewendet werden. Das einfachste ist das Histogramm-Plot, wobei Informationen über ein Merkmal in einer eindimensionalen Form dargestellt werden. Auf der X-Achse wird die Intensität des Fluoreszenzsignals aufgetragen gegen die Anzahl der Ereignisse auf der Y-Achse. Es handelt sich um eine einfache Häufigkeitsverteilung.

Die klassische Art der Darstellung ist das Dot-Plot. Damit werden einzelne Zellpopulationen in einer zweidimensionalen Darstellung anhand der Beziehung von zwei verschiedenen Fluoreszenzen unterschieden. Die Zellen werden aber meistens mehrfach markiert. Es ist deshalb notwendig, die Daten in verschiedenen Gruppen zu unterteilen und getrennt weiter zu betrachten. Gewöhnlich werden die Achsen logarithmisch aufgetragen. Es ist weiterhin möglich, jede Fluoreszenz gegen SSC und/oder FSC zu betrachten. Weitere Darstellungsarten sind Countur-Plot, wobei Punkte gleicher Dichte in Höhenlinien zusammengefasst werden, und Density-Plot, was mehrfach überlagerte Punkte in einem Dot-Plot mit verschiedenen Farben darstellt.

Die Definition von Zellen mit mehreren Parametern (über zwei) verlangt eine weitergehende Analyse über die Verknüpfung von Regionen oder ‚Gates‘. Gates können dann über eine Fehlfarbkodierung in Dot-Plots dargestellt werden. Diese Farbkodierung erlaubt eine einfache Interpretation und Definition von Zellpopulationen, die ähnliche Eigenschaften aufweisen. Innerhalb eines Gates ist es auch möglich verschiedenen Parametern, die von derselben Zelle exprimiert werden, miteinander zu verknüpfen und ihre Expression zu errechnen. Das kann man durch Boolean-Gating durchführen.

Der Durchflusszytometer LSR II weist die folgende Filter-Ausstattung auf:

Tabelle 7 Filter Ausstattung des Durchflusszytometers LSR II.

Laser	Detector Name	PMT	LP Filter	BP Filter
Blue 488nm	SSC	C	empty	488/10
Blue 488nm	B525	B	505LP	525/50
Blue 488nm	B685	A	670LP	685/35
YellowGreen 561nm	YG582	E	empty	582/15
YellowGreen 561nm	YG610	D	600LP	610/20
YellowGreen 561nm	YG670	C	630LP	670/14
YellowGreen 561nm	YG710	B	685LP	710/50
YellowGreen 561nm	YG780	A	755LP	780/60
Red 640nm	R660	C	empty	660/13
Red 640nm	R720	B	685LP	720/30
Red 640nm	R780	A	755LP	780/60
Violet 405nm	V450	E	empty	450/50
Violet 405nm	V525	D	505LP	525/50
Violet 405nm	V610	C	595LP	610/20
Violet 405nm	V710	B	685LP	710/50
Violet 405nm	V780	A	755LP	780/60

3. METHODEN

Für die Messung an dem LSR II wurden für diese Arbeit die folgenden Filter ersetzt:

Tabelle 8 Ersetze Filter für die Messung an dem Durchflusszytometer LSR II.

Filter		PTM	LP Filter	BP Filter
Blue 488nm	B685	A	670LP	670/30
Violet 405nm	V780	A	650LP	660/13
Violet 405nm	V710	B	595LP	610/20
Violet 405nm	V610	C	570LP	575/26

Der Durchflusszytometer MACSQuant verfügt über die folgende Ausstattung:

Tabelle 9 Filter-Ausstattung des Durchflusszytometers MACSQuant.

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

3.6 Charakterisierung der B-Zellen

Die Phänotypisierung der B-Zellen wurde mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper und Durchflusszytometrie am Tag 0 vor und am Tag 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 60 und 180 nach TIV erfasst. Die verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung können im peripheren Blut anhand von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen charakterisiert werden.

Für die Markierung der Oberflächenmolekülen wurden nach Isolierung der PBMCs die in der folgenden Tabellen aufgelisteten Antikörper als Mastermix auf lebenden Zellen zugegeben und nach der o.g. Methode (s.3.4.1) 15 min bei RT im Dunkeln gefärbt.

Tabelle 10 Zusammensetzung des Antikörper-Gemisches für die Oberflächenfärbung zur Charakterisierung der B-Lymphozyten.

Antigen	Kopplung	Verdünnung	Klon	Isotyp	Hersteller
CD14	APC Vio770	1:10	TUEK4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD19	PE vio770	1:20	LT19	Maus IgG1	Miltenyi
CD20	VioGreen	1:20	LT20	Maus IgG1	Miltenyi
CD27	APC	1:20	M-T271	Maus IgG1	Miltenyi
CD3	APCH7	1:50	SK7	Maus IgG1	BD
CD38	PE	1:40	IB6	Maus IgG2b	Miltenyi
IgD	V450	1:50	IA6-2	Maus IgG2a	BD
IgM	FITC	1:20	MHM-88	IgG1	Biolegend

Die Antikörper wurden in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß vorgemischt. Das Gemisch wurde am vorherigen Tag vorgefertigt, bei 4°C im Dunkeln gelagert und kurz vor der Färbung

3. METHODEN

mit 14.000 g zentrifugiert. Anti-CD3 und anti-CD14 wurden mitgefärbt, um T-Lymphozyten und Monozyten in der Analyse der Daten ausschließen zu können. Life/Dead Infrared wurde zum Ausschluss von toten Zellen nach 5 Minuten Inkubation der Oberflächenfärbung hinzugegeben. B-Zellen wurden mit Anti-CD19 identifiziert. Die Markierung des TNF-Rezeptors CD27 und des Aktivierungsmarkers CD38 erlaubte die Identifizierung der Antikörper-sezernierenden Zellen - sogenannten Plasmablasten. Diese Zellen zeichnen sich außerdem durch das Fehlen von CD20 aus. Mittels Anti-CD20 konnte man somit die anderen B-Zell-Populationen identifizieren: vor allem naive B-Lymphozyten und Gedächtniszellen. Dafür wurden CD27 und sIgD markiert. Zur weiteren Unterscheidung der Reifungs- beziehungsweise Differenzierungsgrade der B-Zell-Populationen wurden der Aktivierungsmarker CD38 und die Oberflächenexpression von IgM mit den entsprechenden Antikörper markiert.

Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, um dann intrazellulär Ki67 markieren zu können. Um den Pipettierfehler bei sehr geringen Mengen von Anti-Ki67 zu minimieren, wurde bereits ein Tag zuvor 3,75 µl Anti-Ki67 mit 100 µl PBS/Azid verdünnt.

Tabelle 11 Zusammensetzung des Antikörper-Gemisches zur intrazellulären Färbung der B-Lymphozyten

<i>Antigen</i>	<i>Kopplung.5</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Klon</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Hersteller</i>
Ki67	PerCpCy5.5	1:400	B56	Maus IgG1	BD

Ki67 eignet sich zur Markierung von sich teilenden menschlichen Zellen und erlaubt damit Aussagen über die Wachstumsfraktion einer Zelle. Ki67 befindet sich im Zellkern und während des Zellzyklus, aber nicht in der G₀-Phase, ist dieses Protein auf der Oberfläche des Chromosoms verlagert und kann deswegen durch fluoreszenz-gekoppelte Antikörpern markiert werden.

Die Proben wurden dann mit dem Durchflusszytometer MACSQuant gemessen. Die Analyse der Daten wurde mit dem Programm FlowJo durchgeführt. In der Abb. 7 ist ein Beispiel der angewendeten Gating-Strategie für einen Proband dargestellt.

3. METHODEN

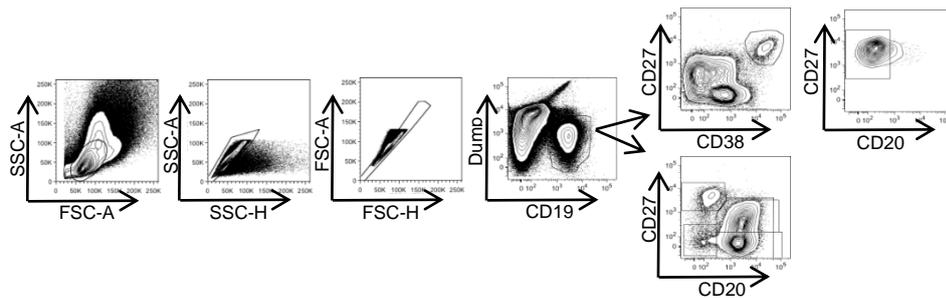


Abb. 7 Gating-Strategie für die Analyse der B-Lymphozyten. Das erste Gate wurde auf Lymphozyten nach FSC - SSC gesetzt. Weiterhin wurden die Dubletten ausgeschlossen und CD19⁺ Zellen identifiziert, sowie tote Zellen, CD3⁺ T-Lymphozyten und CD14⁺ Zellen (Dump) ausgeschlossen. Plasmablasten wurden dann als CD19^{low}CD38⁺CD27⁺CD20⁻ Zellen identifiziert. Aus den CD19⁺ Zellen wurden dann CD20⁺ Zellen identifiziert.

CD20⁺ B-Lymphozyten wurden dann mittels automatisierten Clustering mit dem Programm R und *Principal Component Analysis* - PCA analysiert und in naive B-Zellen und B-Gedächtniszellen unterteilt.

3.6.1.1 Clustering und Principal Component Analysis

Die Limitation der zweidimensionalen Auswertungen mit dem Programm FlowJo konnte über die Möglichkeiten einer mehrdimensionalen Analyse mit der Methode des Clustering überwunden werden. Damit konnte man die Zellen gleichzeitig über die Expression der vier Parametern IgD, CD27, CD38 und IgM klassifizieren. Die Analysen wurden mittels k-mean mit dem Programm R durchgeführt.

Neun Clusters wurden zwingend pro Proband für jeden Zeitpunkt nach TIV nach der Expression der genannten Marker definiert. Drei von den neun Cluster enthielten naive B-Zell Populationen, i.e. hohe Expression an IgD und keine CD27. Sowohl IgM positive als auch CD38 positive oder negative Zellen gehörten zu dieser Gruppe. Die Expression von CD27 definierte vornämlich Gedächtniszellen. Es wurden sechs Cluster mit ähnlichen Eigenschaften identifiziert, die durch höhere CD27 Expression gekennzeichnet waren. Dazu gehörten sowohl IgD⁺ (*unswitched*) als auch IgD⁻ (*switched*) Gedächtniszellen und CD27⁻IgD⁻Zellen, die als doppeltnegative (DN) Gedächtniszellen in der Literatur beschrieben sind. Die DN CD27⁻IgD⁻Zellen können eine ausdifferenzierte Zellpopulation darstellen [38]. Davon exprimieren die meisten Zellen dieser Gruppe Immunglobuline der Klasse G und A [13], die von uns nicht analysiert wurden.

Mit den neun identifizierten Cluster wurde dann eine *Principal Component Analysis* - PCA durchgeführt. Die neun Clustern wurden dabei in den dreidimensionalen Raum anhand der Expression der vier o.g. Marker (IgD, CD27, CD38, IgM) verteilt. Man konnte somit beobachten, dass Cluster 1, 4 und 6 große Ähnlichkeit in der Expression der Marker IgD und CD27 aufwiesen (s. Abb. 8b). Man konnte die dazu gehörigen Zellen zu der

3. METHODEN

allgemeineren Gruppe der naiven B-Zellen einordnen. Gleichmaßen wurden die Cluster 2, 3, 5, 7, 8 und 9 anhand der höheren Expression von CD27 zur Gruppe der Gedächtniszellen zugeordnet.

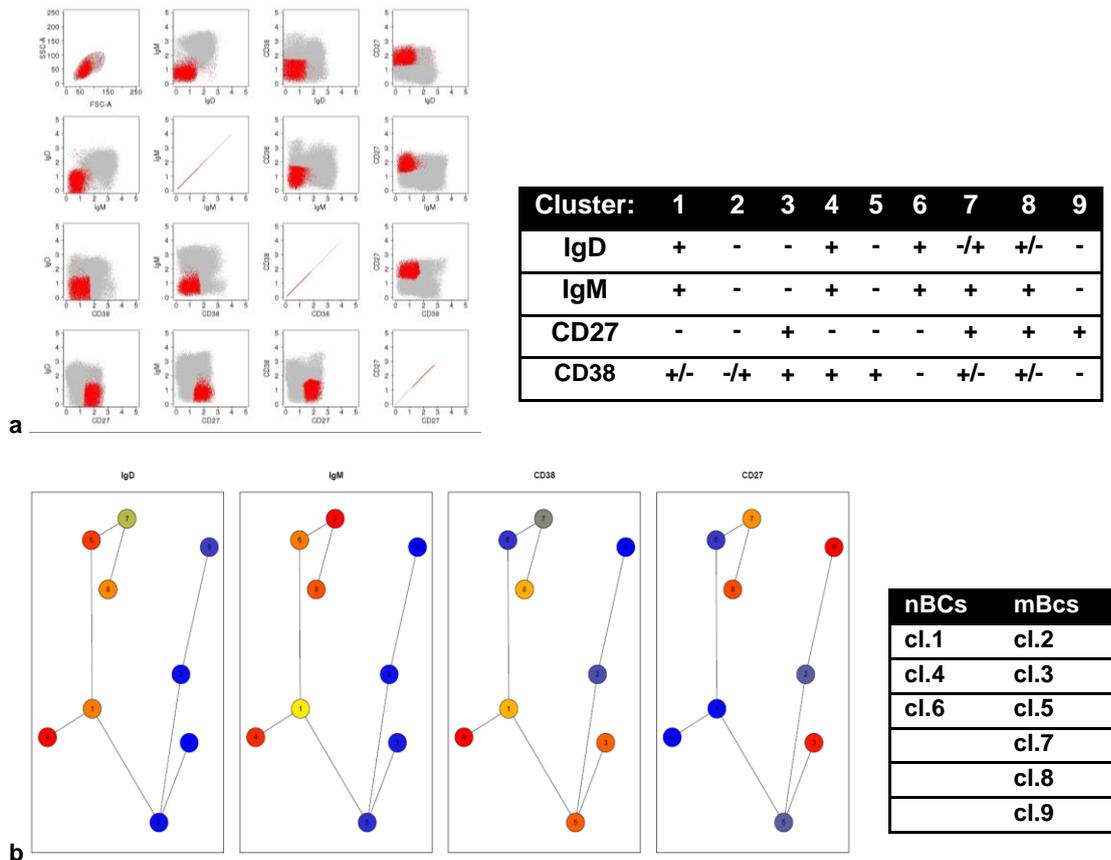


Abb. 8 Cluster Unterteilung der CD20⁺Zellen. (a) Graphische Darstellung vom Cluster 9 anhand eines Probanden am Tag 7 nach TIV: in Rot sind die zum Cluster gehörigen Zellen, während die gesamte Zellpopulation in Grau dargestellt wird. In Tabelle sind die neun identifizierten Cluster aufgelistet. Entlang der Expression von IgD, CD27, CD38 und IgM wurden CD20⁺Zellen charakterisiert und in neun Cluster unterteilt. Die Expression von den jeweiligen Marker ist mit +, keine Expression ist mit – gekennzeichnet, während +/- drauf hinweist, dass sowohl positive als auch negative Zellen für den Marker in dem Cluster enthalten sind. (b) Die graphische Darstellung der Principal Component Analysis präsentiert die Expression der Marker für die verschiedene Cluster - von Rot - viel exprimiert - bis Blau - sehr wenig oder nicht exprimiert. Die räumlichen Abstände zwischen den verschiedenen Cluster stellen die euklidischen Distanzen zwischen den Zellen des jeweiligen Clusters im dreidimensionalen Raum dar. Man kann anhand der farbigen Kodierung und der räumlichen Ordnung der Zellen die Cluster 1, 4 und 6 nach der Expression von IgD und CD27 als naive B-Zellen (nBCs) identifizieren, während die Cluster 2, 3, 5, 7, 8 und 9 die verschiedenen Aktivierungs- und Differenzierungsstufen der Gedächtniszellen (mBCs) darstellen, wie in der Tabelle aufgelistet.

Die Übereinstimmung der Clustering-Analyse und der PCA erlaubte die sichere Identifizierung der naiven B-Zellen und Gedächtniszellen innerhalb der CD20⁺ B-Lymphozyten. Durch die intrazelluläre Expression von Ki67 wurde weiterhin das Proliferationsprofil dieser Zellen bestimmt.

Für die Cluster-Analysen und PCA danken wir Herrn Dr. rer. nat. Karsten Jürchott.

3. METHODEN

3.7 Charakterisierung der T-Zellen

In diesem Versuch wurden T-Zellen am Tag 180 nach TIV charakterisiert. Ziel dieses Versuches war die Markierung von bestimmten Oberflächenmolekülen, die verschiedene Reifungs- sowie Differenzierungsstufen der T-Zellen identifizieren können.

Dazu wurden Anti-CD3 zur Identifizierung der T-Lymphozyten, sowie Anti-CD4 und Anti-CD8 für jeweils T-Helfer Zellen und zytotoxische T-Zellen angewendet. Zur Klassifizierung von naiven T-Zellen und Gedächtniszellen wurden CD45RA und CCR7 markiert. Weiterhin wurden Oberflächemolekülen - CD244, KLRG1, NKG2D, CD57, CD27 - markiert, die mit Erschöpfung beziehungsweise Alterung der T-Zellen in Zusammenhang gebracht wurden. Diese dienten der Phänotypisierung von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen. Zum Ausschluss anderer T-Zell Populationen (wie NK-Zellen) oder Monozyten wurden anti-CD56 und anti-CD16 in den Antikörper-Mastermix hinzugefügt.

Die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (Tabelle 12) wurden vor der Färbung in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß vorgefertigt, Beriglobin wurde zugegeben und das Gefäß bei 14.000 g zentrifugiert. Die PBMCs wurden aus heparinisiertem Vollblut gewonnen (s.3.3) und bis 10⁷ Zellen in FACS-Röhrchen verteilt. Die Oberflächenfärbung wurde auf lebenden Zellen 15 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben in PBS/BSA gewaschen. Propidiumiodid wurde kurz vor der FACS-Messung mit dem Gerät LSRII hinzugegeben.

Tabelle 12 Zusammensetzung des Antikörper-Mastermix zur Oberflächenfärbung der T-Lymphozyten.

<i>Antigen</i>	<i>Kopplung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Klon</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Hersteller</i>
CCR7	PE	1:20	3D12	Ratte IgG2	BD
CD16	APC H7	1:200	3G8	Maus IgG1	BD
CD244	PECy5.5	1:40	C1.7	Maus igG1	Bilogegend
CD27	V500	1:200	N-T271	Maus IgG1	BD
CD3	ef650	1:50	OKT3	Maus IgG2a	eBioscience
CD4	PerCp	1:400	VIT4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD45RA	ef605	1:100	HI100	Maus IgG2b	eBioscience
CD56	PeCy7	1:50	NCAM16	Maus IgG1	BD
CD57	VioBlue	1:40	TB03	Maus IgM	Miltenyi
CD8	Qdot565	1:50	3B5	Maus IgG2a	Invitrogen
KLRG1	A488	1:100	13FRF2		Nicht kommerziell
NKG2D	APC	1:20	BAT221	Maus IgG1	Miltenyi

Die Analyse der Daten wurde mit dem Programm FlowJo durchgeführt.

3. METHODEN

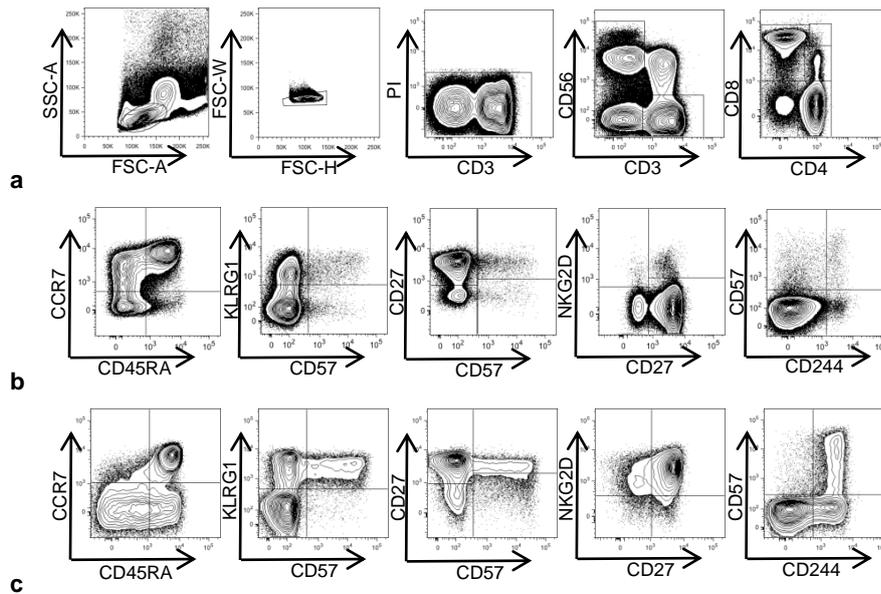


Abb. 9 Gating-Strategie zur Charakterisierung der T-Lymphozyten anhand eines repräsentativen Beispiels. (a) T-Lymphozyten wurden erstmal in FSC-SSC identifiziert, die Dubletten wurden dann in FSC ausgeschlossen sowie die toten Zellen mittels PI-Markierung. CD3⁺ T-Lymphozyten wurden identifiziert und CD56⁺ Zellen wurden ausgeschlossen. Innerhalb der CD3⁺ T-Lymphozyten wurden dann CD4⁺ und CD8⁺T-Lymphozyten abgegrenzt. **(b)** CD4⁺ T-Zellen wurden dann nach der Expression von CD45RA und CCR7 analysiert sowie nach der Expression von CD57, KLRG1, CD27, NKG2D und CD244. Ebenfalls wurden CD8⁺ T-Zellen **(c)** nach der Expression von CD45RA und CCR7, sowie von CD57, KLRG1, CD27, NKG2D und CD244 charakterisiert.

3.8 Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen - *Fast Immune Assay*

Einige Viren (wie Cytomegalie-Virus - CMV und Epstein-Barr-Virus - EBV) können nach der primären Infektion von dem Immunsystem nicht vollständig eliminiert werden. Sie verbleiben somit in dem Organismus und verursachen eine chronische latente Infektion, die die Immunantwort gegen neue Pathogene beeinträchtigen kann. In diesem Versuch ging es darum, die Antigen-spezifische CD4⁺- beziehungsweise CD8⁺ T-Zellen für die Herpesviren CMV und EBV zu identifizieren und ihr Zytokinprofil zu analysieren. Es wurde mittels *Fast Immune Assay* nach der Quantität und Qualität von CMV- und EBV-Antigen spezifischen T-Zellen untersucht.

Um die gleichzeitige Stimulation von Helfer- und zytotoxische T-Zellen zu erreichen, wurden in dieser Arbeit Gemische angewendet, die aus jeweils 11 Aminosäure langen in sterilem Wasser verdünnten 15 überlappenden Peptiden bestanden [39].

3.8.1.1 Antigen-spezifische Stimulation von CD4⁺- und CD8⁺-T- Zellen

Am Tag 28 nach Impfung wurde 1 ml heparinisiertes Vollblut in Stimulationsröhrchen verteilt. Das Vollblut wurde 6 Stunden bei 37°C im Dunkeln mit verschiedenen Antigen-Peptiden stimuliert (Tabelle 13). Als Negativkontrolle wurde PBS und als Positivkontrolle (S/T) ein oligoklonaler Stimulus mit den Superantigene SEB (Staphylococcal Enterotoxin B) und TSST₁ (Toxic Shock Syndrome Toxin 1) angesetzt. SEB und TSST₁ binden an

3. METHODEN

die V β -Kette des TCR und gleichzeitig an die C α -Kette eines MHC-Moleküls, woraufhin Th-Zellen und zytotoxische T-Zellen aktiviert werden. In jeder Probe wurde anti-CD28 hinzugefügt, um die Präsentation von APCs zu imitieren. Der Stimulus wurde wie vom Hersteller empfohlen angewendet und wie in der folgenden Tabelle beschrieben vorgefertigt.

Tabelle 13 Fast Immune Assay-Stimuli zur Antigen-spezifischen Aktivierung der T-Zellen.

	<i>Stimulus</i>	<i>Anti-CD28</i>	<i>PBS</i>	<i>Gesamtvolumen</i>
Negativkontrolle	PBS	1 μ l	49 μ l	50 μ l
S/T	1 μ l SEB + 1,5 μ l TSST ₁	1 μ l	46,5 μ l	50 μ l
PepTivator[®] - CMV-pp65	20 μ l	1 μ l	29 μ l	50 μ l
PepTivator[®] - CMV-IE-1	20 μ l	1 μ l	29 μ l	50 μ l
PepTivator[®] - EBV-BZLF1	20 μ l	1 μ l	9 μ l	50 μ l
PepTivator[®] - EBV-EBNA1	20 μ l			

Nach 2 Stunden wurde Brefeldin A zugegeben, um die Detektion der intrazellulären produzierten Zytokine zu erlauben. Um die Stimulation anzuhalten, wurden 9 ml Qiagen Erythrozyten Lysis Buffer dazugegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Der Qiagen Erythrozyten Lysis Buffer sorgt für die Lyse der roten Blutkörperchen und das Anhalten der durch die Antigene wirkenden Stimulation. Die Proben wurden dann bei 280 g bei 4°C, 10 Minuten zentrifugiert und anschließend nochmal mit 5 ml Erylyse-Buffer gewaschen. Das entstandene Pellet wurde in 800 μ l PBS resuspendiert und in 96er-Wellplatte übertragen. Die Platte wurde bei 490 g zentrifugiert und das Pellet in 100 μ l PBS resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit den Antikörpern 15 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach 5 Minuten wurde 1 μ l LD-Aqua hinzu gegeben.

Tabelle 14 Zusammensetzung des Antikörper-Mastermix zur Oberflächenfärbung der T-Lymphozyten nach Antigen-spezifischer Stimulation.

<i>Antigen</i>	<i>Kopplung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Klon</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Hersteller</i>
CD14	VioGreen	1:20	TUEK4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD20	VioGreen	1:20	LT20	Maus IgG1	Miltenyi
CD4	APCH7	1:200	RPA-T4	Maus IgG1	BD
CD8	PerCp	1:10	BW135/80	Maus IgG2a	Miltenyi
Beriglobin		1:50			

CD14 und CD20 wurden mitgefärbt, um Monozyten und B-Lymphozyten in die Datenanalyse ausschließen zu können. Die Korezeptoren CD4 und CD8 dienen zur Identifizierung von T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen.

Die Proben wurden dann in PBS/BSA gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Um die Aktivierung der CD4⁺T-Zellen zu erkennen, wurde CD40L markiert. Die Aktivierung von

3. METHODEN

CD8⁺ T-Zellen wurde anhand der intrazellulären Expression von Interferon gamma (IFN- γ) detektiert. Weitere Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-17 (IL-17) und Tumornekrose-Faktor alpha (TNF- α) wurden zur Analyse der Qualität beider T-Zell-Populationen markiert. Dafür wurde es nach der Permeabilisierung mit dem in der Tabelle 15 beschriebenen Mastermix 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Tabelle 15 Zusammensetzung des Antikörper-Mastermix zur intrazellulären Färbung der T-Lymphozyten nach Antigen-spezifischer Stimulation.

Antigen	Kopplung	Verdünnung	Klon	Isotyp	Hersteller
CD40L (CD154)	VioBlue	1:20	5C8	Maus IgG2a	Miltenyi
IFN- γ	Fitc	1:20	45-15	Maus IgG1	Miltenyi
IL-17	PE	1:100	BL168	Maus IgG1	Biolegend
IL-2	APC	1:200	MQ1-17H12	Ratte IgG2a	BD
TNF- α	PE V770	1:100	CA2	Human IgG1	Miltenyi

Es wurde dann in PBS/BSA gewaschen und das Pellet in 350 μ l PBS/BSA für die FACS-Analyse mit dem Gerät MACSQuant resuspendiert.

In der Abb. 10 ist die Gating-Strategie, die zur Identifizierung der Antigen-spezifischen T-Zellen nach Stimulation angewendet wurde, abgebildet.

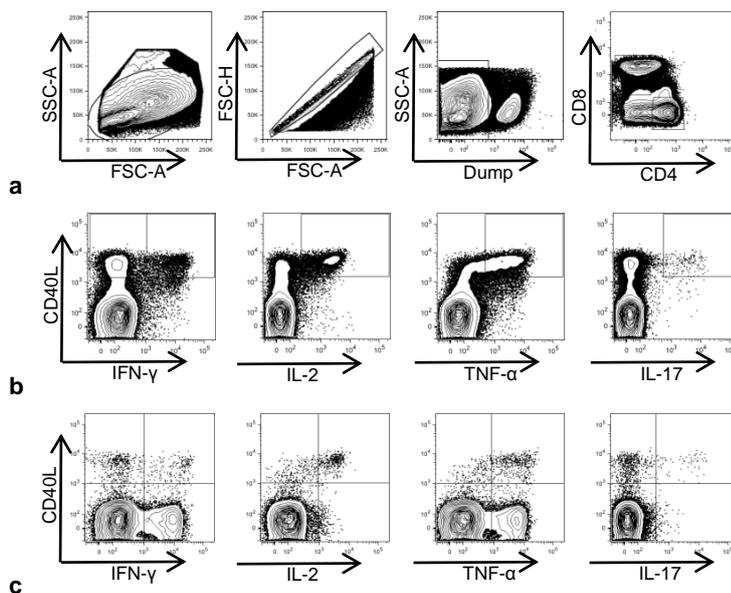


Abb. 10 Gating-Strategie zur Identifizierung der CD4⁺ und CD8⁺ Antigen-spezifischen T-Zellen anhand eines Beispiels nach einem oligoklonalen Stimulus mit SEB und TSST₁. (a) Lymphozyten wurden in FSC-SSC identifiziert; Dubletten wurden ausgeschlossen sowie tote Zellen mittels LD-Aqua (Dump). CD3⁺ T-Zellen wurden abgegrenzt und innerhalb dieser CD4⁺ oder CD8⁺ exprimierenden Zellen zur weiteren Analyse identifiziert. (b) CD4⁺ T-Zellen wurden nach ihrer Aktivierung durch die Expression von CD40L charakterisiert. CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen wurden nach der Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2, TNF- α und IL-17 identifiziert. (c) Aktivierte CD8⁺ T-Zellen wurden nach der Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2, TNF- α und IL-17 charakterisiert.

3.9 Zellzahlbestimmung

Die zelluläre Zusammensetzung einer Probe wird durch die FACS-Analyse in Prozentwerte der hierarchisch vorbestehenden Zellpopulation ausgedrückt. Um die eigentliche Zahl einer Zellpopulation in einer Probe zu berechnen, wurden zelldefinierende Oberflächenmarker in einem unabhängigen Versuch direkt in heparinisiertem Vollblut markiert. Jeder Zentrifugationsschritt wurde vermieden, um den Zellverlust zu minimieren.

3. METHODEN

Durch Reverse-Pipettieren wurden 50 µl Vollblut in 96er Well-Platte übertragen. Die Oberflächenfärbung wurde mit PBS/BSA auf 50 µl aufgefüllt und direkt auf den Proben aufgetragen. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Färbung mit 500 µl Eriylse-Qiagen Buffer angehalten und die Proben wurden 30 Minuten auf Eis gestellt. Man konnte mit dem MACSQuant genau 350 µl der Probe messen. Über den prozentual ermittelten Anteil der in der Probe enthaltenen unterschiedlichen Zellpopulationen konnte man dann die Gesamtzahl der Zellen berechnen.

In der Tabelle 16 sind die mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper markierten Strukturen zur Identifizierung der Hauptpopulationen im peripheren Blut aufgelistet.

Tabelle 16 Zusammensetzung des Antikörper-Mastermix für die Oberflächenfärbung von heparinisierten Vollblut zur Zellzahl Bestimmung.

Antigen	Kopplung	Verdünnung	Klon	Isotyp	Hersteller
BDCA2 (CD303)	Fitc	1:100	AC144	Maus IgG1	Miltenyi
CD14	VioBlue	1:100	TUEK4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD19	PE vio770	1:20	LT19	Maus IgG1	Miltenyi
CD3	APCH7	1:50	SK7	Maus IgG1	BD
CD4	APC	1:20	VIT4	Maus IgG2a	Miltenyi
CD45	Viogreen	1:20	5B1	Maus IgG2a	Miltenyi
CD56	PE	1:40	AF12/7H3	Maus IgG1	Miltenyi
CD8	PerCp	1:10	BW135/80	Maus IgG2a	Miltenyi
Beriglobin		1:50			

Leukozyten wurden als CD45⁺Zellen identifiziert. Davon waren CD3⁺ T-Lymphozyten von CD19 B-Lymphozyten zu unterscheiden. Die CD3⁺ T-Zellen wurden dann weiterhin in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen unterteilt. CD14 ist auf alle Monozyten und CD56 auf NK-Zellen zu finden. Plasmazytoide dendritische Zellen wurden durch die Expression von BDCA2 definiert. In der Abb. 11 ist die Gating-Strategie der Zellpopulationen dargestellt.

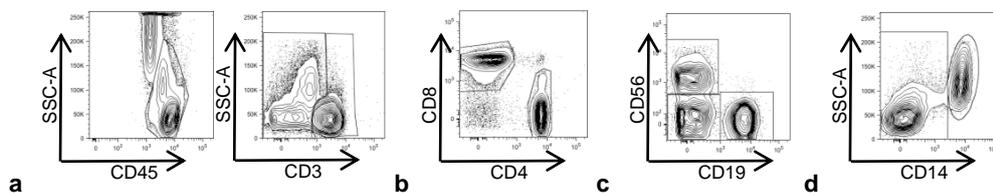


Abb. 11 Gating-Strategie zur Identifizierung der Hauptzellpopulationen in heparinisiertem Vollblut anhand Contour-Plot eines Probandes. (a) CD45⁺ Zellen werden identifiziert. Diese werden in CD3⁺ und CD3⁻ Zellen unterteilt. CD3⁺ Zellen werden weiterhin in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen unterteilt **(b)**. Aus CD3⁻ Zellen wurden CD19⁺ Zellen identifiziert **(c)** sowie CD14⁺ Zellen **(d)**.

Aus den gewonnenen Prozentwerten konnte man über den bekannten Verdünnungskoeffizienten auf die reellen Zahlen zurückschließen. Dafür wurde die folgende Gleichung angewendet.

3. METHODEN

$$\text{absoluter Zellzahl} = \frac{\text{Prozent der Zellpopulation}}{\text{Aufnahmevervolumen (350 } \mu\text{l)}} * \text{Verdünnung (12)}$$

3.10 Serologische Analysen

3.10.1.1 *Hämagglutinin-Inhibition Assay*

Die Hämagglutinin-Inhibition (HI)-Titer wurden für die drei in dem Vakzin enthaltenen Virusstämme mittels Hämagglutinin-Inhibition Assay gemessen. Serumproben wurden am Tag 0 und am Tag 21 nach Impfung eingefroren und an einem späteren Zeitpunkt zur Messung des HI-Titers angewendet. Als HI-Titer ist das Reziprok der letzten Verdünnung zu verstehen, bei der nach Inkubation mit dem Hämagglutinin der jeweiligen viralen Stämme und den Serumproben eine Agglutination der roten Blutkörperchen aus Putenblut (preclinics GmbH, Potsdam) beobachtet wurde. Es wurden pro Proband pro Virusstamm Duplikate gemessen und der Mittelwert der Duplikate wurde für die Auswertung angewendet. Die Messungen wurden dankensweise von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Brunhilde Schweiger am Robert-Koch Institut durchgeführt.

3.10.1.2 *Bestimmung von Cytomegalie- und Epstein-Barr-Virus-spezifischen Antikörpern*

Serumproben der Probanden wurden am Tag 0 vor der Influenza-Impfung eingefroren und an einem späteren Zeitpunkt zur Messung des anti-CMV-IgG und anti-EBV-IgG angewendet. Die Analysen wurden vom Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH, Berlin durchgeführt. Dafür wurde das CMV bzw. EBV IgM-ELISA bzw. IgG-ELISA PCS (Medac, Wedel) auf ELISA BEP III (Siemens, Erlangen) angewendet.

3. METHODEN

3.11 Datenanalyse und Statistik

Tabelle 17 Angewendete Programmen zu Datenanalyse und Statistik

Software	Firma	Anwendung
MacsQuant	MiltenyiBiotec	Analyse und Auswertung der durchzytometrischen Daten
FlowJo Macintosh 9 - 10.0	ThreeStar Inc. (Ashland, OR, USA)	Analyse und Auswertung der durchzytometrischen Daten
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, WA, USA)	Text, Graphiken, Tabellen
Prism Software 5-6	Graphpad Software Inc. (La Jolla, CA, USA)	Graphiken Statistik
Spice Macintosh 5.1 - 5.3	NIAID - Bioinformatics and ComputationalBiosciencesBranch (Bethesda, MD, USA)	Graphiken
R 2.15		Statistik k-mean Clustering PCA

Die Graphiken dieser Arbeit wurden mit den Programmen GraphPad Prism und Spice realisiert. Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism sowie mit dem Programm R durchgeführt. Für statistische Unterschiede zwischen den beiden Probandenkohorten wurde der zweiseitige, ungepaarte Mann-Whitney Test angewendet. Für Korrelations-Analysen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient für lineare Zusammenhänge sowie der Spearman-Korrelationskoeffizient für nicht-lineare Zusammenhänge berechnet. Medianwerte und Interquartilabstand I_{50} werden in den Graphiken angezeigt. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

4. ERGEBNISSE

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen der Impfstudie PRIMAGE, den Einfluss des Alters auf die adaptive Immunantwort nach Influenzaimpfung zu erforschen. Hierzu wurden 50 Probanden geimpft und im Zeitverlauf die serologische Impfantwort (4.1) gemessen sowie verschiedene B-Zellpopulationen (4.2) charakterisiert. Es wurden weiterhin T-Zellen (4.3) phänotypisiert und der Immunstatus der Probanden anhand von latenten Virusinfektionen (4.3.3 und 4.4) erhoben.

4.1 Die serologische Impfantwort

Als erstes wurde der serologische Status der Studienteilnehmer für die drei in dem Impfstoff enthaltenen Virusstämme untersucht. Alle Teilnehmer der Studie PRIMAGE (50; alt 26/50 vs. jung 24/50) wurden mit dem kommerziell erhältlichen trivalenten inaktivierten Vakzin (TIV) gegen Influenza geimpft. Für die Saison 2011/2012 wurde mit dem Impfstoff Mutagrip® (Sanofi Pasteur) gegen Influenza A/California/7/2009 (H1N1), Influenza A/Perth/16/2009 (H3N2) und Influenza B/Brisbane/60/2008 immunisiert. Die Impfstoffe enthielten keine Adjuvantien.

Um den Erfolg der Impfung zu erfassen, wurden die Antikörper-Titer mittels Hämagglutinin-Inhibition (HI) -Assay für die drei Virusstämme untersucht. Dazu wurde Blutserum am Tag 0 vor der Impfung und am Tag 21 nach der Impfung gewonnen. Bei der Entwicklung eines ausreichenden Schutzes spricht man von Serokonversion beziehungsweise Seropositivität. Eine Serokonversion bedeutet eine vierfache Erhöhung des Antikörper-Titers am Tag 21 im Vergleich zum Tag 0. Von Seropositivität spricht man bei einem Antikörper-Titer größer gleich 40 am Tag 21 beziehungsweise größer gleich 10 am Tag 0. Probanden, die eine Serokonversion für mindestens 2 Virusstämme aufwiesen, wurden als **Responder** bezeichnet.

4. ERGEBNISSE

Alt				Jung			
ID	A/H3N2	A/H1N1	B	ID	A/H3N2	A/H1N1	B
1				3			
4				5			
6				8			
7				10			
9				14			
11				15			
12				18			
13				22			
16				23			
17				25			
19				26			
21				27			
24				30			
31				38			
32				44			
35				45			
36				47			
37				51			
39				52			
40				53			
41				55			
42				56			
43				57			
49				58			
50							
54							

Abb. 12 Die Serokonversion für die drei Influenza-Virusstämme. Serokonversion in Blau, keine Serokonversion in Rot für ältere Probanden (a) und junge Probanden (b). Man sieht eine vom Alter unabhängige Serokonversion für alle drei Virusstämme.

Die höchste Rate an Serokonversion konnte man für den Influenza Virusstamm A/Perth/H3N2 beobachten. Dabei zeigten 82% (41/50) der Probanden am Tag 21 nach TIV eine Serokonversion. Davon waren 46,3% (19/41) jung und 53,6% (22/41) alt. Am Tag 0 waren 34% (17/50) der Probanden seronegativ: 47% (8/17) in der älteren und 53% (9/17) in der jüngeren Kohorte. Der Medianwert für die Antikörper-Titer war für beide Beobachtungsgruppen nicht verschieden.

Für Influenza A/California/H1N1 zeigten nur 68% (34/50) der Probanden am Tag 21 nach TIV eine Serokonversion. Davon waren 47% (16/34) jung und 53% (18/34) alt. Am Tag 0 waren 72% (36/50) der Probanden seronegativ: 55,5% (20/36) der älteren und 44% (16/36) der jüngeren Kohorte. Für diesen Virusstamm zeigte sich ein höherer Antikörper-Titer für die jüngeren Patienten (Medianwert 1:80 vs. 1:160; p=0,036).

Für die Influenza B/Brisbane zeigten 72% (36/50) der Probanden am Tag 21 nach TIV eine Serokonversion. Davon waren 53% (19/36) jung und 47% (17/36) alt. Am Tag 0 waren 44% (22/50) der Probanden seronegativ: davon 36,3% (8/22) in der älteren und 64% (14/22) in der jüngeren Kohorte. Es waren keine Altersunterschiede jung vs. alt in der Entwicklung von Antikörper-Titer für Influenza B/Brisbane zu beobachten.

4. ERGEBNISSE

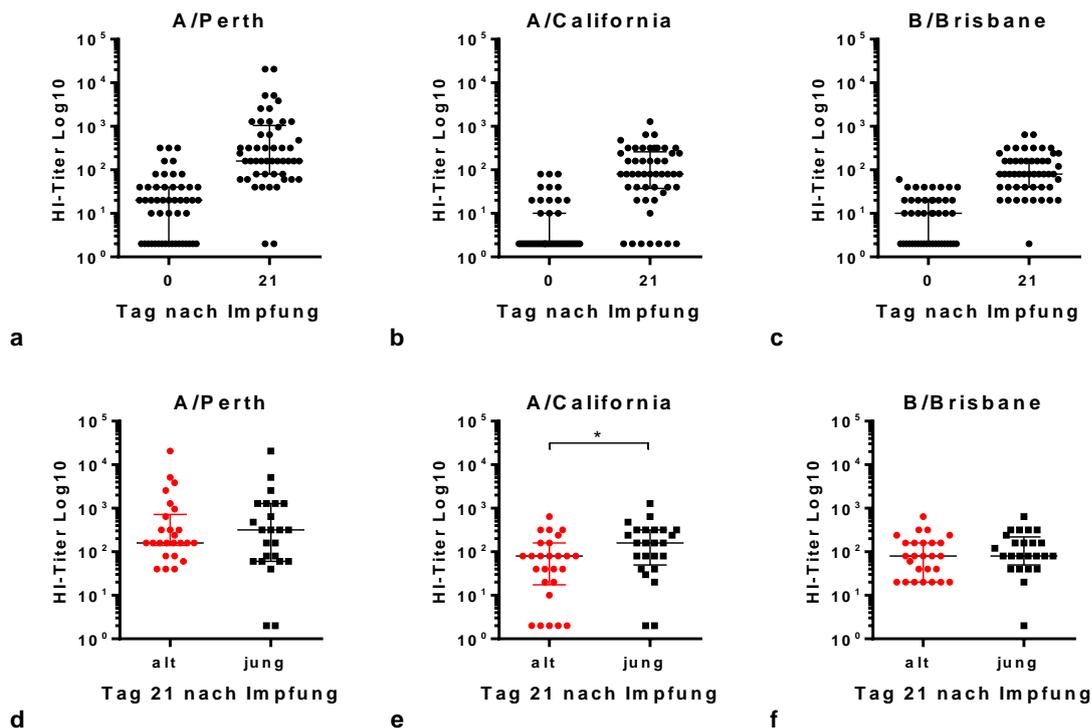


Abb. 13 HI-Titer im Serum nach Impfung mit TIV Mutagrip 2011/2012. HI-Titer am Tag 0 und Tag 21 (a-c) bzw. am Tag 21 (d-f) alt (Rot) vs. jung (Schwarz) jeweils für Influenza A/Perth/H3N2 (a; d); für Influenza A/California/H1N1 (b; e) und für Influenza B/Brisbane (c; f). Ältere Probanden entwickelten niedrigere HI-Titer für Influenza A/California/H1N1 in Vergleich zu jüngeren Probanden ($p=0,0036$).

84% der Teilnehmer waren Responder (42/50), wobei diese gleichmäßig auf die Altersgruppen verteilt waren (52,4% jung vs. 47,6% alt). Dabei waren 8% der Probanden Non-Responder für alle drei Influenza-Virusstämme und die übrigen 8% der Probanden (3 junge und 1 alt) Non-Responder für zwei der drei Virusstämme.

Zusammenfassend verzeichneten wir eine serologische Impfantwort bei 84% der Probanden, und zwar unabhängig vom Alter. Die geringste Effektivität der TIV wurde gegen Influenza A/California beobachtet. Für diesen Virusstamm konnten wir einen altersabhängigen Unterschied des HI-Titer feststellen: Ältere Probanden entwickelten einen niedrigeren Antikörper-Titer für H1N1 als die Jüngeren.

4. ERGEBNISSE

4.2 Charakterisierung der B-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der Impfantwort wurden verschiedene B-Zellpopulationen - Plasmablasten, naive B-Zellen und B-Gedächtniszellen - mittels Durchflusszytometrie nach TIV über die Zeit analysiert.

Plasmablasten wurden durch die Ko-Expression der Aktivierungsmarker CD38 und CD27 sowie die niedrige Expression von CD19 und das Fehlen von CD20 (CD19^{low}CD38⁺⁺CD27⁺⁺CD20⁻) definiert. Naive B-Zellen wurden als CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻ Zellen und B-Gedächtniszellen als CD19⁺CD20⁺IgD⁻CD27⁺ identifiziert. Die Expression von CD38 und IgD sowie die Expression von sIgM wurden dazu auf naiven B-Zellen und B-Gedächtniszellen untersucht.

Zusätzlich wurden Ki67⁺ naive B-Zellen und Ki67⁺ B-Gedächtniszellen quantifiziert.

4.2.1 Plasmablasten

Anhand der Kinetik kann man einen deutlichen Anstieg der Plasmablasten am Tag 7 nach der Immunisierung erkennen, um am Tag 10 nach TIV auf die Ausgangswerte zurückzukehren. Dieser Verlauf zeigt keine Altersunterschiede. Unterschiede lagen jedoch in der Anstiegsrate vor: Bei jüngeren Probanden ist der prozentuale Anteil der Plasmablasten an den CD19⁺ B-Zellen höher als bei den älteren Probanden (Abb. 14).

4. ERGEBNISSE

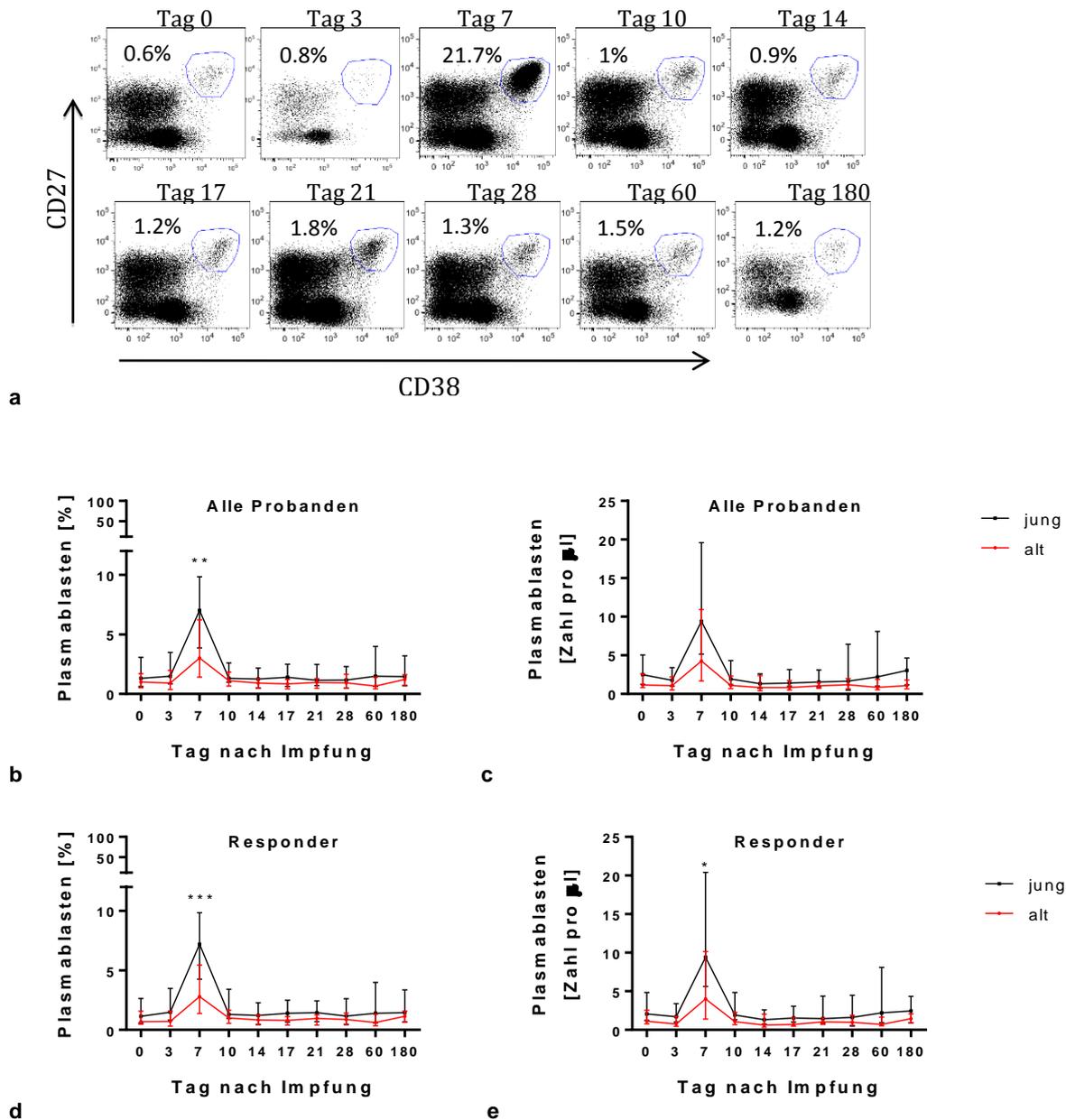
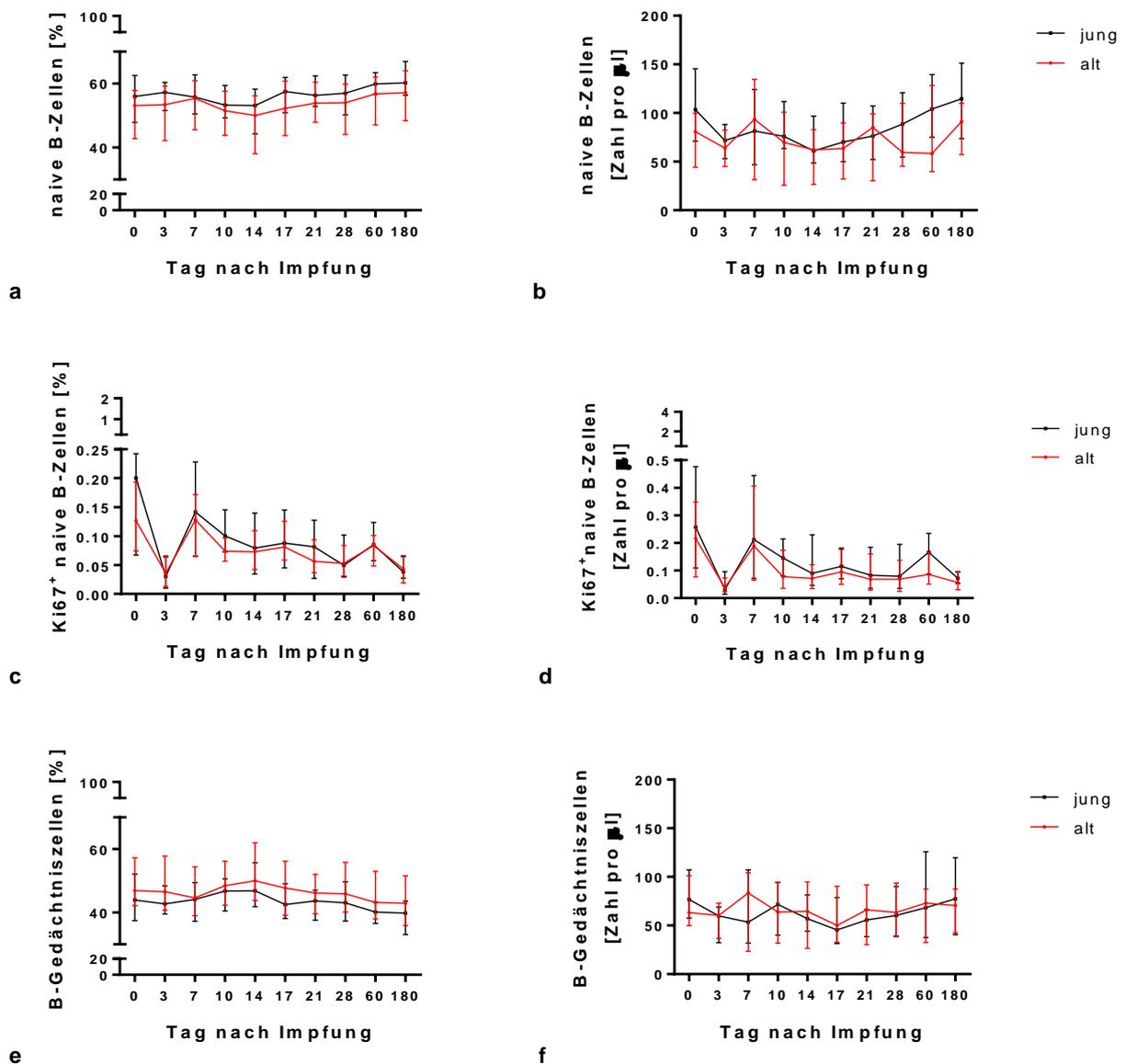


Abb. 14 Plasmablasten-Kinetik im peripheren Blut nach TIV. Erhöhte Frequenzrate an Plasmablasten am Tag 7 nach TIV anhand eines repräsentativen Probanden (a). Plasmablasten wurden als $CD19^{low}CD27^+CD38^+CD20^-$ Zellen definiert. Der relative Anteil (b) sowie absolute Zahlen (c) der Plasmablasten innerhalb der $CD19^+$ Zellen an den verschiedenen Tagen nach Impfung zeigen einen Anstieg dieser Zellpopulation am Tag 7 nach TIV. Jüngere Probanden haben eine höhere Plasmablasten-Frequenzen am Tag 7 als ältere Probanden ($p = 0,002$). Innerhalb der Responder-Gruppe (d, e) zeigt sich ein relativer (d) und absoluter (e) Unterschied bei den Plasmablasten zwischen alten und jungen Probanden ($p < 0,0001$ und $p = 0,01$).

4. ERGEBNISSE

4.2.2 CD20⁺ B-Zellen

CD20⁺ B-Zellen wurden anhand der Expression von IgD, CD27, IgM und CD38 in naive B-Zellen und B-Gedächtniszellen unterteilt (s.3.6). Sowohl naive B-Zellen als auch B-Gedächtniszellen zeigten keinen wesentlichen Schwankungen in dem Zeitraum nach TIV. Auch Altersunterschiede in der Kinetik dieser Zellpopulationen konnten nicht beobachtet werden. Die Ki67-Expression zeigt sich deutlich erhöht für die Gedächtniszellen im Vergleich zu den naiven B-Zellen. Am Tag 3 nach TIV registrierten wir eine Abnahme der Ki67⁺ B-Zellen beider Zellpopulationen im peripheren Blut, um am Tag 7 auf den Ausgangswert zurückzukehren. Altersunterschiede konnten weder für Ki67⁺ naiven B-Zellen noch Ki67⁺ B-Gedächtniszellen beobachtet werden (Abb. 15).



4. ERGEBNISSE

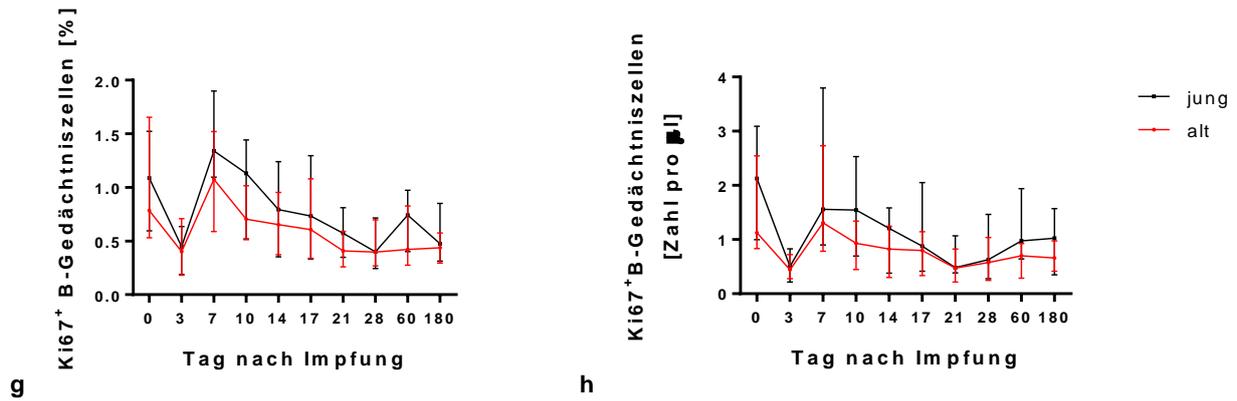


Abb. 15 Zeitlicher Verlauf von naiven B-Zellen und Gedächtniszellen nach TIV. Naive B-Zellen (IgD⁺CD27⁻) als Summe der mittels *k-mean* entstandenen Cluster 1, 4 und 6 innerhalb der CD20⁺ B-Zellen als absolute Zahlen (**a**; **b**). Gedächtniszellen als Summe der mittels *k-mean* entstandenen Cluster 2, 3, 7, 8, 9 und 5 innerhalb der CD20⁺ B-Zellen als absolute Zahlen (**e**; **f**). Mittels FlowJo-Analysen wurden CD19⁺ Zellen identifiziert. Innerhalb der CD19⁺ Zellen wurden dann nur die CD20 positive Zellen weiterhin betrachtet. Diese wurden dann mittels *k-mean* anhand ihrer Expression von IgD, CD27, CD38 und IgM in neun Cluster unterteilt. Die Cluster wurden dann anhand ähnlicher Eigenschaften zusammengesetzt und die zwei Hauptpopulationen - naive B-Zellen und Gedächtniszellen - identifiziert. Kein Altersunterschied zwischen jung (Schwarz) vs. alt (Rot). (**c-d**; **g-h**) Ki67-Expression der naiven B-Zellen (**c-d**) sowie der Gedächtniszellen (**g-h**) in Vergleich alt (Rot) vs. jung (Schwarz). Der prozentuale Anteil sowie die Anzahl der beiden Zellpopulationen sinken am Tag 3 nach TIV, um sich dann wieder am Tag 7 zu normalisieren.

4. ERGEBNISSE

4.3 Charakterisierung der T-Zellen

T-Zellen wurden anhand ihrer Reifungs- und Differenzierungsmerkmale in Abhängigkeit vom Alter charakterisiert. Am Tag 28 nach Impfung wurden aus Blutproben von 47 Probanden (47/50: 25 in der älteren Gruppe und 22 in der jüngeren Gruppe) die T-Zell Populationen analysiert.

Dem *Immune Risk Profile* - IRP – zufolge kumuliert im Alter die Zahl der ausdifferenzierten CD8⁺ T-Zellen bei sinkender CD4⁺ T-Zell-Anzahl, sodass einem Verhältnis CD4⁺:CD8⁺ < 1 ein erhöhtes Risiko zugeschrieben wird. Die Ratio CD4⁺:CD8⁺ war im Gegensatz dazu in der untersuchten Kohorte bei den Älteren höher als bei den Jüngeren (2,8 vs. 2,0, p<0,05) und dabei jeweils größer eins. Ältere Probanden zeigten einen höheren Anteil an CD4⁺ T-Zellen (Medianwert 70 vs. 64, p=0,01) und der Anteil (Medianwert 24 vs. 32, p=0,005) wie die Anzahl (Medianwert 230 vs. 403, p<0,001) von CD8⁺ T-Zellen war niedriger bei den Alten im Vergleich zu den Jungen (Abb. 16 a-b).

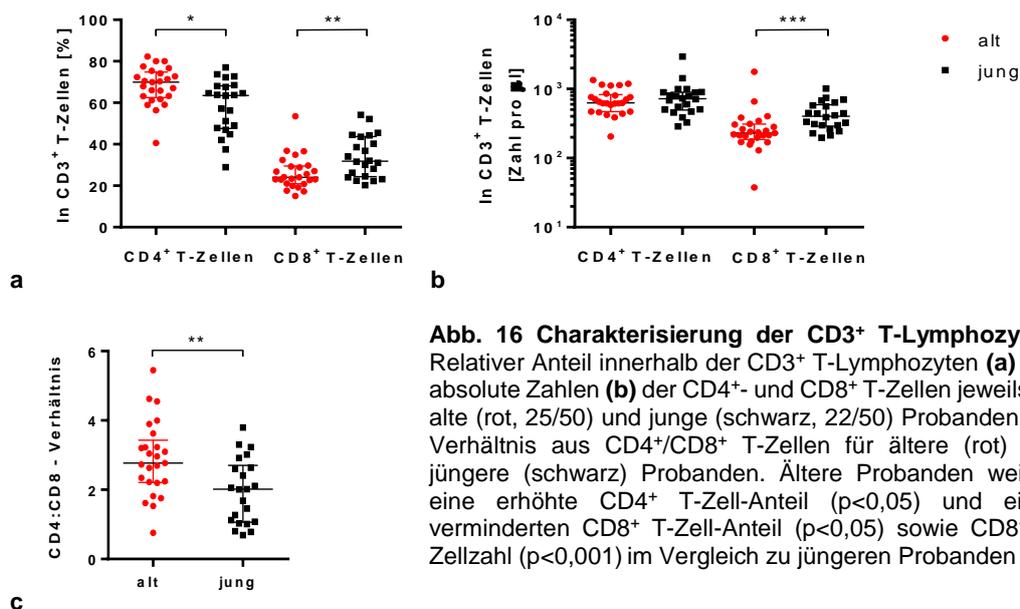


Abb. 16 Charakterisierung der CD3⁺ T-Lymphozyten. Relativer Anteil innerhalb der CD3⁺ T-Lymphozyten (a) und absolute Zahlen (b) der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen jeweils für alte (rot, 25/50) und junge (schwarz, 22/50) Probanden. (c) Verhältnis aus CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen für ältere (rot) und jüngere (schwarz) Probanden. Ältere Probanden weisen eine erhöhte CD4⁺ T-Zell-Anteil (p<0,05) und einen verminderten CD8⁺ T-Zell-Anteil (p<0,05) sowie CD8⁺ T-Zellzahl (p<0,001) im Vergleich zu jüngeren Probanden auf.

Um das immunologische Alter der Probanden einschätzen zu können, wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen phänotypisch anhand bestimmter Oberflächenmarker klassifiziert.

Anhand der Expression der Rezeptoren CCR7 und CD45RA wurden naive T-Zellen und verschiedene Differenzierungsstadien der Gedächtniszellen identifiziert: naive Zellen T_{NV}: CCR7⁺CD45RA⁺; T-Gedächtniszellen T_{CM}: CCR7⁺CD45RA⁻; Effektor-Gedächtniszellen T_{EM}: CCR7⁻CD45RA⁻ und enddifferenzierte Gedächtniszellen T_{EMRA}: CCR7⁻CD45RA⁺. Weitere Oberflächenmarker wie KLRG1, NKG2D, CD57 und CD244 sowie CD27 wurden zur weiteren Phänotypisierung der T-Zellen untersucht.

4. ERGEBNISSE

4.3.1 CD4⁺ T-Zellen

Die Expression von CD45RA und CCR7 auf CD4⁺ T-Zellen (T_{NV} : CCR7⁺CD45RA⁺; T_{CM} : CCR7⁺CD45RA⁻; T_{EM} : CCR7⁻CD45RA⁻; T_{EMRA} : CCR7⁻CD45RA⁺) wurde zwischen Alt und Jung verglichen. Der relative Anteil naiver T-Zellen an den CD4⁺ T-Zellen war bei jüngeren Probanden höher als bei älteren Probanden (Medianwert 56 vs. 60, $p < 0,05$). T-Gedächtniszellen hingegen waren bei den älteren Probanden vermehrt zu finden (Medianwert 32 vs. 27, $p < 0,05$). Keine Unterschiede waren bei den Effektor-Gedächtniszellen sowie den T_{EMRA} zu verzeichnen.

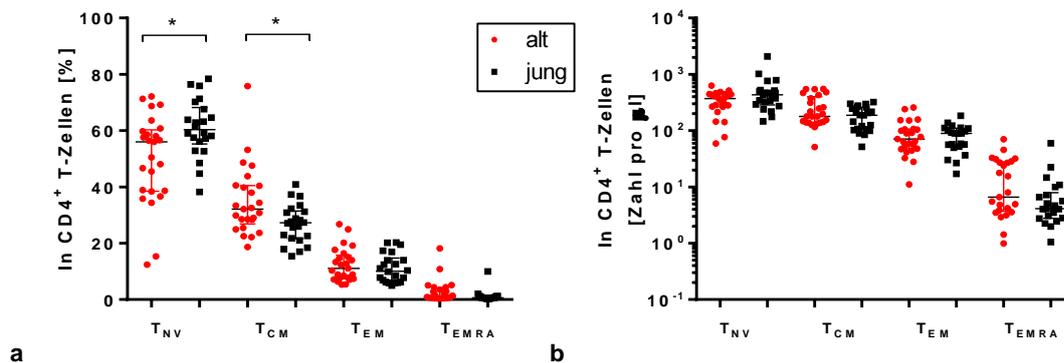


Abb. 17 Expression von CCR7 und CD45RA auf CD4⁺ T-Zellen. Relativer Anteil der naiven T-Zellen und Gedächtniszellen (T_{NV} : CCR7⁺CD45RA⁺; T_{CM} : CCR7⁺CD45RA⁻; T_{EM} : CCR7⁻CD45RA⁻; T_{EMRA} : CCR7⁻CD45RA⁺) an den CD4⁺ T-Zellen (a) und absolute Zahlen in Log₁₀ (b). Ältere Probanden (Rot) weisen im Vergleich zu jüngeren Probanden (schwarz) einen geringeren Anteil naiver T-Zellen auf (T_{NV} : CCR7⁺CD45RA⁺; $p = 0,016$). Der Anteil der T-Gedächtniszellen ist bei älteren erhöht im Vergleich zu jüngeren Probanden (T_{CM} : CCR7⁺CD45RA⁻; $p = 0,012$). Medianwerte und Interquartilabstand werden angezeigt.

Die weitere Phänotypisierung der CD4⁺ T-Zellen wurde anhand der o.g. Marker durchgeführt. Die Expression von KLRG1, NKG2D, CD244, CD27 und CD57 wurde auf allen CD4⁺ T-Zellen analysiert und im Vergleich alt vs. jung dargestellt (Abb. 18).

Interessanterweise zeigte sich eine höhere Expression von CD244 (Anzahl: Medianwert 26 vs. 7, $p < 0,05$) und CD57 (relativer Anteil: Medianwert 6 vs. 1, $p < 0,001$; Anzahl: Medianwert 46 vs. 10, $p < 0,001$) auf CD4⁺ T-Zellen älterer Menschen. Zudem fiel eine verminderte Expression von CD27 auf CD4⁺ T-Zellen der älteren Probanden auf (relativer Anteil: Medianwert 87 vs. 95, $p < 0,05$).

4. ERGEBNISSE

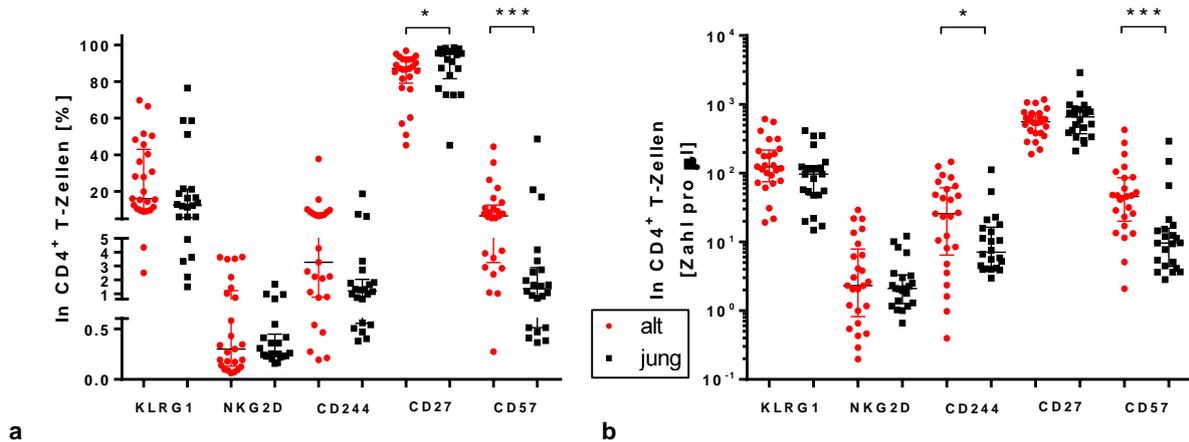


Abb. 18 Expression der Oberflächenmarker KLRG1, NKG2D, CD244, CD27, CD57 auf CD4⁺ T-Zellen. Relativer Anteil an CD4⁺CD3⁺T-Lymphozyten (a) sowie die Gesamtzahl in Log10 (b) der KLRG1, NKG2D, CD244, CD27, CD57 exprimierenden Zellen. Ältere (Rot) weisen eine höhere Anzahl ($p=0,04$) von CD244⁺ T-Zellen und CD57⁺ T-Zellen (relativer Anteil $p=0,0005$ bzw. absolute Zahl $p=0,0003$) im Vergleich zu jüngeren Probanden (Schwarz) auf. CD27⁺CD4⁺ T-Lymphozyten sind bei der Älteren weniger vorhanden als bei der jüngeren Kohorte ($p= 0,02$).

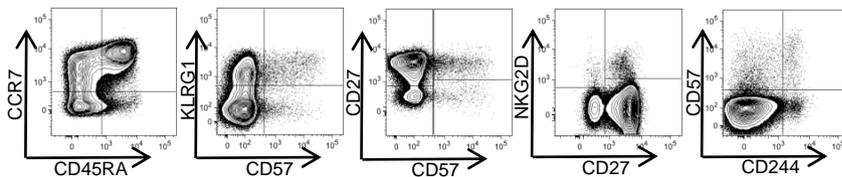


Abb. 19 Gating Strategie der Expression von CCR7, CD45RA, KLRG1, CD57, NKG2D, CD244, CD27 auf CD4⁺ T-Helfer-Zellen. Nach Ausschluss von toten Zellen (durch PI) und NK-Zellen (durch anti-CD56), wurden CD4 Zellen innerhalb der CD3 T-Lymphozyten identifiziert und die jeweilige Marker analysiert. Beispiel eines jungen Probanden.

4.3.2 CD8⁺ T-Zellen

So wie für CD4⁺ T-Zellen ist es möglich anhand derselben Marker CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten zu klassifizieren. Um naive CD8⁺ T-Zellen von Gedächtniszellen zu unterscheiden, wurden die Populationen nach der Expression von CD45RA und CCR7 unterteilt (T_{NV}: CCR7⁺CD45RA⁺; T_{CM}: CCR7⁺CD45RA⁻; T_{EM}: CCR7⁻CD45RA⁻; T_{EMRA}: CCR7⁻CD45RA⁺).

Wie bei den CD4⁺ T-Zellen, waren die naiven CD8⁺ T-Zellen bei den Alten im Vergleich zu den Jungen vermindert (Medianwert 27 vs. 63, $p<0,0001$). Dieser Unterschied bestand sowohl relativ als auch absolut (Medianwert 71 vs. 226, $p<0,0001$). Das Gedächtniszellkompartiment war hingegen bei älteren Probanden größer als bei den jüngeren Probanden. Der Anteil der T-Gedächtniszellen (T_{CM}: CCR7⁺CD45RA⁻; Medianwert 15 vs. 7, $p<0,0001$) sowie der Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}: CCR7⁻CD45RA⁻; Medianwert 30 vs. 15, $p=0,001$) war in der älteren Gruppe größer. Die Expansion des Gedächtniszellkompartiments der CD8⁺ T-Zellen sowie die Abnahme des naiven Anteils im Alter werden in Abb. 20 als Tortendiagramm illustriert.

4. ERGEBNISSE

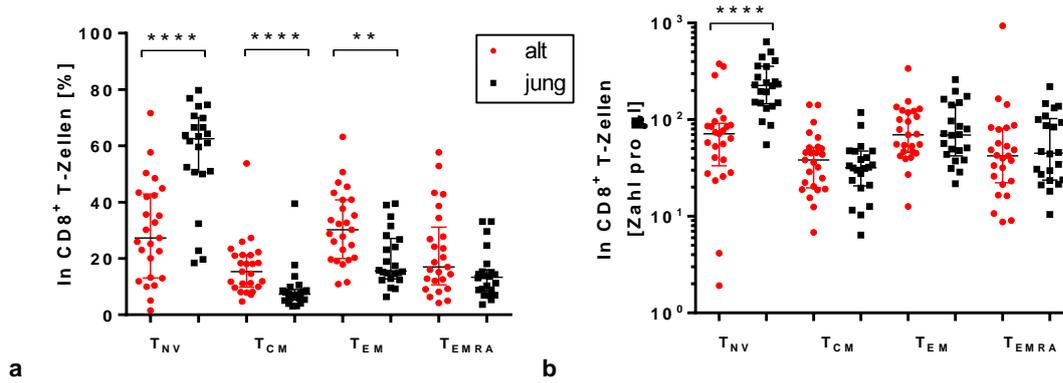


Abb. 20 Expression von CCR7 und CD45RA auf CD8⁺ T-Zellen. Relativer Anteil an den CD8 T-Zellen (a) und absolute Zahlen in Log10 (b) der naiven T-Zellen und Gedächtniszellen (T_{NV}: CCR7⁺CD45RA⁺; T_{CM}: CCR7⁺CD45RA⁻; T_{EM}: CCR7⁻CD45RA⁻; T_{EMRA}: CCR7⁻CD45RA⁺). Ältere Probanden (rote Kreise) weisen im Vergleich zu jungen Probanden (schwarze Vierecke) einen geringeren Anteil naiver T-Zellen (T_{NV}: CCR7⁺CD45RA⁺; p<0,0001) und einen größeren Anteil von Gedächtniszellen (sowohl T_{CM} CCR7⁺CD45RA⁻; p<0,0001 als auch für die T_{EM} CD45RA⁻CCR7⁻; p=0,001) auf (a). In absoluten Zahlen zeigen sich die naiven Zellen bei Alten vermindert im Vergleich zu Jungen (T_{NV}: CCR7⁺CD45RA⁺; p<0,0001).

Zur weiteren Phänotypisierung der CD8⁺ T-Zellen wurde die Expression von KLRG1, NKG2D, CD244, CD27 und CD57 analysiert und im Vergleich alt vs. jung aufgetragen.

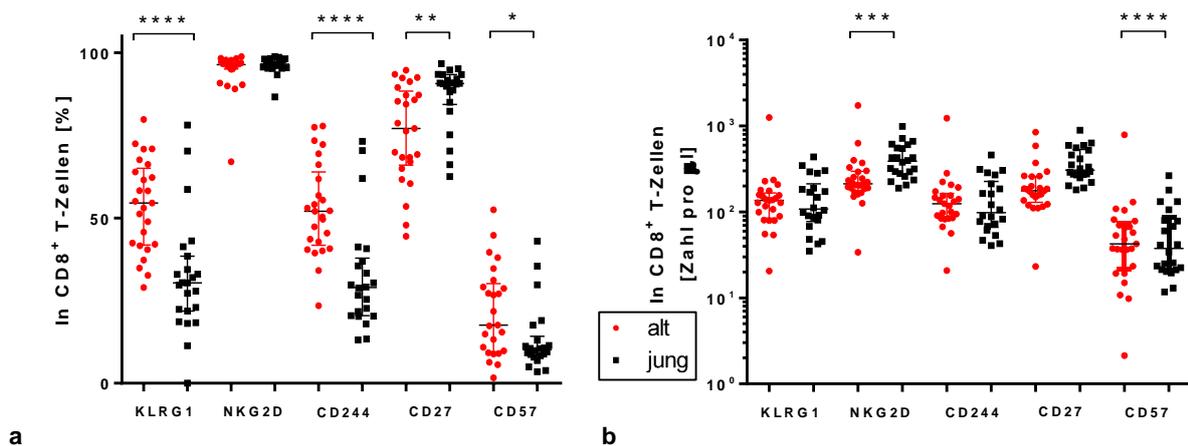


Abb. 21 Expression der Oberflächemarker KLRG1, NKG2D, CD244, CD27, CD57 auf CD8 T-Zellen. Relativer Anteil der CD8⁺CD3⁺T-Lymphozyten (a) und Gesamtzahl in Log10 (b) der KLRG1, NKG2D, CD244, CD27, CD57 exprimierenden Zellen. Der Anteil der KLRG1⁺CD8⁺, CD244⁺CD8⁺, CD57⁺CD8⁺ und CD27⁺CD8⁺ Zellen sind bei den älteren Probanden (rote Kreise) höher als bei den jüngeren Probanden (schwarze Vierecke) (KLRG1 p<0,0001; CD244 p<0,0001; CD27 p=0,004; CD57 p=0,026), während NKG2D auf nahezu allen CD8 T-Zellen exprimiert ist (a). Die Anzahl der NKG2D⁺CD8⁺ und CD27⁺CD8⁺ Zellen ist bei den jüngeren höher als bei den älteren Probanden (p=0,0003 und p<0,0001).

Die Zunahme ausdifferenzierter CD8⁺ T-Zellen im Alter wurde durch die erhöhte Expression von KLRG1 (Medianwert 54 vs. 30, p<0,0001), CD244 (Medianwert 52 vs. 29, p<0,0001) und CD57 (Medianwert 18 vs. 10, p<0,05) bei den älteren Probanden im Vergleich zu der jüngeren Kohorte bestätigt. Auch das Fehlen des TNF-Rezeptors CD27 auf CD8⁺ T-Zellen vieler älteren Probanden zeigte sowohl prozentual (Medianwert 77 vs. 90, p<0,01) als auch absolut (Medianwert 176 vs. 306, p<0,0001) altersabhängige Unterschiede. In absoluten Zahlen bestätigten sich einmal mehr die anhand der CD8-

4. ERGEBNISSE

Expression erhobenen Resultate: Ältere Probanden weisen weniger CD8⁺ T-Zellen als jüngere Probanden auf.

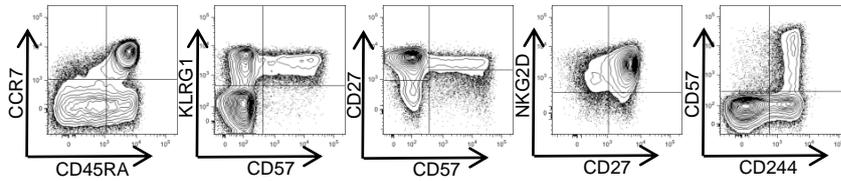


Abb. 22 Gating Strategie der Expression von CCR7, CD45RA, KLRG1, CD57, NKG2D, CD244, CD27 auf CD8⁺ T-Zellen. Nach Ausschluss von toten Zellen mittels PI und NK-Zellen durch CD56, wurden CD8⁺ T-Zellen innerhalb der CD3⁺ T-Lymphozyten identifiziert und die jeweilige Marker analysiert. Beispiel eines repräsentativen jungen Probanden.

Alterungsprozesse des Immunsystems sind in erster Linie auf T-Zellen zu beobachten [19]. Sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Zellen konnten Oberflächenmarker identifiziert werden, die auf Differenzierung und Erschöpfung dieser Zellpopulationen vor allem bei den älteren Probanden hinweisen. Naive T-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺, waren bei den älteren Probanden weniger vorhanden; dagegen konnte man die Expansion des Gedächtniszellkompartiments beobachten. Seneszenzmarker wie NKG2D und CD57 waren auf mehr CD4⁺ T-Zellen bei den Älteren exprimiert. Auch KLRG1⁺, CD244⁺, CD57⁺, CD27⁻ CD8⁺ T-Zellen waren in der älteren Kohorte vermehrt vertreten.

4.3.3 Antigen-spezifische T-Zellen

Um die Wirkung latenter Virusinfektionen auf den Alterungsprozess zu objektivieren, erfolgten Analysen von Antigen-spezifischen T-Zellen für die Herpesviren Cytomegalievirus (CMV) und Epstein-Barr-Virus (EBV). Zur Charakterisierung der CMV-spezifischen T-Zellen wurden Blutproben mit zwei CMV immundominanten viralen Peptiden stimuliert: das immediate-early-1 (IE1) und das Phosphoprotein 65 (pp65). Zur Charakterisierung der EBV-spezifischen T-Zellen wurden die Proben mit einem Peptidgemisch aus zwei dominanten EBV-Epitopen stimuliert: dem lytischen Protein BZLF1 und dem in der latenten Phase dominierenden Protein EBNA1.

Hierfür standen Blutproben von 46 Probanden (25 älteren und 21 jüngeren Probanden) zur Verfügung. Weiterhin erfolgte eine serologische Analyse, die im Rahmen der Routinediagnostik der Labor Berlin GmbH durchgeführt wurde (Anti-EBV-IgM, Anti-EBV-IgG sowie Anti-CMV-IgM und Anti-CMV-IgG).

4.3.3.1 Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺T-Zellen wurden mit den viralen Peptiden (CMV-pp65, CMV-IE1 und EBV - BZLF1+EBNA1) stimuliert und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD40L

4. ERGEBNISSE

und vier Zytokine (Interleukin-2, Interferon-gamma, Tumor-Nekrose-Faktor alpha und Interleukin-17) analysiert. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit den Superantigenen SEB (Staphylococcal enterotoxin B) und TSST₁ (Toxic Shock Syndrome Toxin 1) und als Negativkontrolle PBS. Zur Identifizierung aktivierter Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen und zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse kamen in der Auswertung die folgenden Kriterien zur Geltung: sichtbarer Unterschied zwischen Antigen-spezifischen Zellen und Negativkontrolle, deutlich erkennbare positive Population, Frequenzen > 0,01% oder mindestens 5 *Dots* als CD4⁺CD40L⁺ Zellpopulation.

4. ERGEBNISSE

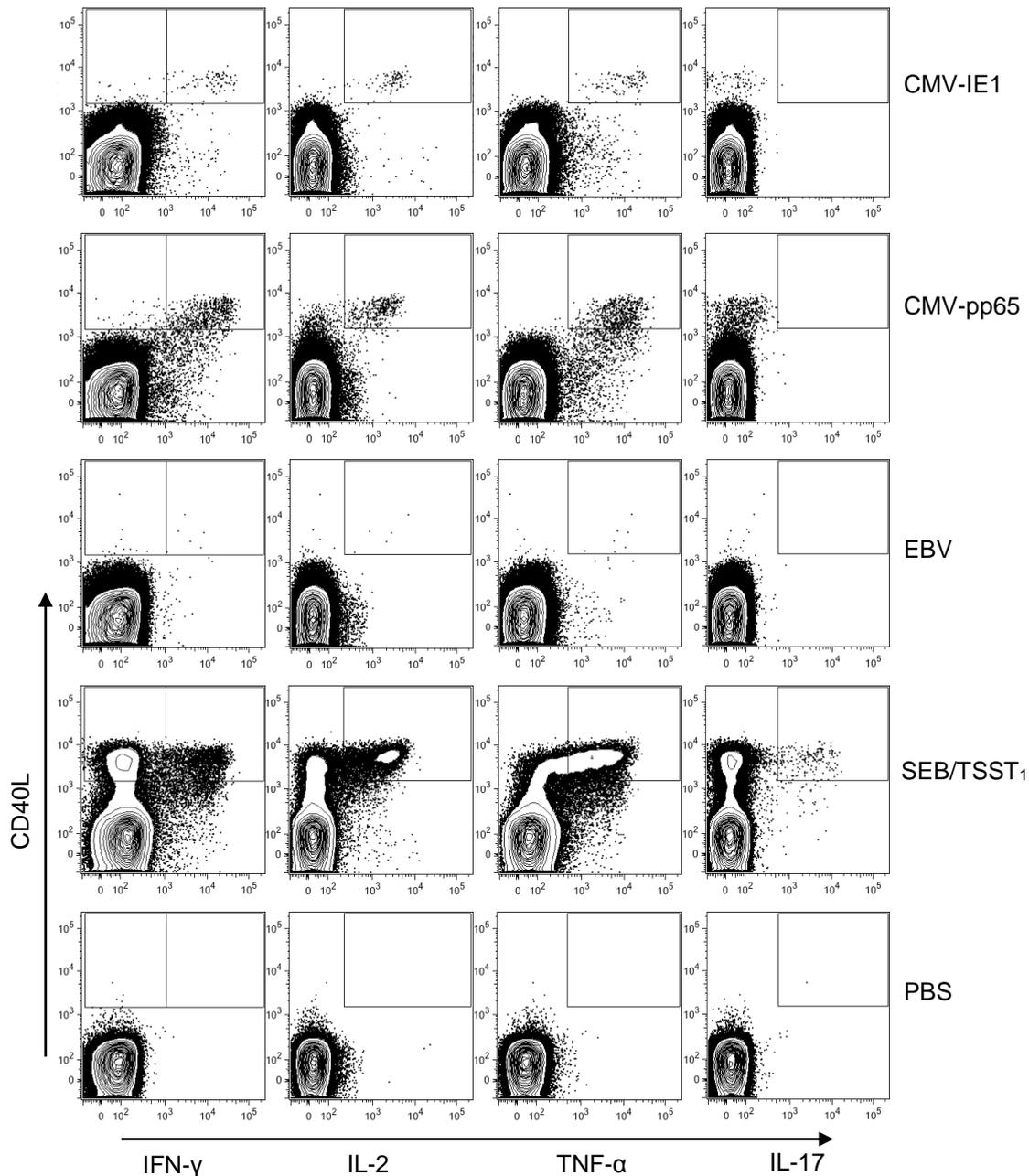


Abb. 23 Contour-Plot der Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Nach Ausschluss von toten Zellen, CD19 B-Zellen und CD14 dendritischen Zellen, wurden CD4 T-Zellen innerhalb der CD3⁺ T Zellen identifiziert und die CD40L⁺ Zellen durch die Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-17 charakterisiert. T-Zellen wurden in Vollblut für 6 Stunden mit den folgenden Virus-Proteinen stimuliert: CMV- IE1, CMV-pp65; EBV-BZLF1+EBNA1. Es wurde mit SEB+TSST₁ als Positivkontrolle stimuliert und zur Negativkontrolle PBS hinzugegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel eines alten Probanden.

32% (8/25) der Probanden in der älteren Gruppe (25/46) und 33% (7/21) der jungen Probanden (21/46) wiesen CMV-IE1 spezifische CD4⁺ T-Zellen auf. CMV-pp65-spezifische CD4⁺ T-Zellen konnten bei 60% (15/25) der älteren Probanden und 33% (7/21) der jüngeren Probanden stimuliert werden. Eine EBV-spezifische CD4⁺ T-Zell Antwort zeigten 16% (4/25) der älteren Probanden und 29% (6/21) der jüngeren Probanden (s. Abb. 24).

4. ERGEBNISSE

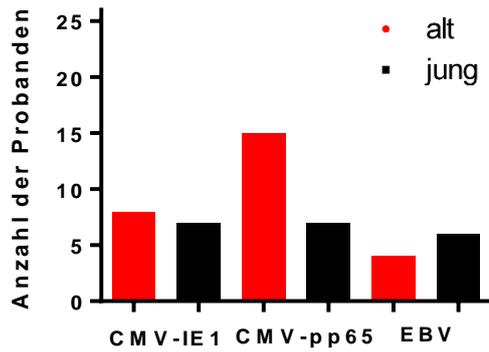


Abb. 24 Anzahl der CMV- und EBV-positiven Probanden. Anzahl der Probanden, bei denen eine spezifische CD4⁺ T-Zell-Aktivierung nach Stimulation mit CMV-IE1, CMV-pp65 und EBV-Peptiden beobachtet wurde.

Weiterhin wurden Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen qualitativ untersucht. Die Expression der Zytokine Interferon gamma (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2), Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) und Interleukin-17 (IL-17) wurde nach Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mit CMV-IE1, CMV-pp65, EBV (EBNA+BZLF1) und mit einem unspezifischen Stimulus (SEB+TSST₁) analysiert und im Vergleich alt vs. jung beobachtet (Abb. 25).

4. ERGEBNISSE

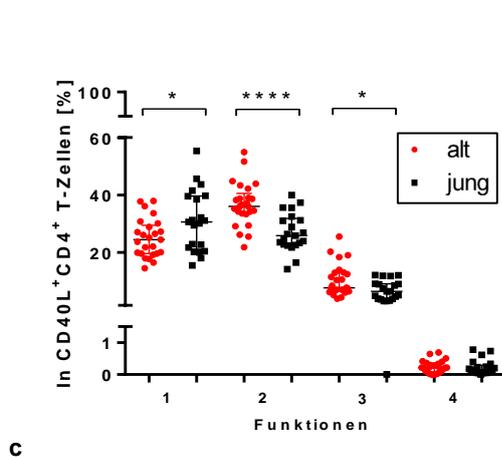
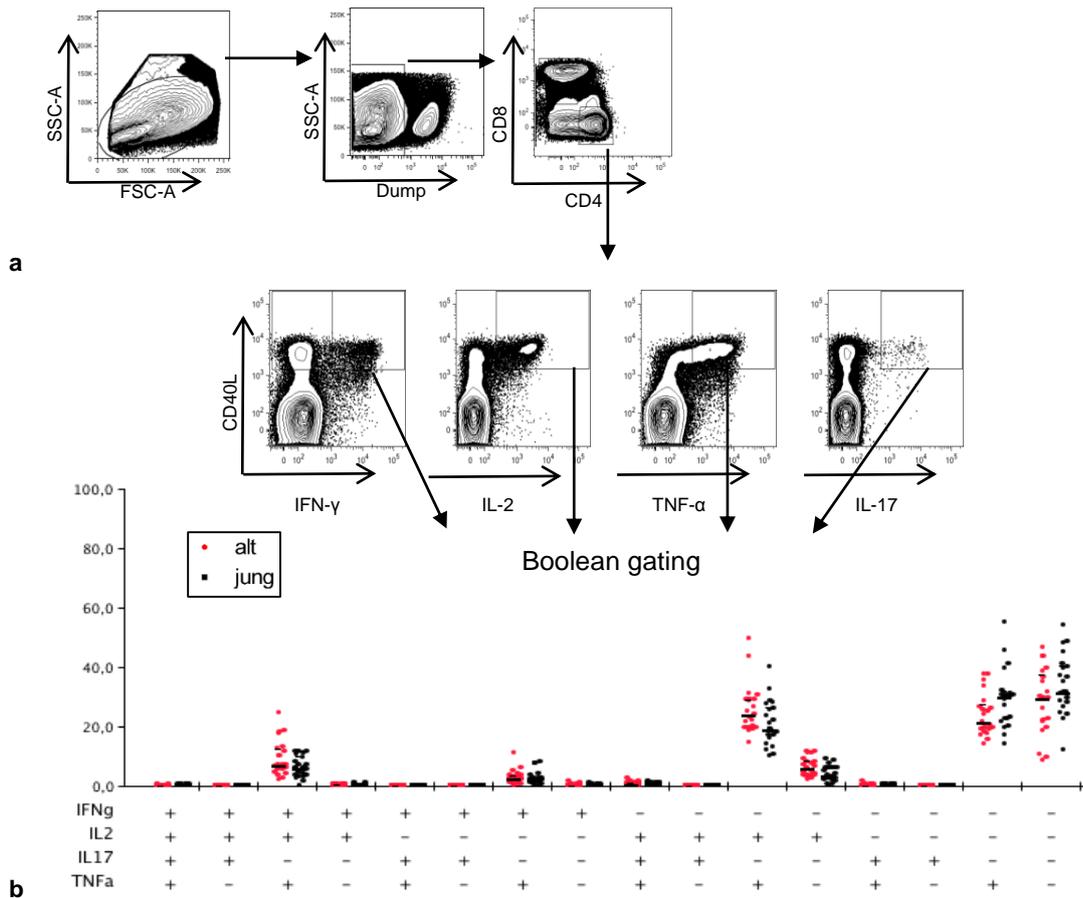


Abb. 25 Charakterisierung der Polyfunktionalität von CD4⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie. (a) Typische Gating-Strategie zur Identifizierung von aktivierten CD4⁺ T-Zellen sowie CD40L⁺IFN- γ ⁺, CD40L⁺IL2⁺, CD40L⁺TNF- α ⁺, CD40L⁺IL17⁺ CD4⁺ T-Zellen. **(b)** Innerhalb der aktivierten CD4⁺ T-Zellen wurde die Expression der Zytokine nach unspezifischen Stimuli mittels SEB + TSST₁ durch Boolean Gating analysiert und die Polyfunktionalität der Zellen dargestellt. Dabei wurden ältere (rot) mit jüngeren Probanden (schwarz) verglichen. **(c)** Relativer Anteil der multifunktionalen CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen im Vergleich alt (rot) vs. jung (schwarz): mit 4 werden die Zellen bezeichnet, die alle vier gemessenen Zytokine (IFN- γ , IL2, TNF- α und IL17) synthetisieren, mit 3 die Zellen, die drei von den vier gemessenen Zytokine synthetisieren, mit 2 die Doppelproduzenten und mit 1 die Einzelproduzenten. Medianwerte und Interquartilabstände werden angezeigt.

Die Qualität der CD4⁺ T-Zell Antwort auf einen unspezifischen, starken Stimulus (SEB+TSST₁) zeigte altersbedingte Unterschiede: ältere Probanden zeigten mehr multifunktionale CD4⁺ T-Zellen als jüngere. IFN- γ ⁺IL2⁺TNF- α ⁺ CD4⁺ T-Zellen sowie Doppelproduzenten (IL2⁺TNF- α ⁺ und IFN- γ ⁺TNF- α ⁺) sind in höheren Frequenzen bei den älteren Probanden als bei den jüngeren Probanden vorhanden (jeweils Medianwert 8 vs 6, $p < 0,05$ und Medianwert 36 vs. 26, $p < 0,0001$) (Abb. 25). Jüngere Probanden hatten einen höheren Anteil an Einzelproduzenten (Medianwert 24 vs. 31, $p < 0,05$). Dies war besonders deutlich beim Anteil der TNF- α sezernierenden Zellen.

4. ERGEBNISSE

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen beobachtet (Abb. 26): Polyfunktionale CMV-IE1-spezifische CD4⁺ T-Zellen waren häufiger bei der älteren Probandengruppe. Dabei war der Anteil von Tripelproduzenten für IFN- γ , IL-2 und TNF- α bei den älteren Probanden höher als bei den Jüngeren (Medianwert 52 vs. 25, $p < 0,05$). Die Doppelproduzenten (IFN- γ +TNF- α + und IL2+TNF- α +) waren dagegen bei den jüngeren Probanden stärker exprimiert (Medianwert 26 vs. 43, $p = 0,009$).

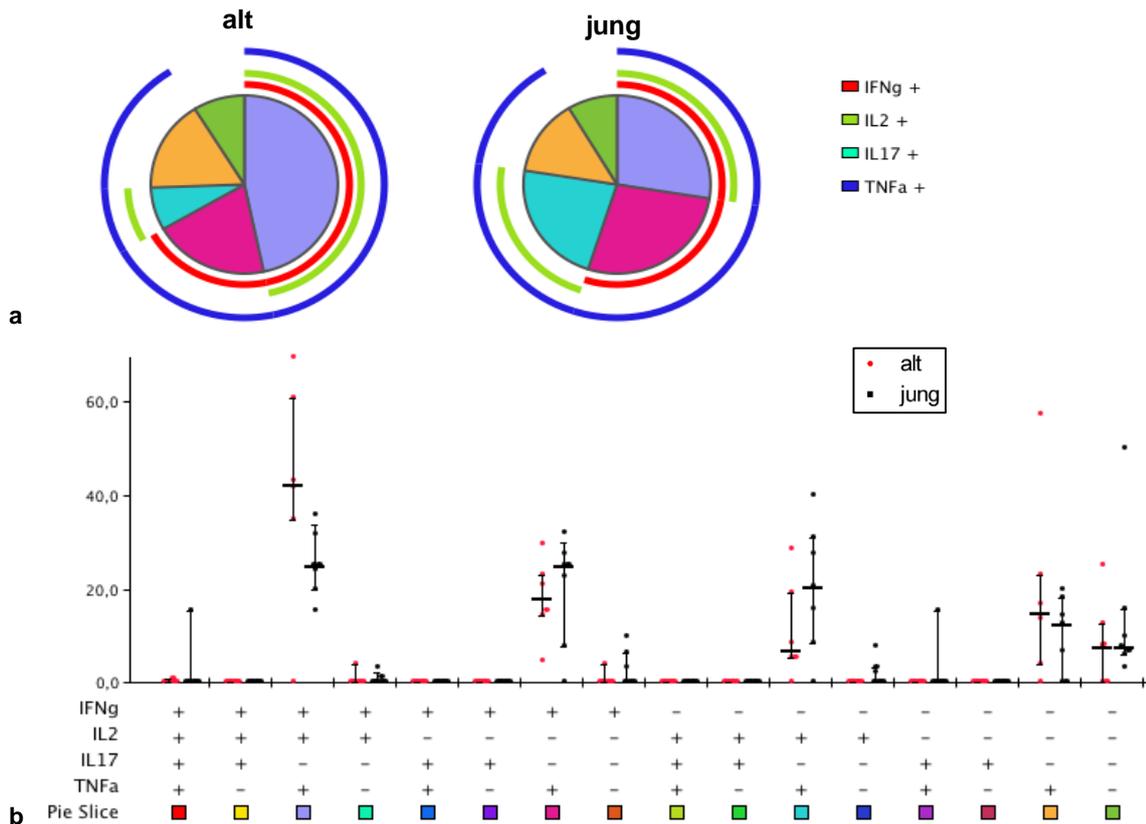
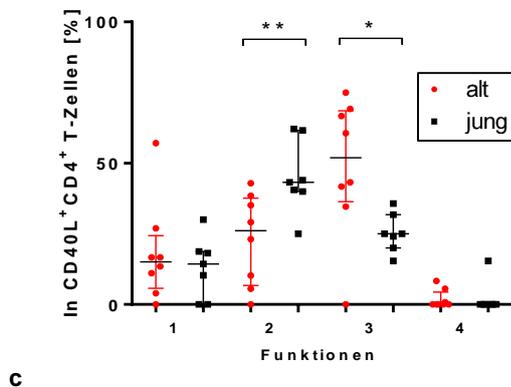


Abb. 26 Charakterisierung der Polyfunktionalität von CMV-IE1 CD4⁺ T-Zellen. (a) Tortendiagramm der Zytokinexpression von CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit CMV-IE1 im Vergleich Alt vs. Jung. (b) Frequenzen der multifunktionalen CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen im Vergleich ältere Probanden (rot) zu jüngeren Probanden (schwarz). Medianwerte werden in dem Tortendiagramm und als schwarze Linie in dem Streudiagramm angezeigt. (c) Prozenten der multifunktionalen CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen im Vergleich Alt (rot) vs. Jung (schwarz). Mit 4 werden die Zellen bezeichnet, die alle vier gemessenen Zytokine (IFN- γ , IL2, TNF- α und IL17) synthetisieren, mit 3 die Zellen, die drei von vier gemessenen Zytokinen synthetisieren, mit 2 die Doppelproduzenten und mit 1 die Einzelproduzenten. Medianwerte und Interquartilabstände werden angezeigt.



Bei den Probanden, die eine spezifische CD4⁺ T-Zell-Antwort auf den Stimulus mit pp65 und EBV aufwiesen, zeigte sich eine ähnliche Tendenz im Sinne einer größeren

4. ERGEBNISSE

Polyfunktionalität (vor allem von Tripelproduzenten) der spezifischen CD4⁺ T-Zellen bei den älteren Probanden (Daten nicht gezeigt).

In der Zusammenschau dieser Daten zeigen ältere Menschen eine höhere Frequenz an polyfunktionalen CD4⁺ T-Zellen. Dies konnte sowohl für die Aktivierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen als auch für die Reaktion auf einen unspezifischen Stimulus gezeigt werden.

4.3.3.1.2 Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen

Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden in gleicher Weise analysiert: Als Indikator für die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen wurde die intrazelluläre Synthese von IFN- γ nach Stimulation mit viralen Peptiden (CMV-IE1, CMV-pp65 und EBV EBNA+BFLZ1) durchflusszytometrisch analysiert. Wieder kamen Kriterien in der Auswertung zur Geltung, die eine zuverlässige Identifikation von stimulierten Antigen-spezifischen Zellen bei Vermeidung falsch positiver Ergebnisse zum Ziel hatten: Sichtbarer Unterschied zwischen stimulierten Proben und Negativkontrolle, deutlich erkennbare positive Population, Frequenzen > 0,01% oder mindestens 5 *Dots* als CD8⁺ IFN- γ ⁺ Zellpopulation. Neben der Expression von IFN- γ wurde auch die Fähigkeit von stimulierten CD8⁺ T-Zellen zur Bildung anderer Zytokine (IL-2, TNF- α und IL-17) untersucht. Zur besseren Darstellung der Zytokin-exprimierenden Zellen zeigt Abb. 27 die CD40L⁺CD8⁺ T-Zellen. Einige CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage CD40L zu exprimieren und damit eine Helfer-Funktion ausüben zu können [40].

4. ERGEBNISSE

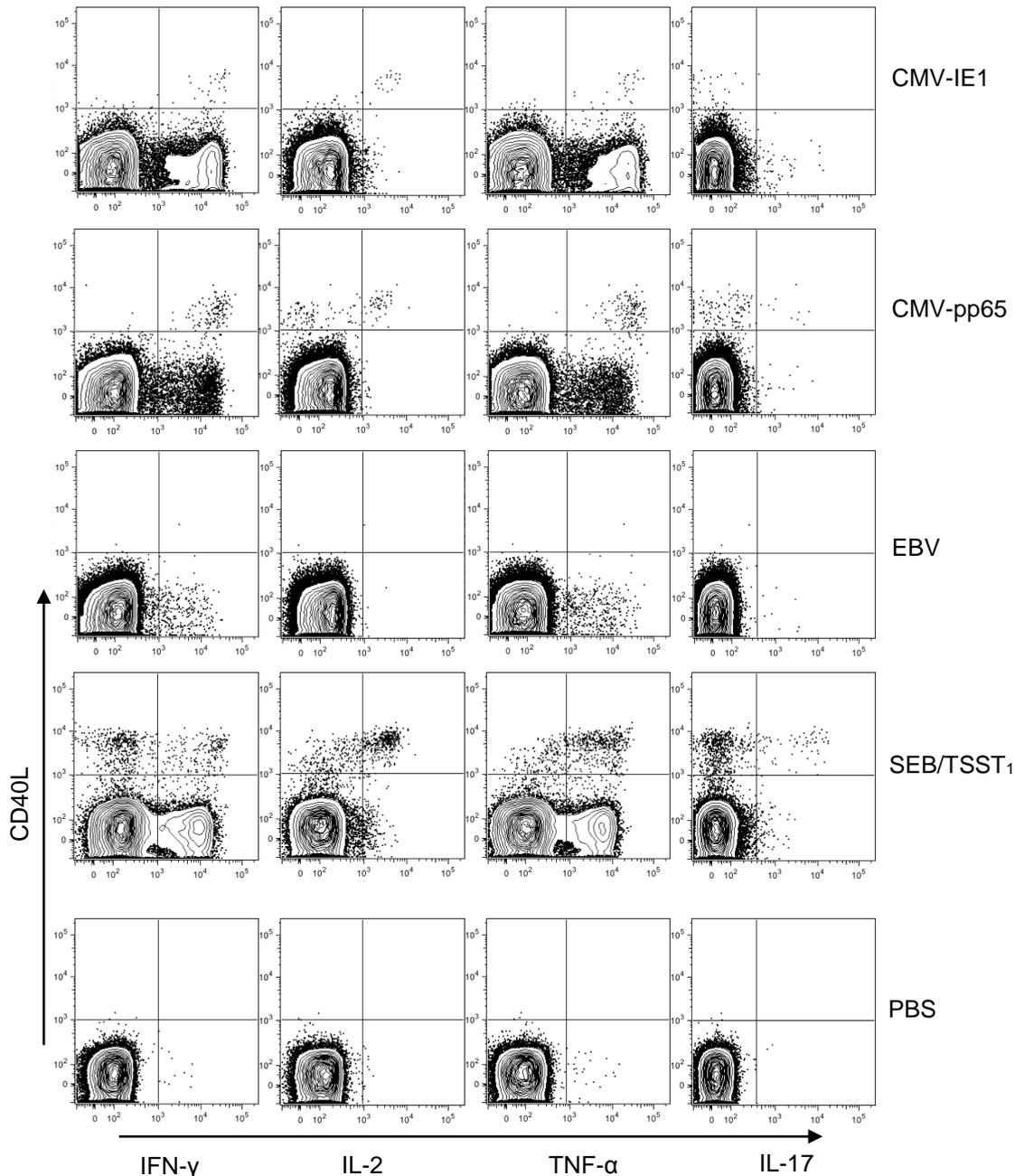


Abb. 27 Contour-Plot der Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Nach Ausschluss von toten Zellen, CD19⁺ B-Zellen und CD14⁺ dendritischen Zellen, wurden CD8⁺ T-Zellen innerhalb der CD3⁺ T Zellen identifiziert und durch die Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-17 charakterisiert. Es wurde im Vollblut für 6 Stunden mit den folgenden Virus-Proteinen stimuliert: Cytomegalievirus-Immediate-Early Protein 1 (CMV- IE1); Cytomegalievirus – Phosphoprotein 65 (CMV-pp65); Epstein-Barr-Virus (EBV)- EBNA1+BZLF1; es wurde mit SEB+TSST₁ als Positivkontrolle stimuliert und als Negativkontrolle PBS hinzugegeben. Beispiel eines repräsentativen alten Probanden.

Die IFN- γ -Expression von aktivierten Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf die viralen Stimuli zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alters. Quantitativ zeigten aber mehr Probanden der älteren Kohorte spezifische CD8⁺ T-Zellen sowohl für CMV-IE1 - 68% (17/25) - als auch für CMV-pp65 - 76% (19/25) - im Vergleich zu den jüngeren Probanden, bei denen eine Aktivierung nur für 48% (10/21) für CMV-IE1 und 43% (9/21) für CMV-pp65 zu sehen war. EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden in beiden

4. ERGEBNISSE

Alterskohorten bei der großen Mehrheit der Probanden beobachtet, d.h. bei 92% (23/25) der älteren und 81% (17/21) der jüngeren Probanden.

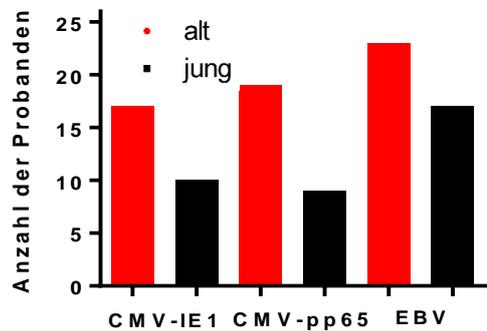


Abb. 28 Anzahl der CMV- und EBV-positiven Probanden. Anzahl der Probanden, bei denen eine spezifische CD8⁺ T-Zell-Aktivierung nach Stimulation mit CMV-IE1, CMV-pp65 und EBV-Peptiden beobachtet wurde.

Um die Qualität der Immunantwort zu untersuchen, wurde die Polyfunktionalität der CD8⁺ T-Zellen mittels Boolean-Gate analysiert. Nach Stimulation mit CMV-Peptiden (sowohl IE1 als auch pp65) zeigten sich keine qualitativen Unterschiede zwischen den beiden Alterskohorten. Dabei synthetisierten die meisten CD8⁺ T-Zellen ein Zytokin, vor allem IFN- γ oder TNF- α (Daten nicht gezeigt). Nach Stimulation mit EBV-Peptiden (EBNA+BZLF1) wurden ebenfalls keine polyfunktionalen EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen beobachtet. Die meisten CD8⁺ T-Zellen synthetisierten ein einziges der gemessenen Zytokine. Dabei war der Unterschied der Einzelproduzenten zwischen den Alterskohorten signifikant (Medianwert 0,2 vs. 0,1, $p < 0,05$): ältere Probanden hatten mehr monofunktionale EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen als jüngere Probanden, vor allem TNF- α -Produzenten.

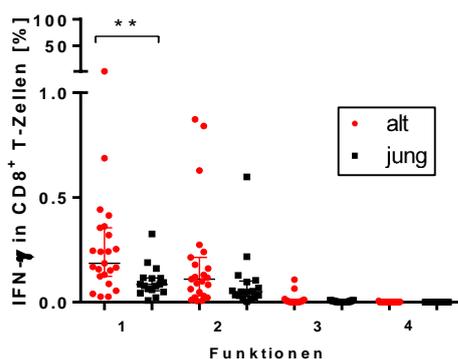


Abb. 29 Charakterisierung der Polyfunktionalität der CD8⁺ T-Zellen nach Stimulus mit Epstein-Barr-Virus Peptiden. CD8⁺ T-Zellen wurden mit einem Gemisch aus EBV dominanten Peptiden (EBNA+BZLF1) stimuliert. Die Aktivierung der CD8 T-Zellen wurde durchflusszytometrisch als intrazelluläre IFN- γ -Expression erfasst. Außerdem wurden CD8⁺ T-Zellen auf ihre Produktion weiterer Zytokine analysiert: TNF- α , IL-2 und IL-17. Mittels Boolean-Gate konnte man Mehrproduzenten identifizieren. Die Frequenzen der poly- bzw. monofunktionalen CD8⁺ T-Zellen sind als Scatter-Plot im Vergleich alt (rot) vs. jung (schwarz) dargestellt. Medianwerte und Interquartilabstände werden angezeigt.

4.4 Serologische Analyse von Herpesviren-spezifischen Antikörpern

Zur Erfassung des immunologischen Status der Probanden bezüglich einer Infektion mit CMV und EBV wurden serologische Analysen durchgeführt. Antikörper-Titer des Immunglobulin M und Immunglobulin G mit Spezifität für CMV und EBV wurden hierfür gemessen. Als positiv wurde ein Titer über eins gewertet.

4. ERGEBNISSE

Für das Cytomegalie-Virus verzeichneten wir keine Probanden der älteren Kohorte als positiv für Anti-CMV-IgM, während ein Proband in der jüngeren Kohorte eine frische bzw. akute Infektion durch IgM-Antikörpernachweis aufwies. Positiver Anti-CMV-IgG war hingegen bei 73% (19/26) der älteren Kohorte und 42% (10/24) der jüngeren Probanden zu finden. Die Anti-CMV-IgG Titer waren höher für die älteren als für die jüngeren Probanden (Medianwert 6 vs. 0,2, $p < 0,05$).

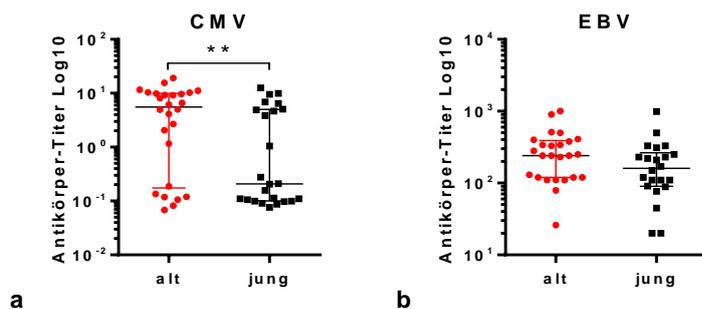


Abb. 30 Cytomegalie-Virus und Epstein-Barr-Virus Antikörper-Titer in Serum. (a) Anti-CMV-IgG. Ältere Probanden (Rot, $n=26$) zeigen einen höheren IgG-Titer als Jüngeren (Schwarz, $n=24$) ($p=0,02$). **(b)** EBV spezifische IgG-Titer, jeweils für älteren Probanden (Rot, $n=26$) und jüngeren Probanden (Schwarz, $n=24$).

Bezüglich des EBV-Infektionsstatus stand Material für serologische Analysen für 47 Probanden (25 älteren und 22 jüngeren) zur Verfügung. Kein Proband wies einen positiven (>25) anti-EBV-IgM-Titer auf. Anti-EBV-IgGs wurden bei nahezu allen Probanden gefunden. Nur zwei Probanden der jüngeren Kohorte zeigten einen negativen IgG-Titer (< 25) und ein älterer Proband hatte einen grenzwertigen IgG-Titer von 26. Beim EBV zeigte sich eine Tendenz zu höheren IgG-Titern in der älteren Kohorte im Vergleich zu der Jüngeren, der Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz ($p=0,05$). Alle Probanden, die serologisch positiv für CMV waren, wiesen gleichzeitig einen positiven IgG-Titer für EBV auf.

Als Maß für eine Infektion kann sowohl die humorale Antwort als Antikörper-Titer als auch die zelluläre Immunreaktion nach Stimulation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mit immundominanten Peptiden der Viren herangezogen werden. Um den Infektionsstatus besser zu erfassen, wurde der humorale Status mit der zellulären Spezifität für die immundominanten Peptide von CMV und EBV korreliert.

Die Probanden mit positivem Antikörper-Titer für CMV (29/50) wiesen nahezu allesamt auch CMV-spezifische T-Lymphozyten auf (27/29). Zwischen der humoralen und der zellulären Immunspezifität für CMV besteht also im Wesentlichen eine Überlappung. Beide Probanden mit divergenten Befunden für Serologie und spezifischer T-Zellantwort gehörten zur jüngeren Kohorte.

4. ERGEBNISSE

Während nur 22% der Probanden (10/46) eine EBV-spezifische CD4⁺ T-Zell-Antwort zeigten, wiesen 87% eine spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort (40/46) auf. Diese CD8⁺ T-Zell-Antwort korreliert mit dem EBV-Antikörpertiter ($p=0,04$ nach Spearman).

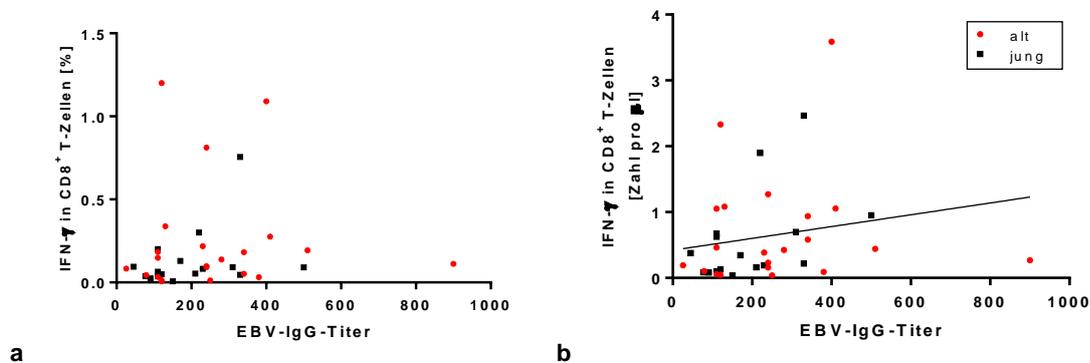


Abb. 31 Korrelation zwischen dem EBV-IgG Antikörper-Titer und der spezifische CD8⁺ T-Zell Antwort. Prozentuale Angabe der EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Korrelation mit dem EBV-Antikörper-Titer (IgG) (a). Anzahl der EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Korrelation mit dem EBV-Antikörper-Titer (IgG) ($r=0,4$; $p=0,04$ nach Spearman) (b).

4.5 Einfluss des Immunstatus auf das immunologische Alter und die Impfantwort

In diesem Abschnitt werden Zusammenhänge zwischen Immunstatus, dem immunologischen Alter und deren Einfluss auf die Immunantwort nach Influenza-Impfung erfasst. Als Immunstatus werden hier die latenten Infektionen durch die Herpesviren Cytomegalie-Virus und Epstein-Barr-Virus bezeichnet (s.4.3.3 und 4.4). Als immunologisches Alter ist hier die Zusammensetzung der verschiedenen T-Zell-Populationen nach ihrem Differenzierungs- und Reifungsgrad zu verstehen (s.4.3). Die Impfantwort wurde mittels HI-Titer sowie über die Kinetik der Plasmablasten ermittelt (s.4.1 und 4.2.1).

Die Probanden wurden anhand ihres humoralen CMV-Status in eine positive und eine negative Gruppe unterteilt. Innerhalb dieser Gruppen wurde weiterhin nach Alter unterschieden. Im Vergleich alt vs. jung und positiv vs. negativ wurden Differenzierungs- und Erschöpfungsmarker auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen analysiert.

Weitere Subgruppen entstanden in Abhängigkeit der spezifischen zellulären Antwort. Es wurden Antigen-spezifische CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen unterschieden und Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Serokonversion am Tag 21 nach TIV sowie des immunologischen Alters analysiert.

Die Merkmale der verschiedenen Gruppen sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst. Rote Kästen weisen auf eine Erhöhung einer bestimmten

4. ERGEBNISSE

Zellpopulation im ersten Gruppenteil, während eine Verminderung dieser durch die Farbe Grün gekennzeichnet wird. Blau bedeutet keinen Unterschied.

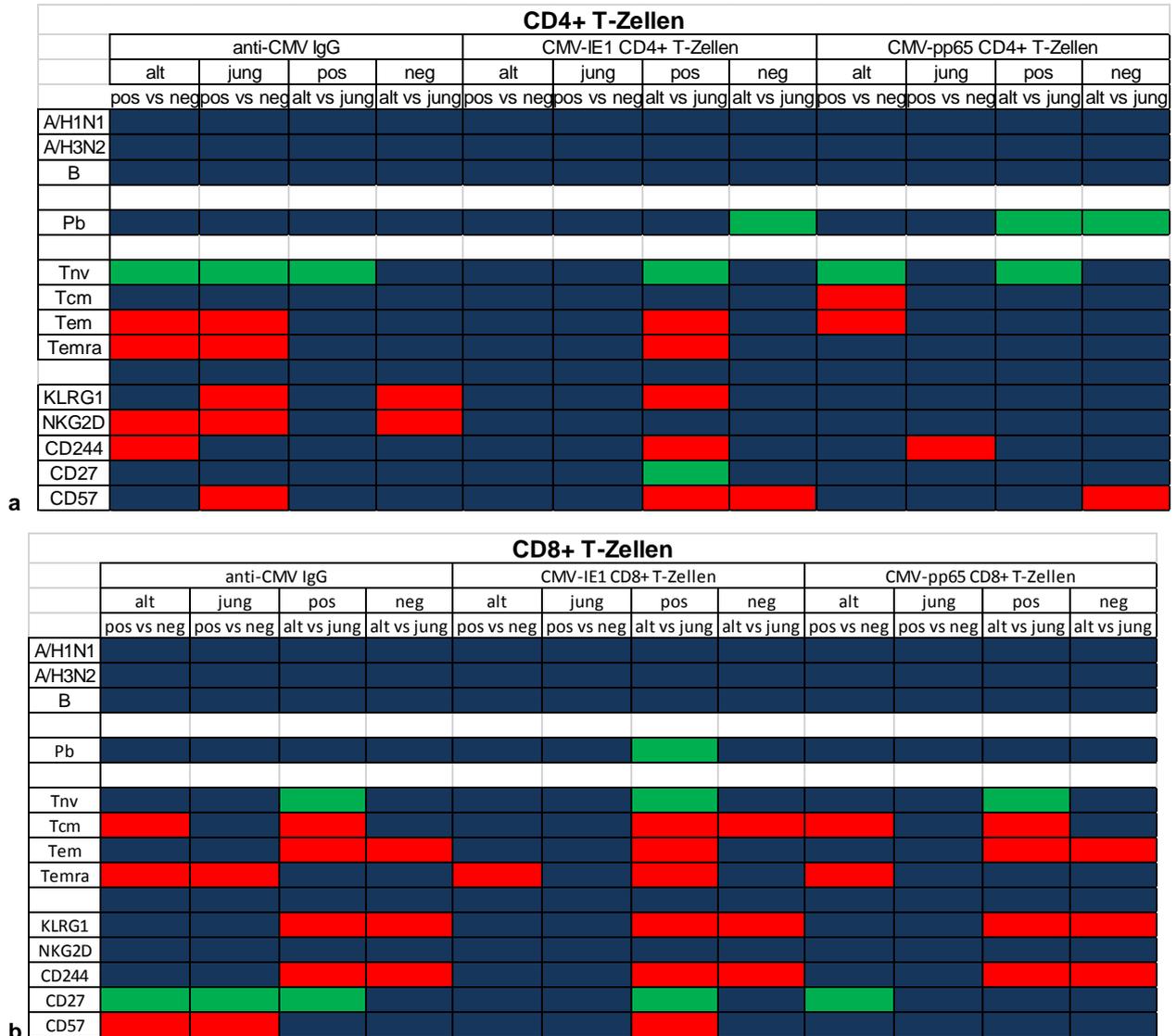


Abb. 32 Darstellung der Immunantwort nach TIV sowie des immunologischen Alters in Abhängigkeit vom CMV-Immunstatus. Die Studienteilnehmer wurden nach dem humoralen Status für anti-CMV-IgG sowie nach der Antigen-spezifischen T-Zell Antwort für CMV-IE-1 und CMV-pp65 in eine positive (pos.) und eine negative (neg.) Gruppe sowie zusätzlich in Alt vs. Jung unterteilt. Innerhalb der Gruppen Alt vs. Jung und pos. vs. Neg. wurden die HI-Titer am Tag 21 nach TIV für die drei Influenza-Virusstämme, die Plasmablasten (Pb) am Tag 7 nach TIV, die Expression von CD45RA und CCR7 sowie die Oberflächenmarker KLRG1, NKG2D, CD244, CD27, CD57 als prozentualer Anteil der CD4+ (a) und CD8+ T-Zellen (b) verglichen. Rote Kästen weisen auf eine Erhöhung der Expression einer bestimmten Zellpopulation beziehungsweise Oberflächenmarkers im ersten Gruppenteil, während eine verminderten Expression durch Grün gezeigt wird ($p > 0,05$). Blau bedeutet keinen Unterschied. Zum Beispiel: CMV-serologisch positive Probanden der älteren Gruppe haben einen höheren relativen Anteil von TEMRA an CD8+ T-Zellen im Vergleich zu den älteren Probanden, die keinen CMV-IgG-Titer aufwiesen.

Die Abb. 32 zeigt, dass die Entwicklung Influenza-spezifischer Antikörper für die drei geimpften Virusstämme weder durch den CMV-Status noch durch das Alter beeinflusst ist. Im Gegensatz dazu wird die Altersabhängigkeit im Anstieg der Plasmablasten durch

4. ERGEBNISSE

diese Daten bestätigt: Junge Probanden weisen einen höheren Anteil an Plasmablasten am Tag 7 nach TIV auf als ältere Probanden.

Die Daten dieser Arbeit deuten auf die Akkumulation ausdifferenzierter Gedächtniszellen in Zusammenhang mit dem CMV-Status hin. Ausdifferenzierte CD4⁺ sowie CD8⁺T-Zellen (T_{EMRA}) sind innerhalb der Altersgruppen bei CMV-serologisch-positiven Probanden vermehrt im Vergleich zu CMV-serologisch-negativen Probanden. Dem gegenüber ist bei CMV-serologisch-negativen Probanden die naive T-Zellpopulation geringer. Ein ähnliches Szenario ergibt sich aus dem Altersvergleich für die Probanden, die CMV-IE1-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufweisen. Anders ist es wenn man CMV-pp65-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen analysiert. Bei den Probanden, die CMV-pp65-spezifische CD4⁺ T-Zellen aufwiesen, kann man nur innerhalb der alten Probandengruppe eine größere Gedächtniszellpopulation beobachten. Bei den CMV-pp65-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kann man beobachten, dass sich Alte und CMV-pp65-positive Probanden durch eine größere Gedächtniszellpopulation und eine geringere naive T-Zellpopulation auszeichnen.

Auch die Expression von „Erschöpfungsmarkern“ auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist häufiger auf CMV-IE1-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu CMV-pp65-spezifischen T-Zellen. Mehr CMV-IE1-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimieren KLRG1, CD244, CD57 und weniger CD27 bei älteren Probanden. Serologisch positive Probanden zeigen einen höheren Anteil an NKG2D⁺CD4⁺ T-Zellen sowohl innerhalb der alten als auch innerhalb der jungen Probandenkohorte. CD8⁺ T-Zellen zeichnen sich bei serologisch-positiven Probanden durch einen höheren Anteil an CD57⁺ und eine niedrigere Anteil an CD27⁺ Zellen im Altersvergleich aus.

Wir wollten den möglichen Einfluss des immunologischen Alters auf die humorale Influenza-Antwort untersuchen. Dafür wurden T-Zell-Populationen (naive und Gedächtniszellen) der T-Helfer-Zellen und der zytotoxischen T-Zellen sowie die Expression von Oberflächenmerkmalen für Differenzierung und Reifung (s.4.3) mit dem HI-Titer für die drei in der Impfung enthaltenen Virusstämme und die Plasmablasten-Expansion am Tag 7 nach TIV korreliert. Dabei konnten wir keinen Zusammenhang zwischen HI-Titer am Tag 21 bzw. Anstieg des HI-Titers nach TIV und dem immunologischen Alter feststellen. Gleichmaßen konnte keine Korrelation zwischen Plasmablasten-Expansion nach der Impfung und immunologischen Alter festgestellt werden.

4. ERGEBNISSE

Weiterhin wollten wir den möglichen Einfluss des CMV-Status auf die Immunantwort nach Influenza-Impfung erfassen. Dafür wurde die CMV-spezifische CD4⁺ T-Zell-Antwort mit der Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Antwort nach TIV verglichen. Wir konnten eine positive Korrelation zwischen Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen am Tag 14 nach TIV mit CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen beobachten. Vor allem ist die IFN- γ -Produktion von aktivierten CD40L⁺CD4⁺ T-Zellen sowohl für junge als auch für ältere Probanden zu bemerken: je mehr IE1⁺ IFN- γ ⁺CD40L⁺ CD4⁺ T-Zellen, desto mehr Influenza⁺ IFN- γ ⁺CD40L⁺ CD4⁺ T-Zellen waren zu beobachten.

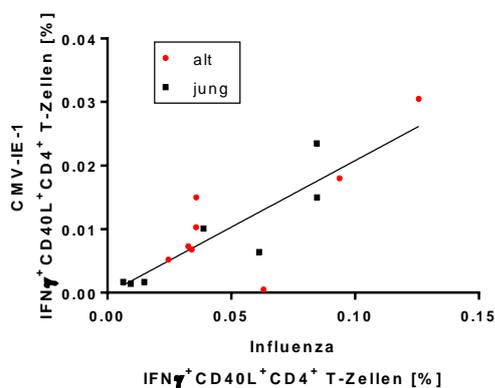


Abb. 33 Korrelation der Herpesviren-spezifischen CD4⁺ T-Zellen mit der CD4⁺ T-Zell-Antwort nach TIV. Korrelation zwischen aktivierten CD4⁺ T-Zellen nach 6 Stunden Stimulation mit dem Immundominanten Peptid IE1 (immediate-early 1) des Cytomegalie-Virus und die CD4⁺ T-Zellen nach 6 Stunden Stimulation mit dem Vakzin Mutagrip® (Sanofi-pasteur) am Tag 14 nach TIV. Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden durch die Expression von CD40L als Prozent der gesamten CD3⁺ T-Zellen identifiziert. Im Bild ist die Expression der CD40L und IFN- γ CMV-IE1 spezifischen T-Zellen (Y-Achse) und Influenza-spezifischen T-Zellen (X-Achse) dargestellt, für junge Probanden (Schwarz) und ältere Probanden (Rot). Je mehr CMV-IE1⁺CD4⁺T-Zellen desto mehr Influenza-spezifische CD4⁺ T-Zellen am Tag 14 nach TIV ($r=0,82$; $p<0,001$).

Zusammenfassend konnte man einen Einfluss der Infektion mit CMV auf die Differenzierung der CD3⁺ T-Lymphozyten beobachten. Dieser Zusammenhang wurde sowohl serologisch als auch für die CMV-spezifischen T-Zellen nachgewiesen. Ältere Probanden sowie solche mit CMV-IE1-spezifischen T-Zellen wiesen eine ausdifferenziertere Zellpopulation (mehr Gedächtniszellen und weniger naive T-Zellen) auf sowie mehr T-Lymphozyten mit Expression von Alterungsmerkmalen.

Zusätzlich bestand ein Zusammenhang zwischen CMV-Status und der zellulären Immunantwort auf die Influenza-Impfung. Je mehr CMV-IE1 CD4⁺ T-Zellen, desto mehr Influenza-spezifische CD4⁺ T-Zellen waren vorhanden.

5. DISKUSSION

5 Diskussion

Influenza ist eine virale Erkrankung, die vor allem bei älteren Menschen und Menschen mit eingeschränktem Immunsystem zu schweren Komplikationen führen kann. Die jährliche Influenza-Impfung vermag es dabei, gerade bei älteren Menschen, nicht immer, einen sicheren Schutz aufzubauen [1, 41]. Aus diesem Grund stellt die Influenza-Impfung ein gutes Modell für die Untersuchung altersbedingter Veränderungen in der Immunantwort dar. Altersabhängige Unterschiede im Kontext der Influenza-Impfung wurden sowohl für die humorale [2, 42-45] als auch für die adaptive zelluläre Immunantwort [46-49] bereits beschrieben und sind auch weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Dabei werden nicht nur die physiologische Alterung bzw. Differenzierung der T-Zellen (sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen) als Hauptmerkmale im Prozess von Immunoseneszenz angesehen, sondern auch latente chronische Infektionen mit Herpesviren (vor allem CMV) [19, 28, 30, 50, 51].

Ziel dieser Arbeit war es, altersabhängige immunologische Signaturen zu identifizieren, die Ursachen für die verminderte Immunantwort auf die Influenza-Impfung im Alter darstellen können. Dafür wurde zunächst die humorale Immunreaktion nach TIV analysiert. Neben dem HI-Titer wurden für die Kohorten Alt vs. Jung auch die Plasmablasten-Expansion im Zeitverlauf nach der Impfung untersucht. Weiterhin wurden die B- und T-Zell-Populationen anhand von Differenzierungs- und Erschöpfungsmarkern charakterisiert. Bei unseren Probanden vorliegende latente Virusinfektionen mit CMV und EBV wurden sowohl serologisch als auch mittels Fast Immune Assay ermittelt. Die Differenzierungsstadien der T-Zellen wurden mit der Immunantwort nach TIV korreliert und zusätzlich der Einfluss von CMV-Infektionen auf die Differenzierung der T-Zellen wurde in Betracht gezogen.

5.1 Die serologische Impfantwort

Durch die Impfung generierte Influenza-spezifische neutralisierende Antikörper stellen einen der wichtigsten protektiven Faktoren gegen eine spätere Grippeinfektion dar [52]. Wir ermittelten daher die serologische Impfantwort mittels Hämagglutinin-Inhibition (HI) Assay für die drei in der Impfung erhaltenen Virusstämmen A/California/7/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2) und B/Brisbane/60/2008 [53]. 84% der Studienteilnehmer waren Responder mit nachgewiesener Serokonversion für mindestens zwei der drei beobachtet. Dabei verzeichneten wir einen altersabhängigen Unterschied für den HI-

5. DISKUSSION

Titer: Ältere Probanden entwickelten einen niedrigeren Antikörper-Titer für H1N1 als die Jüngeren (s. 4.1).

Die meisten Menschen haben im Laufe ihres Lebens Kontakt mit Influenza-Viren, sei es durch natürlich erworbene Infektionen oder durch vorherige Impfungen. Aus diesem Grund ist die Immunantwort auf die Influenza-Impfung zumeist eine gemischte Antwort aus primären und sekundären Immunreaktionen. Ein weiterer Faktor der Immunantwort auf eine Influenza-Impfung ist die sog. Kreuzreaktivität von Antikörpern [45, 54]. Hierunter versteht man die Spezifität von Antikörpern gegen konservierte Bestandteile von z.B. Viren. Dies führt zum Vorhandensein von bindungsfähigen Antikörper, obwohl eine Infektion mit dem Virus niemals zuvor stattgefunden hatte.

Der hier gemessene HI-Titer nach Impfung setzt sich also aus diesen verschiedenen Reaktionen des Immunsystems zusammen. Obwohl Menschen mit zunehmendem Alter Influenza-Viren vermehrt ausgesetzt sind, kann man bei ihnen verminderte HI-Titer nach TIV beobachten [2, 41]. Wir konnten auch eine geringere Entwicklung von HI-Antikörper bei älteren Probanden im Vergleich zu den jüngeren für Influenza H1N1 messen. Für diesen Virusstamm konnte man unabhängig vom Alter in beiden Probandengruppen die geringste Effektivität der Impfung beobachten. Das kann möglicherweise an der Tatsache liegen, dass die älteren genauso wie die jüngeren Probanden bisher noch keinen Kontakt zu H1N1 hatten und es sich hier also vorwiegend um eine primäre Immunreaktion handelt. Anders ist es bei den Influenza-Stämmen H3N2 und B, für welche keine altersabhängigen Unterschiede vorlagen. Hierbei könnte möglicherweise das bereits vorhandene immunologische Gedächtnis eine altersbedingte Beeinträchtigung der Immunantwort kompensieren. Diese zwei Virusstämme befinden sich schon seit längerer Zeit in Zirkulation, sodass unsere Probanden bereits in Kontakt mit ihnen gewesen sein und im Zuge dessen über spezifische Antikörper verfügen könnten.

5.2 Charakterisierung der B-Zellen

Neben der Antikörper-vermittelten Impfantwort im Serum wurden auch Messungen zur Charakterisierung der B-Zellpopulationen nach der Impfung durchgeführt. Unsere Daten zeigten einen Anstieg der Plasmablasten am Tag 7 nach TIV, was in Konkordanz zu bereits veröffentlichten Studien steht [54]. Dieser Anstieg war markanter für die jüngeren Probanden im Vergleich zu den älteren (s.4.2.1). Der beobachtete, niedrigere H1N1-Antikörper Titer bei den älteren Probanden könnte also auf eine altersbedingte Beeinträchtigung der Plasmablasten-Expansion zurückzuführen sein.

5. DISKUSSION

Die hier analysierte Plasmablasten-Kinetik stellt eine zusammengesetzte Immunantwort gegen die drei im Impfstoff enthaltenen Influenza-Stämme dar. Da eine Auftrennung nach Virus-Spezifitäten hier nicht erfolgen kann, kann über die Anteile von primärer und Gedächtniszell-vermittelter Antwort nur spekuliert werden: Aus Arbeiten zu reinen Primärantworten gegen virale Pathogene ist bekannt, dass eine Zunahme der Plasmablastenpopulation im peripheren Blut erst ab Tag 14 nach Impfung eintritt [55]. Obwohl eine direkte Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Vakzinen nur eingeschränkt möglich ist, ist für die von uns beobachtete Kinetik anzunehmen, dass der frühe Anstieg der Antikörper-sezernierenden Zellen vor allem durch H3N2- und B/Brisbane-spezifische Zellen getragen wird, welche an einer sekundären Immunreaktion beteiligt sind.

Des Weiteren wurde die Zusammensetzung der B-Zellpopulation anhand von Naivitäts- und Gedächtniszellmarkern im Zeitverlauf nach TIV untersucht. Unsere Messungen ergaben weder altersabhängige Unterschiede in der Zusammensetzung der verschiedenen B-Zellpopulationen, noch Veränderungen im Verlauf nach Impfung. Der Anteil der Ki67-exprimierenden Zellen war im Gedächtniszellkompartiment höher als für naive B-Zellen. Bei beiden Zellpopulationen nahm der Anteil an Ki67⁺-Zellen am Tag 3 nach TIV deutlich ab, um dann am Tag 7 auf die Ausgangswerte zurückzukehren (s.4.2.2). Diese Abnahme von Ki67⁺-Zellen könnte eine Rekrutierung aktivierbarer B-Zellen beider Populationen aus dem peripheren Blut in lymphatisches Gewebe darstellen, wo im Folgenden die Differenzierung zu Plasmablasten erfolgt. Sowohl naive B-Zellen als auch B-Gedächtniszellen vermögen über das Potential, nach Kontakt mit dem Influenza-Antigen in Antikörper-sezernierende Zellen zu differenzieren und können so eine gemischte primäre und sekundäre Immunreaktion ausbilden.

5.3 Charakterisierung der T-Zellen

Um eine Immunantwort eingehend zu charakterisieren, benötigt man neben Daten zur serologischen Impfantwort, den Plasmablasten sowie den B-Zellen auch Informationen zu den T-Zellen. Die Interaktion zwischen T- und B-Zellen ist wesentlich, da sie entscheidend zur Entwicklung von Antikörper-sezernierenden Zellen und B-Gedächtniszellen beiträgt [56]. Daher führten wir eine Phänotypisierung von T-Zellen bezüglich ihres Differenzierungsgrades durch.

Hier konnte man eine Abnahme naiver T Zellen bei gleichzeitiger Zunahme differenzierter T-Zellpopulationen bei älteren Probanden im Vergleich zu jüngeren beobachten (s.4.3).

5. DISKUSSION

Diese Beobachtung galt sowohl für CD4⁺ als auch für CD8⁺ T-Zellen. Anhand der Expression von CD45RA und CCR7 wurden naive T-Zellen (T_{NV}), T-Gedächtniszellen (T_{CM}), Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) und Effektor-Zellen (T_{EMRA}) unterschieden [16]. Wir beobachteten eine Abnahme der naiven T-Zellen mit zunehmendem Alter sowie einen Anstieg differenzierter Gedächtniszellen. Davon waren CD8⁺ T-Zellen im höheren Ausmaß betroffen als CD4⁺ T-Zellen. Darüber hinaus vergrößerte sich bei den CD4⁺ T-Zellen lediglich der Anteil der T_{CM}, wohingegen bei den CD8⁺ T-Zellen eine Zunahme der T_{CM} und T_{EM} bei den Älteren verzeichnet werden konnte.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtung liegt in der Expansion von oligoklonalen CD8⁺ T-Zellpopulationen, die durch Apoptose-Resistenz, Mangel des Aktivierungsmarkers CD28 sowie verkürzte Telomere charakterisiert sind [23]. Im Zusammenhang mit der Untersuchung des CMV-Status der Probanden in dieser Arbeit ist die Tatsache erwähnenswert, dass insbesondere CMV-spezifische T-Zellen in diesen oligoklonalen Zellpopulationen zu finden sind [19, 23, 57].

Die Expansion des Gedächtniskompartiments bei älteren Menschen sowie die parallel vorliegende Verminderung von naiven Zellen sind Folgen des komplexen Alterungsprozesses, dem das Immunsystem im Laufe des Lebens ausgesetzt ist. Nicht nur die absolute Anzahl zirkulierender naiver T-Zellen nimmt mit dem Alter ab, sondern auch ihre Fähigkeit zur Bekämpfung von Pathogenen [20, 21, 34]. Das sei vor allem auf die Tatsache zurückzuführen, dass chronische latente Virusinfektionen zur Erschöpfung dieser Zellen führen könnten [36, 58, 59]. Die Expression einiger Oberflächenmarker wie CD244, CD57 und KLRG1 auf T-Zellen wurde in anderen Arbeiten bereits mit der Erschöpfung von T-Zellen in Zusammenhang gebracht [57, 60-63]. Sowohl für CD4⁺ T-Zellen als auch für CD8⁺ T-Zellen konnten wir altersabhängige Veränderungen der diese Marker exprimierenden Zellpopulationen nachweisen.

Eine erhöhte Expression von CD244 wurde bereits für CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen beschrieben [57]. Bei CD4⁺ T-Zellen wurde in der Subpopulation von CD4⁺CD28⁻ T-Zellen eine gesteigerte Expression von CD244 gefunden, die hier als Marker der Ausdifferenzierung diskutiert wird [64]. Außerdem wurden erhöhte Zellzahlen von CD244⁺CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit chronischen entzündlichen Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoider Arthritis) beschrieben [64]. Dabei verfügte diese Zellpopulation eine niedrigere Aktivierungsschwelle als CD244⁻CD4⁺ T-Zellen. CD244 könnte also eine wichtige Rolle für das Auftreten autoimmun-vermittelter Pathologien spielen [64]. Da diese wie auch andere chronische Erkrankungen ein

5. DISKUSSION

Ausschlusskriterium für die Teilnahme an unserer Studie darstellten, kann die in unserer älteren Probandengruppe beobachtete Hochregulierung von CD244 auf CD4⁺T-Zellen als Ausdruck einer auch im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses auftretenden zunehmenden Differenzierung und Erschöpfung des CD4⁺ T-Zellkompartiments angesehen werden. Ob dieser Zellpopulation auch prognostisches Potential für das zukünftige Auftreten von Autoimmunerkrankungen beigemessen werden kann, bleibt zu untersuchen [65]. Wie CD244 zeigt auch die Expression von CD57 auf CD4⁺ T-Zellen einen ausdifferenzierten Phänotyp an und ist bei Älteren vermehrt exprimiert [60, 66-68]. Dagegen zeigen unsere älteren Probanden einen geringeren Anteil an CD4⁺ T-Zellen, die den Aktivierungsmarker CD27 exprimierten. Die vermehrte Expression dieser Erschöpfungs- bzw. Differenzierungsmarker im Alter war auf CD8⁺ T-Zellen noch deutlicher zu beobachten als auf CD4⁺ T-Zellen. Eine größere Anzahl der CD8⁺ T-Zellen von älteren Probanden exprimierten CD244 und CD57 im Vergleich zu den jüngeren. Zusätzlich konnte man auch eine größere KLRG1⁺CD8⁺ T-Zellpopulation bei den Älteren feststellen. Die Expression dieser drei Marker ist für CD8⁺ T-Zellen vor allem im Rahmen von CMV-Infektionen beschrieben worden [19, 36, 57, 61, 63].

Zusammenfassend sprechen diese Expressionsmuster für eine Größenzunahme der Population an ausdifferenzierten Gedächtniszellen bei den älteren Menschen im Vergleich zu den jüngeren Probanden. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass sich Alterungsprozesse des Immunsystems vor allem im Differenzierungsgrad und der Funktionalität der Zellpopulationen niederschlagen [50].

5.3.1 Antigen-spezifische T-Zellen

Chronisch latente Virusinfektionen, insbesondere mit den Herpesviren Cytomegalie-Virus (CMV) und Epstein-Barr-Virus (EBV), werden in der Literatur als wichtige Einflussgrößen auf den Alterungs- und Differenzierungsprozess von der T-Lymphozyten diskutiert. Die Durchseuchung mit diesen Viren in der Bevölkerung steigt hierbei proportional zum Alter [21, 58].

Um altersbedingte Unterschiede in Abhängigkeit zum Infektionsstatus untersuchen zu können, analysierten wir den serologischen Status für CMV und EBV unserer Probanden sowie das Vorhandensein spezifischer T-Zellen für bestimmte immundominante Peptide der Herpesviren (s.4.3.3). In unserer Studienkohorte waren nahezu 100% der Probanden serologisch positiv für EBV. Der anti-EBV-IgG Titer korrelierte mit der Anzahl an aktivierten EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit EBV-Peptiden, d.h.

5. DISKUSSION

nahezu alle Probanden wiesen eine CD8⁺-T-Zell-Antwort auf. Die CD4⁺ T-Zell Antwort nach Stimulation mit EBV-Peptiden war schwächer ausgeprägt. Altersbedingte Unterschiede konnten in Abhängigkeit zum EBV-Status nicht dargestellt werden.

Im Vergleich zur EBV-Infektion, ergab sich bei dem CMV-Status der Probanden ein heterogeneres Bild. 73% der älteren Probanden verfügten über anti-CMV-IgG Antikörper wohingegen nur 42% der jüngeren Probanden als serologisch positiv getestet wurden. Antigen-spezifische T-Zellen wurden für die zwei immundominanten CMV-Peptide IE-1 und pp65 identifiziert. Unsere Daten zeigten, dass die zelluläre Immunantwort gegen immundominante CMV-Peptide ein wichtiger zusätzlicher Parameter zur Beurteilung des Einflusses einer CMV-Infektion auf die Zusammensetzung des T-Zellkompartiments darstellen könnte und dieser unabhängig von dem Antikörper-Titer ist (s. Abb. 32). Wir konnten mehr CD8⁺ als CD4⁺ T-Zellen beobachten, die spezifisch gegenüber diesen Antigenen waren. Ältere Menschen zeigten für beide immundominante Peptide einen höheren Anteil an CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen als jüngere Probanden.

Zudem lagen auch altersabhängige Unterschiede in der Funktionalität CMV-spezifischer T-Zellen vor. Hierfür wurde das Zytokinprofil der T-Zellen nach Stimulation mit den CMV-Peptiden untersucht. Der überwiegende Anteil der zu CMV vorliegenden Arbeiten beschreibt eine durch den chronischen Aktivierungsprozess vorangetriebene Ausdifferenzierung der T-Zellen [25, 33, 57], die mit einer zunehmenden Abnahme ihrer Funktionalität einhergeht [69]. Bei getrennter Betrachtung der CMV-Peptide zeigte sich in unserer Studie bei den älteren Probanden nach der Stimulation mit IE-1 eine größere Population aktivierter polyfunktionaler CD4⁺ T-Zellen. Ältere Probanden verfügten über mehr Zellen, die eine gleichzeitige Expression der drei Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α aufwiesen und als Tripelproduzenten bezeichnet werden. Tripelproduzenten wurden in anderen Arbeiten bereits als eine Subpopulation von CD4⁺ T-Gedächtniszellen (T_{CM}) beschrieben [33], welcher eine bessere Fähigkeit zur Kontrolle viraler chronischer Infektionen zugemessen wird [70-72]. Hier ist ein geteilter Erklärungsansatz denkbar: Zum einen ist bei Älteren die CMV-Infektionsprävalenz höher, zum anderen ist die CD4⁺ T-Gedächtniszellpopulation (anteilig) vergrößert. Anders präsentierten sich die CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen: Hierbei waren die meisten aktivierten Zellen Zytokin-Einzelproduzenten (vor allem IFN- γ oder TNF- α) ohne dass altersabhängige Unterschiede auftraten.

5. DISKUSSION

5.4 Einfluss des CMV-Status auf das immunologische Alter und die Impfantwort

Da keine direkte Korrelation zwischen der Stärke der CMV-spezifischen T-Zell-Antwort und der Höhe des CMV-Antikörper-Titers bestand, wurden die Probanden für weitere Analysen nach dem serologischen CMV-Status (Anti-CMV-IgG) und zusätzlich nach der zellulären IE-1- bzw. pp65-Spezifität der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen unterteilt. Eine Analyse der Daten bezüglich CMV-Status, immunologischen Alter und Impfantwort diente der Untersuchung des Einflusses der viralen Infektion auf die Entwicklung von HI-Titer und Plasmablasten-Expansion am Tag 7 nach TIV sowie auf das immunologische Alter (s.4.5).

Wir konnten keinen Einfluss vom CMV-Status (serologisch und zellulär) auf die Influenza-spezifische Immunantwort nach TIV beobachten. Die Entwicklung von HI-Titer der drei geimpften Virusstämme zeigte sich in unserer Studienkohorte vom CMV-Status nicht beeinflusst, was einen Gegensatz zu publizierten Daten darstellt [28]. Auch in der Differenzierung der B-Zellen zu Plasmablasten ergaben sich keine Assoziationen mit dem CMV-Status unserer Probanden. Dagegen unterlagen T-Zellen (sowohl das CD4⁺ als auch das CD8⁺ T-Zell-Kompartiment) dem Einfluss des Herpesvirus bezüglich ihrer Differenzierung und Funktionalität, was sich zusätzlich zum Einfluss des Lebensalters auf die Verteilung zwischen naiven und Gedächtniszellenpopulationen auswirkte. Außerdem waren Unterschiede in Abhängigkeit der Spezifität der T-Zellen für die zwei untersuchten immundominanten Peptide IE-1 und pp65 zu beobachten: Bei Probanden, die eine IE-1-spezifische CD4⁺ T-Zell-Aktivierung zeigten, konnte man in Abhängigkeit vom Alter eine Abnahme der naiven CD4⁺ T-Zellpopulation bei gleichzeitiger Zunahme der CD4⁺ Effektor-Zellen (T_{EMRA}) verfolgen. Diese veränderte Zusammensetzung konnte für Probanden, bei denen keine CMV-IE1-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort vorlag, nicht beobachtet werden. CMV-IE-1-CD4⁺ positive ältere Menschen wiesen auch in Bezug auf die Expression der zuvor diskutierten Erschöpfungs- und Differenzierungsmarker (KLRG1, CD244, CD57 und CD27) Veränderungen im Sinne einer fortgeschrittenen Alterung des Immunsystems auf. Interessanterweise wurde dieser Unterschied nicht bei den Probanden beobachtet, die eine CD4⁺ T-Zell-Spezifität für pp65 aufwiesen, sodass es sich hierbei um einen spezifischen Effekt der gegen das IE-1-Antigen gerichteten Immunantwort handeln könnte. In einer Arbeit von Bunde *et al.* [32] wurde gezeigt, dass die gegen die immundominanten CMV-Peptide (IE-1 und pp65) gerichteten Antworten

5. DISKUSSION

Ausdruck eines unterschiedlichen Vermögens zur Kontrolle der CMV-Infektion sind: IE-1-spezifische CD8⁺ T-Zellen vermitteln den Schutz gegen die Reaktivierung der CMV-Infektion nach Herz- und Lungentransplantation, nicht aber pp65-spezifische CD8⁺ T-Zellen. In unseren Daten zeigten sich Unterschiede nur im CD4⁺ T-Zell-Kompartiment, nicht aber bei den CD8⁺ T-Zellen.

Um eine mögliche unterschiedliche Rolle von IE-1- und pp65-CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, korrelierten wir die CD4⁺ T-Zell-Aktivierung nach Stimulation mit CMV-IE-1 und CMV-pp65 mit der CD4⁺ T-Zell-Antwort auf die Influenza-Impfung (Daten von D. Rachwalik). Eine positive Korrelation bestand zwischen CMV-IE-1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen am Tag 14 nach TIV. Es zeigte sich insbesondere ein positiver statistischer Zusammenhang zwischen dem Anteil an IFN- γ -Produzenten der aktivierten CMV-spezifischen (IE-1) und jenem der aktivierten Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Dies könnte so interpretiert werden, als dass Probanden mit der Fähigkeit zur Ausbildung einer CD4⁺ T-Zellantwort gegen das IE-1 Peptid auch stärkere IFN- γ vermittelte T-Zell Antworten ausbilden konnten. Diese Korrelation lag jedoch nicht für CMV-pp65-CD4⁺ T-Zellen vor.

Polyfunktionale Zellen sind T-Zellen, welche zur Produktion mehrerer Zytokine befähigt sind. Unsere Daten zeigten, dass die meisten CMV-IE-1-spezifische CD4⁺ T-Zellen der älteren Probanden polyfunktional sind (s.4.3.3.1.1). Die Polyfunktionalität dieser Zellen könnte auf eine bessere Fähigkeit zur Kontrolle viraler Infektionen hinweisen [70, 72]. CMV-IE-1-CD4⁺ T-Zellen übernehmen also möglicherweise eine protektiven Rolle gegenüber der Infektion mit CMV-Viren, ohne dass sie Ausdruck einer Beeinträchtigung der Immunantwort gegen neue Pathogene oder einer sekundären Immunantwort (wie im Fall der Influenza-Impfung) sind [28]. Das könnte auch auf die Tatsache hindeuten, dass das Immunsystem der Probanden, bei den einer CMV-IE-1-CD4⁺ T-Zell-Spezifität nachzuweisen war, im allgemein eine bessere Fähigkeit zur Kontrolle latenter (CMV) und/oder rezidivierender (Influenza) viralen Infektionen aufweist. Die von anderen Autoren beschriebene durch CMV-ausgelöste verminderte Immunität im hohen Lebensalter [25, 28, 58] konnte bei unseren relativ „jungen“ älteren Probanden (Durchschnittsalter 58 Jahre) nicht in vergleichbarem Ausmaß beobachtet werden.

Dennoch zeigte sich auch bei CMV-positiven Individuen der jüngeren Kohorte eine weiter fortgeschrittene Naiv-/Gedächtniszellendifferenzierung des T-Zellkompartiments. Die latente CMV-Infektion könnte also, wie schon in bereits veröffentlichten Studien

5. DISKUSSION

beschrieben [24, 36], auch in jüngerem Alter zur Beschleunigung des immunologischen Alterungsprozesses beitragen.

Es ergaben sich in der Analyse keine ersichtlichen Zusammenhänge zwischen der altersbedingt veränderten Zusammensetzung des T-Zellkompartiments im Hinblick auf die anhand von HI-Titern (für alle drei Stämme) und Plasmablasten-Expansion bestimmten Effektivität der Influenza-Impfung.

5.5 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, altersabhängige immunologische Signaturen nach Influenza-Impfung zu identifizieren. Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass solche altersabhängigen Unterschiede der Immunantwort auf die Influenza-Impfung sowohl beim Ausbilden des HI-Titers als auch der Plasmablasten-Expansion bestanden. Weiterhin zeigten sich zum Teil erhebliche altersabhängige Unterschiede bei der Differenzierung der T-Lymphozyten und dies auch im Kontext mit CMV-Infektionen. Latente CMV-Infektionen wirkten sich auf die Differenzierung der T-Zellen aus, indem diese mit vermehrter Erschöpfung der T-Zellen (*exhaustion*) einhergingen [36, 57, 67]. Die Theorie, dass diese vermehrte Erschöpfung der T-Zellen eine verminderte Impfantwort zur Folge haben könnte [28], konnten wir mit unseren Messungen allerdings nicht belegen. Möglicherweise könnte das „junge“ Alter unserer „älteren“ Probanden (<65 Jahre) dabei einen solchen Effekt maskiert haben, indem die Folgen der von viralen Infektionen ausgelösten Veränderungen „noch“ keinen Einfluss auf die Impfantwort verursacht haben.

Aktuell sehen die Impfempfehlungen des Robert-Koch-Instituts eine Influenza-Impfung bei Menschen jenseits des 60. Lebensjahrs vor. Die hier präsentierten Daten liefern eine Rationale, um die bestehende Indikationsstellung zur Immunisierung weiter zu verbessern. Beispielsweise könnten zusätzliche altersassoziierte Parameter herangezogen werden, welche neben dem anagraphischen Alter auch immunologische Signaturen seneszenten T-Zellen oder den CMV-Status berücksichtigen. So könnten Menschen mit einem hohen Risiko für Impfversagen identifiziert werden, was zum Beispiel den zusätzlichen Einsatz von Impfstoffen mit Adjuvantien nach sich ziehen könnte.

Eine weitere Beobachtung dieser Arbeit im Zusammenhang mit latenten CMV-Infektionen besteht darin, dass neben der Antikörper-Titer-Messung als klinischer Standardmethode die T-Zell-vermittelte Immunantwort auf verschiedene CMV-Peptide wichtige zusätzliche Informationen liefern könnte. Die T-Zell-vermittelte Immunantwort auf unterschiedliche

5. DISKUSSION

CMV-Peptide ging mit Veränderungen auf die Differenzierung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen einher, welche zum Teil gegensätzliche Einflüsse auf die Immunität ausüben.

Zukünftige Analysen der TIV-Impfantwort sollten nicht nur den HI-Titer, sondern auch die Entwicklung antigen-spezifischer Plasmablasten sowie CD4⁺ T-Zellen heranziehen, damit eine umfassendere Beurteilung der Effektivität der Impfung erfolgen kann. Dabei wäre es wichtig, die Immunität für die drei in der Impfung enthaltenen Virusstämme getrennt zu analysieren, um die Komplexität der Immunreaktion auf die TIV aufzuschlüsseln. Außerdem sollte man Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen phänotypisieren, um Aussagen über deren Differenzierungs- und Reifungsgrad in Zusammenhang mit ihrer Funktionalität treffen zu können. Dabei sollte auch der Einfluss latenter viraler Infektionen (v.a. CMV) betrachtet werden, um deren Auswirkungen auf das immunologische Alter zu charakterisieren.

Zusätzlich zu den in dieser Arbeit behandelten altersabhängigen Einflussgrößen auf die Immunkompetenz, enthält der Datensatz der PRIMAGE-Studie viele weitere hier nicht thematisierten Faktoren, die einen großen Stellenwert in der aktuellen Forschung immunoseneszenten Prozesse haben. Hierzu zählen die Analysen anderer Zellarten des Immunsystems (z.B. Dendritische Zellen, NK-Zellen), anderer infektiologischer Parameter (z.B. chronische Pilzinfektionen, Adenoviren) sowie auch Veränderungen molekulargenetischen Natur (z.B. Genexpression, Epigenetik), die einen erheblichen Einfluss auf die Ausbildung einer Immunantwort ausüben dürften und in einer möglichen erweiterten Auswertung des von uns erhobenen Datensatzes in Zukunft untersucht werden können.

LITERATURVERZEICHNIS

Literaturverzeichnis

1. Osterholm, M.T., et al., *Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis. 2012 Jan;12(1):36-44. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70295-X. Epub 2011 Oct 25.
2. Goodwin, K., C. Viboud, and L. Simonsen, *Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review*. Vaccine. 2006 Feb 20;24(8):1159-69. Epub 2005 Sep 19.
3. Kreijtz, J.H., R.A. Fouchier, and G.F. Rimmelzwaan, *Immune responses to influenza virus infection*. Virus Res. 2011 Dec;162(1-2):19-30. doi: 10.1016/j.virusres.2011.09.022. Epub 2011 Sep 22.
4. Saisonbericht der Arbeitsgemeinschaft Influenza, R.-K.I. *Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2011/2012*. 2012 [cited 2012 24.09].
5. WHO. *Influenza Laboratory Surveillance Information, FluNet WHO 2011 in Germany*. 2011 [cited 2012 24.09]; Available from: <http://gamapserver.who.int/gareports/Default.aspx?ReportNo=7>.
6. RKI. *Für wen wird die Impfung gegen die saisonale Influenza empfohlen?* 23.09.2011 [cited 2012 25.05]; Available from: http://www.rki.de/clin_162/nn_1270420/SharedDocs/FAQ/Impfen/Influenza/FAQ02.html.
7. Murphy, K.P., ed. *Janeway's Immunobiology*. 8 ed. Vol. 1. 2012, Garland Science, Taylor & Francis Group, LC: New York. 888.
8. Maecker, H.T., J.P. McCoy, and R. Nussenblatt, *Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project*. Nat Rev Immunol. 2012 Feb 17;12(3):191-200. doi: 10.1038/nri3158.
9. Tokoyoda, K., et al., *Organization and maintenance of immunological memory by stroma niches*. Eur J Immunol. 2009 Aug;39(8):2095-9. doi: 10.1002/eji.200939500.
10. Sanz, I., et al., *Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells*. Semin Immunol. 2008 Feb;20(1):67-82. doi: 10.1016/j.smim.2007.12.006. Epub 2008 Feb 6.
11. Yoshida, T., et al., *Memory B and memory plasma cells*. Immunol Rev. 2010 Sep;237(1):117-39. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00938.x.
12. Bohnhorst, J.O., et al., *Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome*. J Immunol. 2001 Oct 1;167(7):3610-8.
13. Buffa, S., et al., *B cell immunosenescence: different features of naive and memory B cells in elderly*. Biogerontology. 2011 Oct;12(5):473-83. doi: 10.1007/s10522-011-9353-4. Epub 2011 Aug 31.
14. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
15. Stockinger, B., M. Veldhoen, and B. Martin, *Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity*. Semin Immunol. 2007 Dec;19(6):353-61. Epub 2007 Nov 26.
16. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature. 1999 Oct 14;401(6754):708-12.
17. Horiuchi, S. and J.R. Wilmoth, *Age patterns of the life table aging rate for major causes of death in Japan, 1951-1990*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1997. **52**(1): p. B67-77.

LITERATURVERZEICHNIS

18. Aspinall, R. and D. Andrew, *Thymic involution in aging*. J Clin Immunol. 2000 Jul;20(4):250-6.
19. Fulop, T., A. Larbi, and G. Pawelec, *Human T Cell Aging and the Impact of Persistent Viral Infections*. Front Immunol. 2013 Sep 13;4:271.
20. DelaRosa, O., et al., *Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity*. Biogerontology. 2006 Oct-Dec;7(5-6):471-81.
21. Brunner, S., et al., *Persistent viral infections and immune aging*. Ageing Res Rev. 2011 Jul;10(3):362-9. doi: 10.1016/j.arr.2010.08.003. Epub 2010 Aug 19.
22. Howard, W.A., K.L. Gibson, and D.K. Dunn-Walters, *Antibody quality in old age*. Rejuvenation Res. 2006 Spring;9(1):117-25.
23. Linton, P.J. and K. Dorshkind, *Age-related changes in lymphocyte development and function*. Nat Immunol. 2004 Feb;5(2):133-9.
24. Weinberger, B., et al., *Healthy aging and latent infection with CMV lead to distinct changes in CD8+ and CD4+ T-cell subsets in the elderly*. Hum Immunol. 2007 Feb;68(2):86-90. Epub 2006 Dec 5.
25. Strindhall, J., et al., *The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: the Swedish HEXA immune study*. Age (Dordr). 2013 Jun;35(3):985-91. doi: 10.1007/s11357-012-9400-3. Epub 2012 Mar 14.
26. Wikby, A., et al., *The immune risk profile is associated with age and gender: findings from three Swedish population studies of individuals 20-100 years of age*. Biogerontology. 2008 Oct;9(5):299-308. doi: 10.1007/s10522-008-9138-6. Epub 2008 Mar 28.
27. Franceschi, C., et al., *Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence*. Ann N Y Acad Sci. 2000 Jun;908:244-54.
28. Trzonkowski, P., et al., *Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence*. Vaccine. 2003 Sep 8;21(25-26):3826-36.
29. Sylwester, A.W., et al., *Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects*. J Exp Med. 2005 Sep 5;202(5):673-85.
30. Derhovanessian, E., A. Larbi, and G. Pawelec, *Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection*. Curr Opin Immunol. 2009 Aug;21(4):440-5. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.012. Epub 2009 Jun 15.
31. Khan, N., et al., *T cell recognition patterns of immunodominant cytomegalovirus antigens in primary and persistent infection*. J Immunol. 2007 Apr 1;178(7):4455-65.
32. Bunde, T., et al., *Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells*. J Exp Med. 2005 Apr 4;201(7):1031-6. Epub 2005 Mar 28.
33. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, *T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design*. Nat Rev Immunol. 2008 Apr;8(4):247-58. doi: 10.1038/nri2274. Epub 2008 Mar 7.
34. Pawelec, G., A. Larbi, and E. Derhovanessian, *Senescence of the human immune system*. J Comp Pathol. 2010 Jan;142 Suppl 1:S39-44. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.09.005. Epub 2009 Nov 8.
35. Rink, L., I. Cakman, and H. Kirchner, *Altered cytokine production in the elderly*. Mech Ageing Dev. 1998 May 15;102(2-3):199-209.

LITERATURVERZEICHNIS

36. Le Saux, S., C.M. Weyand, and J.J. Goronzy, *Mechanisms of immunosenescence: lessons from models of accelerated immune aging*. Ann N Y Acad Sci. 2012 Jan;1247:69-82. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06297.x. Epub 2012 Jan 6.
37. Luttmann W., B.K., Küpper M., Myrtek D., ed. *Der experimentator: Immunologie*. 3 ed. 2009, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 309.
38. Bulati, M., et al., *B cells and immunosenescence: a focus on IgG+IgD-CD27- (DN) B cells in aged humans*. Ageing Res Rev. 2011 Apr;10(2):274-84. doi: 10.1016/j.arr.2010.12.002. Epub 2010 Dec 23.
39. Maecker, H.T., et al., *Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry*. J Immunol Methods. 2001 Sep 1;255(1-2):27-40.
40. Frentsch, M., et al., *CD40L expression permits CD8+ T cells to execute immunologic helper functions*. Blood. 2013 Jul 18;122(3):405-12. doi: 10.1182/blood-2013-02-483586. Epub 2013 May 29.
41. Lang, P.O., et al., *Effectiveness of influenza vaccine in aging and older adults: comprehensive analysis of the evidence*. Clin Interv Aging. 2012;7:55-64. doi: 10.2147/CIA.S25215. Epub 2012 Feb 24.
42. Ellebedy, A.H. and R. Ahmed, *Re-engaging cross-reactive memory B cells: the influenza puzzle*. Front Immunol. 2012;3:53. doi: 10.3389/fimmu.2012.00053.
43. Nakaya, H.I., et al., *Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans*. Nat Immunol. 2011 Jul 10;12(8):786-95. doi: 10.1038/ni.2067.
44. Powers, D.C. and R.B. Belshe, *Vaccine-induced antibodies to heterologous influenza A H1N1 viruses: effects of aging and "original antigenic sin"*. J Infect Dis. 1994 May;169(5):1125-9.
45. Xie, H., et al., *Immunogenicity and cross-reactivity of 2009-2010 inactivated seasonal influenza vaccine in US adults and elderly*. PLoS One. 2011 Jan 31;6(1):e16650. doi: 10.1371/journal.pone.0016650.
46. McElhaney, J.E., et al., *T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly*. J Immunol. 2006 May 15;176(10):6333-9.
47. Wagar, L.E., et al., *Influenza-specific T cells from older people are enriched in the late effector subset and their presence inversely correlates with vaccine response*. PLoS One. 2011;6(8):e23698. doi: 10.1371/journal.pone.0023698. Epub 2011 Aug 22.
48. Targonski, P.V., R.M. Jacobson, and G.A. Poland, *Immunosenescence: role and measurement in influenza vaccine response among the elderly*. Vaccine. 2007 Apr 20;25(16):3066-9. Epub 2007 Jan 16.
49. Wilkinson, T.M., et al., *Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans*. Nat Med. 2012 Jan 29;18(2):274-80. doi: 10.1038/nm.2612.
50. Ouyang, Q., et al., *Dysfunctional CMV-specific CD8(+) T cells accumulate in the elderly*. Exp Gerontol. 2004 Apr;39(4):607-13.
51. Solana, R., et al., *CMV and Immunosenescence: from basics to clinics*. Immun Ageing. 2012 Oct 31;9(1):23. doi: 10.1186/1742-4933-9-23.
52. Bodewes, R., A.D. Osterhaus, and G.F. Rimmelzwaan, *Targets for the induction of protective immunity against influenza a viruses*. Viruses. 2010 Jan;2(1):166-88. doi: 10.3390/v2010166. Epub 2010 Jan 14.
53. de Jong, J.C., et al., *Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus*. Dev Biol (Basel). 2003;115:63-73.
54. He, X.S., et al., *Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination*. J Immunol Methods. 2011 Feb 28;365(1-2):67-75. doi: 10.1016/j.jim.2010.12.008. Epub 2010 Dec 21.

LITERATURVERZEICHNIS

55. Kohler, S., et al., *The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination*. Eur J Immunol. 2012 Sep;42(9):2363-73. doi: 10.1002/eji.201142306. Epub 2012 Aug 6.
56. Whitmire, J.K., et al., *CD40 ligand-deficient mice generate a normal primary cytotoxic T-lymphocyte response but a defective humoral response to a viral infection*. J Virol. 1996 Dec;70(12):8375-81.
57. Pita-Lopez, M.L., et al., *Effect of ageing on CMV-specific CD8 T cells from CMV seropositive healthy donors*. Immun Ageing. 2009 Aug 28;6:11. doi: 10.1186/1742-4933-6-11.
58. Nikolich-Zugich, J., *Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections*. Nat Rev Immunol. 2008 Jul;8(7):512-22. doi: 10.1038/nri2318.
59. Pawelec, G. and E. Derhovanessian, *Role of CMV in immune senescence*. Virus Res. 2011 May;157(2):175-9. doi: 10.1016/j.virusres.2010.09.010. Epub 2010 Oct 1.
60. Onyema, O.O., et al., *Cellular aging and senescence characteristics of human T-lymphocytes*. Biogerontology. 2012 Apr;13(2):169-81. doi: 10.1007/s10522-011-9366-z. Epub 2011 Nov 19.
61. Ouyang, Q., et al., *Age-associated accumulation of CMV-specific CD8+ T cells expressing the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1)*. Exp Gerontol. 2003 Aug;38(8):911-20.
62. Voehringer, D., M. Koschella, and H. Pircher, *Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1)*. Blood. 2002 Nov 15;100(10):3698-702. Epub 2002 Jul 12.
63. Ouyang, Q., et al., *Large numbers of dysfunctional CD8+ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old*. J Clin Immunol. 2003 Jul;23(4):247-57.
64. Fasth, A.E., et al., *Activating NK-cell receptors co-stimulate CD4(+)/CD28(-) T cells in patients with rheumatoid arthritis*. Eur J Immunol. 2010 Feb;40(2):378-87. doi: 10.1002/eji.200939399.
65. Maier, L.M. and D.A. Hafler, *Autoimmunity risk alleles in costimulation pathways*. Immunol Rev. 2009 May;229(1):322-36. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00777.x.
66. Focosi, D., et al., *CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency*. J Leukoc Biol. 2010 Jan;87(1):107-16. doi: 10.1189/jlb.0809566. Epub 2009 Oct 30.
67. Pourgheysari, B., et al., *The cytomegalovirus-specific CD4+ T-cell response expands with age and markedly alters the CD4+ T-cell repertoire*. J Virol. 2007 Jul;81(14):7759-65. Epub 2007 Apr 4.
68. van Bergen, J., et al., *Phenotypic and functional characterization of CD4 T cells expressing killer Ig-like receptors*. J Immunol. 2004 Dec 1;173(11):6719-26.
69. Sandberg, J.K., N.M. Fast, and D.F. Nixon, *Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes*. J Immunol. 2001 Jul 1;167(1):181-7.
70. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. Blood. 2006 Jun 15;107(12):4781-9. Epub 2006 Feb 7.
71. Mackay, L.K., et al., *Maintenance of T cell function in the face of chronic antigen stimulation and repeated reactivation for a latent virus infection*. J Immunol. 2012 Mar 1;188(5):2173-8. doi: 10.4049/jimmunol.1102719. Epub 2012 Jan 23.
72. Nebbia, G., et al., *Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4+ and pp65 CD8+ T cells protect against high-level replication after liver transplantation*. Am J

LITERATURVERZEICHNIS

Transplant. 2008 Dec;8(12):2590-9. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02425.x.
Epub 2008 Oct 6.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, **Cecilia Bozzetti**, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Charakterisierung von altersabhängigen immunologischen Signaturen nach Influenza-Impfung** 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM 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 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.“

29. September 2014

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

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

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Thiel möchte ich zunächst für die Bereitstellung dieser Arbeit und für seine Fähigkeit ein inspirierendes wissenschaftliches Umfeld zu schaffen danken.

Mein Dank gilt zudem den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Thiel, die mir die Einarbeitung in die Laborarbeit einfach gestalteten und jederzeit für konstruktive Kritik zur Verfügung standen. Insbesondere geht mein Dank an Axel Schulz und Dr. Sarah Meier, durch deren Supervision mein fachliches und praktisches Verständnis der Thematik kontinuierlich verbessert wurde. Ein besonderer Dank auch an Julia Mälzer und Dominika Rachwalik, die durch ihre Arbeit und Unterstützung den Rahmen für das erfolgreiche Gelingen dieser Dissertation schafften.

Meinem Mann Lars danke ich für seine stetige Unterstützung, seinen nicht endenden Motivationsgeist und sein Vertrauen in mich, ohne den dieses gesamte Vorhaben nicht möglich gewesen wäre. Meiner Tochter Elisabeth möchte ich meinen Dank ausdrücken: Ihre Geburt hat unglaublich große Freude in unser Leben gebracht.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die immer an mich geglaubt haben. Dafür, dass sie für die Freiheit und die Mittel zur optimalen Gestaltung meines beruflichen als auch persönlichen Lebens immer mit ihrer uneigennütigen Liebe gesorgt haben, bin ich ihnen sehr dankbar.