

Aus dem Bereich Klinische Medizin  
Fachrichtung Infektionsmedizin  
Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung der spezifischen Immunantwort gegen Herpesviren und die  
Entwicklung und Anwendung eines neuen Stimulationsverfahrens zum  
Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von

**David Schub**

geb. am 06.01.1987 in Saarbrücken

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	8
2	Summary .....	10
3	Abkürzungsverzeichnis.....	12
4	Einleitung.....	15
4.1	Das Immunsystem .....	15
4.1.1	Die humorale adaptive Immunantwort .....	15
4.1.2	Die zelluläre adaptive Immunantwort und die Antigen-Präsentation.....	16
4.2	Die Familie der Herpesviren .....	19
4.2.1	Humane Alphaherpesviren.....	20
4.2.2	Das humane Cytomegalievirus und seine Rolle bei Organtransplantationen ...	22
4.3	Patientengruppen mit erhöhtem Risiko für Herpesvirus-Infektionen und -Reaktivierungen sowie für die damit verbundenen Komplikationen.....	23
4.3.1	Rheumatische Erkrankungen und deren Therapie .....	24
4.4	Die Herpesvirus-spezifische Immunantwort .....	27
4.4.1	Verfahren zum Nachweis der spezifischen humoralen Immunantwort.....	28
4.4.2	Verfahren zur Analyse der spezifischen zellulären Immunantwort.....	28
4.5	Diagnostik der Alphaherpesvirus-Infektion bei Beteiligung des zentralen Nervensystems.....	34
4.6	Therapie und Prophylaxe bei Infektionen mit humanen Herpesviren (VZV, HSV und CMV) .....	37
4.7	Ziele dieser Arbeit.....	38
5	Material und Methoden.....	41
5.1	Geräte, Materialien und Reagenzien.....	41
5.1.1	Liste der verwendeten Antikörper .....	41
5.1.2	Geräte und Materialien .....	42

5.1.3	Chemikalien und Kits .....	43
5.1.4	Übersicht über die verwendeten Antigene.....	45
5.1.5	Zusammensetzung der Puffer und Medien .....	46
5.1.6	Medikamentenliste für in vitro-Experimente .....	46
5.1.7	Übersicht über die verwendete Software.....	47
5.2	Probanden- und Patientenkollektiv.....	47
5.2.1	Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort bei nicht-symptomatischen und symptomatischen Personen.....	48
5.2.2	Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen .....	50
5.2.3	Charakterisierung der HSV-spezifischen Immunantwort bei nicht-symptomatischen und symptomatischen Personen.....	52
5.2.4	Probanden- und Patientenkollektiv zur Entwicklung eines neuen Analyseverfahrens zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten .....	54
5.2.5	Patientenkollektiv zur Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort in Patienten mit ZNS-Infektion.....	54
5.2.6	Personenkollektiv zur Analyse des Effekts der Harnstoffbehandlung von Proteinen und Zelllysaten auf die Induktion Antigen-spezifischer Immunantworten ....	57
5.3	Quantifizierung und Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen aus Vollblut (Kurzzeit-Stimulationsmethode) .....	59
5.3.1	Antigen-spezifische T-Zell-Stimulation aus Vollblut.....	59
5.3.2	Erythrozytenlyse und Fixierung der Leukozyten .....	61
5.3.3	Intrazelluläre T-Zell-Färbung .....	61
5.4	Nachweisverfahren zur simultanen Analyse Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten und Blut .....	63
5.4.1	Isolierung der Immunzellen aus Cerebrospinalflüssigkeit .....	63

5.4.2	Vorfärbung der Immunzellen aus Cerebrospinalflüssigkeit.....	64
5.4.3	Simultane Stimulation von Immunzellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten und Blut (Ko-Inkubation) .....	64
5.4.4	Quantifizierung von Immunzellen in Cerebrospinalflüssigkeit und Blut .....	65
5.4.5	Protokollabweichungen bei der Isolierung von Immunzellen aus anderen extrasanguinen Flüssigkeiten .....	66
5.5	Isolierung von PBMCs aus Vollblut über einen Dichtegradienten .....	67
5.6	Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen aus isolierten Zellpopulationen.....	67
5.7	Isolierung von T- und B-Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung .....	68
5.8	Magnetische Isolierung von CD14 <sup>+</sup> -Monozyten unter Verwendung von CD14-„MicroBeads“ .....	69
5.8.1	Magnetische Markierung von CD14-positiven Monozyten .....	70
5.8.2	Magnetische Isolierung der markierten CD14 <sup>+</sup> -Monozyten mit einer Säule.....	70
5.9	Analyse der Antigen-spezifischen Proliferation von T-Zellen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs CFSE .....	70
5.9.1	Markierung von isolierten PBMCs mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE .....	71
5.9.2	Stimulation CFSE-markierter Immunzellen.....	72
5.9.3	Ernte CFSE-markierter Immunzellen und Markierung mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern .....	72
5.10	Analyse der Antigen-spezifischen Proliferation unter Verwendung von BrdU und der späten IFN $\gamma$ -Expression.....	73
5.11	(Vor-) Inkubation von Immunzellen mit Antirheumatika/Immunsuppressiva .....	74
5.12	Quantifizierung CMV-spezifischer Immunzellen mit der ELISpot-Technologie.....	75
5.13	Quantitative Bestimmung Erreger-spezifischer Antikörper mittels ELISA .....	76
5.14	Statistische Analysen .....	77
5.14.1	Bestimmung der Nachweisgrenzen für VZV- bzw. HSV-spezifische T-Zellen.....	77
5.14.2	Einschlusskriterien für die T-Zellfunktionalitätsanalysen .....	77

5.14.3	Einschlusskriterien zur Berechnung der Veränderungen der IFN $\gamma$ - und der CTLA-4-Expressionsdichte .....	78
5.14.4	Statistische Testverfahren.....	78
6	Ergebnisse .....	80
6.1	Charakterisierung VZV-spezifischer Immunantworten bei asymptomatischen und symptomatischen Patienten .....	80
6.1.1	Ausgeprägte phänotypische und funktionelle Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort in asymptomatischen Personen gegenüber Patienten mit Herpes Zoster .....	80
6.1.2	Fallbericht: Die VZV-spezifische Immunantwort bei VZV-Primärinfekt zeigt funktionelle und phänotypische Charakteristika wie bei Personen mit akuter VZV-Reaktivierung.....	97
6.1.3	Charakteristische Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort einer 34-jährigen Probandin nach einer Masern-Mumps-Röteln-Varizellen (MMRV)-Impfung .....	99
6.1.4	Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen .....	101
6.2	Charakterisierung der humoralen und zellulären Immunität gegen die Alphaherpesviren Herpes-Simplex Virus 1 und 2 (HSV).....	115
6.2.1	Die HSV-spezifische Immunantwort immungesunder Probanden ist altersabhängig und zeigt eine gute Korrelation zwischen den T-Zellfrequenzen und den Antikörperlevels .....	115
6.2.2	Die zelluläre Immunantwort zeigt insgesamt keine deutlichen HSV-spezifischen Veränderungen bei Probanden mit eingeschränkter Immunfunktion .....	117
6.2.3	Die Frequenz, die Zytokinexpression und der Phänotyp der HSV-spezifischen Immunantwort zeigen während einer akuten HSV-Reaktivierung keine charakteristischen Veränderungen .....	121
6.2.4	Die HSV-spezifische Immunantwort wird bei einem akuten Herpes Zoster nur bei wenigen Personen beeinflusst .....	123

6.3	Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten .....	126
6.3.1	Entwicklung eines neuen Analyseverfahren zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen aus Cerebrospinalflüssigkeit.....	126
6.3.2	Kontrollexperimente zur Validierung des Analyseverfahrens zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten .....	132
6.3.3	Anwendung des neu entwickelten simultanen Stimulationsverfahrens zur Analyse anderer extrasanguiner Flüssigkeiten .....	137
6.4	Analyse und Charakterisierung Virus-spezifischer T-Zellen aus Blut und CSF von Patienten mit Entzündungen des ZNS.....	142
6.4.1	Die VZV-spezifische Immunantwort in Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen zeigt charakteristische Merkmale in CSF und Blut .....	142
6.4.2	Die HSV-spezifische T-Zellfrequenz eines Patienten mit HSV-bedingter Enzephalitis ist in der CSF stark erhöht.....	147
6.5	Analyse des Effekts der Harnstoffbehandlung einzelner Proteine oder gesamter Zellysate auf die induzierte Antigen-spezifische Immunantwort .....	149
6.5.1	Analyse Harnstoff-behandelter CMV-Proteine (pp65 und IE-1) hinsichtlich ihres Potentials simultan CMV-spezifische CD4 und CD8 Immunantworten zu induzieren ..	149
6.5.2	Die Temperatur-abhängige Harnstoffbehandlung kommerziell erhältlicher Lysate hat keinen positiven Effekt auf die induzierten VZV- bzw. CMV-spezifischen T-Zellfrequenzen .....	159
6.5.3	Vergleichende Analyse zweier CMV-Lysate mit und ohne Harnstoffbehandlung und Immunogenitätsbestimmung des pp65- und IE-1-Proteins unter Verwendung von Virus-Deletionsmutanten .....	161
7	Diskussion.....	165
7.1	Phänotyp und Funktionalität der VZV-spezifischen Immunantwort in Phasen ohne oder mit akuter VZV-Replikation.....	165
7.2	Anwendungsmöglichkeiten des Vollblut-basierten Tests zum Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen.....	172

7.3	Einfluss der anti-rheumatischen Therapie auf die VZV-spezifische T-Zellfrequenz	173
7.4	Die VZV-spezifische Immunantwort bei Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen .....	177
7.5	Phänotyp und Funktionalität der HSV-spezifischen Immunantwort in der Latenzphase und während akuter HSV-Reaktivierung .....	181
7.6	Verbesserung der Nachweisbarkeit Antigen-spezifischer T-Zellen in verschiedenen extrasanguinen Flüssigkeiten durch die Ko-Inkubation mit Blut .....	185
7.7	Nur marginaler Effekt der Harnstoffbehandlung auf die Immunogenität von CMV-Proteinen und -Lysaten .....	190
7.8	Limitierungen dieser Arbeit .....	193
7.9	Fazit .....	194
8	Literaturverzeichnis .....	196
9	Abbildungsverzeichnis .....	210
10	Tabellenverzeichnis .....	213
11	Publikationen, Patent und wissenschaftliche Konferenzen .....	214
11.1	Publikationen .....	214
11.1.1	Publikationen/Patente dieser Dissertation .....	214
11.1.2	Weitere Publikation .....	214
11.1.3	Manuskripte in Vorbereitung .....	214
11.2	Präsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen .....	215
11.2.1	National .....	215
11.2.2	International .....	215
12	Danksagung .....	217
13	Lebenslauf .....	219

# 1 Zusammenfassung

Herpesviren persistieren nach der Primärinfektion lebenslang im infizierten Wirtsorganismus und bedürfen daher einer lebenslangen Kontrolle durch das Immunsystem. Besonders die Quantität und Qualität der Erreger-spezifischen zellulären Immunantwort ist dabei von entscheidender Bedeutung für die effektive Erregerkontrolle. Bei immunbeeinträchtigten Patienten, wie z.B. Hämodialyse-Patienten, Transplantat-Empfängern und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen, ist diese jedoch häufig ebenfalls beeinträchtigt, sodass es vermehrt zu Reaktivierungen der Herpesviren mit teils schwerwiegenden Komplikationen kommt. Insbesondere die Alphaherpesvirus-spezifische Immunantwort wurde bislang jedoch in diesen Patienten noch nicht systematisch analysiert.

Ein Ziel dieser Arbeit war somit die spezifisch gegen das Varizella-Zoster Virus (VZV) bzw. die beiden Herpes-Simplex Viren 1 und 2 (HSV) gerichtete zelluläre Immunantwort funktionell und phänotypisch zu charakterisieren. Dabei sollten immunologische Marker identifiziert werden, die mit einer effektiven Erreger-Kontrolle einhergehen. Zudem sollte der Einfluss einer immunsuppressiven und/oder anti-rheumatischen Therapie auf diese Immunantworten evaluiert werden. Neben der Analyse der Immunantwort im Blut sollte bei Patienten mit VZV-bedingten Infektionen des zentralen Nervensystems (ZNS) eine Analyse der Immunzellen vom Ort des Infektgeschehens durchgeführt werden. Zur Optimierung der Stimulationsbedingungen Antigen-spezifischer T-Zellen *in vitro* sollte am Beispiel der Cytomegalievirus (CMV) Infektion der Effekt einer Harnstoffbehandlung von viralen Proteinen und -Lysaten auf die Induktion einer Antigen-spezifische T-Zellantwort untersucht werden. Die T-Zellanalysen wurden dabei mit durchflusszytometrischen Methoden und dem ELISpot-Verfahren durchgeführt, wohingegen die Serologie mittels ELISA bestimmt wurde.

Im Vergleich zu nicht-symptomatischen Personen konnten in Patienten mit akutem Herpes Zoster deutliche Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort hinsichtlich der Frequenz, dem Anteil multifunktionaler bzw. ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierender T-Zellen, sowie der Expression der Oberflächenmarker CD127, CTLA-4 und PD-1 nachgewiesen werden.

In Patienten mit rheumatischer Arthritis, die unter der Biologika-Therapie (IL-6-Rezeptor-Blocker bzw. TNF-Blocker) waren, konnten verglichen mit immungesunden Probanden verringerte VZV-spezifische T-Zellfrequenzen nachgewiesen werden, die die erhöhte Zosterinzidenz dieser Patienten begünstigen könnten. Da die Patienten zum Zeitpunkt der Analyse asymptomatisch waren, konnten funktionelle und phänotypische Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort hingegen nicht identifiziert werden.

Die HSV-spezifische Immunantwort in nicht-symptomatischen Personen zeigte ähnliche funktionelle und phänotypische Eigenschaften wie die VZV-spezifische Immunantwort, jedoch waren bei akuter HSV-Reaktivierung keine immunologischen Veränderungen nachweisbar. Die bei einem Teil der Patienten mit akuter VZV-Reaktivierung nachweisbaren „Zoster-assoziierten“-Veränderungen in der HSV-spezifischen Immunantwort lassen Kreuzreaktivitäten der HSV- und VZV-spezifischen CD4 T-Zellen dieser Personen vermuten.

Durch ein in dieser Arbeit neu entwickeltes und patentiertes Nachweisverfahren zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten, wie z.B. der Cerebrospinal- (CSF), der Aszites- und der Blasenspülflüssigkeit, konnten VZV-spezifische Immunzellen am Ort des Infektgeschehens (CSF) und im Blut von Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen simultan analysiert werden. Im Vergleich zu Patienten mit anderen ZNS-Infektionen oder -Entzündungen waren die VZV-spezifische Frequenz und die CTLA-4-Expression sowohl im Blut als auch in der CSF von Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen signifikant erhöht. Zudem war in der CSF dieser Patienten eine deutliche lokale Anreicherung der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen gegenüber dem Blut nachweisbar.

Die Analysen des Effekts der Harnstoffbehandlung von CMV-Proteinen und -Lysaten auf die induzierte CMV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellantwort verdeutlichte, dass die Harnstoffbehandlung lediglich einen marginalen Effekt auf die Stimulierbarkeit hat.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit immunologische Parameter identifiziert und neue Methoden zur Identifizierung Antigen-spezifischer Immunzellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten entwickelt und evaluiert. Diese können zur Identifizierung des individuellen Infektrisikos und zum Monitoring der antiviralen Therapie bei akuten Reaktivierungskomplikationen Anwendung finden bzw. zur Diagnostik und zur Identifizierung verschiedener Infektions-auslösender Erreger beitragen.

## 2 Summary

### **Characterization of the specific immune response towards herpesviruses and the development and application of a new stimulatory approach for the detection of antigen-specific immune cells from extrasanguinous fluids**

After primary infection, herpesviruses establish persistence in the infected host organism therefore requiring lifelong control by the immune system. Both the quantity and quality of pathogen-specific cellular immune response are particularly important for the effective control of the pathogen. However, in immunocompromised patients such as hemodialysis patients, transplant recipients and patients with rheumatic diseases, these specific cellular immune responses are often impaired, leading to an increase in herpesvirus reactivations which can be accompanied by severe complications. Up to now, specific immune responses towards particularly alphaherpesviruses have not been studied systematically in these patients.

Therefore one aim of this work was the functional and phenotypical characterization of the specific cellular immune responses towards the varicella-zoster virus (VZV) and the herpes-simplex viruses 1 and 2 (HSV) and the identification of immunological markers for effective virus control. Furthermore the effect of immunosuppressive and/or anti-rheumatic therapy on these immune responses should be evaluated. In patients with VZV-induced infection of the central nervous system (CNS), immune cells should be analyzed in blood and additionally directly from the site of infection. To optimize stimulatory conditions for detection of antigen-specific T cells *in vitro*, Cytomegalovirus (CMV) infection was used as an example to assess the effect of urea treatment of viral proteins and lysates on the induction of antigen-specific T-cell responses. T-cell analyses were performed using flow cytometric methods and the ELISpot technology, whereas serology was determined by ELISA.

In comparison to non-symptomatic individuals, VZV-specific immune responses in patients with active herpes zoster were clearly altered in frequency, proportion of multifunctional or exclusively IFN $\gamma$ -expressing T cells, as well as in the expression of the surface markers CD127, CTLA-4 and PD-1.

Compared with immunocompetent individuals, patients with rheumatic arthritis under therapy with biologicals (IL-6-receptor-blocker or TNF-blocker) showed lower VZV-specific

T-cell-frequencies potentially accounting for the increased zoster incidence in these patients. In contrast, in line with the absence of clinical symptoms at the time of analysis, no functional and phenotypical differences in VZV-specific immune responses were detected.

The HSV-specific immune response in non-symptomatic individuals showed functional and phenotypical properties similar to the VZV-specific immune response; however during active HSV-reactivation no immunological changes were detectable. However, as some patients with active VZV-reactivation showed “zoster-associated” changes in their HSV-specific immune response, this may suggest some extent of cross-reactivity between HSV- and VZV-specific CD4 T cells in these patients.

Using a new approach for the improved detection of antigen-specific immune cells from extrasanguinous fluids (cerebrospinal fluid (CSF), ascites and bladder wash fluid, respectively) which was developed and patented as a part of this thesis, VZV-specific immune cells from site of infection (CSF) and in blood from patients with VZV-induced CNS infections could be analyzed simultaneously. In comparison to patients with other CNS infections or inflammations unrelated to VZV, VZV-specific CD4 T-cell frequencies and CTLA-4 expression in both blood and in the CSF were significantly higher in patients with VZV-induced CNS infections. Moreover, the CSF from these patients was clearly enriched for VZV-specific CD4 T cells as compared to blood.

The analysis of the urea-treatment effect of CMV proteins and lysates on the induction of CMV-specific CD4 and CD8 T-cell responses showed only marginal effects on the stimulatory capacity of the antigens.

In conclusion, in this work, immunological parameters were identified and novel approaches for the detection of antigen-specific immune cells from extrasanguinous fluids were developed and evaluated. These may be applied for identification of the individual risk of infection and monitoring of antiviral therapy during complications in active reactivations or may contribute to diagnostics and identification of various infection-causing pathogens.

### 3 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
ACPA	anti-citrullinierte Peptid-Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APC-H7	Allophycocyanin-Hilite 7
AS	Spondylitis Ankylosans (Morbus Bechterew)
ASI	Antikörper-spezifischer Index
AUC	„area under the curve“
BFA	Brefeldin A
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
BSF	Blasenspülflüssigkeit
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CFP-10	„culture filtrate protein 10“
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CMV	Cytomegalievirus
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit, Liquor
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4, „cytotoxic T-lymphocyte antigen 4“
CyA	Cyclosporin A
DAS28	„Disease activity score 28“
DC	Dendritische Zelle
DMARD	„Disease-modifying anti-rheumatic drugs“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESAT-6	„soluble early secretory antigenic target 6“
FACS	Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren (Durchflusszytometrie)
FCS	fetales Kälberserum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gln	Glutamin
HD	Hämodialyse-Patient
HSA	humanes Serumalbumin
HSV	Herpes-Simplex Virus
IE-1	„immediate-early protein 1“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMRV-Vakzine	Masern-Mumps-Röteln-Varizellen-Vakzine
MP	Methylprednisolon
MTX	Methotrexat
MW	Mittelwert
NG	Nachweisgrenze
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Ammoniumhydrogencarbonat
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD-1	„programmed cell death 1“
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PFA	Paraformaldehyd
PHN	Postherpetische Neuralgie
pp65	65kDa Phosphoprotein
PPD	„purified protein derivative“
PSA	Psoriasis Arthritis

RA	rheumatoide Arthritis
RD	Rheumatische Erkrankungen, „rheumatic diseases“
ROC	„Receiver Operator Characteristics“
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
SEB	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B
SPA	(seronegative) Spondyloarthritiden
StabW	Standardabweichung
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tx	Transplantat-Empfänger
V450	Fluorochrom mit Emissionsmaximum bei 450nm
V500	Fluorochrom mit Emissionsmaximum bei 500nm
VZV	Varizella-Zoster Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 4 Einleitung

### 4.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist für die Abwehr unterschiedlichster Pathogene und körperfremder Moleküle verantwortlich. Ein Teil dieses Immunsystems ist das angeborene Immunsystem. Dieses besteht unter anderem aus unterschiedlichen Zelltypen wie den natürlichen Killerzellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten sowie einer Vielzahl von löslichen Proteinen, die beispielsweise dem Komplementsystem angehören. Das angeborene Immunsystem wirkt unerwünschten Mikroorganismen sehr schnell, jedoch Erreger-unpezifisch entgegen. Auf diese Weise können Erreger teilweise vollständig eliminiert werden oder in der frühen Phase der Infektion in ihrer Vermehrung behindert werden, bis eine Erreger-spezifische Immunantwort aufgebaut ist. Dieser Erreger-spezifische Arm des Immunsystems ist die adaptive Immunantwort, die bei der direkten und auch langfristigen Bekämpfung von Pathogenen von zentraler Bedeutung ist. Sie zeichnet sich besonders dadurch aus, dass bei einem primären Erregerkontakt eine Immunantwort aufgebaut wird, die spezifisch gegen diesen Erreger gerichtet ist und diesen bei einem erneuten Kontakt schneller und effizienter bekämpfen kann. Diese „Lernfähigkeit“ wird auch bei der Immunisierung mit Impfstoffen, die entweder abgetötete Erreger (Tot-Impfstoff) oder Erreger mit abgeschwächter Pathogenität beinhalten (Lebend-Impfstoff), ausgenutzt, um eine Erreger-spezifische Immunantwort zu induzieren, ohne dass der Zielorganismus in Kontakt mit den hochinfektiösen und teilweise lebensbedrohlichen Wildtypereagern kommen muss. Die zellulären Hauptkomponenten dieses adaptiven Immunsystems sind die B-Zellen und die T-Zellen, die in den primären Lymphorganen, dem Knochenmark bzw. dem Thymus entstehen. Sie sind gemeinsam für eine effektive Erreger-Eliminierung verantwortlich und werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert. Dabei wird zunächst auf die B-Zellen eingegangen, die die wichtigste humorale Komponente des adaptiven Immunsystems darstellen und Antikörper produzieren.

#### 4.1.1 Die humorale adaptive Immunantwort

Die humorale adaptive Immunantwort wird durch Antikörper vermittelt, die von Plasmazellen produziert werden, die sich aus naiven B-Zellen entwickeln. Typisches Merkmal naiver B-Zellen ist der B-Zell-Rezeptor, der in der Zellmembran verankert ist. Bei Kontakt des

B-Zell-Rezeptors mit einem Antigen, welches in löslicher Form vorliegen muss und keiner vorherigen Prozessierung in kleine Peptide bedarf, kommt es zur Aktivierung der B-Zelle und zur Differenzierung in eine Plasmazelle, die dann hauptsächlich für die Antikörper-Produktion verantwortlich ist. Je nach Antigen ist die Beteiligung von T-Zellen für eine erfolgreiche Aktivierung der B-Zelle notwendig.

Ein Teil dieser aktivierten B-Zellen differenziert sich zudem in B-Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger eine schnellere Antikörperbildung ermöglichen. B-Zellen besitzen darüber hinaus die Fähigkeit zur Antigen-Präsentation, die jedoch eingeschränkt ist, da sie im Gegensatz zu anderen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) ausschließlich die Antigene aufnehmen, prozessieren und präsentieren können, die sie zuvor mit ihrem B-Zell-Rezeptor erkannt haben.

#### **4.1.2 Die zelluläre adaptive Immunantwort und die Antigen-Präsentation**

Charakteristisches Merkmal aller T-Zellen ist der T-Zell-Rezeptor (TCR) an der Zelloberfläche, der bei der Aktivierung der T-Zellen von zentraler Bedeutung ist. Darüber hinaus besitzen die T-Zellen weitere Oberflächenmoleküle anhand derer sie in T-Helferzellen (CD4 T-Zellen) und zytotoxische T-Zellen (CD8 T-Zellen) unterteilt werden können. Letztere können z.B. durch die Ausschüttung verschiedener löslicher Moleküle wie Granzyme und Perforin sowie über Bindung des Fas-Rezeptors an seinen Liganden (FasL) in einer Zielzelle die Apoptose einleiten (BARRY, BLEACKLEY, 2002).

Da der Fokus dieser Arbeit hauptsächlich auf der Charakterisierung der CD4 T-Zellen liegt, werden die Funktionen und die Fähigkeiten dieser Zellen im Folgenden detailliert beschrieben. CD4 T-Zellen werden in weitere Subpopulationen eingeteilt, von denen jede ein für diese Gruppe charakteristisches Spektrum an Zytokinen exprimiert. Diese Zytokine sind Effektormoleküle, die maßgeblich an der Regulierung der Immunreaktion beteiligt sind und somit auch für eine effiziente Erreger-spezifische Immunantwort unabdingbar sind. Dies gründet sich in besonderem Maße auf ihrer Fähigkeit, die Proliferation und die Differenzierung der Immunzellen zu beeinflussen (KAPLAN et al., 2015).

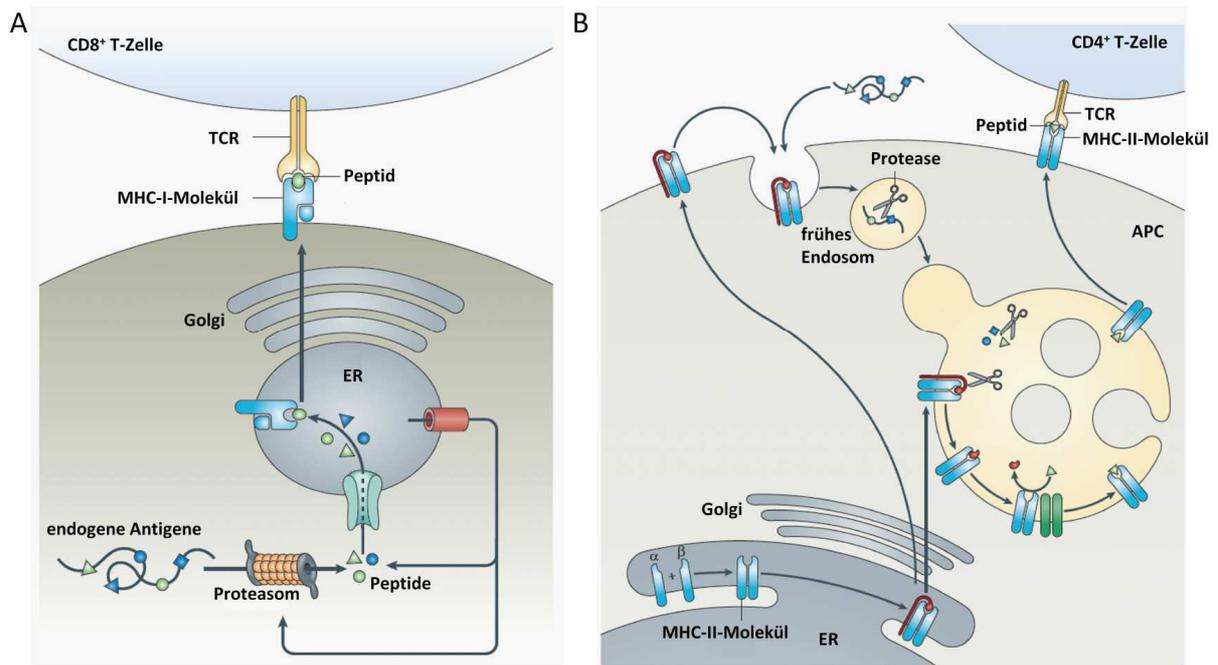
T-Helfer 1 ( $T_H1$ )-Zellen produzieren unter anderem das Zytokin Interferon (IFN)  $\gamma$ , das für die Immunfunktion gegen alle viralen und einige bakterielle Erreger von entscheidender Bedeutung ist und das Leitzytokin der  $T_H1$ -Antwort darstellt (ZHU et al., 2010). Des Weiteren

führt dies dazu, dass Makrophagen aktiviert, die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klassen I und II hochreguliert, sowie weitere Immunzellen angezogen werden. Darüber hinaus hemmt eine gesteigerte IFN $\gamma$ -Expression die Immunantwort von T-Helfer 2 (T<sub>h</sub>2)-Zellen. Des Weiteren sezernieren T<sub>h</sub>1-Zellen das Interleukin (IL)-2, das für die B- und T-Zellproliferation essentiell ist, und den Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ , den Hauptmediator der Entzündungsreaktion und Aktivator von Makrophagen (MURPHY et al., 2009).

T<sub>h</sub>2-Zellen sind hauptsächlich an der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen beteiligt und regulieren über die Expression von IL-4 die Makrophagenaktivierung herunter, wodurch sie auch eine anti-inflammatorische Wirkung haben. Die T-Helfer 17 (T<sub>h</sub>17)-Zellen, die eine weitere Untergruppe der CD4 T-Zellen sind, sezernieren typischerweise IL-17. Sie sind an der Abwehr bakterieller Pathogene beteiligt, sind jedoch auch mit autoimmunen Erkrankungen assoziiert (HARRINGTON et al., 2005; WILKE et al., 2011).

Damit T-Zellen Antigen-spezifisch aktiviert werden, müssen die Antigene zunächst von APCs, zu denen Monozyten, Dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen sowie in eingeschränktem Maße auch B-Zellen gehören, zu kurzen Peptiden verarbeitet werden, um dann anschließend durch MHC-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert zu werden. Abbildung 1 liefert einen Überblick über den allgemeinen Ablauf der Antigenpräsentation an CD8 und CD4 T-Zellen.

Bei endogenen Antigenen, die sich im Zytoplasma der Zelle befinden, erfolgt die Prozessierung im Proteasom. Die dadurch entstandenen Peptide werden in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, dort auf MHC-Moleküle der Klasse I geladen und dann über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Dort können sie von spezifischen CD8 T-Zellen erkannt werden, wodurch eine Stimulierung dieser Zellen induziert wird (Abbildung 1A). Exogene Antigene werden über Endozytose in die Zelle aufgenommen und in den Endosomen zu Peptiden prozessiert. Dort erfolgt die Beladung dieser Peptide auf MHC-Moleküle der Klasse II, die anschließend zusammen zur Zelloberfläche transportiert werden. Dort können sie von spezifischen CD4 T-Zellen erkannt werden, die dadurch aktiviert und stimuliert werden (Abbildung 1B).



**Abbildung 1: Übersicht über den allgemeinen Ablauf der Antigen-Präsentation von endogenen und exogenen Antigenen.** (A) Endogene Antigene, die sich im Zytoplasma der Zelle befinden, werden im Proteasom zu Peptiden prozessiert und anschließend im Endoplasmatischen Retikulum (ER) auf MHC-Moleküle der Klasse I geladen. Vom ER ausgehend wird der MHC-Peptid-Komplex über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert, wo die Peptide präsentiert werden und durch spezifische CD8 T-Zellen erkannt werden können. (B) Exogene Antigene werden endozytotisch in die Antigen-präsentierende Zelle (APC) aufgenommen und in den Endosomen durch Proteasen zu kleinen Peptiden prozessiert. Die MHC-II-Moleküle werden vom ER zu den Endosomen transportiert, wo sie mit den Peptiden beladen werden und anschließend als MHC-II-Peptid-Komplexe zur Zelloberfläche transportiert werden. Sind CD4 T-Zellen mit dem entsprechenden spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) vorhanden, binden diese an den MHC-II-Peptid-Komplex, was zu einer Aktivierung der CD4 T-Zellen führt. Abbildung übersetzt nach (NEEFJES et al., 2011).

Neben diesen beiden Prozessierungswegen können auch exogene Antigene nach Aufnahme in die Zelle über Kreuzpräsentation dem MHC-Klasse I Signalweg zugeführt werden, wodurch auch durch exogene Antigene eine CD8 T-Zellantwort induziert werden kann (HEATH et al., 2004).

Die zur Zelloberfläche transportierten MHC-Peptid-Komplexe werden durch spezifische TCRs erkannt und führen zur Antigen-abhängigen Aktivierung der CD4 oder CD8 T-Zelle. Die Primärinduktion naiver T-Zellen erfolgt in den sekundären Lymphorganen. Bei der Primärinduktion wird zur Aktivierung zudem ein ko-stimulatorisches Signal benötigt, welches durch die Bindung des CD28-Moleküls der T-Zelle an den CD80/86-Komplex der APC hervorgerufen wird. Diese führt zur klonalen Expansion von Effektor-T-Zellen, die dann, ausgehend von den sekundären Lymphorganen, zum Ort des Infektgeschehens wandern und dort den Erregern entgegenwirken. Diese spezifischen T-Zellen können durch die Bindung

des TCR an den MHC-Peptid-Komplex erneut aktiviert werden, ohne dass dafür ein ko-stimulatorisches Signal erforderlich ist.

Darüber hinaus können Bestandteile mancher bakterieller Erreger wie z.B. das *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB), eine polyklonale T-Zellstimulation erzeugen. Dabei bedürfen diese als Superantigene bezeichneten Stimuli keiner vorherigen Prozessierung in kleine Peptide, sondern können eine direkte Verbindung zwischen den MHC-Molekülen einer Zelle und einer bestimmten Untereinheit des TCRs ( $V_{\beta}$ -Kette) herstellen, die zu einer Antigen-unabhängigen Aktivierung der T-Zelle führt (KAPPLER et al., 1989; DELLABONA et al., 1990).

Unabhängig davon, ob die T-Zellaktivierung Antigen-abhängig oder -unabhängig (polyklonal) induziert wird, führt diese Stimulation zur Aktivierung der Zelle, die durch die vermehrte Expression von Aktivierungsmarkern wie z.B. dem CD69-Molekül an der Zelloberfläche gekennzeichnet ist (SIMMS, ELLIS, 1996). Des Weiteren werden zahlreiche Zytokine und weitere Botenstoffe induziert, die in diesem Abschnitt bereits beschrieben wurden. Im weiteren Verlauf kommt es durch Proliferation zur klonalen Expansion der T-Zellen. Aktivierung, Zytokininduktion und Proliferation können auch experimentell zur Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen gegen einzelne Erreger genutzt werden.

#### **4.2 Die Familie der Herpesviren**

Herpesviren besitzen einen Durchmesser von 150nm bis 200nm. Ihr doppelsträngiges DNA-Genom, das über den „Rolling Circle“-Mechanismus repliziert wird, wird von einem Capsid umhüllt und somit vom angrenzenden Tegument abgegrenzt. Das Genom codiert für Strukturproteine und zahlreiche regulatorische Proteine, die unter anderem für die Virusreplikation von entscheidender Bedeutung sind. Die äußere Hüllmembran des Viruspartikels besteht aus unterschiedlichen Glykoproteinen, die häufig Angriffspunkte der Erreger-spezifischen Immunantwort, insbesondere von neutralisierenden Antikörpern, darstellen (MODROW et al., 2010).

Ein typisches Merkmal aller Herpesviren ist deren lebenslange Persistenz im infizierten Organismus nach der Primärinfektion. Folglich ist eine lebenslange Kontrolle des Virus durch das Immunsystem des Wirts unabdingbar um eine erneute Vermehrung der Viren zu verhindern. Diese Reaktivierungen führen besonders bei Personen mit beeinträchtigter Immunfunktion häufig zu wiederkehrenden Infektepisoden. Allgemein werden Herpesviren

unter anderem aufgrund der von ihnen infizierten Zelltypen und ihrer pathogenen Eigenschaften in drei Subfamilien Alpha-, Beta- und Gammaherpesviren eingeteilt, wobei im Folgenden besonders auf die humanen Vertreter der Alpha- und Betaherpesviren genauer eingegangen wird (MODROW et al., 2010).

#### **4.2.1 Humane Alphaherpesviren**

Zur Unterfamilie der Alphaherpesviren gehören die Herpes-Simplex Viren 1 und 2 (HSV-1 und -2) sowie das Varizella-Zoster Virus (VZV). Das DNA-Genom von HSV-1 und -2 ist in vielen Bereichen identisch und besitzt mehr als 84 offene Leserahmen, die für zahlreiche virale Proteine kodieren (RAJCANI et al., 2004). Mit lediglich 72 offenen Leserahmen besitzt das VZV hingegen das kleinste Genom aller humanen Herpesviren (MODROW et al., 2010). Mit einer Seroprävalenz von über 90% bei VZV (KILGORE et al., 2003) und je nach Alter 65% bis mehr als 90% bei den Simplex-Viren (CHAYAVICHITSILP et al., 2009) gehören die Alphaherpesviren zu den Viren mit der weltweit höchsten Durchseuchung.

Während eine Primärinfektion mit HSV-1 im Kindesalter meist asymptomatisch verläuft und nur selten lediglich milde Symptome wie z.B. die typischen Lippenbläschen (Herpes labialis) auftreten, kann es bei Neugeborenen (Herpes neonatorum) aber auch bei Erwachsenen zu teils schweren Infektverläufen kommen. Im Gegensatz zum Erstkontakt mit HSV-1 nimmt eine Primärinfektion mit HSV-2 meist einen symptomatischen Verlauf, der zusätzlich zu allgemeinen Krankheitssymptomen wie z.B. Fieber auch durch Geschwüre und/oder Bläschen im Genitalbereich (Herpes genitalis) gekennzeichnet ist (MODROW et al., 2010). Die Primärinfektion mit VZV manifestiert sich in den meisten Fällen durch den für dieses Virus charakteristischen bläschenförmigen Ausschlag an der Hautoberfläche, der auch als Windpocken bekannt ist. Während diese Infektion bei Kindern meist unproblematisch verläuft, kann es bei Erwachsenen und bei Personen mit einem beeinträchtigten Immunsystem zu Komplikationen wie einer generalisierten Infektion, einer Hepatitis oder VZV-bedingter Enzephalitis kommen (MODROW et al., 2010).

Nach der Primärinfektion ziehen sich die Viren meist in sensorische Ganglien zurück und verbleiben dort, ohne dass neue Viruspartikel gebildet werden (Latenz). Bedingt durch die lebenslange Persistenz der Viren im Wirtsorganismus bedarf es einer ständigen Kontrolle der Viren durch das Immunsystem des Wirts. Folglich treten symptomatische Reaktivierungen besonders bei Personen mit eingeschränkter Immunfunktion auf. Diese Einschränkung der

Immundefizienz wird z.B. durch verschiedene Autoimmunerkrankungen, Immundefizienzen, Umweltfaktoren wie Stress oder andere psychische Faktoren, UV-Bestrahlung, Immunseneszenz im höheren Alter und Immunsuppressiva-Therapie verursacht (MODROW et al., 2010). Insbesondere Transplantatempfänger besitzen ein erhöhtes Reaktivierungsrisiko, da sie lebenslang immunsupprimierende Medikamente einnehmen müssen um eine Abstoßung des körperfremden Organs zu verhindern. Durch diese Immunsuppression können sich jedoch im Körper persistierende Erreger wie VZV oder HSV wieder vermehren (Reaktivierung). Die wohl bekannteste Form der Reaktivierung des HSV-1 ist der Herpes labialis. Eine Reaktivierung von VZV führt hingegen in den meisten Fällen zu einem bläschenartigen Ausschlag der lokal auf die Hautbereiche begrenzt ist, die von dem betroffenen sensorischen Ganglions innerviert sind (ZERBONI et al., 2014). Da sich dieser Ausschlag häufig wie ein Gürtel um den Oberkörper herum ausbreitet, ist diese als Herpes Zoster bezeichnete Reaktivierung unter dem Begriff „Gürtelrose“ bekannt. Nach Rückgang der akuten Symptome eines Herpes Zoster kann es an den zuvor betroffenen Hautbereichen zu starken Schmerzen kommen (KOST, STRAUS, 1996). Diese als postherpetische Neuralgie (PHN) bezeichnete Komplikation tritt je nach Alter und Immundefizienz der Person mit einer Inzidenz von 5-30% auf und verursacht bei den betroffenen Patienten teilweise ein lebenslanges Leiden (KAWAI et al., 2014). Darüber hinaus kann es bei Alphaherpesvirus-Infektionen aber auch zu deutlich schwerwiegenderen Symptomen/Komplikationen unter Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) (Enzephalitis, Meningitis) oder anderer immunprivilegierter Orte wie dem Auge (Zoster ophthalmicus, Retinitis, Uveitis) kommen (YAWN, GILDEN, 2013; STANZEL et al., 2014).

Generell können Reaktivierungen von Alphaherpesviren auch untypischere Verläufe nehmen, die beispielsweise bei VZV-bedingten Infekten die charakteristischen Hautausschläge vermissen lassen (Zoster sine herpete) oder zu Virus-bedingten Gefäßschädigungen (Vaskulopathie) oder kardiovaskulären Ereignissen (Herzinfarkt oder Schlaganfall) führen (GILDEN et al., 2013; MINASSIAN et al., 2015). Auch bei Beteiligung des ZNS fehlen oft die typischen Reaktivierungssymptome, wodurch die Diagnostik deutlich erschwert wird (s. Abschnitt 4.5).

#### **4.2.2 Das humane Cytomegalievirus und seine Rolle bei Organtransplantationen**

Das humane Cytomegalievirus (CMV) gehört zur Unterfamilie der Betaherpesviren und besitzt mit rund 230.000 Basenpaaren und ca. 200 Genprodukten im Vergleich zu den humanen Alphaherpesviren ein deutlich größeres Genom (MODROW et al., 2010). Zwei Genprodukte sind für die immunologische Forschung von besonderem Interesse, da sie einen großen Anteil an der Immunogenität des Virus ausmachen. Dabei handelt es sich um das phosphorylierte Tegument-Protein pp65 und das IE-1-Protein („immediate early protein 1“), das transaktivierende Funktionen besitzt (CHERRINGTON, MOCARSKI, 1989; KHAN et al., 2007; KALEJTA, 2008).

Zwischen 40 und 80% der Menschen sind mit CMV infiziert, wobei das Alter und der Entwicklungsstatus des Landes dabei eine wichtige Rolle spielen (BATE et al., 2010; FISHMAN, 2013). Die Mehrheit der infizierten Personen besitzt jedoch aufgrund der meist asymptomatischen Primärinfektion keine Kenntnis über ihren tatsächlichen CMV-Status. Während bei immungesunden Personen aufgrund der effektiven Kontrolle durch die spezifische Immunantwort nahezu keine symptomatischen CMV-Reaktivierungen auftreten, stellt das Virus bei immunsupprimierten Personen wie bei Empfängern von Organtransplantaten ein schwerwiegendes Problem dar (RAZONABLE, 2005; KOTTON et al., 2013). Zum einen kommt es bei diesen Patienten aufgrund der Immunsuppressiva-Therapie vermehrt zu CMV-Reaktivierungen. Zum anderen, persistiert CMV auch in verschiedenen Organen, wie z.B. der Niere und der Leber, und kann so bei der Transplantation eines dieser Organe auf den Transplantat-Empfänger mit übertragen werden und dadurch bei einem CMV-seronegativen Empfänger eine Primärinfektion auslösen oder bei einem CMV-seropositiven Empfänger eine Reaktivierung begünstigen (HO et al., 1975; SINGH et al., 1988; ISON et al., 2013). Diese CMV-(Re)-Infektionen können einerseits zum Verlust des transplantierten Organs führen und zum anderen weitere ernstzunehmende Infektionskomplikationen wie z.B. eine CMV-Hepatitis oder -Pneumonie oder CMV-bedingte gastrointestinale Symptome verursachen, die neben dem Transplantatverlust per se auch mit einem verminderten Patientenüberleben einhergehen können (LJUNGMAN et al., 2002; FISHMAN, ISSA, 2010). Folglich ist das Ziel, die Immunantwort des Organtransplantat-Empfängers medikamentös nur soweit zu unterdrücken, dass das Transplantat nicht durch eine gegen das Transplantat gerichtete Immunreaktion abgestoßen wird, aber noch eine

ausreichende Immunantwort vorhanden ist, um CMV und andere Erreger wie z.B. VZV, HSV und *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) effektiv kontrollieren zu können. Da die Anzahl und die Dosis der immunsupprimierenden Medikamente in den ersten Wochen nach der Transplantation am höchsten ist, und dadurch ein erhöhtes Risiko für CMV-Reaktivierungen besteht, werden in diesem Zeitintervall engmaschige Kontrollen hinsichtlich einer potentiellen Virusvermehrung durchgeführt (CHADBAN et al., 2008).

Neben der klassischen Bestimmung der Viruslast mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden in den vergangenen Jahren zudem vermehrt indirekte Analysemethoden zum Nachweis der Erreger-spezifischen Immunität angewandt, um nicht nur die Virusvermehrung, sondern auch die Effektivität der Immunantwort im Verlauf nach der Transplantation besser einschätzen zu können (GERNA et al., 2011; MANUEL et al., 2013; SESTER et al., 2016). In den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2 wird auf diese Analysemethoden in detaillierter Form eingegangen.

### **4.3 Patientengruppen mit erhöhtem Risiko für Herpesvirus-Infektionen und -Reaktivierungen sowie für die damit verbundenen Komplikationen**

Personen mit einem beeinträchtigten Immunsystem sind deutlich häufiger von Reaktivierungen persistierender Erreger betroffen als dies bei immungesunden Probanden der Fall ist. Im Zusammenhang mit diesen Reaktivierungen und auch bei Primärkontakt mit dem Erreger treten zudem öfter Komplikationen auf, die für den Patienten lebensbedrohliche Folgen haben können (MEYDING-LAMADE, STRANK, 2012). Zusätzliche Nachteile für immunsupprimierte Patienten bestehen dadurch, dass Lebendimpfungen mit der VZV-Vakzine generell für diese Patientengruppen kontraindiziert sind (s. Abschnitt 4.6 und (EMERY, 2013).

Beeinträchtigungen des Immunsystems werden häufig durch unterschiedliche immunsupprimierende Medikamente verursacht. So ist die Inzidenz für Infektkomplikationen und Reaktivierungsereignisse bei Patienten, die aufgrund einer Krebserkrankung eine Chemotherapie erhalten, erhöht (WINGARD, 1993). Zudem zählen Transplantatempfänger ebenfalls zu Risikopatienten für Erreger-(Re)-Infektionen (GOURISHANKAR et al., 2004). Dies gilt nicht nur für CMV, sondern auch für andere virale Erreger wie VZV, HSV oder bakterielle Pathogene wie z.B. *M. tuberculosis* (LAUZURICA et al., 2003; MUNOZ et al., 2005; MILLER, DUMMER, 2007; FISHMAN, ISSA, 2010; KO et al., 2013;

*PAVLOPOULOU et al., 2015*). Darüber hinaus kann die Diagnostik einer VZV-Reaktivierung auch aufgrund des teilweise verspäteten Auftretens oder sogar des vollständigen Fehlens des charakteristischen Hautausschlags deutlich erschwert sein (OH et al., 2002; HOVENS et al., 2007; PERGAM et al., 2013).

Dialysepatienten stellen ebenfalls eine Risikogruppe für Herpesvirus-Reaktivierungen dar. Aufgrund ihrer Urämie besitzen diese Patienten ebenfalls eine eingeschränkte Immunfunktion, die sich auch in einer Beeinträchtigung der Antigen-spezifischen Gedächtnis CD4 T-Zellantwort zeigt (LIM et al., 2007; LITJENS et al., 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass bei Patienten mit autoimmunbedingten Erkrankungen, wie z.B. die rheumatischen Erkrankungen, auf die später noch detaillierter eingegangen wird, ebenfalls erhöhte Inzidenzen von Infektionen beobachtet werden konnten (MCDONALD et al., 2009). Darüber hinaus können bei diesen Patienten vermehrt atypische Verläufe oder stärkere Ausbreitungen der Hautausschläge sowie schwere Komplikationen beobachtet werden (WITT et al., 2009). Unklar ist jedoch noch, inwieweit einzelne, bei diesen Patienten verabreichte Medikamente dieses Risiko zusätzlich noch begünstigten.

Eine eingeschränkte Immunfunktion kann jedoch auch von Viren selbst hervorgerufen werden, wie dies bei HIV-positiven Personen der Fall ist. Insbesondere im späten Krankheitsverlauf und der daraus resultierenden ausgeprägten Immundefizienz, können persistierende Erreger wie das CMV sehr häufig reaktivieren und letztendlich auch zum Tod des Patienten führen (WEBSTER, 1991).

Unabhängig von der Ursache der Immundefizien besitzen somit alle genannten Patientengruppen ein erhöhtes Risiko für Herpesvirus-bedingte Infektkomplikationen und würden von diagnostischen Verfahren besonders profitieren, die eine individualisierte Abschätzung des Infektionsrisikos ermöglichen können.

#### **4.3.1 Rheumatische Erkrankungen und deren Therapie**

Rheumatische Erkrankungen haben viele verschiedene Ursachen und Erscheinungsformen. Allen ist jedoch gemein, dass sie zu einer eingeschränkten Beweglichkeit mit teils massiven Schmerzen führen. Zu der Gruppe der Patienten mit autoimmun-bedingten rheumatischen Erkrankungen gehören neben den Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) auch Patienten mit seronegativen Spondyloarthritis (SPA). Letztere umfassen die Gruppen der Patienten

mit Spondylitis Ankylosans (AS, Morbus Bechterew) und Psoriasis-Arthritis (PSA) und sind typischerweise durch einen Befall der Wirbelgelenke gekennzeichnet (ZOCHLING, SMITH, 2010).

Bei den meisten Patienten mit autoimmun-bedingten rheumatischen Erkrankungen kommt es je nach Erkrankungstyp durch Fehlregulierung des Immunsystems zur erhöhten IL-6, IL-1 und/oder TNF-Produktion was unter anderem zu Deformierungen der Knochen, Entzündung der Gelenke und systemischer Inflammation führt (VAN VOLLENHOVEN, 2009). Darüber hinaus produzieren B-Zellen verschiedene Rheuma-assoziierte Antikörper (Rheumafaktoren und Antikörper gegen anti-citrullinierte Peptide (ACPAs)), die auch zu diagnostischen Zwecken herangezogen werden, jedoch bei den SPA-Patienten teilweise nicht vorhanden sind (FARID et al., 2013). Um das aktuelle Ausmaß der Erkrankung zu identifizieren, wird unter anderem der „Disease activity score 28“ (DAS28) bestimmt, indem von 28 definierten Gelenken die Anzahl der erwärmten, geschwollenen und schmerzhaften Gelenke miteinbezogen wird (PREVOO et al., 1995).

Neben schmerzlindernden Medikamenten, nicht-steroidalen antiinflammatorischen Medikamenten und Glukokortikoiden, werden Patienten mit rheumatischen Erkrankungen als Basistherapie mit sogenannten Standard-DMARDs („Disease-modifying anti-rheumatic drugs“) behandelt. Wichtigster Vertreter dieser Standard-DMARDs sind das Methotrexat (MTX) und das Leflunomid, die am häufigsten verwendet werden. Erstgenanntes wirkt als Zytostatikum indem es das Enzym Dihydrofolat-Reduktase reversibel inhibiert und somit in die DNA-Synthese eingreift (VANDER HEIDEN, 2011). Leflunomid hingegen hemmt die Leukozytenmigration und das Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase das am Pyrimidinstoffwechsel beteiligt ist (DAVILA, RANGANATHAN, 2011). MTX und Leflunomid hemmen somit beide die de-novo-Synthese der DNA. Da bei T-Zellen das Recycling von Basen zur Synthese von Nukleotiden („salvage-pathway“), wenig oder nicht vorhanden ist, und die T-Zellen somit zur Proliferation auf die de-novo-Synthese angewiesen sind, gehen sie dadurch zu Grunde.

Da die Basistherapie mit DMARDs aufgrund der relativ unspezifischen Wirkmechanismen mit zahlreiche Nebenwirkungen assoziiert ist, wurden in den letzten beiden Jahrzehnten vermehrt spezifische Antikörper und Rezeptor-Konstrukte mit sehr spezifischer Wirkung in der Signaltransduktion von T-Zellen, B-Zellen oder Zytokinen entwickelt, um im besonderen

Maße bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf eingreifen zu können. Diese Biologika („Biologic response modifiers“), die eine spezielle Untergruppe der DMARDs darstellen, werden je nach Art und Fortschritt der zugrundeliegenden Erkrankung sowie je nach Verträglichkeit und Therapie-Erfolg zur Mono- oder Kombinations-Therapie verwendet (AVCI et al., 2015). Die Biologika mit ihren unterschiedlichen Wirkmechanismen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die größte Gruppe dieser Biologika sind die TNF-Blocker zu denen auch Adalimumab, Etanercept, Infliximab und Certolizumab gehören und die der vermehrten TNF $\alpha$ -Produktion entgegen wirken. Der Wirkstoff Tocilizumab hingegen blockiert den IL-6-Rezeptor und verhindert somit die Bindung des durch Rheuma übermäßig produzierten IL-6. Der B-Zell-Blocker Rituximab verhindert die Aktivierung der B-Zellen (EDWARDS et al., 2004) wohingegen Abatacept, das unter anderem aus der extrazellulären Domäne des humanen zytotoxischen Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) besteht, das ko-stimulatorische Signal der T-Zellen inhibiert, indem es mit CD28 um die Bindestelle des CD80/CD86 Komplexes konkurriert (MORELAND et al., 2006; AVCI et al., 2015).

**Tabelle 1: Biologika zur Therapie rheumatischer Erkrankungen und deren Funktion**

Biologikum	Funktion
Abatacept	T-Zell-Ko-Stimulations-Blocker
Adalimumab	TNF-Blocker
Certolizumab	TNF-Blocker
Etanercept	TNF-Blocker
Infliximab	TNF-Blocker
Rituximab	B-Zell-Blocker
Tocilizumab	IL-6-Rezeptor-Blocker

Im Zusammenhang mit rheumatischen Erkrankungen wird sowohl für die Standard-DMARDs als auch für die Biologika ein erhöhte Inzidenz verschiedener Infektionen diskutiert, die eine Therapie-bedingte verringerte Funktionalität der Erreger-spezifischen Immunität vermuten lässt. Ob das Risiko für VZV-Reaktivierungen bei RA-Patienten durch die alleinige Einnahme von MTX ansteigt, ist bislang noch unklar, jedoch konnte für PSA-Patienten bereits gezeigt werden, dass allein die Kombination von Standard-DMARDs und einem Biologikum die

Inzidenz erhöht, während die Monotherapie keinen negativen Einfluss hat (SHALOM et al., 2015; ZISMAN et al., 2016).

Aktuelle Studien zeigen, dass RA-Patienten gegenüber der Normalbevölkerung eine deutlich erhöhte Zosterinzidenz besitzen (VEETIL et al., 2013). Insbesondere die Therapie mit TNF-Blocker scheint bei diesen Patienten mit einem leicht erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Herpes Zoster assoziiert zu sein (STRANGFELD et al., 2009; GARCIA-DOVAL et al., 2010; GALLOWAY et al., 2013; CHE et al., 2014; RAMIRO et al., 2014). Für andere Biologika wie Rituximab, Tocilizumab und Abatacept ist die Datenlage bezüglich des Einflusses auf die Zosterraten bislang noch unklar, allerdings gibt es Hinweise, dass es zwischen allen Biologika bei älteren RA-Patienten bezüglich der Zosterinzidenz keine deutlichen Unterschiede gibt (YUN et al., 2015).

Insgesamt ist die Datenlage zum Einfluss der Therapie auf die Zosterinzidenz jedoch noch lückenhaft. Zudem ist bislang noch unklar, inwieweit das Immunsystem allgemein und die VZV-spezifische Immunantwort im Speziellen durch die Erkrankung und durch die verschiedenen Therapeutika in ihrer Funktion beeinflusst werden. Folglich bieten sich Ansatzpunkte potentielle direkte Auswirkungen dieser Medikamente auf die Immunität anhand einer detaillierten Charakterisierung der Quantität und Qualität der VZV-spezifischen Immunantwort der Patienten *in vitro* nachzuweisen und dadurch Patienten mit einem gesteigerten Risiko für VZV-Reaktivierungen identifizieren zu können.

#### **4.4 Die Herpesvirus-spezifische Immunantwort**

Um bei Infektionen den verursachenden Erreger zu identifizieren, wird neben der Diagnose von charakteristischen Symptomen in den meisten Fällen der direkte Erregernachweis angewandt. Dieser wird routinemäßig durch Nukleinsäurenachweis unter Verwendung der PCR durchgeführt (SAUERBREI et al., 1999; EMERY et al., 2000). Da jedoch einige Erreger häufig nur in einem kurzen Zeitintervall direkt nachweisbar sind und der direkte Erregernachweis ferner keine Rückschlüsse auf den Zustand des Immunsystems zulässt, wird die nach einem Erregerkontakt aufgebaute spezifische humorale oder zelluläre Immunantwort zur indirekten Identifizierung einer Primärinfektion oder einer Reaktivierung verwendet.

#### **4.4.1 Verfahren zum Nachweis der spezifischen humoralen Immunantwort**

Generell wird eine effektive Erregerkontrolle durch die humorale und die zelluläre Immunantwort gewährleistet. Folglich können die Erreger z.B. durch den Nachweis Erreger-spezifischen Antikörper identifiziert werden. Häufig sind die gebildeten Antikörper dabei gegen verschiedene Hüllproteine oder andere immunogene Proteine des Erregers gerichtet und werden meist über einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) nachgewiesen. Dabei binden die Erreger-spezifischen Antikörper an eine mit Erregerbestandteilen (z.B. Hüllproteine) beschichtete Oberfläche und können anschließend über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden. In Folge einer Primärinfektion mit Herpesviren werden meist drei verschiedene Klassen von spezifischen Antikörpern (IgA, IgM, IgG) gebildet, wobei die IgA und IgM Antikörper nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar sind und lediglich das für den Langzeitschutz notwendige IgG im Blut persistiert (MODROW et al., 2010).

Im Zusammenhang mit Reaktivierungen der Alphaherpesviren gibt es Hinweise für einen Anstieg der IgA-Levels während einer akuten Reaktivierung, sodass IgA-Levels ebenfalls ein gewisses diagnostisches Potential besitzen könnten (DOERR et al., 1987; HUANG et al., 2013). Jedoch besitzen die Antikörperlevels generell im Vergleich zu den T-Zellfrequenzen eine geringe Dynamik (LEVIN et al., 2008). Zudem gibt es für einige Erreger wie z.B. VZV oder *M. tuberculosis* bereits Hinweise, dass die Immunantwort vorwiegend durch T-Zellen, und hier im besonderen Maße von den CD4 T-Zellen, vermittelt wird (VOSSEN et al., 2004; MALAVIGE et al., 2007; MILLINGTON et al., 2007; SESTER et al., 2011). Dementsprechend wurden in den vergangenen Jahren vermehrt Analysemethoden zur Quantifizierung der zellulären Immunantwort entwickelt, die im folgenden Abschnitt erläutert werden.

#### **4.4.2 Verfahren zur Analyse der spezifischen zellulären Immunantwort**

Neben Hauttests wie sie z.B. für den in vivo Nachweis einer Infektion mit VZV oder *M. tuberculosis* entwickelt wurden, werden häufig Lymphozyten-Proliferationstests (ARVIN, 1992) und „IFN $\gamma$  Release Assays“ angewandt, bei denen je nach Methode Vollblutproben oder aus Vollblut isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mit spezifischen Antigenen stimuliert werden. Anschließend wird die Vermehrung der spezifisch aktivierten Zellen bzw. die Expression des von spezifisch stimulierten Zellen induzierten Zytokins IFN $\gamma$  analysiert (SADAOKA et al., 2008; SESTER et al., 2016). Die Anzahl bzw.

Frequenz Zytokinproduzierender Zellen kann per ELISpot-Verfahren oder nach intrazellulärer Akkumulierung der Zytokine unter Verwendung durchflusszytometrischer Analysen identifiziert werden (SESTER et al., 2008a; SCHMIDT, SESTER, 2013; SCHMIDT et al., 2014b; SESTER et al., 2016). Der Zytokin-ELISA ermöglicht hingegen den Nachweis der gesamten Menge der Zytokinexpression in Kulturüberständen stimulierter Zellen (HAYASHIDA et al., 2015), wobei die Anzahl Zytokinproduzierender Zellen nicht bestimmt werden kann.

Die Mehrzahl der Analyseverfahren zum Nachweis der spezifischen zellulären Immunantwort ermöglicht es hauptsächlich quantitative Ergebnisse zum prozentualen Anteil Antigen-spezifischer T-Zellen zu generieren und Hinweise zur tatsächlichen Funktionalität der einzelnen Immunzellen sind auf die Produktion von IFN $\gamma$  beschränkt. Jedoch konnte in den letzten Jahren für viele chronische Infektionen gezeigt werden, dass auch die Funktionalität der spezifischen Immunantwort für die Erregerkontrolle von besonderer Bedeutung ist (HARARI et al., 2006; SESTER et al., 2008b). Folglich besteht die Notwendigkeit Erreger-spezifische T-Zellen nicht nur quantitativ zu bestimmen, sondern zusätzlich auch den Phänotyp und die Funktionalität dieser Zellen detailliert zu charakterisieren, wodurch eine effizientere Diagnostik sowie ein verbessertes Monitoring von Risikopatienten ermöglicht werden kann. Folglich sind Analyseverfahren, bei denen verschiedene immunologische Zell-Parameter, wie z.B. die intrazelluläre Zytokinproduktion und verschiedene Oberflächenmoleküle, simultan nachgewiesen werden können, aussagekräftiger, um die zelluläre Immunantwort des einzelnen Patienten zu charakterisieren.

Ideale Voraussetzungen zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung Erreger-spezifischer T-Zellen bieten dabei vor allem durchflusszytometrische Verfahren, die die simultane Analyse einer Vielzahl immunologischer Zell-Parameter unter Verwendung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern ermöglichen (FREER, RINDI, 2013; SCHMIDT, SESTER, 2013). Hier zeigte sich, dass die Fähigkeit von CD4 T-Zellen zur gleichzeitigen Produktion verschiedener Zytokine wie z.B. IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  als Maß für hohe Multifunktionalität angesehen werden kann und bei vielen Erregern mit einer effektiven Kontrolle des Erregers (Latenz, Persistenz) korreliert, wohingegen eine eingeschränkte Zytokinexpression (v.a. Verlust von IL-2) eine verringerte Erreger-spezifische Immunfunktion bei meist aktiven Infektgeschehen signalisiert (PANTALEO, HARARI, 2006; SESTER et al., 2008b; SESTER et al., 2011; WHERRY, 2011; SCHMIDT et al., 2012; SCHMIDT et al., 2014a; WHERRY, KURACHI,

2015). Eine verstärkte Expression inhibitorischer Moleküle wie z.B. dem zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4), das mit CD28 um die CD80/86-Bindestelle konkurriert und somit die T-Zellaktivierung unterbinden kann, und dem „programmed-death-1“ (PD-1)-Molekül auf der Zelloberfläche der Erreger-spezifischen T-Zellen weist interessanterweise ebenfalls auf eine eingeschränkte Effektivität der spezifischen Immunantwort hin (BARBER et al., 2006; DAY et al., 2006; SESTER et al., 2008b; WHERRY, KURACHI, 2015). Zudem kam es nach einer Impfung mit einem saisonalen Grippeimpfstoff zu einer deutlichen Herabregulierung der CD127-Expression auf Influenza-spezifischen CD4 T-Zellen, die auf eine Veränderung des Differenzierungsstatus dieser Zellen während einer akuten Induktion einer Immunantwort hindeutet (SCHMIDT et al., 2012).

#### **4.4.2.1 Antigene zur Stimulation CMV-spezifischer T-Zellen**

Am Beispiel der CMV-Infektion nach Organtransplantation zeigte sich, dass sich durch Funktionsanalyse der CMV-spezifischen Immunantwort neue diagnostische Verfahren als Ergänzung zur Viruslast entwickeln lassen, die zur frühzeitigen Identifizierung von Patienten mit CMV-Komplikationen und zur Steuerung der antiviralen Therapie angewandt werden können (SESTER et al., 2008b; SESTER et al., 2016).

Zur Charakterisierung der CMV-spezifischen Immunantwort gibt es bereits verschiedene CMV-Antigene, die in den bisherigen Verfahren zur Stimulation verwendet werden. Hierzu werden z.B. CMV-Proteingemische eingesetzt, die durch das Abtöten von CMV-infizierten Fibroblasten gewonnen werden. Darüber hinaus werden häufig einzelne Proteine oder einzelne synthetisch hergestellte Peptide oder überlappende Peptidgemische zur Stimulation verwendet. Während einzelne Proteingemische oder Proteine durch Endozytose aufgenommen werden und daher meist nur eine spezifische CD4 T-Zellantwort induzieren, kann durch die Verwendung von Peptiden auch eine CD8 T-Zellantwort induziert werden. Da sowohl die CMV-spezifischen CD4 als auch CD8 T-Zellen bei der effizienten Kontrolle von CMV beteiligt sind, wäre es von Vorteil, beide CMV-spezifischen T-Zellsubpopulationen gleichzeitig in einem Ansatz stimulieren zu können. Die bisher verwendeten Stimuli sind jedoch entweder für die CD4 oder CD8 T-Zellanalyse optimiert, weshalb bislang ein Verfahren bzw. der geeignete Stimulus zur effektiven Simultananalyse fehlt. Interessanterweise konnte jedoch durch Harnstoffbehandlung eines Epstein-Barr Virus Proteins (BZLF1) und des pp65-Proteins von CMV gezeigt werden, dass extrazelluläre

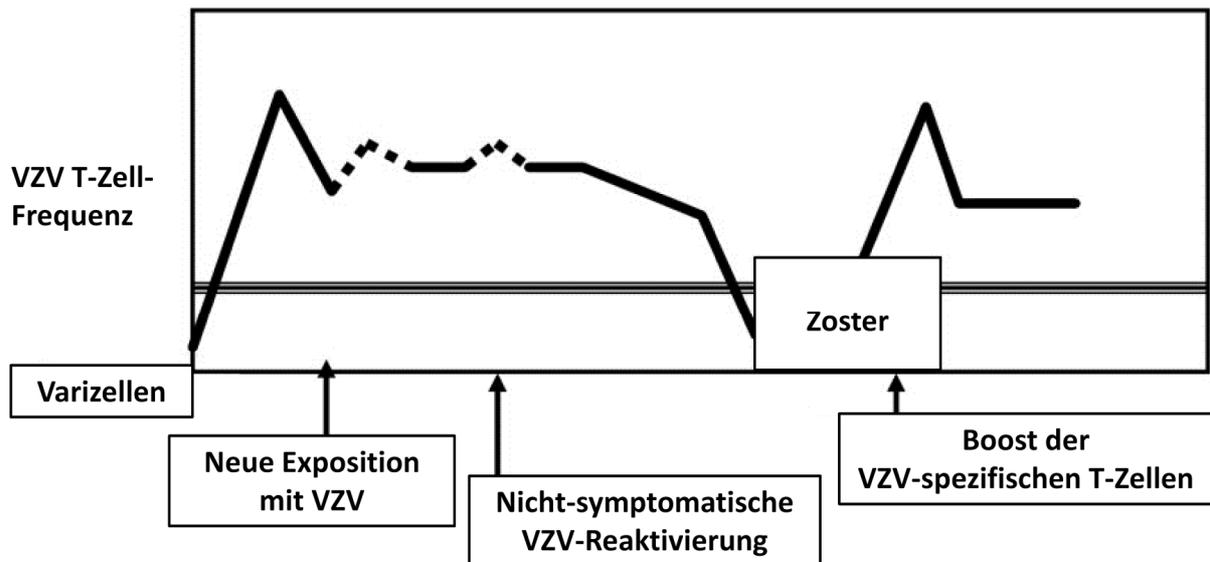
Proteine nicht nur in MHC Klasse II Molekülen, sondern über Kreuzpräsentation auch in MHC-Molekülen der Klasse I präsentiert werden können (BARABAS et al., 2008). Dies stellt somit einen vielversprechenden Ansatz dar, gleichzeitig sowohl eine spezifische CD4 als auch CD8 T-Zellantwort zu induzieren. Somit bieten sich durch Antigenbehandlung mit Harnstoff auch Optimierungspotentiale um die CMV-spezifische T-Zelldiagnostik und die dafür notwendigen Analysen zu verbessern.

#### **4.4.2.2 Die Alphaherpesvirus-spezifische T-Zellimmunität**

Die Alphaherpesvirus-spezifische T-Zellimmunität wurde bislang noch nicht in dem detaillierten Ausmaß charakterisiert, wie dies bei CMV der Fall ist. Bereits bekannt ist, dass nach dem primären Erregerkontakt Gedächtnis-T-Zellen gebildet werden, die gegen den Erreger gerichtet sind und in zentrale Gedächtnis-T-Zellen, Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen eingeteilt werden können (VAN BESOUW et al., 2012; KHAN et al., 2015). Diese Zellen sind in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine wie z.B. IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4 und TNF $\alpha$  zu exprimieren (ZHANG et al., 1995; HAYWARD et al., 1998; ASANUMA et al., 2000; HARARI et al., 2006).

##### *Die VZV-spezifische Immunantwort*

Rein quantitative Analysen der T-Zellen im Blut belegen, dass die medianen CD4 T-Zellfrequenzen der VZV-spezifischen und HSV-spezifischen Immunantworten mit 0,11% und 0,22% deutlich geringer sind als die der CMV-spezifischen Immunantwort, bei denen im Median ca. 2% aller CD4 T-Zellen gegen CMV gerichtet sind (ASANUMA et al., 2000; SESTER et al., 2001; SESTER et al., 2003). In Abbildung 2 ist ein allgemeines Modell der Dynamik der VZV-spezifischen zellulären Immunantwort vom Zeitpunkt der Primärinfektion im zeitlichen Verlauf dargestellt und wird im nachfolgenden Abschnitt anhand aktueller Literatur erläutert.



**Abbildung 2: Modell der VZV-spezifischen T-Zellfrequenz im Zeitverlauf.** Nach einer Primärinfektion mit Varizella-Zoster Virus (VZV) wird eine VZV-spezifische zelluläre Immunantwort aufgebaut die nach ca. 2 Wochen ihr Maximum erreicht und danach leicht abfällt. Im weiteren Verlauf, in welchem das Virus latent im Körper persistiert, bleibt die Frequenz der VZV-spezifischen T-Zellen aufgrund von endogener oder exogener Exposition mit VZV auf einem stabilen Niveau. Bleiben exogene und endogene Induktionen („Boost“) aus oder wirken sich Faktoren wie z.B. die Immunseneszenz im höheren Alter oder Therapie-bedingte Effekte negativ auf die Immunfunktion aus, nimmt die VZV-spezifische T-Zellfrequenz sukzessive ab. Wird ein gewisses Level unterschritten, kann die Kontrolle des Virus durch das Immunsystem nicht mehr aufrechterhalten werden und es kann zu symptomatischen Reaktivierungen kommen, die sich überwiegend in Form eines charakteristischen Hautausschlages (Herpes Zoster) zeigen. Durch die Vermehrung des Virus wird die VZV-spezifische zelluläre Immunantwort deutlich induziert und die T-Zellfrequenz steigt erneut deutlich an und pendelt sich nach Rückgang der Symptome meist wiederum auf einem stabilen Niveau ein. Abbildung modifiziert nach (ARVIN et al., 2007)

Messungen VZV-spezifischer T-Zellen bei Kindern mit Primärinfektion verdeutlichten, dass die Frequenz dieser Zellen direkt nach der Primärinfektion am höchsten ist und in den weiteren Wochen zunehmend geringer wird. Die Antikörperlevels nahmen hingegen nicht signifikant ab (VOSSSEN et al., 2004; SADAOKA et al., 2008). In einer Querschnittsanalyse von 540 immungesunden Personen wurde beschrieben, dass die VZV-spezifische T-Zellfrequenz im Alter zwischen 30 und 40 Jahren am höchsten ist und mit zunehmendem Alter der Probanden deutlich abfällt, was mit einer erhöhten Inzidenz an VZV-Reaktivierungen im höheren Alter korreliert (WEINBERG et al., 2010). Da im Gegensatz dazu die Antikörper auch in älteren Personen nahezu unverändert bleiben, weist dies, sowie die Erkenntnisse aus Studien mit unterschiedlichen Patientengruppen mit beeinträchtigtem Immunsystem, auf die besondere Bedeutung der VZV-spezifischen T-Zellen für eine effektive Erregerkontrolle hin (PARK et al., 2004; VERMONT et al., 2014). Dies wird zudem dadurch verstärkt, dass Patienten mit Agammaglobulinämie ausreichend vor VZV-Reaktivierungen geschützt sind

(GOOD, ZAK, 1956), obwohl sie nicht in der Lage sind, nach einem Primärkontakt mit einem Erreger eine spezifische humorale Immunantwort zu bilden.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass insbesondere die Auffrischung der zellulären VZV-spezifischen Immunantwort durch die Herpes-Zoster-Vakzine entscheidend für die deutliche Reduktion von VZV-Reaktivierungen und PHN ist (PATTERSON-BARTLETT et al., 2007; LEVIN et al., 2008). Eine akute VZV-Reaktivierung an sich führt wie die Impfung mit der Zoster-Vakzine innerhalb weniger Tage zu einer signifikanten Steigerung der zellulären Immunantwort, die innerhalb der ersten Wochen am höchsten ist.

Erkenntnisse bezüglich des Phänotyps und der Funktionalität der VZV-spezifischen Immunzellen besonders in immunsupprimierten Patienten sind noch stark limitiert. Vermutet wird jedoch, dass die VZV-spezifischen Effektor-Gedächtnis-T-Zellen in den immunsupprimierten Patienten und in älteren Personen beeinträchtigt sind (VAN BESOUW et al., 2012). Erste Hinweise bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen lassen vermuten, dass Personen mit einem beeinträchtigtem Immunsystem geringere VZV-spezifische T-Zellfrequenzen besitzen, als dies bei immungesunden Probanden der Fall ist, wodurch die erhöhte Zosterinzidenz dieser Patienten erklärt werden könnte (RONDAAN et al., 2014). Inwieweit sich Beeinträchtigungen in der Funktionalität einer vorhandenen VZV-spezifischen T-Zellantwort auf die Effektivität der VZV-spezifischen Immunität auswirken, ist bislang jedoch noch unklar.

#### *Die HSV-spezifische Immunantwort*

Die durch die Primärinfektion mit HSV induzierte Immunantwort umfasst sowohl Antikörper als auch CD4 und CD8 T-Zellen die spezifisch gegen zahlreiche Virusbestandteile gerichtet sind. Studien an T-Zell-depletierten Mäusen lassen vermuten, dass die T-Zellen für einen effizienten Schutz unerlässlich sind, da die HSV-spezifischen Antikörper alleine die Mäuse nicht vor einer erneuten Infektion schützen (MILLIGAN et al., 1998). Jedoch offenbarte eine Studie von Patienten mit wiederkehrender HSV-2-bedingter Meningitis, dass die HSV-spezifischen T-Zellfrequenzen, im Gegensatz zu den ursprünglichen Erwartungen, in diesen Patienten deutlich erhöht sind. Wie die zelluläre HSV-spezifische Immunantwort bei Patienten mit Immundefizienz beeinflusst wird, ist bislang noch nicht im Detail bekannt. Bei HIV-positiven Personen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass schwere Reaktivierungen mit HSV-2 mit deutlich geringeren HSV-2-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen korrelieren

(POSAVAD et al., 1997). In einer aktuell laufenden multizentrischen Studie werden zudem unter anderem die HSV-spezifischen T-Zellfrequenzen bei Kindern nach Nierentransplantation bestimmt und untersucht, inwieweit diese T-Zellfrequenzen für die optimierte Steuerung der Therapie herangezogen werden können (AHLENSTIEL-GRUNOW et al., 2014).

Funktionelle Analysen der HSV-spezifischen zellulären Immunantwort beschränken sich bislang hauptsächlich auf die CD8 T-Zellen. So konnte in Mäusen bereits nachgewiesen werden, dass die Blockade eines PD-1-Liganden nach der HSV-Infektion zu einer verstärkten HSV-spezifischen CD8 T-Zellantwort führt (CHANNAPPANAVAR et al., 2012). Ob dies auch für humane CD8 T-Zellen gilt, ist noch unbekannt. In Bezug auf die Funktionalität von HSV-spezifischen CD4 T-Zellen ist hingegen lediglich bekannt, dass sie während einer chronischen Infektion in der Lage sind, IFN $\gamma$  und/oder IL-2 zu exprimieren, wobei der Anteil der doppelt positiven Zellen (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>) mit 20% gegenüber anderen chronischen Infektionen relativ gering ausfällt (HARARI et al., 2006).

Insgesamt ist die alphaherpesvirale zelluläre Immunantwort besonders bei Personen mit Immunbeeinträchtigungen bislang noch nicht ausreichend detailliert quantitativ und qualitativ untersucht worden. Zudem fehlen bei diesen Patienten Daten bezüglich der funktionellen Veränderungen der Immunantwort während eines akuten Infektgeschehens. Folglich bieten sich hier beispielsweise Ansatzpunkte für durchflusszytometrische Analysen dieser zellulären Immunantworten. Dies würde nicht nur grundlegende Erkenntnisse zur Regulation der HSV-Infektion, sondern auch zur Effektivität dieser Immunantworten und des damit verbundenen individuellen Infektrisikos eines Patienten ermöglichen. Darüber hinaus könnten immunologische Parameter bei Patienten mit atypischen Infektverläufen und neuronalen Komplikationen einen wertvollen indirekten diagnostischen Beitrag zur Identifizierung des Erregers leisten.

#### **4.5 Diagnostik der Alphaherpesvirus-Infektion bei Beteiligung des zentralen Nervensystems**

Da sich die Alphaherpesviren während der Latenz vor allem in neuronale Ganglien zurückziehen, ist das zentrale Nervensystem (ZNS) bei Primärinfektionen und Reaktivierungen von VZV und HSV ein Ort für viral-bedingte Komplikationen. Während die Diagnose eines akuten Herpes Zosters meistens schon allein aufgrund der Anamnese oder

der Blickdiagnose erfolgen kann, ist bei untypischeren Verläufen und Komplikationen wie z.B. der VZV-bedingten Meningitis (Entzündung der Hirn- und Rückenmarkshäute) und Enzephalitis (Entzündung des Gehirns) die Identifizierung des zugrundeliegenden Erregers aus klinischer Sicht erschwert, da diese nicht zwangsläufig von den charakteristischen Hautsymptomen begleitet werden (GILDEN et al., 2010; LYNCH et al., 2014; PASEDAG et al., 2014).

Die durch Herpes-Simplex-Viren verursachte Enzephalitis ist ebenfalls schwierig zu diagnostizieren und stellt eine sehr schwere Form der Enzephalitis dar, die trotz Behandlung mit antiviralen Medikamenten innerhalb des ersten Jahres nach Symptombeginn bei 14% der Patienten zum Tode führt (HJALMARSSON et al., 2007; MEYDING-LAMADE, STRANK, 2012). Daneben können neurologische Schäden häufig nicht verhindert werden, jedoch ist der Erfolg der Therapie besser, je früher die Therapie begonnen werden kann (MCGRATH et al., 1997).

Die routinemäßige Diagnostik von ZNS-Infektionen hinsichtlich einer möglichen Beteiligung von Alphaherpesviren erfolgt über die PCR und/oder den Antikörpernachweis, bei dem entweder Antikörperlevels oder der Antikörper-spezifische Index (ASI) bestimmt werden, der sich aus dem Verhältnis von Antikörperlevel in der Cerebrospinalflüssigkeit (Liquor, CSF) und im Blut zusammensetzt. Da die Blutanalysen aufgrund der teilweise lokalen Begrenzung der Reaktivierung jedoch häufig nicht ausreichend wäre, wird den Patienten, z.B. durch die Punktion des Rückenmarks, eine CSF-Probe entnommen und zu diagnostischen Zwecken analysiert (GRAHN, STUDAHL, 2015).

Aufgrund des begrenzten Zeitfensters, in dem die Viren direkt nachweisbar sind und der eingeschränkten Aussagekraft der PCR und der Erreger-spezifischen Antikörper, können diagnostische Lücken entstehen (SAUERBREI, WUTZLER, 2002; BHASKARAN et al., 2013; GRAHN, STUDAHL, 2015). Zudem kann es bei autoimmunen Erkrankungen mit ZNS-Beteiligung wie z.B. der Multiplen Sklerose auch ohne VZV-Reaktivierungen zu erhöhten Levels intrathekalen Erreger-spezifischer Antikörper kommen. Dies wird auch als sogenannte „MRZ“-Reaktion bezeichnet, da die vermehrte Antikörperproduktion meist auf Antikörper gegen Masern, Röteln und/oder VZV beschränkt ist (REIBER et al., 1998). Aufgrund dieser Limitierungen bieten sich auch bei der HSV-Infektion Möglichkeiten für eine immunbasierte Diagnostik auf T-Zellebene.

In immungesunden Personen verhindern die Blut-Hirn-Schranke bzw. die Blut-CSF-Schranke den Übertritt von Erregern vom Blut in das Gehirn bzw. die CSF (PALMER, 2010). Während Immunzellen die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können, ist eine Einwanderung in die CSF möglich, die Anzahl dieser Zellen in der CSF ist jedoch normalerweise gering (DE GRAAF et al., 2011). Bei Infektionen des ZNS kann es zu einer gesteigerten Einwanderung von Immunzellen aus dem Blut in die CSF kommen (DEMEESTERE et al., 2015). Bekannt ist bereits, dass es unter anderem bei bakteriell und viral bedingten ZNS-Erkrankungen zu einem Anstieg der Zellzahl (Pleozytose) in der CSF kommt (REIBER, UHR, 2011; DEMEESTERE et al., 2015). Folglich wird bei Alphaherpesvirus-bedingten ZNS-Infektionen auch die Bestimmung der Zellzahl und der Zellmorphologie in der CSF zu diagnostischen Zwecken durchgeführt (REIBER, UHR, 2011). Während bakterielle Infektionen unter anderem meist eine starke Anreicherung von Granulozyten aufweisen (granulozytäres Zellbild), sind im Gegensatz dazu bei viralen Infektionen mehrheitlich Lymphozyten vorzufinden (lymphozytäres Zellbild) (REIBER, UHR, 2011). Zudem wird in aktuellen Studien das Verhältnis verschiedener Immunzelltypen anhand von charakteristischen Oberflächenmolekülen dieser Zellen bei einer Vielzahl unterschiedlicher neurologischer Erkrankungen analysiert, wobei die Messung meist durchflusszytometrisch erfolgt (SUBIRA et al., 2002; MULLEN et al., 2012; KOWARIK et al., 2014). Bislang ist das Wissen bezüglich einer möglichen Antigen-Spezifität der Immunzellen, insbesondere der T-Lymphozyten, stark limitiert. Dennoch konnte in ersten vielversprechenden Studien, in denen durch *M. tuberculosis* verursachte Meningitiden analysiert wurden, bereits nachgewiesen werden, dass sich bei bakteriellen ZNS-Infektionen Erreger-spezifische Lymphozyten in der CSF anreichern und anhand der spezifischen IFN $\gamma$ -Expression identifiziert werden können (THOMAS et al., 2008). Bei viralen ZNS-Infektionen hingegen konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden, ob es sich bei den stark angereicherten Lymphozyten in der CSF um eine Anreicherung von T-Zellen gegen das Symptom-auslösende Virus handelt, oder ob es zu einer unspezifischen Ansammlung von Lymphozyten in der CSF kommt.

Folglich könnte der Nachweis Herpesvirus-spezifischer T-Zellen in der CSF bei Herpesvirus-bedingten ZNS-Erkrankungen die bislang limitierte Diagnostik unterstützen. Durch die quantitative und funktionelle Analyse der spezifischen Immunantwort systemisch (aus Blut) und am Ort des Infektgeschehens (aus CSF), könnte neben der Erreger-Identifizierung auch der Therapie-Erfolg überprüft werden. Hinzu kommt, dass der Nachweis und die

Charakterisierung der Erreger-spezifischen T-Zellen aus der CSF Pilot-Charakter hätte und potentiell auf andere extrasanguine Flüssigkeiten, das heißt auf andere entzündliche Flüssigkeiten, übertragen werden könnte.

#### **4.6 Therapie und Prophylaxe bei Infektionen mit humanen Herpesviren (VZV, HSV und CMV)**

Mit Ausnahme der VZV-Vakzine (Varizellen-Vakzine, Zoster-Vakzine) gibt es bislang noch keinen effektiven Impfstoff gegen eines der anderen erwähnten Herpesviren (CHUNG, SEN, 2012; EMERY, 2013). Zwar gab und gibt es in den letzten Jahrzehnten einige vielversprechende Kandidaten für Impfstoffe gegen die beiden Herpes-Simplex Viren, jedoch wurde bislang noch kein als effektiv erachteter Impfstoff zur Impfung freigegeben (MCALLISTER, SCHLEISS, 2014). Für die Entwicklung einer CMV-Vakzine gibt es zwar zahlreiche Ansätze, jedoch ist auch hier bislang noch kein Durchbruch gelungen (MCVOY, 2013).

Lebendvakzine, wie die VZV-Vakzine, sind aufgrund der häufig auftretenden Komplikationen und Nebenwirkungen generell für immunsupprimierte Patienten kontraindiziert (DANZIGER-ISAKOV et al., 2013). Generell wird vorgeschlagen VZV-seronegative Kandidaten für eine Organtransplantation mindestens vier Wochen vor der Transplantation mit der Varizellen-Vakzine zu impfen, während es nach der Transplantation nur in ausgewählten Patienten in Betracht gezogen werden sollte (PERGAM et al., 2013). Dadurch bedingt ist die Anzahl an Studien bezüglich der durch die Impfung induzierten VZV-spezifischen Immunantwort gering. Dennoch geben diese erste Hinweise dafür, dass Dialysepatienten und Transplantatempfänger durch die Varizellen-Vakzine eine multifunktionelle zelluläre VZV-spezifische Immunantwort aufbauen können (POSFAY-BARBE et al., 2012), wenngleich bislang noch nicht ausreichend untersucht ist, wie langlebig diese ist. Letzteres gilt auch für die Impfung mit der Zoster-Vakzine. Zwar gibt es bereits erste aktuelle Studien die zeigen, dass die Zoster-Impfung vor Transplantation zu einer Reduktion der Zosterinzidenz führt (LANGAN et al., 2016; TSENG et al., 2016). Wie sicher und langfristig dieser Schutz ist, bedarf jedoch noch weiterer Studien. Um auch immunsupprimierte Patienten sicher impfen zu können, besteht ein besonderes Interesse an der Entwicklung von VZV-Totimpfstoffen, die generell für diese Patienten empfohlen wären. Seit kurzem gibt es so einen Zoster-Vakzine-Kandidaten, der aus einer Untereinheit des Glycoproteins E besteht (CHLIBEK et al., 2014).

Erste Studien in immungesunden Personen belegen das große Potential dieses Impfstoffs, da besonders in älteren Probanden eine deutlich bessere Effizienz erreicht wird als dies bei Verwendung des Lebendimpfstoffs der Fall ist (LEVIN, 2012; LAL et al., 2015). Vermutet wird, dass die altersbedingte Seneszenz die Effektivität der Lebendvakzine in dieser Zielgruppe reduziert (LEVIN et al., 2008; LAL et al., 2015).

Die Primärinfektion mit VZV, HSV und CMV muss bei immunkompetenten Personen normalerweise nicht therapiert werden. Untypisch verlaufende Primärinfekte oder Reaktivierungen von VZV und HSV (z.B. Herpes genitales oder Herpes Enzephalitis), die deutlich häufiger in immunsupprimierten Patienten auftreten, werden hingegen standardmäßig mit Aciclovir-Derivaten behandelt (MUELLER et al., 2008). Diese Guanin-Analoga werden von der viralen Thymidinkinase zur DNA-Synthese verwendet, führen jedoch aufgrund ihrer fehlenden Ribose zum Kettenabbruch und verhindern somit die weitere Virusreplikation. Da CMV eine andere Thymidinkinase besitzt als die beiden Alphaherpesviren und Aciclovir somit schwächer wirksam ist, wird zur Behandlung von CMV-Infektionen und zur Prophylaxe von Risiko-Patienten wie z.B. Transplantatempfängern überwiegend das Virostatikum Gancyclovir oder Valgancyclovir verwendet (KOTTON, 2013). Neben diesen Virostatika können Risikopatienten nach Erregerkontakt auch mit VZV-Immunglobulinen behandelt werden um die Erregereliminierung zu unterstützen (MODROW et al., 2010). Da die Therapie mit Virostatika oder Immunglobulinen zahlreiche Nebenwirkungen hat bzw. mit hohen Kosten verbunden ist, kann ein Infektionsmonitoring mittels Antigen-spezifischer T-Zellen die Möglichkeit bieten, die Menge und Dosis dieser Therapeutika auf das Notwendigste zu begrenzen und die damit verbundenen Nebenwirkungen möglichst gering zu halten (ARNDT, 1988; RABASEDA, 2003; ORBACH et al., 2005).

#### **4.7 Ziele dieser Arbeit**

Antigen-spezifische T-Zellen sind an der Eliminierung und Kontrolle zahlreicher Erreger beteiligt und scheinen bei der Kontrolle von Alphaherpesviren sogar entscheidend für eine effektive Immunantwort zu sein. Bei Infektionen mit anderen Erregern zeigte sich, dass die Effektivität der Erregerkontrolle nicht nur von der Anzahl der Antigen-spezifischen Immunzellen, sondern im besonderen Maße auch von der Funktionalität und vom Phänotyp dieser Zellen abhängt. Da die Kenntnisse zur immunologischen Kontrolle von

Alphaherpesviren besonders bei immunsupprimierten Patienten stark limitiert sind, sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit die Immunantwort gegen die Alphaherpesviren VZV und HSV detailliert charakterisiert werden. Dabei stand neben der reinen Quantifizierung vor allem die funktionelle Charakterisierung der CD4 T-Zellen im Vordergrund, die anhand der Expression verschiedener Zytokine und Oberflächenmoleküle durchgeführt wurde und die Qualität der Erreger-spezifischen Immunantwort widerspiegelt. Zusätzlich sollte die Proliferationsfähigkeit der spezifischen T-Zellen bestimmt werden.

Dabei wurde zunächst die VZV-spezifische und HSV-spezifische Immunität von immungesunden Probanden und von Patienten mit erhöhtem Risiko, also Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem untersucht. Darüber hinaus sollten immunologische Marker und Veränderungen, die mit einem akuten Infektgeschehen assoziiert sind bei Patienten mit akutem Herpes Zoster identifiziert werden. In ähnlicher Weise sollte eine Charakterisierung der HSV-spezifischen Immunantwort während chronischer und akuter Infektion durch Analyse von Blutproben von Personen mit HSV-Reaktivierungen erfolgen. Bei durch Alphaherpesvirus-bedingten ZNS-Erkrankungen sollten im Rahmen dieser Arbeit zudem T-Zellen aus der CSF (Infektort) und dem Blut (Peripherie) hinsichtlich ihrer Erreger-Spezifität und funktioneller sowie phänotypischer Eigenschaften vergleichend analysiert werden.

Da bislang noch unklar ist, inwieweit die immunsuppressive und immunmodulatorische Therapie von Rheumapatienten für die erhöhte Zosterinzidenz dieser Patientengruppe verantwortlich ist, sollte in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Medikamente auf die Quantität und Qualität der zellulären Immunantwort im Allgemeinen und der VZV-spezifischen Immunantwort im Speziellen charakterisiert werden. Dies erfolgte zum einen durch die Analyse von Blutproben von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen unter unterschiedlichen Therapieregimen und zum anderen durch Analyse der Hemmwirkung dieser Medikamente *in vitro*.

Abschließend wurde der Einfluss einer Harnstoff-Behandlung von Antigenen auf deren Fähigkeit zur simultanen Induktion von Antigen-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen untersucht werden. Dies erfolgte bei Blutproben von Gesunden und von Patienten mit erhöhtem Infektrisiko. Dies wurde zum einen anhand einzelner CMV Proteine (IE-1 und pp65) und zum anderen anhand von kompletten CMV Proteingemischen analysiert. Darüber hinaus

sollte der Beitrag der beiden Proteine für die Immunogenität von CMV mit Hilfe von Virus-Deletionsmutanten nachgewiesen werden.

Diese Fragestellungen tragen dazu bei, die spezifisch gegen verschiedene Herpesviren gerichtete Immunantwort bei Gesunden und Immunsupprimierten in verschiedenen Phasen der Infektion detailliert zu charakterisieren. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen eine Grundlage bilden, um neue immun-basierte diagnostische Strategien zu entwickeln, die eine genauere Einschätzung des individuellen Infektrisikos und die Steuerung antiviraler Therapien ermöglichen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Geräte, Materialien und Reagenzien

#### 5.1.1 Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Firma, Firmensitz
BrdU-Dnase	FITC	B44	BD Biosciences, Heidelberg
CD3	APC	SK7	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	APC-H7	SK3	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	PE	SK3	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	PE-Cy7	SK3	BD Biosciences, Heidelberg
CD8	APC	SK1	BD Biosciences, Heidelberg
CD8	PerCP	SK1	BD Biosciences, Heidelberg
CD14	PE	RMO52	Beckmann Coulter (Immunotech), Krefeld
CD16	PE	3G8	BD Biosciences, Heidelberg
CD19	FITC	HIB19	BD Biosciences, Heidelberg
CD28	-	L293	BD Biosciences, Heidelberg
CD45	APC	MEM-28	Sigma-Aldrich, Steinheim
CD45	V500	HI30	BD Biosciences, Heidelberg
CD45RO	PE-Cy7	UCHL-1	BD Biosciences, Heidelberg
CD49d	-	9F10	BD Biosciences, Heidelberg
CD56	PE	B159	BD Biosciences, Heidelberg
CD62L	PE	DREG-56	BD Biosciences, Heidelberg
CD69	PE-Cy7	L78	BD Biosciences, Heidelberg
CD69	PerCP	L78	BD Biosciences, Heidelberg

<b>Antikörper</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Klon</b>	<b>Firma, Firmensitz</b>
CD127	FITC	eBioRDR5	eBioscience, Frankfurt
CD152 (CTLA-4)	APC	BNI3	BD Biosciences, Heidelberg
CD279 (PD-1)	PE	MIH4	BD Biosciences, Heidelberg
IFN $\gamma$	FITC	4S.B3	BD Biosciences, Heidelberg
IFN $\gamma$	PE	4S.B3	BD Biosciences, Heidelberg
IL-2	PE	MQ1-17H12	BD Biosciences, Heidelberg
IL-4	PE	8D4-8	BD Biosciences, Heidelberg
IL-17	APC	eBio64CAP17	eBioscience, Frankfurt
TNF $\alpha$	APC	Mab 11	BD Biosciences, Heidelberg
TNF $\alpha$	V450	Mab 11	BD Biosciences, Heidelberg

### **5.1.2 Geräte und Materialien**

<b>Geräte und Materialien</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
96-Loch-Platte (Flachboden)	Greiner, Frickenhausen
Brutschrank (Hera cell 150)	Heraeus, Hanau
Digitale Lupe für ELISpot (digimicro 2.0)	DNT, Dietzenbach
Durchflusszytometer (FACSCanto II, FACS Aria III)	BD Biosciences, Heidelberg
Kanüle (Safety-Multifly)	Sarstedt, Nümbrecht
Kolbenhubpipette (10, 20, 100, 200, 1000 $\mu$ l)	Abimed, Langenfeld
Li-Hep Monovetten (4,7ml und 9ml)	Sarstedt, Nümbrecht
MACS Roller (MACS Mix)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnet mit Säulenbefestigung (MACS Separator)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop CKX31	Olympus, Hamburg

<b>Geräte und Materialien</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe (Pipetbooy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Plattenleser/Photometer multifunktional (Viktor X4)	PerkinElmer, Rodgau
Präzisions Dispenser Tips (5ml)	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße (1.5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen für Durchflusszytometrie (5ml FACS Röhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen Polypropylen (15, 50ml)	Greiner, Frickenhausen
Säule (MS Column)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Serologische Pipette (2, 5, 10, 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Vortex Mixer 7-2020	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Werkbank, steril (Hera Safe)	Heraeus, Hanau
Zellfilter (50µm)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellsortierer (FACS Aria III)	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifuge Labofuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau

### **5.1.3 Chemikalien und Kits**

<b>Chemikalien und Kits</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Anti-CMV-ELISA-KIT (IgG)	Euroimmun, Lübeck
Anti-HSV-ELISA-KIT (IgG)	Euroimmun, Lübeck
Anti-VZV-ELISA-KIT (IgA, IgG)	Euroimmun, Lübeck

<b>Chemikalien und Kits</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Brefeldin A (BFA, Stock 5mg/ml in Ethanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, Steinheim
CD14 „MicroBeads, human“	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CFDA-SE (Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit, 10mM Stock in DMSO)	Life technologies, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
FicoLite-H (Ficoll)	PAA, Pasching (Österreich); Linaris (blue), Wertheim-Bettingen
humanes Serumalbumin (HSA)	CSL Behring, Marburg
Lysing-Solution (10x konzentriert, 1x Verdünnung mit H <sub>2</sub> O dest.)	BD Biosciences, Heidelberg
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> , 10% in H <sub>2</sub> O)	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd, (PFA, pH 7.4 – 7.6)	AppliChem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom, Berlin
„phosphate buffered saline“ (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
„Roswell Park Memorial Institute“ (RPMI) Medium 1640 mit 1% L-Glutamin (Gln)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saponin (2g in 10%igem NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim

<b>Chemikalien und Kits</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
T- Track CMV (inkl. IE-1; pp56; SEB)	Lophius Biosciences, Regensburg

#### **5.1.4 Übersicht über die verwendeten Antigene**

<b>Antigene</b>	<b>Firma, Firmensitz</b>
CFP-10	Lionex, Braunschweig
CMV-Antigen	Virion/Serion, Würzburg
CMV-Antigen (ELISpot, PBMC-Stimulation)	BioWhittaker, Verviers (Belgien)
CMV-Antigen (MRC5)	Lophius Biosciences , Regensburg
CMV-Kontroll-Antigen	Virion/Serion, Würzburg
CMV-Kontroll-Antigen (ELISpot, PBMC-Stimulation)	BioWhittaker, Verviers (Belgien)
CMV-Kontroll-Antigen (MRC5)	Lophius Biosciences, Regensburg
ESAT-6	Lionex, Braunschweig
HSV-1/2-Antigen	Virion/Serion, Würzburg
HSV-1/2-Kontroll-Antigen	Virion/Serion, Würzburg
IE-1	Lophius Biosciences, Regensburg
IE-1-defizientes CMV-Antigen (MRC5)	Dr. Christina Paulus und Dr. Michael Nevels Universität Regensburg über Lophius Biosciences, Regensburg
pp65	Lophius Biosciences, Regensburg
pp65-defizientes CMV-Antigen (MRC5)	Dr. Christina Paulus und Dr. Michael Nevels Universität Regensburg über Lophius Biosciences, Regensburg
pp65/IE-1-defizientes CMV-Antigen (MRC5)	Dr. Christina Paulus und Dr. Michael Nevels Universität Regensburg über Lophius Biosciences, Regensburg

<b>Antigene</b>	<b>Firma, Firmensitz</b>
PPD	Staten Serum Institut, Kopenhagen (Dänemark)
SEB	Sigma-Aldrich, Steinheim
SEB (für ELISpot)	Lophius Biosciences, Regensburg
VZV-Antigen	Virion/Serion, Würzburg
VZV-Antigen (Proli-Assay)	AbD Serotec, Düsseldorf
VZV-Kontroll-Antigen	Virion/Serion, Würzburg
VZV-Kontroll-Antigen (Proli-Assay)	AbD Serotec, Düsseldorf

### **5.1.5 Zusammensetzung der Puffer und Medien**

<b>Puffer und Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
FACS-Puffer	PBS, 5% FCS, 0,5% BSA, 0,07% NaN <sub>3</sub>
Isolierungspuffer	PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA, pH 7,2
Markierlösung (2x)	PBS, 0,1% HSA, 10µM CFDA-SE
Markiermedium	RPMI, 1% Gln, 1% P/S, 0,5% HSA
PBS-HSA	PBS, 0,1% HSA
PBS-EDTA	PBS, 0,02% EDTA
Saponin-Puffer	FACS-Puffer, 0,1% Saponin
Wachstumspuffer	RPMI, 1% Gln, 1% P/S, 5% FCS

### **5.1.6 Medikamentenliste für in vitro-Experimente**

<b>Medikamente (Handelsname)</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Abatacept (Orencia)	Bristol-Myers Squibb, München
Adalimumab (Humira)	AbbVie (Tochter von Abbott Laboratories), Wiesbaden

<b>Medikamente (Handelsname)</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Cyclosporin A (Sandimmun)	Novartis, Nürnberg
Etanercept (Enbrel)	Pfizer, Berlin
Methylprednisolon (Urbason)	Sanofi-Aventis, Frankfurt/Berlin
Rituximab (MabThera)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Tocilizumab (RoActemra)	Chugai, Frankfurt

### **5.1.7 Übersicht über die verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
BD FACSDiva Software V.6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism V.5.02	GraphPad, La Jolla (San Diego, CA)
Microsoft Excel 2010	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft Word 2010	Microsoft, Redmond (USA)
WorkOut Software V. 2.5	Dazdaq LTD, Brighton (England)

## **5.2 Probanden- und Patientenkollektiv**

Die Analyse der Erreger-spezifischen Immunantworten in Blutproben und extrasanguinen Flüssigkeiten wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Referenznummern: 26/07, 158/13, und Erweiterungen von 142/02 und 188/05 vom 23.10.12) bzw. teilweise wie im Fall einer Aszites-Probe aus klinischer Indikation durchgeführt. Alle Personen oder im Falle von Kindern ihre Eltern gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Die in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden- und Patientenproben wurden in Kooperation mit den Kliniken des Uniklinikum des Saarlandes rekrutiert. Blutproben von Kindern wurden durch die Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie (Prof. Dr. Tilman Rohrer, Prof. Dr. Ludwig Gortner) zur Verfügung gestellt. Patienten mit akutem Herpes Zoster oder HSV-Reaktivierung wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie (Dr. Eva Janssen, Prof. Dr. Thomas Vogt) rekrutiert. Blutproben

von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen, Dialysepatienten und Transplantatempfängern wurden durch die Kliniken für Innere Medizin I (Prof. Dr. Gunter Aßmann, Prof. Dr. Michael Pfreundschuh) und Innere Medizin IV (Prof. Dr. Urban Sester, Prof. Dr. Danilo Fliser) zur Verfügung gestellt. Patienten mit Entzündungen des ZNS wurden in Kooperation mit der Klinik für Neurologie (Dr. Mathias Fousse, Prof. Dr. Klaus Faßbender) rekrutiert und Proben von Blasenzellkarzinom-Patienten wurden durch die Klinik für Urologie und Kinderurologie (Dr. Julia Elsässer, Prof. Dr. Michael Stöckle) bereitgestellt.

### ***5.2.1 Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort bei nicht-symptomatischen und symptomatischen Personen***

Die VZV-spezifische Immunantwort wurde in 207 nicht-symptomatischen Kontroll-Probanden im Alter zwischen 10 Monaten und 91,8 Jahren analysiert (Tabelle 2). Mit Hilfe von Fragebögen konnten von 115 Personen verlässliche Daten bezüglich bereits durchgeführter VZV-Impfungen, stattgehabter VZV-Primärinfektion (Windpocken) und VZV-Reaktivierung (Herpes Zoster) erhoben werden. Unter diesen 115 Personen befanden sich nach eigenen Angaben 13 VZV-naive Probanden (keine VZV-Impfung, keine Windpocken, kein Herpes Zoster). Darüber hinaus wurden Blutproben von 132 nicht-symptomatischen Patienten mit unterschiedlich starker Beeinträchtigung des Immunsystems analysiert (32 Hämodialyse-Patienten (HD) mit urämischer Immundefizienz, 49 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen (RD) und 51 Transplantat-Empfänger (Tx) unter immunsuppressiver Therapie (Tabelle 2). Um Änderungen in der VZV-spezifischen Immunantwort während einer akuten VZV-Reaktivierung zu bestimmen, wurden Blutproben von 75 Personen mit akutem Herpes Zoster (55 ohne und 20 mit bekannter Immunsuppression aufgrund einer immunsupprimierenden Therapie oder der jeweiligen Grunderkrankung) innerhalb der ersten 3 Wochen nach den ersten klinischen Symptomen einer VZV-Reaktivierung entnommen und analysiert. Um Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort im Verlauf nach einer akuten Reaktivierung zu messen, wurden 16 Patienten mit akuter Reaktivierung 4,3 (Interquartilsabstand (IQR) 1,7) Monate nach Entnahme der ersten Probe erneut getestet.

**Tabelle 2: Patientencharakteristiken zur detaillierten Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort in Personen mit und ohne Herpes Zoster**

	Kontroll- Probanden	Kontrollen altersangepasst zu Zoster	Immunkompetente Zoster-Patienten	p-Wert	Kontrollen altersangepasst zu Immunbeeinträchtigten	HD	Tx	RD	p-Wert	Immun- beeinträchtigte Zoster-Patienten	p-Wert <sup>§</sup>
n	207	32	55		29	32	51	49		20	
Alter in Jahren [MW ± StabW]	22,4 ± 19,9	62,6 ± 15,6	65,2 ± 19,2	0,5122	60,1 ± 14,0	61,9 ± 13,0	53,9 ± 15,2	55,9 ± 14,4	0,0589	61,7 ± 19,4	0,1665
weiblich [n (%)]	95 (45,9)	20 (62,5)	30 (54,5)	0,5074	19 (65,5)	11 (34,4)	16 (31,4)	35 (71,4)	<0,0001	6 (30)	0,2273
Leukozyten/ $\mu$ l <sup>#</sup> [MW ± StabW]	6679 ± 1891 (n=187)	7696 ± 2372 (n=30)	6631 ± 2557 (n=51)	0,0338	7545 ± 2384 (n=28)	6494 ± 2389 (n=28)	7075 ± 2856 (n=50)	8647 ± 3002 (n=45)	0,0051	6853 ± 2492 (n=19)	0,2524
% Lymphozyten <sup>#</sup> [MW ± StabW]	32,7 ± 11,5 (n=70)	25,5 ± 11,0 (n=23)	25,6 ± 10,2 (n=50)	0,9432	26,1 ± 10,7 (n=22)	22,7 ± 7,0 (n=20)	23,6 ± 9,2 (n=42)	23,9 ± 9,1 (n=45)	0,5370	27,5 ± 7,7 (n=17)	0,0682
Besonderheiten	nein	nein	nein		nein	nein	48x Niere, 2x Leber, 1x Lunge	34 RA <sup>£</sup> , 13 PSA <sup>£</sup> , 2 AS <sup>£</sup>		2 HD, 6 Tx, 2 RA <sup>®</sup> , 1 PSA <sup>®</sup> 9 Sonstige <sup>§</sup>	

<sup>§</sup>bezieht sich auf den Vergleich von immunbeeinträchtigten Zoster-Patienten und den entsprechenden 132 nicht-symptomatischen Patienten (HD, Hämodialyse-Patienten; Tx, Transplantat-Empfänger; RD, Patienten mit rheumatischen Erkrankungen); <sup>#</sup>wo verfügbar (Die Anzahl der einbezogenen Personen ist in Klammern angegeben), <sup>£</sup>8 Therapie-naive, der Rest unter Rheuma-Therapie, <sup>®</sup>alle unter Rheuma-Therapie, <sup>§</sup>Sonstige beinhaltet 6 Patienten mit Krebs-Erkrankung (2 unter immunsuppressiver Therapie), 1 Patient unter kontinuierlicher ambulanter Peritonealdialyse, 1 Patient mit systemischem Lupus erythematoses, und 1 Patient mit Pemphigus vulgaris unter immunsuppressiver Therapie; AS, Spondylitis Ankylosans; MW, Mittelwert; PSA, Psoriasis Arthritis; RA, Rheumatoide Arthritis; StabW, Standardabweichung. Daten reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015a).

### 5.2.2 Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen

Der Einfluss der anti-rheumatischen Therapie auf die VZV-spezifische Immunantwort von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen wurde mit Hilfe von Blutproben von insgesamt 78 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) und 20 Patienten mit Spondyloarthritis (SPA) analysiert. Die Charakteristika der Patienten mit grenzwertigem oder positiven VZV-IgG-Serostatus sowie die Einteilung in Subgruppen basierend auf der unterschiedlichen anti-rheumatischen Therapie sind in Tabelle 3 und Abbildung 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Charakteristika VZV-IgG-positiver bzw. –grenzwertiger Patienten mit rheumatischen Erkrankungen und der Kontroll-Probanden**

	Kontroll- Probanden	RA-Patienten	SPA-Patienten	P-Wert
n	39	75	19	-
Alter in Jahren [MW ± StabW]	58,63 ± 16,15	60,84 ± 13,08	51,38 ± 11,85	0,0320 (*RA vs SPA)
weiblich [%]	56,41	76,00	57,89	0,0649
Zeit seit Krankheitsbeginn in Jahren [MW ± StabW]	-	7,92 ± 6,43 (n=68)	7,87 ± 8,77 (n=19)	0,9766
Leukozyten/μl [MW ± StabW]	7362 ± 1975 (n=36)	8250 ± 2841 (n=74)	8411 ± 3668 (n=19)	0,3770
% Lymphozyten [MW ± StabW]	27,30 ± 9,94 (n=28)	24,58 ± 10,25 (n=74)	27,65 ± 7,40 (n=19)	0,1331
DAS28 [MW ± StabW]	-	3,76 ± 1,27 (n=50)	3,72 ± 1,48 (n=3)	0,9627
mg/L CRP [MW ± StabW]	-	4,05 ± 6,31 (n=65)	9,71 ± 12,00 (n=16)	0,0302
mm/h BSG [MW ± StabW]	-	16,06 ± 12,28 (n=52)	20,60 ± 18,58 (n=15)	0,5722
erosiver Verlauf [%]	-	40,00 (n=60)	46,67 (n=15)	0,7711

	Kontroll- Probanden	RA-Patienten		SPA-Patienten	P-Wert
Herpes Zoster > 6 Monate vor Blutentnahme <sup>§</sup>	-	Ja (n=12)	Nein (n=44)	-	-
Alter in Jahren [MW ± StabW]	-	66,43 ± 8,81	57,34 ± 13,88	-	0,0363
Besonderheiten	-	-	-	16 PSA, 3 AS	-

<sup>§</sup> Informationen bezüglich potentieller zurückliegender VZV-Reaktivierungen waren von 56 der 75 RA-Patienten verfügbar. AS, Spondylitis Ankylosans; BSG, Blutsenkungsgeschwindigkeit; CRP, C-reaktives Protein; DAS28, „Disease activity score 28“; MW, Mittelwert; PSA, Psoriasis Arthritis; RA, Rheumatoide Arthritis; SPA, Spondyloarthritis; StabW, Standardabweichung



**Abbildung 3: Einteilung der RA-Patienten anhand ihrer anti-rheumatischen Therapie.** Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden zunächst hinsichtlich der Einnahme von Biologika unterteilt. Die Gruppe ohne Biologikum wurde anschließend in RA-Patienten ohne aktuelle Therapie (naive) und Patienten unter DMARD-Monotherapie eingeteilt. Bei letztgenannten wurden zusätzlich die jeweiligen Wirkstoffe angegeben. Die Klassifizierung von Patienten mit Biologikum erfolgte hinsichtlich der An- bzw. Abwesenheit zusätzlicher DMARDs. Für beide Gruppen wurde jeweils die Verteilung und Kombination der Wirkstoffe angegeben. DMARD, „Disease modifying anti-rheumatic drug“; mono, Monotherapie; RA, rheumatoide Arthritis.

Um den Einfluss von anti-rheumatischen Medikamenten auf die VZV-spezifische Immunantwort *in vitro* zu analysieren wurden zusätzlich Blutproben von 3 immungesunden Probanden im Alter von 26, 27 und 34 Jahren mit diesen Medikamenten (s. Abschnitt 5.1.6) inkubiert und die Frequenz, Proliferation und Zytokinexpression der reaktiven Immunzellen gemessen.

### ***5.2.3 Charakterisierung der HSV-spezifischen Immunantwort bei nicht-symptomatischen und symptomatischen Personen***

Zur Charakterisierung der HSV-spezifischen Immunantwort wurden Blutproben von 26 nicht-symptomatischen immungesunden Kontroll-Probanden im Alter von 7,8 bis 91,8 Jahren analysiert (Tabelle 4). Des Weiteren wurden 59 nicht-symptomatische Patienten mit Krankheits- bzw. Therapie-bedingter Immunsuppression hinsichtlich ihrer HSV-Immunität untersucht (13 HD, 30 Tx, 16 RD, Tabelle 4). Potentielle Veränderungen in der Quantität und Qualität der HSV-spezifischen Immunantwort wurden anhand von 13 Personen mit akuter HSV-Reaktivierung (6x Herpes Labialis, 2x HSV Pneumonie, 5x HSV-bedingter Hautausschlag (HSV-PCR positiv), Tabelle 4) untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss einer akuten VZV-Reaktivierung auf die HSV-spezifische Immunantwort mit Hilfe von 35 Patienten mit akutem Herpes Zoster analysiert (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Patientencharakteristika zur Analyse der HSV-spezifischen Immunantwort**

	Kontroll- Probanden	Altersangepasste Kontrollen zu Immun- beeinträchtigten Patienten	HD	Tx	RD	p-Wert	Altersangepasste Kontrollen zu HSV- Reaktivierung	Personen mit HSV- Reaktivierung	p-Wert	Kontrollen zu Zoster	Zoster- Patienten	p-Wert
n	26	13	13	30	16		15	13		10	35	
Alter in Jahren [MW ± StabW]	42,29 ± 21,81	13,31 ± 17,34	61,63 ± 12,37	56,90 ± 12,26	61,85 ± 8,55	0,5298	54,22 ± 19,34	50,31 ± 18,60	0,5920	63,93 ± 14,50	70,92 ± 14,06	0,1755
weiblich [n (%)]	22 (84,6)	13 (100)	4 (30,8)	12 (40)	10 (62,5)	0,0008	15 (100)	4 (30,77)	0,0001	10 (100)	14 (40)	0,0007
Leukozyten/μl [MW ± StabW]	7410 ± 2474 (n=22)	7642 ± 3062 (n=13)	7125 ± 3605 (n=8)	6063 ± 2256 (n=30)	7306 ± 2286 (n=16)	0,2569	7463 ± 2912 (n=15)	6763 ± 1771 (n=12)	0,7884	8189 ± 3202 (n=10)	6904 ± 2967 (n=33)	0,2940
% Lymphozyten [MW ± StabW]	31,09 ± 12,75 (n=22)	28,64 ± 15,05 (n=13)	12,00 (n=1)	28,86±14,18 (n=25)	28,05 ± 8,58 (n=16)	0,5282	29,46 ± 14,39 (n=15)	27,51 ± 11,31 (n=10)	0,6774	26,32 ± 15,22 (n=10)	25,36 ± 9,87 (n=31)	0,7847
Besonderheiten	Nein	Nein	Nein	29x Niere, 1x Lunge	35 RA <sup>§</sup> , 1 PSA <sup>§</sup>		Nein	2x HSV- Pneumonie, 6x Herpes Labialis, 5x HSV-bedingter Hautausschlag (PCR pos), 3x Ko-Infekt HSV/VZV; Inkl. 3 Tx, 1 HIV			28 Immun- gesunde, 2 Tx (Niere), 1 RA <sup>§</sup> , 4 sonstige <sup>#</sup>	

<sup>§</sup>alle unter Rheuma-Therapie, <sup>§</sup>unter MTX-Therapie, <sup>#</sup>3 Patienten mit Krebserkrankungen (1 unter Immunsuppressiver Therapie), 1 Memphigus vulgaris unter immunsuppressiver Therapie; HD, Hämodialyse-Patienten; MTX, Methotrexat; MW, Mittelwert; PSA, Psoriasis Arthritis; RA, rheumatoide Arthritis; RD, Patienten mit rheumatischen Erkrankungen; StabW, Standardabweichung; Tx, Transplantat-Empfänger.

#### **5.2.4 Probanden- und Patientenkollektiv zur Entwicklung eines neuen Analyseverfahrens zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten**

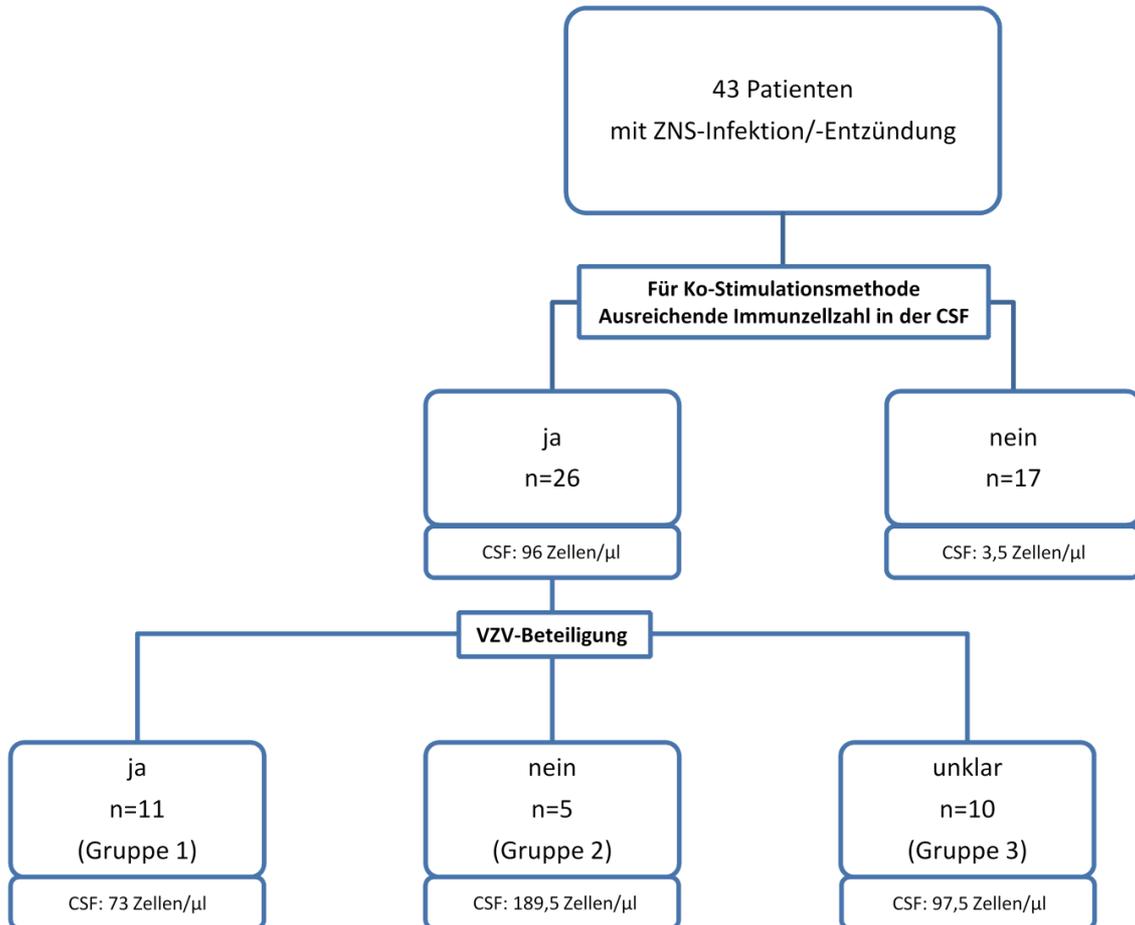
Die Entwicklung eines neuen Verfahrens zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten erfolgte anhand der Immunzellen aus der CSF und Blut einer Patientin mit VZV-bedingter Meningoneuritis. Die Kontrollexperimente zur weiteren Überprüfung dieses Verfahrens wurden mit dem Blut bzw. den isolierten PBMCs eines 28-jährigen immungesunden Probanden bzw. einer 24-jährigen immungesunden Probandin durchgeführt.

Um die Anwendbarkeit des neuen Verfahrens zum Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen aus anderen extrasanguinen Flüssigkeiten zu überprüfen, wurden 25 Blasenspülflüssigkeits- (BSF-) und Blut-Proben von 11 Blasenzellkarzinom-Patienten unter Instillations-Therapie mit Bakterien des Bacille Calmette Guérin (BCG) Stammes analysiert. Die Entnahme der BSF-Proben erfolgte jeweils eine Woche nach der BCG-Instillation bzw. unmittelbar vor der nächsten Erhaltungstherapie. Zusätzlich wurden Immunzellen aus dem Aszites eines 66-jährigen Patienten mit Verdacht auf *M. tuberculosis*-assoziiertem Aszites isoliert und unter Verwendung der neuen Methodik Antigen-spezifisch stimuliert.

#### **5.2.5 Patientenkollektiv zur Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort in Patienten mit ZNS-Infektion**

Zur Validierung des neuen Nachweisverfahrens wurden CSF- und Blutproben von insgesamt 43 Patienten mit Erkrankungen und Infektionen des ZNS rekrutiert und eine vergleichende Analyse der VZV-spezifischen Immunantworten durchgeführt. Die Entnahme der CSF erfolgte dabei jeweils zu diagnostischen Zwecken und wurde durch Lumbalpunktion vorgenommen. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte innerhalb einer Stunde nach der Lumbalpunktion. Die Patienten, bei denen genügend Immunzellen für die Stimulation vorhanden waren, wurden je nach Beteiligung von VZV an den akuten Symptomen in 3 Gruppen eingeteilt (Abbildung 4). Die Gruppe 1 (VZV-bedingt) umfasst insgesamt 11 Patienten, bei denen VZV eindeutig von klinischer Seite aufgrund der Kombination von positiver PCR (10x), positivem ASI (7x) und der Begleit-Symptome, als Auslöser für die aktuelle ZNS-Infektion identifiziert wurde. Gruppe 2 umfasst 5 Patienten, bei denen eine

Beteiligung von VZV ausgeschlossen wurde (nicht VZV-bedingt). Zehn weitere Patienten, bei denen eine Beteiligung von VZV an der aktuellen Symptomatik unklar war, wurden in Gruppe 3 eingeschlossen. Die jeweiligen Patientencharakteristika sind in Tabelle 5 aufgeführt.



**Abbildung 4: Übersicht der Einteilung von Patienten mit Entzündungen des ZNS.** Insgesamt 43 Patienten mit Infektionen bzw. Entzündungen unter Beteiligung des ZNS wurden zur Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort in der CSF und im Blut eingeschlossen. 26 Patienten hatten eine für die Antigen-spezifische Stimulation unter Verwendung des Ko-Stimulationsverfahrens ausreichende Immunzellzahl bzw. CD4 T-Zellzahl. Diese Patienten wurden je nach Beteiligung von VZV an der akuten Erkrankung in drei Gruppen eingeteilt. Für alle Subgruppen ist jeweils die mediane Zellzahl pro µl CSF angegeben. CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; VZV, Varizella-Zoster Virus; ZNS, zentrales Nervensystem.

**Tabelle 5: Charakteristika der Patienten mit Entzündungen des ZNS, die mit der Ko-Stimulationsmethode analysiert wurden**

	Grund der ZNS-Entzündung			
	VZV-bedingt (Gruppe 1)	Nicht VZV-bedingt (Gruppe 2)	VZV-Beteiligung unklar (Gruppe 3)	p-Wert
n	11	5	10	
Alter in Jahren [MW ± StabW]	58,93 ± 23,81	44,26 ± 16,37	50,73 ± 23,18	0,4550
Frauen [n (%)]	3 (27,3)	1 (20)	4 (40)	0,6923
Erkrankungen/Symptome	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. VZV-Meningoenzephalitis</li> <li>2. Zoster ophthalmicus</li> <li>3. VZV-Meningitis+ Neuritis (Nervus facialis)</li> <li>4. VZV-Meningitis + Zoster oticus + Neuritis (Nervus facialis)</li> <li>5. Keratouveitis herpetica + Meningitis (VZV-Koinfektion)</li> <li>6. VZV-Meningitis + Herpes Zoster (V1/V2)</li> <li>7. VZV-Meningitis</li> <li>8. VZV-Meningitis + Zoster ophthalmicus</li> <li>9. VZV-Meningitis (typischer Zosterausschlag fraglich)</li> <li>10. VZV-Meningoenzephalitis + Zoster</li> <li>11. VZV-Meningitis</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Meningoenzephalitis nach Pneumokokken-Meningitis</li> <li>2. Bakterielle Meningitis</li> <li>3. Bakterielle Meningitis (M. tuberculosis), oder Autoimmun-bedingt</li> <li>4. HSV-Enzephalitis</li> <li>5. Atypisches Guillain-Barré-Syndrom</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Enzephalitis</li> <li>2. Periphere Fazialisparese</li> <li>3. Meningoenzephalitis</li> <li>4. Meningoenzephalitis</li> <li>5. Enzephalitis + multiple Hirninfarkte</li> <li>6. Meningomyelitis</li> <li>7. Meningoenzephalitis</li> <li>8. Meningoenzephalitis + Fazialisparese</li> <li>9. Meningoenzephalitis</li> <li>10. Fazialisparese (VZV oder Borrelien)</li> </ol>	
Grunderkrankung	<p>1x rheumatoide Arthritis</p> <p>1x cerebrovaskuläre Risikofaktoren</p> <p>1x Prostata-Karzinom</p>	<p>1x Hyperthyreose</p> <p>1x COPD</p>	<p>1x Hyperthyreose</p> <p>1x Bronchial-Karzinom</p> <p>1x Diabetes</p>	

COPD, chronisch obstruktive Lungenerkrankung; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*; MW, Mittelwert; StabW, Standardabweichung; ZNS, Zentrales Nervensystem

Zur Charakterisierung anderer Erreger-spezifischer T-Zellen aus der CSF wurden beispielhaft die HSV-spezifischen Immunzellen eines 46-jährigen Patienten mit akuter HSV-Enzephalitis unter Verwendung der neu entwickelten Methode nachgewiesen und quantitativ und funktionell analysiert.

#### ***5.2.6 Personenkollektiv zur Analyse des Effekts der Harnstoffbehandlung von Proteinen und Zelllysaten auf die Induktion Antigen-spezifischer Immunantworten***

Um den Einfluss der Harnstoffbehandlung von CMV-Proteinen und -Lysaten auf die CMV-spezifische Immunantwort zu identifizieren, wurden Blutproben von insgesamt 122 Personen analysiert, deren Charakteristika in Tabelle 6 dargestellt sind. Für den Vergleich von Harnstoff-behandelten CMV-Proteinen mit einem unbehandelten CMV-Lysat wurden 40 gesunde Kontrollpersonen, 40 HD-Patienten und 40 Tx-Patienten eingeschlossen, von denen jeweils ca. 75% CMV-seropositiv waren. Um den Effekt der Harnstoffbehandlung auf je ein VZV- und ein CMV-Lysat zu testen, wurde die Erreger-spezifische Immunantwort von 10 gesunden Kontrollpersonen gemessen. Des Weiteren wurde anhand von Blutproben von 10 gesunden Kontrollpersonen und 2 Tx-Patienten der Effekt von pp65- und/oder IE-1-defizienten CMV-Lysaten (Virus-Deletionsmutanten) sowie eines weiteren Harnstoff-behandelten CMV-Lysates auf die Induktion der CMV-spezifischen Immunantwort analysiert.

**Tabelle 6: Charakteristika der Patienten für die Analyse Harnstoff-behandelter Antigene**

n Probanden/Patienten	122						
	Teil1: Harnstoff-behandelte Proteine vs CMV-Lysat			Teil2: VZV/CMV-Lysate <sup>§</sup>		Teil3: verschiedene CMV-Lysate + Deletionen	
n	120			10		12	
CMV-Serologie	Negativ		positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
n	32		88	1	9	2	10
Alter in Jahren [MW ± StabW]	53,70 ± 17,64		54,97 ± 16,18	-		-	
p-Wert (Alter)	0,71			-		-	
Charakteristik	Kontrollen	HD	Tx	Kontrollen		Kontrollen	Tx
n	40	40	40	10		10	2
Alter in Jahren [MW ± StabW]	43,31 ± 13,74	65,85 ± 13,32	54,73 ± 14,33	42,25 ± 13,07		42,46 ± 12,29	
CMV-Status (pos/neg)	30/10	29/10	29/10	9/1		8/2	2/0
p-Wert (Alter)	<0,0001 (**Kontrolle vs HD; **Kontrolle vs Tx; **HD vs Tx)			-		-	

<sup>§</sup> Alle Personen aus Teil 2 sind VZV-seropositiv. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; CMV, Cytomegalievirus; HD, Hämodialyse-Patient; MW, Mittelwert; neg, negativ; pos, positiv; StabW, Standardabweichung; Tx, Transplantat-Empfänger; VZV, Varizella-Zoster Virus

### **5.3 Quantifizierung und Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen aus Vollblut (Kurzzeit-Stimulationsmethode)**

Der Analyse Antigen-spezifischer T-Zellen aus Vollblut durch intrazelluläre Zytokinanalysen erfolgte wie zuvor beschrieben (SCHMIDT, SESTER, 2013). Durch die Zugabe von Antigenen (s. Tabelle 7) und ko-stimulatorischen Antikörpern können die Lymphozyten in heparinisierem Vollblut stimuliert werden. Die Antigene werden dabei zunächst von APCs prozessiert und anschließend als Peptide auf den MHC-Molekülen präsentiert. T-Zellen, die diesen MHC-Peptidkomplex erkennen, werden aktiviert, wodurch unter anderem Aktivierungsmarker wie z.B. CD69 auf der Zelloberfläche hochreguliert und spezifisch verschiedene Zytokine produziert werden. Nach 2h wird der Export über Transportvesikel durch die Zugabe von Brefeldin A (BFA) unterbunden, wodurch die induzierten Zytokine nicht mehr sezerniert, sondern stattdessen intrazellulär angereichert werden. Sechs Stunden nach Inkubationsbeginn erfolgt die Fixierung der Leukozyten, bei der zusätzlich die Erythrozyten lysiert werden. Durch die anschließende Permeabilisierung der Zellen mit Saponin können Fluorochrom-gekoppelte Antikörper in die Zellen gelangen und dort die intrazellulär akkumulierten Zytokine spezifisch markieren. Gleichzeitig können bei Bedarf zudem Moleküle auf der Zelloberfläche Fluorochrom-markiert werden. Abschließend erfolgt die Identifizierung Fluorochrom-markierter Zellen und deren quantitativer und funktioneller Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie.

#### **5.3.1 Antigen-spezifische T-Zell-Stimulation aus Vollblut**

Pro 15ml Reagiergefäß werden je 450µl (für 2 FACS-Färbungen) bzw. 600µl (für 3 FACS-Färbungen) heparinisierem Vollblut, und je 1µg/ml der ko-stimulatorischen Antikörper anti-CD28 Antikörper und anti-CD49d vorgelegt. Anschließend werden die spezifischen Antigene bzw. die Stimulanzen der Negativ- und Positivkontrolle (Tabelle 7) zu den entsprechenden Reagiergefäßen hinzugegeben. Alle Proben werden nach gründlichem Durchmischen für insgesamt 6h im Brutschrank (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) mit lose angeschraubtem Deckel inkubiert, wobei nach 2h jeweils 10µg/ml BFA hinzugefügt wird.

**Tabelle 7: Antigene zur Antigen-spezifischen Stimulation aus Vollblut**

Erreger	Antigene	Lösungsmittel	Menge/ml Vollblut
HSV	Ko-HSV (Negativkontrolle)	H <sub>2</sub> O, destilliert	32µl
	HSV	H <sub>2</sub> O, destilliert	32µl
VZV	Ko-VZV (Negativkontrolle)	H <sub>2</sub> O, destilliert	32µl
	VZV	H <sub>2</sub> O, destilliert	32µl
<i>M. tuberculosis</i>	PBS (Negativkontrolle)	-	10µl
	PPD	PBS	7,32µg
	ESAT-6	10mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	10µg
	CFP-10	10mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	10µg
CMV	Ko-CMV (Negativkontrolle)	H <sub>2</sub> O, destilliert	32µl
	CMV	H <sub>2</sub> O, destilliert	32µl
	MRC5 (Negativkontrolle)	PBS	27,9µl
	CMV (MRC5)	PBS	27,9µl
	IE-1-defizientes CMV (MRC5)	PBS	27,9µl
	pp65-defizientes CMV (MRC5)	PBS	27,9µl
	pp65/IE-1-defizientes CMV (MRC5)	PBS	27,9µl
<i>Staphylococcus aureus</i>	SEB (Positivkontrolle)	H <sub>2</sub> O, destilliert	2,5µg
<b>Harnstoff-behandelte Antigene</b>			
VZV	Ko-VZV (Negativkontrolle)	4M Harnstoffpuffer	32µl
	VZV	4M Harnstoffpuffer	32µl
CMV	IE-1	4M Harnstoffpuffer	30µg
	pp65	4M Harnstoffpuffer	8µg
	Ko-CMV (Negativkontrolle)	4M Harnstoffpuffer	32µl
	CMV	4M Harnstoffpuffer	32µl
	MRC5 (Negativkontrolle)	4M Harnstoffpuffer	27,9µl
	CMV (MRC5)	4M Harnstoffpuffer	27,9µl

Erreger	Antigene	Lösungsmittel	Menge/ml Vollblut
	IE-1-defizientes CMV (MRC5)	4M Harnstoffpuffer	27,9µl
	pp65-defizientes CMV (MRC5)	4M Harnstoffpuffer	27,9µl
	pp65/IE-1-defizientes CMV (MRC5)	4M Harnstoffpuffer	27,9µl

### 5.3.2 Erythrozytenlyse und Fixierung der Leukozyten

Nach Zugabe von 100µl/ml 20mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pro Ansatz werden die Proben jeweils 10s gut durchmischt und 15min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wird jeweils 9ml Lysing-Solution pro ml Vollblut hinzupipettiert. Daraufhin werden die Ansätze für 10min bei RT inkubiert und 7min bei 320xg zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in 2ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 400µl FACS-Puffer aufgenommen. Bis zur intrazellulären Färbung werden die Zellen bei 4°C aufbewahrt.

Bei Verwendung von Antikörpern, die an nicht-Fixierungsstabile Epitope binden (z.B. des PD-1-Moleküls) werden nach der 15-minütigen Inkubation mit EDTA jeweils 150µl der Proben entnommen und diese bereits vor Fixierung mit Lysing-Solution 25min mit dem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper im Dunkeln gefärbt (Färbung 3a, Tabelle 8). Die weitere Bearbeitung dieser Proben wird wie im vorherigen Abschnitt beschrieben durchgeführt.

### 5.3.3 Intrazelluläre T-Zell-Färbung

Die Antikörpermischungen für die in dieser Arbeit verwendeten Multiparameterfärbungen sind in Tabelle 8 dargestellt. Zur Färbung werden die fixierten Proben durchmischt und pro Färbung von jedem Ansatz 200µl in je ein 5ml Reagiergefäß überführt. Zur Permeabilisierung der Zellen werden pro Reagiergefäß 2ml Saponin-Puffer hinzugefügt, 10min bei RT inkubiert und anschließend durch einen Zentrifugationsschritt (7min bei 320xg) und das Abnehmen des Überstandes entfernt. Die Zellen werden anschließend in je 50µl Saponin-haltigem Antikörper-Gemisch (Tabelle 8) resuspendiert und für 30min im Dunkeln bei RT gefärbt. Danach werden die ungebundenen Antikörper durch einen Waschschrift mit je 3ml FACS-Puffer (7min bei 320xg und anschließendem Abnehmen des Überstandes) entfernt. Abschließend werden die Zellen in je 150µl 1% Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen und bis zur Analyse im Durchflusszytometer bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

**Tabelle 8: Antikörper-Gemische zur Fluorochrom-markierten Färbung Antigen-spezifisch stimulierter Blutproben**

Antikörper	Fluorochrom	Färbung 1	Färbung 2	Färbung 3a*	Färbung 3b	Färbung 4	Färbung 5	Färbung 6
		Menge [ $\mu$ l]						
<b>CD4</b>	PE-Cy7	0,50	0,50	0,50				0,50
	APC-H7					0,50	0,50	
<b>CD8</b>	PerCP						4,00	
<b>CD69</b>	PerCP	2,00	2,00		2,00	2,00		2,00
	Pe-Cy7						1,00	
<b>IL-2</b>	PE	2,00					2,00	
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	FITC	0,50			0,50	0,50	0,50	
	PE		0,60					
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	APC	0,15					0,15	
<b>IL-4</b>	PE							2,00
<b>IL-17</b>	APC							2,50
<b>CD45R0</b>	PE-Cy7					1,50		
<b>CD62L</b>	PE					8,00		
<b>CD127</b>	FITC		1,25					
<b>CD152 (CTLA-4)</b>	APC		2,00					
<b>CD279 (PD-1)</b>	PE			22,50				
<b>Saponin (5%)</b>		1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00
<b>FACS-Puffer</b>		43,85	42,65		46,50	36,50	40,85	42,00
<b>Gesamt</b>		<b>50,00</b>	<b>50,00</b>	<b>23,00</b>	<b>50,00</b>	<b>50,00</b>	<b>50,00</b>	<b>50,00</b>

\*Färbung der Zellen vor der Zugabe von Lysing-Solution; die Volumina der Antikörper-Lösungen wurden austitriert, so dass die Antikörper-Konzentration im Sättigungsbereich lag.

#### **5.4 Nachweisverfahren zur simultanen Analyse Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten und Blut**

Das in dieser Arbeit entwickelte neue Testverfahren ermöglicht die simultane Analyse von Antigen-spezifischen Immunzellen aus verschiedenen Komponenten (extrasanguine Flüssigkeiten und Blut) in einem einzigen Stimulations- und Färbeansatz. Dazu werden die Immunzellen aus der extrasanguinen Flüssigkeit zunächst isoliert und mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen den Pan-Leukozytenmarker CD45 markiert. Nach der Durchmischung mit unmarkiertem Vollblut derselben Person werden die Zellen aus dem Blut und der extrasanguinen Flüssigkeit in einem Reagiergefäß mit Antigen stimuliert (s. Abschnitt 5.3). Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse können die Zellen anhand des Vorhandesseins oder des Fehlens der zur Vorfärbung verwendeten Fluorochrom-Markierung ihrer ursprünglichen Komponente (extrasanguine Flüssigkeit oder Blut) zugeordnet werden.

Das Nachweisverfahren wurde unter Angabe der einzelnen Arbeitsschritte beim Deutschen Patent- und Markenamt (DPMA) patentiert (SCHUB et al., 2015b) und wird im Folgenden am Beispiel der CSF beschrieben.

##### **5.4.1 Isolierung der Immunzellen aus Cerebrospinalflüssigkeit**

Innerhalb einer Stunde nach der CSF-Entnahme durch Lumbalpunktion werden 1 bis 8ml CSF in ein 15ml Reagiergefäß überführt und 10min bei 320xg zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und die Zellen werden in 100µl Markiermedium aufgenommen. Anschließend wird die Gesamtzellzahl unter Verwendung von 5µl des Zell-Medium-Gemisches in einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Bei einer Gesamtzellzahl von weniger als 15.000 wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen verzichtet. Stattdessen wurde mit der gesamten Zellsuspension (95µl) eine Oberflächenfärbung (s. Abschnitt 5.4.4) zur Quantifizierung und Charakterisierung der unterschiedlichen Immunzelltypen durchgeführt.

Bei einer Gesamtzellzahl zwischen 15.000 und 30.000 werden zunächst 5µl der Zellsuspension für die Oberflächenfärbung (s. Abschnitt 5.4.4) verwendet um den Anteil der CD4 T-Zellen an der gesamten CSF-Immunzellpopulation durchflusszytometrisch zu bestimmen und die Anzahl der isolierten CD4 T-Zellen zu berechnen. Bei Proben mit mehr als

15.000 CD4 T-Zellen werden die restlichen 90µl der Zellsuspension für die Stimulation vorbereitet.

Bei einer Gesamtzellzahl von mehr als 30.000 werden ebenfalls 5µl der Zellsuspension für die Oberflächenfärbung (s. Abschnitt 5.4.4) verwendet und die restlichen 90µl direkt für die Stimulation vorbereitet, ohne das Ergebnis der Oberflächenfärbung abzuwarten.

#### **5.4.2 Vorfärbung der Immunzellen aus Cerebrospinalflüssigkeit**

Die isolierten Zellen aus der CSF werden in ein 5ml Reagiergefäß überführt und mit 1µl anti-CD45-Antikörper (CD45-V500) für 30min im Dunkeln bei RT vorgefärbt. Nach Zugabe von 3ml Markiermedium werden die Zellen 7min bei 320xg zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Der Waschschrift wird mit 2ml Markiermedium wiederholt und der Überstand erneut abgenommen.

Zur Überprüfung der Stabilität der Vorfärbung während der Ko-Inkubation mit Blut wurden die Zellen in einem Kontrollexperiment zusätzlich mit 0,5µl eines APC-gekoppelten anti-CD45-Antikörpers vorgefärbt (s. Abbildung 35).

#### **5.4.3 Simultane Stimulation von Immunzellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten und Blut (Ko-Inkubation)**

Das Zellpellet aus vorgefärbten CSF-Zellen wird mit 300µl heparinisiertem Vollblut pro verwendetes Antigen vermischt, sodass die weitere Behandlung der Immunzellen simultan erfolgt. Nach Zugabe von 1µg/ml anti-CD28 Antikörper und 1µg/ml anti-CD49d-Antikörper und erneutem Durchmischen werden jeweils 300µl des Zellgemischs pro 15ml Reagiergefäß verteilt.

Die weiteren Arbeitsschritte der Antigen-spezifischen Stimulation und Fixierung erfolgen analog zu den Abschnitten 5.3.1 und 5.3.2. Zu beachten ist hierbei, dass lediglich ein Blutvolumen von 300µl pro Reagiergefäß vorhanden ist und die Arbeitsschritte aufgrund der Markierung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern möglichst im Dunkeln erfolgen sollten. Nach der Fixierung der Zellen im Dunkeln werden die permeabilisierten Zellen unter Verwendung der Antikörper aus Tabelle 9 gefärbt (s. Abschnitt 5.3.3) und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

**Tabelle 9: Antikörper-Gemisch zur Analyse Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten und Blut**

Antikörper	Fluorochrom	Menge [ $\mu$ l]
CD4	PE-Cy7	1,00
CD69	PerCP	2,00
IL-2	PE	2,00
IFN $\gamma$	FITC	0,50
TNF $\alpha$	V450	1,00
CD152 (CTLA-4)	APC	2,00
Saponin (5%)		1,00
FACS-Puffer		40,50
<b>Gesamt</b>		<b>50,00</b>

#### **5.4.4 Quantifizierung von Immunzellen in Cerebrospinalflüssigkeit und Blut**

Um die Quantität verschiedener Immunzellsubpopulationen in der CSF und im Blut zu messen, werden charakteristische Oberflächenmoleküle der einzelnen Subtypen angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch identifiziert. Die Arbeitsschritte sind nachfolgend erläutert.

In 100 $\mu$ l Markiermedium aufgenommene Zellen aus der CSF bzw. 100 $\mu$ l heparinisiertes Vollblut werden in je ein 5ml Reagiergefäß überführt und 20min bei RT im Dunkeln mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Tabelle 10 zeigt das Antikörper-Gemisch zur Quantifizierung von CD4 und CD8 T-Zellen, B Zellen und NK Zellen. Nach Zugabe von 1ml Lysing-Solution werden die Proben weitere 10min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen 7min bei 320xg zentrifugiert und der Überstand wird abgenommen. Nach der Zugabe von 2ml FACS-Puffer werden die Zellen erneut 7min bei 320xg zentrifugiert und nach dem Entfernen des Überstandes in je 150 $\mu$ l 1%PFA aufgenommen. Bis zur durchflusszytometrischen Analyse werden die Zellen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

**Tabelle 10: Antikörper-Gemisch zum Nachweis verschiedener Lymphozytensubpopulationen**

Antikörper	Fluorochrom	Menge [ $\mu$ l]
CD4	PE-Cy7	0,50
CD3	APC	0,50
CD19	FITC	2,50
CD8	PerCP	4,00
CD16	PE	1,00
CD56	PE	4,00
<b>Gesamt</b>		<b>12,50</b>

#### **5.4.5 Protokollabweichungen bei der Isolierung von Immunzellen aus anderen extrasanguinen Flüssigkeiten**

Das Protokoll zur simultanen Stimulation kann auch durch Kombination anderer extrasanguiner Flüssigkeiten mit Vollblut durchgeführt werden. Das Procedere der Stimulation erfolgt wie in Abschnitt 5.4.3 beschrieben, die Isolierung der Zellen aus anderen extrasanguinen Flüssigkeiten variiert jedoch in Abhängigkeit des Gesamtvolumens und der Zellzahl.

##### **1. Blasenspülflüssigkeit (BSF)**

Zwischen 50 und 100ml BSF werden auf zwei 50ml Reagiergefäße verteilt und 7min bei 320xg zentrifugiert. Die Zellpellets werden in je 1ml Markiermedium aufgenommen und in einem 15ml Reagiergefäß vereint. Die beiden 50ml Reagiergefäße werden jeweils 2x mit je 1ml Markiermedium ausgewaschen, das ebenfalls in das 15ml Reagiergefäß überführt wird. Nach erneuter Zentrifugation (7min bei 320xg) und dem Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet zur weiteren Bearbeitung in 200 $\mu$ l Markiermedium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit 10 $\mu$ l der Zellsuspension wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben. Die Vorfärbung der isolierten Immunzellen mit 1 $\mu$ l V500-gekoppelten CD45-Antikörpern wird analog zu Abschnitt 5.4.2 durchgeführt.

##### **2. Aszitesflüssigkeit**

50ml Aszitesflüssigkeit werden analog zur BSF zentrifugiert, jedoch mit 5ml Markiermedium gewaschen. Das Zellpellet wird anschließend in 1ml Markiermedium resuspendiert. Zur

Stimulation werden pro Antigen jeweils 100.000 Immunzellen (je ca. 40.000 CD4 T-Zellen) mit insgesamt 2,5µl CD45-V500 vorgefärbt.

### **5.5 Isolierung von PBMCs aus Vollblut über einen Dichtegradienten**

Bei *in-vitro*-Experimenten, bei denen vitale Lymphozyten kultiviert oder isoliert werden sollen, ist es notwendig unerwünschte Blutbestandteile wie z.B. Erythrozyten oder Granulozyten zu entfernen. Dies wird dadurch erreicht, dass sich diese Zellen aufgrund ihrer Eigenschaften in einem durch Zentrifugation erzeugten Dichtegradienten einer Ficoll-Lösung in einem Reagenzgefäß an einer anderen Stelle ansammeln als dies bei den PBMCs (weiße intermediäre Schicht) der Fall ist. Durch vorsichtiges Abnehmen der intermediären Schicht können somit vitale PBMCs aus dem Blut isoliert werden. Da Kulturexperimente über mehr als 24h besonders stark von Verunreinigungen beeinflusst werden können, werden die nachfolgenden Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Zunächst werden pro 50ml Reagiergefäß maximal 12ml heparinisieretes Vollblut mit einer PBS-EDTA-Lösung (PBS, 0,02%EDTA) auf ein Volumen von 35ml aufgefüllt und durchmischt. Anschließend wird das Zellgemisch langsam mit 13ml Zuckerlösung (Ficoll) unterschichtet und 20min bei 1180xg ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMCs (weiße intermediäre Schicht) werden nun in ein neues 50ml Reagiergefäß überführt und in 50ml PBS-EDTA-Lösung resuspendiert. Nach einem 10min Zentrifugationsschritt bei 615xg wird der Überstand verworfen und die Zellen mit 50ml PBS-EDTA-Lösung erneut gewaschen (10min 280xg). Nachdem der Überstand verworfen wurde, werden die Zellen in 1ml PBS-HSA (PBS, 0,1%HSA) aufgenommen und in ein 15ml Reagiergefäß überführt. Bei Bedarf kann nun die Zellzahl bestimmt werden.

### **5.6 Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen aus isolierten Zellpopulationen**

Zur Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen aus isolierten Zellpopulationen in Kulturmedien (ohne Anwesenheit von Vollblut) wurde ein Protokoll verwendet, das für die Stimulation von PBMCs etabliert wurde und nachfolgend detailliert angegeben ist (SESTER et al., 2002).

Pro Antigen-Ansatz wird eine definierte Zellzahl isolierter Immunzellen in 400µl Markiermedium in ein 5ml Polypropylen-Reagiergefäß überführt. Die Stimulation erfolgt durch Zugabe von 1µg/ml anti-CD28 und 1µg/ml anti-CD49d sowie dem jeweiligen Antigen von Interesse. Zusätzlich werden jeweils eine entsprechende Negativkontrolle und eine

Positivkontrolle (SEB) mitgeführt. Nachdem die Ansätze durchmischt wurden, werden sie 30min im Brutschrank (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) mit lose angeschraubtem Deckel inkubiert. Anschließend folgt ein 5min Zentrifugationsschritt bei 230xg, woraufhin die Zellen für weitere 1,5h im Brutschrank inkubiert werden. Nachdem jeweils 10µg/ml BFA hinzugefügt und die Ansätze 5min bei 230xg zentrifugiert wurden, werden sie zurück in den Brutschrank gestellt. Nach einer Stimulationsdauer von insgesamt 6h werden jeweils 100µl/ml 20mM EDTA hinzupipettiert und die Proben jeweils 10s ordentlich durchmischt. Nach 15-minütiger Inkubation werden die Ansätze mit jeweils 2ml PBS-EDTA-Lösung versetzt und anschließend 7min bei 320xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Zellen durch Zugabe von jeweils 300µl warmem 4% PFA und anschließender 5-minütiger Inkubation fixiert. In einem letzten Waschschrift werden zu jedem Ansatz 2ml FACS-Puffer hinzugefügt und die Ansätze anschließend 7min bei 320xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Zellen in insgesamt 400µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Färbung und durchflusszytometrischen Quantifizierung und Charakterisierung bei 4°C gelagert. Die Färbung erfolgt analog zu Abschnitt 5.3.3 unter Verwendung des in Tabelle 9 angegebenen Antikörper-Gemische.

## **5.7 Isolierung von T- und B-Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung**

Um lebende Immunzellen aus dem Vollblut mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Zellsortierung zu isolieren, werden zunächst PBMCs isoliert (s. Abschnitt 5.5). Die Zellen werden im Anschluss mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und danach z.B. mit einem durchflusszytometrischen Zellsortierer (BD FACS Aria III) aufgrund ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) sowie der An- bzw. Abwesenheit bestimmter Fluoreszenzsignale eingeteilt und isoliert. Im Gegensatz zu einer durchflusszytometrischen Messung können mit Hilfe eines Zellsortierers die Zellen von Interesse nicht nur quantifiziert und charakterisiert werden, sondern auch für weitere Analysen und Zell-Kultivierungen in einem vitalen Zustand isoliert werden. Während der Messung werden die Zellen wie bei der analytischen Durchflusszytometrie in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt (isoelektrische Fokussierung). Bei der Zellsortierung geht der Flüssigkeitsstrom jedoch anschließend zusätzlich in einzelne Tropfen über, die einzelne Zellen enthalten können oder nicht. Befindet sich in einem Tropfen eine Zelle von Interesse, erhält der Flüssigkeitsstrom unmittelbar vor dem sogenannten Abrisspunkt (Entstehung des Tropfens) eine elektrische Ladung. Dadurch kann

der Tropfen mit der gewünschten Zelle in dem danach zu passierenden elektrischen Feld so abgelenkt werden, dass die Zelle in einem separaten Reagiergefäß aufgefangen werden kann (IBRAHIM, VAN DEN ENGH, 2007).

Die Arbeitsschritte zur Vorbereitung der Proben für die durchflusszytometrische Zellsortierung von T- und B-Zellen sind nachfolgend erläutert.

Isolierte PBMCs werden in einem Volumen von 1ml Markiermedium mit gegen CD3 (CD3-APC) bzw. CD56 (CD56-PE) gerichteten Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern 20min bei RT im Dunkeln angefärbt. Nach einem Waschschrift mit 5ml Markiermedium (Zentrifugation 7min bei 320xg und Abnehmen des Überstandes) werden die Zellen in 1ml Markiermedium resuspendiert und am Zellsortierer analysiert und sortiert. T-Zellen werden als CD3<sup>+</sup> Lymphozyten definiert und sortiert, wohingegen B-Zellen über die fehlende Expression von CD3 und CD56 identifiziert werden (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> Lymphozyten).

Um die Reinheit der Zellpopulationen nach Sortierung zu bestimmen, wird jeweils ein Aliquot mit Hilfe der Subpopulations-Oberflächenfärbung (s. Abschnitt 5.4.4) gefärbt und analysiert. Für die T-Zell- bzw. B-Zellisolierung ergab sich eine Reinheit von >99% bzw. 86,3%. Nach der Isolierung werden die beiden Zellpopulationen mit jeweils 15ml Markiermedium gewaschen (Zentrifugation 7min bei 320xg und Abnehmen des Überstandes) und in jeweils 5ml Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend werden die Zellen über Nacht im Brutschrank (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) aufbewahrt.

## **5.8 Magnetische Isolierung von CD14<sup>+</sup>-Monozyten unter Verwendung von CD14-„MicroBeads“**

Zellsuppopulationen können nicht nur mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen, sondern auch über ein kommerzielles Magnet-basiertes Verfahren isoliert werden. Dazu werden die Zellen von Interesse mit spezifischen Antikörpern markiert, an die Magnetpartikel gebunden sind („MicroBeads“). Anschließend können die markierten Zellen unter Verwendung einer Säule und eines Magneten von den unmarkierten Zellen getrennt werden, da die markierten Zellen durch den Magneten in der Säule zurückgehalten werden. Zur Isolierung von Monozyten zur Verwendung als Antigen-präsentierende Zellen wurden in dieser Arbeit CD14 „MicroBeads“ verwendet, die die Isolierung von CD14<sup>+</sup>-Monozyten ermöglichen. Die Monozyten-Isolierung erfolgt dabei nach den Angaben des Herstellers („CD14 MicroBeads human“).

### **5.8.1 Magnetische Markierung von CD14-positiven Monozyten**

Am Tag der Antigen-spezifischen Stimulation werden PBMCs isoliert (s. Abschnitt 5.5), wobei nach der Auftrennung über den Dichtegradienten die Wasch- und Zentrifugationsschritte auf Eis bzw. bei 4°C erfolgen. Die nachfolgende magnetische Markierung und Isolierung der CD14<sup>+</sup> Monozyten erfolgt ebenfalls auf Eis um die Adhäsion der Monozyten an die Wand des Reagiergefäßes zu verhindern und wird wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

Nach der Bestimmung der Zellzahl werden die PBMCs durch Zentrifugieren (10min bei 320xg) pelletiert und anschließend wird der Überstand verworfen. Pro 10<sup>7</sup> Zellen werden jeweils 80µl Isolierungspuffer hinzugefügt und das Pellet darin resuspendiert. Anschließend werden pro 10<sup>7</sup> Zellen jeweils 20µl CD14 „MicroBeads hinzugefügt. Nach sorgfältigem Durchmischen erfolgt die Markierung der Zellen 15min bei 2-8°C im Kühlschrank. Nach einem Waschriff mit 1-2ml Isolierungspuffer pro 10<sup>7</sup> Zellen, werden die Zellen (max 10<sup>8</sup>) in 500µl Isolierungspuffer aufgenommen.

### **5.8.2 Magnetische Isolierung der markierten CD14<sup>+</sup>-Monozyten mit einer Säule**

Die Säule („MS Column“) wird an einem großen Magneten („MACS Separator“) befestigt und dreimal mit jeweils 500µl Isolierungspuffer gewaschen. Anschließend wird die Zellsuspension auf die Säule gegeben, die danach dreimal mit je 500µl Isolierungspuffer gewaschen wird. Die durchlaufende Flüssigkeit inklusive der unmarkierten Zellen wird währenddessen in einem 15ml Reagiergefäß aufgefangen. Zur Isolierung der CD14<sup>+</sup>-Monozyten wird die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt. Nach zügigem Auffüllen der Säule mit 1ml Isolierungspuffer werden die Zellen mit Hilfe eines Stempels aus der Säule gewaschen und in einem separaten 15ml Reagiergefäß aufgefangen. Bei Bedarf können die isolierten Zellen über eine zweite Säule aufgetrennt werden, um eine höhere Reinheit zu erhalten.

Um die Reinheit der CD14<sup>+</sup>-Monozyten-Isolierung zu überprüfen, wurde ein Aliquot dieser isolierten Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil der CD14<sup>+</sup>-Monozyten an allen Zellen betrug nach der Isolierung über zwei Säulen >99,4%.

## **5.9 Analyse der Antigen-spezifischen Proliferation von T-Zellen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs CFSE**

Neben der Fähigkeit, eine Vielzahl verschiedener Zytokine zu exprimieren, ist die Antigen-spezifische Proliferation eine weitere wichtige Eigenschaft von T-Zellen für eine effektive

Erregerbekämpfung. Zur Bestimmung der Proliferationsfähigkeit werden neben dem in Abschnitt 5.10 beschriebenen Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) oder radioaktiven Reagenzien wie <sup>3</sup>H-Thymidin häufig fluoreszierende Farbstoffe wie z.B. der Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) verwendet. Dieser Farbstoff, der die Funktionalität der Zellen nicht beeinflusst, kann die Zellmembran von vitalen Zellen passieren und wird in den Zellen in Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) umgewandelt und gebunden, sodass er seine Membrangängigkeit verliert. Kommt es zur Proliferation der Zelle, führt dies zur gleichmäßigen Aufteilung des Farbstoffs auf die beiden Tochterzellen, die dementsprechend ein geringeres CFSE-Signal als die Mutterzelle besitzen. Dementsprechend können auch mehrmalige Zellteilungen durch eine weitere Abnahme des CFSE-Signals nachgewiesen werden. Durch die zusätzliche Markierung der Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die gegen charakteristische Oberflächenmoleküle verschiedener Zellen gerichtet sind, können zudem einzelne Zellsubpopulationen wie CD4 und CD8 T-Zellen hinsichtlich ihrer Proliferationsfähigkeit durchflusszytometrisch analysiert werden (LYONS, 1999; LYONS, DOHERTY, 2004).

### **5.9.1 Markierung von isolierten PBMCs mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE**

Die Markierung isolierter PBMCs mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE erfolgte nach einem etablierten Protokoll (SESTER et al., 2008b). Die einzelnen Schritte sind im Folgenden aufgeführt.

1ml PBS-HSA resuspendierte PBMCs werden mit 1ml 2x Markierlösung versetzt und während einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C im Dunkeln bei langsamer Rotation mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE markiert. Anschließend wird das Reagiergefäß mit Markiermedium auf 15ml aufgefüllt und 10min bei 320xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in 15ml Markiermedium gelöst und 5min durch langsames Rotieren bei 37°C im Dunkeln durchmischt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (7min bei 320xg) wird der Überstand abgenommen und der Waschschrift wiederholt. Abschließend werden die Zellen in 4ml Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer bestimmt.

### 5.9.2 Stimulation CFSE-markierter Immunzellen

Die Stimulation und die abschließende Ernte und Färbung der CFDA-SE markierten Zellen erfolgte abgesehen von der Kultivierungsdauer und den verwendeten Antigenen wie zuvor für andere Antigen beschrieben und ist nachfolgend detailliert dargelegt (SESTER et al., 2008b).

Nach der Zellzahlbestimmung wird mit Wachstumsmedium eine Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml hergestellt und jeweils 30µl dieser Zellsuspension in je eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte pipettiert. Anschließend werden jeweils 30µl der verdünnten Antigene (Tabelle 11) hinzugefügt und die 96-Loch-Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach Hinzufügen von jeweils 240µl Wachstumsmedium werden die Zellen erneut im Brutschrank inkubiert. Aufgrund der stärkeren Proliferation werden die SEB-stimulierten Proben am 4. Tag 1:2 verdünnt, indem die Zellen zunächst durch Resuspendieren vom Plattenboden gelöst und anschließend auf zwei Vertiefungen verteilt werden. Danach werden jeweils 150µl frisches Wachstumsmedium hinzugefügt. Die Zellen der anderen Vertiefungen werden nicht geteilt.

**Tabelle 11: Antigene zur Analyse der VZV-spezifischen T-Zellproliferation**

Antigen	Menge/ml
Ko-VZV*	1,46mg
VZV-Ag*	1,46mg
SEB	2,5µg

\*AbD Serotec

### 5.9.3 Ernte CFSE-markierter Immunzellen und Markierung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

Am 5. Tag werden jeweils 150µl Medium-Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in dem verbleibenden Volumen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach Überführen der Zellen in je ein 5ml Reagiergefäß, wird die jeweilige Vertiefung der 96-Loch-Platte zweimal mit je 200µl PBS gewaschen und die Flüssigkeit ebenfalls in das entsprechende 5ml Reagiergefäß überführt. Daraufhin werden pro Ansatz 100µl/ml 20mM EDTA hinzugefügt und 10s durchmischt. Die Ansätze werden 15min im Dunkeln inkubiert und anschließend wird jeweils 2ml FACS-Puffer hinzugefügt. Nach einem 7-minütigen

Zentrifugationsschritt bei 320xg wird der Überstand abgenommen und die Zellen werden mit 50µl des in Tabelle 12 aufgeführten Antikörper-Gemisches 30min lang im Dunkeln bei RT gefärbt. Anschließend werden die Zellen mit 3ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 7min bei 320xg). Schließlich wird der Überstand abgenommen und die Zellen in jeweils 150µl 1%PFA resuspendiert. Bis zur durchflusszytometrischen Messung werden die Zellen bei 4°C im Dunkeln gelagert.

**Tabelle 12: Antikörper-Gemisch zum Nachweis der VZV-spezifischen T-Zellproliferation**

Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
CD4	PE	4,00
CD8	PerCP	6,00
CD3	APC	1,00
FACS-Puffer		39,00
<b>Gesamt</b>		<b>50,00</b>

### 5.10 Analyse der Antigen-spezifischen Proliferation unter Verwendung von BrdU und der späten IFN $\gamma$ -Expression

Die Blutproben werden analog zur Kurzzeitstimulationsmethode (s. Abschnitt 5.3.1) mit 1µg/ml anti-CD28 Antikörper und 1µg/ml anti-CD49d-Antikörper sowie dem VZV-Antigen und den entsprechenden Stimulanzen für die Negativ- und Positivkontrolle stimuliert (Tabelle 7). Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte mit Ausnahme der verwendeten Antigene wie zuvor beschrieben (WIDMANN et al., 2008) und ist nachfolgend detailliert dargestellt.

Nach gründlichem Durchmischen werden die Proben im Brutschrank (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) mit lose angeschraubtem Deckel für eine Stimulationsdauer von insgesamt 36h inkubiert. Um die Zellen mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen, wird jeder Ansatz nach 6h mit 600µl Markiermedium versetzt und anschließend gründlich durchmischt. 8h vor der Fixierung der Zellen werden jeweils 500µM BrdU hinzugefügt, um bei der abschließenden durchflusszytometrischen Messung die spezifische Proliferation auf Einzelzellebene anhand der Einbaurrate von BrdU nachweisen zu können. Um zusätzlich die späte IFN $\gamma$ -Expression

(32-36h nach Stimulation) analysieren zu können, wird 4h vor der Fixierung 10µg/ml BFA hinzugegeben.

36h nach Zugabe der Antigene erfolgt die Lyse der Erythrozyten und die Fixierung der Zellen, die jeweils analog zu Abschnitt 5.3.2 durchgeführt wird. Das Protokoll für die anschließende T-Zell-Färbung ist in Abschnitt 5.3.3 beschrieben, wobei zum Nachweis der Antigen-spezifischen bzw. der polyklonalen Proliferation der T-Zellen sowie der späten IFN $\gamma$ -Expression die in Tabelle 13 angegebenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper verwendet werden. Bis zur abschließenden durchflusszytometrischen Analyse werden die Proben bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

**Tabelle 13: Antikörper-Gemisch zur Quantifizierung der Antigen-spezifischen Proliferation anhand der BrdU-Einbaurrate sowie der späten IFN $\gamma$ -Expression**

Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
CD4	PE-Cy7	1,00
CD69	PerCP	2,00
IFN $\gamma$	PE	0,25
BrdU	FITC	12,00
CD8	APC	1,00
Saponin (5%)		1,00
FACS-Puffer		32,75
<b>Gesamt</b>		<b>50,00</b>

### 5.11 (Vor-) Inkubation von Immunzellen mit Antirheumatika/Immunsuppressiva

Vier Stunden vor Zugabe der Antigene werden pro Ansatz je 300µl Vollblut auf 15ml Reagiergefäße verteilt und mit den in Tabelle 14 aufgeführten Medikamenten versetzt. Dabei wird für jedes Medikament der maximale Plasmaspiegel nach einmaliger Medikamenteneinnahme als „mittlere“ Konzentration definiert. Zusätzlich werden jeweils 5fach erhöhte und 5fach verdünnte Konzentrationen verwendet. Einzige Ausnahme bildet das Medikament Methylprednisolon das aufgrund der größeren therapeutischen Breite 10fach verdünnt bzw. konzentriert verwendet wird. Als Referenzwerte dienen Stimulationsansätze ohne Medikament. Alle Ansätze werden bis zum Beginn der Antigen-

spezifischen Stimulation (Kurzzeit-Assay, s. Abschnitt 5.3; Antikörper-Gemisch, Tabelle 9) oder Proliferation (BrdU, s. Abschnitt 5.10) für 4h im Brutschrank bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit lose angeschraubtem Deckel vorinkubiert.

**Tabelle 14: Übersicht der zur Vorinkubation verwendeten anti-rheumatischen und immunsuppressiven Medikamente sowie der jeweiligen verwendeten Medikamentenkonzentration**

Medikament	Niedrige Konzentration [µg/ml]	mittlere Konzentration* [µg/ml]	Hohe Konzentration [µg/ml]
Abatacept (Orencia)	30	150	750
Adalimumab (Humira)	20	100	500
Etanercept (Enbrel)	0,5	2,5	12,5
Rituximab	60	300	1500
Tocilizumab	60	300	1500
Cyclosporin A	0,16	0,8	4
Methylprednisolon	0,1	1	10

\*entspricht dem maximalen Plasmaspiegel nach Einmaleinnahme des jeweiligen Medikaments

## 5.12 Quantifizierung CMV-spezifischer Immunzellen mit der ELISpot-Technologie

Zum Nachweis CMV-spezifischer Immunzellen mit der ELISpot-Methode wurde der T-Track<sup>®</sup> CMV (Lophius Biosciences) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei werden IFN $\gamma$ -sezernierende Immunzellen nach Stimulation mit CMV-spezifischen Antigenen detektiert, indem das sezernierte Zytokin durch anti-IFN $\gamma$ -spezifische Antikörper auf dem Boden der 96-Loch-Platte gebunden und anschließend über eine enzymatische Reaktion lokal nachgewiesen wird. Jede lokale IFN $\gamma$ -Ansammlung (Spot) repräsentiert dabei eine Zytokinproduzierende Zelle.

Aus heparinisiertem Vollblut werden dafür zunächst PBMCs isoliert (s. Abschnitt 5.5) und mit Medium auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Pro Ansatz werden 100µl Zellsuspension in die mit anti-IFN $\gamma$ -Antikörpern beschichteten Löcher einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Anschließend werden die Antigene bzw. die Stimulanzen für die Negativ-, Positiv- und Operatorkontrolle (Tabelle 15) hinzugegeben. Nach 19h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> werden die Proben sechsmal mit jeweils 200µl Waschpuffer 1 gewaschen und nach Zugabe eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten

anti-IFN $\gamma$ -Antikörpers 2h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach je 3 Waschschritten mit den Waschpuffern 1 und 2, werden pro Vertiefung 50 $\mu$ l Substrat hinzugefügt und die Platte 6 bis 7min im Dunkeln bei RT inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Wasser wird die Färbereaktion abgestoppt und die Platte anschließend über Nacht bei RT getrocknet. Die Anzahl der Spots pro Vertiefung wird mit Hilfe einer digitalen Lupe zeitnah manuell bestimmt.

**Tabelle 15: Antigene zur Stimulation Antigen-spezifischer Immunzellen mit der ELISpot-Technologie**

Antigen	Menge Antigen (Stock) [ $\mu$ l]	Volumen Medium [ $\mu$ l]	pro Vertiefung einer 96- Loch-Platte [ $\mu$ l]
Medium (Negativkontrolle)	-	50	50
IE-1 Protein <sup>ab</sup>	2	48	50
pp65 Protein <sup>b</sup>	2	48	50
Ko-CMV <sup>c</sup>	4,8	45,2	50
CMV-Ag <sup>c</sup>	4,8	45,2	50
SEB <sup>d</sup> (Positivkontrolle)	5	45	50
Medium (Operatorkontrolle) <sup>e</sup>	-	150	150

<sup>a</sup>Pro Person wurden jeweils zwei Ansätze mit dem IE-1-Protein stimuliert. <sup>b</sup>Harnstoff-modifiziertes Antigen; <sup>c</sup>BioWhittaker; <sup>d</sup>Lophius Biosciences; <sup>e</sup>ohne Zellen

### 5.13 Quantitative Bestimmung Erreger-spezifischer Antikörper mittels ELISA

Zur Bestimmung VZV-, HSV- bzw. CMV-spezifischer IgG-Antikörper werden VZV anti-IgG-ELISA, HSV anti-IgG-ELISA und CMV-IgG-ELISA nach Herstellerangaben (EuroImmun-Ag) durchgeführt. Zusätzlich erfolgt die Analyse VZV-spezifischer IgA-Antikörper unter Verwendung eines VZV anti-IgA-ELISA. Die IgA-ELISA Teste wurden in der Routinediagnostik des Institutes für Virologie in Kollaboration analysiert. Die jeweiligen Nachweisgrenzen sind in Tabelle 16 angegeben.

**Tabelle 16: Grenzwerte der verschiedenen Antikörper-ELISA zur Bestimmung des jeweiligen Serostatus**

Antikörperklasse	negativ	grenzwertig	positiv
VZV-IgG [IE/l*]	<80	≥80 - <110	≥110
VZV-IgA [ratio]	<0,8	≥0,8 - <1,1	≥1,1
CMV-IgG und HSV-IgG [RE/ml]	<16	≥16 - <22	≥22

IE/l, internationale Einheiten pro Liter; RE/ml, relative Einheiten pro Milliliter

## 5.14 Statistische Analysen

### 5.14.1 Bestimmung der Nachweisgrenzen für VZV- bzw. HSV-spezifische T-Zellen

Die Nachweisgrenze für VZV-spezifische CD4 T-Zellen wurde anhand der Frequenz-Verteilung der Stimulationen mit dem Kontroll-Lysat von allen 207 immungesunden Kontrollen berechnet. Dazu wurden die Frequenzen der Kontroll-Lysat-Stimulationen, die über der medianen Frequenz von 0,00190% lagen (n=103), logarithmiert und daraufhin an der logarithmierten medianen Frequenz der Kontroll-Lysat-Stimulation gespiegelt. Daraufhin wurde aus den logarithmierten Ausgangswerten und den gespiegelten Werten eine Standardabweichung von 1,70628 berechnet. Abschließend wurde die doppelte Standardabweichung zur medianen Frequenz der Kontroll-Lysat-Stimulationen addiert und durch Entlogarithmieren eine Nachweisgrenze von 0,02027% berechnet, die auf 0,02% gerundet wurde.

Die Nachweisgrenze für HSV-spezifische CD4 T-Zellen wurde auf die gleiche Weise berechnet und ergab einen Wert von 0,02631%, der auf 0,025% gerundet wurde. Da die Anzahl der immungesunden Probanden bei der Analyse der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen eher gering war (n=26), wurde die Nachweisgrenze unter Verwendung einer „Receiver Operator Characteristics“ (ROC)-Analyse auf Basis des VZV-Serostatus überprüft und konnte schließlich mit einem Wert von 0,025% bestätigt werden.

Die Nachweisgrenze für CMV-spezifische CD4 T-Zellen wurde bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe etabliert und beträgt 0,05% (SESTER et al., 2001).

### 5.14.2 Einschlusskriterien für die T-Zellfunktionalitätsanalysen

Für alle T-Zellanalysen aus Blut wurden ausschließlich Proben berücksichtigt, bei denen mindestens 10000 CD4 T-Zellen gemessen wurden. Ausnahmen bilden Proben bei denen nur

8000 bis 10000 CD4 T-Zellen nachweisbar waren, jedoch eine deutliche Anzahl Erregerspezifische T-Zellen identifiziert werden konnten und die Negativkontrolle deutlich unterhalb der Nachweisgrenze sowie die Positivkontrolle deutlich oberhalb der Nachweisgrenze lagen. Aufgrund des erhöhten Anteils reaktiver T-Zellen in den extrasanguinen Flüssigkeiten bei insgesamt meist geringerer Gesamtzellzahl wurden hier alle Proben mit mindestens 1000 CD4 T-Zellen pro Ansatz eingeschlossen.

Um eine aussagekräftige Statistik bezüglich der T-Zellfunktionalität generieren zu können, wurden für die Zytokinexpressionsanalysen aufgrund der Aufteilung in drei Subpopulationen lediglich Proben herangezogen, bei denen mindestens 30 Zytokin-exprimierende T-Zellen nachweisbar waren. Für die Messung der CD127-, CTLA-4- und PD-1-Expression hingegen wurden aufgrund der Aufteilung in zwei Subpopulationen alle Proben von seropositiven Personen und Personen mit einem grenzwertigen Serostatus berücksichtigt, die mindestens 20 Erregerspezifische CD4 T-Zellen aufwiesen.

#### ***5.14.3 Einschlusskriterien zur Berechnung der Veränderungen der IFN $\gamma$ - und der CTLA-4-Expressionsdichte***

Die Veränderung der Expressionsdichte eines Zytokins oder Oberflächenmoleküls ist ein Maß für den Anstieg bzw. die Reduktion eines Wertes im Vergleich zu einem anderen Wert und wird durch Division dieser Werte ermittelt.

Zur Analyse einer Veränderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von IFN $\gamma$  nach Stimulation mit verschiedenen CMV-Antigenen wurden ausschließlich Proben von CMV-seropositiven Personen eingeschlossen, die mindestens 20 CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 bzw. CD8 T-Zellen besitzen. Dieser Unterschied („Fold difference“) wurde errechnet, indem die IFN $\gamma$ -MFI der CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> durch die IFN $\gamma$ -MFI der nicht-CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 bzw. CD8 T-Zellen dividiert wurde.

Zur Berechnung einer Veränderung der CTLA-4-MFI zwischen Immunzellen aus der CSF und Immunzellen aus dem Blut wurden ausschließlich Proben mit jeweils mindestens 20 CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 T-Zellen eingeschlossen.

#### ***5.14.4 Statistische Testverfahren***

Zum Vergleich kontinuierlicher Variablen (T-Zellfrequenz, Proliferation, Expression von PD-1, CTLA-4, CD127, CD62L und CD45RO, Antikörperlevel, IFN $\gamma$ -positive Spots bei der ELISpot-

Analyse, Leukozytenzahlen, Prozent von Lymphozyten, Zellzahl pro  $\mu\text{l}$  CSF, CRP, BSG) zwischen 2 Gruppen wurden der Wilcoxon Test für gepaarte und der Mann-Whitney Test für ungepaarte Werte verwendet. Um mehr als 2 Gruppen zu vergleichen, wurden der Friedman bzw. Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Signifikante Ergebnisse in diesen Initialtests wurden mit dem Dunn Post-Test den verschiedenen Gruppen zugeordnet. Unterschiede in der Zytokinexpression, im Alter, in der Krankheitsdauer und im DAS28 wurden unter Verwendung des gepaarten bzw. ungepaarten t-Test für 2 Gruppen und des One-Way Analysis of Variance Test mit dem Bonferroni Post-Test für mehr als 2 Gruppen ermittelt. Für die korrekte Verwendung von parametrischen bzw. nichtparametrischen Tests bei der Analyse der DAS28-, CRP- und BSG-Daten wurde zuvor der D'Agostino und Pearson omnibus Normalitätstest zur Bestätigung oder zum Ausschluss einer Gauß'schen Normalverteilung durchgeführt. Die Spearman Korrelation wurde verwendet um die Korrelation zwischen CD4 T-Zellfrequenzen und Antikörperlevels, Frequenzen und Proliferationsfähigkeit von CD4 T-Zellen, Proliferationsfähigkeit von CD4 und CD8 T-Zellen sowie zwischen T-Zellfrequenzen und IFN $\gamma$ -positiven Ereignissen in der ELISpot-Analyse zu bestimmen. Die Sensitivität und Spezifität von Grenzwerten bei Verwendung verschiedener immunologischer Marker oder verschiedener Antigene wurde jeweils mit einer ROC-Analyse berechnet. Der jeweils beste Grenzwert wurde unter Verwendung des Youden-Index ermittelt, der durch Addition des jeweiligen Sensitivität- und Spezifitätswertes und anschließender Subtraktion von 100% errechnet wird. Der Grenzwert mit dem höchsten Youden-Index ist dabei jeweils am besten geeignet um zwischen zwei Gruppen zu unterscheiden. Unterschiede in der Geschlechtsverteilung wurden bei 2 Gruppen mit Fisher's exaktem Test und bei mehr als 2 Gruppen mit dem  $\chi^2$ -Test“ berechnet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Charakterisierung VZV-spezifischer Immunantworten bei asymptomatischen und symptomatischen Patienten

Erreger-spezifische Immundiagnostik findet mehr und mehr Anwendung im klinischen Alltag. Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines T-Zell-basierten, immundiagnostischen Verfahrens zur quantitativen und qualitativen Analyse von Immunantworten, die spezifisch gegen das Varizella-Zoster Virus (VZV) gerichtet sind, sowie die Identifizierung möglicher klinischer Anwendungsfelder.

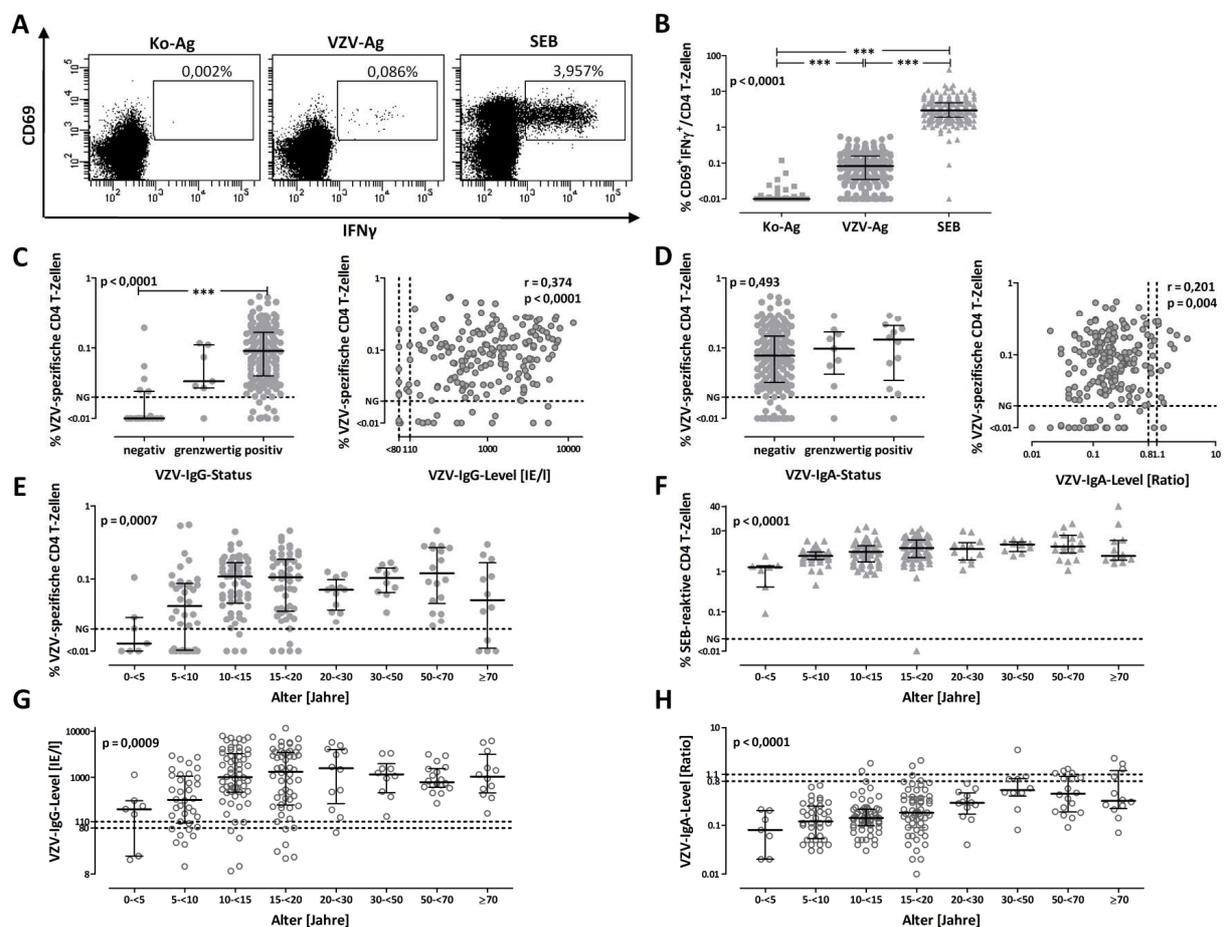
Dazu ist es nötig, die VZV-spezifischen immunologischen Parameter zunächst in einer großen Gruppe immungesunder nicht-symptomatischer Personen detailliert zu charakterisieren. Dies liefert die Grundlage für einen Vergleich mit symptomatischen Patienten, sodass definierte Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort während eines aktiven Infektgeschehens identifiziert und möglicherweise für Diagnostik, Risikoeinschätzung und Therapiekontrolle verwendet werden können.

#### 6.1.1 *Ausgeprägte phänotypische und funktionelle Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort in asymptomatischen Personen gegenüber Patienten mit Herpes Zoster*

##### 6.1.1.1 *Die VZV-spezifische Immunantwort ist in gesunden Personen nachweisbar und zeigt altersabhängige Unterschiede*

Zur Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunität in immungesunden Personen wurden 207 Vollblutproben von immungesunden Probanden im Alter von 10 Monaten bis 91,8 Jahren analysiert (s. Tabelle 2). Jede Blutprobe wurde mit VZV-Lysat, Kontroll-Lysat als Negativkontrolle und dem polyklonalen Stimulus *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) als Positivkontrolle stimuliert. Abbildung 5A zeigt repräsentative Punktdiagramme der Immunantwort eines VZV-positiven 44-jährigen Probanden. Die Antigen-spezifischen CD4 T-Zellen wurden durchflusszytometrisch anhand der Ko-Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Zytokins Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) identifiziert. Die Mehrheit der Proben haben keine reaktiven Zellen in der Negativkontrolle, wohingegen bei den meisten Probanden VZV-spezifische CD4 T-Zellen nachweisbar waren (Median 0,08%, IQR 0,12%,

Abbildung 5B). Die T-Zellfrequenzen nach Stimulation mit SEB waren höher und mit Ausnahme einer Person in allen Probanden nachweisbar. Da diese Person eine deutliche Immunantwort nach Stimulation mit dem VZV-Lysat zeigte, wurde sie ebenfalls in die weiteren Analysen eingeschlossen. Um die VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen zu berechnen, wurde die Frequenz der Negativkontrolle von der entsprechenden Frequenz, die nach Stimulation mit dem VZV-Lysat erhalten wurde, subtrahiert. Mit Hilfe der T-Zellfrequenzen der Kontroll-Lysat Stimulationen von allen 207 gesunden Kontroll-Probanden konnte ein Grenzwert von 0,02% VZV-spezifischer CD4 T-Zellen kalkuliert werden, der für alle weiteren Analysen verwendet wurde (s. Abschnitt 5.14.1).



**Abbildung 5: Die VZV-spezifische Immunität ist in der Mehrheit immunkompetenter Personen nachweisbar und zeigt altersabhängige Unterschiede.** Vollblutproben von immunkompetenten Probanden wurden mit Kontroll-Antigen (Ko-Ag, Negativkontrolle), VZV-Antigen (VZV-Ag) und *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB, Positivkontrolle) stimuliert und die reaktiven CD4 T-Zellen ( $CD69^+IFN\gamma^+$ ) durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Dargestellt sind repräsentative Punktdiagramme („Dotplots“) eines 44-jährigen Probanden mit Angabe der jeweiligen Prozentzahl reaktiver CD4 T-Zellen. **(B)** Für alle 207 getesteten immungesunden Kontroll-Probanden sind die Frequenzen der reaktiven CD4 T-Zellen nach Stimulation mit dem jeweiligen Antigen dargestellt. Auch die Person ohne SEB-reaktive CD4 T-Zellen zeigte eine deutlich Aktivierung nach Stimulation mit dem VZV-Antigen und wurde deshalb in die weiteren Analysen mit eingeschlossen. Die Frequenzen der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen wurden nach Subtraktion der entsprechenden Negativkontrolle anhand des VZV-IgG- **(C)** bzw. VZV-IgA-Status **(D)** dargestellt (jeweils links). Die Korrelation der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen mit

den jeweiligen VZV-IgG- bzw. IgA-Levels ist jeweils rechts abgebildet. In **(E)-(H)** sind die Frequenzen reaktiver CD4 T-Zellen ( $CD69^+/IFN\gamma^+$ ) nach Stimulation mit **(E)** VZV-Antigen nach Subtraktion der Negativkontrolle bzw. **(F)** SEB sowie die VZV-spezifischen **(G)** IgG- und **(H)** IgA-Levels in verschiedenen Altersgruppen der immungesunden Probanden dargestellt. Die Querstriche markieren jeweils den medianen Wert und den Interquartilsabstand; die gepunkteten Linien geben die Nachweisgrenze (NG) der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen, der IgG- und der IgA-Levels an. Die Nachweisgrenze (NG) für VZV-spezifische CD4 T-Zellen beträgt 0,02%. Die IgG-Levels werden in Internationalen Einheiten pro Liter (IE/l) und die IgA-Levels als Ratio angegeben. Für die statistischen Analysen wurde der Friedman Test für gepaarte (B) und der Kruskal-Wallis Test für ungepaarte Werte (C) - (H), jeweils in Kombination mit Dunn Post-Test, verwendet. Signifikante Unterschiede im Post-Test in (B) - (D) sind mit Sternen gekennzeichnet (\*\*\*) für  $p < 0,0001$ ). Die Korrelationen wurden mit dem Spearman Test kalkuliert. IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; VZV, Varizella-Zoster Virus. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015a).

Der Vergleich der zellulären Immunantwort mit der humoralen Immunantwort (IgG und IgA), die mittels ELISA ermittelt wurde, zeigte, dass die Mehrheit der VZV-IgG-positiven Probanden auch T-Zell-positiv war (67/81), wohingegen die Mehrheit der serologisch negativen Personen auch T-Zell negativ war (14/19, Abbildung 5C). Zudem wiesen die IgG-positiven Probanden eine deutlich höhere VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz auf als die IgG-negativen. Von den 7 VZV-IgG-grenzwertigen Probanden waren 6 VZV-T-Zell-positiv. Die Analyse der VZV-IgA-Levels ergab, dass nur 12/207 Probanden IgA-positiv und 9/207 Probanden IgA-grenzwertig waren (Abbildung 5D). Im Vergleich zu den VZV-IgA negativen Personen war kein Unterschied in der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz nachweisbar ( $p=0,493$ ). Bei quantitativem Vergleich der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen und der Antikörperlevels lag lediglich eine moderate Korrelation für IgG ( $r=0,374$ ) und eine schwache Korrelation für IgA vor ( $r=0,201$ ), die jedoch statistisch signifikant war (Abbildung 5C und D).

Um altersabhängige Unterschiede identifizieren zu können, wurde die Frequenz VZV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 T-Zellen sowie die VZV-IgG- und IgA-Levels in unterschiedlichen Altersgruppen analysiert (Abbildung 5E-H). Die VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz stieg im Altersverlauf von ihrem Minimum in den jüngsten Probanden (<5 Jahre) bis zum Erreichen des Maximums im jugendlichen Alter (10-15 Jahre) stark an. Anschließend blieb die Frequenz bis zu einem Alter von 70 Jahren relativ stabil und alle analysierten Probanden waren T-Zell-positiv. Bei Probanden >70 Jahren fiel die Frequenz hingegen interessanterweise deutlich ab und bei einem Drittel dieser Probanden war die T-Zellfrequenz sogar unterhalb der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Altersgruppe lediglich ein geringer Abfall der SEB-reaktiver T-Zellfrequenzen beobachtet werden.

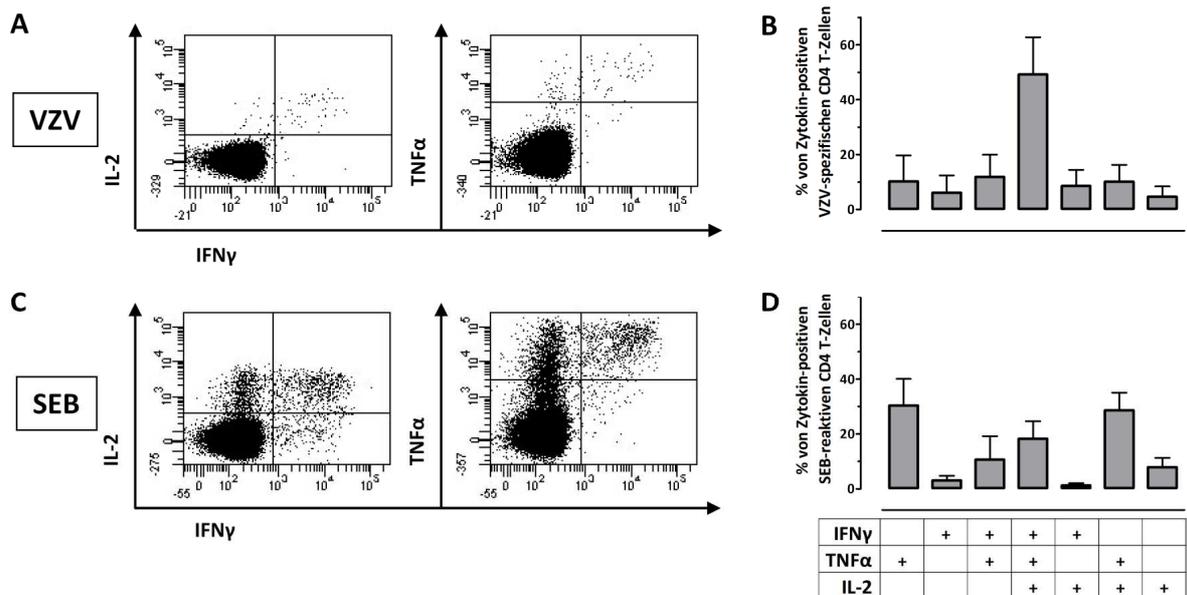
Der Altersverlauf der VZV-IgG-Levels war ähnlich wie der Verlauf der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz, wobei der maximale Level erst in der Altersgruppe der 20-30-Jährigen erreicht wurde. Die IgA-Levels blieben im Altersverlauf trotz kontinuierlichen Anstieges mehrheitlich unterhalb der Nachweisgrenze. Erst in den beiden ältesten Probandengruppen konnte ein deutlicher Anteil von mehr als 20% IgA-positiven Personen identifiziert werden.

Zusammenfassend waren VZV-spezifische T-Zellen und IgGs in der überwiegenden Mehrheit der immungesunden Personen nachweisbar und offenbarten altersspezifische Unterschiede. Im Gegensatz dazu wurden positive IgA-Levels erwartungsgemäß erst in den beiden ältesten Altersgruppen vermehrt detektiert.

#### ***6.1.1.2 VZV-spezifische T-Zellen in nicht-symptomatischen Personen sind überwiegend multifunktionell***

Um die funktionellen Eigenschaften der VZV-spezifischen zellulären Immunantwort zu charakterisieren wurde die Expression der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  durch VZV-spezifische CD4 T-Zellen ermittelt und mit der Zytokinexpression der SEB-reaktiven CD4 T-Zellen verglichen. Abbildung 6A und C zeigt repräsentative Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Messung der Zytokinexpression VZV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 T-Zellen eines immunkompetenten Probanden. In Abbildung 6B und D ist die Zytokinexpression VZV-spezifischer und polyklonaler CD4 T-Zellen der immungesunden Probanden dargestellt. Je nachdem ob eine Zelle in der Lage war bestimmte Zytokinkombinationen zu exprimieren oder nicht, wurde sie in eine der sieben Untergruppen eingeteilt. Um eine aussagekräftige statistische Analyse der Daten zu gewährleisten, wurden hierfür ausschließlich Probanden mit einer VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz über der Nachweisgrenze (0,02%) und mindestens 30 Zytokin-positiven reaktiven (CD69<sup>+</sup>) CD4 T-Zellen eingeschlossen. Während die VZV-spezifische zelluläre Immunantwort überwiegend durch multifunktionelle Zellen gekennzeichnet war, die in der Lage sind, alle drei Zytokine zu exprimieren, waren die SEB-reaktiven Zellen mehrheitlich TNF $\alpha$ -positiv. Die Zytokinexpressionsprofile der VZV-spezifischen und der polyklonalen Immunantwort zeigten keine charakteristischen altersabhängigen Unterschiede.

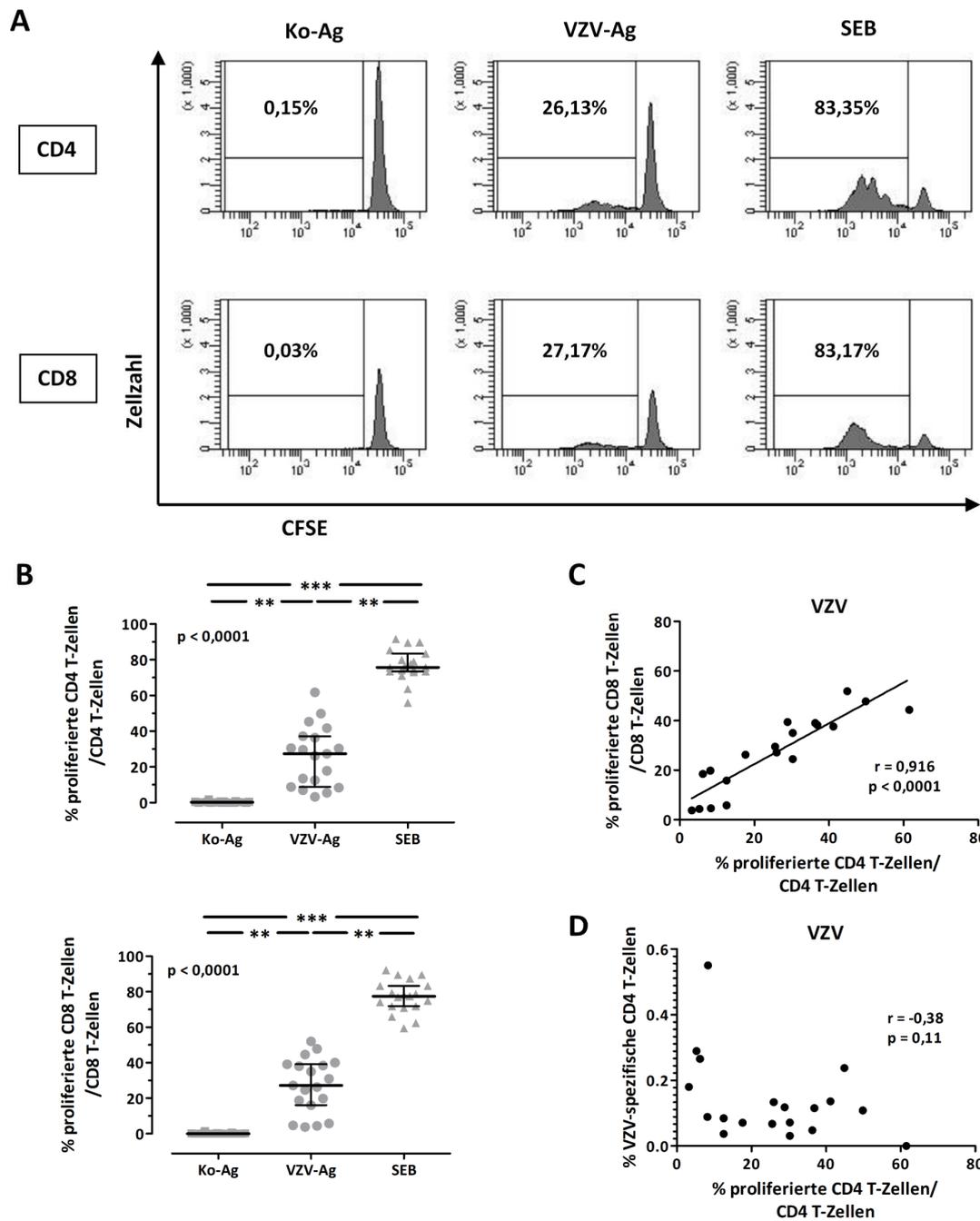
Folglich waren die VZV-spezifischen CD4 T-Zellen immungesunder Personen durch ein hohes Maß an Multifunktionalität gekennzeichnet, die sich durch die Fähigkeit zur gleichzeitigen Expression der drei untersuchten Zytokine auszeichnet.



**Abbildung 6: VZV-spezifische CD4 T-Zellen immungesunder Probanden sind multifunktional.** Dargestellt ist die Expression der Zytokine IFN $\gamma$ -, IL-2- und TNF $\alpha$  von VZV-spezifischen (oben) und *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B-reaktiven CD4 T-Zellen (SEB, unten). In **(A)** und **(C)** sind repräsentative Punktdiagramme der Zytokinexpression von CD4 T-Zellen eines immungesunden Probanden dargestellt. Die VZV-spezifischen **(B)** und SEB-reaktiven **(D)** CD4 T-Zellen wurden anhand der Expression der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  auf sieben Subgruppen aufgeteilt. Um eine hohe Aussagekraft der Statistik zu gewährleisten, wurden nur Proben berücksichtigt, bei denen mindestens 30 Zytokin-exprimierende CD4 T-Zellen nachgewiesen wurden (n=126). Die Balken stellen den jeweiligen Anteil der Subgruppen der einfach-, doppelt- oder dreifach-Zytokin-exprimierenden Zellen an allen VZV-spezifischen bzw. SEB-reaktiven CD4 T-Zellen dar. Dabei sind die Werte als Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. IFN, Interferon; IL, Interleukin; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015a).

### 6.1.1.3 Die Proliferationsfähigkeit VZV-spezifischer T-Zellen ist hoch

Neben der Expression verschiedener Zytokine ist eine weitere wichtige Eigenschaft von T-Zellen die Fähigkeit zur spezifischen Proliferation nach Kontakt mit dem entsprechenden Antigen. In Abbildung 7 sind die anhand des abnehmenden CFSE-Signals identifizierten proliferierten CD4 und CD8 T-Zellen immungesunder Probanden nach 7-tägiger Stimulation mit VZV-Antigen sowie den Stimulanzen der Negativ- und Positivkontrolle dargestellt. Repräsentative Histogramme der CD4 und CD8 T-Zellproliferation einer immungesunden Person nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen sind in Abbildung 7A dargestellt. Die Ergebnisse von 19 analysierten Proben immungesunder Probanden zeigten, dass sowohl die CD4 als auch die CD8 T-Zellen nach Stimulation mit dem VZV-Antigen mit einem medianen Anteil von 27,37% bzw. 27,17% proliferierter Zellen eine starke Proliferation aufwiesen, wohingegen die Proliferation nach Stimulation mit dem Kontroll-Antigen gering war (CD4 0,27%, CD8 0,07%, Abbildung 7B). Erwartungsgemäß war der Anteil proliferierter CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation mit SEB am größten (75,70% und 77,42%).

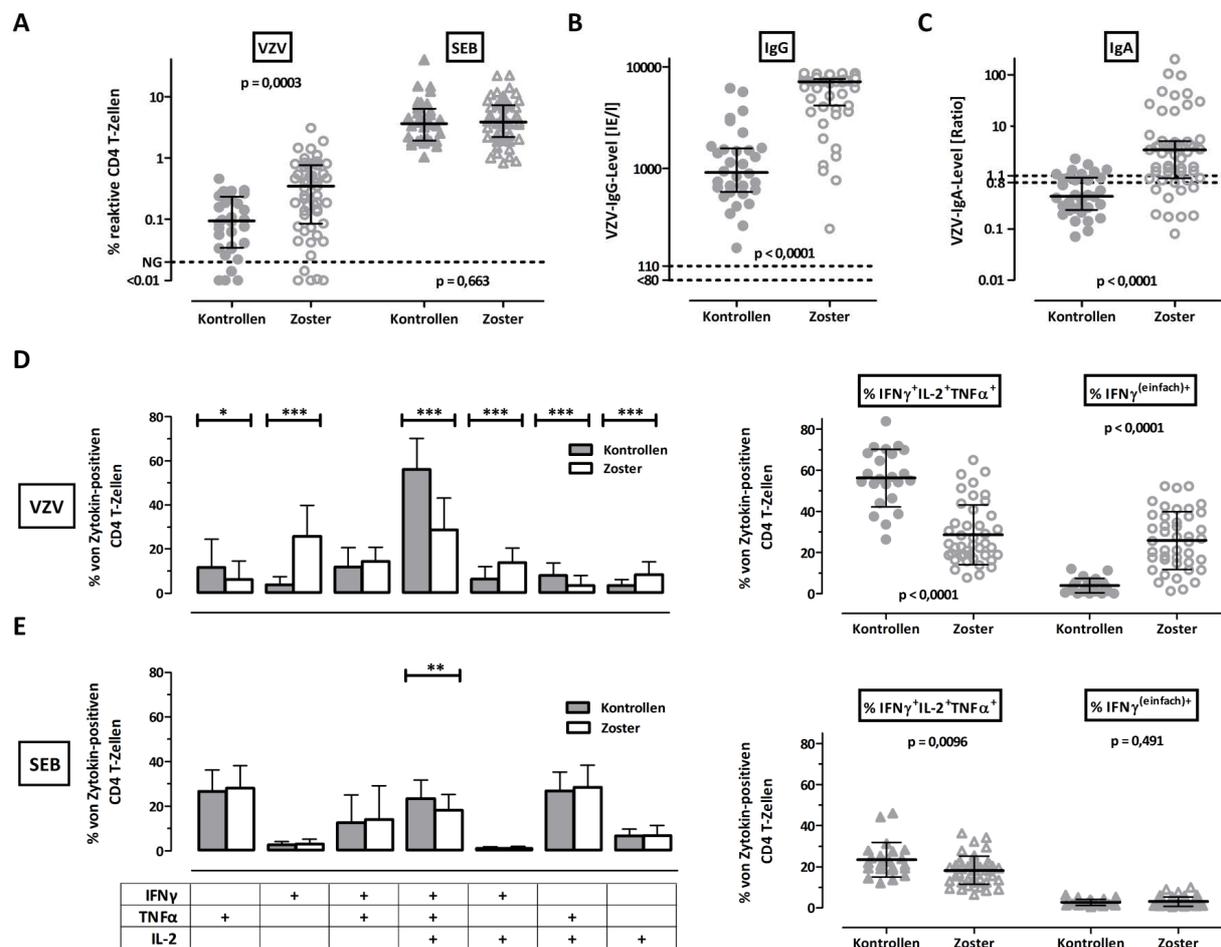


**Abbildung 7: Die Proliferationsfähigkeit VZV-reaktiver CD4 T-Zellen korreliert mit der von CD8 T-Zellen, jedoch nicht mit der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz.** Dargestellt ist die anhand der Abnahme des CFSE-Signals identifizierte Proliferation von CD4 und CD8 T-Zellen immungesunder Probanden nach 7-tägiger Stimulation mit einem Kontroll-Antigen (Ko-Ag), dem VZV-Antigen (VZV-Ag) und dem *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB). **(A)** Repräsentative Histogramme der Proliferationsfähigkeit von CD4 und CD8 T-Zellen eines immungesunden Probanden. **(B)** Dargestellt ist die Proliferationsfähigkeit der CD4 und CD8 T-Zellen von 19 VZV-seropositiven immungesunden Probanden. Der Median und der Interquartilsabstand sind mit Querstrichen markiert. In **(C)** ist die Korrelation der Proliferationsfähigkeit zwischen den VZV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen immungesunder Personen dargestellt. In **(D)** wird die Frequenz VZV-spezifischer CD4 T-Zellen mit der Proliferationsfähigkeit der VZV-reaktiven CD4 T-Zellen bei immungesunden Probanden korreliert. Für die statistische Berechnung gepaarter Werte (B) wurde der Friedman Test mit Dunn Post-Test verwendet und signifikante Unterschiede mit Sternen angegeben (\*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ ). Die Korrelationen (C, D) wurden unter Verwendung des Spearman Tests kalkuliert. CFSE, Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester; VZV, Varizella-Zoster Virus.

Bemerkenswert war, dass sich intraindividuell eine sehr gute Korrelation zwischen der VZV-spezifischen Proliferation von CD4 und CD8 T-Zellen zeigte ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,915$ , Abbildung 7C). Im Gegensatz dazu konnte zwischen der Frequenz und der Proliferationsfähigkeit der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen keine Korrelation identifiziert werden (Abbildung 7D).

#### 6.1.1.4 Während akuter Reaktivierung ist die VZV-spezifische Immunität deutlich verändert

Zur Identifizierung immunologischer Marker für eine akute VZV-Reaktivierung wurde die VZV-spezifische Immunantwort von nicht-symptomatischen Probanden und Personen mit akutem Zoster analysiert. Interessanterweise zeigten Personen mit akuter Reaktivierung gegenüber den nicht-symptomatischen Personen eine signifikant höhere VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz, wohingegen sich die Frequenz der polyklonal stimulierten T-Zellen zwischen den Gruppen nicht unterschied (Abbildung 8A). Auch die humorale VZV-spezifische Immunantwort (IgG und IgA) war bei symptomatischen Personen erhöht (Abbildung 8B und C).

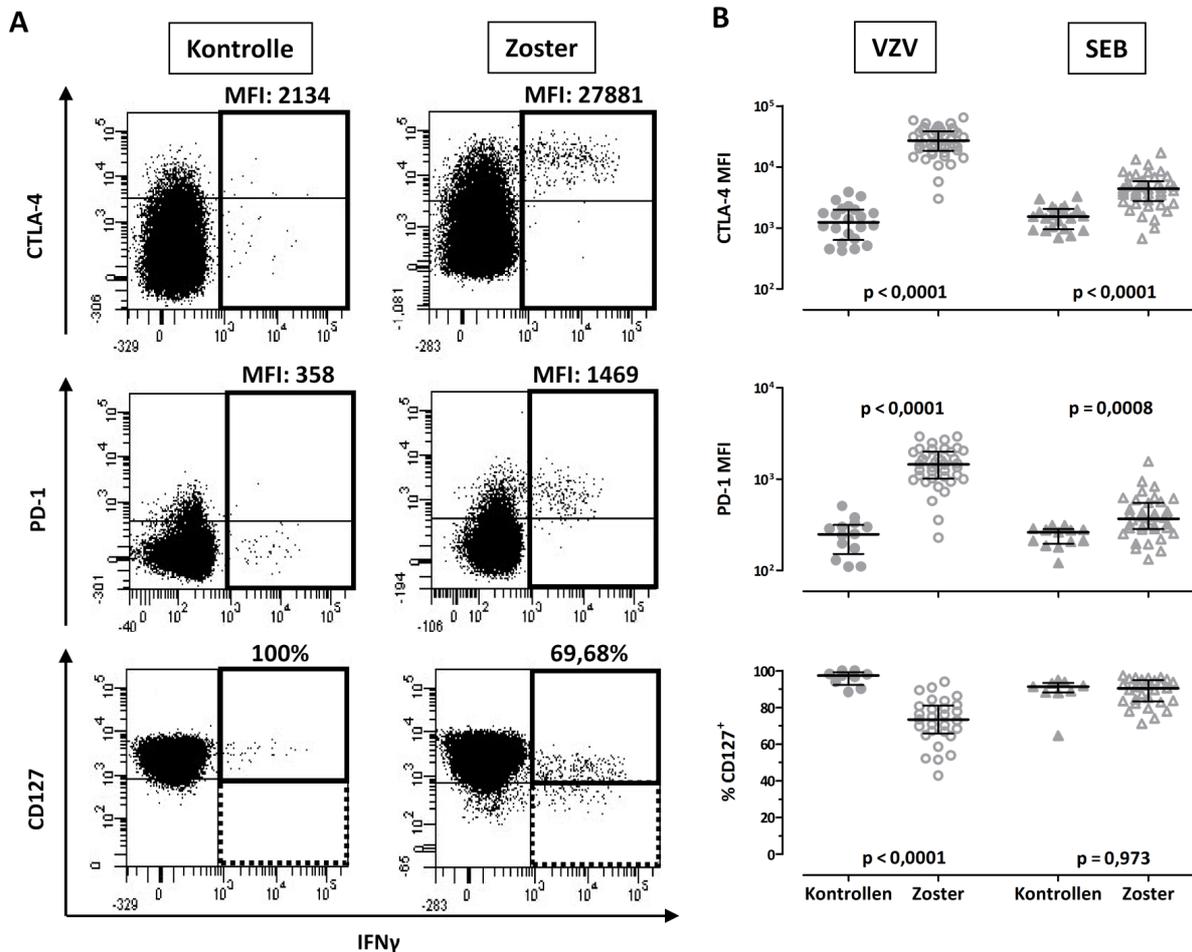


**Abbildung 8: Ausgeprägte Veränderungen der Frequenz und Zytokinexpression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen während eines akuten Herpes Zoster.** Es wurden jeweils nicht-symptomatische immungesunde Probanden (n=32) mit gleichaltrigen immunkompetenten Patienten mit akutem Herpes Zoster (n=55) verglichen. Die Streudiagramme zeigen die Frequenzen reaktiver CD4 T-Zellen ( $CD69^+/IFN\gamma^+$ ) nach VZV-spezifischer oder polyklonaler (mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B, SEB) Stimulation **(A)**, sowie die VZV-spezifischen IgG- **(B)** und IgA-Levels **(C)**. Die gepunkteten Linien geben die jeweilige Nachweisgrenze (NG) an. Der Median und der Interquartilsabstand sind mit Querstrichen markiert. Die Antikörperlevels werden in internationalen Einheiten pro Liter (IE/l) für IgG und als Ratio für IgA angegeben. **(D)** VZV- oder **(E)** SEB-stimulierte CD4 T-Zellen sind anhand ihrer Expression der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  (in allen Proben in denen mindestens 30 Zytokin-exprimierende CD4 T-Zellen nachweisbar waren; n=23 Kontrollen und n=43 Zoster-Patienten) unterteilt. Die Balken stellen Subpopulationen von einfach-, doppelt- und dreifach-Zytokin-exprimierenden Zellen dar (links). Die Werte sind dabei jeweils als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung angegeben. Multifunktionelle ( $IFN\gamma^+IL-2^+TNF\alpha^+$ ) und ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierende Zellen der beiden Gruppen sind zusätzlich separat als repräsentative Beispiele für stark ausgeprägte Veränderungen dargestellt (rechts). Signifikante Unterschiede wurden in (A)-(C) unter Verwendung des Mann-Whitney Test und in (D) und (E) anhand des ungepaarten t-Tests ermittelt und in letzterem mit Sternen angegeben (\* für  $p<0,05$ , \*\* für  $p<0,01$ , \*\*\* für  $p<0,001$ ). IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; IL, Interleukin; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015a).

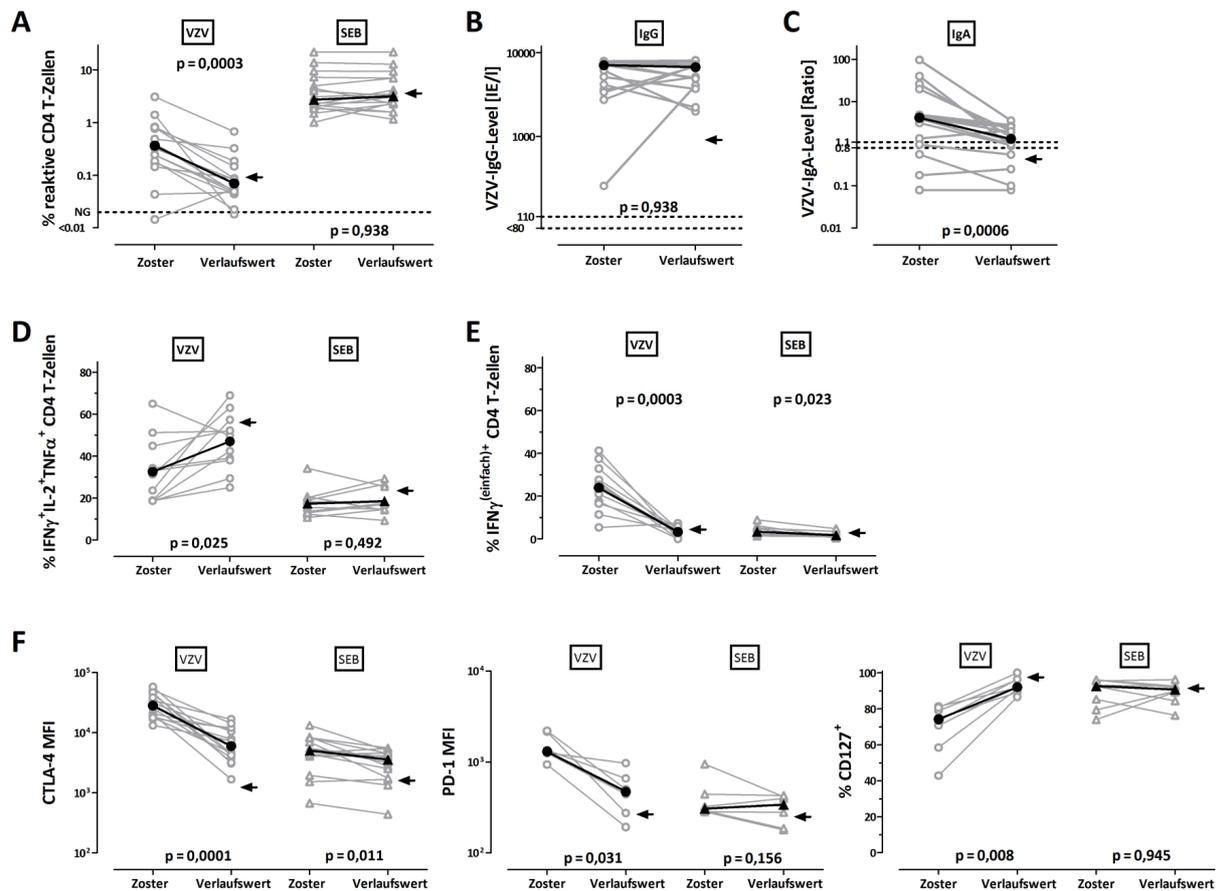
Die Charakterisierung des Zytokinexpressionsprofils der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen zeigte, dass es zwischen gesunden Probanden und Personen mit akuter Infektion charakteristische Unterschiede bei der Verteilung der Subpopulationen gab. Dies offenbarte sich insbesondere bei den multifunktionalen und den ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierenden T-Zellen, die bei Patienten mit akutem Herpes Zoster stark erniedrigt ( $IFN\gamma^+IL-2^+TNF\alpha^+$ ) bzw. deutlich erhöht ( $IFN\gamma^{(einfach)^+}$ ) waren (Abbildung 8D). Interessanterweise waren diese Unterschiede bei den polyklonal stimulierten T-Zellen nicht vorhanden, mit Ausnahme eines leicht geringeren Anteils an multifunktionalen Zellen in symptomatischen Personen (Abbildung 8E).

Neben der Frequenz und der Zytokinexpression wurde zudem die Expressionsstärke der Oberflächenmarker CTLA-4 und PD-1, die als Maß für die funktionelle Anergie der Zellen herangezogen werden können, in symptomatischen und nicht-symptomatischen Personen analysiert. Des Weiteren wurde die Expression des Differenzierungsmarkers CD127 auf den VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen dieser Personen quantifiziert. Um eine aussagekräftige statistische Analyse nach Aufteilung der Zellen in zwei Subpopulationen (hohe/geringe Expressionsdichte) zu gewährleisten, wurden hierfür ausschließlich Probanden mit VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz über der Nachweisgrenze (0,02%) und mindestens 20 Zytokin-positiven reaktiven CD4 T-Zellen eingeschlossen. In Abbildung 9A ist die jeweilige Expression von CTLA-4, PD-1 und CD127 auf den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen durch exemplarische Punktdiagramme dargestellt. Abbildung 9B zeigt das Ergebnis aller Personen mit akutem Zoster und der alters-angepassten Gruppe nicht-symptomatischer

Probanden. Bemerkenswert ist, dass bei Personen mit akuter VZV-Reaktivierung die CTLA-4 und PD-1-Expression auf den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen stark erhöht war, wohingegen der Anteil CD127-exprimierender Zellen verringert war. Ein signifikanter – wenn auch geringerer – Anstieg der Expression der beiden Marker für funktionelle Energie konnte auch auf den polyklonal stimulierten Zellen detektiert werden.



**Abbildung 9: Ausgeprägte Veränderungen der Expression von CTLA-4, PD-1 und CD127 auf VZV-spezifischen Immunzellen während eines akuten Herpes Zoster.** Es wurde die Expression von CTLA-4, PD-1, und CD127 auf reaktiven (CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) CD4 T-Zellen bei nicht-symptomatischen immungesunden Probanden mit gleichaltrigen immunkompetenten Zoster-Patienten verglichen. In **(A)** sind repräsentative Punktdiagramme nach einer VZV-spezifischen Stimulation eines Kontroll-Probanden und eines Zoster-Patienten dargestellt. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 und PD-1, sowie den prozentualen Anteil der CD127-positiven Zellen an allen IFN $\gamma$ -exprimierenden CD4 T-Zellen an. **(B)** Expression der Oberflächenmoleküle auf allen VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen aller Personen mit mindestens 20 VZV-spezifischen CD4 T-Zellen (n=22 und 45 für CTLA-4, n=13 und 38 für PD-1, und n=9 und 29 für CD127, jeweils für Kontrollen und Zoster-Patienten). Median und der Interquartilsabstand sind mit Querstrichen markiert. Signifikante Unterschiede wurden unter Verwendung des Mann-Whitney Tests ermittelt. CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten Antigen 4; IFN, Interferon; PD-1, „programmed death“ 1; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; VZV, Varizella-Zoster Virus. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015a).



**Abbildung 10: Normalisierung der meisten Zoster-assoziierten VZV-spezifischen Veränderungen nach Abklingen der Erkrankung.** Die Diagramme zeigen longitudinale Analysen der Zoster-Patienten (n=16) während des akuten Herpes Zosters und mindestens 3 Monate später (Median 4.3 (IQR 1.7)) im symptomfreien Zustand. **(A)** Dargestellt sind die Frequenzen der reaktiven CD4 T-Zellen ( $CD69^+/IFN\gamma^+$ ) nach VZV-spezifischer und polyklonaler (mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B, SEB) Stimulation **(A)**, sowie VZV-spezifische IgG- **(B)** und IgA-Level **(C)**. Die gepunkteten Linien repräsentieren die jeweilige Nachweisgrenze (NG). Die Antikörperlevels wurden in internationalen Einheiten pro Liter (IE/l) für IgG bzw. als Ratio für IgA angegeben. Für alle Patienten mit mindestens 30 nachweisbaren Zytokin-exprimierenden CD4 T-Zellen während und nach der akuten VZV-Reaktivierung (n=11) sind jeweils die prozentualen Anteile der multifunktionalen ( $IFN\gamma^+IL-2^+TNF\alpha^+$ ) und der ausschließlich  $IFN\gamma$ -exprimierenden VZV-spezifischen **(D)** bzw. SEB-reaktiven CD4 T-Zellen **(E)** dargestellt. **(F)** VZV-spezifische und SEB-reaktive CD4 T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 und PD-1 sowie hinsichtlich der CD127-Positivität während und nach einem akuten Zoster analysiert. Dabei wurden nur Patienten mit mindestens 20 VZV-spezifischen CD4 T-Zellen in beiden Messungen in die Analyse eingeschlossen (n=14 für CTLA-4, n=6 für PD-1, und n=8 für CD127). Die hervorgehobenen Datensätze repräsentieren die Mediane in (A)-(C) und (F), und die Mittelwerte in (D) und (E). Die Pfeile zeigen die Mediane bzw. Mittelwerte an, die anhand der entsprechenden gesunden Kontroll-Probanden (s. Abbildung 8 und Abbildung 9) ermittelt wurden. Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung des gepaarten Wilcoxon Tests in (A)-(C) und (F), und des gepaarten t-Tests in (D) und (E) durchgeführt. CTLA-4, zytotoxischer Lymphozyten Antigen 4; IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; IL, Interleukin; PD-1, „programmed death“ 1; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015a).

Um potentielle Veränderungen der immunologischen Marker im Zeitverlauf nach einer akuten VZV-Infektion analysieren zu können, wurden 16 Personen mit Herpes Zoster mehr als 3 Monate nach ihrer akuten VZV-Reaktivierung (Median 4,3 Monate (IQR 1,7 Monate)) erneut getestet. Zum Zeitpunkt der Nachtestung waren alle 16 Personen symptomfrei. Mit

Ausnahme der VZV-IgG Levels waren alle Zoster-assoziierten funktionellen und phänotypischen Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort inklusive der VZV-IgA-Levels zu Werten zurückgekehrt, die nahezu identisch mit denen der gesunden Kontroll-Probanden waren (Abbildung 10).

Um die immunologischen Marker zu identifizieren, die am besten zwischen Personen mit akutem Herpes Zoster und nicht-symptomatischen Probanden differenzieren können, wurde eine ROC-Analyse durchgeführt (Tabelle 17). VZV-IgG-Levels  $> 3259 \text{ IE/l}$  identifizierten VZV-Reaktivierungen mit einer Sensitivität von 85,5% und einer Spezifität von 90,6% („area under the curve“ (AUC) 0,926). Bei einem Grenzwert von 1,47 wurde für die VZV-IgA-Ratio eine Sensitivität von 67,3% und eine Spezifität von 93,8% ermittelt. Bei einem Grenzwert von 0,31 war die Spezifität der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz mit 96,9% zwar deutlich höher, wies jedoch die geringste Sensitivität (52,7%) aller getesteten Marker auf. Obwohl bei Analyse der Oberflächenmarker ausschließlich Proben mit ausreichender Anzahl an VZV-spezifischen CD4 T-Zellen eingeschlossen wurden, zeigte deren Analyse auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen die höchsten Spezifitäten (100%) bei gleichzeitig hohen Sensitivitäten von mehr als 89% (Tabelle 17). Mit einer Sensitivität von 97,8% bei einem MFI-Grenzwert von 4772 war CTLA-4 dabei der Marker, der am besten zwischen nicht-symptomatischen gesunden Probanden und Personen mit akuter Infektion diskriminieren konnte (AUC 0,998).

Insgesamt kommt es während eines akuten Herpes Zosters zu ausgeprägten Veränderungen in der VZV-spezifischen Immunantwort, die sich unter anderem durch eine erhöhte VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz und höhere IgG- und IgA-Levels auszeichneten. Darüber hinaus zeigten die VZV-spezifischen T-Zellen einen reversiblen Funktionalitätsverlust. Dieser war zum einen durch eine eingeschränkte Zytokinexpression charakterisiert, die sich in einem Verlust von multifunktionalen Zellen bei gleichzeitigem Anstieg der ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierenden VZV-spezifischen CD4 T-Zellen zeigte. Des Weiteren war der Verlust der Funktionalität durch einen Anstieg der CTLA-4- und PD1-Expression sowie einer verringerten CD127-Expression charakterisiert.

**Tabelle 17: ROC-Analyse zur Identifizierung der besten Diskriminierung zwischen Zoster-Patienten und nicht-symptomatischen immungesunden Personen**

	n (Kontrollen/Zoster)	Grenzwert für VZV-Reaktivierung*	AUC	Standard-Fehler	95% Konfidenzintervall	p-Wert	% Sensitivität	% Spezifität
Frequenz**	32/55	> 0,31	0,731	0,053	0,628 bis 0,834	0,0003	52,7	96,9
IgG-Level [IE/l]	32/55	> 3259	0,926	0,028	0,871 bis 0,980	< 0,0001	85,5	90,6
IgA-Level [Ratio]	32/55	> 1,47	0,8480	0,0408	0,768 bis 0,928	< 0,0001	67,3	93,8
% IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL-2 <sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>	23/43	< 33,28	0,904	0,036	0,833 bis 0,975	< 0,0001	72,1	95,7
% IFN $\gamma$ <sup>(einfach)+</sup>	23/43	> 11,28	0,948	0,025	0,899 bis 0,998	< 0,0001	86,1	95,7
CTLA-4 [MFI]	22/45	> 4772	0,998	0,003	0,993 bis 1,003	< 0,0001	97,8	100
PD-1 [MFI]	13/38	> 542,8	0,980	0,018	0,945 bis 1,014	< 0,0001	94,7	100
% CD127 <sup>+</sup>	9/29	< 87,29	0,981	0,018	0,946 bis 1,016	< 0,0001	89,7	100

\*aus ROC Analyse ermittelt; \*\*%VZV-spezifische CD4 T-Zellen; AUC, „area under the curve“; IE/l, internationale Einheiten pro Liter; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; ROC, „Receiver Operator Characteristics“. Daten reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015a).

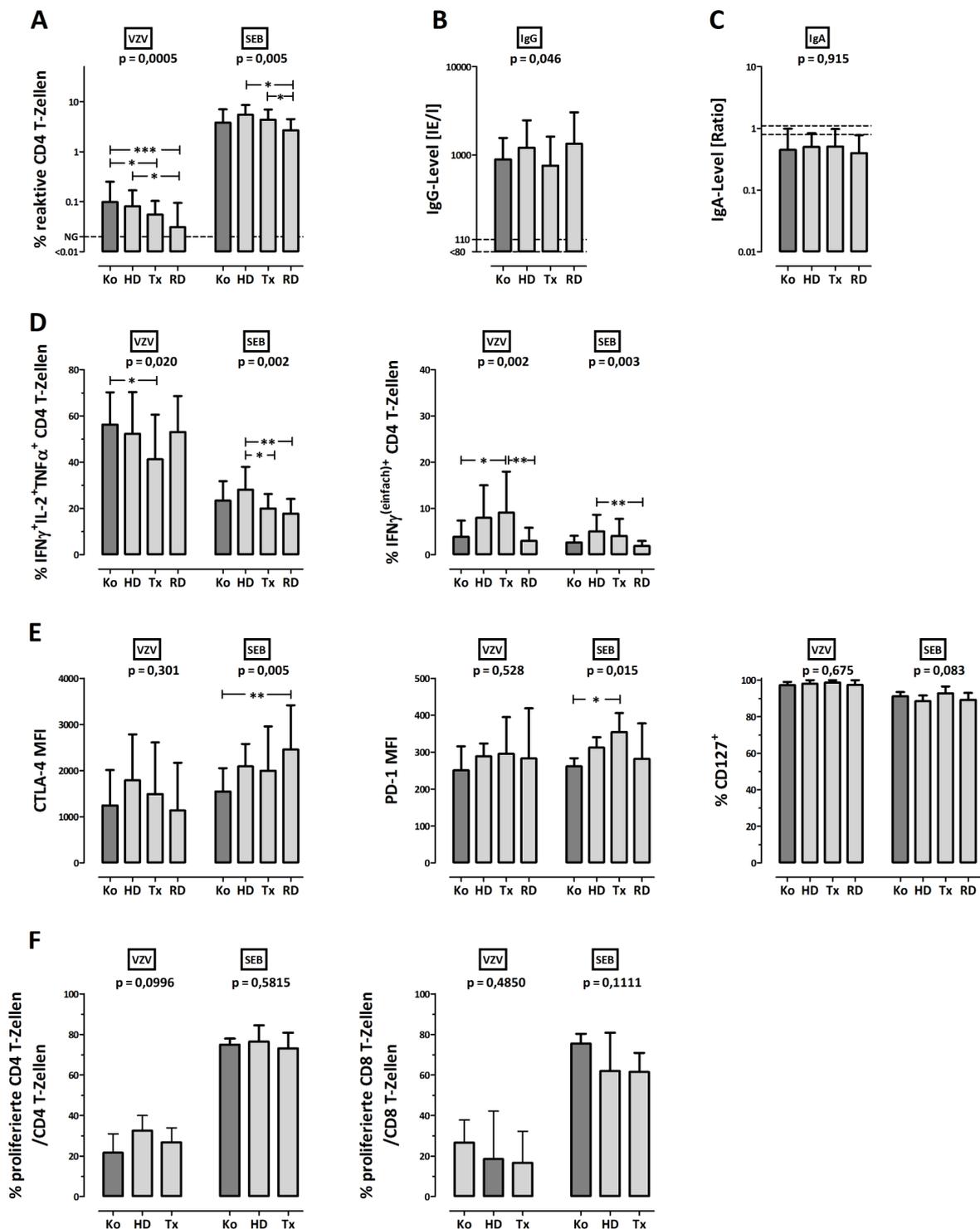
#### **6.1.1.5 Geringere VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen und leichte Zoster-assoziierte funktionelle Veränderungen in nicht-symptomatischen immunsupprimierten Patienten**

Um die VZV-spezifische Immunität in Patientengruppen mit erhöhtem Reaktivierungsrisiko analysieren zu können, wurde die zelluläre und humorale Immunantwort von Dialysepatienten, Transplantatempfängern und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen mit der einer altersangepassten Gruppe gesunder Kontroll-Probanden verglichen (s. Tabelle 2). Die Frequenzen der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen zwischen den immungesunden Probanden und den immunsupprimierten Patienten unterschieden sich dabei deutlich. Die Gruppe der gesunden Kontroll-Probanden zeigte erwartungsgemäß insgesamt die höchste Frequenz, wohingegen die Gruppe der Patienten mit rheumatischen Erkrankungen die niedrigste Frequenz aufwies (Abbildung 11A). Die Frequenzen der SEB-reaktiven CD4 T-Zellen unterschieden sich nur marginal und auch die VZV-spezifischen IgG- und IgA-Levels wiesen nur geringe (IgG) bzw. keine (IgA) Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abbildung 11A - C). Die Zytokinexpression der VZV-spezifischen sowie der SEB-reaktiven CD4 T-Zellen der Probanden- und Patientengruppen war teilweise verschieden. So war die VZV-spezifische Immunantwort der Transplantatempfänger durch einen geringeren Anteil an multifunktionellen bzw. einen erhöhten Anteil an ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierenden Zellen gekennzeichnet (Abbildung 11D). Bei den SEB-reaktiven Zellen der Dialysepatienten hingegen war der Anteil dieser beiden Subpopulationen gegenüber den übrigen Patientengruppen erhöht.

Hinsichtlich der Expression der Oberflächenmoleküle zeigten VZV-spezifischen Zellen der verschiedenen Gruppen keine markanten Unterschiede, während geringe Unterschiede bei der CTLA-4- bzw. PD-1-Expression der SEB-reaktiven Zellen detektierbar waren ( $p=0,005$  und  $p=0,015$  Abbildung 11E).

Die Proliferationsfähigkeit VZV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen, die beispielhaft in einem kleineren Kollektiv von HD- und Tx-Patienten analysiert wurde, zeigte keine Unterschiede zwischen den Probanden- und Patientengruppen (Abbildung 11F). Auch nach Stimulation mit dem polyklonalen Stimulus SEB konnten im Anteil der proliferierten T-Zellen keine Unterschiede zwischen den Personengruppen identifiziert werden. Allerdings waren

letztenannte deutlich jünger als die immunbeeinträchtigten Patienten (Kontrollen  $35,37 \pm 11,17$ , HD-Patienten  $67,83 \pm 14,50$ , Tx-Patienten  $57,73 \pm 14,60$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 11: Die Quantität und Qualität der VZV-spezifischen Immunantworten in nicht-symptomatischen immunbeeinträchtigten Patienten sind nur marginal durch die Immundefizienz beeinflusst.** Die VZV-spezifische Immunität wurde in Hämodialyse-Patienten (HD, n=32), Transplantat-Empfängern (Tx, n=51) und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen (RD, n=49) analysiert und mit altersangepassten immungesunden Kontrollen (Ko, n=29) verglichen. Dargestellt sind jeweils die Mediane und die Interquartilsabstände (IQR) der VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen (A), sowie der VZV-spezifischen (B) IgG- und (C) IgA-

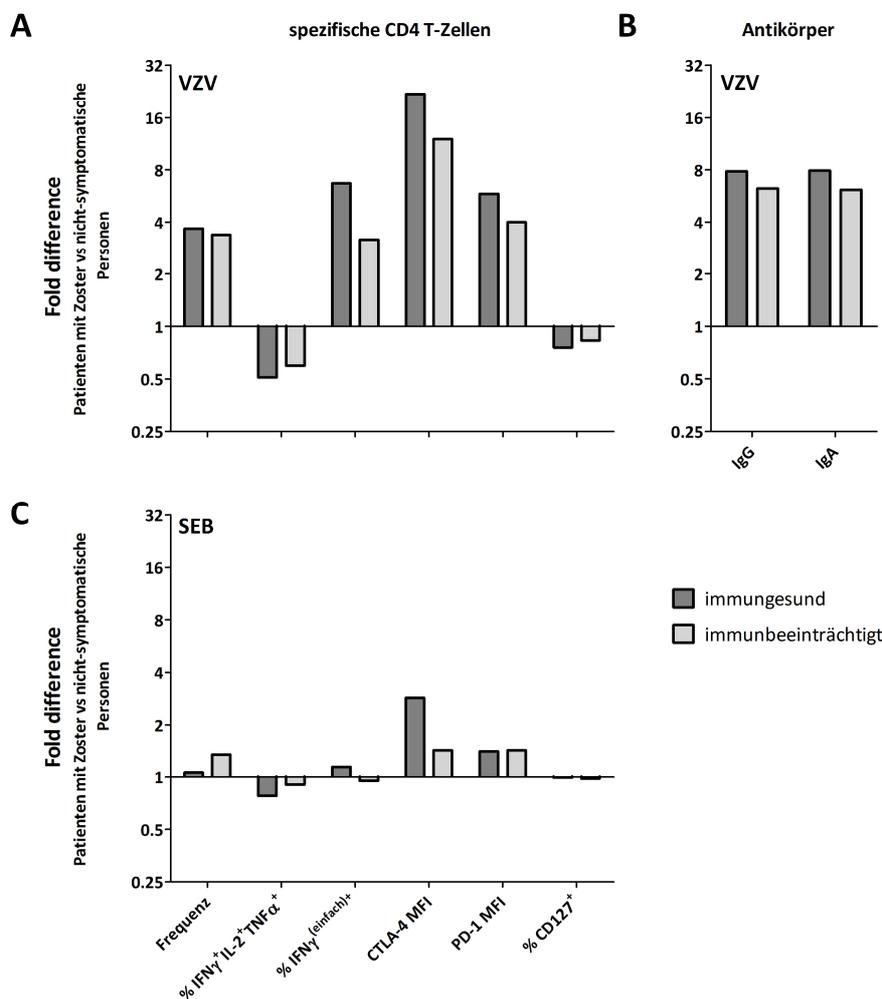
Levels. Die gepunkteten Linien repräsentieren die jeweiligen Nachweisgrenzen (NG). Die Antikörperlevels wurden in internationalen Einheiten pro Liter (IE/l) für IgG bzw. als Ratio für IgA angegeben. **(D)** Die Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen der dreifach-positiven (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>) oder ausschließlich IFN $\gamma$ -positiven CD4 T-Zell-Subpopulationen sind für alle Proben mit mindestens 30 Zytokin-exprimierenden CD4 T-Zellen dargestellt (n=23 für Kontrollen, n=17 für HD, n=23 für Tx, und n=21 für RD). **(E)** Die Expression von CTLA-4, PD-1, und CD127 wurde auf den reaktiven CD4 T-Zellen analysiert und alle Proben mit mindestens 20 VZV-spezifischen Zellen wurden eingeschlossen. Dargestellt sind die Mediane und der Interquartilsabstand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des CTLA-4- (links, n=22 für Kontrollen, n=21 für HD, n=31 für Tx, und n=27 für RD) und des PD-1-Signals (Mitte, n=13 Kontrollen, n=6 für HD, n=9 für Tx, und n=14 für RD) und der prozentuale Anteil CD127-positiver Zellen (rechts, n=9 Kontrollen, n=20 HD, n=22 Tx, und n=26 für RD). **(F)** Dargestellt ist der Anteil proliferierender CD4 (links) und CD8 T-Zellen (rechts) nach VZV-bzw. SEB-spezifischer Stimulation (n=10 für Kontrollen, n=13 für HD, n=8 für Tx). Statistische Signifikanzen wurden in (A)-(C) sowie (E) und (F) anhand des Kruskal-Wallis Test mit dem Dunn Post-Test, und in (D) unter Verwendung des One-Way Analysis of Variance Test mit Bonferroni Post-Test berechnet. Signifikante Unterschiede in den Post-Tests sind durch Sterne gekennzeichnet (\* für p<0,05, \*\* für p<0,01, \*\*\* für p<0,001). CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten Antigen 4; IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; IL, Interleukin; PD-1, „programmed death“ 1; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus. Abbildung teilweise reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015a).

Zusammenfassend zeigte die VZV-spezifische Immunität bei nicht-symptomatischen immunsupprimierten Patienten eine geringere Frequenz VZV-spezifischer CD4 T-Zellen und eine leicht veränderte Zytokinexpression. Die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker sowie die T-Zellproliferation und die humorale Immunantwort schienen hingegen durch die Immundefizienz der Patienten nicht beeinträchtigt zu werden.

#### ***6.1.1.6 Die Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort während akuter Reaktivierung sind in immunsupprimierten Patienten und immunkompetenten Personen nahezu gleich***

Um potentielle Einflüsse einer Immundefizienz auf Zoster-assoziierte Veränderungen der VZV-spezifischen Immunität analysieren zu können, wurden die Immunantworten von 20 immunsupprimierten Patienten mit aktiver VZV-Reaktivierung mit denen von 132 nicht-symptomatischen immunsupprimierten Patienten verglichen. Obwohl die Art und das Ausmaß der Immunsuppression zwischen diesen Zoster-Patienten eher inhomogen war (s. Tabelle 2), konnten deutliche signifikante Unterschiede zwischen immunsupprimierten Patienten mit und ohne Zoster identifiziert werden, die denen zwischen den immunkompetenten Zoster-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe ähnelten. Um das Ausmaß der immunologischen Veränderungen in Abhängigkeit der Immundefizienz zu quantifizieren, wurde das Vielfache der Zoster-assoziierten Veränderung („fold difference“) jedes Parameters zwischen immunkompetenten Zoster-Patienten und nicht-symptomatischen Kontroll-Probanden sowie zwischen immunbeeinträchtigten Zoster-Patienten und immunsupprimierten Patienten kalkuliert (Abbildung 12). Obgleich das

Ausmaß der Zoster-assoziierten immunologischen Veränderungen bei immunsupprimierten Patienten geringfügig weniger ausgeprägt war als bei immungesunden Personen, zeigten beide Gruppen deutliche Veränderungen in der VZV-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort während einer akuten VZV-Reaktivierung. Mit medianen Veränderungen der Parameter um teilweise mehr als das 20-fache während einer akuten Reaktivierung, war die Veränderung der VZV-spezifischen Immunantwort deutlich ausgeprägter, als die geringen Unterschiede in wenigen Parametern nach polyklonaler Stimulation (vgl. Abbildung 12A und B vs. C).

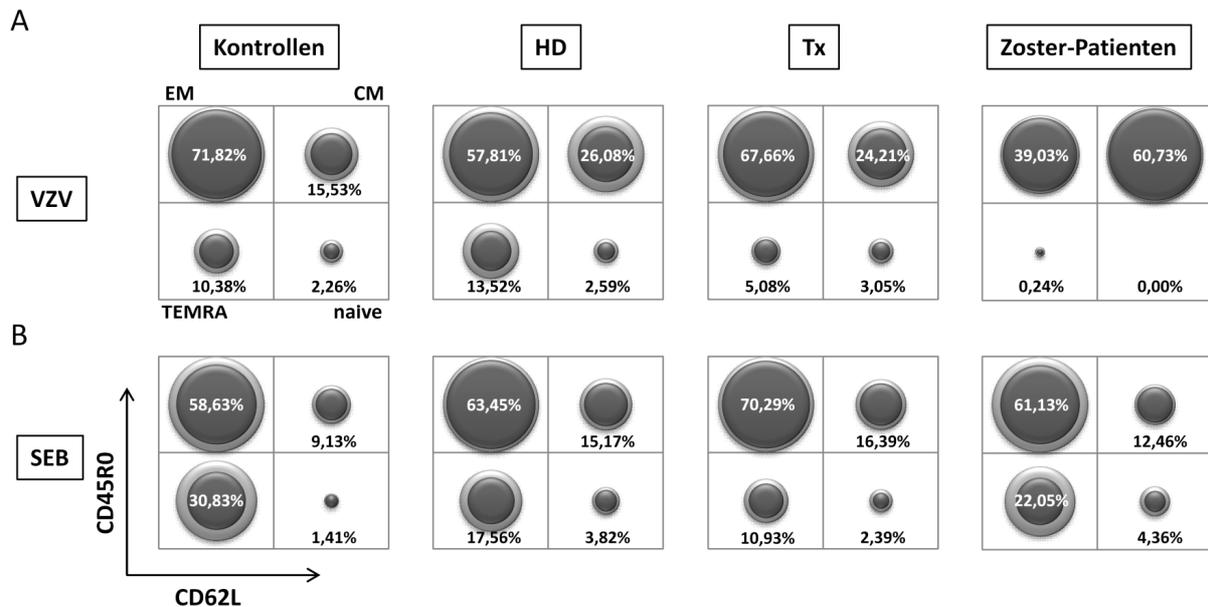


**Abbildung 12: Zusammenfassung des Ausmaßes der Zoster-assoziierten immunologischen Veränderungen bei immunkompetenten und immunbeeinträchtigten Personen.** Die Balken spiegeln den Unterschied ("fold difference") jedes Parameters der VZV-spezifischen (A) zellulären und (B) humoralen Immunantwort wieder. Dieser wurde durch Division der Mediane (oder der Mittelwerte für % Zytokin-positive CD4 T-Zellen) der Parameter bei Zoster-Patienten durch die entsprechenden Werte der jeweiligen nicht-symptomatischen immungesunden bzw. immunbeeinträchtigten Personen kalkuliert. Die Veränderungen in den CD4 T-Zell-Charakteristika nach polyklonaler Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) sind in (C) dargestellt. CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten Antigen 4; IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; IL, Interleukin; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; PD-1, „programmed death“ 1; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015a).

Insgesamt waren die Zoster-assoziierten Veränderungen somit auch in immunsupprimierten Patienten deutlich nachweisbar, auch wenn diese Veränderungen im Vergleich mit immunkompetenten Personen weniger stark ausgeprägt waren.

#### ***6.1.1.7 Während eines akuten Zosters besteht die überwiegende Mehrheit VZV-spezifischer CD4 T-Zellen aus zentralen Gedächtnis-T-Zellen***

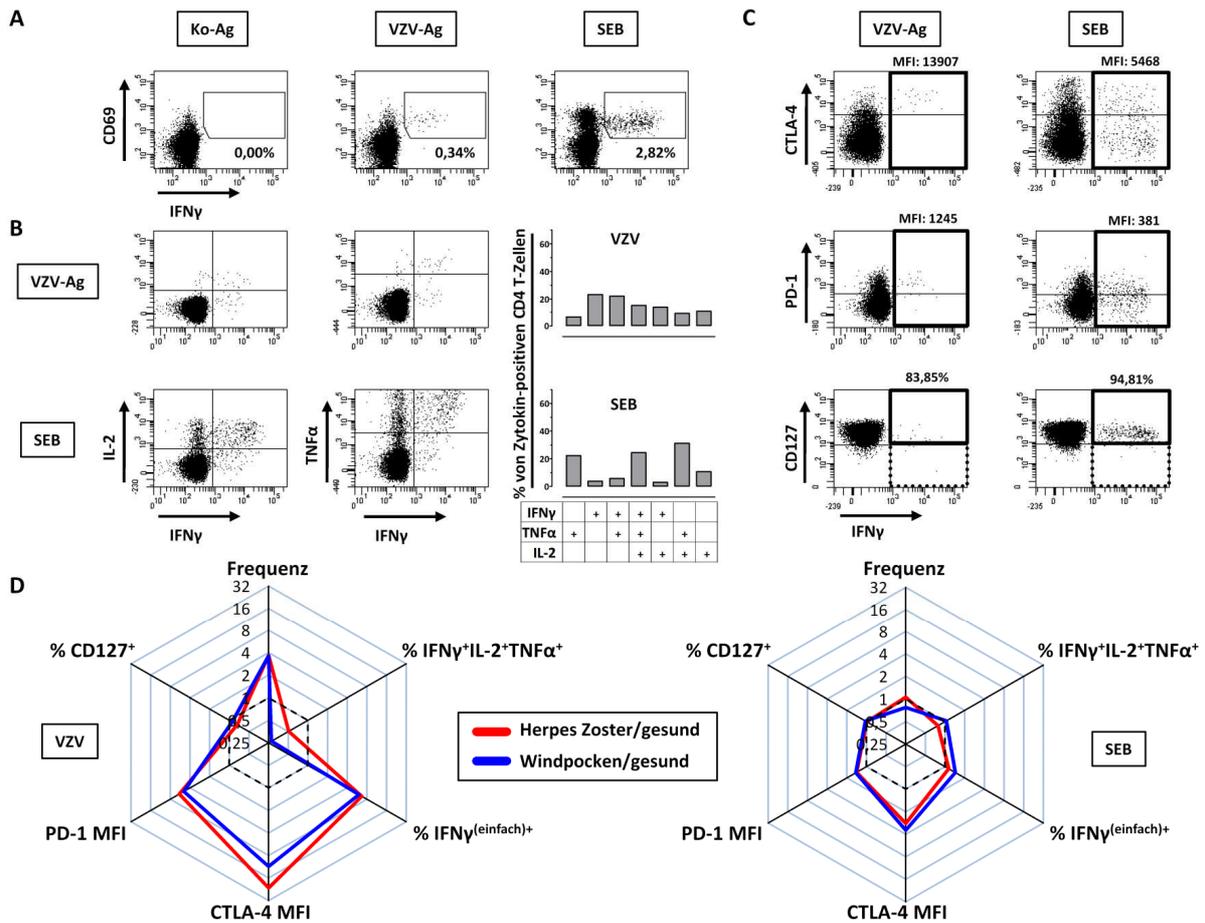
Das Differenzierungsstadium einer T-Zelle kann unter anderem anhand der Expression der Oberflächenmarker CD62L und CD45RO bestimmt werden (SALLUSTO et al., 1999). Um zu analysieren, ob die Differenzierung der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen durch eine Immundefizienz oder eine akute VZV-Reaktivierung beeinflusst wird, wurde nach der Antigen-spezifischen Stimulation die CD62L und CD45RO-Expression auf den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen von 17 altersangepassten nicht-symptomatischen Personen (6 Kontrollen, 5 HD-, 6 Tx-Patienten) und 3 Patienten mit akutem Herpes Zoster gemessen (Abbildung 13). Das Alter der Probanden war altersangepasst (Kontrollen  $54,25 \pm 3,85$  Jahre, HD-Patienten  $57,35 \pm 6,98$  Jahre, Tx-Patienten  $55,31 \pm 12,17$ , Zoster-Patienten  $63,92 \pm 6,94$  Jahre,  $p=0,42$ ). Die VZV-spezifischen CD4 T-Zellen von nicht-symptomatischen Personen waren mehrheitlich Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ( $CD62L^-CD45RO^+$ ), unabhängig davon, ob die Personen immunsupprimiert waren oder nicht (Median 57,81% bis 71,82%). Im Gegensatz zu den drei nicht-symptomatischen Personengruppen besaßen Patienten mit akutem Herpes Zoster signifikant mehr zentrale Gedächtnis-T-Zellen ( $CD62L^+CD45RO^+$ ,  $p=0,0065$ ). Im Vergleich zu den gesunden Kontroll-Probanden war bei den Zoster-Patienten zudem der Anteil der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen signifikant verringert ( $p=0,0338$ ). Demgegenüber waren SEB-reaktiven CD4 T-Zellen sowohl bei allen nicht-symptomatischen Personen als auch bei den Patienten mit akutem Herpes Zoster mehrheitlich Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und zeigten in Abhängigkeit von Immundefizienz oder VZV-Reaktivierung keine signifikanten Veränderungen in ihrem Differenzierungsprofil.



**Abbildung 13: Während eines akuten Zosters ist Anteil VZV-spezifischer zentraler Gedächtnis-CD4 T-Zellen erhöht.** Dargestellt sind die jeweiligen Anteile der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, EM), zentralen Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CM), terminal differenzierten T-Zellen (CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>, TEMRA) und naive T-Zellen (CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>) an der VZV-spezifischen (**A**) bzw. SEB-reaktiven CD4 T-Zellpopulation (**B**). Es wurden ausschließlich Proben von altersangepassten Personen mit mindestens 20 CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 T-Zellen (n=6 für Kontrollen, n=4 für Hämodialyse-Patienten (HD), n=6 für Transplantat-Empfänger (Tx), n=3 für Zoster-Patienten) eingeschlossen. Die dunklen Kreise und die Prozentzahl geben den mittleren Wert der jeweiligen Personengruppe an. Die hellgrauen Kreise spiegeln die Größe der Standardabweichung wieder. Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung des One-Way Analysis of Variance Test mit Bonferroni Post-Test durchgeführt. Signifikanzen wurden bei den Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (p=0,0338; p<0,05 für Kontrolle vs Zoster-Patienten) und den zentralen Gedächtnis-T-Zellen (p=0,0065; p<0,01 für Kontrolle vs Zoster-Patienten, p<0,05 für HD und Tx vs Zoster-Patienten) nachgewiesen. CM, „central memory cells“; EM, „effector memory cells“; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TEMRA, „terminal differentiated effector memory cells“, VZV, Varizella-Zoster Virus.

### 6.1.2 Fallbericht: Die VZV-spezifische Immunantwort bei VZV-Primärfekt zeigt funktionelle und phänotypische Charakteristika wie bei Personen mit akuter VZV-Reaktivierung

Neben dem typischen Herpes Zoster bei einer Reaktivierung von VZV kommt es bei einem Primärfekt mit VZV nach kurzer Inkubationszeit typischerweise zu Varizellen (Windpocken), einem charakteristischen Hautausschlag mit begleitendem Fieber. Obwohl die Primärfektion mit dem Virus in den meisten Fällen im Kindesalter erfolgt, kann diese auch erst im Erwachsenenalter auftreten. Im vorliegenden Fall wurde die VZV-spezifische Immunantwort eines 38-jährigen immungesunden Probanden mit akutem VZV-Primärfekt (seit 10 Tagen typische Varizellen) detailliert charakterisiert und in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Die VZV-spezifische Immunantwort eines immungesunden Probanden mit VZV-Primärinfekt weist ebenfalls Zoster-assoziierte Veränderungen auf.** Dargestellt ist die VZV-spezifische zelluläre Immunantwort eines 38-jährigen immungesunden Probanden mit seit 10 Tagen bestehender symptomatischer VZV-Primärinfektion (Windpocken). **(A)** Dargestellt sind die CD4 T-Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CD69 und IFN $\gamma$  nach Stimulation mit dem Kontroll-Antigen (Ko-Ag), dem VZV-Antigen (VZV-Ag) und dem polyklonalen Stimulus *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB). Die spezifisch aktivierten (CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) sind jeweils umrandet und quantifiziert (Frequenz). In **(B)** sind links die Punktdiagramme der IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ -Expression der VZV-spezifischen (oben) und SEB-reaktiven (unten) CD4 T-Zellen dargestellt. Die Balken rechts stellen die jeweiligen Anteile der daraus ermittelten Subpopulationen von einfach-, doppelt- und dreifach-Zytokin-exprimierenden Zellen an allen Zytokin-exprimierenden VZV-spezifischen bzw. SEB-reaktiven CD4 T-Zellen dar. **(C)** Von oben nach unten sind die Punktdiagramme der CTLA-4, PD-1 und CD127-Expression auf allen CD4 T-Zellen dargestellt. Die VZV-spezifischen (links) bzw. SEB-reaktiven CD4 T-Zellen (rechts) sind jeweils durch schwarze Rechtecke hervorgehoben. Die CTLA-4 und PD-1-Expression auf den reaktiven CD4 T-Zellen wurde als MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) angegeben. Die CD127-Expression wurde als Prozent CD127-positiver Zellen von allen VZV-spezifischen bzw. SEB-reaktiven CD4 T-Zellen angegeben. **(D)** Dargestellt sind Netzdiagramme, in denen die Unterschiede („Fold difference“) der verschiedenen immunologischen Parameter zwischen immungesunden Probanden mit akutem Herpes Zoster (n=55) und Personen ohne akute VZV-Symptomatik (gesund, n=32) in rot bzw. dem Probanden mit VZV-Primärinfektion (Windpocken) und den Personen ohne akute VZV-Symptomatik in blau angegeben ist. Bei der Frequenz und den Oberflächenmolekülen wurde der „Fold difference“ anhand der medianen Werte und bei der Zytokinexpression anhand der Mittelwerte berechnet. Die gestrichelte Linie bei „1“ indiziert keine Unterschiede zwischen symptomatischen und nicht-symptomatischen Patienten. CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten Antigen 4; IFN, Interferon; IL, Interleukin; PD-1, „programmed death“ 1; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus.

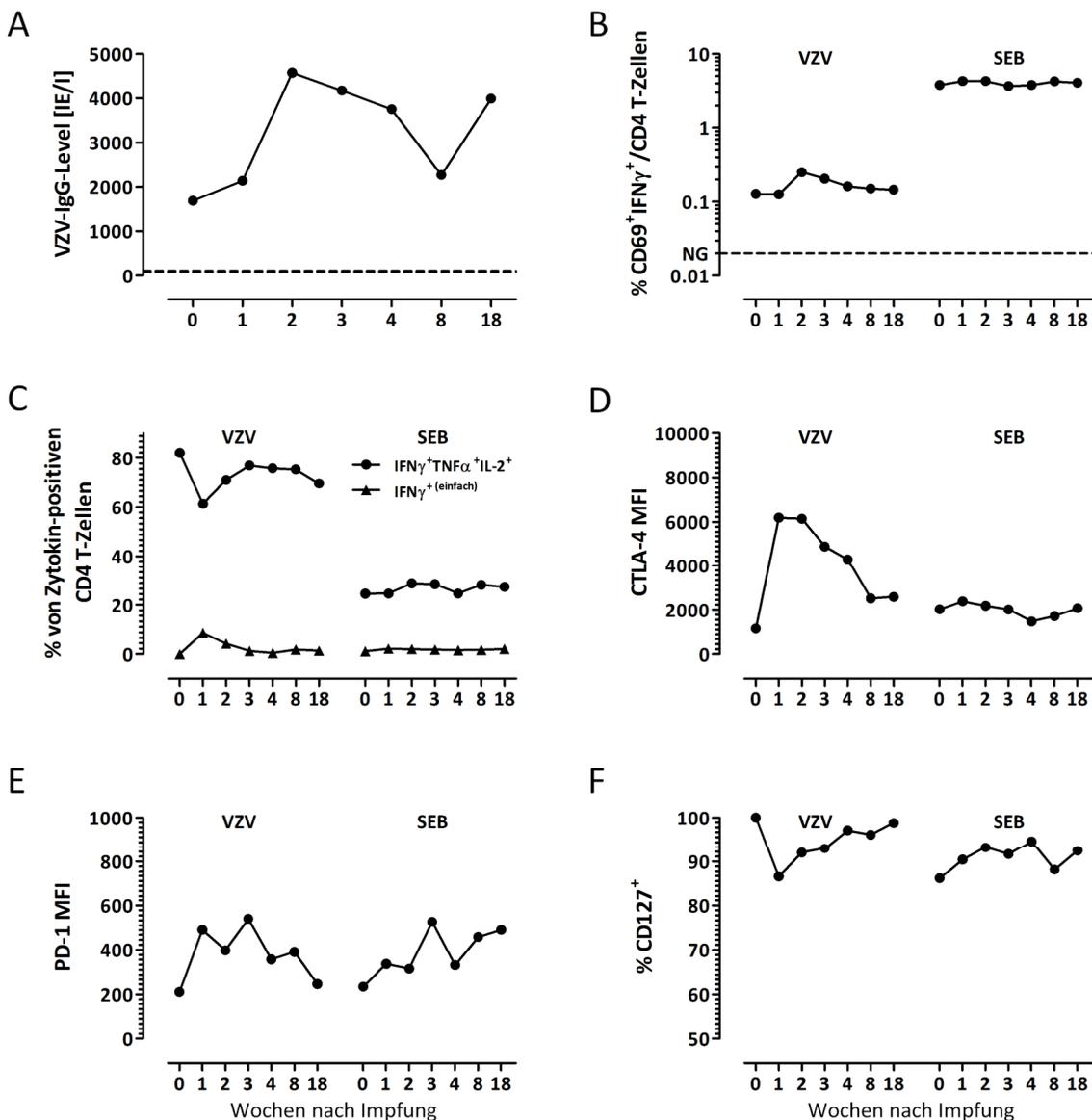
Im Blut des Probanden konnte zu diesem Zeitpunkt bereits sowohl eine VZV-spezifische humorale Immunantwort (1733 IE/I VZV-IgG, nicht gezeigt) als auch eine VZV-spezifische

zelluläre Immunantwort (0,34% VZV-spezifische CD4 T-Zellen, Abbildung 14A) nachgewiesen werden. Die detailliertere Charakterisierung ergab, dass letztere nur zu einem geringen Anteil multifunktionell (15,56% IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>) waren und 23,34% ausschließlich IFN $\gamma$  exprimierten (Abbildung 14B). Zusätzlich wurde die Expression der Anergie-Marker CTLA-4 (MFI 13907) und PD-1 (MFI 1245), sowie des Differenzierungsmarkers CD127 (83,85%) analysiert (Abbildung 14C).

In Abbildung 14D wurde die Funktionalität und der Phänotyp der VZV-spezifischen Immunantworten des Patienten mit Primärfekt mit den jeweiligen Veränderungen bei Patienten mit Herpes Zoster gegenübergestellt. Dargestellt ist jeweils die Veränderung der jeweiligen Parameter im Vergleich zu nicht-symptomatischen Kontrollen („1“, wenn kein Unterschied besteht). Interessanterweise zeigte Phänotyp und Funktionalität der VZV-spezifischen Immunantwort des Probanden mit VZV-Primärfekt die gleichen charakteristischen Veränderungen wie sie bei Personen mit akuter VZV-Reaktivierung identifiziert wurden (z.B. Verlust von Multifunktionalität und erhöhte Expression von Anergie-Markern, s. Abschnitt 6.1.1.4). Die polyklonale Immunantwort nach SEB-Stimulation hingegen zeigte keine Unterschiede mit Ausnahme einer leicht erhöhten CTLA-4-Expression während Primärfekt und Herpes Zoster (Fold increase 3,54 und 2,87). Somit konnten bei dem Probanden mit akuter VZV-Primärfektion die gleichen charakteristischen Veränderungen in der VZV-spezifischen Immunantwort identifiziert werden, wie sie während eines akuten Herpes Zosters nachgewiesen werden können.

### ***6.1.3 Charakteristische Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort einer 34-jährigen Probandin nach einer Masern-Mumps-Röteln-Varizellen (MMRV)-Impfung***

Eine 34-jährige Probandin mit VZV-Primärfekt (Windpocken) im Kindesalter wurde u.a. zur Auffrischung der Immunantwort gegen das Masern-Virus mit dem Masern-Mumps-Röteln-Varizellen-Kombinationsimpfstoff (MMRV) geimpft. Um dadurch ausgelöste charakteristische Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort detailliert im Zeitverlauf zu analysieren, wurden der Probandin am Tag vor der Impfung sowie 1, 2, 3, 4, 8 und 18 Wochen nach Impfung Blutproben entnommen. Neben der Quantifizierung der VZV-spezifischen humoralen und zellulären Immunität wurden wie zuvor auch der Phänotyp und die Funktionalität der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen im Zeitverlauf bestimmt (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Die Analyse der VZV-spezifische Immunantwort einer VZV-seropositiven Probandin im zeitlichen Verlauf nach einer MMRV-Impfung zeigte reversible quantitative und funktionelle Veränderungen.** Dargestellt sind die Werte der verschiedenen immunologischen Marker der VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen einer 34-jährigen Probandin im zeitlichen Verlauf vor (d0) und nach (1, 2, 3, 4, 8, 18 Wochen) der Impfung. In **(A)** sind die VZV-IgG-Level und in **(B)** die Frequenzen VZV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 T-Zellen dargestellt. Die gepunkteten Linien geben die jeweiligen Nachweisgrenzen (NG) an. Der jeweilige Anteil der multifunktionellen (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>) und der IFN $\gamma$ <sup>(einfach)+</sup> VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen ist in **(C)** dargestellt. **(D,E)** Die Expression der Oberflächenmarker CTLA-4 und PD-1 auf den VZV-spezifischen und den SEB-reaktiven CD4 T-Zellen wird anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. **(F)** Dargestellt ist der jeweilige prozentuale Anteil CD127-positiver VZV-spezifischer bzw. SEB-reaktiver CD4 T-Zellen an allen CD4 T-Zellen. CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten Antigen 4; IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; IL, Interleukin; MMRV, Masern-Mumps-Röteln-Varizellen; PD-1, „programmed death“ 1; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus.

Während die T-Zellfrequenz und der IgG-Level der VZV-spezifischen Immunantwort nach einer Woche (0,126% bzw. 2141 IE/l) nahezu keine Veränderung zum jeweiligen vorherigen Wert zeigten, konnte zwei Wochen nach der Impfung ein deutlicher Anstieg nachgewiesen werden (0,252% bzw. 4570 IE/l, Abbildung 15A und B). Interessanterweise konnten bei allen

phänotypischen und funktionellen Markern bereits eine Woche nach der Impfung deutliche VZV-Reaktivierungs-assoziierte Veränderungen der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen beobachtet werden. So konnten sowohl ein prozentualer Anstieg der ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierenden Zellen (0,00% vs 8,66%, Abbildung 15C) als auch eine erhöhte CTLA-4- und PD-1-Expression (MFI 1164 vs 6186 und 211 vs 490, Abbildung 15D und E) identifiziert werden, wohingegen der Anteil multifunktionaler Zellen (82,08% vs 61,38% Abbildung 15C) und CD127-positiver Zellen (100% vs 86,58%, Abbildung 15F) deutlich abnahm. Zu vermerken ist jedoch, dass die CTLA-4- und PD-1-Expression schwächer ausgeprägt war, als dies bei Patienten während eines akuten Herpes Zosters und bei dem Probanden mit akutem Primärfekt der Fall war. Analog zu den Patienten mit akutem Zoster konnte auch bei dieser Probandin die Reversibilität der charakteristischen Veränderungen der VZV-spezifischen zellulären Immunantwort im Verlauf nach Impfung nachgewiesen werden. Dies zeigte sich daran, dass 18 Wochen nach der Impfung der Phänotyp und die Funktionalität der VZV-spezifischen zellulären Immunantwort nahezu identisch mit den Ausgangswerten vor der Impfung waren. Der VZV-IgG-Level war nach vorherigem Absinken hingegen bei der letzten Messung erneut leicht erhöht. Bis auf einen leichten Anstieg der PD-1-Expression und einen variierenden Anteil CD127-positiver CD4 T-Zellen, blieben die Frequenz und Funktionalität der SEB-reaktiven CD4 T-Zellen im Gegensatz zur VZV-spezifischen Immunantwort im zeitlichen Verlauf nahezu unbeeinträchtigt.

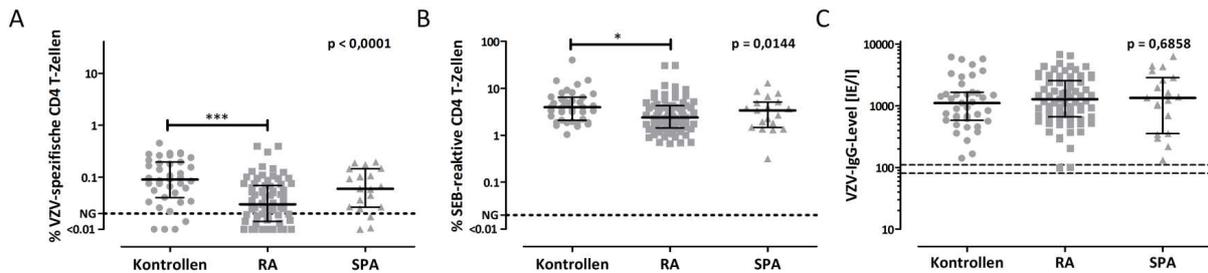
#### ***6.1.4 Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen***

##### ***6.1.4.1 Die VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz ist bei Patienten mit rheumatoider Arthritis deutlich niedriger als bei immungesunden Probanden***

Patienten mit rheumatischen Erkrankungen weisen im Gegensatz zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko für VZV-Reaktivierungen auf (VEETIL et al., 2013). Bislang ist jedoch noch unklar ob bestimmte Antirheumatika für dieses erhöhte Risiko verantwortlich sind und inwieweit die VZV-spezifische Immunantwort dieser Patienten beeinflusst wird.

Um potentielle Veränderungen und Beeinträchtigungen der VZV-spezifischen Immunantwort identifizieren zu können, wurde die VZV-spezifische Immunantwort in 94 Blutproben von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen analysiert (78 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) und 20 Patienten mit Spondyloarthritiden (SPA)). Von diesen waren 3 RA-

Patienten und 1 SPA-Patient VZV-seronegativ und wurden deshalb für die weiteren Analysen ausgeschlossen. Zum Vergleich wurde die Quantität und Qualität der VZV-spezifischen Immunantwort einer altersangepassten Gruppe aus 39 immungesunden Kontroll-Probanden mit positiver VZV-Serologie herangezogen. Die Probanden- und Patientencharakteristika der Personen mit positivem bzw. grenzwertigem VZV-IgG-Status sind in Tabelle 3 aufgeführt.



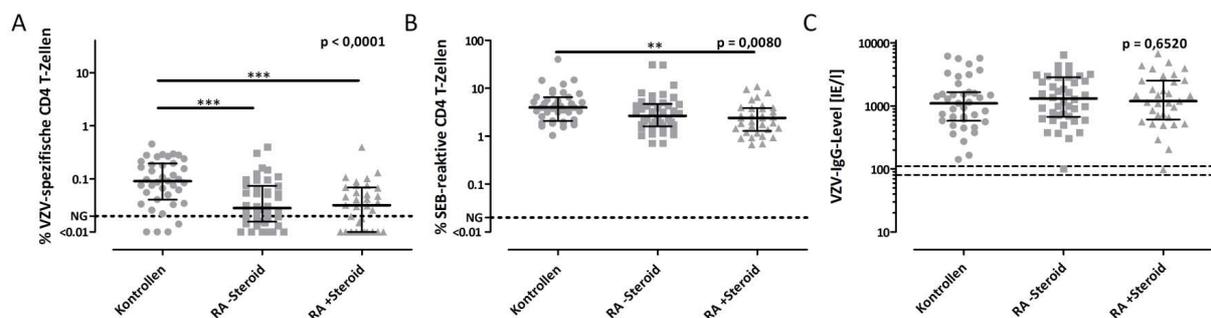
**Abbildung 16: RA-Patienten besitzen gegenüber immungesunden Probanden deutlich geringere VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen, wohingegen die VZV-IgG-Levels gleich sind.** Dargestellt sind die VZV-spezifischen (A) und SEB-reaktiven T-Zellfrequenzen (B) sowie VZV-IgG-Levels (C) von 35 immungesunden Probanden (Kontrollen), 75 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen (RA) und 19 Patienten mit Spondyloarthritis (SPA). Die VZV-IgG-Levels sind in internationalen Einheiten pro Liter (IE/l) angegeben. Die Querstriche markieren den medianen Wert sowie den Interquartilsabstand. Die jeweiligen Nachweisgrenzen (NG) sind durch gepunktete Linien visualisiert. Statistische Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden unter Verwendung des Kruskal-Wallis Test und des Dunn Post-Tests berechnet. Signifikante Unterschiede in den Post-Tests sind durch Sterne gekennzeichnet (\* für  $p < 0,05$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ ). Ig, Immunglobulin; RA, Rheumatoide Arthritis; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; SPA, Spondyloarthritis; VZV, Varizella-Zoster Virus.

In Abbildung 16 sind die VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen sowie die VZV-IgG-Levels der drei Personengruppen dargestellt. Interessanterweise zeigten die RA-Patienten gegenüber den gesunden Kontroll-Probanden sowohl nach der VZV-spezifischen Stimulation als auch nach der polyklonalen Stimulation signifikant geringere reaktive T-Zellfrequenzen, wobei der Unterschied bei VZV deutlich ausgeprägter war ( $p < 0,0001$  und  $p = 0,0144$ ). Zudem wiesen 37,3% (28/75) der RA-Patienten VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen unterhalb der Nachweisgrenze auf, wohingegen nur 7,7% (3/39) der immungesunden Probanden T-Zell-negativ waren. Im Gegensatz dazu waren bei den SPA-Patienten keine signifikanten Unterschiede vorhanden und lediglich bei 15,8% (3/19) der SPA-Patienten war die VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz unterhalb der Nachweisgrenze.

Während somit bei den T-Zellen deutliche Unterschiede identifiziert werden konnten, waren die VZV-IgG-Levels zwischen den drei Personengruppen vergleichbar ( $p = 0,6858$ , Abbildung 16C).

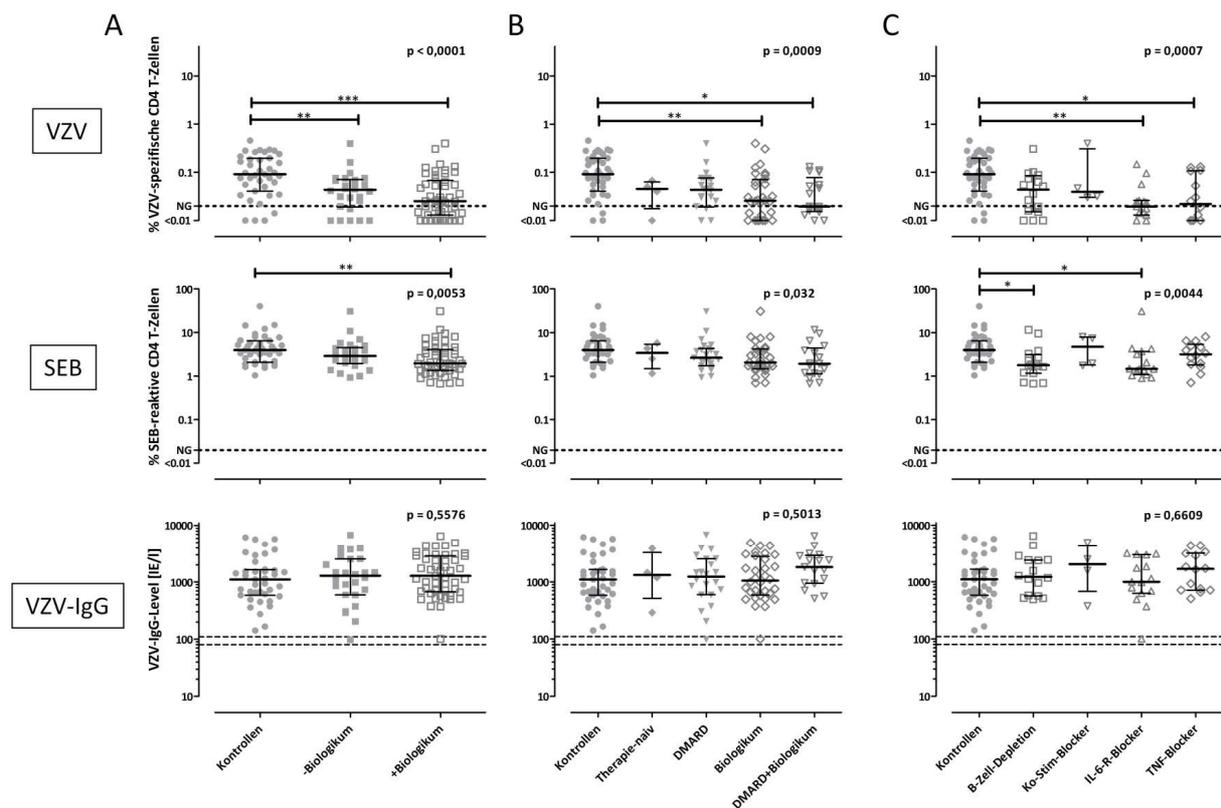
### 6.1.4.2 Biologika, aber nicht DMARDs oder Steroide, scheinen mit signifikant geringeren VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen assoziiert zu sein

Um nachzuweisen, ob die geringeren VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen bei RA-Patienten Therapie-bedingt waren, wurde zunächst ein möglicher Einfluss von Steroiden auf die VZV-spezifische Immunantwort dieser Patienten untersucht (Abbildung 17). Interessanterweise konnte jedoch kein negativer Einfluss der Steroidtherapie auf die VZV-spezifische Immunantwort dieser Patienten nachgewiesen werden, da sowohl Patienten mit als auch ohne Steroide signifikant geringere VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen besaßen als immungesunde Kontroll-Probanden und es zwischen den beiden RA-Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede gab (Abbildung 17A). Obwohl bei den SEB-reaktiven CD4 T-Zellen VZV beidseitigen RA-Patientengruppen ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den Frequenzen nachzuweisen war, zeigten verglichen mit den Kontroll-Probanden lediglich die RA-Patienten unter Steroidtherapie eine signifikant geringere Frequenz SEB-reaktiver CD4 T-Zellen, was ein Hinweis für eine allgemeine negative Beeinflussung der Steroidtherapie auf die zelluläre Immunantwort sein könnte (Abbildung 17B). Wie erwartet gab es bei der Quantifizierung der humoralen Immunantwort keine Steroid-abhängige Beeinflussung der VZV-IgG-Levels, wobei sich die Levels auch nicht von denen der immungesunden Kontroll-Probanden unterschieden ( $p=0,6520$ , Abbildung 17C).



**Abbildung 17: Die Verminderung der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz bei RA-Patienten ist Steroid-unabhängig.** Dargestellt sind die VZV-spezifischen (A) und SEB-reaktiven T-Zellfrequenzen (B) sowie die VZV-IgG-Levels (C) von 35 immungesunden Probanden (Kontrollen), 33 RA-Patienten unter Steroid-Therapie (+ Steroid) und 42 RA-Patienten ohne Steroid-Therapie (-Steroid). Die VZV-IgG-Levels werden in internationalen Einheiten pro Liter (IE/l) angegeben. Die jeweiligen Nachweisgrenzen (NG) sind als gepunktete Linien dargestellt. Die Querstriche markieren den medianen Wert und den Interquartilsabstand. Statistische Werte wurden unter Verwendung des Kruskal-Wallis Test und dem Dunn Post-Test berechnet. Signifikante Unterschiede in den Post-Tests sind durch Sterne gekennzeichnet (\*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ ). Ig, Immunglobulin; RA, rheumatoide Arthritis; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; VZV, Varizella-Zoster Virus.

Um Einflüsse weiterer anti-rheumatischer Medikamente auf die VZV-spezifische Immunantwort detailliert analysieren zu können, wurden die 75 RA-Patienten in den nachfolgenden Abschnitten anhand ihrer Therapie in verschiedene Gruppen eingeteilt. Eine Übersicht dieser Einteilung ist in Abbildung 3 (s. Abschnitt 5.2.2) dargestellt. In Abbildung 18 sind die VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen sowie die VZV-IgG-Levels der nach ihrer anti-rheumatischen Therapie eingeteilten RA-Patienten und immungesunder Probanden dargestellt.



**Abbildung 18: Die VZV-spezifische Immunantwort ist bei RA-Patienten unter Biologika beeinträchtigt.** Die Frequenzen der VZV-spezifischen (oben) und SEB-reaktiven Immunantwort (Mitte) sowie die VZV-IgG-Levels (unten) von RA-Patienten wurden in Abhängigkeit von der anti-rheumatischen Therapie analysiert. **(A)** Dargestellt sind die Frequenzen reaktiver CD4 T-Zellen und die VZV-IgG-Levels von immungesunden Probanden (n=35) und RA-Patienten ohne und mit Biologika-Therapie (n=26 bzw. n=49). In **(B)** sind die Frequenzen und Antikörperlevels von RA-Patienten unter unterschiedlicher Therapie im Vergleich zu immungesunden Probanden gezeigt (n=4 für naive, n=22 für DMARD, n=17 für Biologikum und n=32 für DMARD+Biologikum). **(C)** Dargestellt sind die T-Zellfrequenzen und Antikörperlevels der RA-Patienten unter Biologika-Therapie, eingeteilt nach den jeweiligen Wirkmechanismus des Biologikums (n=16 für B-Zell-Depletion, n=4 für Ko-Stimulations-Blocker, n=15 für IL-6-Rezeptor-Blocker, n=14 für TNF-Blocker). Die gepunkteten Linien repräsentieren die jeweiligen Nachweisgrenzen (NG), die Querstriche markieren den medianen Wert bzw. den Interquartilsabstand. Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Dunn Post-Test berechnet. Signifikanzen im Post-Test wurden mit Sternchen angegeben (\* für p<0,05, \*\* für p<0,01, \*\*\* für p<0,001). DMARD, „Disease modifying anti-rheumatic drug“, IE/l, internationale Einheiten pro Liter; Ig, Immunglobulin; IL-6-R, IL-6-Rezeptor Ko-Stim, Ko-Stimulation; RA, Rheumatoide Arthritis; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus.

Dabei zeigten sich interessante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Anhand der allgemeinen Einteilung hinsichtlich der An- bzw. Abwesenheit einer Biologika-Therapie konnten zunächst bei beiden Gruppen im Vergleich zu den immungesunden Kontrollen signifikant geringere VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen nachgewiesen werden ( $p < 0,0001$ , Abbildung 18A oben). Die detailliertere Einteilung der RA-Patienten in Therapie-naive, Patienten mit DMARD- bzw. Biologika-Monotherapie und Patienten unter gleichzeitiger DMARD- und Biologika-Therapie zeigte hingegen, dass eine signifikante Beeinträchtigung der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz ausschließlich bei Patienten unter Biologika-Therapie zu beobachten war, unabhängig davon, ob die Patienten eine Monotherapie erhielten oder nicht (Abbildung 18B oben). RA-Patienten ohne akute anti-rheumatische Therapie (Therapie-naive) zeigten hingegen keine geringeren VZV-spezifischen T-Zellfrequenzen im Vergleich zu immungesunden Kontrollen. Die Frequenz SEB-reaktiver CD4 T-Zellen war bei den RA-Patienten unter Biologika-Therapie im Vergleich zu den immungesunden Kontroll-Probanden ebenfalls vermindert (Abbildung 18A Mitte). Bei den Patienten ohne Biologika-Therapie konnte dies hingegen nicht beobachtet werden. Bei der detaillierten Einteilung der RA-Patienten konnten zwar insgesamt signifikante Veränderungen nachgewiesen werden (Abbildung 18B Mitte,  $p = 0,032$ ), jedoch konnte dieser Unterschied im Post-Test keinen bestimmten Gruppen zugeordnet werden (keine Signifikanz im Post-Test).

Da die VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz bei RA-Patienten unter Biologika-Therapie im Vergleich zu immungesunden Personen die deutlichste Verringerung aufwies, wurde nachfolgend analysiert, ob dafür eine bestimmte Gruppe von Biologika verantwortlich sein könnte. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 18C dargestellt und illustriert deutlich, dass besonders RA-Patienten unter IL-6-Rezeptor-Blocker-Therapie oder TNF-Blocker-Therapie eine verringerte VZV-spezifische T-Zellfrequenz aufwiesen (Mediane 0,091%, 0,020% und 0,022%). Die medianen VZV-spezifischen T-Zellfrequenzen der Patienten unter B-Zell-Depletions- und Ko-Stimulations-Blocker-Therapie waren zwar ebenfalls geringer als die der Kontroll-Probanden (0,044% und 0,040%), jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Interessanterweise scheint die Immunantwort von RA-Patienten generell durch die Einnahme von B-Zell-depletierenden Medikamenten und IL-6-Rezeptor-Blockern beeinträchtigt zu werden, da die Frequenzen SEB-reaktiver CD4 T-Zellen bei diesen Patienten im Vergleich zu den Kontroll-Probanden deutlich vermindert waren ( $p = 0,0044$ ). Die VZV-IgG-Levels unterschieden sich hingegen bei der allgemeinen Einteilung anhand der

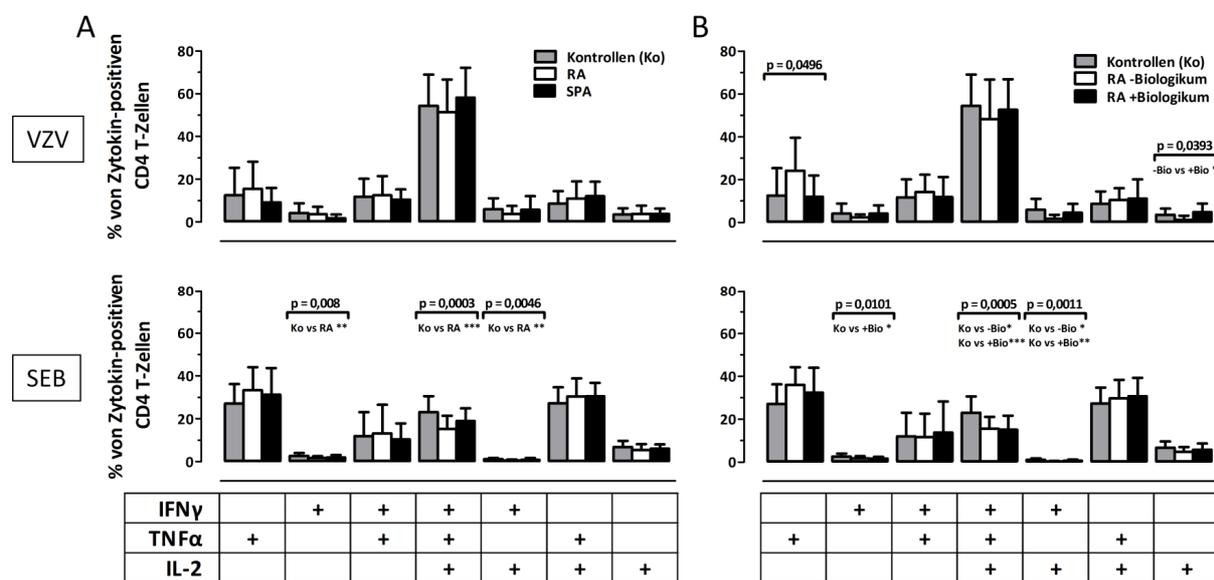
Therapie und bei der spezifischen Unterteilung der einzelnen Biologika zwischen den einzelnen Personengruppen nicht ( $p$ -Wert jeweils  $>0,05$  Abbildung 18A - C rechts).

#### **6.1.4.3 Die VZV-spezifische Immunantwort der Patienten mit rheumatischen Erkrankungen ähnelt der von nicht-symptomatischen Probanden**

Zusätzlich zur quantitativen Analyse der VZV-spezifischen Immunantworten wurden bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen auch funktionelle immunologische Parameter charakterisiert, die die Expression von Zytokinen und verschiedene Oberflächenmarken umfassten. Da für die funktionellen Charakterisierung mindestens 30 (Zytokinexpressionsprofil) bzw. 20 (Oberflächenmarker) Zytokin-positive bzw. reaktive CD4 T-Zellen notwendig waren und sich dadurch die Anzahl der einschließbaren Datensätze deutlich verringerte, konnte bei den PSA-Patienten keine weitere Unterteilung in verschiedene Subgruppen hinsichtlich der Therapie erfolgen. Aus dem gleichen Grund war bei RA-Patienten sowohl bei der Zytokinexpressionsanalyse als auch bei der Analyse der Oberflächenmoleküle jeweils lediglich eine Einteilung anhand der Behandlung mit oder ohne Biologikum sinnvoll.

Die Zytokinexpression der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen von den Kontroll-Probanden und den RA- und SPA-Patienten zeigte erwartungsgemäß keine deutlichen Unterschiede (Abbildung 19A oben) und war mehrheitlich durch multifunktionelle CD4 T-Zellen charakterisiert (Median  $\text{IFN}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}\alpha^+$  CD4 T-Zellen, Kontrollen 54,19%, RA 51,68%, SPA 62,86%). Die SEB-reaktiven CD4 T-Zellen waren bei allen Personengruppen durch ein hohes Maß an Zellen gekennzeichnet, die lediglich  $\text{TNF}\alpha$  exprimierten. Bei den RA-Patienten waren im Vergleich zu den immungesunden Personen signifikant geringere Anteile an ausschließlich  $\text{IFN}\gamma^+$ ,  $\text{IFN}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}\alpha^+$  und  $\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$  CD4 T-Zellen nachweisbar (Abbildung 19A unten,  $p=0,008$ ,  $p=0,0003$ ,  $p=0,0046$ ). Das Zytokinexpressionsprofil VZV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 T-Zellen von RA-Patienten mit und ohne Biologika-Therapie sowie von immungesunden Probanden ist in Abbildung 19B dargestellt. Insgesamt konnte hier jedoch keine eindeutig mit Biologika-Therapie assoziierte Veränderung in der Zytokinexpression der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen identifiziert werden. Lediglich ein leicht größerer Anteil ausschließlich IL-2-exprimierender T-Zellen konnte bei RA-Patienten mit Biologikum gegenüber den Patienten ohne Biologikum-Therapie nachgewiesen werden ( $p=0,0393$ ). Zusätzlich war eine geringe Veränderung im Anteil ausschließlich  $\text{TNF}\alpha$ -exprimierender

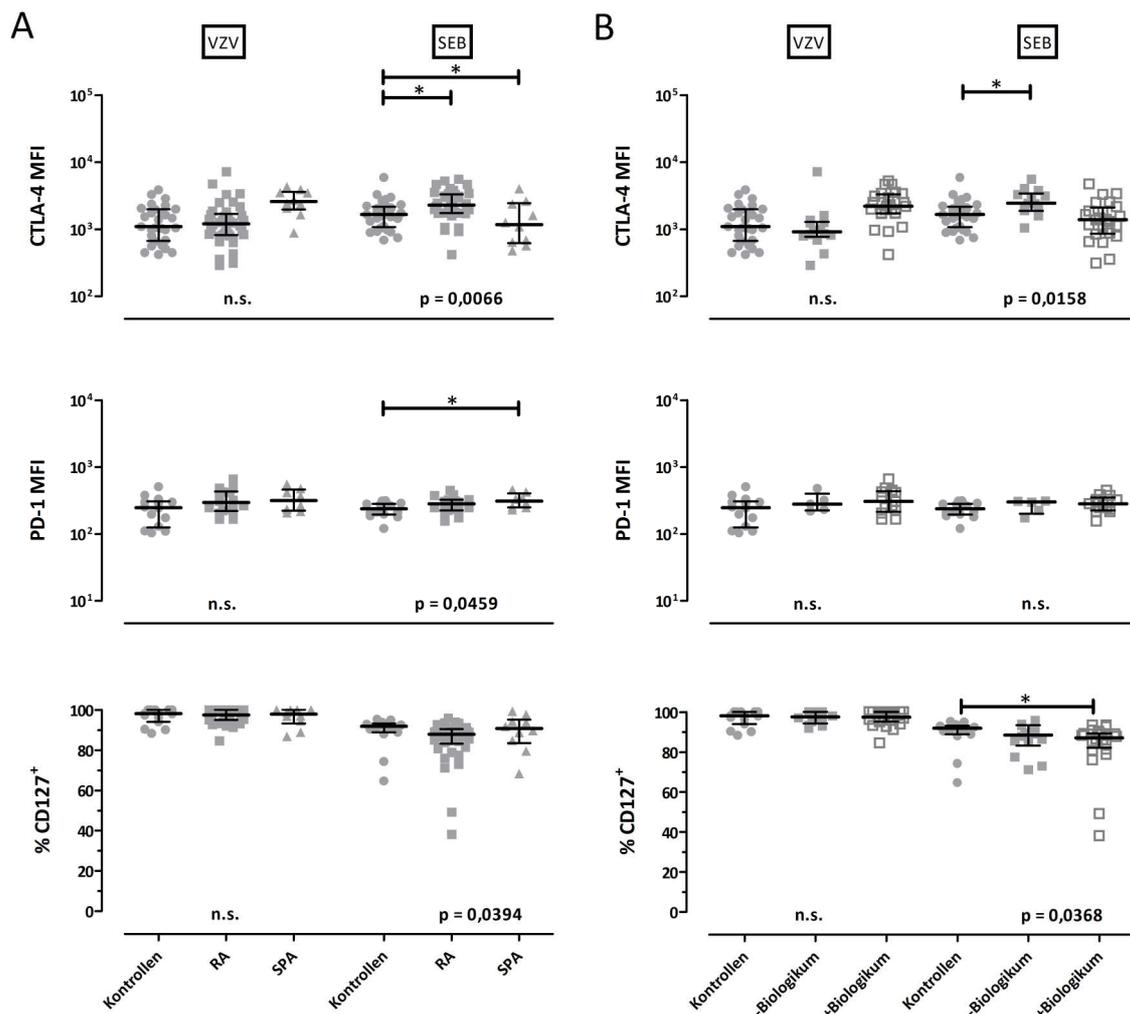
Zellen nachweisbar, der für alle 3 Personengruppen zutraf ( $p=0,0496$ ). VZV-Reaktivierungs-assoziierte Veränderungen, das heißt der Verlust von  $\text{IFN}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}\alpha^+$  CD4 T-Zellen bei gleichzeitigem Anstieg ausschließlich  $\text{IFN}\gamma$ -exprimierender Zellen, konnten jedoch bei den RA-Patienten weder im Vergleich zu immungesunden Probanden noch in Abhängigkeit von der Therapie identifiziert werden. Die Zytokinexpression der SEB-reaktiven Zellen zeigte ebenfalls keine Veränderungen in Abhängigkeit von der Therapie. Verglichen mit den immungesunden Kontroll-Probanden besaßen jedoch beide Gruppen einen geringeren prozentualen Anteil  $\text{IFN}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}\alpha^+$  und  $\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}\alpha^+$  CD4 T-Zellen sowie die Patienten mit Biologika zudem weniger ausschließlich  $\text{IFN}\gamma$ -exprimierende Zellen.



**Abbildung 19: VZV-spezifische CD4 T-Zellen von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen unterscheiden sich ihrem Zytokinexpressionsprofil nur geringfügig von gesunden Kontrollen.** Dargestellt sind Balkendiagramme (Mittelwert und Standardabweichung) der Subgruppen einfach-, doppelt- und dreifach-Zytokin-exprimierender CD4 T-Zellen von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen. Eingeschlossen wurden ausschließlich Proben mit mindestens 30 Zytokin-positiven CD4 T-Zellen. In **(A)** sind die Zytokinexpressionsprofile der VZV-spezifischen (oben) und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen (unten) von immungesunden Kontrollen (Ko,  $n=29$ ), RA-Patienten ( $n=28$ ) und SPA-Patienten ( $n=10$ ) dargestellt. **(B)** Dargestellt sind die Zytokinexpressionsprofile der VZV-spezifischen (oben) und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen (unten) von immungesunden Kontrollen ( $n=29$ ) und von RA-Patienten mit bzw. ohne Biologika-Therapie ( $n=8$  bzw.  $n=20$ ). Statistische Unterschiede zwischen den Patientengruppen wurden mit dem One-Way Analysis of Variance Test und dem Bonferroni Post-Test berechnet. Signifikanzen im Post-Test wurden mit Sternen angegeben (\* für  $p<0,05$ , \*\* für  $p<0,01$ , \*\*\* für  $p<0,001$ ). Bio, Biologikum; IFN, Interferon; IL, Interleukin; RA, Rheumatoide Arthritis; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; SPA, Spondyloarthritis; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus.

Da eine gesteigerte Expression von CTLA-4 und PD-1 mit einer beeinträchtigten Funktionalität der T-Zellen einhergeht, wurde die Expression dieser Moleküle auf den VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen von RA- und PSA-Patienten analysiert. Zusätzlich wurde die Expression von CD127 auf den VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4

T-Zellen gemessen (Abbildung 20A). Während die Expression von CTLA-4 und PD-1 auf diesen Zellen bei allen drei Personengruppen mit einer medianen MFI zwischen 1096 und 1204 bzw. 248 und 317 eher gering war, waren nahezu alle VZV-spezifischen CD4 T-Zellen CD127-positiv (Median Kontrolle 98,19%, RA 97,42%, SPA 97,92%). Signifikante Unterschiede zwischen diesen Personengruppen konnten weder bei der Expression der beiden inhibitorischen Moleküle noch bei der Expression des CD127-Moleküls auf den VZV-spezifischen Zellen identifiziert werden. Die SEB-reaktiven Zellen zeigten hingegen deutliche Unterschiede in der Expression dieser Moleküle. Während die RA-Patienten gegenüber den Kontroll-Probanden eine signifikant erhöhte CTLA-4-Expression aufwiesen, konnte auf den SEB-reaktiven Zellen der PSA-Patienten sowohl eine verringerte CTLA-4- als auch eine erhöhte PD-1-Expression im Vergleich zu den immungesunden Personen nachgewiesen werden. Trotz signifikanter Unterschiede in der Expressionsstärke war die Expression von CTLA-4 und PD-1 insgesamt gering.



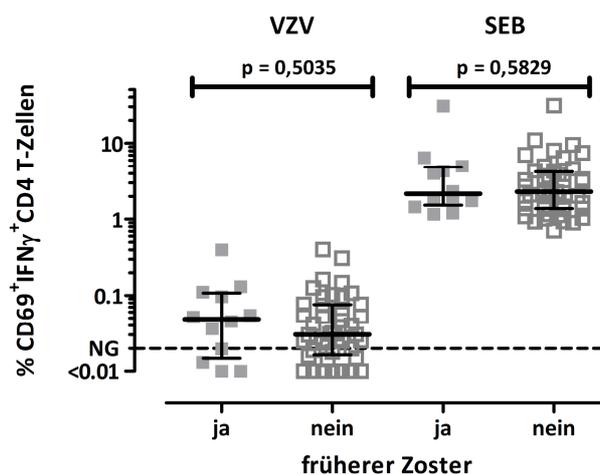
**Abbildung 20: Die Expression von CTLA-4, PD-1 und CD127 auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen ist bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen im Vergleich zu immungesunden Personen unverändert.** VZV-spezifische und SEB-reaktive CD4 T-Zellen wurden hinsichtlich der Expression der Oberflächenmoleküle CTLA-4, PD-1 und CD127 analysiert. Dabei wurde die Expression dieser Moleküle zwischen **(A)** RA-Patienten und SPA-Patienten sowie **(B)** RA-Patienten mit und ohne Biologika jeweils mit immungesunden Kontrollen verglichen, wobei nur Messungen von Personen mit mindestens 20 VZV-spezifischen CD4 T-Zellen eingeschlossen wurden (n=29 für Kontrollen, n=10 für SPA, n=38 für RA (davon 24 mit Biologikum)). Die Expressionsstärke von CTLA-4 und PD-1 wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. Die Expression von CD127 wird durch den Anteil CD127-positiver Zellen an allen VZV-spezifischen bzw. SEB-reaktiven CD4 T-Zellen angegeben. Die Querstriche markieren den medianen Wert und den Interquartilsabstand. Unter Verwendung des Kruskal-Wallis Test und dem Dunn Post-Test wurden statistische Unterschiede berechnet, deren Signifikanzen im Post-Test durch Sterne markiert wurden (\* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ ). CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten-Antigen-4; n.s., nicht signifikant; PD-1, „programmed death“ 1; RA, Rheumatoide Arthritis; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; SPA, Spondyloarthritis; VZV, Varizella-Zoster Virus.

Die Einteilung der RA-Patienten hinsichtlich der Therapie mit und ohne Biologika lieferte bei der VZV-spezifischen Immunantwort ebenfalls keine Hinweise auf eine Veränderung in der Expression der drei untersuchten Marker (Abbildung 20B). Folglich konnten auch in Abhängigkeit der Therapie keine immunologischen Veränderungen identifiziert werden, die auf eine funktionelle Beeinträchtigung der VZV-spezifischen Immunantwort hindeuten, wie sie in ausgeprägter Form bei Personen mit akutem Herpes Zoster nachweisbar waren. Bei den SEB-reaktiven CD4 T-Zellen konnten ebenfalls keine deutlichen Unterschiede gemessen werden. Lediglich die RA-Patienten ohne Biologikum zeigten gegenüber den immungesunden Probanden eine leicht höhere CTLA-4-Expression während RA-Patienten unter Biologika-Therapie leicht geringere Frequenzen CD127-positiver CD4 T-Zellen aufwiesen.

Insgesamt konnten somit bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen keine Unterschiede in der Funktionalität und dem Phänotyp VZV-spezifischer CD4 T-Zellen identifiziert werden, die mit einer funktionellen Beeinträchtigung der VZV-spezifischen Immunantwort einhergehen. Die Beobachtung, dass RA-Patienten unter Biologika-Therapie und hier insbesondere Patienten unter IL-6-Rezeptor-Blocker- sowie TNF-Blocker-Therapie verglichen mit immungesunden Probanden signifikant geringere VZV-spezifische Frequenzen besitzen, könnten jedoch möglicherweise auf eine eingeschränkte bzw. verminderte VZV-spezifische Immunantwort hinweisen und folglich eine erhöhte Infektneigung bei diesen Patienten begünstigen.

#### 6.1.4.4 Frühere Herpes-Zoster-Erkrankungen zeigen keinen Einfluss auf die VZV-spezifischen T-Zellfrequenzen bei RA-Patienten

Zur Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen wurden ausschließlich Personen ohne akute VZV-Reaktivierung eingeschlossen. Um potentielle Einflüsse früherer symptomatischer VZV-Reaktivierungen auf die aktuellen VZV-spezifischen T-Zellfrequenzen von Patienten mit hoher Zosterinzidenz zu analysieren, wurden die Frequenzen von RA-Patienten, die in der Vergangenheit einen Herpes Zoster hatten (n=12), und RA-Patienten ohne zurückliegende symptomatische VZV-Reaktivierungen (n=44) verglichen (Abbildung 21; Tabelle 3, Patientencharakteristika). Dabei lag der Zeitpunkt der akuten VZV-Reaktivierung mindestens 6 Monate vor dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Von den restlichen RA-Patienten lagen diesbezüglich keine Informationen vor. Wie aufgrund der in Abschnitt 6.1.1.4 beschriebenen Reversibilität der Zoster-assoziierten Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort nach Rückgang der akuten VZV-Reaktivierungs-Symptomatik erwartet wurde, waren bei dem in dieser Arbeit verfügbaren RA-Patientenkollektiv erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede in der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz nachweisbar ( $p=0,5035$ ). Die Frequenzen der SEB-reaktiven CD4 T-Zellen der beiden Gruppen unterschieden sich ebenfalls nicht ( $p=0,5829$ ). Insgesamt scheinen die VZV-spezifischen T-Zellfrequenzen der RA-Patienten somit erwartungsgemäß nicht durch frühere VZV-Reaktivierungen beeinflusst zu sein.

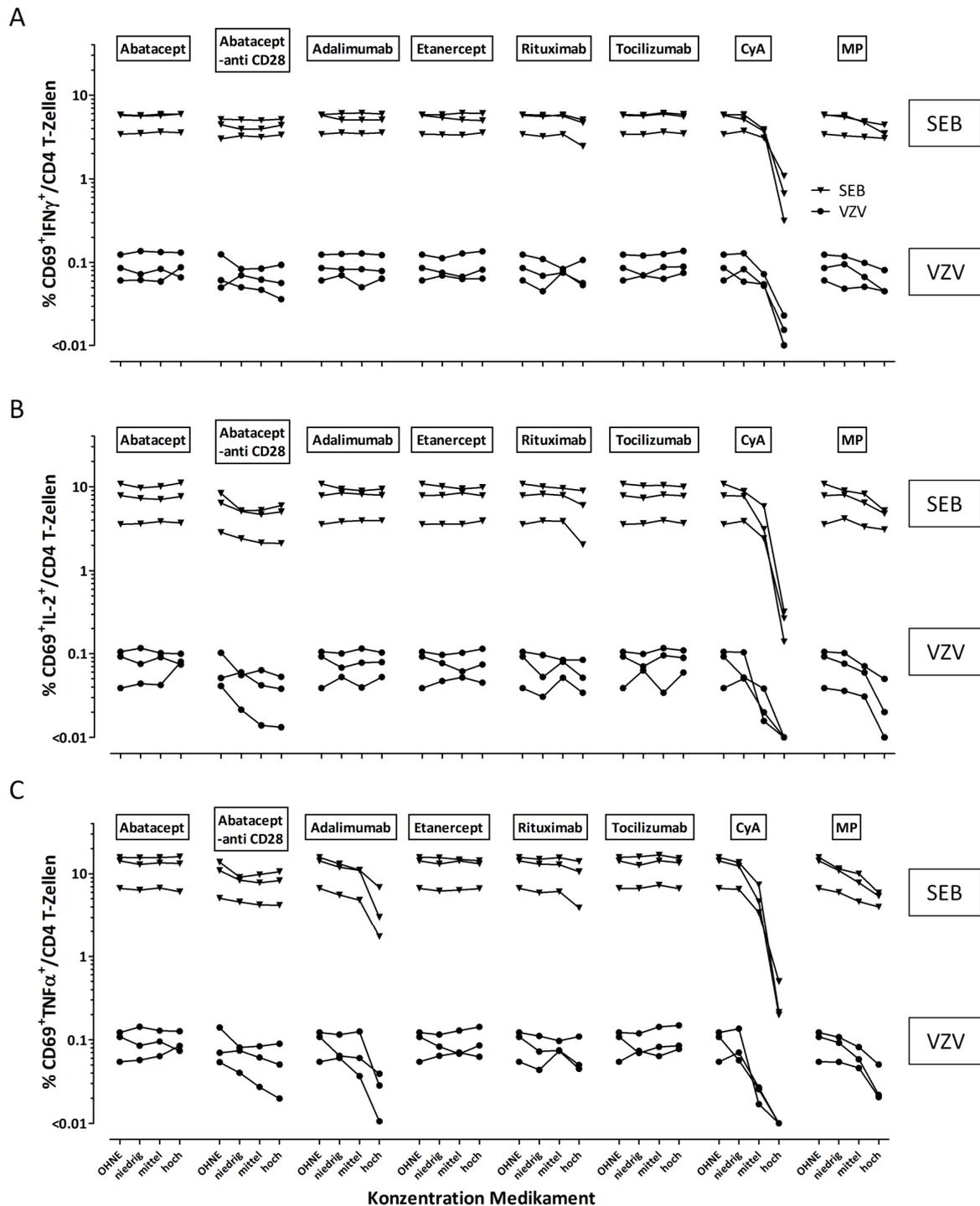


**Abbildung 21: Die aktuelle VZV-spezifische T-Zellfrequenz von RA-Patienten wird durch zurückliegende symptomatische VZV-Reaktivierungen nicht beeinflusst.** Dargestellt sind die VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen von RA-Patienten mit und ohne symptomatische VZV-Reaktivierung in der Vergangenheit (n=12 für ja und n=44 für nein). Die Querstriche geben dabei jeweils den Median und den Interquartilsabstand an. Die gepunktete Linie repräsentiert die Nachweisgrenze (NG). Statistische Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet. IFN, Interferon; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; VZV, Varizella-Zoster Virus.

#### **6.1.4.5 Anti-rheumatische Medikamente zeigen *in vitro* keinen Einfluss auf die VZV-spezifische Frequenz, Proliferation und Zytokinexpression**

Um potentielle Einflüsse der anti-rheumatischen Therapie auf die VZV-spezifische Immunantwort *in vitro* zu analysieren, wurden Blutproben von drei immungesunden Kontroll-Probanden zunächst mit verschiedenen anti-rheumatischen Medikamenten vorinkubiert und anschließend spezifisch stimuliert. Um unmittelbare Einflüsse in der Frühphase nach Stimulation identifizieren zu können, wurde die Expression der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  bereits innerhalb von 2-6 Stunden nach Stimulation quantifiziert. Da die T-Zellfunktionalität durch die anti-rheumatische Medikation auch Antigen-unabhängig beeinflusst werden könnte, wurden zusätzlich Stimulationen mit dem polyklonalen Stimulus SEB durchgeführt. Als interne Kontrolle wurden zudem parallel zwei Immunsuppressiva (Cyclosporin A und Methylprednisolon) verwendet, die bekanntermaßen einen hemmenden Einfluss auf die frühe Zytokininduktion ausüben.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Zytokinexpression während der frühen-Phase nach der Stimulation bei unterschiedlicher Konzentration der Medikamente dargestellt. Die mittlere Konzentration entspricht dabei jeweils dem maximalen Plasmaspiegel nach Einmaleinnahme des jeweiligen Medikaments. Bei Anwesenheit der anti-rheumatischen Medikamente waren keine deutlichen Effekte auf die VZV-spezifische oder polyklonale Zytokinexpression messbar. Ausschließlich bei hoher Konzentration des TNF-Blockers Adalimumab konnte eine geringe Abnahme der TNF $\alpha$ -Expression festgestellt werden, die interessanterweise bei dem TNF-Blocker (Etanercept) nicht detektierbar war.

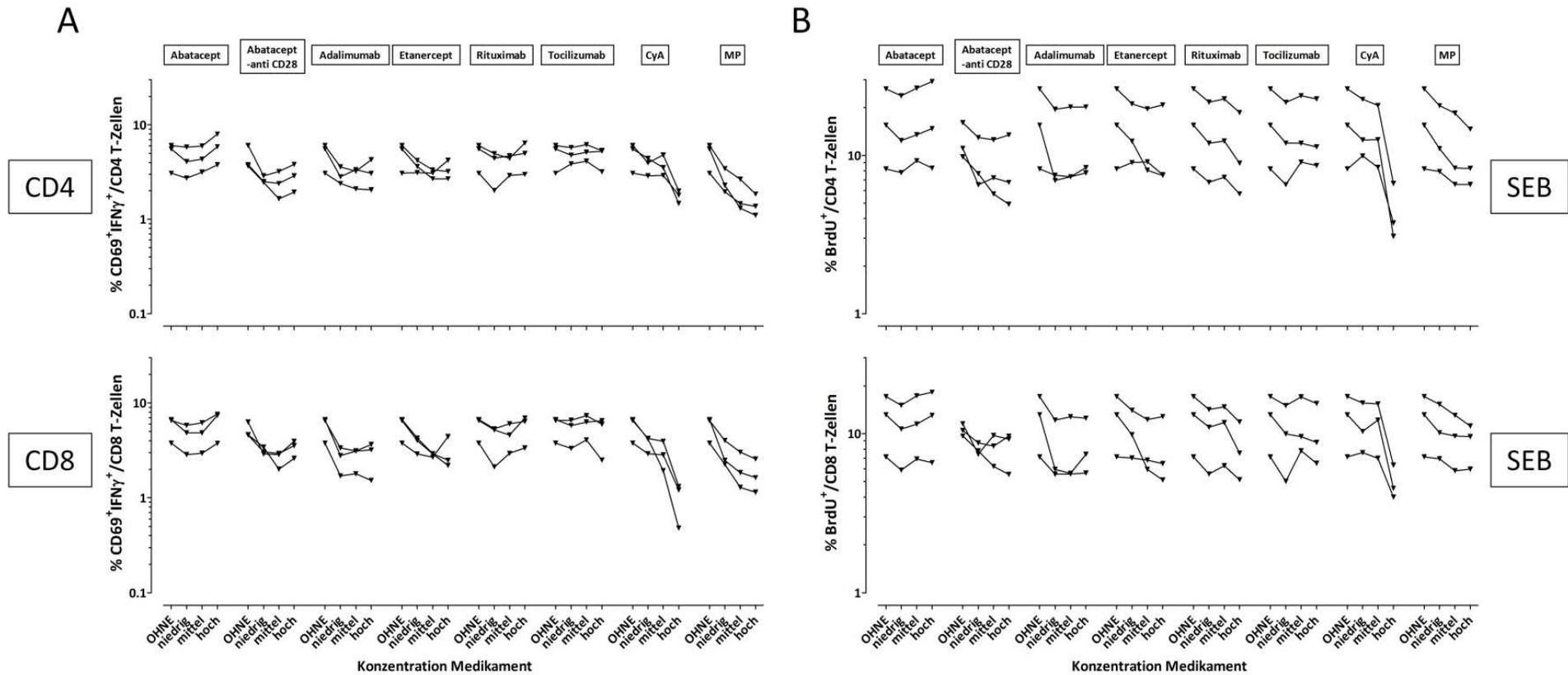


**Abbildung 22: Anti-rheumatische Medikamente zeigen keinen Einfluss auf die „frühe“ Zytokinexpression VZV-spezifischer und SEB-reaktiver T-Zellen.** Dargestellt sind die nach 4-stündiger Vorinkubation mit verschiedenen anti-rheumatischen und anderen immunsuppressiven Medikamenten und anschließender 6-stündiger Antigen-spezifischer Vollblut-Stimulation nachgewiesenen Frequenzen  $CD69^+IFN\gamma^+$  (**A**),  $CD69^+IL-2^+$  (**B**) und  $CD69^+TNF\alpha^+$  (**C**) VZV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 T-Zellen. Dabei wurde für jede Person (n=3) ein Ansatz ohne Medikament sowie pro Medikament je ein Ansatz mit geringer, mittlerer (max. Blutspiegel) und hoher Konzentration angesetzt. Bei Abatacept wurden zusätzliche Ansätze ohne den ko-stimulatorischen anti-CD28-Antikörper mitgeführt. CyA, Cyclosporin A; IFN, Interferon; IL, Interleukin; MP, Methylprednisolon; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus.

Im Gegensatz zu den anti-rheumatischen Medikamenten wurde der Anteil Zytokin-exprimierender T-Zellen erwartungsgemäß durch Cyclosporin A und Methylprednisolon gehemmt, wobei der supprimierende Effekt durch Cyclosporin A deutlich ausgeprägter war als bei Methylprednisolon. Bemerkenswert war, dass die TNF $\alpha$ -Expression bereits bei mittlerer Cyclosporin A Konzentration deutlich inhibiert wurde, wohingegen dieser deutliche Effekt bei der IFN $\gamma$ - und IL-2-Expression erst bei der hohen Konzentration auftrat.

Um möglicherweise später auftretende Effekte der anti-rheumatischen Medikamente nachweisen zu können, wurde zusätzlich die IFN $\gamma$ -Expression sowie die Antigen-spezifische Proliferation 32-36h nach Stimulation analysiert.

Der Einfluss der unterschiedlichen Medikamente auf die späte Zytokinexpression und die anhand der Einbaurrate von BrdU nachgewiesene Proliferation ist in Abbildung 23 dargestellt. Aufgrund der auch ohne Medikamenteninkubation bereits sehr geringen späten Zytokinexpression und Proliferation der VZV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen war eine Aussage über eine potentielle immunsupprimierende Wirkung der Medikamente auf die VZV-spezifischen T-Zellen nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Die polyklonale späte IFN $\gamma$ -Expression und Proliferation war hingegen deutlich messbar, jedoch war keine eindeutige Wirkung der anti-rheumatischen Medikamente auf die SEB-reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen nachweisbar. Wie bereits in Frühphase nach Stimulation wurde die späte IFN $\gamma$ -Expression hingegen nachweislich mit ansteigender Konzentration von Cyclosporin A und Methylprednisolon inhibiert, wobei hier im Gegensatz zur frühen Phase der Effekt durch Methylprednisolon stärker ausgeprägt war (Abbildung 23A). Mit ansteigender Konzentration von Cyclosporin A und Methylprednisolon konnte zudem eine deutliche Verringerung der Frequenz BrdU-positiver SEB-reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen nachgewiesen werden. (Abbildung 23B).



**Abbildung 23: Die „späte“ IFN $\gamma$ -Expression und die mittels BrdU-Einbauratenachgewiesene Proliferation SEB-reaktiver T-Zellen scheint durch anti-rheumatische Medikamente nicht beeinflusst zu werden.** Nach 4-stündiger Vorinkubation mit verschiedenen anti-rheumatischen und anderen immunsuppressiven Medikamenten und anschließender 36-stündiger polyklonaler (SEB) Vollblut-Stimulation wurden die IFN $\gamma$ -Expression (**A**) und die mittels BrdU-Einbauratenachgewiesene Proliferation (**B**) von CD4 (oben) und CD8 T-Zellen (unten) während der letzten 4h der Inkubation analysiert. Für jede Person (n=3) wurde ein Ansatz ohne Medikament sowie pro Medikament je ein Ansatz mit geringer, mittlerer (max. Blutspiegel) und hoher Konzentration angesetzt. Bei Abatacept wurden zusätzliche Ansätze ohne den anti-CD28-Antikörper mitgeführt. CyA, Cyclosporin A; IFN, Interferon; MP, Methylprednisolon; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

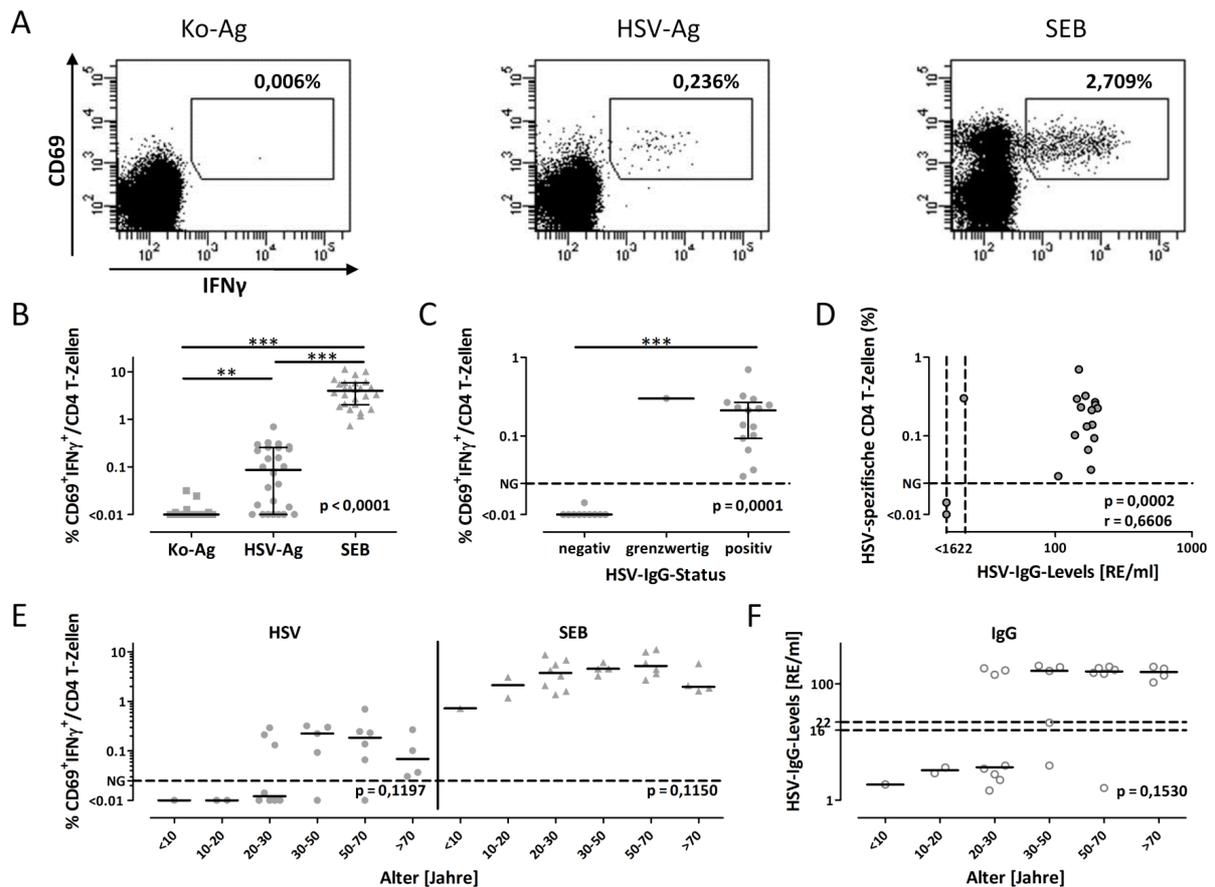
Da die therapeutische Wirkung von Abatacept durch die Bindung an CD28-Moleküle der Zielzellen vermittelt wird, wodurch einer Inhibierung des ko-stimulatorischen Signals hervorgerufen wird, wurden bei diesen Medikament zusätzlich Ansätze ohne Zugabe des Ko-stimulatorischen anti-CD28-Antikörpers mitgeführt. Erwähnenswert ist, dass bei diesen Stimulationen im Vergleich zu den Stimulationen mit diesem Antikörper wie erwartet geringere Frequenzen, eine geringere Zytokinexpression und eine geringere Proliferation induziert wurden. Allerdings war auch ohne den anti-CD28-Antikörper kein eindeutiger immunsupprimierender Effekt von Abatacept auf die VZV-spezifische oder polyklonale Immunantwort nachweisbar (Abbildung 22 und 23).

Insgesamt konnte somit *in vitro* im Gegensatz zu den beiden Immunsuppressiva Cyclosporin A und Methylprednisolon kein positiver oder negativer Einfluss der anti-rheumatischen Medikamente auf die VZV-spezifische und polyklonale Zytokinexpression sowie die Proliferation nachgewiesen werden.

## **6.2 Charakterisierung der humoralen und zellulären Immunität gegen die Alphaherpesviren Herpes-Simplex Virus 1 und 2 (HSV)**

### ***6.2.1 Die HSV-spezifische Immunantwort immungesunder Probanden ist altersabhängig und zeigt eine gute Korrelation zwischen den T-Zellfrequenzen und den Antikörperlevels***

Blutproben von insgesamt 26 immungesunden Kontroll-Probanden ohne akute HSV-Symptomatik im Alter von 7 bis 91 Jahren wurden hinsichtlich der HSV-spezifischen Immunität untersucht. Die Probandencharakteristika sind in Tabelle 4 angegeben. Zur Analyse der zellulären Immunantwort wurden alle Blutproben mit einem Lysat HSV-infizierter Zellen, einem Kontroll-Lysat als Negativkontrolle und dem polyklonalen Stimulus SEB als Positivkontrolle stimuliert. In Abbildung 24A ist ein repräsentatives Ergebnis der durchflusszytometrischen T-Zellanalyse einer 55-jährigen Probandin anhand von Punktdiagrammen dargestellt. Während nach Stimulation mit dem Kontroll-Lysat nahezu keine CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 T-Zellen auftraten, konnten diese nach Stimulation mit dem HSV-Lysat bei einigen Probanden nachgewiesen werden (Abbildung 24B). Die HSV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz wurde errechnet, indem jeweils die Frequenz der CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 T-Zellen nach Stimulation mit der Negativkontrolle von der Frequenz nach Stimulation mit dem HSV-Antigen subtrahiert wurde.



**Abbildung 24: Die T-Zellfrequenzen und IgG-Levels der HSV-spezifischen Immunantwort korrelieren gut. (A)** Repräsentative Punktdiagramme von CD4 T-Zellen einer immungesunden Probandin nach Stimulation mit dem Kontroll-Antigen (Ko-Ag), dem HSV-Antigen (HSV-Ag) und dem *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB). Angegeben sind die jeweiligen Frequenzen CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 T-Zellen. **(B)** Dargestellt ist das Analyse-Ergebnis aller immungesunden Probanden nach Stimulation mit den drei verschiedenen Stimuli. Die Querstriche repräsentieren jeweils den Median und den Interquartilsabstand. **(C)** Die Frequenzen der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen wurden nach Abzug der entsprechenden Negativkontrolle in Abhängigkeit des HSV-IgG-Status dargestellt. **(D)** Korrelation der HSV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen und HSV-IgG-Levels (RE/ml) aller immungesunden Probanden. Darstellung der HSV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenz **(E)** sowie des HSV-IgG-Levels **(F)** in Abhängigkeit vom Alter der Probanden. Die Nachweisgrenzen (NG) sind als gepunktete Linien visualisiert. Für die statistischen Analysen wurde der Friedman Test für gepaarte (B) und der Kruskal-Wallis Test für ungepaarte Werte (C, E, F) jeweils in Kombination mit Dunn Post-Test, verwendet. Signifikante Unterschiede im Post-Test in (B, C) sind mit Sternen gekennzeichnet (\*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ ). Die Korrelationen wurden mit dem Spearman Test kalkuliert. HSV, Herpes-Simplex Virus; IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; RE/ml, relative Einheiten pro Milliliter.

Die HSV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen lagen bei allen HSV-seronegativen Probanden (10/26) unterhalb der Nachweisgrenze von 0,025%, wohingegen die 15 analysierten HSV-seropositiven Probanden mit einer medianen HSV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz von 0,21% ausnahmslos T-Zell-positiv waren (Abbildung 24C). Lediglich eine Probandin hatte einen grenzwertigen HSV-IgG-Status bei gleichzeitig hoher HSV-spezifischer CD4 T-Zellfrequenz (0,30%). Zudem war bei den gesunden Probanden eine gute Korrelation

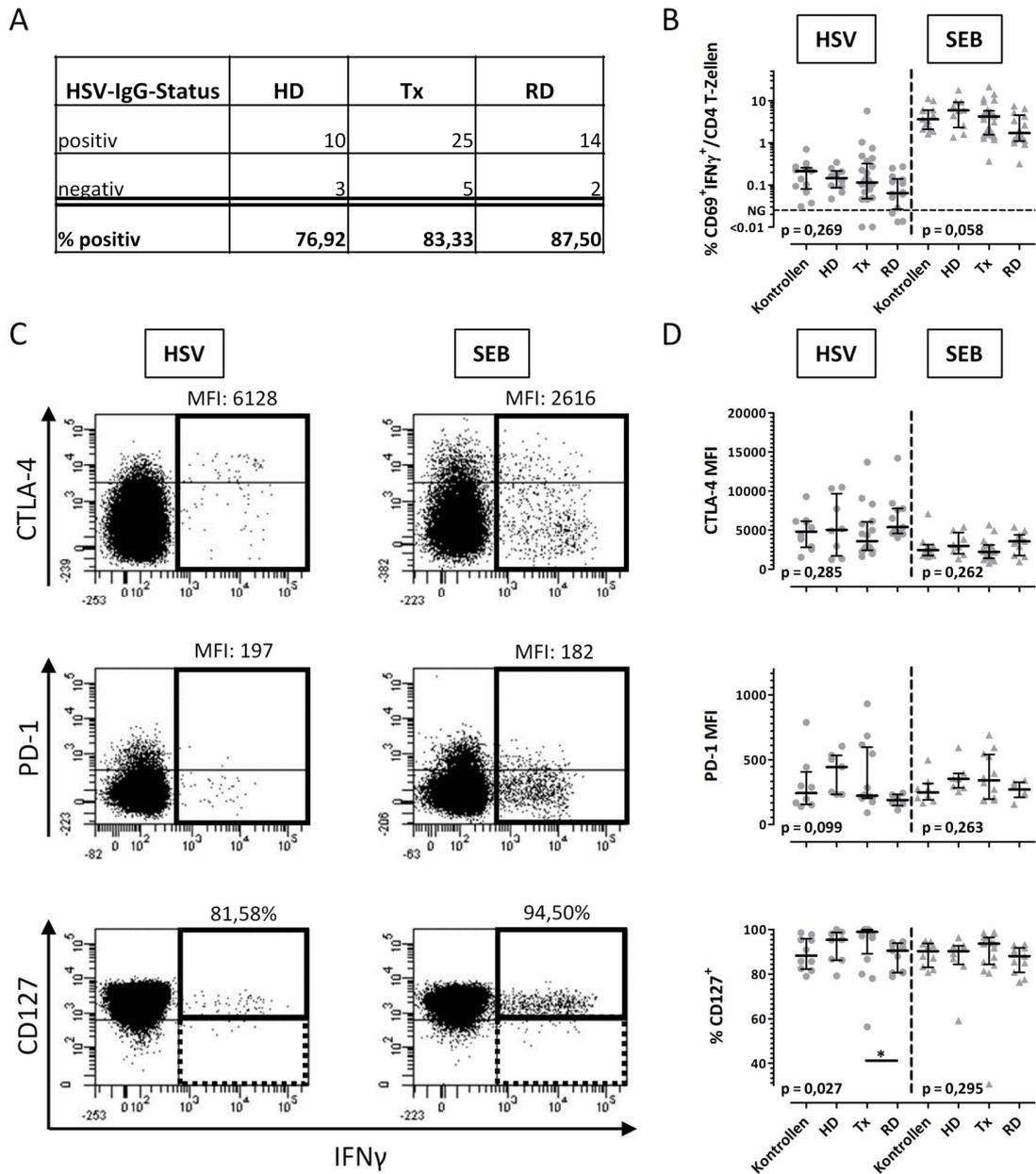
zwischen den HSV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen und den HSV-IgG-Levels nachweisbar ( $p=0,0002$  und  $r=0,6606$ , Abbildung 24D).

Während die jüngeren Probanden (<20 Jahre) sowohl HSV-IgG- als auch HSV-T-Zell-negativ waren, nahm der Anteil der Probanden mit einem positiven IgG- und T-Zell-Status von jeweils 37,5% in der Gruppe der 20- bis 30-Jährigen bis hin zu 100% in der Gruppe der >70-Jährigen stetig zu (Abbildung 24E und F). Die Frequenz der SEB-reaktiven CD4 T-Zellen stieg mit zunehmendem Alter der Probanden kontinuierlich an. Nur bei den Probanden >70-Jahren konnte eine leichte Abnahme der T-Zellfrequenz festgestellt werden, die auch bei den HSV-spezifischen CD4 T-Zellen dieser Probanden nachweisbar war. Die HSV-IgG-Levels dieser Probanden schienen jedoch interessanterweise gegenüber den Probanden zwischen 30 und 70 nicht verringert zu sein. Trotz leichter Tendenzen konnten jedoch bei der Alters-abhängigen Analyse der T-Zellfrequenzen und der Antikörperlevels keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

### ***6.2.2 Die zelluläre Immunantwort zeigt insgesamt keine deutlichen HSV-spezifischen Veränderungen bei Probanden mit eingeschränkter Immunfunktion***

Um potentielle Auswirkungen einer Immunsuppression auf die HSV-spezifische Immunantwort untersuchen zu können, wurden 59 nicht-symptomatische Patienten mit Immundefizienzen (13 HD, 30 Tx, 16 RD; Patientencharakteristika s. Tabelle 4) zunächst hinsichtlich ihres HSV-IgG-Status analysiert. Hier zeigte sich, dass 10 Patienten (3 HD, 5 Tx, 2 RD) HSV-seronegativ waren (Abbildung 25A). Von diesen 10 seronegativen Patienten waren 8 T-Zell-negativ und 2 T-Zell-positiv (1 HD 0,486% und 1 Tx 0,037%). Anschließend wurde die HSV-spezifische zelluläre Immunantwort der 49 HSV-IgG-positiven Patienten hinsichtlich der Frequenz, der Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle und der Zytokinexpression analysiert und die Ergebnisse mit denen von 13 immungesunden HSV-IgG-positiven Kontroll-Probanden verglichen.

Zwischen den einzelnen Probanden- und Patientengruppen konnten weder für die HSV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz noch für die Frequenz SEB-reaktiver CD4 T-Zellen signifikante Unterschiede identifiziert werden ( $p=0,269$  bzw.  $0,058$ , Abbildung 25B). Jedoch waren die Frequenzen in der Gruppe der Patienten mit rheumatischen Erkrankungen tendenziell leicht niedriger als dies bei den übrigen Gruppen der Fall war.

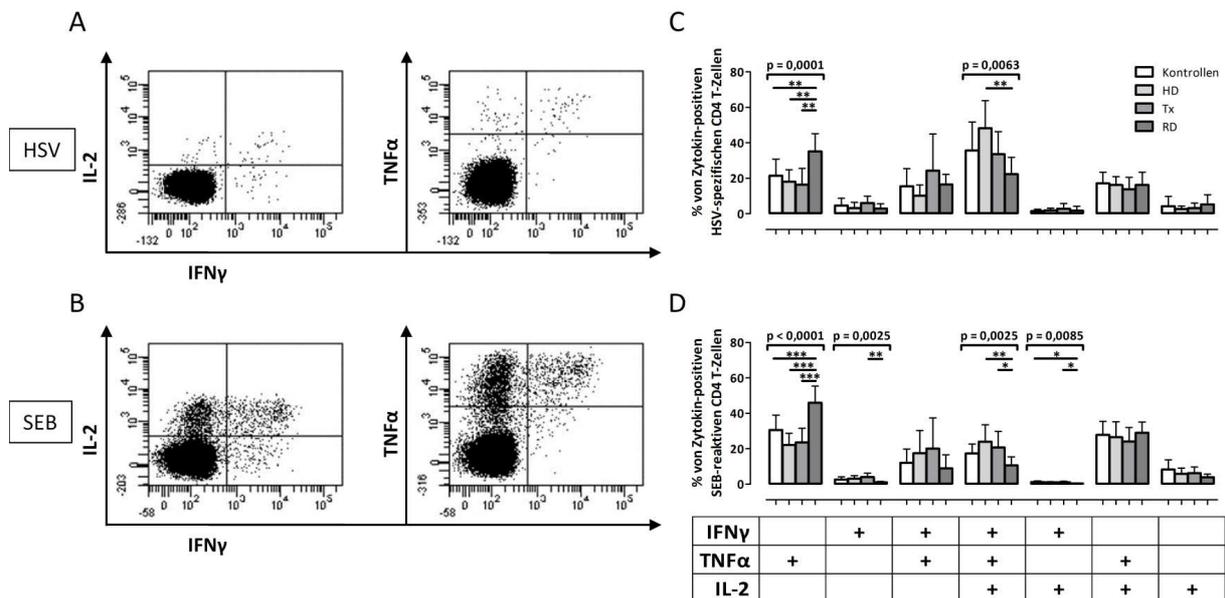


**Abbildung 25: Die HSV-spezifische zelluläre Immunantwort von immunsupprimierten Patienten zeigt keine Veränderungen in der Frequenz und Expression der Moleküle CTLA-4, PD-1 und CD127. (A)** HSV-IgG-Status immunsupprimierter Patienten (n=13 für HD, n=30 für Tx, n=16 für RD). **(B)** Dargestellt sind die HSV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen aller HSV-seropositiven immunsupprimierten Patienten und einer altersangepassten Gruppe immungesunder Kontroll-Probanden (n=13). Die Nachweisgrenze (NG) ist als gepunktete Linie dargestellt. **(C)** Repräsentative Punktdiagramme der CTLA-4-, PD-1- und CD127-Expression auf HSV-spezifischen (jeweils links) und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen (jeweils rechts) einer immungesunden Probandin. Die Expressionsstärke von CTLA-4 und PD-1 wird durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die Expression von CD127 wird anhand des Anteils CD127-positiver HSV-spezifischer bzw. SEB-reaktiver Zellen an der gesamten IFN $\gamma$ -exprimierenden CD4 T-Zellpopulation bestimmt. **(D)** Analyseergebnis der Expression von CTLA-4, PD-1 und CD127 auf HSV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen aller HSV-IgG-positiven immunsupprimierten Patienten und Kontroll-Probanden von Proben mit mindestens 20 HSV-spezifischen CD4 T-Zellen. Die Querstriche geben jeweils den Median und den Interquartilsabstand an. Für die statistischen Analysen wurde jeweils der Kruskal-Wallis Test in Kombination mit Dunn Post-Test verwendet. Signifikante Unterschiede im Post-Test sind mit Sternen gekennzeichnet (\* für  $p < 0,05$ ). CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten-Antigen-4; HD, Hämodialyse-Patient; HSV, Herpes-Simplex Virus; Ig, Immunglobulin; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; PD-1, „programmed death“ 1; RD, Patient mit rheumatischer Erkrankung; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; Tx, Transplantat-Empfänger.

In Abbildung 25C sind repräsentative Punktdiagramme der CTLA-4-, PD-1 und CD127-Expression einer immungesunden Probandin nach Stimulation mit dem HSV-Antigen und dem polyklonalen Stimulus SEB gezeigt. Die Expression der beiden inhibitorischen Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 auf den HSV-spezifischen CD4 T-Zellen zeigte zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,285$  bzw.  $0,099$ , Abbildung 25D). Es fiel jedoch auf, dass die Expressionsstärke dieser Moleküle innerhalb der einzelnen Patienten-Gruppen sehr stark variierte. Die HSV-spezifischen CD4 T-Zellen der immunsupprimierten Patienten waren mit medianen Werten von 95,35% (HD), 98,91% (Tx) und 90,48% mehrheitlich CD127-positiv, wobei die Patienten mit rheumatischen Erkrankungen im Gegensatz zu den Transplantatempfängern einen leicht geringeren Anteil an CD127<sup>+</sup> HSV-spezifischen CD4 T-Zellen besaßen ( $p=0,027$ ; im Post-Test Tx vs RD  $p<0,05$ ). Die polyklonal stimulierten CD4 T-Zellen der unterschiedlichen Probanden- bzw. Patienten-Gruppen waren in der Expression von CTLA-4 ( $p=0,262$ ), PD-1 ( $p=0,263$ ) und CD127 ( $0,295$ ) nahezu gleich.

In Abbildung 26A und B sind repräsentative Punktdiagramme einer 55-jährigen Probandin dargestellt, die die Expression der Zytokine IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  nach Stimulation mit dem HSV-Lysat bzw. SEB darstellen. Das Expressionsprofil der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen von gesunden Probanden, sowie HD- und Tx-Patienten war mehrheitlich durch multifunktionelle Zellen gekennzeichnet, die in der Lage sind, alle drei analysierten Zytokine zu exprimieren (Abbildung 26C). Wie bereits zuvor bei der Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort gezeigt wurde (s. Abschnitt 6.1.1.2), exprimierten die SEB-reaktiven CD4 T-Zellen dieser Personen hingegen überwiegend das Zytokin TNF $\alpha$  alleine oder in Kombination mit IL-2 oder IFN $\gamma$  (Abbildung 26D). Bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen war die HSV-spezifische zelluläre Immunantwort durch einen signifikant höheren Anteil an ausschließlich TNF $\alpha$ -exprimierenden CD4 T-Zellen geprägt, während der Anteil der IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD4 T-Zellen gegenüber den HD-Patienten geringer war ( $p=0,0001$ , Abbildung 26C). Zudem waren die SEB-reaktiven Zellen mehrheitlich durch ausschließlich TNF $\alpha$ -exprimierende CD4 T-Zellen charakterisiert (Median 45,38%), die im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erhöht waren ( $p<0,0001$ ). Dadurch bedingt fiel der Anteil der übrigen Subgruppen in einigen Fällen signifikant niedriger aus. Bei den für die Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort eingeschlossenen Patienten (s. Tabelle 2) gab

es hingegen keine signifikanten Unterschiede im Anteil ausschließlich TNF $\alpha$ -exprimierender SEB-reaktiver CD4 T-Zellen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 26: Die Zytokinexpression HSV-spezifischer CD4 T-Zellen ist lediglich bei Patienten mit rheumatoiden Erkrankungen leicht verändert.** Dargestellt ist die Expression der Zytokine IFN $\gamma$ -, IL-2- und TNF $\alpha$  von HSV-spezifischen (oben) und *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B-reaktiven CD4 T-Zellen (SEB, unten). In (A) und (B) sind repräsentative Punktdiagramme der Zytokinexpression von CD4 T-Zellen einer immungesunden Probandin dargestellt. (C) und (D) Die CD4 T-Zellen wurden anhand der Expression der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  auf sieben Subgruppen aufgeteilt. Um eine hohe Aussagekraft der Statistik zu gewährleisten, wurden nur Proben berücksichtigt, bei denen mindestens 30 Zytokin-exprimierende CD4 T-Zellen nachgewiesen wurden (n=12 für Kontrollen, n=7 für HD, n=16 für Tx, n=9 für RD). Die Balken stellen den jeweiligen Anteil der Subgruppen der einfach, doppelt oder dreifach-Zytokin-exprimierenden Zellen an allen HSV-spezifischen bzw. SEB-reaktiven CD4 T-Zellen dar. Dabei sind die Werte als Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse wurde jeweils der One-Way Analysis of Variance Test mit dem Bonferroni Post-Test verwendet. Signifikanzen im Post-Test wurden mit Sternen angegeben (\* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ ). HD, Hämodialyse-Patient; HSV, Herpes-Simplex Virus; IFN, Interferon; IL, Interleukin; RD, Patient mit rheumatischer Erkrankung; TNF, Tumornekrosefaktor; Tx, Transplantat-Empfänger.

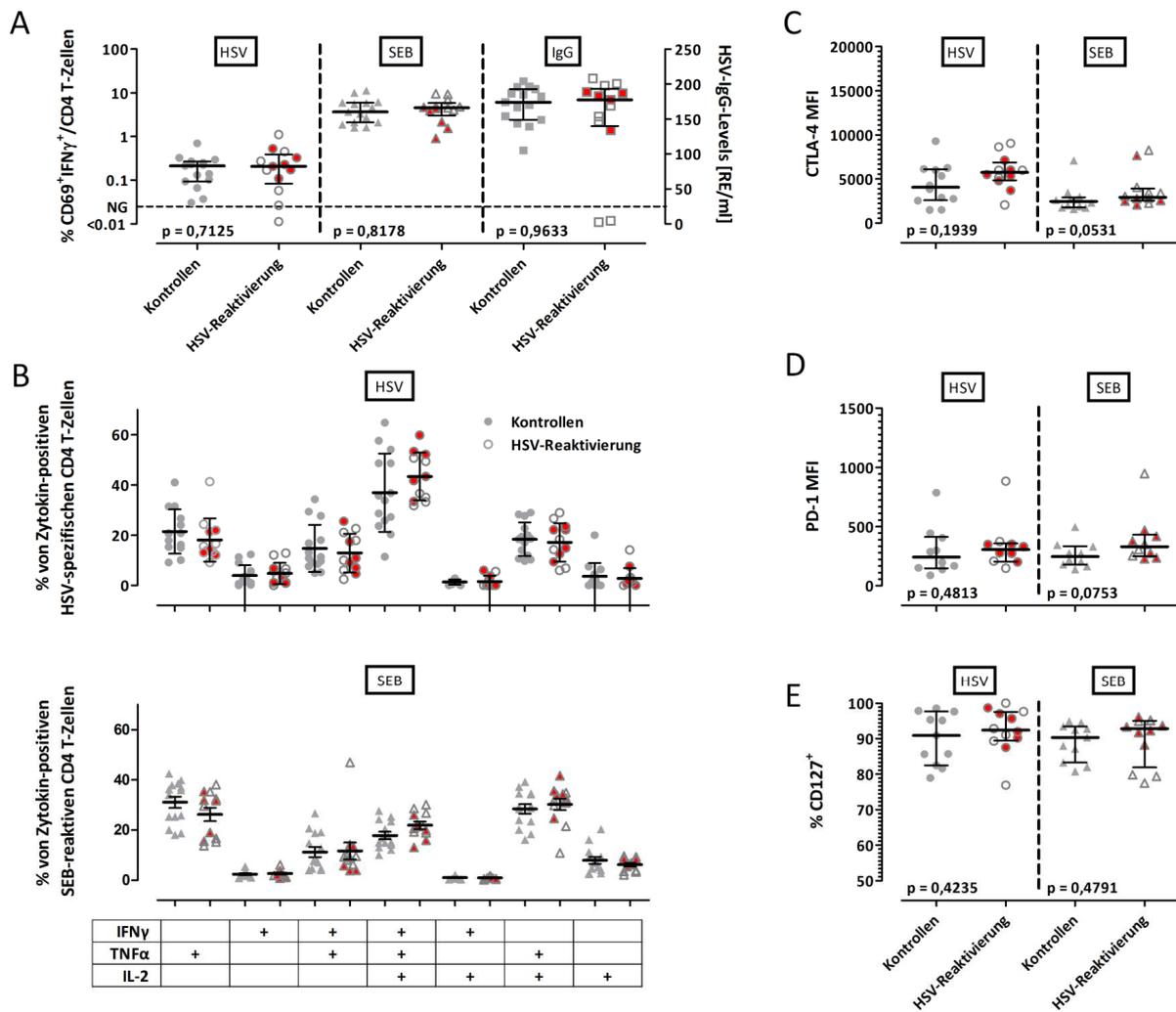
Trotz geringfügiger Unterschiede waren die Frequenz, der Phänotyp und die Funktionalität der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen zwischen den verschiedenen nicht-symptomatischen Probanden- und Patientengruppen wie erwartet sehr ähnlich. Lediglich die RD-Patienten zeigten sowohl bei der Expression der Oberflächenmoleküle als auch anhand ihres Zytokinprofils funktionelle Veränderungen bezogen auf die übrigen Personengruppen. Besonders bei der Expression der Zytokine fiel jedoch auf, dass dies kein HSV-spezifisches Phänomen zu sein schien, da auch die SEB-reaktiven Zellen die gleichen charakteristischen Veränderungen aufwiesen.

### ***6.2.3 Die Frequenz, die Zytokinexpression und der Phänotyp der HSV-spezifischen Immunantwort zeigen während einer akuten HSV-Reaktivierung keine charakteristischen Veränderungen***

Um immunologische Marker für eine akute HSV-Reaktivierung identifizieren zu können, wurde die HSV-spezifische Immunantwort von 13 Personen mit einer akuten HSV-Reaktivierung hinsichtlich ihrer Quantität und Funktionalität analysiert und mit den immunologischen Charakteristika der HSV-spezifischen Immunität einer Gruppe von 15 altersangepassten nicht-symptomatischen Kontroll-Probanden verglichen. Da die HSV-spezifischen CD4 T-Zellprofile von Tx-Patienten und Kontroll-Probanden keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (s. Abbildung 25 und 26), wurden in den folgenden Analysen 3 Tx-Patienten mit akuter HSV-Reaktivierung mit eingeschlossen (s. Tabelle 4, Patientencharakteristika). Die quantitative Bestimmung der humoralen und zellulären Immunantwort zeigte keine Unterschiede in den T-Zellfrequenzen und den HSV-IgG-Levels ( $p=0,7125$ ,  $p=0,8178$ ,  $p=0,9633$ , Abbildung 27A). Interessant war jedoch, dass 2 Personen trotz positiver HSV-PCR HSV-IgG-negativ waren und zudem geringe HSV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen aufwiesen. Da unklar war, ob es sich hierbei um HSV-Primärinfektionen handelte, oder nach einer früheren Primärinfektion lediglich keine HSV-spezifischen Antikörperlevels mehr nachweisbar waren, wurden diese beiden Patienten für die weiteren Analysen ausgeschlossen.

Auch das Zytokinprofil der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen der Personen mit akuter HSV-Reaktivierung wies keine Reaktivierungs-assoziierten Veränderungen auf und war somit auch mehrheitlich durch  $IFN\gamma^+IL-2^+TNF\alpha^+$  CD4 T-Zellen gekennzeichnet (Abbildung 27B). Wie erwartet war die Zytokinexpression der SEB-reaktiven Zellen von Personen mit und ohne HSV-Reaktivierung nahezu gleich.

In Abbildung 27C - E ist die Expression der Oberflächenmarker CTLA-4, PD-1 und CD127 auf den HSV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen von immungesunden Probanden und Personen mit akuter HSV-Reaktivierung dargestellt. Signifikante Unterschiede gab es jedoch auch bei der Analyse dieser Parameter nicht.



**Abbildung 27: Die HSV-spezifische Immunantwort von Personen mit akuter HSV-Reaktivierung zeigt keine signifikanten Veränderungen in der Quantität sowie der Funktionalität und dem Phänotyp.** Die HSV-spezifische Immunantwort von altersangepassten nicht-symptomatischen Probanden (n=15) und Personen mit akuter HSV-Reaktivierung (n=13) wurde hinsichtlich der Frequenz, der Zytokinexpression und der Expression von CTLA-4, PD-1 und CD127 vergleichend analysiert. Die Werte von Personen mit akutem Herpes Labialis sind durch rote Symbole markiert. **(A)** Die Diagramme zeigen die Frequenzen HSV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 T-Zellen sowie die HSV-IgG-Level der getesteten Personen. Die gepunktete horizontale Linie repräsentiert die Nachweisgrenze (NG). Die HSV-IgG-Level werden in relativen Einheiten pro Milliliter (RE/ml) angegeben. **(B)** HSV-spezifische (oben) oder SEB-reaktive CD4 T-Zellen (unten) sind anhand ihrer Expression der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  (in allen Proben in denen mindestens 30 Zytokin-exprimierende CD4 T-Zellen nachweisbar waren; n=14 für Kontroll-Probanden und n=12 für Patienten mit HSV-Reaktivierung) unterteilt. Die Zytokin-exprimierenden Zellen sind in Subpopulationen von einfach-, doppelt- und dreifach-Zytokin-exprimierenden Zellen eingeteilt. Die Querstriche geben dabei jeweils die Mittelwert und die Standardabweichung an. Die Expression der Oberflächenmoleküle CTLA-4 **(C)**, PD-1 **(D)** und CD127 **(E)** wurde jeweils auf den HSV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen aller Messungen mit mindestens 20 HSV-spezifischen CD4 T-Zellen analysiert (n=12 und 12 für CTLA-4, n=10 und 10 für PD-1, und n=11 und 12 für CD127 für Kontroll-Probanden und Patienten mit akuter HSV-Reaktivierung). Die CTLA-4- und PD1-Expression wird durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die Expression von CD127 wird anhand des prozentualen Anteils der CD127-positiven Zellen von allen IFN $\gamma$ -exprimierenden CD4 T-Zellen bestimmt. (A, C, D, E) Der jeweilige Median und der Interquartilsabstand sind mit Querstrichen markiert. Signifikante Unterschiede wurden in (A, C, D, E) unter Verwendung des Mann-Whitney Test und in (B) anhand des ungepaarten t-Tests ermittelt. CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten Antigen 4; HSV, Herpes-Simplex Viren; IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; IL, Interleukin; PD-1, „programmed death“ 1; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumornekrosefaktor.

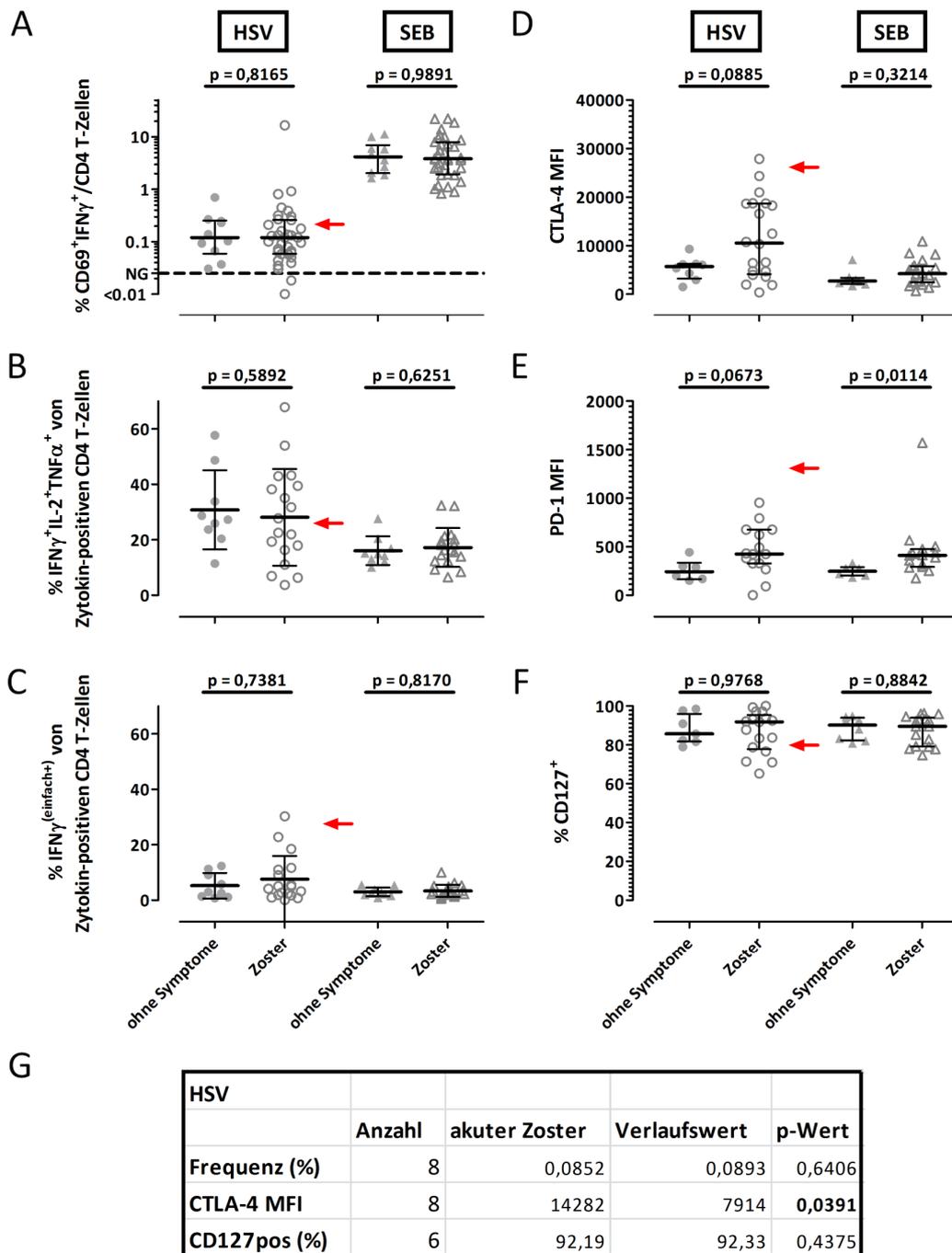
Da die hier analysierte Gruppe der Patienten mit akuter HSV-Reaktivierung unterschiedliche Manifestationen der HSV-Reaktivierung umfasste, wurden die Patienten mit akutem Herpes labialis in Abbildung 27 zusätzlich optisch hervorgehoben (rote Symbole) um festzustellen, ob sich die HSV-spezifische Immunantwort dieser Patienten von den übrigen symptomatischen Patienten oder den nicht-symptomatischen Kontroll-Probanden unterschied. Jedoch konnte weder bei der quantitativen noch der funktionellen Charakterisierung der HSV-spezifischen Zellen eine separate Gruppierung der immunologischen Parameter der HSV-spezifischen Immunantwort dieser Patienten beobachtet werden.

Insgesamt zeigten somit die immunologischen Marker keine Veränderungen, die mit einer akuten HSV-Reaktivierung im Allgemeinen oder einem akuten Herpes labialis im Speziellen assoziiert sind. Dies steht im Gegensatz zu den deutlichen Veränderungen, die bei der VZV-spezifischen Immunantwort bei Patienten mit Herpes Zoster zu beobachten waren.

#### ***6.2.4 Die HSV-spezifische Immunantwort wird bei einem akuten Herpes Zoster nur bei wenigen Personen beeinflusst***

Die beiden Herpesviren HSV-1 und HSV-2 sind nahe Verwandte des VZV und es ist bereits bekannt, dass es T-Lymphozyten gibt, die Kreuzreaktivität gegen sowohl HSV als auch VZV aufweisen (CHIU et al., 2014; OUWENDIJK et al., 2014; JING et al., 2016). Um zu analysieren, ob die Quantität und Qualität der HSV-spezifischen Immunantwort durch eine akute VZV-Reaktivierung beeinflusst werden kann, wurde bei 35 HSV-seropositiven Personen mit akutem Herpes Zoster untersucht, inwieweit auch die HSV-spezifische Immunantwort typische Veränderungen aufweist. Als Kontrollgruppe diente hierbei eine altersangepasste Gruppe aus 10 HSV- und VZV-seropositiven Probanden ohne akute VZV-Symptomatik. Die Personencharakteristika sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Die Ergebnisse der quantitativen und funktionellen Charakterisierung der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen von Personen ohne und mit akutem Herpes Zoster sind in Abbildung 28 dargestellt. Die jeweiligen Mediane bzw. Mittelwerte der VZV-spezifischen Immunantwort dieser Zoster-Patienten, die eine Subgruppe von den in Abschnitt 6.1.1.4 analysierten Patienten darstellen, sind durch rote Pfeile markiert, um mögliche Veränderungen der HSV-spezifischen Immunantwort hin zu einem Zoster-assoziierten Phänotyp besser identifizieren zu können.



**Abbildung 28:** Während eines akuten Herpes Zoster ist die HSV-spezifische CTLA-4- und PD-1-Expression bei einem Teil der Personen erhöht, wohingegen die übrigen immunologischen Marker nicht verändert sind. Es werden jeweils VZV- und HSV-seropositive nicht-symptomatische immungesunde Probanden (n=10) mit gleichaltrigen Zoster-Patienten (n=35) verglichen. Die roten Pfeile markieren jeweils den Median bzw. Mittelwert der untersuchten Parameter VZV-spezifischer CD4 T-Zellen der Zoster-Patienten. **(A)** Die Diagramme zeigen die HSV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen (CD69<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) an. Die Nachweisgrenze (NG) ist durch eine gepunktete Linie dargestellt. Vergleichend wurde zudem der jeweilige Anteil der ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierenden **(B)** und der multifunktionellen CD4 T-Zellen (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>) **(C)** in allen Proben, in denen mindestens 30 Zytokin-exprimierende CD4 T-Zellen nachweisbar waren analysiert (n=9 für nicht-symptomatische Personen bzw. n=18 für Personen mit VZV-Reaktivierung). Die Werte sind dabei jeweils als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung angegeben (Querstriche). Die Expression von CTLA-4, CD127 und PD-1 auf HSV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen aller Personen mit mindestens 20 HSV-spezifischen CD4 T-Zellen sind in **(D-F)** dargestellt (n=8 und 20 für CTLA-4, n=8 und 17 für CD127, und n=6 und 15 für PD-1 für nicht-symptomatische Personen bzw. Personen mit akuter VZV-Reaktivierung). Die CTLA-4- und

PD-1-Expression wird durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die Expression von CD127 wird anhand des prozentualen Anteils der CD127-positiven Zellen von allen IFN $\gamma$ -exprimierenden CD4 T-Zellen bestimmt. In (A, D, E, F) geben die Querstriche jeweils den Median und den Interquartilsabstand an. **(G)** Dargestellt sind die medianen Werte der HSV-spezifischen T-Zellfrequenz, CTLA-4- und CD127-Expression von 8 Zoster-Patienten während und mehr als 3 Monate nach einem akuten Zoster. Signifikante Unterschiede wurden in (A, D, E, F) unter Verwendung des Mann-Whitney Test und in (B, C) anhand des ungepaarten t-Tests ermittelt. Die Analyse der gepaarten Daten (G) wurde mit dem Wilcoxon Test durchgeführt. CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten Antigen 4; HSV, Herpes-Simplex Virus; IFN, Interferon; IL, Interleukin; PD-1, „programmed death“ 1; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumornekrosefaktor.

Die medianen Frequenzen der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen von Personen ohne und mit akuter VZV-Reaktivierung waren nahezu identisch ( $p=0,8165$ ) und lagen unterhalb der Frequenz VZV-spezifischer CD4 T-Zellen während einer akuten VZV-Reaktivierung (Abbildung 28A). Die SEB-reaktiven CD4 T-Zellen waren in den beiden Gruppen ebenfalls gleich. Da es während eines akuten Herpes Zosters typischerweise zum Verlust multifunktionaler VZV-spezifischer CD4 T-Zellen bei gleichzeitigem Anstieg der ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierenden VZV-spezifischen CD4 T-Zellen kommt (s. Abschnitt 6.1.1.4), lag der Fokus der Analyse der HSV-spezifischen Zytokinexpression auf diesen beiden Subpopulationen. Das Ergebnis zeigte jedoch eindeutig, dass es bei den HSV-spezifischen CD4 T-Zellen nicht zu generellen Zoster-assoziierten Veränderungen der Zytokinexpression kommt und insbesondere der Anteil der ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierenden T-Zellen mit 7,56% gering blieb (Abbildung 28B und C). Zudem konnte auch bei der Analyse der übrigen Subgruppen Zytokin-exprimierender HSV-spezifischer CD4 T-Zellen keine Veränderungen zwischen den Personen mit und ohne Zoster identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Das Zytokinexpressionsprofil SEB-reaktiver CD4 T-Zellen war während eines akuten Zosters ebenfalls unverändert.

In der Expression der Oberflächenmoleküle auf HSV-spezifischen CD4 T-Zellen konnten insgesamt ebenfalls keine Unterschiede mit statistischer Signifikanz zwischen der Gruppe der nicht symptomatischen Probanden und der Gruppe der Personen mit akutem VZV-Infektgeschehen nachgewiesen werden (Abbildung 28D - F). Dennoch fiel bei einem Teil der Personen mit akutem Herpes Zoster auf, dass auch bei den HSV-spezifischen CD4 T-Zellen Veränderungen in der Expression dieser Oberflächenmoleküle auftraten, wie sie bereits bei den VZV-spezifischen Zellen dieser Personen beobachtet werden konnten. So konnte bei diesen Personen eine erhöhte CTLA-4- und PD-1-Expression der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen gemessen werden. Allerdings konnten auch bei den SEB-reaktiven CD4 T-Zellen eine leicht erhöhte CTLA-4- und PD-1-Expression nachgewiesen werden, wobei die

Veränderungen im Vergleich zu der HSV-spezifischen Immunantwort bei CTLA-4 schwächer und bei PD-1 stärker ausgeprägt waren.

Von 8 der Zoster-Patienten konnte mehr als 3 Monate nach der akuten VZV-Reaktivierung eine erneute Analyse der HSV-spezifischen Immunantwort durchgeführt werden (Abbildung 28G). Aufgrund der geringen Personenzahl und der teilweise geringen Anzahl HSV-spezifischer CD4 T-Zellen konnte nicht von allen Parametern eine Verlaufsmessung mit statistischer Aussagekraft durchgeführt werden. Während die Frequenz, die HSV-IgG-Levels und die CD127-Expression keine Veränderungen zu den Werten während der akuten VZV-Reaktivierung zeigten, konnte auf den HSV-spezifischen CD4 T-Zellen ein deutlicher Rückgang der CTLA-4-Expression nachgewiesen werden, wie er zuvor für die VZV-spezifischen T-Zellen beschrieben wurde ( $p=0,0391$ ).

Insgesamt zeigte sich somit, dass es während eines akuten VZV-Infektes zu keiner generellen Veränderung des Phänotyps und der Funktionalität der HSV-spezifischen Immunität zu kommen scheint. Dennoch geben die Analysen Hinweise darauf, dass bei vereinzelt Personen insbesondere die Expression von CTLA-4 auf den HSV-spezifischen CD4 T-Zellen durch eine VZV-Reaktivierung beeinflusst werden kann, was möglicherweise durch eine Kreuzreaktivität dieser CD4 T-Zellen zwischen VZV und HSV verursacht werden könnte.

### **6.3 Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten**

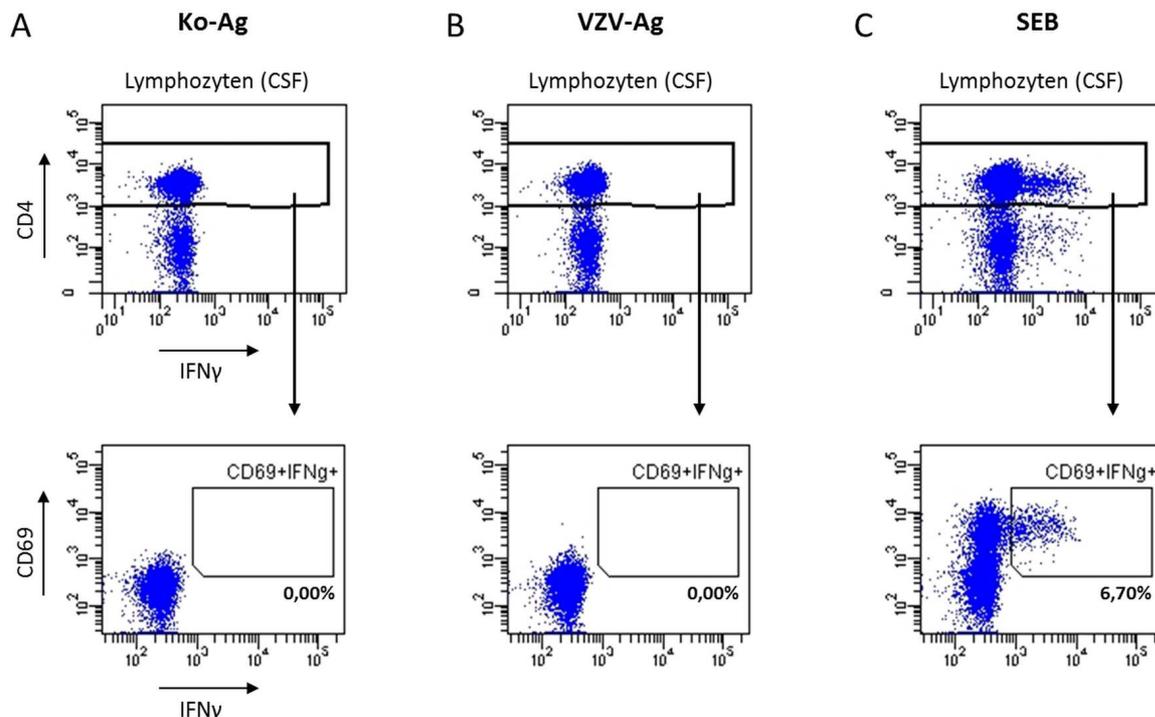
#### ***6.3.1 Entwicklung eines neuen Analyseverfahren zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen aus Cerebrospinalflüssigkeit***

Der indirekte immunbasierte Erregernachweis im Blut wird häufig dann angewandt, wenn der direkte Erregernachweis oder die Anamnese nicht oder nur eingeschränkt möglich sind und eine systemische Reaktion vorliegt. Je nach Erreger und Infektionsort können solche systemischen Immunreaktionen ausbleiben, sodass die Analyse von Immunzellen am Infektionsort eine vielversprechende Alternative bietet. Um die häufig am Ort der Infektion angereicherten Immunzellen nachweisen zu können, werden diese aus extrasanguinen Flüssigkeiten isoliert, die direkt vom Infektionsort stammen. Unter anderem aufgrund der häufig geringen Immunzellzahl in diesen extrasanguinen Flüssigkeiten sind die derzeit bestehenden Methoden für die Quantifizierung und Charakterisierung dieser Zellen nicht optimal. Im folgenden Experiment wird am Beispiel der Cerebrospinalflüssigkeit (Liquor, CSF)

von Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen die Entwicklung eines neuen immunbasierten Analyseverfahrens zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten veranschaulicht.

### 6.3.1.1 Isolierte Immunzellen aus CSF einer Patientin mit VZV-bedingter ZNS-Erkrankung können nicht effektiv Antigen-spezifisch stimuliert werden

Um zu analysieren, ob Immunzellen aus CSF Antigen-spezifisch stimuliert werden können, wurden die Immunzellen aus CSF einer Patientin mit akuter VZV-bedingter Meningoneuritis isoliert und anschließend Antigen-spezifisch stimuliert. In Abbildung 29 sind die Punktdiagramme der in der CSF enthaltenen Lymphozyten mit den jeweiligen Antigen-spezifischen CD4 T-Zellen nach Stimulation mit dem Kontroll-Antigen (Negativkontrolle), dem VZV-Antigen und dem polyklonalen Stimulus SEB (Positivkontrolle) dargestellt.



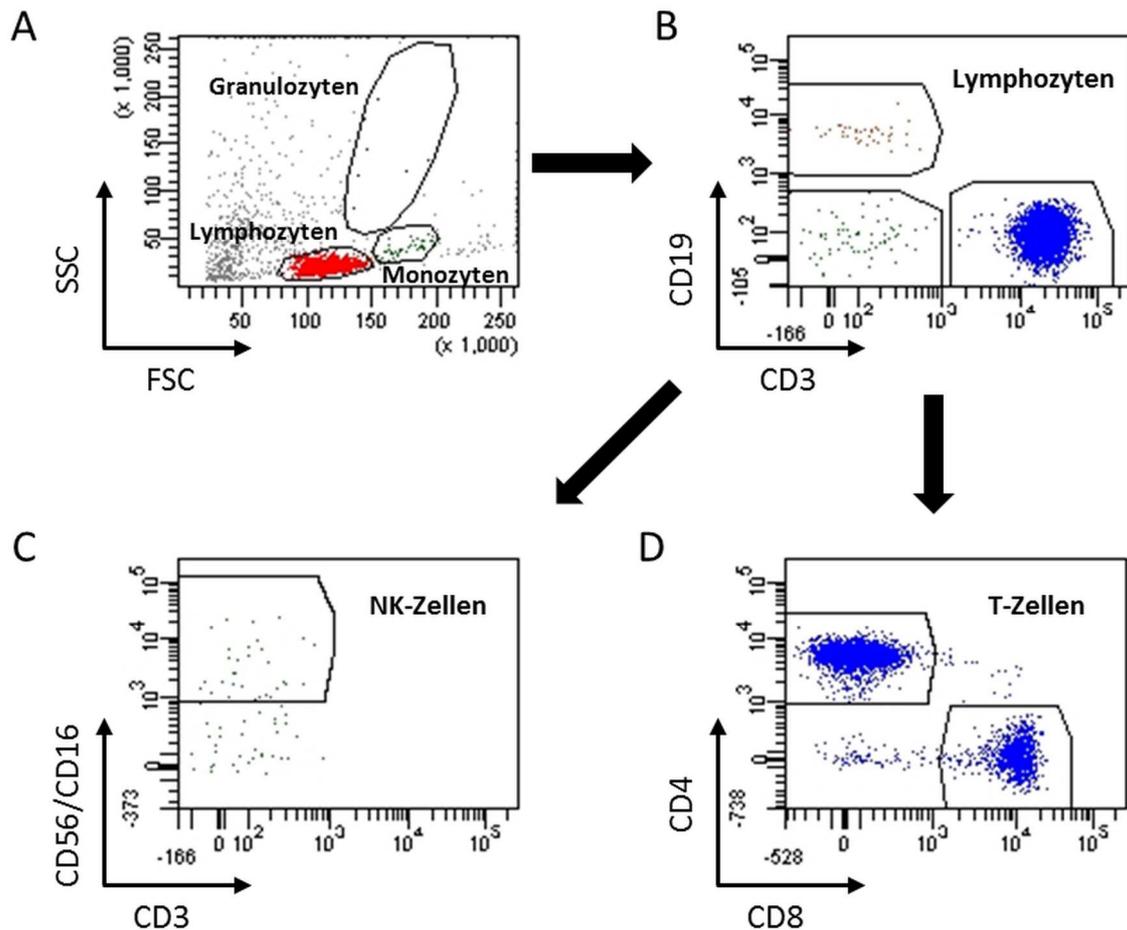
**Abbildung 29: Kein Nachweis Erreger-spezifischer T-Zellen bei alleiniger Stimulation von CSF-Immunzellen.** Aus der CSF isolierte Immunzellen einer Patientin mit VZV-Meningoneuritis wurden mit dem Kontroll-Antigen (Ko-Ag, Negativkontrolle) (A), mit dem Varizella-Zoster-Virus-Antigen (VZV-Ag) (B) und dem polyklonalen Stimulus SEB (Positivkontrolle, C) stimuliert. Die durchflusszytometrisch identifizierten CD4 T-Zellen (umgrenzter Bereich, jeweils oben) wurden hinsichtlich der Frequenz reaktiver (CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) CD4 T-Zellen (umgrenzter Bereich, Prozentzahlen jeweils unten) analysiert. CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; IFN, Interferon; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B. Abbildung reproduziert aus Patentschrift zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015b).

Erwartungsgemäß wurden nach Stimulation mit dem Kontroll-Antigen keine Antigen-spezifischen Immunzellen detektiert (0,00%, Abbildung 29A). Nach Stimulation mit SEB

zeigten hingegen 6,70% der CD4 T-Zellen eine Ko-Expression des Aktivierungsmarker CD69 und des Zytokins IFN $\gamma$  (Abbildung 29C). Folglich waren die Zellen grundsätzlich in der Lage, nach einer polyklonalen Stimulation zu reagieren. Allerdings konnten nach der Stimulation mit dem VZV-Antigen jedoch keine VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nachgewiesen werden (0,00%, Abbildung 29B).

Da für eine erfolgreiche Antigen-spezifische Stimulation neben den zu stimulierenden T-Zellen auch Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) notwendig sind, wurde eine Subtypen-Analyse der aus der CSF der Patientin isolierten Immunzellen durchgeführt, um die darin enthaltenen Immunzelltypen zu identifizieren. Dabei wurden die Immunzellen durchflusszytometrisch anhand der Größe und Granularität sowie durch die Markierung charakteristischer Oberflächenmarker mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern analysiert und eingeteilt (Abbildung 30). Die CSF-Immunzellen waren mehrheitlich der T-Lymphozyten-Population zuzuordnen (98,51%), was sich deutlich von der typischerweise im Blut vorliegenden Verteilung unterscheidet. Der Anteil der APCs, zu denen Monozyten und B-Zellen gehören, war hingegen sehr gering, wobei die Identifizierung der Monozyten anhand des SSC- und FSC-Signals aufgrund dieser geringen Zellzahlen erschwert war.

Die Analyse einer zweiten CSF-Probe eines Patienten mit VZV-Meningoenzephalitis offenbarte ebenfalls eine sehr niedrige APC-Zellzahl, während die überwiegende Mehrheit der Zellen T-Lymphozyten waren. Da bei diesem Patienten ebenfalls keine VZV-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt), könnte die geringe Menge an APCs bei Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen ein Faktor sein, der eine effektive Antigen-spezifische Stimulation verhindert.

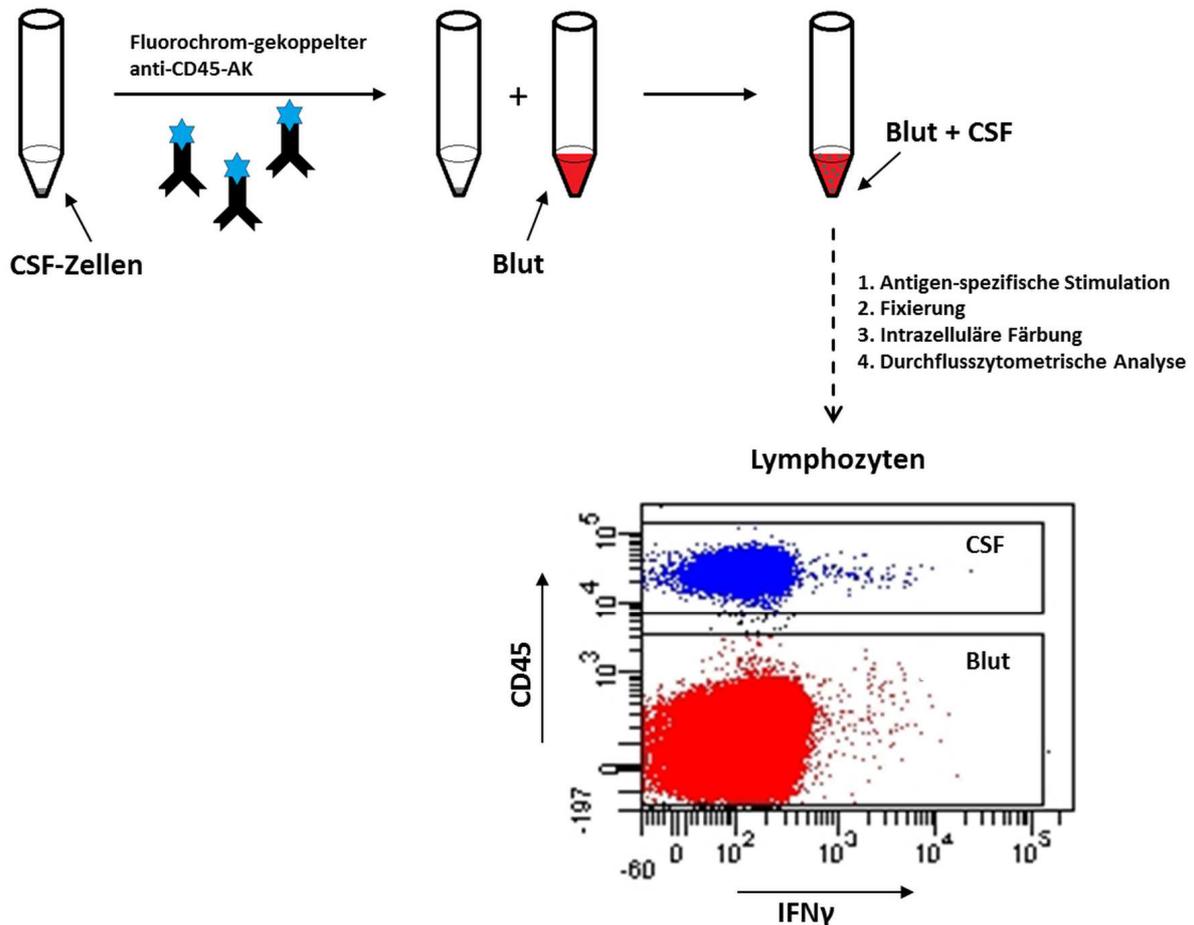


**Abbildung 30:** Die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellsubtypen in CSF einer Patientin mit VZV-bedingter Meningoneuritis offenbarte hohe T-Zellzahlen aber nur eine geringe Anzahl APCs (B-Zellen und Monozyten). (A) Die CSF-Immunzellen werden aufgrund ihrer Größe (FSC-Signal) und Granularität (SSC-Signal) in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterteilt. (B) Die Lymphozyten wurden anschließend anhand ihres CD3 und CD19 Signals in B-Zellen ( $CD3^+CD19^+$ ) und T-Zellen ( $CD3^+CD19^-$ ) sowie  $CD19^+CD3^-$  Lymphozyten unterteilt. (C) Letztgenannte sind zum Teil NK-Zellen ( $CD56/CD16^+CD3^-$ ). (D) Die  $CD3^+$ -positiven Immunzellen wurden in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen unterteilt. APCs, Antigen-präsentierende Zellen; CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; FSC, Vorwärtsstreulicht; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; SSC, Seitwärtsstreulicht; VZV, Varizella-Zoster Virus.

### 6.3.1.2 Isolierte und Fluorochrom-markierte Immunzellen der CSF werden mit Blut koinkubiert, um eine effektive Antigen-spezifische Stimulation zu ermöglichen

Um unter anderem eine ausreichende Anzahl Antigen-präsentierender Immunzellen während der Stimulation zu gewährleisten und somit einen potentiellen limitierenden Faktor außer Kraft zu setzen, wurden die isolierten CSF-Immunzellen während der Stimulation mit Blut derselben Patientin (VZV-Meningoneuritis) ko-inkubiert. Um die Immunzellen aus CSF und aus Blut bei der anschließenden durchflusszytometrischen Messung diskriminieren zu können, wurden die isolierten CSF-Immunzellen vor der Ko-Inkubation mit Blut mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen den Leukozyten-Oberflächenmarker CD45 markiert (Abbildung 31). Nach der simultanen Stimulation und Fixierung der Zellen wurden

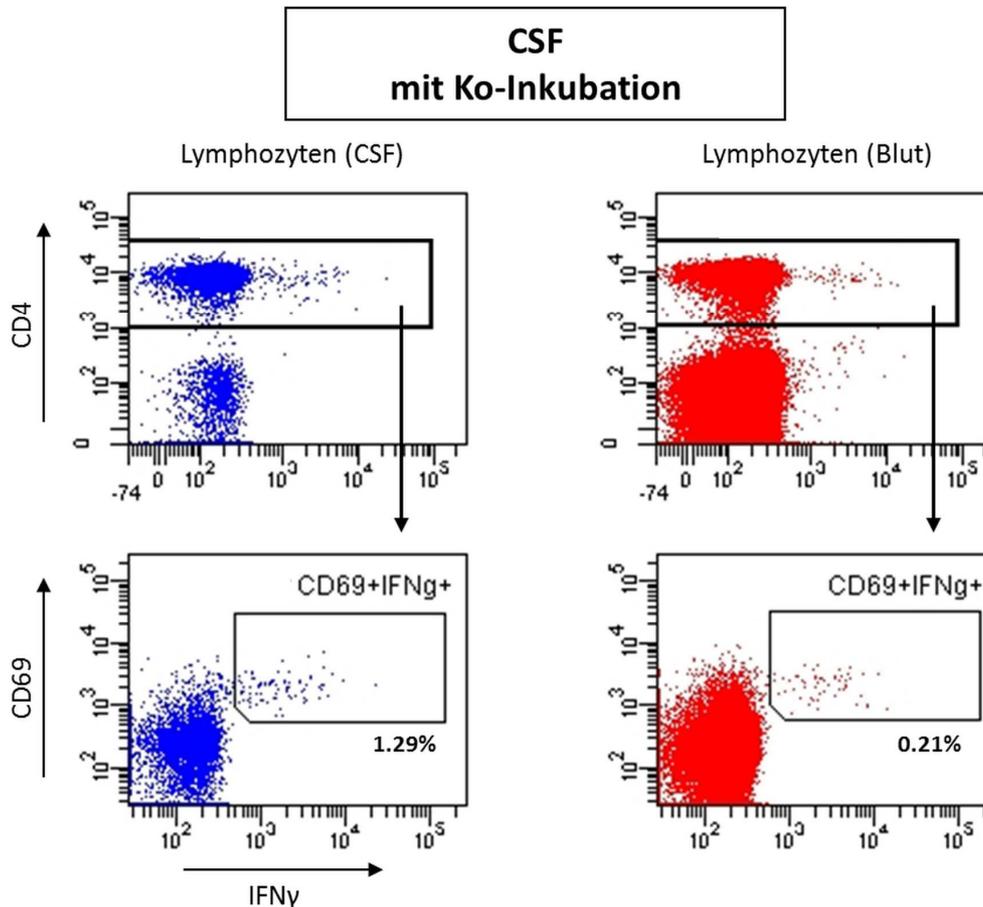
mit Fluorchrom-markierten Antikörpern Oberflächenmarker (CD4, CD69, CTLA-4) und Zytokine (IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ ) von Interesse angefärbt und abschließend durchflusszytometrisch analysiert. Der detaillierte Ablauf der neu entwickelten Methode ist in Abschnitt 5.4 beschrieben.



**Abbildung 31:** Die Markierung der CSF-Immunezellen mit Fluorchrom-gekoppelten anti-CD45 Antikörpern ermöglicht nach der simultanen Stimulation mit Blut die Diskriminierung reaktiver Immunezellen aus CSF und Blut. Dargestellt ist das simultane Stimulationsverfahren mit Fokus auf der Markierung von Immunezellen aus CSF mit Fluorchrom-gekoppelten Antikörpern. Dabei werden isolierte CSF-Immunezellen mit Fluorchrom-gekoppelten anti-CD45-Antikörpern markiert und anschließend in Anwesenheit von Blut Antigen-spezifisch stimuliert. Nach der Fixierung der Zellen und der intrazellulären Färbung werden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert, wobei CSF-Immunezellen (blau) anhand des Fluoreszenzsignals des anti-CD45-Antikörpers von Immunezellen aus dem Blut (rot) unterschieden werden können (siehe Punktdiagramm, rechts). AK, Antikörper; CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; IFN, Interferon.

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der VZV-spezifischen Stimulation von CSF-Zellen mit Ko-Inkubation mit Blut derselben Patientin (mit akuter VZV-bedingter Meningoneuritis) dargestellt. Während die Stimulation mit dem VZV-Antigen ohne Ko-Inkubation mit Blut keine spezifische Aktivierung von CSF-Immunezellen hervorrief (s. Abbildung 29), konnte nach simultaner Stimulation von CSF-Immunezellen und Blut eine VZV-spezifische CD4

T-Zellfrequenz von 1,29% der CSF-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 32). Zudem konnte durch die simultane Stimulation in derselben Messung gleichzeitig die VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz im Blut detektiert werden, die mit 0,21% deutlich geringer war als bei den CSF-Immunezellen. Dies lässt auf eine Anreicherung von VZV-spezifischen CD4 T-Zellen in der CSF im Vergleich zum Blut schließen.



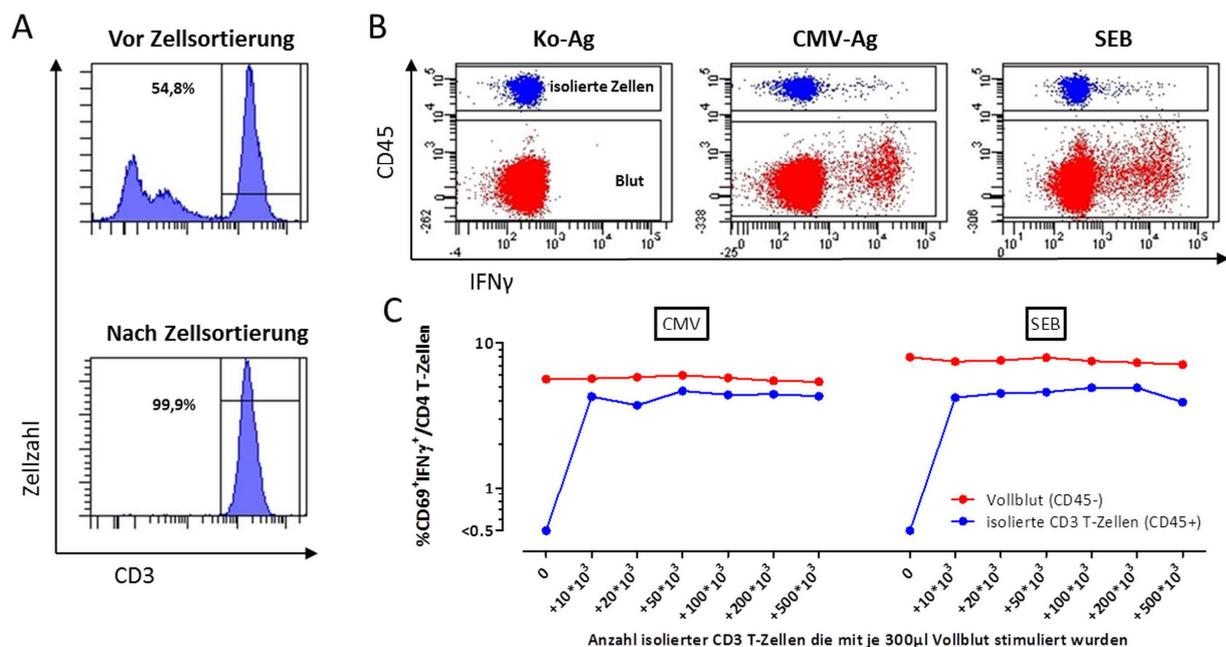
**Abbildung 32: Die Stimulation von CSF-Immunezellen in Anwesenheit von Blut ermöglicht den Nachweis VZV-spezifischer Immunezellen aus CSF.** Dargestellt sind die aus einer simultanen Stimulationsreaktion identifizierten Immunezellen aus CSF (blau) und aus Blut (rot), die hinsichtlich reaktiver ( $CD69^+IFN\gamma^+$ ) CD4 T-Zellen analysiert wurden. Die Prozentzahlen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil  $CD69^+IFN\gamma^+$  Zellen an allen CD4 T-Zellen. CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; IFN, Interferon; VZV, Varizella-Zoster Virus. Abbildung reproduziert aus Patentschrift zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015b).

Insgesamt wurde ein neues methodisches Prinzip etabliert, das durch die simultane Stimulation mit Blut den Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen aus CSF erst ermöglicht und potentiell limitierende Faktoren wie das Fehlen von APCs kompensieren kann.

### 6.3.2 Kontrollexperimente zur Validierung des Analyseverfahrens zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten

#### 6.3.2.1 Die Frequenz Antigen-spezifischer und polyklonal stimulierter CD4 T-Zellen bleibt bei Zugabe von unterschiedlichen Mengen an vorgefärbten Zellen konstant

Im nachfolgenden Validierungsschritt wurde überprüft, ob die Anzahl der extrasanguinen Immunzellen, die zum Blut zugegeben werden, einen Einfluss auf die Antigen-spezifische Stimulation bzw. auf die ermittelte polyklonale CD4 T-Zellfrequenz hat. Dazu wurden unter Verwendung der durchflusszytometrischen Zellsortierung vitale T-Zellen ( $CD3^+$ ) aus den PBMCs eines CMV-seropositiven immungesunden Probanden isoliert, die in der nachfolgenden Analyse die isolierten Immunzellen einer extrasanguinen Flüssigkeit simulieren.



**Abbildung 33: Die nachweisbare CMV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz bleibt bei unterschiedlichen Ausgangszahlen an vorgefärbten CD3 T-Zellen konstant.** (A) Dargestellt ist der Anteil von T-Zellen ( $CD3^+$ ) vor und nach der durchflusszytometrischen Zellsortierung von PBMCs eines immungesunden Probanden. (B) Dargestellt sind Punktdiagramme von CD4 T-Zellen nach simultaner Stimulation von jeweils 20.000 isolierten und vorgefärbten CD3 T-Zellen ( $CD45^+$ , blau) und Blut ( $CD45^+$ , rot), jeweils mit dem Kontroll-Antigen (Ko-Ag), dem CMV-Antigen (CMV-Ag) und dem polyklonalen Stimulus *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB). Die CD4 T-Zellen sind dabei nach dem CD45- und IFN $\gamma$ -Signal aufgetrennt. (C) Die CMV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen ( $CD69^+IFN\gamma^+$ ) von unterschiedlichen Ausgangszahlen vorgefärbter T-Zellen und ungefärbten Blutzellen sind dargestellt. CMV, Cytomegalievirus; IFN, Interferon.

Die durch Sortierung erzielte Reinheit der isolierten T-Zellpopulation betrug 99,9% (Abbildung 33A). Nach der Regeneration der T-Zellen über Nacht im Brutschrank wurden die isolierten T-Zellen mit einem Antikörper gegen CD45 vorgefärbt und in unterschiedlichen

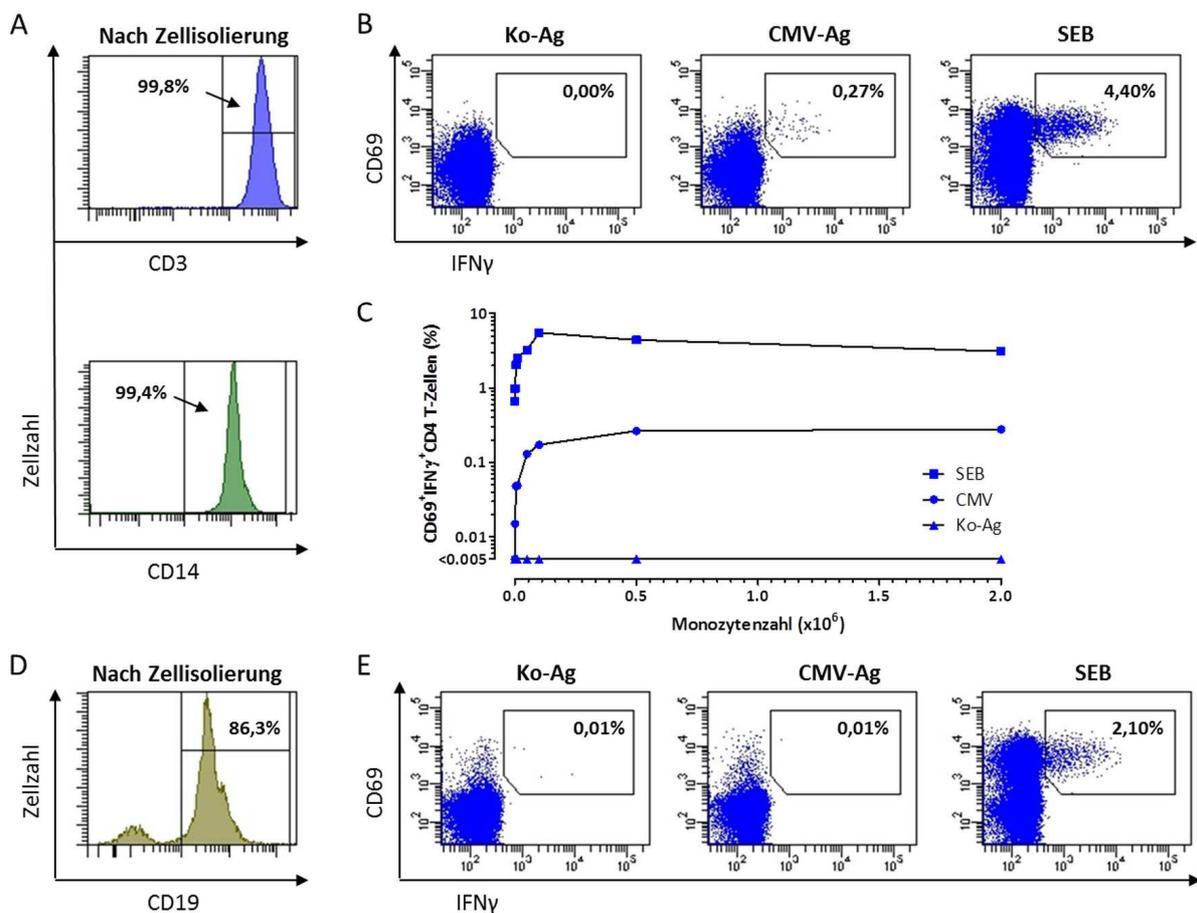
Mengen (0-500.000 T-Zellen) mit je 300µl Vollblut desselben Probanden vermengt und stimuliert. In Abbildung 33B sind exemplarisch die Ergebnisse der Stimulationen mit dem Kontroll-Antigen, dem CMV-Lysat und der Positivkontrolle SEB nach Zugabe von 20.000 vorgefärbten T-Zellen dargestellt. Dabei wurden die dargestellten CD4 T-Zellen anhand ihres CD45- und IFN $\gamma$ -Signals aufgetrennt. Das Ergebnis der Analyse mit unterschiedlichen Mengen an vorgefärbten CD3 T-Zellen zeigte, dass die Frequenzen CMV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 T-Zellen der vorgefärbten (isolierte T-Zellen, blau) und ungefärbten Population (Blut, rot) bei den hier verwendeten Zellzahlen konstant blieben (Abbildung 33C). Lediglich nach Zugabe von 500.000 vorgefärbten T-Zellen konnten geringfügig geringere Frequenzen SEB-reaktiver CD4 T-Zellen gemessen werden. Darüber hinaus ist zu vermerken, dass die durch CMV und SEB hervorgerufenen Reaktivitäten bei den zuvor durchflusszytometrisch isolierten T-Zellen etwas schwächer ausfielen, als dies bei den aus Vollblut stimulierten Immunzellen der Fall war.

#### **6.3.2.2 Monozyten, aber nicht B-Zellen, sind für die Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen von entscheidender Bedeutung**

Nachfolgend sollte überprüft werden, welche Immunzellen für eine erfolgreiche Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen von Bedeutung sind und somit bei Abwesenheit einen limitierenden Faktor für die bisherigen *in vitro* Stimulationsverfahren von T-Zellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten darstellen könnten.

Um den Einfluss von Monozyten auf die Induktion einer CMV-spezifischen Immunantwort zu analysieren, wurden konstante Mengen durchflusszytometrisch isolierter T-Zellen (100.000 T-Zellen pro Ansatz) mit unterschiedlichen Mengen magnetisch isolierter Monozyten und dem CMV-Lysat, bzw. der entsprechenden Negativ- und Positivkontrolle stimuliert (Abbildung 34). Die Reinheit der beiden dafür isolierten Zellpopulationen ist in Abbildung 34A dargestellt. Zu beachten ist hierbei, dass alle Immunzellen aus Blutproben desselben Probanden isoliert wurden, um eine Übereinstimmung der HLA-Moleküle und Kompatibilität der T-Zell-Rezeptoren zu gewährleisten. In Abbildung 34B sind beispielhaft die Punktdiagramme einer Stimulation von isolierten T-Zellen nach Zugabe von 500.000 Monozyten dargestellt. Die Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an Monozyten zeigten, dass ohne Zugabe von Monozyten keine CMV-spezifische CD4 T-Zellantwort induziert wurde (Abbildung 34C). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass bereits bei

Zugabe von geringen Mengen an Monozyten eine geringe CMV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz detektiert werden konnte, die mit zunehmender Monozytenzahl anstieg, bis ein Maximum von 0,25% CMV-spezifischer CD4 T-Zellen erreicht wurde. Die Frequenz SEB-reaktiver CD4 T-Zellen stieg ebenfalls mit zunehmender Monozytenzahl an, wobei bei der höchsten Konzentration eine leicht geringere Frequenz SEB-reaktiver CD4 T-Zellen gemessen wurde. Interessanterweise konnten jedoch auch in Abwesenheit der Monozyten durch SEB T-Zellen polyklonal stimuliert werden, wenngleich die Frequenz mit 0,66% deutlich geringer war, als dies in Anwesenheit von Monozyten der Fall war.



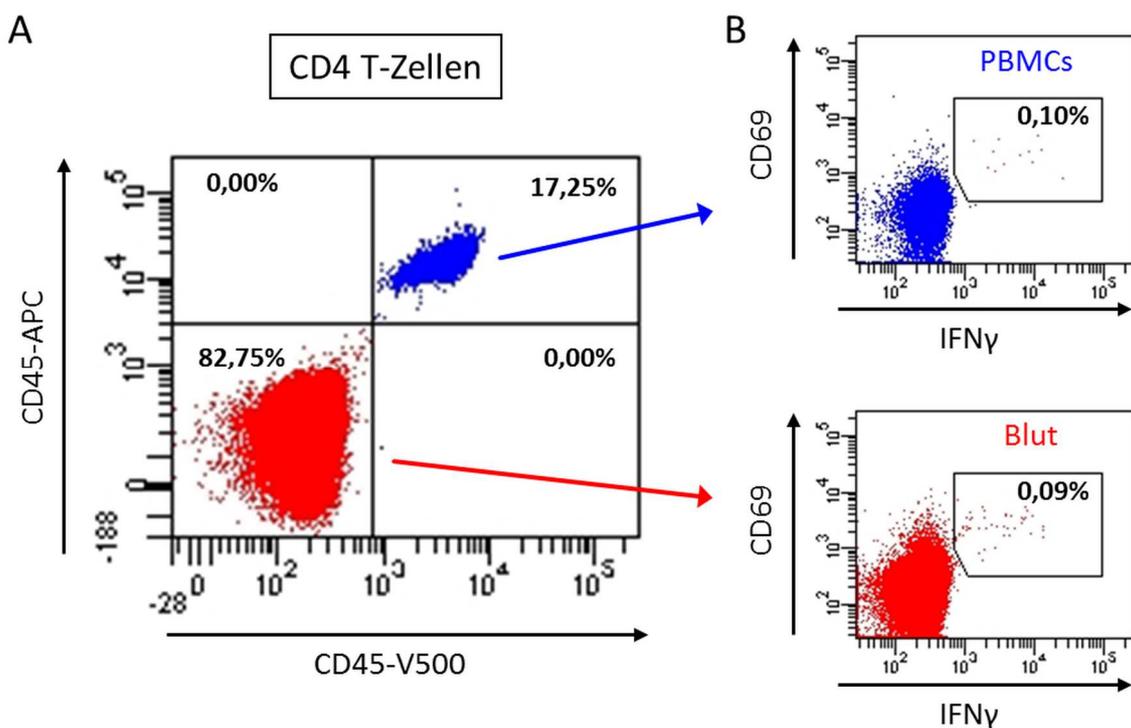
**Abbildung 34: CMV-spezifische T-Zellen können in Anwesenheit von Monozyten, aber nicht von B-Zellen stimuliert werden.** Durchflusszytometrisch isolierte CD3 T-Zellen wurden in Anwesenheit von Monozyten oder B-Zellen stimuliert. **(A)** Reinheit des T-Zell- (blau) und Monozyten-Isolats (grün). **(B)** Repräsentative Punktdiagramme von CD4 T-Zellen nach Stimulation von je 100.000 T-Zellen mit dem Kontroll-Antigen (Ko-Ag), dem CMV-Antigen (CMV-Ag) und dem polyklonalen Stimulus *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) in Anwesenheit von je 500.000 Monozyten. Die Prozentzahlen geben jeweils die Frequenz reaktiver ( $CD69^+IFN\gamma^+$ ) CD4 T-Zellen an allen CD4 T-Zellen an. **(C)** Frequenzen reaktiver CD4 T-Zellen nach Stimulation von je 100.000 T-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an Monozyten. **(D)** Punktdiagramme von CD4 T-Zellen nach Stimulation von je 100.000 T-Zellen mit dem Ko-Ag, dem CMV-Ag und SEB in Anwesenheit von je 200.000 Zellen des B-Zellisolats. Die Prozentzahlen geben jeweils die Frequenz reaktiver ( $CD69^+IFN\gamma^+$ ) CD4 T-Zellen an allen CD4 T-Zellen an. CMV, Cytomegalievirus; IFN, Interferon.

Neben Monozyten können auch B-Zellen Antigene präsentieren, wenngleich diese hauptsächlich über Antikörper-vermittelte Endozytose exogener Antigene initiiert wird. Um zu untersuchen, ob sich CMV-spezifische T-Zellen auch aus isolierten T-Zellen unter alleiniger Zugabe von B-Zellen und einem CMV-Lysat stimulieren lassen, wurden zusätzlich vitale B-Zellen durchflusszytometrisch isoliert (Abbildung 34D). Mit 86,3% CD19-positiver Zellen war das verwendete B-Zellisolat weniger rein als das T-Zell- und Monozytenisolat. Allerdings waren neben den B-Zellen hauptsächlich NK-Zellen in dem Isolat enthalten, während der Anteil der Monozyten und T-Zellen jeweils nur 0,5% betrug. Nach Regeneration der B- und T-Zellisolate über Nacht im Brutschrank wurden jeweils 100.000 T-Zellen mit 200.000 Zellen des B-Zellisolats stimuliert. Das in Abbildung 34E dargestellte Ergebnis der abschließenden durchflusszytometrischen Analyse zeigt, dass B-Zellen das CMV-Lysat vermutlich nicht so prozessieren und präsentieren konnten, dass eine nachweisbare CMV-spezifische CD4 T-Zellantwort induziert wurde. Lediglich nach Stimulation mit dem polyklonalen Stimulus SEB konnten reaktive Zellen identifiziert werden, da für die stimulatorische Wirkung von SEB keine Prozessierung und Präsentation notwendig ist. Insgesamt scheint somit für eine effiziente Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen *in vitro* die Anwesenheit von Monozyten erforderlich zu sein, wohingegen B-Zellen allein keine Antigen-spezifische Reaktion der CD4 T-Zellen induzieren konnten.

#### **6.3.2.3 Zur Vorfärbung verwendete Antikörper werden während der Stimulation nicht auf ungefärbte Blutzellen übertragen**

Da bei dem neuen Analyseverfahren zum Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten und Blut ausschließlich die Immunzellen aus der extrasanguinen Flüssigkeit vorgefärbt werden, ist es von entscheidender Bedeutung, dass während der nachfolgenden Ko-Inkubation keine Fluorochrom-gekoppelten Antikörper dissoziieren und auf die ungefärbten Immunzellen des Blutes übertragen werden. Um die Stabilität der Fluorochrom-Markierung während der Antigen-spezifischen Stimulation zu überprüfen, wurden PBMCs einer 24-jährigen Probandin mit zwei unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten CD45-Antikörpern (V500 und APC; verschiedene Klone, s. Material und Methoden) markiert und anschließend unter Verwendung des simultanen Stimulationsverfahrens in Anwesenheit von Blut mit dem VZV-Antigen stimuliert, wobei bei der abschließenden intrazellulären Färbung zusätzlich IFN $\gamma$ , CD69 und CD4 mit Fluorochrom-

gekoppelten Antikörpern markiert wurden. Falls die zur Vorfärbung verwendeten Antikörper während der Stimulation auf zuvor ungefärbte Blutzellen übertragen werden würden, wären bei der abschließenden durchflusszytometrischen Analyse neben  $CD45-APC^+V500^+$  und  $CD45-APC^-V500^-$  CD4 T-Zellen auch  $CD45-APC^+V500^-$  und  $CD45-APC^-V500^+$  CD4 T-Zellen zu erwarten. Die Messung zeigte jedoch, dass ausschließlich doppelt-markierte (17,25%) und unmarkierte CD4 T-Zellen (82,75%) vorhanden waren (Abbildung 35A). Somit ist anzunehmen, dass die zur Vorfärbung verwendeten Antikörper während der Stimulation nicht auf die unmarkierten Immunzellen aus dem Blut übertragen werden. Da die VZV-spezifischen Frequenzen bei den markierten PBMCs und unmarkierten Blutzellen wie erwartet gleich waren, konnte zudem gezeigt werden, dass die Markierung der Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern keinen Einfluss auf die Antigen-spezifische CD4 T-Zellfrequenz hat (Abbildung 35B).



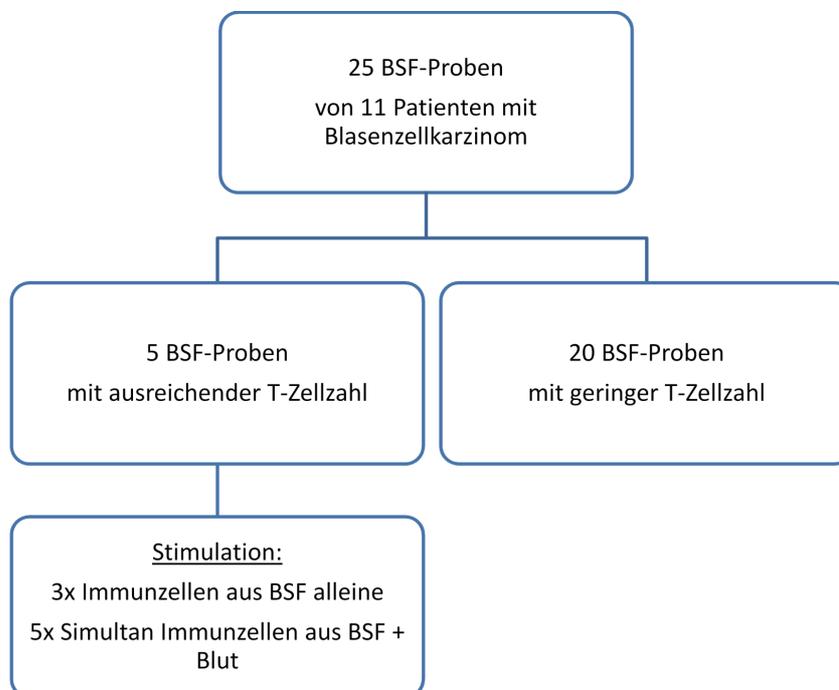
**Abbildung 35: Fluorochrom-gekoppelte Antikörper werden während der Stimulation nicht auf ungefärbte Immunzellen übertragen.** (A) Nach der doppelten Vorfärbung von PBMCs mit zwei unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten anti-CD45 Antikörpern und der anschließenden simultanen Stimulation mit ungefärbtem Blut werden alle CD4 T-Zellen anhand des APC- und V500-Signals aufgetrennt. Doppelt CD45-negative sind in rot und doppelt CD45-positive CD4 T-Zellen in blau dargestellt. (B) Die jeweilige Frequenz der VZV-spezifischen ( $CD69^+IFN\gamma^+$ ) CD4 T-Zellen ist als Prozentzahl angegeben. IFN, Interferon; VZV, Varizella-Zoster Virus.

### 6.3.3 Anwendung des neu entwickelten simultanen Stimulationsverfahrens zur Analyse anderer extrasanguiner Flüssigkeiten

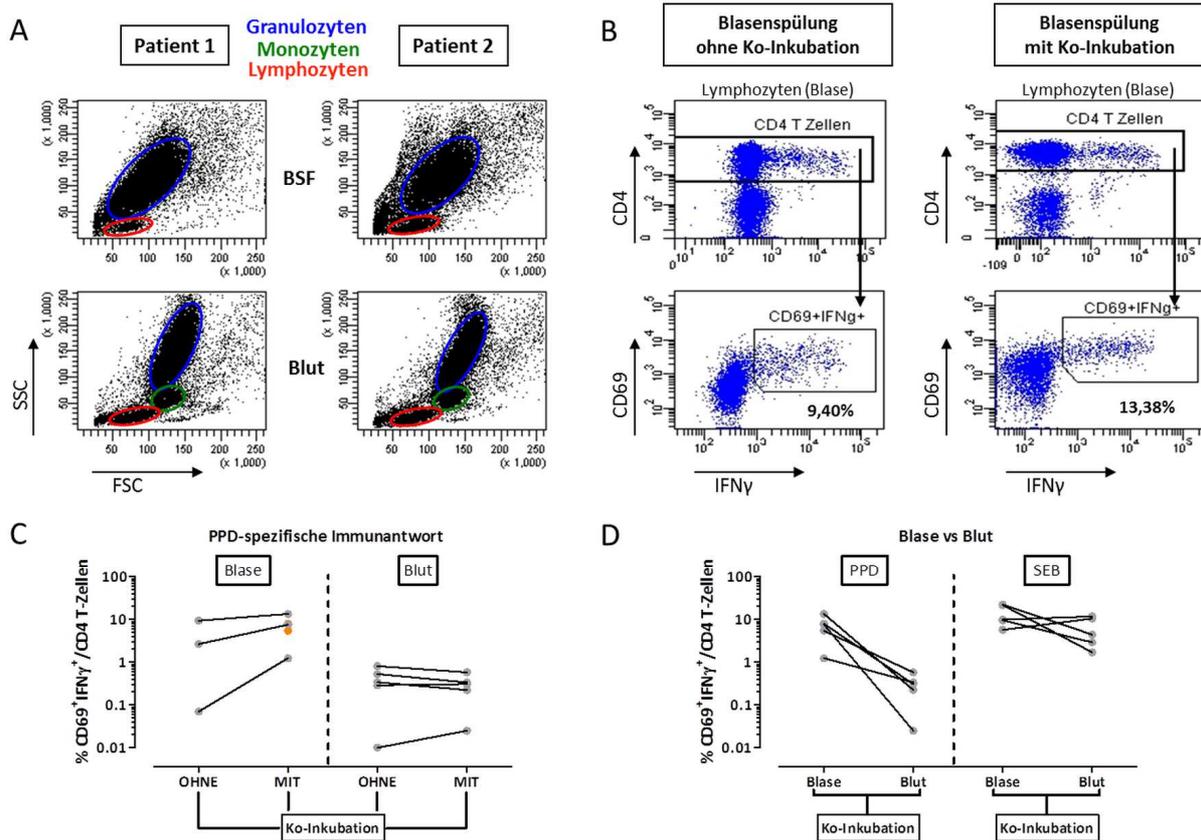
#### 6.3.3.1 Blasenspülflüssigkeit von Blasenzellkarzinom-Patienten

Bei Patienten mit nicht-muskelinvasivem Blasenzellkarzinom wird nach Resektion des entarteten Gewebes der BCG-Impfstoff (Bacille Calmette Guérin), der auch zur Impfung gegen *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) verwendet wird, in definierten Abständen in die Blase appliziert um das Auftreten von Rezidiven zu verringern (BRANDAU, SUTTMANN, 2007; BABJUK et al., 2013).

Die dadurch unter anderem ausgelöste spezifische Immunantwort kann unter Verwendung von gereinigtem Tuberkulin (PPD „purified protein derivative“) als Antigen nachgewiesen werden. Neben der Analyse der systemischen PPD-spezifischen Immunantwort im Blut, die bereits in ersten Studien zur Determinierung des Therapieerfolgs herangezogen wurde (ELSÄßER et al., 2013), könnte auch die Quantifizierung und Charakterisierung der lokal in der Blase induzierten bzw. potentiell angereicherten Immunantwort durch Stimulation der in der BSF enthaltenen T-Zellen Hinweise für einen Therapieerfolg liefern.



**Abbildung 36: Übersicht über die Blasenspülflüssigkeits-Proben und die Verwendbarkeit für Stimulationsexperimente.** Von 25 Blasenspülflüssigkeits-Proben (BSF-Proben) von 11 Patienten mit Blasenzellkarzinom konnte nur in 5 Proben eine für Stimulationsexperimente ausreichende T-Zellzahl nachgewiesen werden. Drei Proben wurden vergleichend ohne und mit Ko-Inkubation stimuliert. Zusätzlich wurden 2 Proben ausschließlich unter Verwendung des simultanen Stimulationsverfahrens analysiert.



**Abbildung 37: Die Nachweisbarkeit angereicherter PPD-spezifischer T-Zellen aus Blasenpflüssigkeit wird durch die Verwendung des simultanen Stimulationsverfahrens verbessert.** (A) Dargestellt sind Punktdiagramme von Immunzellen aus Blasenpflüssigkeit (BSF) und Blut von zwei Blasenzellkarzinom-Patienten mit hoher Lymphozytenanzahl. Die Immunzellen wurden anhand des FSC- (Größe) und des SSC-Signals (Granularität) in Granulozyten, Lymphozyten und bei den Blutzellen zusätzlich in Monozyten eingeteilt. (B) Beispielhafte Punktdiagramme von Lymphozyten und PPD-spezifischen CD4 T-Zellen aus BSF nach Stimulation in Abwesenheit (links) und Anwesenheit von Blut derselben Person (rechts). Die Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf den Anteil PPD-spezifischer (CD69<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) Zellen an allen CD4 T-Zellen. (C) Vergleich der Frequenzen PPD-spezifischer Immunzellen aus BSF ohne und mit Ko-Inkubation mit Blut, sowie der PPD-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen im Blut ohne und mit Ko-Inkubation mit BSF-Immunzellen von Blasenzellkarzinom-Patienten (n=5). Die beiden orangenen Symbole markieren Patienten bei denen aufgrund der geringen BSF-Gesamtzellzahl keine Stimulation von BSF-Immunzellen ohne Ko-Inkubation mit Blut durchgeführt wurde. (D) Vergleichende Analyse der PPD-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen aus BSF und Blut von Blasenzellkarzinom-Patienten (n=5). IFN, Interferon; PPD, „purified protein derivative“; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B. Abbildungsteil (B) reproduziert aus Patentschrift zu dieser Arbeit (SCHUB et al., 2015b).

Zu diesem Zweck wurden 25 BSF- und Blut-Proben von 11 Blasenzellkarzinom-Patienten unter BCG-Instillations-Therapie analysiert (Abbildung 36). In Abbildung 37A sind repräsentative Punktdiagramme der BSF und Blut von zwei dieser Patienten dargestellt. Die darin enthaltenen Immunzellen sind dabei entsprechend ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) abgebildet. Unabhängig davon, ob in einer BSF genügend T-Zellen für eine Stimulation enthalten waren, war – im Gegensatz zum Blut - bei der Mehrheit der Patientenproben allein aufgrund des FSC- und SSC-Signals eine eindeutige Abgrenzung von Lymphozyten und

Granulozyten erschwert, während Monozyten meist gar nicht detektierbar waren. Dementsprechend konnte das Verhältnis von Monozyten und T-Zellen in der BSF und im Blut nicht verglichen werden. Dennoch fiel im Gegensatz zu den CSF-Proben auf, dass in der BSF die Anzahl der Lymphozyten stark variierte, obgleich bei den meisten Patienten überwiegend Granulozyten nachweisbar waren. Folglich war unklar, ob ausreichend APCs in den isolierten Proben vorhanden waren, um die T-Zellen ohne Ko-Inkubation mit Blut PPD-spezifisch stimulieren zu können. Zudem war nicht bekannt, ob die Effizienz dieser Antigen-spezifischen Stimulation durch die Ko-Inkubation mit Blut gesteigert werden könnte. Insgesamt waren jedoch nur in 5 Proben genügend T-Zellen in der BSF vorhanden, um eine kombinierte Stimulation mit Blutzellen durchzuführen. Bei drei dieser Patienten waren zudem genügend BSF Zellen vorhanden, um diese isoliert zu stimulieren (s. Abbildung 36). In Abbildung 37B sind repräsentative Punktdiagramme einer PPD-spezifischen Stimulation von Immunzellen eines Blasenzellkarzinom-Patienten mit einer ausreichenden Immunzellzahl in der BSF dargestellt. Dabei wurde die PPD-spezifische CD4 T-Zellfrequenz ohne und mit Ko-Inkubation mit Blut gemessen. Interessanterweise konnten bei dem Patienten bereits PPD-spezifische CD4 T-Zellen ohne Ko-Inkubation stimuliert werden (Frequenz 9,40%). Bemerkenswert war jedoch, dass durch die Verwendung des simultanen Stimulationsverfahrens bei diesem Patienten eine PPD-spezifische CD4 T-Zellfrequenz von 13,38% nachgewiesen werden konnte, was verglichen mit der alleinigen Stimulation der BSF Zellen einer Steigerung um mehr als 40% entsprach. Dass es sich bei diesem Ergebnis nicht um einen Einzelfall handelte, zeigten die Analysen von 2 weiteren stimulierten BSF, bei denen die PPD-spezifische CD4 T-Zellfrequenz durch die Verwendung der Ko-Inkubationsmethode ebenfalls jeweils gesteigert werden konnte (Abbildung 37C, links). Im Gegensatz dazu blieb die PPD-spezifische CD4 T-Zellfrequenz in separat stimuliertem Blut und im Blut, das in Anwesenheit von Immunzellen aus der BSF des jeweiligen Patienten stimuliert wurde nahezu identisch (Abbildung 37C, n=5, rechts). Dadurch können unspezifische Aktivierungen, die allein aufgrund der Ko-Inkubation der Immunzellen aus Blut und BSF hätten ausgelöst werden können, ausgeschlossen werden.

Die Quantifizierung der Frequenzen reaktiver T-Zellen der 5 stimulierten Patienten-Proben zeigte zudem, dass sich PPD-reaktive T-Zellen bei Blasenzellkarzinom-Patienten in der Blase im Vergleich zum Blut stark anreichern (Abbildung 37D). Interessanterweise war diese Anreicherung bei den PPD-spezifischen CD4 T-Zellen zudem deutlich ausgeprägter als bei

den SEB-reaktiven CD4 T-Zellen (mediane Anreicherung 24,4 bzw. 2,3), was in einer unabhängigen Studie in der Klinik für Urologie und Kinderurologie in einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden soll.

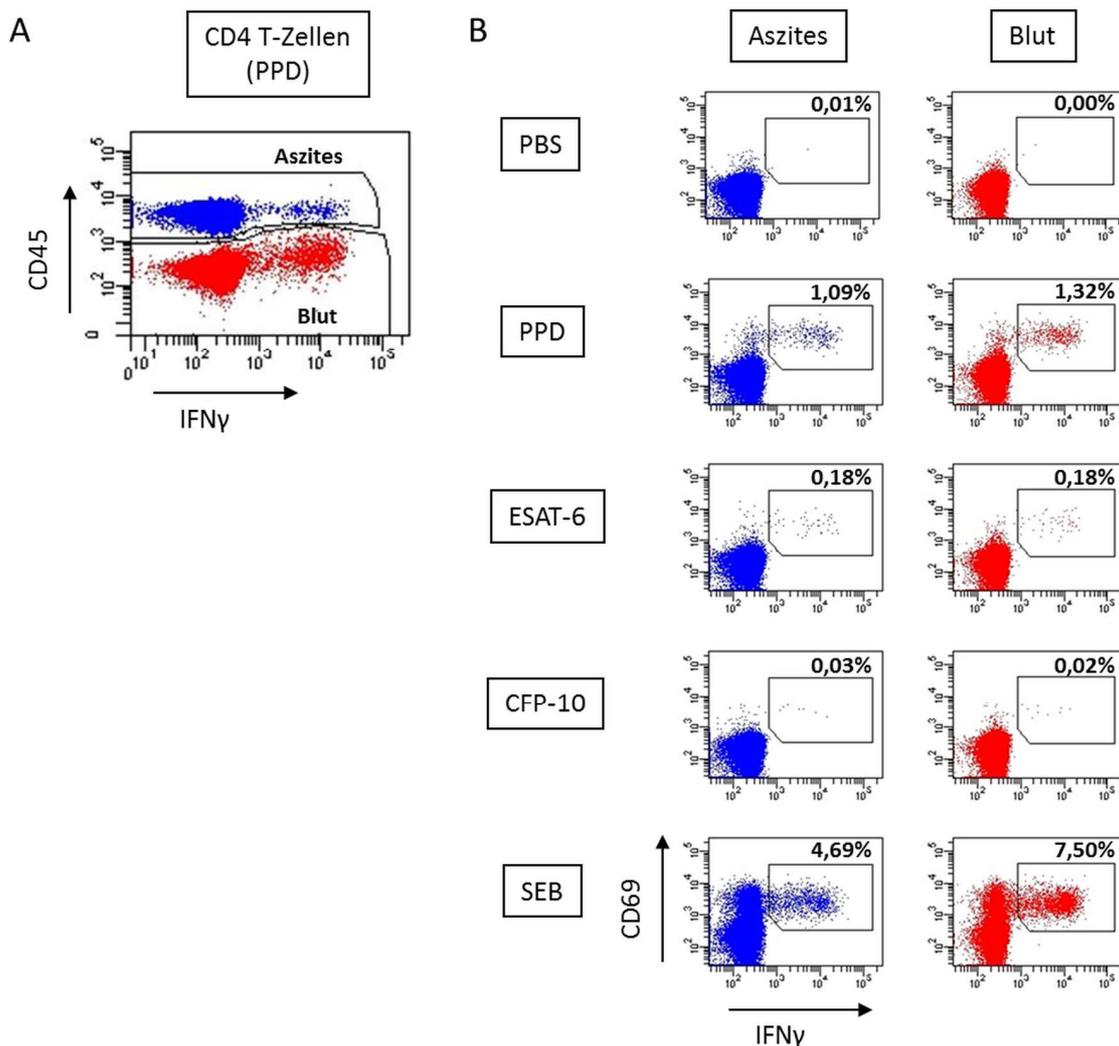
Insgesamt waren nur bei wenigen BSF-Proben genügend T-Zellen für eine Stimulation vorhanden. Bei diesen Patienten konnte allerdings gezeigt werden, dass sich während der Therapie PPD-spezifische T-Zellen in der Blase anreichern. Diese konnten zwar auch ohne Ko-Inkubation mit Blut Antigen-spezifisch stimuliert werden, jedoch ermöglichte die simultane Stimulationsmethode bei diesen Proben einen effizienteren Nachweis der PPD-spezifischen CD4 T-Zellen.

### **6.3.3.2 Patient mit Verdacht auf *M. tuberculosis*-bedingtem Aszites**

Bei Patienten mit Aszites sammelt sich Flüssigkeit in der Bauchhöhle an. Diese wird dem Patienten zum einen aus therapeutischen und zum anderen aus diagnostischen Gründen entnommen. Im nachfolgenden Beispiel wurde die Aszitesflüssigkeit eines 66-jährigen Patienten mit Verdacht auf *M. tuberculosis*-bedingtem Aszites entnommen und die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Aufgrund der ausreichenden Zellzahl wurden die Immunzellen der Aszitesflüssigkeit mit einem gegen CD45 gerichteten Antikörper vorgefärbt und anschließend unter Verwendung des simultanen Stimulationsverfahrens in Anwesenheit von Blut desselben Patienten mit verschiedenen Antigenen stimuliert.

In Abbildung 38A sind exemplarisch die CD4 T-Zellen nach Stimulation mit PPD dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass Immunzellen aus Aszites und Blut anhand des Signals des zur Vorfärbung verwendeten anti-CD45-Antikörpers unterschieden werden konnten. Abbildung 38B zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung nach der Stimulation mit den mycobakteriellen Antigenen PPD, ESAT-6 („soluble early secretory antigenic target 6“) und CFP-10 („culture filtrate protein 10“) sowie der entsprechenden Negativ- und Positivkontrolle (PBS bzw. SEB). Das Analyseergebnis zeigt deutlich, dass Immunzellen, die aus der Aszitesflüssigkeit isoliert wurden, unter Verwendung des simultanen Stimulationsverfahrens Antigen-spezifisch stimuliert werden. Generell gilt, dass von einer Infektion mit *M. tuberculosis* auszugehen ist, wenn ESAT-6 und/oder CFP-spezifische CD4 T-Zellen nachweisbar sind. In der untersuchten Probe konnten sowohl in der Aszitesflüssigkeit als auch im Blut neben den PPD-spezifischen (1,09% und 1,32%) und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen (4,69% und 7,50%) auch jeweils ESAT-6-spezifische (jeweils 0,18%)

CD4 T-Zellen nachgewiesen werden, sodass das Ergebnis als *M. tuberculosis*-positiv zu werten ist.



**Abbildung 38: Das simultane Nachweisverfahren ist zur Analyse von Antigen-spezifischen T-Zellen aus Aszitesflüssigkeit geeignet.** Dargestellt sind Punktdiagramme von Immunzellen eines Patienten mit Verdacht auf *M. tuberculosis*-bedingtem Aszites nach kombinierter Stimulation der Aszites-Zellen mit Blut. **(A)** Diskriminierung von CD4 T-Zellen aus der Aszitesflüssigkeit (blau) und Blut (rot) anhand der zur Vorfärbung verwendeten Fluoreszenzmarkierung der CD45-Moleküle. **(B)** Frequenzen reaktiver CD4 T-Zellen aus der Aszitesflüssigkeit (blau) und Blut (rot) nach Stimulation mit der Negativkontrolle (PBS), PPD, ESAT-6, CFP-10 und dem polyklonalen Stimulus SEB (Positivkontrolle). CFP-10, „culture filtrate protein 10“; ESAT-6, „soluble early secretory antigenic target 6“; IFN, Interferon; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*; PPD, „purified protein derivative“; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass die neu entwickelte Methode die Möglichkeit bietet, Antigen-spezifische Immunzellen in verschiedenen extrasanguinen Flüssigkeiten wie CSF, BSF und Aszitesflüssigkeit durch die simultane Stimulation mit Blut des jeweiligen Patienten nachzuweisen. Zudem konnte für CSF und BSF veranschaulicht werden, dass die Nachweisbarkeit der Antigen-spezifischen CD4 T-Zellen durch dieses Verfahren verbessert werden konnte.

## **6.4 Analyse und Charakterisierung Virus-spezifischer T-Zellen aus Blut und CSF von Patienten mit Entzündungen des ZNS**

Neben Herpes Zoster-assoziierten Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort wurde im Folgenden untersucht, inwieweit sich entsprechende immunologische Veränderungen in der spezifischen Immunantwort bei neurologischen Manifestationen finden, bei denen eine spezifische Diagnose differentialdiagnostisch erschwert ist.

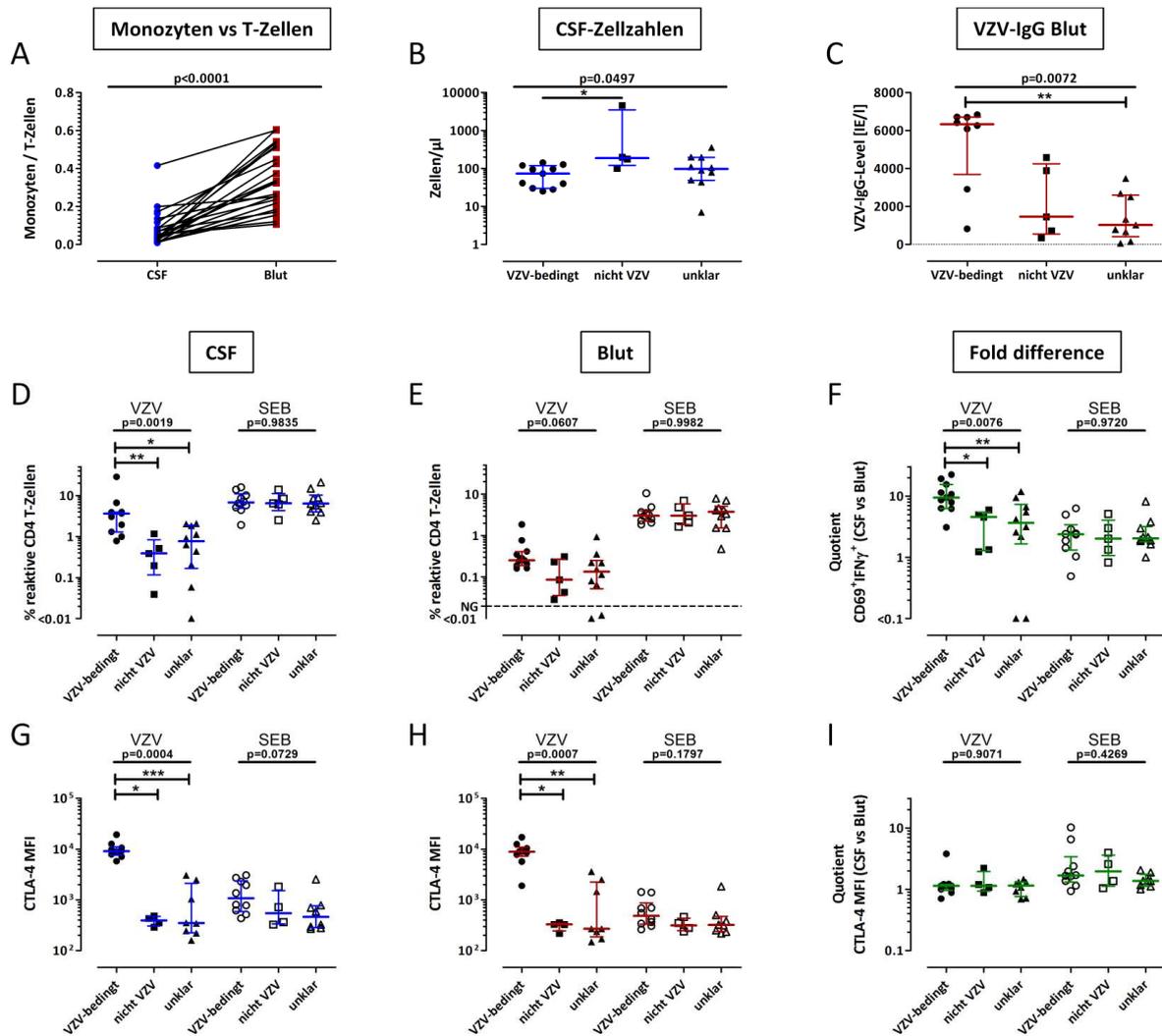
### ***6.4.1 Die VZV-spezifische Immunantwort in Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen zeigt charakteristische Merkmale in CSF und Blut***

Um die VZV-spezifische Immunantwort am Ort des Infektgeschehens (CSF) und die systemische VZV-spezifische Immunantwort (Blut) vergleichend analysieren zu können, wurden insgesamt 43 Patienten mit ZNS-Entzündungen zunächst hinsichtlich der Immunzellzahl in der CSF untersucht. Bei 26 dieser Patienten konnte mittels Bestimmung der Zellzahl und der Immunzellsubtypen-Analyse (s. Abschnitt 5.4.1 und 5.4.4) eine ausreichende Immunzellzahl in der CSF identifiziert werden, sodass die Blut- und CSF-Proben dieser Patienten für die weiteren Stimulationsexperimente verwendet werden konnten (Übersicht, s. Abbildung 4).

Bei der Entwicklung des Protokolls (s. Abschnitt 6.3.1 und 6.3.2) zur Stimulation der CSF-Zellen fiel auf, dass die geringe Anzahl der APCs möglicherweise einen limitierenden Faktor für eine Antigen-spezifische Stimulation von CSF-Immunzellen ohne Blut darstellen könnte. In den zuvor durchgeführten Kontrollexperimenten konnte zudem bestätigt werden, dass Monozyten und nicht B-Zellen bei der Antigen-spezifischen Stimulation eine entscheidende Rolle spielen. Um zu überprüfen, ob der geringe Anteil an Monozyten möglicherweise auch bei diesen 26 Patienten einen limitierenden Faktor für die alleinige Antigen-spezifische Stimulation von CSF-Immunzellen gewesen wäre, wurde von den 26 CSF-Proben das Verhältnis von Monozyten zu T-Zellen bestimmt und mit dem der Blutproben verglichen (Abbildung 39A). Bemerkenswerterweise konnte gegenüber dem Blut bei allen Patienten in der CSF eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Verschiebung hin zu Lymphozyten beobachtet werden ( $p < 0,0001$ ). Somit wäre auch bei diesen Patienten eine alleinige Stimulation von CSF-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht effektiv gewesen, sodass das simultane Stimulationsverfahren in Anwesenheit von Blut vielversprechendere Ergebnisse vermuten lässt.

Die 26 Patienten mit ausreichender Immunzellzahl wurden basierend auf der Beteiligung von VZV an der ZNS-Erkrankung in die Gruppen mit gesicherten VZV-bedingten ZNS-Infektionen (Gruppe 1), gesicherten nicht-VZV-bedingten ZNS-Entzündungen (Gruppe 2) und die Patientengruppe bei denen die Beteiligung von VZV an der akuten ZNS-Symptomatik unklar ist (Gruppe 3) eingeteilt. Gruppe 3 besteht überwiegend aus Patienten mit Meningoenzephalitis unklarer Genese, gefolgt von Patienten mit Fazialisparese (Gesichtslähmung), deren Entstehung u.a. durch eine VZV-Reaktivierung verursacht werden kann (FURUTA et al., 2000; FURUTA et al., 2005). Die Gruppeneinteilung sowie die entsprechenden Patientencharakteristika sind in Abschnitt 5.2.5 (Abbildung 4 und Tabelle 5) aufgeführt.

Zunächst wurde überprüft, ob sich die Anzahl der Zellen in der CSF (Zellzahl pro  $\mu\text{l}$ ) zwischen den verschiedenen Patientengruppen unterschied (Abbildung 39B). Erwartungsgemäß war diesbezüglich jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen den Patientengruppen nachweisbar ( $p=0,0497$ ). Obwohl im Gegensatz dazu bei den VZV-IgG-Levels signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar waren ( $p=0,0072$ , Abbildung 39C) ermöglichten die Antikörperlevels ebenfalls keine eindeutige Diskriminierung zwischen den Patienten mit gesicherten VZV-bedingten ZNS-Infektionen und den Patienten mit gesicherten nicht VZV-bedingten ZNS-Infektionen und -Entzündungen (100% Sensitivität, 75% Spezifität, s. Tabelle 18). Um festzustellen, ob dies mit der quantitativen und qualitativen Analyse der T-Zellen aus CSF und Blut möglich ist, wurden die CSF-Immunzellen zusammen mit Blut desselben Patienten ko-inkubiert und stimuliert. In Abbildung 39D und E sind die Frequenzen VZV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 T-Zellen aus der CSF bzw. aus dem Blut dargestellt. Auffällig war, dass die VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen bei der Gruppe mit VZV-bedingter ZNS-Infektion am höchsten waren. Interessanterweise war der Unterschied zu den anderen Gruppen bei den Immunzellen aus der CSF deutlich ausgeprägter als bei den Immunzellen aus dem Blut, wo nur eine leichte Tendenz festgestellt werden konnte ( $p=0,0019$  und  $p=0,0607$ ). Bei den SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen wurden hingegen keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Patientengruppen identifiziert.



**Abbildung 39: Erhöhte Frequenz und CTLA-4-Expression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen aus CSF und Blut in Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion.** Immunzellsubtypen, Zellzahlen, Antikörper und VZV-spezifische Immunantworten wurden in der CSF (blau) und/oder im Blut (rot) von Patienten mit ZNS-Entzündung verglichen. Zur Analyse der Antikörperlevels, T-Zellfrequenzen und CTLA-4-Expression wurden die Patienten auf Basis der Beteiligung von VZV an der ZNS-Entzündung in drei Gruppen eingeteilt (VZV-bedingt, nicht VZV-bedingt, VZV-Beteiligung unklar (unklar)). 4 von 11 Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion haben keine zusätzliche Hautmanifestation, zeigen jedoch gegenüber den Patienten mit zusätzlicher VZV-bedingter Hautmanifestation keine Unterschiede in den immunologischen Parametern. **(A)** Dargestellt ist das Verhältnis von Monozyten zu T-Zellen in der CSF im Vergleich zum Blut. In **(B)** sind die Zellzahlen pro µl in der CSF der 26 getesteten Personen dargestellt. In **(C)** sind die VZV-IgG-Level (IE/l) im Blut von 22 Patienten (8x VZV, 5x nicht VZV, 9x unklar) gezeigt. **(D-I)** Dargestellt sind die VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen in der CSF **(D)** und im Blut **(E)** sowie die jeweilige CTLA-4-Expression dieser Zellen **(G, H)**. Die Stimulation der Immunzellen erfolgte unter Verwendung des simultanen Nachweisverfahrens. Die Stärke der CTLA-4-Expression ist anhand der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben und es wurden alle Proben mit mindestens 20 VZV-spezifischen Zellen eingeschlossen. Unterschiede in den reaktiven T-Zellfrequenzen **(F)** bzw. der CTLA-4-Expression **(I)** zwischen der CSF und dem Blut sind anhand des jeweiligen „Fold difference“ angegeben. In (C, E) sind die jeweiligen Nachweisgrenzen durch eine gepunktete Linie visualisiert. In (B-I) geben die Querstriche den jeweiligen Median und den Interquartilsabstand an. Signifikante Unterschiede wurden in (A) unter Verwendung des Wilcoxon Test und in (B-I) anhand des Kruskal-Wallis Test sowie dem Dunn Post-Test ermittelt und sind in letzterem mit Sternen angegeben (\* für p<0,05, \*\*0,01). CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; CTLA-4, zytotoxisches Lymphozyten Antigen 4; IE/l, internationale Einheiten pro Liter; IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; VZV, Varizella-Zoster Virus; ZNS, zentrales Nervensystem.

**Tabelle 18: ROC-Analyse zur Identifizierung der besten Diskriminierung zwischen Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen und Patienten mit nicht VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen**

Parameter	Flüssigkeit	Grenzwert* für VZV-bedingte ZNS-Infektion	% Spezifität	% Sensitivität	AUC
VZV-IgG-Level [IE/l]	Blut	> 5329	75	100	0,875
VZV-Frequenz**	CSF	> 1,23	100	81,82	0,964
VZV-Frequenz**	Blut	> 0,12	100	60	0,800
VZV-CTLA-4 [MFI]	CSF	> 3136	100	100	1
VZV-CTLA-4 [MFI]	Blut	> 1128	100	100	1

\*aus ROC Analyse ermittelt; \*\*% VZV-spezifische CD4 T-Zellen; AUC, „area under the curve“; IE/l, internationale Einheiten pro Liter; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; ROC, „Receiver Operator Characteristics“

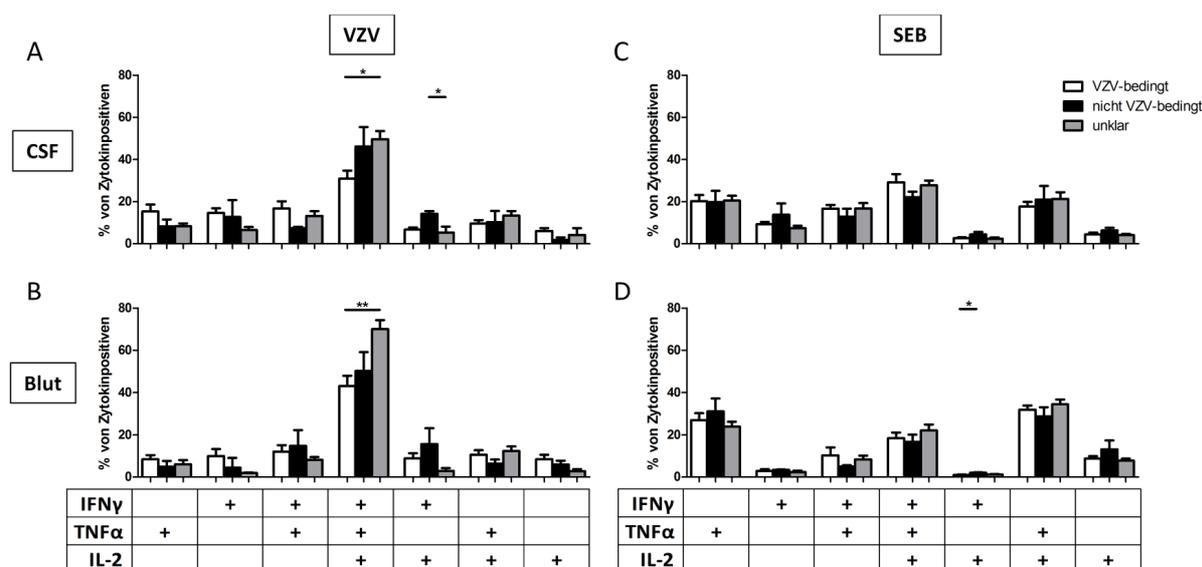
Die vergleichende Analyse der CD4 T-Zellen aus CSF und aus Blut zeigten darüber hinaus, dass die VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen in der CSF deutlich höher waren als im Blut, wobei dieser Unterschied bei Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen am größten war (medianer „Fold difference“: VZV-bedingt 9,4; nicht VZV 4,5; unklar 3,6; Abbildung 39F). Die Anreicherung der SEB-reaktiven Zellen in der CSF war hingegen bei den drei Patientengruppen nahezu identisch und fiel zudem deutlich geringer aus als bei den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen (medianer „Fold difference“: 2,4; 2,0; 2,0).

Zusätzlich zur Frequenz wurde die Expression des Oberflächenmoleküls CTLA-4 auf den VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen quantifiziert. Interessanterweise konnte auf den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen von Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen die höchste CTLA-4 Expression nachgewiesen werden (Abbildung 39G und H). Dies galt sowohl für die Immunzellen aus der CSF als auch aus dem Blut ( $p=0,0004$  und  $p=0,0007$ ). Im Gegensatz zur Frequenz war jedoch anhand der CTLA-4-Expression auf den VZV-spezifischen Immunzellen aus der CSF bzw. aus dem Blut eine eindeutige Unterscheidung der Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektionen und der Patienten mit nicht VZV-bedingten ZNS-Entzündungen möglich (Sensitivität und Spezifität jeweils 100%, s. Tabelle 18). Die SEB-reaktiven CD4 T-Zellen unterschieden sich hingegen nicht in ihrem CTLA-4-

Expressionsniveau. Zudem waren die Unterschiede im CTLA-4-Expressionslevel der VZV-spezifischen bzw. SEB-reaktiven CD4 T-zellen zwischen CSF- und Blut-Immunezellen gering (Median 1,1 bis 2,0, Abbildung 39I).

Bemerkenswert ist, dass 4 der 11 Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion keine zusätzliche Hautmanifestation aufwiesen, jedoch weder in der Frequenz der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen aus CSF oder Blut noch in der CTLA-4-Expression auf diesen Immunezellen Unterschiede gegenüber den Patienten mit zusätzlicher Hautmanifestation zeigten.

Wie bereits bei Patienten mit akutem Herpes Zoster gezeigt werden konnte, kommt es während der akuten Symptome zu einer charakteristischen Verschiebung des Zytokinexpressionsprofils VZV-spezifischer CD4 T-Zellen, die durch den Verlust von multifunktionalen Zellen ( $\text{IFN}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}\alpha^+$ ) und den Anstieg ausschließlich  $\text{IFN}\gamma$ -exprimierender CD4 T-Zellen gekennzeichnet ist. Um zu überprüfen, ob dieses charakteristische Expressionsprofil auch bei Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion vorzufinden ist, wurde die Zytokinexpression der CSF- und Blutzellen dieser Patienten gegenüber den Patienten ohne und mit unklarer VZV-Beteiligung analysiert (Abbildung 40). Sowohl in der CSF als auch im Blut war die VZV-spezifische Immunantwort mehrheitlich durch  $\text{IFN}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}\alpha^+$ -exprimierende CD4 T-Zellen gekennzeichnet (Abbildung 40A und B). Weder in der CSF noch im Blut von Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion konnten jedoch gegenüber den anderen beiden Patientengruppen charakteristische Veränderungen in der Zytokinexpression der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nachgewiesen werden. Lediglich der prozentuale Anteil der multifunktionalen CD4 T-Zellen der CSF-Immunezellen und Blutzellen war bei den Patienten mit unklarer VZV-Beteiligung signifikant höher als bei Patienten mit VZV-Beteiligung, wohingegen bei den erstgenannten Patienten der Anteil  $\text{IFN}\gamma^+\text{IL-2}^+$ -exprimierender VZV-spezifischer Zellen in der CSF geringer war als bei den Patienten mit nicht VZV-bedingten ZNS-Entzündungen. Nach Stimulation mit dem polyklonalen Stimulus SEB war das Zytokinexpressionsmuster wie erwartet in den verschiedenen Patientengruppen nahezu gleich und zeichnete sich durch ein hohes Maß an  $\text{TNF}^+$ -exprimierenden CD4 T-Zellen aus (Abbildung 40C und D).



**Abbildung 40: Keine deutlichen Unterschiede im Zytokinexpressionsprofil von VZV-spezifischen CD4 T-Zellen in der CSF und im Blut von Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen.** Immunzellen aus CSF und Blut von Patienten mit ZNS-Entzündungen wurden unter Verwendung des simultanen Nachweisverfahrens stimuliert. Die Patienten wurden auf Basis der Beteiligung von VZV an der ZNS-Entzündung in drei Gruppen eingeteilt (VZV-bedingt, nicht VZV-bedingt, VZV-Beteiligung unklar (unklar)). VZV-spezifische (A, B) und SEB-reaktive CD4 T-Zellen (C, D) wurden anhand der Expression von IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  in 7 Subgruppen unterteilt. Die Balkendiagramme geben dabei anteilig den Mittelwert und die Standardabweichung dieser Subpopulationen an allen Zytokin-positiven CD4 T-Zellen an. Es wurden ausschließlich Proben mit mindestens 30 VZV-reaktiven CD4 T-Zellen eingeschlossen. Zur statistischen Analyse wurde jeweils der One-Way Analysis of Variance Test mit dem Bonferroni Post-Test verwendet. Signifikanzen im Post-Test wurden mit Sternen angegeben (\* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ ). CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; IFN, Interferon; IL, Interleukin; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumornekrosefaktor; VZV, Varizella-Zoster Virus; ZNS, zentrales Nervensystem.

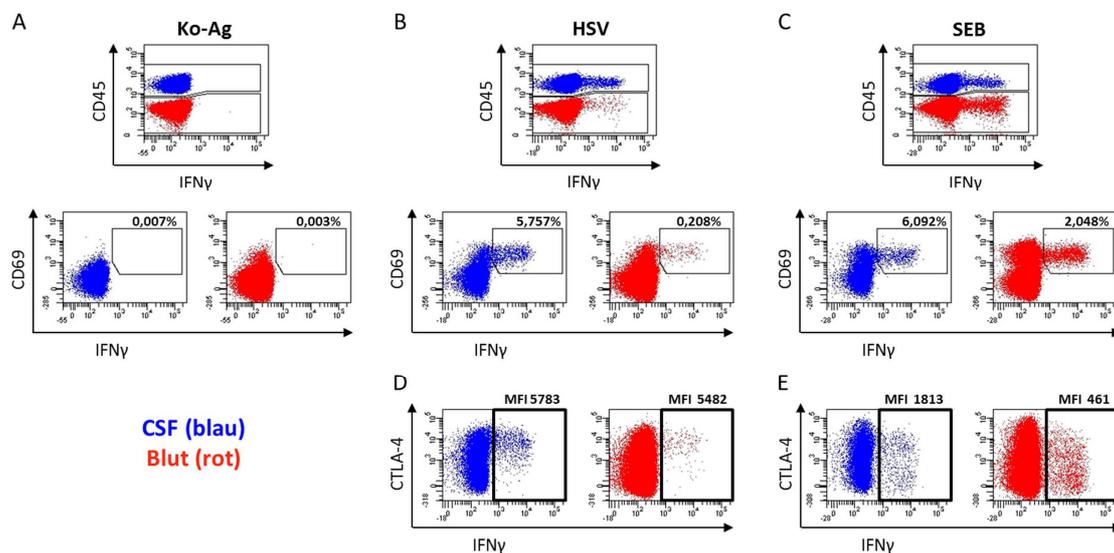
Insgesamt konnten bei Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen unabhängig von zusätzlichen Hautmanifestationen sowohl in der CSF als auch im Blut charakteristische immunologische Veränderungen identifiziert werden (erhöhte VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz und erhöhte CTLA-4-Expression), wobei diese bei den CSF-Immunzellen teilweise deutlicher ausgeprägt waren. Die Analyse der CTLA-4-Expression auf den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen aus CSF bzw. Blut ermöglichte dabei eine bessere Identifizierung dieser Patienten als dies anhand Frequenzen und der VZV-IgG-Levels möglich war.

#### 6.4.2 Die HSV-spezifische T-Zellfrequenz eines Patienten mit HSV-bedingter Enzephalitis ist in der CSF stark erhöht

Dass neben VZV-spezifischen auch andere Erreger-spezifische Immunzellen am Ort des akuten Infektgeschehens (CSF) angereichert sein können, zeigt das in Abbildung 41 dargestellte Ergebnis einer durchflusszytometrischen Charakterisierung der HSV-spezifischen Immunantwort eines Patienten mit akuter HSV-Enzephalitis. Nach Stimulation mit dem

Kontroll-Antigen konnten weder im Blut noch in der CSF  $CD69^{+}IFN\gamma^{+} CD4$  T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 41A). Während die Frequenz der polyklonal stimulierten CD4 T-Zellen in der CSF um das 3-fache erhöht war (6,09% vs 2,05% Abbildung 41C), konnte bei der Analyse der HSV-spezifischen CD4 T-Zellantwort in der CSF eine mehr als 27-fach höhere Frequenz als im Blut detektiert werden (5,76% vs 0,21% Abbildung 41B). Vergleichbar mit den Analysen der Patienten mit symptomatischen HSV-Reaktivierungen ohne ZNS-Beteiligung (s. Abbildung 27C), war die CTLA-4 Expression auf den HSV-spezifischen CD4 T-Zellen erwartungsgemäß gegenüber asymptomatischen Personen nicht erhöht, und war bei den HSV-spezifischen Zellen aus der CSF bzw. dem Blut mit einer medianen Fluoreszenzintensität von 5783 bzw. 5482 nahezu identisch (Abbildung 41D). Die CTLA-4 Expression der SEB-reaktiven Zellen war im Vergleich zu HSV etwas geringer, wobei sie auf den Blutzellen mit einer MFI von 461 am geringsten ausfiel (Abbildung 41E).

Somit konnte auch bei einem akuten HSV-Infekt unter ZNS-Beteiligung ein markanter Anstieg der Frequenz HSV-spezifischer CD4 T-Zellen in der CSF nachgewiesen werden, wie er auch bei den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen während VZV-bedingter ZNS-Infektion vorzufinden war.



**Abbildung 41: HSV-spezifische CD4 T-Zellen sind in der CSF eines Patienten mit HSV-Enzephalitis stark angereichert.** Unter Verwendung des simultanen Nachweisverfahrens wurden Immunzellen aus CSF (blau) und Blut (rot) eines Patienten mit HSV-Enzephalitis mit einem Kontroll-Antigen (Ko-Ag, Negativkontrolle, (A)), dem Herpes-Simplex Virus Antigen (HSV-Ag, (B, D)) und dem polyklonalen Stimulus *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB, Positivkontrolle, (C, E)) stimuliert. (A-C) Die oberen Punktdiagramme zeigen die Unterteilung der CD4 T-Zellen aus CSF und Blut anhand des CD45-Signals. Die jeweiligen Frequenzen reaktiver ( $CD69^{+}IFN\gamma^{+}$ ) CD4 T-Zellen (jeweils unten) nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen sind als Prozentzahlen angegeben. Die CTLA-4-Expression auf den HSV-spezifischen (D) und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen (E) ist anhand der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) dieser Zellen angegeben. CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; IFN, Interferon.

## **6.5 Analyse des Effekts der Harnstoffbehandlung einzelner Proteine oder gesamter Zelllysate auf die induzierte Antigen-spezifische Immunantwort**

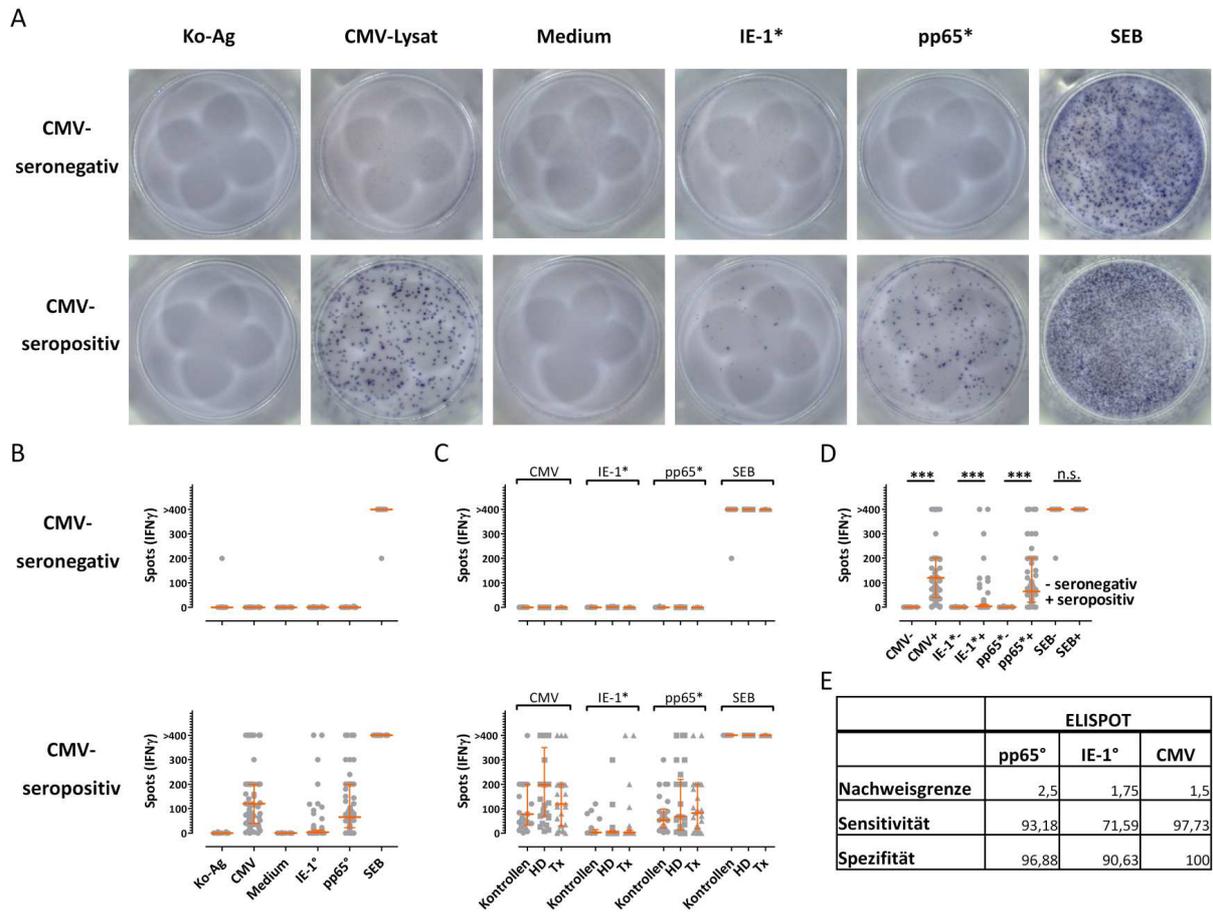
### **6.5.1 Analyse Harnstoff-behandelter CMV-Proteine (pp65 und IE-1) hinsichtlich ihres Potentials simultan CMV-spezifische CD4 und CD8 Immunantworten zu induzieren**

#### **6.5.1.1 Das unbehandelte CMV-Lysat induziert bei der ELISpot-Analyse CMV-seropositiver Personen die meisten IFN $\gamma$ -positiven Spots**

Um das Potential Harnstoff-behandelter Proteine für die Anwendung in der CMV-Diagnostik zu ermitteln, wurde die CMV-spezifische zelluläre Immunantwort anhand von Blutproben von 40 immungesunden Kontroll-Probanden, 40 Hämodialyse-Patienten und 40 Nieren-Transplantat-Empfängern mittels eines abgewandelten kommerziellen CMV-ELISpot-Assays und durchflusszytometrischer Analysen charakterisiert (s. Tabelle 6, Patientencharakteristika, Teil 1). Dazu wurden CMV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellantworten nach Stimulation mit Harnstoff-behandelten pp65- und IE-1-Proteinen und einem unbehandelten CMV-Lysat analysiert.

In Abbildung 42A sind repräsentative Ergebnisse der ELISpot-Analyse eines CMV-seronegativen und eines CMV-seropositiven Probanden dargestellt. Erwartungsgemäß konnte bei den CMV-seronegativen Personen weder nach Stimulation mit den beiden Harnstoff-behandelten CMV-Proteinen noch nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat IFN $\gamma$ -positive Spots detektiert werden (Median  $\leq 0,5$ ; Interquartilsabstand (IQR)  $\leq 0,5$ , Abbildung 42B oben). In den CMV-seropositiven Personen hingegen unterschied sich die induzierte Immunantwort deutlich (Abbildung 42B unten). In den mit IE-1 stimulierten Proben war die mediane Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Zellen gering (3,8; IQR 10,5), mittel bei pp65 (65; IQR 179,5) und nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat am höchsten (120; IQR 160). Zwischen den Patienten- und Probandengruppen waren keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Zellen nachweisbar, wobei angemerkt werden muss, dass sich die Personengruppen im Alter unterschieden (Abbildung 42C; s. Tabelle 6, Patientencharakteristika). Die Analyse von altersangepassten Gruppen CMV-seronegativer und -seropositiver Personen offenbarte hingegen sowohl signifikante Unterschiede nach der Stimulation mit den Harnstoff-behandelten CMV-Proteinen, als auch mit dem unbehandelten CMV-Lysat (jeweils  $p < 0,0001$ ; Abbildung 42D). Interessanterweise waren jedoch bei den drei Antigenen große Unterschiede bei der Spezifität und Sensitivität

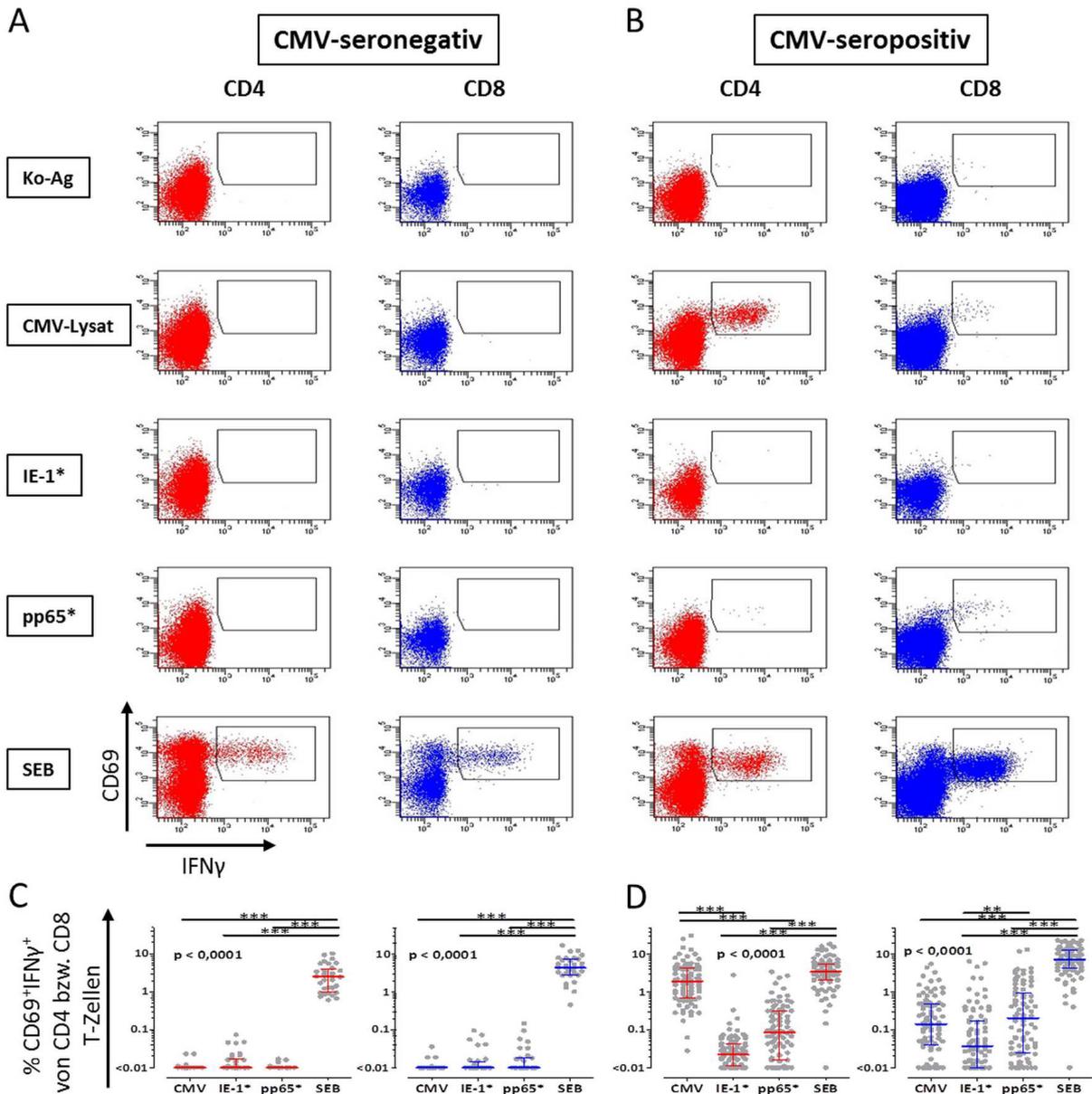
(Abbildung 42E) feststellbar. Während die Sensitivität und Spezifität bei IE-1 (71,59%; 90,63%) eher gering war, konnte unter Verwendung des Harnstoff-behandelten pp65 (93,18%; 96,88%) oder des unbehandelten CMV-Lysates (97,73%; 100%) deutlich besser zwischen CMV-negativen und CMV-positiven Personen diskriminiert werden.



**Abbildung 42: Im ELISpot wird bei CMV-seropositiven Personen nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat die höchste Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Spots induziert.** PBMCs von CMV-positiven und -negativen Personen wurden mittels ELISpot hinsichtlich der IFN $\gamma$ -Expression analysiert. Pro Person wurden Immunzellen mit den beiden Negativkontrollen (Medium und Kontroll-Antigen (Ko-Ag), den Harnstoff-behandelten Proteinen IE-1 (IE-1\*) und pp65 (pp65\*), dem unbehandelten CMV-Antigen und dem polyklonalen Stimulus *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) stimuliert. Die Harnstoff-behandelten Antigene sind jeweils mit einem Stern gekennzeichnet. **(A)** Repräsentative Ergebnisse eines CMV-negativen (oben) und eines CMV-positiven (unten) Probanden. **(B)** Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen aller getesteten CMV-negativen (oben) und CMV-positiven (unten) Personen nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen. **(C)** Vergleich der Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Zellen zwischen immungesunden Probanden (Kontrollen), Hämodialyse-Patienten (HD) und Transplantat-Empfängern (Tx) nach Abzug der Negativkontrolle. **(D)** Vergleich der Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Zellen in CMV-negativen und -positiven Personen in Abhängigkeit vom verwendeten Antigen. **(E)** Sensitivität und Spezifität der Diskriminierung zwischen CMV-positiven und -negativen Personen bei Verwendung der Harnstoff-behandelten Proteine und des unbehandelten CMV-Lysates. In (B-D) sind der jeweilige Median und der Interquartilsabstand durch Querstriche dargestellt. Statistische Analysen zwischen den Personengruppen wurden in (C) mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Dunn Post-Test und zwischen CMV-negativen und -positiven Personen in (D) mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt. Statistische Unterschiede sind jeweils durch Sterne angegeben (\*\*\*) für  $p < 0,001$ . Die bestmöglichen Grenzwerte inklusive der jeweiligen Sensitivität und Spezifität wurden mit ROC-Analysen und dem Youden-Index bestimmt. CMV, Cytomegalievirus; IE-1, „immediate early protein 1“; IFN, Interferon; n.s., nicht signifikant; pp65, 65kDa Phosphoprotein; ROC, „Receiver Operator Characteristics“.

**6.5.1.2 Das Harnstoff-behandelte pp65-Protein induziert die höchsten CMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen, wohingegen die höchsten CMV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat nachweisbar sind**

Um unterscheiden zu können, ob durch die zuvor für den ELISpot verwendeten Antigene CD4 oder CD8 T-Zellen spezifisch aktiviert werden, wurden zusätzlich Antigen-spezifische Stimulationen aus Vollblut mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt. Die Antigen-spezifischen CD4 oder CD8 T-Zellen wurden dabei anhand der Ko-Expression von CD69 und IFN $\gamma$  identifiziert. In Abbildung 43A und B sind von einer CMV-seronegativen und einer CMV-seropositiven Person repräsentative Punktdiagramme für die CD4 und CD8 T-Zellimmunantwort nach Stimulation mit den drei CMV-Antigenen sowie der Negativ- und Positivkontrolle dargestellt. Analog zum ELISpot-Verfahren waren bei CMV-seronegativen Personen nahezu keine CMV-spezifischen CD4 oder CD8 T-Zellen vorhanden (Abbildung 43C). Bei CMV-seropositiven Personen konnten hingegen CMV-spezifische CD4 T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 43D). Dabei war die mediane Frequenz CMV-spezifischer CD4 T-Zellen nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat (Median 1,93%, IQR 3,57%) deutlich höher als mit dem Harnstoff-behandelten pp65 (Median 0,09%, IQR 0,30%). Im Gegensatz dazu wurden nach Stimulation mit dem Harnstoff-behandelten pp65 mehr CMV-spezifische CD8 T-Zellen induziert (Median 0,21%, IQR 0,94%) als mit dem unbehandelten CMV-Lysat (Median 0,14%, IQR 0,46%). Die durch das Harnstoff-behandelte IE-1 induzierten Immunantworten waren sowohl bei den CD4 T-Zellen (Median 0,02%; IQR 0,03%) als auch bei den CD8 T-Zellen gering (Median 0,04%; IQR 0,17%).

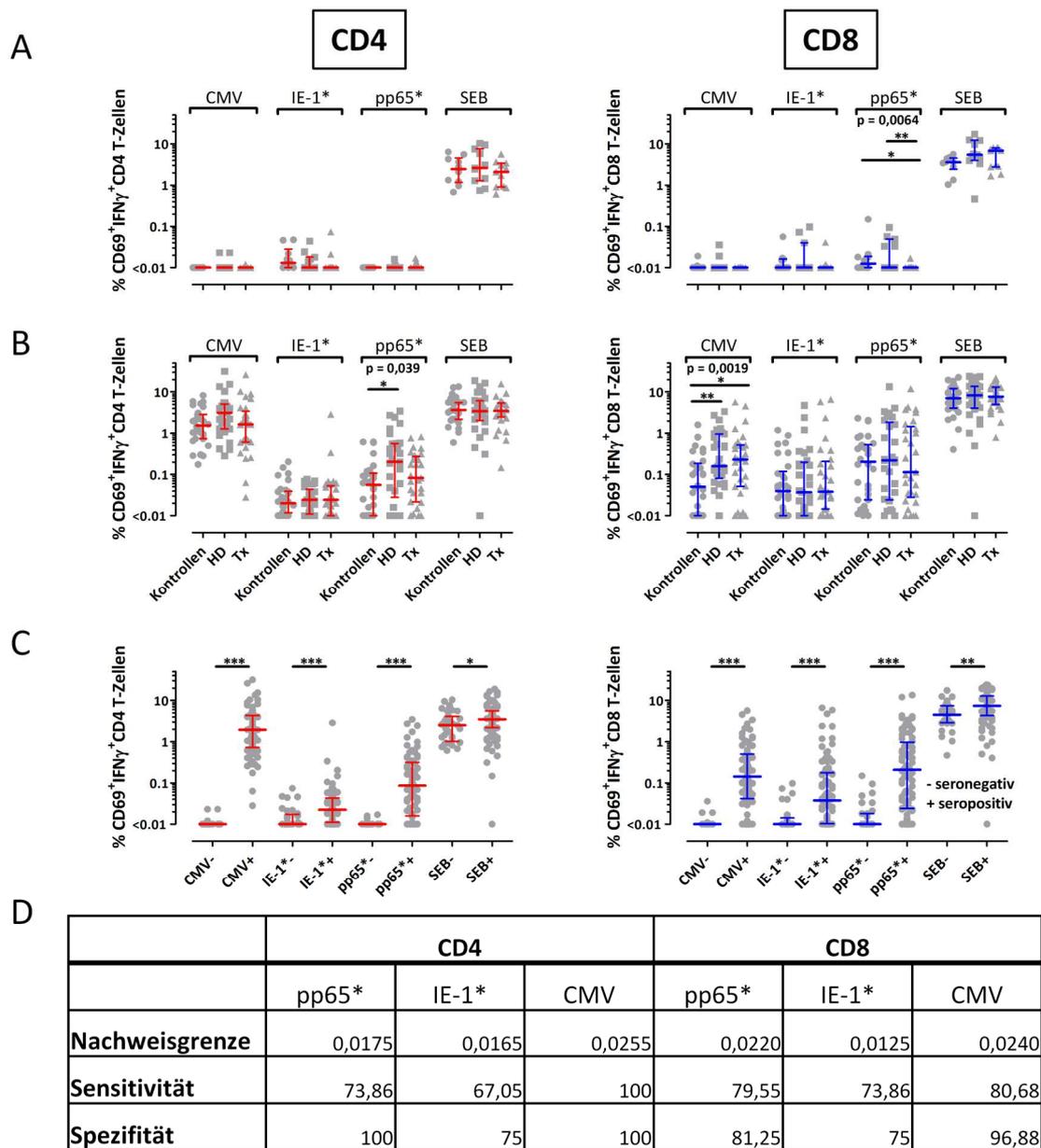


**Abbildung 43: Das Harnstoff-behandelte pp56 induziert mehrheitlich CD8 T-Zellantworten, wohingegen durch das unbehandelte CMV-Lysat deutliche CMV-spezifische CD4 T-Zellantworten induziert werden.** Durchflusszytometrische Analyse CMV-positiver und -negativer Personen hinsichtlich reaktiver (CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) CD4 und CD8 T-Zellen nach Antigen-spezifischer Vollblut-Stimulation. Harnstoff-behandelte Antigen sind durch „\*“ gekennzeichnet. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse eines CMV-negativen (**A**) und eines CMV-positiven Probanden (**B**). In C und D sind die Ergebnisse aller CMV-seronegativen (**C**) und CMV-seropositiven Personen (**D**) dargestellt. Die Querstriche repräsentieren jeweils den Median und den Interquartilsabstand. Statistische Signifikanzen zwischen den Gruppen wurden mit dem Friedman Test und dem Dunn Post-Test berechnet. Signifikanzen im Post-Test wurden mit Sternen angegeben (\*\* für p<0,01, \*\*\* für p<0,001). CMV, Cytomegalievirus; IE-1, „immediate early protein 1“; IFN, Interferon; Ko-Ag, Kontroll-Antigen (Negativkontrolle); pp65, 65kDa Phosphoprotein; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass es wie bei der Verwendung der ELISpot-Methode sowohl bei den CMV-seronegativen als auch bei den -seropositiven Personen mehrheitlich keine relevanten Unterschiede zwischen den Probanden- und Patientengruppen gab (Abbildung 44 A und B). Lediglich in CMV-seronegativen Personen war

die CMV-spezifische CD8 T-Zellfrequenz nach Stimulation mit dem Harnstoff-behandelten pp65 bei Nierentransplantat-Empfängern signifikant niedriger als bei den übrigen Personengruppen ( $p=0,0064$ ). Zudem war die CMV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz CMV-seropositiver Dialysepatienten gegenüber den immungesunden Kontroll-Probanden nach Stimulation mit dem gleichen Antigen leicht erhöht ( $p=0,039$ ), während die CMV-spezifische CD8 T-Zellfrequenz dieser Kontroll-Probanden geringer als in den Patientengruppen war ( $p=0,0019$ ). Da die Personen und Blutproben mit denen der ELISpot-Analyse identisch waren, ist auch hier zu vermerken, dass die Probanden und Patientengruppen eine unterschiedliche Altersverteilung aufwiesen.

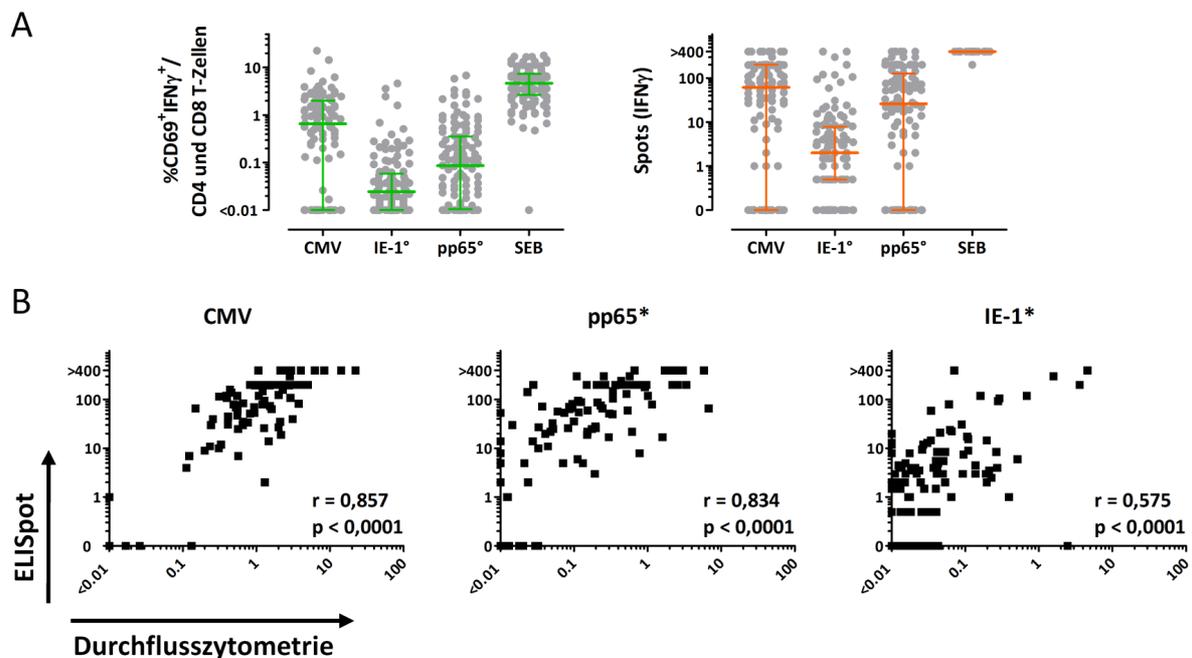
Zur Identifizierung des Antigens mit dem größten diagnostischen Potential, wurden die verschiedenen Antigene hinsichtlich ihres Nutzens zur Diskriminierung von CMV-seronegativen und -seropositiven Personengruppen getestet. Anhand der drei Stimuli konnten jeweils signifikant erhöhte CMV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellfrequenzen in den CMV-seropositiven Personengruppen nachgewiesen werden (Abbildung 44C). Allerdings gab es, analog zum ELISpot-Verfahren deutliche Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität und der Spezifität der verwendeten Stimulanzen (Abbildung 44D). Während nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat anhand der CD4 T-Zellfrequenzen (Sensitivität und Spezifität jeweils 100%) der CMV-Status der zu analysierenden Person eindeutig identifiziert werden konnte, sind die Harnstoff-behandelten Proteine, insbesondere das IE-1, auf CD4-Ebene hierfür deutlich schlechter geeignet. Obwohl nach Stimulation mit dem Harnstoff-behandelten pp65 die höchsten CMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen induziert wurden (s. Abbildung 43D) und die Sensitivität verglichen mit der Analyse der CD4 T-Zellfrequenzen auch etwas höher war (CD4 73,86%; CD8 79,55%, Abbildung 44D), war die Sensitivität und Spezifität auch im Falle der CD8-Analyse erneut nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat am höchsten (Sensitivität 80,68%; Spezifität 96,88%, Abbildung 44D). Die Stimulation mit dem Harnstoff-behandelte IE-1 führte zusätzlich zu den geringen CMV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellfrequenzen auch zu den geringsten Sensitivitäts- und Spezifitätswerten (67,05%–75%) und scheint daher zumindest bei alleiniger Verwendung für die diagnostische Anwendung eher ungeeignet.



**Abbildung 44: Patientengruppen- und CMV-Serostatus-abhängige Analyse der Frequenzen reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation mit Harnstoff-behandelten und unbehandelten Antigenen.** Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von Vollblutproben nach Stimulation mit Harnstoff-behandelten (\*) Proteinen, dem unbehandelten CMV-Lysat sowie dem polyklonalen Stimulus *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB). In CMV-seronegativen (A) und CMV-seropositiven Personen (B) wurden die jeweiligen Frequenzen reaktiver (CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) CD4 (links) und CD8 T-Zellen (rechts) zwischen immungesunden Probanden (Kontrollen), Hämodialyse-Patienten (HD) und Transplantat-Empfängern (Tx) nach Abzug der Negativkontrolle verglichen. (C) Vergleich der reaktiven CD4 (links) und CD8 T-Zellfrequenzen (rechts) zwischen CMV-seronegativen und -seropositiven Personen in Abhängigkeit vom verwendeten Antigen. (D) Sensitivität und Spezifität der Diskriminierung zwischen CMV-positiven und -negativen Personen bei Verwendung der Harnstoff-behandelten Proteine und des unbehandelten CMV-Lysates zur Stimulation von CD4 und CD8 T-Zellen. In (A-C) sind der jeweilige Median und der Interquartilsabstand durch Querstriche dargestellt. Statistische Analysen zwischen den Personengruppen wurden in (A, B) mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Dunn Post-Test und zwischen CMV-negativen und -positiven Personen in (C) mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt. Statistische Unterschiede sind jeweils durch Sterne angegeben (\* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ ). Die bestmögliche Nachweisgrenze für die verschiedenen Antigene inklusive der jeweiligen Sensitivität und Spezifität wurden mit ROC-Analysen und dem Youden-Index bestimmt. CMV, Cytomegalievirus; IE-1, „immediate early protein 1“; IFN, Interferon; pp65, 65kDa Phosphoprotein.

### 6.5.1.3 Die ELISpot-Analyse und die durchflusszytometrische Analyse zeigen bei allen drei Antigenen eine gute Korrelation

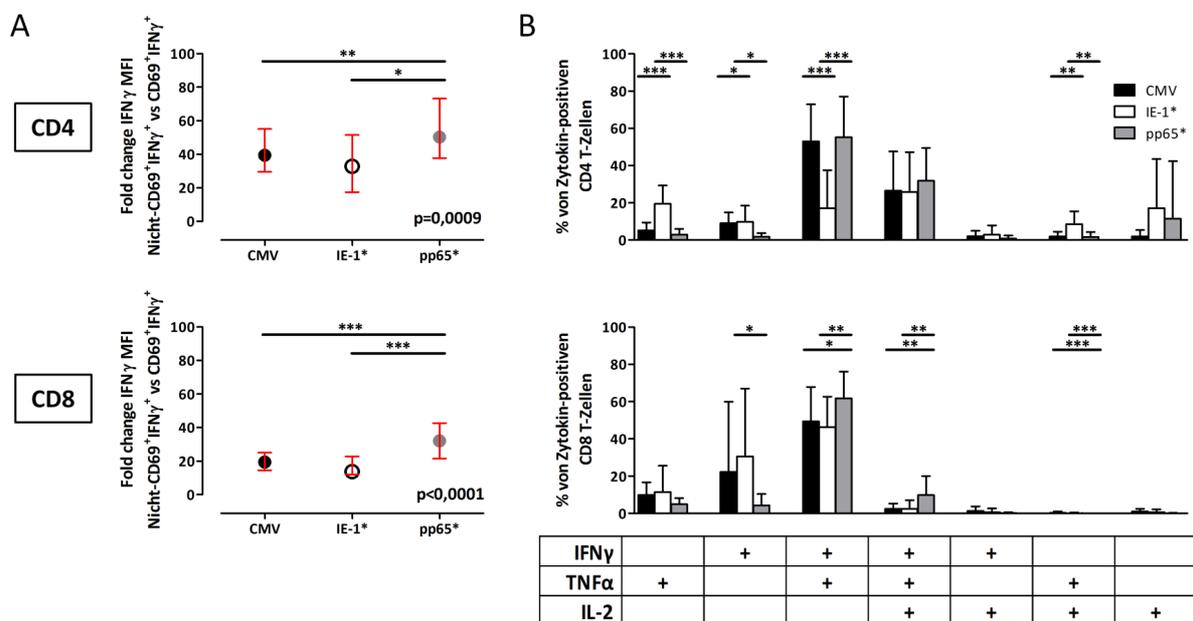
Zum Vergleich der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse mit der ELISpot-Analyse wurden die CD4 und CD8 T-Zellfrequenzen aus der durchflusszytometrischen Bestimmung kombiniert, um eine bessere Übereinstimmung der miteinbezogenen Immunzelltypen der beiden Nachweisverfahren zu erreichen. Diese kombinierten Frequenzen sowie die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen im ELISpot sind in Abbildung 45A dargestellt. Bemerkenswerterweise konnte für alle drei Antigenen eine gute Korrelation nachgewiesen werden ( $p < 0,0001$ ), wobei die höchsten Korrelationskoeffizienten nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat und dem Harnstoff-behandelten pp65 erreicht wurden ( $r = 0,857$  und  $r = 0,834$  Abbildung 45B).



**Abbildung 45: Gute Korrelation der Ergebnisse der ELISpot-Analyse und des durchflusszytometrischen Nachweisverfahrens.** (A) Kombinierte Frequenzen reaktiver (CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) CD4 und CD8 T-Zellen (Durchflusszytometrie) sowie die Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Zellen (ELISpot) nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat, den Harnstoff-behandelten Proteinen (IE-1\* und pp65\*) sowie dem polyklonalen Stimulus SEB. Die jeweiligen Mediane und der Interquartilsabstand sind durch Querstriche angegeben. (B) Korrelation der ELISpot- und Durchflusszytometrie-Ergebnisse nach Stimulation mit CMV, pp65\* und IE-1\*. Die Korrelationen wurden mit dem Spearman Test kalkuliert. CMV, Cytomegalievirus; IE-1, „immediate early protein 1“; IFN, Interferon; pp65, 65kDa Phosphoprotein; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

### 6.5.1.4 Die IFN $\gamma$ -Expressionsstärke und das Zytokinexpressionsprofil der CMV-spezifischen T-Zellen zeigen teilweise signifikante Unterschiede bei Verwendung der verschiedenen CMV-Antigene

Die durchflusszytometrische Analyse bietet im Gegensatz zur ELISpot-Technologie die Möglichkeit, simultan eine Vielzahl unterschiedlicher Parameter zu bestimmen und wurde deshalb verwendet, um potentielle Effekte der Harnstoffbehandlung CMV-spezifischer Proteine detaillierter charakterisieren zu können. Neben der Frequenz IFN $\gamma$ -exprimierender Zellen konnten so zusätzlich die Stärke der IFN $\gamma$ -Expression pro Zelle und die Expression weiterer Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4 und IL-17) nach Stimulation mit den unterschiedlichen Antigenen gemessen werden.



**Abbildung 46:** Die Stimulation mit dem Harnstoff-behandelten pp65-Protein induziert eine stärkere IFN $\gamma$ -Expression, verändert das Zytokinexpressionsprofil CMV-reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen jedoch nicht. Vollblutproben wurden mit unbehandeltem CMV-Lysat und Harnstoff-behandelten (\*) IE-1 und pp65 stimuliert. **(A)** Unterschied („Fold difference“) der IFN $\gamma$  MFI von reaktiven (CD69 $^{+}$ IFN $\gamma^{+}$ ) CD4 bzw. CD8 T-Zellen und den nicht-reaktiven CD4 bzw. CD8 T-Zellen von Proben mit mindestens 20 Antigen-spezifischen T-Zellen. Angegeben sind jeweils der Median und der Interquartilsabstand, der durch Querstriche visualisiert ist. **(B)** Antigen-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen wurden anhand der Expression von IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  in 7 Subgruppen unterteilt. Die Balkendiagramme geben dabei anteilig den Mittelwert und die Standardabweichung dieser Subpopulationen an allen Zytokin-positiven CD4 T-Zellen an. Es wurden in (B) ausschließlich Proben eingeschlossen, bei denen jeweils mindestens 30 Antigen-reaktiven Zellen nachweisbar waren (CD4, n=14; CD8, n=15). Statistische Unterschiede in der IFN $\gamma$  MFI wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Dunn Post-Test berechnet. Die Statistiken der jeweiligen Anteile der Subgruppen Zytokin-exprimierender T-Zellen wurden mit dem Friedman Test und dem Dunn Post-Test berechnet. Statistische Unterschiede sind jeweils durch Sterne angegeben (\* für p<0,05, \*\* für p<0,01, \*\*\* für p<0,001). CMV, Cytomegalievirus; IE-1, „immediate early protein 1“; IFN, Interferon; IL, Interleukin; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; pp65, 65kDa Phosphoprotein; TNF, Tumornekrosefaktor.

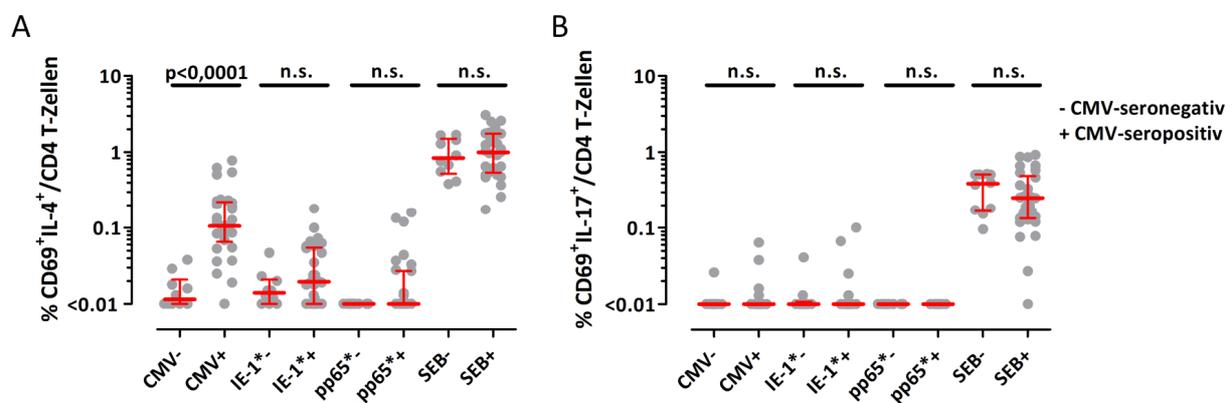
In Abbildung 46A ist das Verhältnis der IFN $\gamma$ -MFI von CMV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen und nicht-CMV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen dargestellt. Um die statistische Validität zu gewährleisten wurden ausschließlich CMV-positive Personen mit mindestens 20 CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 T-Zellen (n=87 für CMV, n=16 für IE-1, n=49 für pp65) bzw. CD8 T-Zellen (n=60, n=33, n=58) in die Analyse eingeschlossen. Interessanterweise war nach Stimulation mit dem Harnstoff-behandelten pp65 der „Fold difference“ der IFN $\gamma$ -MFI bei CD4 und CD8 T-Zellen, im Vergleich zu den anderen beiden Stimuli signifikant höher ( $p=0,0009$ ;  $p<0,0001$ ), was die erhöhte IFN $\gamma$ -Expression pro CMV-spezifische T-Zelle überzeugend widerspiegelt.

Um die Frage zu beantworten, ob sich das Zytokinexpressionsprofil der CMV-spezifischen T-Zellen nach Stimulation mit den drei Antigenen unterscheidet, wurden lediglich die CMV-positiven Personen in die Analyse miteinbezogen, die bei allen 3 Stimuli mindestens 30 Zytokin-positive CD4 und CD8 T-Zellen aufwiesen (CD4, n=11 Personen; CD8, n=15 Personen). Die Analyse des Zytokinexpressionsprofil ergab, dass die induzierte Zytokinexpression CMV-spezifischer CD4 T-Zellen nach Stimulation mit dem CMV-Lysat und dem pp65 nahezu gleich war, wohingegen nach Stimulation mit IE-1 vor allem der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD4 T-Zellen deutlich geringer und der Anteil TNF $\alpha$ <sup>(einfach)+</sup> CD4 T-Zellen signifikant erhöht war (Abbildung 46B). Die IL-2-Expression von CD8 T-Zellen ist bekanntermaßen gering und so war auch unter Verwendung der drei unterschiedlichen Stimuli das Zytokinexpressionsmuster dieser CMV-spezifischen Immunzellen mehrheitlich durch die Expression der Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  charakterisiert. Auffällig ist jedoch, dass die durch pp65 induzierte Immunantwort einen signifikant geringeren Anteil ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierender und einen jeweils leicht erhöhten Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8 T-Zellen aufwies. Insgesamt zeigten jedoch vor allem das Harnstoff-behandelte pp65 und das CMV-Lysat besonders bei der CMV-spezifischen CD4 T-Zellantwort eine hohe Übereinstimmung in dem von ihnen induzierten Zytokinexpressionsprofil.

#### ***6.5.1.5 CMV-spezifische T<sub>h</sub>2-Zellen, aber nicht T<sub>h</sub>17-Zellen können bei CMV-positiven Personen unter Verwendung des CMV-Lysates nachgewiesen werden***

Zusätzlich zur Analyse der CD8 Immunantwort und der CD4 T-Zellen der Subklasse T<sub>h</sub>1 wurden in den 40 immungesunden Kontroll-Probanden die durch die verschiedenen Antigene induzierte CMV-spezifische Zytokinexpression der Th2- und T<sub>h</sub>17-Immunzellen charakterisiert. Die spezifischen Zellen wurden dabei anhand der Ko-Expression des

Aktivierungsmarkern CD69 und des Zytokins IL-4 (T<sub>h</sub>2) bzw. IL-17 (T<sub>h</sub>17) identifiziert. In Abbildung 47 sind die CMV-spezifischen T<sub>h</sub>2- und T<sub>h</sub>17-Frequenzen aller seronegativen und seropositiven Probanden dargestellt. Unter Verwendung der beiden Harnstoff-behandelten CMV-Proteine konnten CMV-positive und CMV-negative Probanden weder anhand der CMV-spezifischen T<sub>h</sub>2- noch der T<sub>h</sub>17-Frequenz diskriminiert werden. Das IL-17-Expressionslevel war nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat ebenfalls in beiden Gruppen gleich. Interessanterweise konnten jedoch anhand des CMV-Lysates signifikant erhöhte CMV-spezifische T<sub>h</sub>2-Frequenzen in den CMV-positiven Probanden identifiziert werden ( $p < 0,0001$ ). Allerdings waren diese Frequenzen jedoch deutlich geringer als die Frequenzen der CMV-spezifischen Th1-Immunantwort (Median 0,11%; IQR 0,16%). Obwohl bei einer Nachweisgrenze von 0,046% die Sensitivität und Spezifität mit 83,33% und 100% eine gute Übereinstimmung mit dem CMV-Serostatus erreichten, blieben sie dennoch unterhalb der Werte der durch das CMV-Lysat induzierten CMV-spezifischen T<sub>h</sub>1-Immunantwort (s. Abbildung 44D; jeweils 100%). Die Harnstoffbehandlung der beiden CMV-Proteine wirkte sich hingegen nicht auf die T<sub>h</sub>2- und T<sub>h</sub>17-Immunantwort aus.

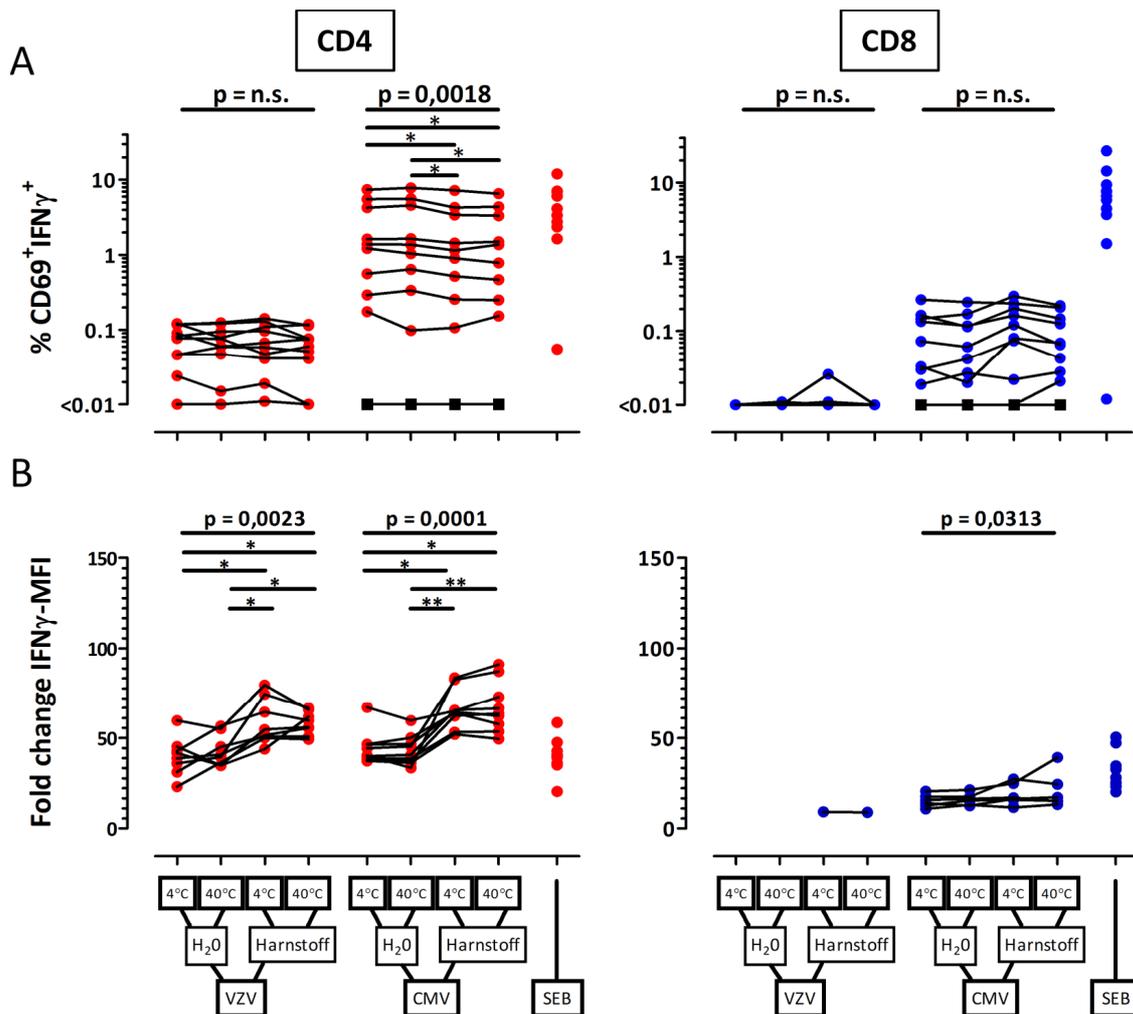


**Abbildung 47: Nur das unbehandelte CMV-Lysat induziert in CMV-seropositiven Personen eine deutliche T<sub>h</sub>2-Immunantwort, wohingegen eine CMV-spezifische T<sub>h</sub>17-Immunantwort bei allen drei Antigenen ausbleibt.** Vollblutproben von immungesunden Probanden (10 CMV-seronegative und 30 CMV-seropositive Probanden) wurden mit Harnstoff-behandelten Proteinen (IE-1\* und pp65\*), einem unbehandelten CMV-Lysat und dem polyklonalen Stimulus SEB stimuliert. Die Frequenzen reaktiver T<sub>h</sub>2-Zellen (CD69<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, (A)) und T<sub>h</sub>17-Zellen (CD69<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>, (B)) wurden jeweils zwischen CMV-seronegativen und -seropositiven immungesunden Personen verglichen. Die jeweiligen Mediane und Interquartilsabstände sind durch Querstriche angegeben. Statistische Unterschiede wurden jeweils mit dem Mann-Whitney Test berechnet. CMV, Cytomegalievirus; IE-1, „immediate early protein 1“; IL, Interleukin; pp65, 65kDa Phosphoprotein; n.s., nicht signifikant; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

### **6.5.2 Die Temperatur-abhängige Harnstoffbehandlung kommerziell erhältlicher Lysate hat keinen positiven Effekt auf die induzierten VZV- bzw. CMV-spezifischen T-Zellfrequenzen**

Der potentielle positive Effekt der Harnstoffbehandlung einzelner Proteine auf die CMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort scheint begrenzt zu sein und wirft die Frage auf, ob die Harnstoffbehandlung gesamter Zelllysate, die ohne Harnstoffbehandlung zu einer sehr hohen CD4-Reaktivität führen (s. Abbildung 43D), ebenfalls zu einer verbesserten Induktion von CD8 T-Zellen führen würde. Da potentielle Effekte auf die Antigen-spezifische CD8-Immunantwort möglicherweise erst durch Aufsummierung der positiven Effekte nach Stimulation mit einer Vielzahl Harnstoff-behandelter Erreger-spezifischer Proteine nachweisbar werden könnten, wurden in diesem Versuchsteil ein CMV-Lysat und ein VZV-Lysat desselben Herstellers (Virion/Serion) einer Harnstoffbehandlung unterzogen. Um die Versuchsbedingungen zu optimieren, wurde die Antigen-Behandlung (Lösen des lyophilisierten Antigens in Harnstoffpuffer bzw. PBS) zusätzlich bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C und 40°C) durchgeführt. Insgesamt wurden die induzierten CMV- und VZV-spezifischen zellulären Immunantworten von 10 immungesunden Kontroll-Probanden mit bekannten Serostatus analysiert (10 VZV-IgG-positiv; 9 CMV-IgG-positiv; s. Tabelle 6 Patientencharakteristika, Teil2).

Wie aus Abbildung 48A deutlich ersichtlich ist, konnten die induzierten VZV- bzw. CMV-spezifischen T-Zellfrequenzen weder alleine durch die Harnstoffbehandlung der beiden Lysate noch durch die Veränderung der Temperatur während der Harnstoffbehandlung gesteigert werden ( $p$ -Wert jeweils  $>0,05$ ). Im Gegensatz zu den Erwartungen konnte sogar ein leichter Rückgang der CMV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen nach Stimulation mit den Harnstoff-behandelten Antigenen nachgewiesen werden ( $p=0,0018$ ). Insbesondere bei den CD8 T-Zellen, bei denen eine Steigerung der induzierten Frequenzen durch die Stimulation mit Harnstoff-behandelten Lysaten erhofft wurde, blieben die Erreger-spezifischen Frequenzen sehr niedrig. Obwohl kein positiver Effekt auf die Frequenzen der Erreger-spezifischen T-Zellen identifiziert werden konnte, war jedoch erneut ein Anstieg der IFN $\gamma$ -Expression pro Zelle (IFN $\gamma$ -MFI) bei den Erreger-spezifischen T-Zellen messbar (Abbildung 48B). Bei den VZV-spezifischen CD8 T-Zellen war aufgrund der geringen Anzahl CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen diesbezüglich keine Aussage möglich.



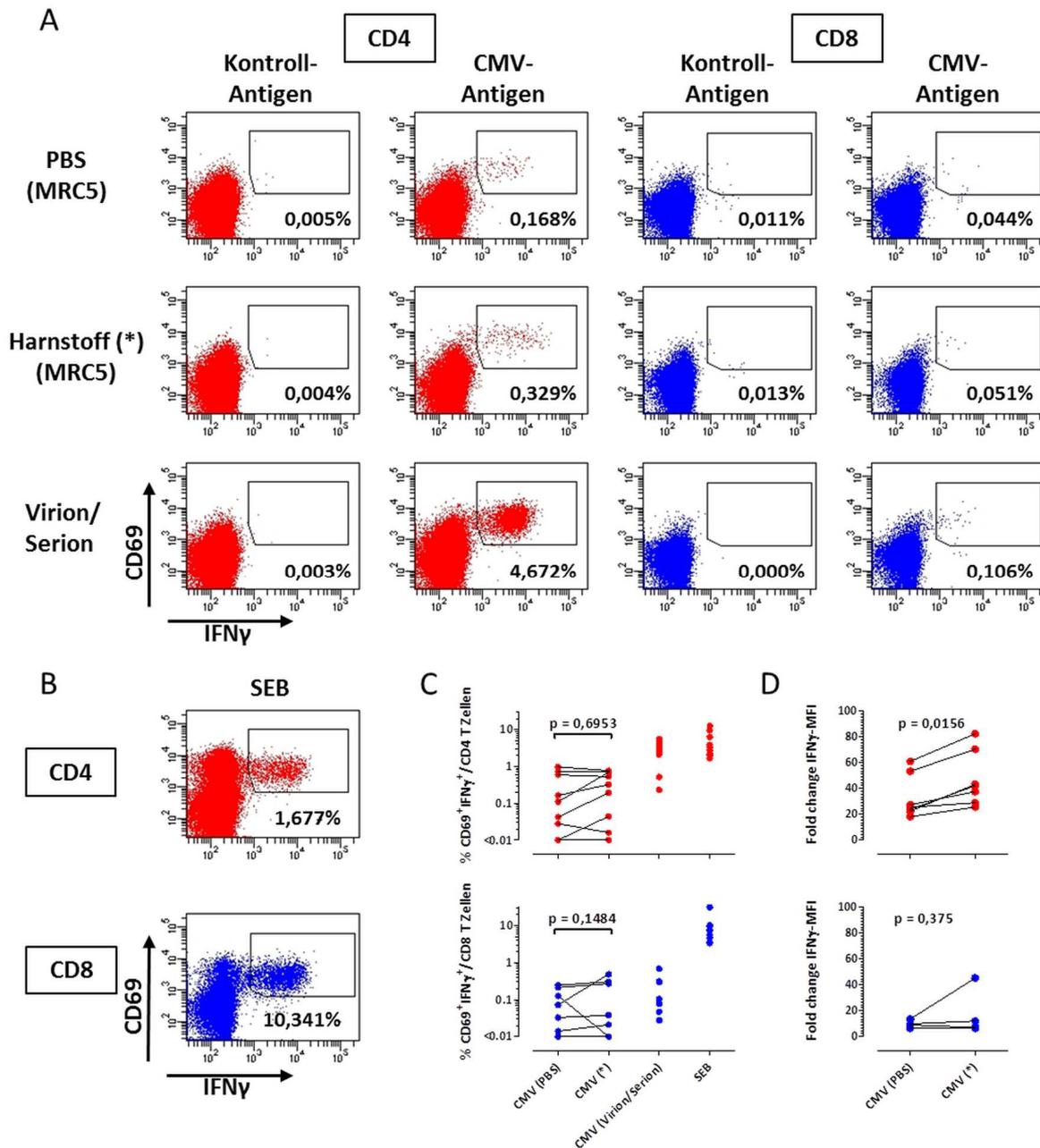
**Abbildung 48:** Die Harnstoffbehandlung je eines kommerziellen VZV- und CMV-Lysates hat keinen Einfluss auf die Antigen-spezifische CD4 und CD8 T-Zellfrequenz, scheint jedoch zu einem Anstieg der IFN $\gamma$ -Expression pro reaktive CD4 T-Zelle zu führen. Vollblutproben von 10 immungesunden Probanden wurden mit Harnstoff-behandeltem und unbehandeltem VZV- und CMV-Lysat sowie dem polyklonalen Stimulus SEB stimuliert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur (4°C bzw. 40°C) während dem Lösen der lyophilisierten Lysate analysiert. **(A)** Vergleich der VZV-spezifischen und CMV-spezifischen CD4 (links) bzw. CD8 T-Zellfrequenzen (rechts). **(B)** Unterschied („Fold difference“) der IFN $\gamma$ -MFI von reaktiven (CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) CD4 bzw. CD8 T-Zellen und den nicht-reaktiven CD4 bzw. CD8 T-Zellen von Proben mit mindestens 20 Antigen-spezifischen T-Zellen. Die CMV-seronegative Probandin ist durch schwarze Symbole (Quadrate) gekennzeichnet und wurde für die statistische Analyse ausgeschlossen. Für die statistischen Analysen wurde jeweils der Friedman Test mit dem Dunn Post-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im Post-Test werden durch Sterne angegeben (\* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ ). CMV, Cytomegalievirus; IFN, Interferon; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; n.s., nicht signifikant; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; VZV, Varizella-Zoster Virus.

### **6.5.3 Vergleichende Analyse zweier CMV-Lysate mit und ohne Harnstoffbehandlung und Immunogenitätsbestimmung des pp65- und IE-1-Proteins unter Verwendung von Virus-Deletionsmutanten**

Um auszuschließen, dass die Zusatzstoffe, die den kommerziellen Lysaten während der Produktion zur Verlängerung der Haltbarkeit hinzugefügt wurden, die Wirkung der Harnstoffbehandlung verhindern, wurde ein weiteres CMV-Lysat ohne diese Zusatzstoffe ausgetestet. Dieses wurde inklusive der entsprechenden Negativkontrolle zu Forschungszwecken freundlicherweise von einem Kooperationspartner (Dr. Christina Paulus und Dr. Michael Nevels, Universität Regensburg über Lophius Biosciences) unter Verwendung einer MRC5-Zelllinie hergestellt. In 10 CMV-seropositiven und 2 seronegativen Personen (s. Tabelle 6, Patientencharakteristika, Teil 3) wurde die Immunogenität dieses Lysates und des unbehandelten kommerziellen CMV-Lysat (Virion/Serion) analysiert.

In Abbildung 49A und B sind anhand von Punktdiagrammen die Antigen-spezifischen und polyklonalen CD4 und CD8 T-Zellfrequenzen eines CMV-positiven Probanden nach Stimulation mit dem unbehandelten und Harnstoff-behandelten CMV-Lysat (MRC5-Zelllinie), dem kommerziellen Lysat (Virion/Serion) und dem polyklonalen Stimulus SEB exemplarisch dargestellt. Die CMV-spezifischen T-Zellfrequenzen sowie die Frequenzen SEB-reaktiver Zellen der 10 CMV-positiven Personen sind in Abbildung 49C aufgeführt. Die 2 CMV-seronegativen Probanden zeigten wie erwartet bei den CD4 und CD8 T-Zellen ausschließlich eine Reaktion in der Positivkontrolle (nicht dargestellt).

Erneut war bei den CMV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellfrequenzen keine generelle Steigerung nach Stimulation mit dem Harnstoff-behandelten CMV-Lysat zu beobachten ( $p=0,6953$ ;  $p=0,1484$ ), da nur bei 4 von 10 Personen bei den CD4 T-Zellen und bei einer von 10 Personen bei den CD8 T-Zellen eine deutlich höhere CMV-spezifischen Frequenz nachgewiesen werden konnte. Zudem fällt auf, dass die CMV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen nach Stimulation mit dem Harnstoff-behandelten Lysat deutlich niedriger waren (Abbildung 49C).

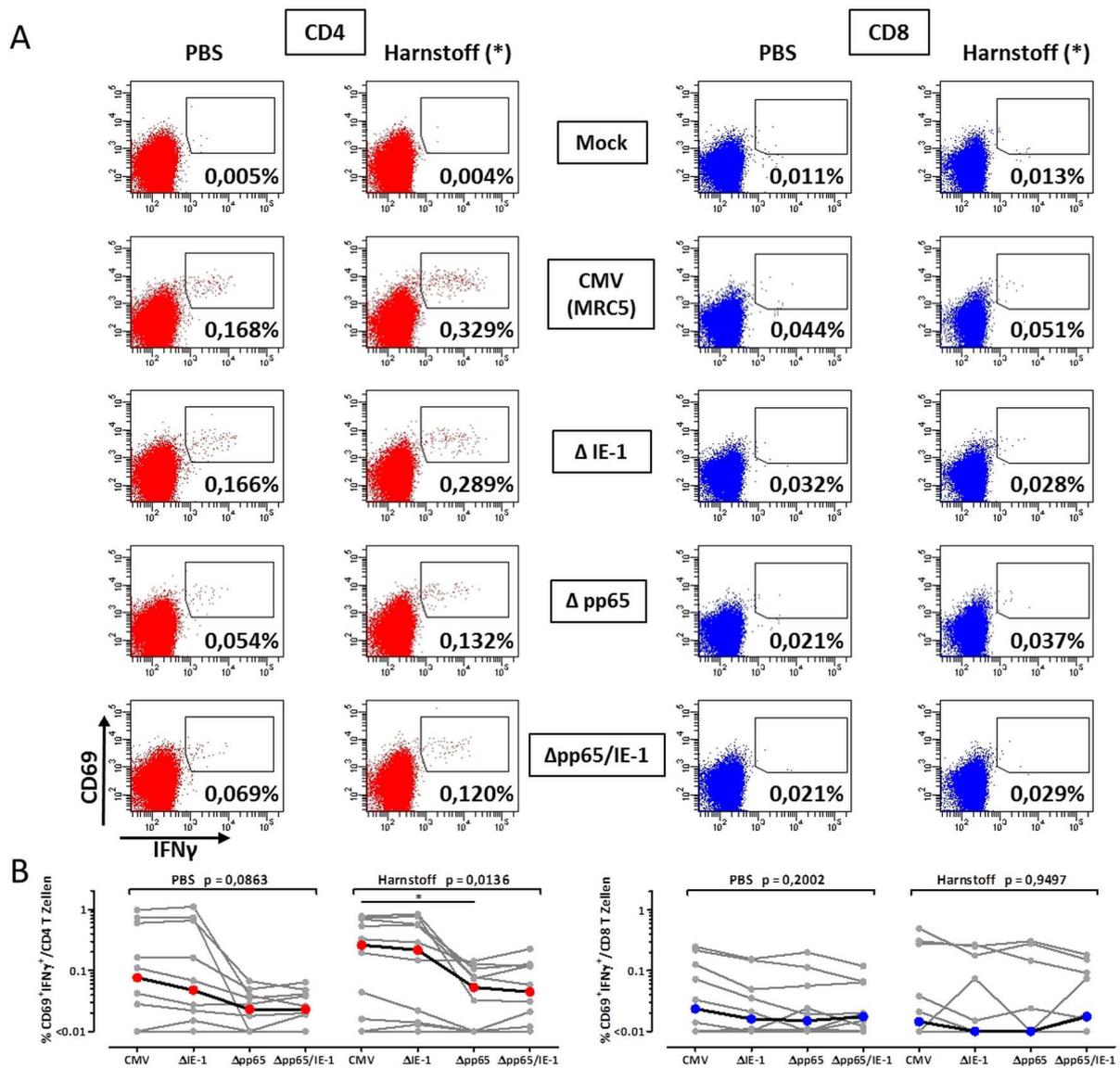


**Abbildung 49: Die Harnstoffbehandlung hat bei einem anderen CMV-Lysat überwiegend ebenfalls keinen Einfluss auf die CMV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellfrequenz.** Vollblutproben von 10 CMV-seropositiven immungesunden Probanden wurden mit einem unbehandelten (PBS) und einem Harnstoff-behandelten CMV-Antigen (\*) (jeweils MRC5-Zelllinie), sowie dem kommerziellen CMV-Antigen (Virion/Serion) stimuliert. Als Negativkontrollen wurden die jeweils nicht mit CMV infizierten Kontroll-Lysate verwendet. Als Positivkontrolle diente der polyklonale Stimulus SEB. **(A)** Repräsentative Ergebnisse der Antigen-spezifischen CD4 (rot) und CD8 T-Zellfrequenzen (blau). **(B)** Repräsentatives Ergebnis nach Stimulation mit SEB. Die Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf den Anteil CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 bzw. CD8 T-Zellen an der jeweiligen gesamten CD4 bzw. CD8 T-Zellpopulation. **(C)** Antigen-spezifische Frequenzen der 10 analysierten immungesunden Probanden. **(D)** Unterschied („Fold difference“) der IFN $\gamma$ -MFI von reaktiven (CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) CD4 bzw. CD8 T-Zellen und den nicht-reaktiven CD4 bzw. CD8 T-Zellen von Proben mit mindestens 20 Antigen-spezifischen T-Zellen. CMV, Cytomegalievirus; IFN, Interferon; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

Insgesamt konnte somit auch unter Verwendung des zu Forschungszwecken produzierten und Harnstoff-behandelten Antigens keine Steigerung der CMV-spezifischen CD4 und CD8

T-Zellfrequenzen induziert werden. Interessanterweise konnte jedoch auch bei diesen Lysaten eine signifikante Steigerung der IFN $\gamma$ -Expression pro CD4, aber nicht pro CD8 T-Zelle nachgewiesen werden, wenngleich die Personenzahl eher gering war ( $p=0,0156$  bzw.  $p=0,375$ ; Abbildung 49D).

Um den Beitrag der beiden CMV-Proteine pp65 und IE-1 für die Immunogenität der CMV-Lysate zu analysieren, wurden neben den Wildtyp-CMV-infizierten MRC5-Zelllysaten auch Lysate von MRC5-Zelllinien hergestellt und verwendet, die mit CMV-Mutanten mit Deletionen für das Protein pp65 und/oder IE-1 infiziert wurden. Als Negativkontrolle diente erneut ein Lysat nicht-infizierter MRC5-Zellen und es wurden wiederum alle Lysate mit und ohne Harnstoffbehandlung zur Stimulation verwendet. Die jeweiligen Antigen-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen eines CMV-positiven Probanden sind in Abbildung 50A anhand von Punktdiagrammen repräsentativ dargestellt. Abbildung 50B zeigt die CMV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellfrequenzen der 10 CMV-positiven Personen nach Stimulation mit dem Wildtyp-CMV-Lysat und den CMV-Lysaten mit den verschiedenen Deletionen. Obwohl die durch diese Lysate induzierten CMV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellfrequenzen, wie zuvor gezeigt, verglichen mit dem kommerziellen Lysat eher gering waren und bei einem Teil der CMV-seropositiven Personen keine bzw. nur geringe CMV-spezifische T-Zellfrequenzen induziert werden konnten, waren bei den CD4 T-Zellen von Personen mit höheren CMV-spezifischen T-Zellfrequenzen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Lysaten feststellbar. Während die mediane CMV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz nach Stimulation mit dem Wildtyp-CMV-Lysat gegenüber dem Lysat mit IE-1-Deletion nur leicht höher war, wurden bei Fehlen des Proteins pp65 ( $\Delta pp65$  oder  $\Delta pp65/IE-1$ ) deutlich geringere CMV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen gemessen. Dieser Effekt trat unabhängig von der Harnstoffbehandlung der Lysate auf, wobei nach Stimulation mit den Harnstoff-behandelten Lysaten sogar ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der pp65-Deletion nachgewiesen werden konnte. Bei den CD8 T-Zellen war hingegen kein deutlicher Effekt der Deletionen messbar, da die induzierten CMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen nach Stimulation mit dem Wildtyp-CMV zu gering waren um eine weitere signifikante Reduktion dieser Frequenz identifizieren zu können.



**Abbildung 50: Analyse der durch CMV-Deletionsmutanten induzierten CMV-spezifischen Immunantworten zur Bestimmung der Immunogenität von pp65 und IE-1.** Vollblutproben von 10 CMV-seropositiven Personen wurden mit einer Negativkontrolle (ohne Antigen (Mock)), dem CMV-Antigen, dem IE-1-defizienten CMV-Antigen ( $\Delta$  IE-1), dem pp65-defizienten CMV-Antigen ( $\Delta$  pp65) und dem IE-1/pp65-defizienten CMV-Antigen ( $\Delta$  pp65/IE-1) stimuliert. Dabei wurde jeweils zwischen unbehandelten und Harnstoff-behandelten Antigenen (jeweils MRC5-Zelllinie) unterschieden. **(A)** Repräsentative Ergebnisse der jeweiligen Antigen-spezifischen CD4 bzw. CD8 T-Zellfrequenzen. Die Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf den Anteil CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 bzw. CD8 T-Zellen an der jeweiligen gesamten CD4 bzw. CD8 T-Zellpopulation. **(B)** Ergebnis der 10 CMV-seropositiven Personen. Der Einfluss der Deletionen auf die induzierte CMV-spezifische Immunantwort wurde jeweils mit dem Friedman Test und dem Dunn Post-Test berechnet. Signifikanzen im Post-Test sind durch Sterne angegeben (\* für p<0,05). CMV, Cytomegalievirus; IE-1, „immediate early protein 1“; IFN, Interferon; pp65, 65kDa Phosphoprotein; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass durch die Verwendung des Harnstoff-behandelten pp65 deutliche CMV-spezifische CD8 T-Zellantworten induziert werden konnten. Bei den hier verwendeten Harnstoff-behandelten CMV-infizierten Zelllysaten war eine Übertragung dieses Effektes auf das gesamte Lysat allerdings bislang nicht erfolgreich.

## 7 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die VZV-spezifische Immunantwort in immunkompetenten und immunsupprimierten Personen hinsichtlich charakteristischer immunologischer Veränderungen während akuter VZV-Reaktivierungen analysiert. In einer ausgewählten Patientengruppe mit rheumatischen Erkrankungen wurde zudem der Einfluss der anti-rheumatischen und/oder immunsuppressiven Therapie auf die VZV-spezifische Immunantwort detailliert analysiert. Durch die Entwicklung eines neuen Analyseverfahrens konnte der Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten verbessert werden, sodass Immunzellen aus CSF und Blut von Patienten mit einer Infektion bzw. Entzündung des ZNS hinsichtlich der Antigen-Spezifität vergleichend analysiert werden konnten. Des Weiteren wurde eine quantitative und qualitative Charakterisierung der HSV-spezifischen Immunantwort in einem immungesunden und immunsupprimierten Personenkollektiv durchgeführt und mit den spezifischen Immunantworten von Personen mit einer akuten HSV- bzw. VZV-Reaktivierung verglichen. Zuletzt wurde der Einfluss der Harnstoffbehandlung einzelner CMV-Proteine und gesamter CMV-infizierter Zellysate auf die simultane Induktion CMV-spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen in verschiedenen Personenkollektiven analysiert.

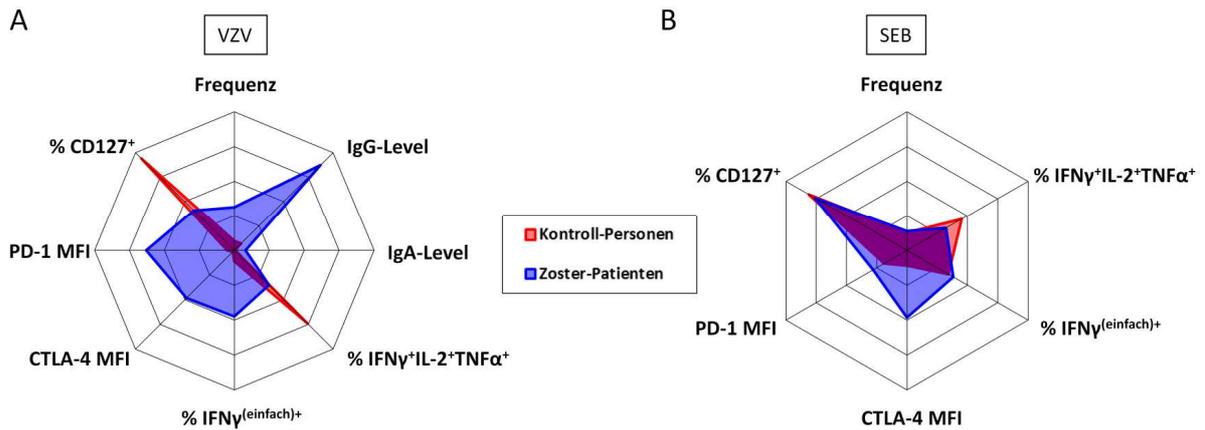
Somit wurde einerseits die spezifische Immunantwort gegen verschiedene Herpesviren in unterschiedlichen klinisch relevanten Situationen charakterisiert. Andererseits konnten in dieser Arbeit Methoden zur Charakterisierung und Analyse spezifischer T-Zellen etabliert bzw. auf ihre Anwendbarkeit und klinische Aussagekraft getestet werden. Die Ergebnisse der einzelnen Teilaspekte werden nun im Folgenden diskutiert.

### **7.1 Phänotyp und Funktionalität der VZV-spezifischen Immunantwort in Phasen ohne oder mit akuter VZV-Replikation**

Die hohe Durchseuchung der Bevölkerung mit VZV konnte in dieser Arbeit einmal mehr bestätigt werden. Während die Prävalenz VZV-spezifischer T-Zellen und IgGs in nicht-symptomatischen immungesunden Probanden sehr hoch ist und die Frequenz und Levels signifikant mit dem Alter der Probanden zusammenhängen, sind wie erwartet nahezu alle nicht-symptomatischen immungesunden Probanden IgA-negativ. Typischerweise ist die VZV-

spezifische CD4 T-Zellantwort bei nicht-symptomatischen Personen durch ein hohes Maß an Multifunktionalität gekennzeichnet, die durch die simultane Expression von IFN $\gamma$ , IL-2 and TNF $\alpha$  gewährleistet wird. Die VZV-spezifische Immunantwort nicht-symptomatischer immunsupprimierter Patienten weist hingegen sowohl leicht geringere Frequenzen als auch eine geringe Beeinträchtigung der Zytokinexpression auf, was die erhöhte Anfälligkeit dieser Patienten für VZV-Reaktivierungen erklären könnte (GOURISHANKAR et al., 2004; MCDONALD et al., 2009). Die Proliferationsfähigkeit der VZV-spezifischen T-Zellen blieb jedoch im Vergleich zu der immungesunder Probanden unverändert und war somit auch trotz geringerer Frequenzen im Blut eher hoch. Allerdings muss hier vermerkt werden, dass die Proliferationsexperimente aus technischen Gründen mit einem anderen VZV-Antigen durchgeführt wurden als die 6h-Stimulationsexperimente aus Vollblut. Zudem besteht die Möglichkeit, dass kreuzreaktive T-Zellen für einen Teil dieser hohen Proliferation verantwortlich sein könnten.

Eine akute VZV-Reaktivierung geht interessanterweise mit reversiblen charakteristischen immunologischen Veränderungen in der VZV-spezifischen Immunantwort einher, die in Abbildung 51A schematisch zusammengefasst sind. So zeigen Patienten mit akutem Herpes Zoster neben höheren IgG- und IgA-Levels signifikant höhere VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen. Darüber hinaus zeigen die Zellen Charakteristika einer funktionellen Beeinträchtigung, die durch eine Einschränkung der Zytokinexpression, eine verringerte Expression des Differenzierungsmarkers CD127 und die Hochregulierung von inhibitorischen Molekülen wie CTLA-4 und PD-1 gekennzeichnet ist. Zusammenfassend ermöglichen diese Parameter eine eindeutige Diskriminierung von nicht-symptomatischen Probanden und Personen mit akutem Herpes Zoster. Diese Unterschiede sind demgegenüber nicht bei SEB-reaktiven CD4 T-Zellen zu finden, bei denen die Parameter weitestgehend vergleichbare Ergebnisse zeigten (Abbildung 51B).



**Abbildung 51: Zusammenfassung der markanten Unterschiede zwischen der VZV-spezifischen Immunantwort von nicht-symptomatischen Personen und Zoster-Patienten.** Das Netzdiagramm vergleicht VZV-spezifische immunologische Marker zwischen gleichaltrigen nicht-symptomatischen immungesunden Kontroll-Personen (rot) und Zoster-Patienten (blau). Dabei wurde für beide Gruppen jeweils die gleiche Anzahl an Messwerten verwendet. Zur Normierung der Daten jedes Markers wurden jeweils die Werte beider Gruppen zusammengefasst und die errechnete 5% Perzentile als Minimalwert bzw. die 95% Perzentile als Maximalwert definiert. Für beide Gruppen wurden jeweils die normierten Mittelwerte der einzelnen Marker nach VZV-spezifischer (A) und polyklonaler Stimulation (SEB; B) bestimmt und im Netzdiagramm dargestellt. Die VZV-spezifische Immunantwort von Patienten mit akutem Herpes Zoster weist dabei sowohl eine erhöhte VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz als auch erhöhte VZV-IgG- und IgA-Levels auf. Neben den quantitativen Veränderungen in diesen Personen konnten zudem charakteristische Veränderungen im Zytokinprofil identifiziert werden. Während der Anteil multifunktionseller (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>) VZV-spezifischer CD4 T-Zellen reduziert ist, ist der Anteil ausschließlich IFN $\gamma$ -produzierender Zellen deutlich erhöht. Zudem kommt es während einer akuten VZV-Reaktivierung zu einem signifikanten Anstieg der CTLA-4- und PD-1-Expression, wohingegen die CD127-Expression auf den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen vermindert ist. Die Quantität, Funktionalität und der Phänotyp der SEB-reaktiven CD4 T-Zellen unterscheidet sich hingegen kaum zwischen Gesunden und Patienten mit Herpes Zoster. Lediglich die CTLA-4- und PD-1-Expressionen sind leicht erhöht.

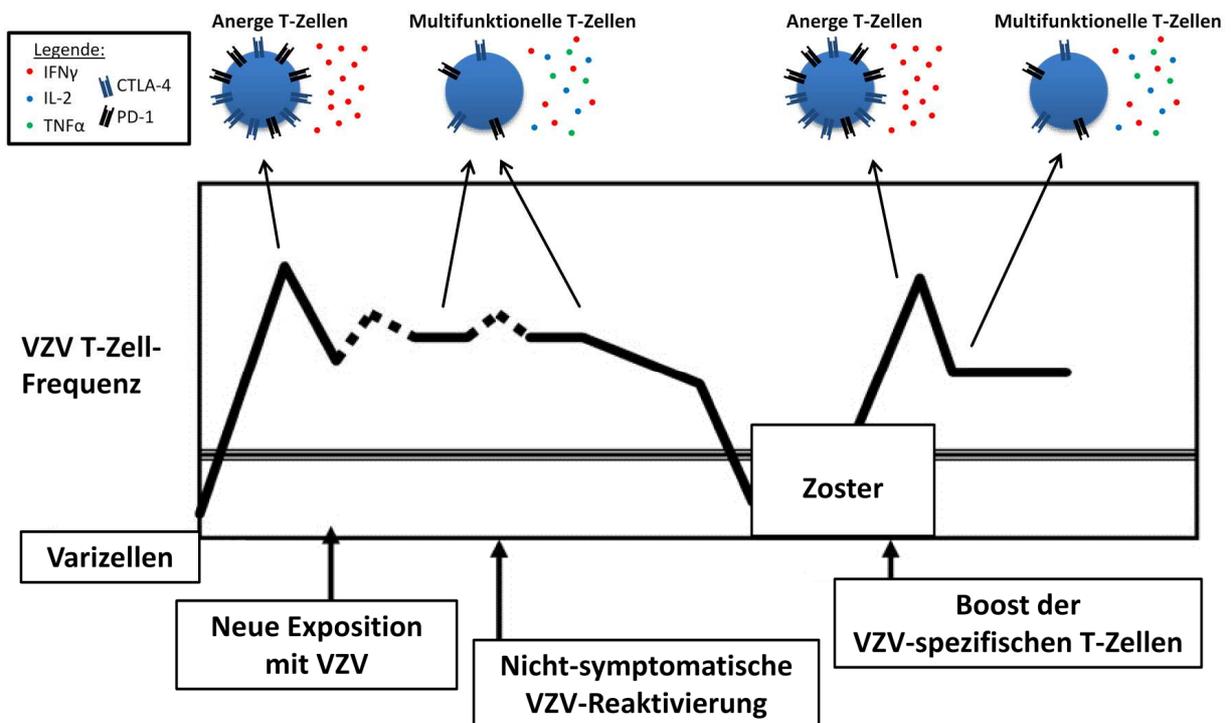
Die Höhe der VZV-spezifischen T-Zellfrequenz und des IgG-Levels ist vom zeitlichen Abstand zur Primärinfektion und Auffrischungen der Immunantwort durch erneute Exposition aus der Umwelt sowie von der generellen Immunkompetenz der jeweiligen Person abhängig (ARVIN, 1992; LEVIN et al., 2003). In dieser Arbeit blieben die IgG-Levels im Alter auf einem konstant hohen Level, während bei einigen älteren Probanden ein Absinken der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz festgestellt werden konnte. Diese verringerte T-Zellfrequenz wurde bereits zuvor bei Personen >60 Jahren nachgewiesen und kann ursächlich mit dem häufigeren Auftreten von Reaktivierungsereignissen bei diesen Personen assoziiert werden (LEVIN et al., 2003; PATTERSON-BARTLETT et al., 2007; LEVIN et al., 2008). Die Tatsache, dass bei immunsupprimierten Patienten ebenfalls geringere VZV-spezifische T-Zellfrequenzen vorhanden sind und die Zosterrate und VZV-bedingte Morbidität bei diesen Patienten ebenfalls hoch sind, unterstützt die Bedeutung der T-Zellen für eine effektive Erregerkontrolle zusätzlich (GOURISHANKAR et al., 2004; PARK et al., 2004; VOSSEN et al., 2004).

Die funktionellen und phänotypischen Analysen offenbarten bei Patienten mit akutem Zoster eine Verschiebung der Zytokinexpression hin zu mehrheitlich ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierenden T-Zellen. Diese eingeschränkte Zytokinexpression konnte auch bereits bei Antigen-spezifischen T-Zellen gegen andere Erreger wie z.B. *M. tuberculosis*, Influenzavirus, HIV, BK Polyomavirus und CMV beobachtet werden und war mit einer hohen Viruslast und symptomatischen Erkrankungen assoziiert (PANTALEO, HARARI, 2006; SESTER et al., 2008b; SESTER et al., 2011; SCHMIDT et al., 2012; SCHMIDT et al., 2014a). Die Herabregulierung von CD127 während eines akuten Herpes Zoster ist zudem eine weitere immunologische Veränderung, die auch auf den Influenzavirus-spezifischen T-Zellen nach einer Influenza-Impfung nachweisbar ist (SCHMIDT et al., 2012). Die verstärkte Expression der inhibitorischen Moleküle CTLA-4 und PD-1 könnte zum einen das Ergebnis eines physiologischen Mechanismus des Immunsystems sein, um die Expansion der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen zu regulieren (RILEY, JUNE, 2005). Darüber hinaus könnte die erhöhte Expression dieser mit funktioneller Anergie assoziierten Moleküle auch für einen Erschöpfungszustand dieser T-Zellen sprechen, wie er bei anhaltender viraler Replikation bei chronischer HIV- oder akuter CMV-Infektion nachgewiesen wurde (KAUFMANN et al., 2007; SESTER et al., 2008b). Neben geringeren VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen weisen nicht-symptomatische immunsupprimierte Patienten gegenüber immunkompetenten Personen interessanterweise zudem einen leicht geringeren Anteil an multifunktionellen Zellen auf. Der Unterschied in der CTLA-4 Expression auf Antigen-spezifischen T-Zellen von Patienten mit Herpes Zoster war im Vergleich zu asymptomatischen Personen wesentlich stärker ausgeprägt (ca. 12fach erhöht) als dies bei CMV-spezifischen T-Zellen transplantierte Patienten mit CMV-Reaktivierung zu beobachten war (lediglich ca. 2-3fach erhöht) (DIRKS, 2016). Vermutlich liegt dies an dem routinemäßig regelmäßig durchgeführten CMV-Monitoring nach Transplantation und dem damit verbundenen schnelleren therapeutischen Eingreifen sowie der oftmals prophylaktisch verabreichten antiviralen Medikation.

Da auch auf den polyklonal stimulierten CD4 T-Zellen eine geringe aber dennoch signifikant erhöhte Expression von CTLA-4 und PD-1 nachgewiesen werden konnte, kann z.B. vermutet werden, dass bei aktiver VZV-Infektion auch eine erhöhte Prädisposition für aktive Infektionen mit anderen Erregern besteht, oder dass eine aktive Infektion mit einem Erreger auch T-Zellen anderer Spezifitäten beeinflusst. Da allerdings auch VZV-spezifische T-Zellen

durch SEB stimuliert werden könnten, wäre auch denkbar, dass der beobachtete Effekt zumindest zum Teil auf VZV-spezifische T-Zellen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Effizienz der Erreger-spezifischen Immunantwort nicht alleine durch die T-Zellfrequenz, sondern darüber hinaus auch durch die Qualität dieser T-Zellen beeinflusst wird, die durch ihre Funktionalität und den Phänotyp definiert ist. Diese charakteristischen immunologischen Veränderungen scheinen jedoch nicht nur auf akute Reaktivierungen beschränkt zu sein. So lässt die Analyse der VZV-spezifischen CD4 T-Zellantwort eines immungesunden Probanden mit einem seit 10 Tagen andauernden VZV-Primärinfekt (Windpocken) vermuten, dass generell bei einem akuten VZV-bedingten Infektgeschehen eine VZV-spezifische Immunantwort mit eingeschränkter Funktionalität und Anzeichen für eine Anergie vorzufinden sind, wohingegen die VZV-spezifische Immunantwort im Latenzzustand durch ein hohes Maß an Multifunktionalität gekennzeichnet ist. Ein diesbezügliches Modell der T-Zellfunktionalität und des Phänotyps in unterschiedlichen Stadien einer VZV-Infektion ist in Abbildung 52 dargestellt. Das Beispiel der Probandin, die mit der MMRV-Vakzine geimpft wurde, gibt zudem Hinweise darauf, dass für die Induktion dieser charakteristischen Veränderungen nicht unbedingt ein Kontakt mit dem VZV-Wildtyp notwendig zu sein scheint.



**Abbildung 52: Funktionalitäts-Modell VZV-spezifischer CD4 T-Zellen ab dem Zeitpunkt der primären VZV-Infektion.** Nach einer Primärinfektion mit VZV wird eine VZV-spezifische zelluläre Immunantwort aufgebaut. Diese hat zunächst einen Phänotyp mit eingeschränkter Funktionalität, der vermutlich durch die hohe virale Belastung hervorgerufen wird. Im weiteren Verlauf, in dem das Virus im latenten Zustand in sensorischen Ganglien überdauert, ist die VZV-spezifische Immunantwort des nicht-symptomatischen Virusträgers durch multifunktionelle CD4 T-Zellen mit geringer Expression von CTLA-4 und PD-1 charakterisiert. Durch exogene Exposition mit VZV oder nicht-symptomatische Reaktivierungen kann sie jedoch von Zeit zu Zeit wieder verstärkt („geboostert“) werden, wodurch die zelluläre Immunantwort aufrechterhalten wird. Bleiben exogene und endogene Induktionen aus oder wirken sich Faktoren wie z.B. die Immunseneszenz im höheren Alter oder Therapie-bedingte Effekte negativ auf das Immunsystem aus, nimmt die VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz nach und nach ab. Wird ein gewisses Level unterschritten, kann die Kontrolle des Virus durch das Immunsystem nicht mehr aufrecht erhalten werden und es kann zu symptomatischen Reaktivierungen kommen, die sich überwiegend in Form eines charakteristischen Hautausschlages (Herpes Zoster) zeigen. Durch die Vermehrung des Virus wird die VZV-spezifische zelluläre Immunantwort deutlich induziert und besitzt zunächst den Zoster-assoziierten Phänotyp (starke Expression inhibitorischer Moleküle) mit eingeschränkter Funktionalität (hoher Anteil ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierender Zellen). Nach Rückgang der Symptome (bzw. >3 Monate nach der akuten VZV-Reaktivierung) pendelt sich die VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz auf einem gewissen Level ein. Die CD4 T-Zellen sind zu diesem Zeitpunkt überwiegend erneut multifunktionell und die Expression der inhibitorischen Marker ist gering. Abbildung modifiziert nach (ARVIN et al., 2007)

Die Verlaufsanalyse der VZV-spezifischen Immunantwort der Probandin mit MMRV-Impfung zeigte nach mehreren Wochen einen Rückgang der „Zoster-assoziierten“ Veränderungen hin zu der ursprünglichen Frequenz, sowie zu Phänotyp und Funktionalität der VZV-spezifischen T-Zellen. Wenngleich zur Auffrischung der VZV-spezifischen Immunantwort im Erwachsenenalter normalerweise die Zoster-Vakzine verwendet wird und somit eine deutlich höhere Impfdosis verabreicht wird als es bei dieser Probandin nach Impfung mit der Varizellen-Vakzine der Fall war, stellt sich dennoch die Frage wie langanhaltend ein Auffrischen der VZV-spezifischen Immunantwort durch eine Impfung tatsächlich ist. So wurde beispielsweise in einer aktuellen Studie diskutiert, dass Personen bereits 10 Jahre nach der ersten Gabe der Zoster-Vakzine von einer weiteren Impfung profitieren würden (LEVIN et al., 2016).

Ein weiteres phänotypisches Merkmal von T-Zellen ist ein charakteristisches Expressionsprofil von Oberflächenmarkern wie z.B. CD45RO und CD62L, anhand dessen die Zellen einem typischen Differenzierungsstadium zugeordnet werden können (SALLUSTO et al., 1999). In Übereinstimmung mit Ergebnissen einer Arbeit aus dem Jahr 2004 zeigte sich, dass die VZV-spezifischen CD4 T-Zellen mehrheitlich durch CD45RO-positive T-Zellen charakterisiert sind (VOSSSEN et al., 2004). Durch die kombinierte Messung mit CD62L wird in dieser Arbeit zudem ersichtlich, dass während eines akuten Herpes Zoster der Anteil VZV-spezifischer zentraler Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) signifikant größer ist, und lässt vermuten, dass diese Zellen während der akuten Reaktivierung neu gebildet worden sind. Diese vermutlich neu gebildeten Zellen sind aufgrund der Expression von CD62L auch in der

Lage die Lymphknoten zu passieren, wo sie nach Kontakt mit dem Antigen proliferieren können und zusätzlich durch Rekrutierung von B-Zellen und dendritischen Zellen (DC) zur Kontrolle der akuten Virusvermehrung beitragen könnten (SALLUSTO et al., 1999). Nach einer überstandenen VZV-Reaktivierung könnten sich diese zentralen Gedächtniszellen teilweise zu Effektor-Gedächtnis-T-Zellen weiter differenzieren, wodurch das Differenzierungsprofil VZV-spezifischer CD4 T-Zellen von nicht-symptomatischen Personen wieder hergestellt werden würde.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten immunologischen Charakteristika bieten nun die Möglichkeit, auch diagnostisch genutzt zu werden. Um das diagnostische Potential eines Tests zu ermitteln, ist die Sensitivität und Spezifität eines Analyseverfahrens von entscheidender Bedeutung. Zwar sind die hier beschriebenen Analysen der phänotypischen und funktionellen Unterschiede in der VZV-spezifischen zellulären Immunantwort ausschließlich auf Proben mit ausreichender Anzahl an reaktiven T-Zellen beschränkt, ermöglichten bei diesen jedoch die Diskriminierung von Personen mit und ohne akuten Herpes Zoster mit 100% Spezifität und nahezu 100% Sensitivität. Diese eindeutige Diskriminierung von Personen mit und ohne akuten Herpes Zoster war sogar dann möglich, wenn die Einteilung der Personen ausschließlich anhand eines einzigen Parameters (CTLA-4 MFI) auf den VZV-spezifischen Zellen erfolgte. Die Bestimmung des IgA-Status zur Diskriminierung zwischen Personen mit und ohne akuten Herpes Zoster lieferte zwar ebenfalls eine hohe Spezifität (93,8%), jedoch war die Sensitivität mit 67,3% eher niedrig. Die Analyse des Differenzierungsstadiums der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen scheint aus mehreren Gründen ebenfalls für diese Zwecke weniger gut geeignet zu sein. So scheint es z.B. Alters-abhängige Unterschiede im Differenzierungsprofil zu geben, was z.B. nach einer Stimulation mit VZV anhand eines geringeren Anteils aktivierter CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD4 T-Zellen bei älteren Probanden im Vergleich zu jüngeren Personen beobachtet werden konnte (PATTERSON-BARTLETT et al., 2007). Da eine symptomatische VZV-Reaktivierung bei älteren Personen zwar häufiger vorzufinden ist, aber eben auch bei jüngeren Personen auftritt, könnten diese Alters-abhängigen Unterschiede die Aussagekraft der Differenzierungsprofil-Analyse reduzieren. Obgleich letztere nur bei einer geringen Personenzahl durchgeführt wurde und somit lediglich erste Eindrücke gewonnen werden konnten, scheinen die Unterschiede im Differenzierungsprofil der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen zwischen nicht-symptomatischen und symptomatischen Personen zudem lediglich schwach ausgeprägt zu

sein. Hinzu kommt, dass die Diskriminierung der Marker CD45RO und CD62L nach Antigen-spezifischer Stimulation häufig erschwert ist. Folglich scheint die funktionelle Analyse der VZV-spezifische T-Zellen inklusive der Quantifizierung der CTLA-4-, PD-1- und CD127-Expression im Vergleich zur Bestimmung des Differenzierungsprofils und des Antikörperlevels zur diagnostischen Anwendung besser geeignet zu sein.

Potentielle zukünftige Anwendungsfelder dieser funktionellen und phänotypischen Analyse VZV-spezifischer T-Zellen werden nachfolgend diskutiert.

## **7.2 Anwendungsmöglichkeiten des Vollblut-basierten Tests zum Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen**

Potentielle Anwendungsgebiete bieten sich für die quantitative und funktionelle Analyse VZV-spezifischer zellulärer Immunantworten aus Vollblutproben vor allem dort wo bislang andere Zytokinexpressions-Nachweisverfahren Nachteile aufweisen. Das ELISpot-Verfahren, das beispielsweise zum Monitoring der VZV-spezifischen Immunantwort bei Patienten nach Transplantation von Stammzellen aus dem Knochenmark oder Nabelschnurblut oder anderen Risikopatienten wie Patienten mit Autoimmunerkrankungen verwendet wurde, bietet gegenüber intrazellulären Zytokinanalysen aus PBMCs den Vorteil, dass meist geringere Mengen an PBMCs benötigt werden (SMITH et al., 2001; LETSCH, SCHEIBENBOGEN, 2003; RONDAAN et al., 2014; SALEM FOURATI et al., 2014). Der Nachteil ist hingegen, dass ausschließlich quantitative und keine funktionellen und phänotypischen Informationen gewonnen werden können (SCHMIDT, SESTER, 2013). Der Nachweis VZV-spezifischer Immunzellen aus Vollblutproben kombiniert hingegen die Vorteile dieser beiden Methoden. So werden lediglich geringe Blutvolumina benötigt, und da keine zeitaufwändige Isolierung von PBMCs notwendig ist und lediglich eine kurze Inkubationsphase von 6h benötigt wird, kann die VZV-spezifische Immunantwort bei Verwendung der Vollblut-Stimulation innerhalb eines Arbeitstages quantitativ und qualitativ untersucht werden (SCHMIDT, SESTER, 2013). Ein Nachteil ist hingegen, dass die Vollblutproben stets innerhalb von 24h bearbeitet werden müssen und kein Einfrieren und späteres Bearbeiten möglich ist wie etwa nach der Isolierung von PBMCs. Da der Vollbluttest jedoch eine breite Anwendung im diagnostischen Bereich haben könnte, wo Testresultate normalerweise möglichst zeitnah generiert werden sollen, scheint dieser Nachteil vernachlässigbar. Zudem ist auch vorstellbar, dass die phänotypischen und funktionellen Marker auch auf zuvor eingefrorenen PBMCs identifiziert

werden könnten, sodass mit Ausnahme der Isolierung der PBMCs der Zeitpunkt der Probenverarbeitung flexibel wäre. Neben der zuvor erwähnten potentiellen Anwendung in der Diagnostik bietet die Vollblutanalyse darüber hinaus die Möglichkeit, im Rahmen von klinischen Studien die Effektivität von Lebendimpfungen und Tot-Vakzine-Kandidaten wie dem VZV-Glykoprotein E, hinsichtlich der Induktion einer hochfrequenten und multifunktionellen VZV-spezifischen Immunantwort zu untersuchen (CHLIBEK et al., 2014).

In Anlehnung an CMV könnte zudem die Analyse der Quantität und Qualität der VZV-spezifischen CD4 T-Zellantwort im Blut von immunsupprimierten Patienten dazu beitragen, das individuelle Risiko für Infektionskomplikationen zu identifizieren. Dafür müssen aber – gerade bei immunsupprimierten Patienten – verschiedene die Immunantwort beeinflussende Faktoren berücksichtigt werden. Der Einfluss der anti-rheumatischen Therapie auf die VZV-spezifischen Zellen in Patienten mit rheumatischen Erkrankungen wurde in der vorliegenden Arbeit bereits analysiert und wird im nachfolgenden Abschnitt diskutiert.

### **7.3 Einfluss der anti-rheumatischen Therapie auf die VZV-spezifische T-Zellfrequenz**

Patienten mit rheumatischen Erkrankungen besitzen im Vergleich zu immungesunden Patienten ein erhöhtes Risiko für VZV-Reaktivierungen (VEETIL et al., 2013). Ob bestimmte anti-rheumatische Medikamente das Risiko zusätzlich erhöhen, ist jedoch bislang noch nicht eindeutig geklärt. Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit konnte die generell beeinträchtigte zelluläre Immunantwort anhand geringerer SEB-Frequenzen der RA-Patienten gegenüber immungesunden Probanden bestätigt werden. Deutlich ausgeprägter war bei diesen Patienten jedoch die Verringerung der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen. Dies war jedoch interessanterweise nicht auf die Behandlung mit Steroiden zurückzuführen, sondern scheint möglicherweise durch die Biologika-Therapie hervorgerufen zu sein, da Patienten unter dieser Behandlung im Vergleich zu immungesunden Probanden signifikant niedrigere VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen aufwiesen; dies war unabhängig davon, ob zusätzlich eine Behandlung mit Standard-DMARDs erfolgte oder nicht. Dabei war trotz der geringen Anzahl der Patienten insbesondere die Therapie mit dem IL-6-Rezeptor-Blocker Tocilizumab oder den TNF-Blockern mit verringerten VZV-spezifischen Frequenzen assoziiert. Dies könnte auf einen Einfluss dieser Medikamente auf die VZV-spezifische zelluläre Immunantwort hindeuten und konsekutiv ein erhöhtes Risiko für VZV-Reaktivierungen

verursachen. Hinweise für eine erhöhte Zosterinzidenz unter TNF-Blocker-Therapie konnten bereits in klinischen Studien gefunden werden (STRANGFELD et al., 2009; GALLOWAY et al., 2013; CHE et al., 2014). Zudem wurde in einer Studie aus dem Jahr 2010 gezeigt, dass RA-Patienten unter TNF-Blocker-Therapie im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich häufiger aufgrund von VZV-Infektionen behandelt werden müssen (32 vs 3,4 von 100.000 Patienten-Jahre) (GARCIA-DOVAL et al., 2010), was möglicherweise mit den in dieser Arbeit identifizierten geringeren VZV-spezifischen T-Zellfrequenzen zusammenhängen könnte. Die Tatsache, dass der IL-6-Rezeptor-Blocker erst seit kurzer Zeit für die Behandlung von rheumatischen Erkrankungen verfügbar ist und dennoch bereits Fallberichte bezüglich mehr oder weniger stark ausgeprägter VZV-Reaktivierungen veröffentlicht wurden, spricht für eine erhöhte Zosterinzidenz auch unter dieser Therapie (KUBANDOVA et al., 2010; ROUX et al., 2011). Folglich wird auch bereits in den Produktinformationen des Herstellers ein Herpes Zoster als häufig auftretende Nebenwirkung klassifiziert (CHUGAI/ROCHE PHARMA AG, 2016). Die in dieser Arbeit identifizierten geringen VZV-spezifischen T-Zellfrequenzen lassen vermuten, dass die Einnahme von Tocilizumab die Effektivität der T-Zell-vermittelten Erregerkontrolle negativ beeinflusst und dies eine mögliche Ursache für diese erhöhte Zosterinzidenz darstellt. Da bei Patienten unter Tocilizumab-Therapie im Gegensatz zu Patienten unter TNF-Blocker-Therapie zudem die Frequenz SEB-reaktiver T-Zellen vermindert war, scheint der Effekt in diesem Fall jedoch nicht exklusiv auf die VZV-spezifische Immunantwort begrenzt zu sein und könnte somit auch die Prädisposition für die Reaktivierung anderer Erreger erhöhen (EDWARDS, 2012; LANG et al., 2012).

Während die Frequenzen VZV-spezifischer CD4 T-Zellen deutliche Unterschiede zeigten, lieferten die Analyse der Zytokinexpression und die phänotypische Charakterisierung dieser Zellen keine Hinweise auf funktionelle Beeinträchtigungen in nicht-symptomatischen Rheumapatienten. Somit könnte die erhöhte Herpes Zoster-Inzidenz allein durch den quantitativen Verlust VZV-spezifischer CD4 T-Zellen verursacht werden. Allerdings muss angemerkt werden, dass für die funktionelle Charakterisierung ausschließlich Personen mit ausreichend VZV-spezifischen CD4 T-Zellzahlen eingeschlossen wurden. Da die VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen jedoch bei den RA-Patienten sehr niedrig waren, führte dies dazu, dass die Patienten mit ausreichender Zellzahl für diese Gruppe eher hohe VZV-spezifische Frequenzen aufwiesen und somit nicht zwangsläufig als repräsentativ für die gesamte Gruppe angesehen werden können. Auch wenn in nicht-symptomatischen

Patienten eine funktionelle Beeinträchtigung nicht unbedingt zu erwarten ist, kann folglich nicht ganz ausgeschlossen werden, dass deren Fehlen in der vorliegenden Analyse ein Resultat der durch die Zellzahl bedingten Selektion der Patienten ist. Basierend auf der in Abschnitt 6.1.1.6 beschriebenen Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort in immunsupprimierten Zoster-Patienten, in die auch 2 RA-Patienten mit akuter VZV-Reaktivierung eingeschlossen wurden, kann jedoch vermutet werden, dass es auch bei RA-Patienten während einer akuten VZV-Reaktivierung zu den charakteristischen Zoster-assoziierten phänotypischen und funktionellen Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort kommt.

Im Gegensatz zu den VZV-spezifischen T-Zellen, waren die VZV-IgG-Levels bei asymptomatischen RA-Patienten weder im Vergleich zu immungesunden Probanden noch in Abhängigkeit der anti-rheumatischen Therapie verändert. Dies war auch der Fall wenn die aufgrund eines VZV-negativen Serostatus ausgeschlossenen Patienten (4 RA und 1 SPA) in die Analysen mit einbezogen wurden. Da jedoch unklar war, ob diese Patienten bisher noch keinen Erregerkontakt hatten, oder ob der VZV-IgG-Level im Verlauf der rheumatischen Erkrankung unter die Nachweisgrenze abgesunken war, wurden diese Patienten für die hier dargestellten Analysen ausgeschlossen. Somit konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sich die Erkrankung sowie die damit verbundene Therapie bei nicht-symptomatischen RA-Patienten ausschließlich auf die T-Zellen und hier insbesondere auf die Frequenzen negativ auswirken. Da das Risiko für VZV-Reaktivierungen bei diesen Patienten im Vergleich zu immungesunden Probanden deutlich erhöht ist, unterstützt dies die Bedeutung der VZV-spezifischen zellulären Immunantwort für eine effektive Erreger-Kontrolle. Dies wird gestützt durch Beobachtungen, die bereits zuvor bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses, einer anderen Autoimmunerkrankung, gemacht wurden, die ebenfalls ein deutlich erhöhtes Risiko für Herpes Zoster besitzen und wie RA-Patienten geringere Frequenzen VZV-spezifischer Immunzellen aufwiesen. Interessanterweise konnte auch bei diesen Patienten gegenüber immungesunden Probanden keine Reduktion, sondern sogar höhere VZV-IgG-Levels gemessen werden (RONDAAN et al., 2014). Dass jedoch nicht alle Patienten mit Autoimmunerkrankungen und erhöhtem Risiko für VZV-Reaktivierungen signifikant in ihrer VZV-spezifischen zellulären Immunantwort beeinträchtigt sind, zeigt hingegen die in derselben Studie durchgeführte Analyse von Patienten mit Morbus Wegener, die weder bei den VZV-IgG-Levels noch bei der zellulären Immunantwort signifikante

Unterschiede zu immungesunden Probanden aufwiesen (RONDAAN et al., 2014). Folglich scheint die Erkrankung bzw. die Therapie dieser Patienten sowie der in der vorliegenden Arbeit untersuchten PSA-Patienten auch ohne nachweisbare Auswirkungen auf die VZV-spezifische zelluläre Immunantwort die Anfälligkeit für VZV-Reaktivierungen zu erhöhen. Wie genau dies jedoch ausgelöst wird ist bislang noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Eine longitudinale Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort von Patienten vor und unter Entwicklung eines Herpes Zoster könnte hier Hinweise liefern, inwieweit funktionelle Veränderungen möglicherweise bereits vor Einsetzen der klinischen Symptomatik messbar sind. Ähnliche Daten existieren für die CMV-spezifische Immunantwort vor bzw. unter CMV-Reaktivierung nach Transplantation (SESTER et al., 2008b; DIRKS et al., 2013). Da VZV-Reaktivierungen jedoch im Vergleich eher seltene Ereignisse sind, würde dies ein Monitoring großer Patientenkohorten erfordern.

Wie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, kommt es bei Patienten mit akutem Zoster durch die VZV-Reaktivierung zu einem Anstieg der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz (s. Abschnitt 6.1.1.4). Auch wenn die Frequenzen nach Rückgang der Symptome wieder abnehmen, besteht die Möglichkeit, dass vorangegangene Zosterepisoden – wie sie bei RA-Patienten nicht unüblich sind – die erhaltenen Ergebnisse beeinflussen können. Der Vergleich von RA-Patienten mit und ohne Zoster-Vergangenheit zeigte, dass mehr als 21% (12/56) dieser RA Patienten bereits einen Zoster in der Vergangenheit hatten, was eindrucksvoll das hohe Risiko dieser Patienten widerspiegelt. Ein signifikanter Unterschied in den VZV-spezifischen T-Zellfrequenzen war jedoch nicht nachweisbar. Folglich konnte eine Beeinflussung der Ergebnisse durch weiter zurückliegende VZV-Reaktivierungen nahezu ausgeschlossen werden, auch wenn die Patientengruppen nicht vollständig altersangepasst waren.

Direkte Einflüsse der anti-rheumatischen Medikamente auf die VZV-spezifische oder SEB-reaktive zelluläre Immunantwort konnten in den *in vitro* Inkubations-Experimenten weder bei der Frequenz, noch bei Zytokinexpression oder Proliferation festgestellt werden. Einzig beim TNF-Blocker Adalimumab fand sich eine Beeinträchtigung in der TNF $\alpha$  Produktion bei hohen Wirkspiegeln. Dennoch kann die erhöhte Anfälligkeit für VZV-Reaktivierungen anhand dieser Ergebnisse nicht direkt erklärt werden. Des Weiteren konnten die nachgewiesenen geringeren Frequenzen der Patienten unter therapeutischer Blockade des IL-6-Rezeptors

bzw. TNF nicht mit einer beeinträchtigen Funktionalität der Zellen *in vitro* in Verbindung gebracht werden. Dies könnte auf Unterschieden in den jeweiligen Wirkmechanismen beruhen, die sich möglicherweise allenfalls indirekt auf die Zytokin-Induktion und Proliferation *in vitro* auswirken. So wäre beispielsweise ein deutlich später eintretender Wirkbeginn der anti-rheumatischen Medikamente im Vergleich zu anderen immunsupprimierenden Medikamenten, wie z.B. Cyclosporin A und Methylprednisolon, vorstellbar. Dies wird z.B. daran ersichtlich, dass die Halbwertszeiten der anti-rheumatischen Medikamente mehrere Tage bis Wochen betragen, während Cyclosporin A und Methylprednisolon eine kurze Halbwertszeit von wenigen Stunden besitzen (NOVARTIS, 2013; SANOFI-AVENTIS, 2015; ABBVIE, 2016; BRISTOL-MYERS SQUIBB, 2016; CHUGAI/ROCHE PHARMA AG, 2016; HOFFMANN-LA ROCHE, 2016; PFIZER, 2016). Folglich besteht die Möglichkeit, dass die *in vitro* Analyseverfahren mit maximaler Inkubationsdauer von 40 Stunden nicht ausreichend waren, um eventuelle direkte Effekte der anti-rheumatischen Medikamente auf die spezifische Immunantwort zu detektieren.

Insgesamt gibt die hier durchgeführte Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen erste Hinweise auf eine mögliche Beeinträchtigung der T-zellulären Immunantwort *in vivo* durch verschiedene Biologika, während für Biologika *in vitro* kein unmittelbarer Einfluss nachgewiesen werden konnte. Ob diese Reduktion der T-Zellfrequenz tatsächlich Therapie-bedingt ist und inwieweit dies für die erhöhte Zosterinzidenz dieser Patienten verantwortlich ist, bedarf jedoch noch weiterer Analysen, bei der nach Möglichkeit auch eine Unterteilung der verschiedenen TNF-Blocker in Betracht gezogen werden könnte.

#### **7.4 Die VZV-spezifische Immunantwort bei Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen**

Obwohl eine VZV-Reaktivierung im klinischen Alltag meist anhand des charakteristischen Hautausschlages oder mittels PCR diagnostiziert werden kann, gibt es untypische Verläufe bei denen z.B. der Hautausschlag fehlt (Zoster sine herpete), Gefäße betroffen sind (Vaskulopathie), oder wie z.B. bei einer Meningitis oder Enzephalitis das ZNS involviert ist und die Identifikation des zugrundeliegenden Erregers schwierig ist (GILDEN et al., 2009; GILDEN et al., 2013; GRAHN, STUDAHL, 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb auch die VZV-spezifische Immunantwort von Patienten mit klinisch gesicherter VZV-bedingter ZNS-Infektion oder ohne VZV-bedingte ZNS-Infektion hinsichtlich charakteristischer Veränderungen untersucht, wie sie zuvor bei Patienten mit akutem Herpes Zoster identifiziert wurden. Neben Immunzellen aus dem Blut wurden dabei zusätzlich Immunzellen aus der CSF analysiert, um auch immunologische Veränderungen beobachten zu können, die auf den Infektionsort begrenzt sind.

Interessanterweise konnten in der CSF deutliche Unterschiede in der VZV-spezifischen Immunantwort zwischen den Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion und den Patienten ohne bzw. mit unklarer VZV-Beteiligung nachgewiesen werden. So könnte die erhöhte VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz und die erhöhte CTLA-4 Expression durch die lokale Replikation des Virus hervorgerufen werden, wodurch bereits in der CSF vorhandene oder neu infiltrierende VZV-spezifische CD4 T-Zellen durch direkten Kontakt mit dem Erreger oder durch die mehrheitlich lokal ausgelöste Immunantwort proliferieren. Erst kürzlich konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass sich während einer akuten VZV-Reaktivierung in menschlichen Ganglien sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen lokal in den betroffenen Ganglien anreichern, was auch die Bedeutung dieser T-Zellen bei der Kontrolle der Virus-Replikation in Ganglien während einer akuten Reaktivierung widerspiegelt (STEAIN et al., 2014). Zwar wurde in dieser Studie nicht die Antigen-Spezifität dieser T-Zellen untersucht, dennoch kann vermutet werden, dass es sich dabei um einen erhöhten Anteil VZV-spezifischer T-Zellen handelt.

Bei allen 11 untersuchten Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion konnte ein Anstieg der Frequenz VZV-spezifischer CD4 T-Zellen sowie eine erhöhte CTLA-4 Expression nicht nur in der CSF, sondern auch im Blut detektiert werden. Diese Beobachtung lässt sich bei 7 dieser Patienten mit dem gleichzeitig vorhandenen akuten Herpes Zoster assoziieren. Die Tatsache, dass diese Veränderungen jedoch ebenfalls im Blut der 4 Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen identifiziert werden konnten, die keinen typischen Hautausschlag aufwiesen, ist hingegen besonders bemerkenswert (4 von 11 Patienten). Dies lässt mehrere mögliche Schlussfolgerungen zu. So könnte das Virus oder zumindest Virusbestandteile den immunprivilegierten Ort (ZNS) in Richtung des Blutes verlassen und dort zusätzlich eine systemische Immunantwort induzieren. Des Weiteren könnten die in der CSF angereicherten VZV-spezifischen T-Zellen aus dem ZNS in das Blut gelangen. Am wahrscheinlichsten

erscheint jedoch, dass VZV-Antigen-tragende APCs, die zuvor nach Antigenkontakt aus dem ZNS in die sekundären Lymphorgane eingewandert sind, zur Vermehrung und Aktivierung von VZV-spezifischen T-Zellen führen und diese auch über das Blut in Richtung des ZNS wandern. Folglich können diese spezifischen T-Zellen sowohl im Blut als auch in der CSF, in der sie stärker angereichert sind, nachgewiesen werden. Vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte in einer Studie, in der die Frequenz ESAT-6-spezifischer Immunzellen im Blut und in der Pleura von Patienten mit pleuraler Tuberkulose verglichen wurde, ebenfalls nachgewiesen werden, dass sich diese spezifischen T-Zellen massiv am Ort des Infektgeschehens anreichern, dennoch aber auch im Blut der Patienten aufzufinden sind, wengleich die Frequenz dort vergleichsweise gering ist (WILKINSON et al., 2005). Verschiedene lokal begrenzte Infektionen bzw. Symptome scheinen also durchaus auch Auswirkungen auf die Erreger-spezifische systemische Immunantwort zu haben. Folglich ist zu vermuten, dass es auch bei VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen keine vollständige lokale Begrenzung der Immunantwort gibt.

Obwohl also auch im Blut mehrheitlich Veränderungen der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nachweisbar waren und auch die VZV-IgG-Levels in der Gruppe der Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen erhöht waren, scheinen die Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort insgesamt jedoch in der CSF am deutlichsten ausgeprägt zu sein (siehe Frequenz). Ähnliche Ergebnisse konnten zuvor bei einer Studie mit Tuberkulose-Meningitis-Patienten gewonnen werden, bei denen die Quantifizierung Erreger-spezifischer Immunzellen in der CSF eine bessere Diskriminierung zwischen latenter und aktiver Tuberkulose-Infektion ermöglichte als dies bei der Verwendung von Blutproben derselben Patienten der Fall war (THOMAS et al., 2008). Dennoch muss angemerkt werden, dass sowohl anhand der CTLA-4-Expression auf den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen aus der CSF als auch aus dem Blut eine optimale Diskriminierung zwischen Patienten mit VZV-bedingten und nicht durch VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen durchgeführt werden konnte (s. Tabelle 18). Auch in der Gruppe der Patienten, bei denen die Ursache der ZNS-Entzündung nicht eindeutig bestimmt werden konnte, finden sich Personen mit leicht erhöhter Frequenz und erhöhter CTLA-4-Expression VZV-spezifischer T-Zellen, sowohl in der CSF als auch im Blut. Hier erscheint VZV als Infekt-auslösender Erreger zumindest wahrscheinlich, wobei eine höhere Aussagekraft nur mit der Untersuchung weiterer Patienten zu erreichen ist. Interessant wäre außerdem zu evaluieren, ob bei der Analyse eines größeren

Patientenkollektives die stärker ausgeprägten Veränderungen der immunologischen Parameter der VZV-spezifischen Immunzellen in der CSF denen des Blutes überlegen wären. Dabei könnten auch Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen, die bislang aufgrund der limitierten Diagnostik als Patienten mit ZNS-Entzündungen unklarer Genese eingestuft wurden, möglicherweise durch die Veränderungen der VZV-spezifischen Immunantwort in der CSF besser identifiziert werden als unter der Analyse von Blut.

Eine signifikante Verschiebung des VZV-spezifischen Zytokinprofils - als weiteres Merkmal des im ersten Teil der Arbeit bestimmten „Zoster-assoziierten Phänotyps“ – war bei Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit nicht-VZV-bedingter ZNS-Entzündung nicht zu sehen. Da eine solche Verschiebung aber zumindest im Blut der Patienten mit gleichzeitigem Herpes Zoster zu erwarten wäre, besteht die Möglichkeit, dass eine VZV-bedingte ZNS-Infektion durchaus Auswirkungen auf die Zytokinexpression der VZV-spezifischen T-Zellen hat, welche in der Analyse aber nicht detektiert werden konnten. Dies könnte einerseits der geringen Anzahl untersuchter Patienten mit ZNS-Erkrankung geschuldet sein. Da sich jedoch das Zytokinprofil der polyklonal stimulierten CD4 T-Zellen nicht zwischen den drei Gruppen von Patienten mit ZNS-Erkrankung, den gesunden Kontrollen und den Patienten mit akutem Herpes Zoster unterschied, besteht andererseits auch die Möglichkeit, dass sich die Zytokinexpression der Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion aufgrund des in diesen Fällen meist schon länger andauernden Infektionsverlaufs bereits wieder normalisiert hat, während der Marker CTLA-4 sowie die Frequenz bei diesen Patienten über einen längeren Zeitraum erhöht bleiben.

Bemerkenswert ist, dass in der CSF insgesamt deutlich höhere Frequenzen an SEB-reaktiven T-Zellen vorhanden waren als im Blut. Dies könnte daran liegen, dass der Anteil naiver – also nicht-reaktiver – T-Zellen in der CSF gegenüber dem Blut generell sehr gering ist, wie bereits für Personen ohne ZNS-Erkrankungen gezeigt werden konnte (DE GRAAF et al., 2011). Die Ursache für diese Beobachtung ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Erklärung könnte jedoch sein, dass die reaktiven Gedächtnis-T-Zellen im Gegensatz zu den naiven T-Zellen eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzen in die CSF zu infiltrieren, was mit ihrer verstärkten Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche zusammenhängen könnte (SVENNINGSSON et al., 1993; KIVISAKK et al., 2003; RANSOHOFF et al., 2003).

Insgesamt scheint die quantitative und qualitative Analyse der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen ein geeignetes Verfahren darzustellen, um Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen von Patienten ohne VZV-bedingte ZNS-Infektion diskriminieren zu können. Insbesondere die CTLA-4-Expression auf den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen scheint für die eindeutige Identifizierung besonders gut geeignet zu sein. Die Analyse von Blut, das im Allgemeinen besser zugänglich und verfügbar ist als CSF-Proben, liefert ebenfalls gute Ergebnisse; allerdings scheint die Analyse der CSF-Immunzellen noch präziser zu sein. Bei Verfügbarkeit von sowohl Blut als auch CSF bietet sich eine simultane Stimulation von isolierten Immunzellen aus CSF zusammen mit Blut an, um die aussagekräftigsten Ergebnisse zu erzielen. Bei Patienten, bei denen der charakteristische Hautausschlag fehlt und die Blickdiagnose sowie die PCR oder die Bestimmung der Antikörperlevels alleine nicht zufriedenstellend sind, könnte dieses Verfahren für die Diagnostik von Nutzen sein. Des Weiteren könnte der Erfolg der antiviralen Therapie dieser Patienten immunologisch überwacht werden und somit potentiell zur Verminderung weiterer Komplikationen beitragen.

#### **7.5 Phänotyp und Funktionalität der HSV-spezifischen Immunantwort in der Latenzphase und während akuter HSV-Reaktivierung**

Neben VZV gehören auch die beiden Herpes-Simplex Viren HSV-1 und HSV-2 zu den Alphaherpesviren. Erkenntnisse über die HSV-spezifische zelluläre Immunantwort beschränken sich jedoch überwiegend auf Studien im Mausmodell und somit gibt es bislang wenige Studien zur humanen HSV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellantwort (KOELLE, 2007; OUWENDIJK et al., 2013). Besonders in immunsupprimierten Personen ist der Kenntnisstand über die HSV-spezifische Immunantwort gering. In dieser Arbeit wurde deshalb diese Immunantwort quantitativ und qualitativ untersucht. Übereinstimmend mit älteren Studien liegt die HSV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz HSV-positiver immungesunder Probanden im Median bei 0,21% und ist damit doppelt so hoch wie die spezifische Immunantwort gegen VZV, jedoch deutlich geringer als die durchschnittliche CMV-spezifische T-Zellfrequenz (ASANUMA et al., 2000).

Während der Kontakt mit VZV bei der überwiegenden Mehrheit der Personen bereits im Kleinkind- bzw. Kindesalter erfolgt und somit bereits in Kindern eine sehr hohe Seroprävalenz nachweisbar war, konnten erst in der Altersgruppe der 20-30-Jährigen erste

HSV-seropositive Probanden identifiziert werden. Abgesehen davon, dass nur 3 Kinder und Jugendliche bezüglich ihrer HSV-spezifischen Immunantwort analysiert wurden, hängt dies zum einen mit der Art der Übertragung der Viren zusammen. Während HSV hauptsächlich über den direkten Kontakt (Speichel, sexuell etc.) übertragen wird, wird VZV überwiegend über Aerosole übertragen, wodurch eine Weiterverbreitung von VZV vereinfacht wird (DAVIDOVICI et al., 2007). Zumindest bei den jüngeren Probanden wird die VZV-Seroprävalenz zusätzlich auch durch die seit 2004 in Deutschland vorhandene Varizellen-Vakzine positiv beeinflusst, wohingegen eine Impfung gegen HSV bislang noch nicht verfügbar ist. Der mit 37,5% im Vergleich zu anderen Studien deutlich geringere Anteil HSV-seropositiver 20-30-jähriger Probanden kann hingegen vermutlich hauptsächlich auf die geringe Probandenzahl zurückgeführt werden (SAUERBREI et al., 2011). Dass die HSV-Seroprävalenz in dieser Altersgruppe jedoch generell geringer ist und die Erstinfektion mit HSV später auftritt als bei VZV konnte in dieser Arbeit trotz der geringen Probandenanzahl veranschaulicht werden.

Bei immunsupprimierten Patienten scheint die Frequenz der HSV-spezifischen Immunantwort tendenziell etwas geringer zu sein als bei immunkompetenten Probanden. Da dies auch bei SEB-reaktiven T-Zellen zu beobachten war scheint dies jedoch eher auf eine allgemeine Beeinträchtigung der zellulären Immunantwort zurückzuführen zu sein und somit kein HSV-spezifisches Phänomen darzustellen. Ob die leicht geringeren Frequenzen immunsupprimierter Patienten mit der beobachteten erhöhten Prävalenz von HSV-Reaktivierungen in diesen Patientengruppen zusammenhängen, bleibt jedoch unklar.

Ähnlich wie bei der VZV-spezifischen Immunantwort bei nicht-symptomatischen Personen zeigte weder die Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle noch die Zytokinexpression deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen und den gesunden Probanden, die die Unterschiede in der Anfälligkeit dieser Patientengruppen für HSV-Reaktivierungen bzw. die damit verbundenen Komplikationen erklären könnten. Lediglich die Patienten mit rheumatischen Erkrankungen wiesen einen erhöhten Anteil ausschließlich TNF $\alpha$ -exprimierender CD4 T-Zellen auf, was jedoch sowohl bei den HSV-spezifischen als auch bei den SEB-reaktiven T-Zellen der Fall war. Da die SEB-reaktiven CD4 T-Zellen bei der Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen nicht durch einen erhöhten Anteil TNF $\alpha$ -exprimierender Zellen

gekennzeichnet waren, scheint der Unterschied bei der Analyse der HSV-spezifischen Immunantwort eher durch die geringere Patientenzahl hervorgerufen zu werden.

Im Vergleich zu einer Studie aus dem Jahr 2005, in der die IL-2- und IFN $\gamma$ -Expression quantifiziert wurde, fällt auf, dass dort die HSV-spezifischen CD4 T-Zellen der 16 analysierten immungesunden Probanden zu einem Großteil ausschließlich IL-2 exprimieren, wohingegen die Anteile der IL-2<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und ausschließlich IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 T-Zellen deutlich geringer sind (HARARI et al., 2005). Dies hängt vermutlich mit mehreren verschiedenen Faktoren zusammen. Zum einen wurden in der Studie PBMCs stimuliert, die die tatsächlichen physiologischen Bedingungen nicht so gut widerspiegeln wie die Analyse direkt im Vollblut und auch zum Teil in ihren Subpopulationen verändert sind (APPAY et al., 2006; SILVA et al., 2013). Des Weiteren sind die Frequenzen der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen in dieser Studie mit <0,1% im Vergleich zu der hier vorgelegten Arbeit und in einer zuvor publizierten Studie aus dem Jahr 2000 deutlich geringer (ASANUMA et al., 2000). Dies verwundert zunächst, da bei längerer Stimulationsdauer, wie es bei der PBMC-Stimulation der Fall war, eine höhere HSV-spezifische T-Zellfrequenz zu erwarten gewesen wäre. Da jedoch auch die Inkubationszeit des Sekretionsinhibitors deutlich länger ist (>10h) und dieser mit zunehmender Zeit zytotoxisch wirkt, führt dies vermutlich zum Verlust von T-Zellen, wodurch nicht nur die Frequenz, sondern auch die Verteilung der Subgruppen Zytokin-exprimierender Zellen verändert wird.

Interessanterweise konnten bei Patienten mit akuter HSV-Reaktivierung keine charakteristischen Veränderungen in der HSV-spezifischen CD4 T-Zellantwort festgestellt werden. Dies könnte beispielsweise daran liegen, dass die HSV-spezifische Immunantwort bei HSV-positiven Personen häufiger durch asymptomatische oder auch symptomatische Reaktivierungen (Herpes labialis) in Kontakt mit dem Erreger kommt und somit auch bei aktuell nicht-symptomatischen Probanden grundsätzlich ein anderer Phänotyp bzw. eine andere Zytokinexpression vorliegt, als dies bei der VZV-spezifischen Immunantwort der Fall ist. Dafür spricht beispielsweise, dass im Gegensatz zur VZV-spezifischen Immunantwort höhere Grundlevel der CTLA-4- und PD-1-Expression vorlagen sowie ein leicht geringerer Anteil CD127-positiver CD4 T-Zellen bei nicht-symptomatischen immungesunden Probanden nachzuweisen war. Hinzu kommt, dass der Anteil multifunktionaler CD4 T-Zellen, die

spezifisch gegen HSV gerichtet sind bei diesen Probanden geringer war als bei VZV-spezifischen T-Zellen.

Eine andere Erklärung für die fehlenden Unterschiede zwischen Personen ohne und mit akuter HSV-Reaktivierung könnte eine lokale Begrenzung und die kurze Dauer der häufigsten Form der HSV-Reaktivierung (Herpes Labialis) sein. Dabei könnten ausschließlich lokal vorhandene oder einwandernde Immunzellen an der Bekämpfung und Eliminierung der Virusvermehrung beteiligt sein, wodurch die Immunzellen, die im Blut verbleiben keine phänotypischen und funktionellen Veränderungen aufweisen und auch nicht in der Frequenz verändert sind. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass bei einem Patienten mit HSV-bedingter Enzephalitis eine deutliche lokale Anreicherung HSV-spezifischer CD4 T-Zellen auftrat, wohingegen die HSV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz im Blut mit 0,21% dem medianen Wert nicht-symptomatischer Person entsprach. Interessant ist, dass sich bei diesem Patienten die CTLA-4-Expression auf den HSV-spezifischen CD4 T-Zellen weder in der CSF und im Blut noch im Vergleich zu nicht-symptomatischen Personen unterschied, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass es während einer akuten HSV-Reaktivierung nicht zur Hochregulierung von inhibitorischen Markern auf den spezifischen Zellen kommt. Da jedoch auch Blutproben von Patienten mit nicht lokal begrenzten PCR-bestätigten HSV-bedingten Hautausschlägen analysiert wurden und diese Patienten im Vergleich zu den immungesunden Probanden ebenfalls keine Veränderungen in der HSV-spezifischen Immunantwort aufwiesen, scheint eine lokale Begrenzung als Ursache für die nicht vorhandenen quantitativen und qualitativen Veränderungen der CD4 T-Zellpopulation dennoch eher unwahrscheinlich. Da keine Verlaufsdaten bei Personen mit akuter HSV-Reaktivierung generiert wurden, besteht auch die Möglichkeit, dass potentielle Veränderungen in Frequenz, Phänotyp und/oder Funktionalität der HSV-spezifischen Immunantwort in Folge eines akuten Infektgeschehens erst deutlich später auftreten, als dies bei anderen Erregern wie z.B. VZV, CMV und BK Polyomavirus der Fall ist (SESTER et al., 2008b; SCHMIDT et al., 2014a). Da der Fokus der Analyse der HSV-spezifischen Immunantwort in dieser Arbeit auf den CD4 T-Zellen lag, ist auch vorstellbar, dass akute HSV-Reaktivierungen nur zu messbaren quantitativen und qualitativen Veränderungen anderer Immunzellen, wie z.B. den HSV-spezifischen CD8 T-Zellen führen. Einen Hinweis dafür lieferte eine aktuelle Studie, in der nachgewiesen werden konnte, dass die HSV-spezifischen CD8 T-Zellen von Personen mit symptomatischen Herpesinfekten eher

monofunktional sind, während HSV-positive Probanden ohne HSV-assoziierte Symptomatik höhere Frequenzen von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen mit hoher Multifunktionalität besitzen (KHAN et al., 2015).

Aufgrund der nahen Verwandtschaft von HSV und VZV gibt es neben kreuzreaktiven Antikörpern auch kreuzreaktive T-Zellen, die auf definierte immunogene Bestandteile sowohl von VZV als auch von HSV reagieren (CHIU et al., 2014; OUWENDIJK et al., 2014; JING et al., 2016). Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der HSV-spezifischen Immunantwort bei Personen mit akutem Herpes Zoster zeigte insgesamt, dass die messbare HSV-spezifische Immunantwort inklusive der Zytokinexpression und dem Phänotyp generell nicht signifikant durch eine aktive VZV-Replikation beeinflusst zu sein scheint. Dennoch ist bei einem Teil dieser Personen die PD-1- und CTLA-4-Expression der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen leicht erhöht, was je nach Patient für einen mehr oder weniger großen Anteil an kreuzreaktiven T-Zellen sprechen könnte. Ob diese Patienten tatsächlich mehr kreuzreaktive T-Zellen besitzen als Personen mit geringer PD-1- und CTLA-4-Expression ist jedoch unklar und bedarf noch weiterer Analysen.

Unklar ist zudem, warum bei manchen immungesunden Personen HSV-Reaktivierungen an den Lippen mehrmals im Jahr auftreten, wohingegen andere HSV-positive Personen nie oder nur sehr selten symptomatische HSV-Reaktivierungen entwickeln. Diesbezüglich wurden zwar bereits Studien durchgeführt, jedoch ließen die Ergebnisse keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu (SPRUANCE et al., 1995). Ob die interindividuelle Varianz von HSV-Reaktivierungen mit charakteristischen quantitativen oder qualitativen Unterschieden in der HSV-spezifischen CD4 oder CD8 T-Zellimmunität zusammenhängt, konnte aufgrund der geringen Personenzahl in der vorliegenden Arbeit bisher noch nicht untersucht werden. Allerdings bieten das in dieser Arbeit etablierte Analyseverfahren zur Charakterisierung der HSV-spezifischen Immunantwort und das bisher analysierte Personenkollektiv eine gute Grundlage um dies in weiterführenden Studien zu erforschen.

## **7.6 Verbesserung der Nachweisbarkeit Antigen-spezifischer T-Zellen in verschiedenen extrasanguinen Flüssigkeiten durch die Ko-Inkubation mit Blut**

Wie bereits erwähnt, konnten Studien, bei denen Immunzellen aus der CSF und der Bronchiallavage analysiert wurden, zeigen, dass es während einer bakteriellen Infektion am

Infektionsherd zur Anreicherung Erreger-spezifischer Immunzellen kommt (WILKINSON et al., 2005; THOMAS et al., 2008; JAFARI et al., 2011).

Darüber hinaus konnten auch bei Virus-bedingten Infektionen Erreger-spezifische T-Zellen in extrasanguinen Flüssigkeiten in räumlicher Nähe zum Infektionsherd nachgewiesen werden. In einer Studie von Patienten mit VZV-bedingter Uveitis konnten beispielsweise in den intraokularen Flüssigkeiten (Glaskörperflüssigkeit und Kammerwasser des Auges) angereicherte VZV-spezifische T-Zellen isoliert und stimuliert werden (MILIKAN et al., 2006). Allerdings mussten dafür in einem zeitaufwändigen Verfahren autologe APCs isoliert werden, die die Antigen-spezifische Stimulation der T-Zellen erst ermöglichten. Folglich erscheint diese Methode zur Anwendung in der Diagnostik eher ungeeignet, hätte möglicherweise jedoch durch die in dieser Arbeit entwickelte Methodik der kombinierten Stimulation mit Blutzellen vereinfacht werden können.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Analyseverfahren zum simultanen Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten und Blut bietet erstmals die Möglichkeit, in relativ kurzer Zeit Antigen-spezifische Immunzellen vom Ort der Infektion zu stimulieren und zu analysieren. Durch die simultane Stimulation mit Blut kann zudem ein optimaler Vergleich mit der systemischen Immunantwort in Zirkulation durchgeführt werden. Da viele aktive Infektionen mit einer Anreicherung Antigen-spezifischer T-Zellen am Infektionsherd assoziiert sind, kann durch diese zusätzlichen Optionen eine Verbesserung der Diagnosestellung ermöglicht werden.

Um die Immunzellen bei der abschließenden durchflusszytometrischen Messung entsprechend ihrer Herkunft der extrasanguinen Flüssigkeit bzw. dem Blut zuzuordnen, wurden die Immunzellen aus der extrasanguinen Flüssigkeit mit einem Fluorochrom-gekoppelten CD45-Antikörper markiert. Prinzipiell könnte die Markierung auch mit fluoreszierenden Farbstoffen wie z.B. CFSE erfolgen. Das Prinzip der Vorfärbung von Zellen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper zur späteren Diskriminierung von markierten und unmarkierten Zellen wurde bereits zuvor zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen eines Organempfängers auf seinen Spender verwendet. Allerdings wurden dort entweder PBMCs bzw. Blutproben von zwei verschiedenen Personen durchmischt, um die Frequenz alloreaktiver CD4 T-Zellen bestimmen zu können (WOLF et al., 2016), oder der Fluoreszenzfarbstoff CFSE wurde verwendet, um die zur Antigen-spezifischen Stimulation

von Lymphozyten benötigten APCs bei der abschließenden durchflusszytometrischen Analyse durch elektronisches „Gating“ ausschließen zu können (LEE et al., 2002; JING et al., 2012). Bislang wurde diese Vorfärbung jedoch noch nicht genutzt, um in einer Person simultan die Antigen-spezifische systemische Immunantwort im Blut mit der Antigen-spezifischen Immunantwort vom Ort des Infektgeschehens (extrasanguine Flüssigkeit) stimulieren und vergleichen zu können. Folglich wurde dieses Verfahren inklusive möglicher Anwendungen im Bereich der Diagnostik von Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen auch erfolgreich patentiert (SCHUB et al., 2015b).

Die Analyse von Patienten mit verschiedenen ZNS-Erkrankungen in dieser Arbeit zeigte, dass bei diesen Patienten in der CSF das Mengenverhältnis von T-Zellen und Monozyten deutlich in Richtung der T-Zellen verschoben ist. Diese Beobachtung scheint sich nicht nur auf Patienten mit ZNS-Infektion zu beschränken, sondern konnte zudem bereits für Patienten mit multipler Sklerose und anderen Patienten mit neurologischer Symptomatik nachgewiesen werden (SUBIRA et al., 2002; HAN et al., 2014). Wie in einem Kontrollexperiment mit isolierten T-Zellen bestätigt werden konnte, sind unter den APCs besonders Monozyten und nicht B-Zellen für eine erfolgreiche Antigen-spezifische Stimulation notwendig (Abbildung 34). Auch wenn generell noch andere APCs wie Makrophagen und DCs an einer optimalen T-Zell-Stimulation beteiligt sein können, bietet diese Beobachtung eine mögliche Erklärung für die suboptimale oder sogar gänzlich ausbleibende T-Zellreaktion bei alleiniger Stimulation isolierter Immunzellen aus CSF, da die hinzugefügten Antigene aufgrund der geringen Monozytenzahl nur wenig bis gar nicht prozessiert und präsentiert werden können. Lediglich die Stimulation mit SEB zeigte in dem Kontrollexperiment mit 0,66% eine geringe T-Zell-Reaktivität auch ohne Zugabe von Monozyten und B-Zellen (s. Abbildung 34C), wobei SEB auch zu einer Antigen-unabhängigen Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit MHC-Molekülen führt und somit auch eine Stimulation von Lymphozyten untereinander zu einer T-Zell-Reaktivität führen kann. Durch die Ko-Inkubation mit Blut oder durch zusätzliche Substitution von Monozyten können die CSF-Zellen hingegen auch Antigen-spezifisch stimuliert werden, was belegt, dass bei dem hier entwickelten Verfahren die APCs aus dem Blut diesen limitierenden Faktor während der simultanen Stimulation ausgleichen. Somit können durch dieses neue Nachweisverfahren Limitierungen wie z.B. die geringe Menge APCs schnell und simpel umgangen werden, ohne dass autologe APCs zeitaufwändig isoliert bzw. generiert werden müssen. Zudem ist dieses

Verfahren aufgrund der kurzen Dauer auch für einen Einsatz in der Routinediagnostik geeignet.

Wie zuvor erwähnt wurde bislang bei Patienten mit *M. tuberculosis*-bedingter Meningitis die *M. tuberculosis*-spezifische IFN $\gamma$ -Produktion von CSF-Immunzellen unter Verwendung der ELISpot-Methode bestimmt (THOMAS et al., 2008). Das hier entwickelte Verfahren bietet jedoch das Potential, die Aussagekraft der Detektion spezifischer Immunzellen bei solchen Patienten zu verbessern. Dies wird z.B. dadurch erreicht, dass, wie in einem Kontrollexperiment gezeigt werden konnte, die zur Stimulation einsetzbare Anzahl der Immunzellen aus der extrasanguinen Flüssigkeit über einen großen Bereich variabel ist, ohne dass die letztendlich detektierte Antigen-spezifische T-Zellfrequenz dadurch beeinflusst wird (s. Abbildung 33). Erst bei zu großen Mengen vorgefärbter T-Zellen nimmt die Antigen-spezifische T-Zellfrequenz ab, wobei dies durch gleichzeitige Erhöhung des zugegebenen Bluts vermutlich kompensiert werden könnte. Dies ist besonders interessant, da geringe Ausgangs-Zellzahlen beim ELISpot-Verfahren nicht nur erwartungsgemäß weniger Zytokin-positive Spots generieren, sondern gegenüber größeren Ausgangs-Zellzahlen auch die nachweisbare Frequenz negativ beeinträchtigen (SESTER et al., 2002; SMITH et al., 2009).

Im zuvor beschriebenen Kontrollversuch zur Etablierung der Ko-Stimulationsmethode zeigte sich bei Stimulation mit CMV-Antigenen bzw. SEB allerdings, dass die jeweils reaktiven CD4 T-Zellfrequenzen des durchflusszytometrisch generierten T-Zellisolates zwar konstant blieben, aber durchgehend geringer ausfielen als die direkt aus dem Vollblut stimulierten T-Zellen. Eine mögliche Beeinflussung der T-Zellreaktivität durch die Vorfärbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern konnte mithilfe eines weiteren Kontrollperiments ausgeschlossen werden, bei dem nach der doppelten Vorfärbung von nicht-gesorteten PBMCs die CMV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen aus den markierten PBMCs und den unmarkierten Zellen aus dem Blut derselben Person gleich waren (s. Abbildung 35). Somit scheint die leicht verminderte T-Zell-Reaktivität eher ein Resultat der Zellsortierungsprozedur zu sein, die die Zellen speziell in diesem Experiment durchlaufen hatten, die aber kein Bestandteil der eigentlichen Methode ist.

Ein weiterer Vorteil der Ko-Stimulationsmethode mittels Durchflusszytometrie gegenüber dem ELISpot-Verfahren könnte auch sein, dass vermutlich geringere Ausgangs-Zellzahlen für eine effektive Antigen-spezifische Stimulation ausreichend sind (SESTER et al., 2002). Diese

Vermutung muss jedoch noch im direkten Vergleich bestätigt werden. Klar ist jedoch bereits jetzt, dass das Ko-Stimulationsverfahren wie alle durchflusszytometrischen Methoden die Möglichkeit bietet, die Erreger-spezifischen Immunzellen nicht nur quantitativ zu detektieren, sondern gleichzeitig auch funktionell und phänotypisch durch die Expressionsanalyse weiterer Zytokine und verschiedener Oberflächenmarker zu charakterisieren. Wie z.B. bereits anhand von Funktionalitätsanalysen von CMV-, BKPyV- und *M. tuberculosis*-spezifischen Immunzellen im Blut gezeigt werden konnte, könnten die so gewonnenen detaillierteren Erkenntnisse bezüglich der Funktionalität dieser Zellen die Diagnostik und das Monitoring der jeweiligen Patienten zusätzlich erleichtern und verbessern (SESTER et al., 2008b; SESTER et al., 2011; SCHMIDT et al., 2014a).

Dass dieses neue Stimulationsverfahren zusätzlich auch das Potential für die Anwendung in der Diagnostik besitzt und dort zur spezifischen Identifizierung des Infektions-auslösenden Erregers beitragen kann, wurde durch die in dieser Arbeit beschriebene Analyse von Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion gezeigt. Wie zudem am Beispiel der BSF und dem Aszites gezeigt werden konnte, können unter Verwendung dieser Methode auch Immunzellen aus anderen extrasanguinen Flüssigkeiten effektiv stimuliert werden. Somit könnte dieses Verfahren auch Anwendung für die Diagnose und das Immunmonitoring anderer Infektionen bieten, bei denen die Infektion an immunprivilegierten Orten bzw. lokal begrenzt erfolgt, wie beispielsweise bei der bereits erwähnten Studie an Patienten mit VZV-bedingter Uveitis (MILIKAN et al., 2006). Aufgrund der kurzen Dauer des neuen Nachweisverfahrens könnten zudem vielversprechende Analysen wie beispielsweise die Identifizierung ESAT-6-spezifischer Immunzellen aus der Pleura von Patienten mit pleuraler Tuberkulose oder aus der CSF von Patienten mit *M. tuberculosis*-bedingter Meningitis, die zuvor unter Verwendung der ELISpot-Methode durchgeführt wurde, beschleunigt werden (WILKINSON et al., 2005; THOMAS et al., 2008).

Die nachweisbaren PPD-spezifischen Frequenzen von Immunzellen aus der BSF von Blasenzellkarzinom-Patienten konnten durch die simultane Stimulation mit Blut verbessert werden und könnten somit möglicherweise auch zum Monitoring von BCG-Therapie-bedingten Komplikationen beitragen. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde die BSF in der Regel vor der nächsten Instillation gewonnen. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Patienten mit für eine Stimulation ausreichender Immunzellzahl insgesamt gering war.

Eine mögliche Alternative, um mehr Immunzellen für eine Antigen-spezifische Stimulation zur Verfügung zu haben, könnte die Entnahme der BSF zu einem anderen Zeitpunkt sein. So wäre denkbar, dass die Anzahl an Immunzellen beispielsweise 2-3 Tage nach einer BCG-Instillation höher ist, da die Rekrutierung reaktiver T-Zellen und somit die höchste Zahl an infiltrierenden Immunzellen in zeitlicher Nähe zur BCG-Instillation zu erwarten ist. Dies würde zudem mit dem zu diesem Zeitpunkt häufigeren Auftreten von Blasenentzündungen (Zystitis) oder Grippe-ähnlichen Symptomen bei diesen Patienten korrelieren (ORIHUELA et al., 1987). Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Zellzahl wäre eine der Analyse vorausgehende *in vitro*-Expansion der Immunzellen, was jedoch zum Monitoring des Therapieverlaufs eher ungeeignet erscheint (PIERAERTS et al., 2012). Neben dem Nachweis und der Charakterisierung von Immunzellen aus anderen extrasanguinen Flüssigkeiten bieten sich jedoch auch Möglichkeiten, mit dieser Methode funktionelle T-Zellanalysen aus Gewebe oder Tumorproben durchzuführen, ohne dass dafür wie bei einer Studie von Melanom-Patienten die aufwendige Herstellung von HLA-Peptid-Tetrameren oder von Antigen-präsentierenden immortalisierten B-Zelllinien notwendig wäre (TJIN et al., 2011). Zudem könnten verschiedenste T-Zellsubpopulationen, wie z.B. die kürzlich beschriebenen CMV-assoziierten CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich ihrer Spezifität und Funktionalität analysiert oder bestimmte Antigen-spezifische T-Zellpopulationen hinsichtlich Kreuzreaktivitäten gegenüber anderen Erregern untersucht werden.

### **7.7 Nur marginaler Effekt der Harnstoffbehandlung auf die Immunogenität von CMV-Proteinen und -Lysaten**

Eine optimale simultane Analyse von Antigen-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen könnte das Monitoring von Risikopatienten entscheidend verbessern. Am Beispiel der CMV-Infektion zeigte sich, dass sowohl CMV-spezifische CD4 als auch CD8 T-Zellen an der Infektabwehr beteiligt sind. Die bisher verwendeten Stimulationsverfahren sind jedoch nur für entweder CD4 oder CD8 T-Zellen optimiert. Eine Studie bezüglich der Harnstoffbehandlung des BZLF-1 Proteins von EBV und des pp65-Proteins von CMV zeigte, dass Antigene so optimiert werden können, dass sie gleichzeitig eine spezifische CD4 und CD8 Immunantwort hervorrufen können (BARABAS et al., 2008). Um die klinische Verwendbarkeit solchermaßen behandelte Antigene zu untersuchen, wurden Blutproben von immungesunden Probanden und immunsupprimierten Patienten, die eine der Zielgruppen für die Anwendung eines T-Zell-

Monitorings sind, analysiert. Während das unbehandelte CMV-Lysat die stärkste CMV-spezifische T<sub>h</sub>1- und T<sub>h</sub>2-Immunantwort induzierte, reichte bereits die Harnstoffbehandlung eines einzelnen Proteins (pp65) aus, um eine im Median höhere CD8 T-Zellantwort zu induzieren, als dies bei dem CMV-Lysat der Fall war. Wie bereits für das BZLF-1-Protein experimentell bewiesen wurde, wird dies vermutlich dadurch ausgelöst, dass das pp65-Protein aufgrund der Harnstoffbehandlung über Kreuzpräsentation dem MHC-I-Signalweg zugeführt wird, wodurch letztendlich neben den CD4 T-Zellen auch CMV-spezifische CD8 T-Zellen aktiviert werden (BARABAS et al., 2008). Da mit dem Harnstoff-behandelten pp65-Protein auch bei immunsupprimierten Patienten CMV-spezifische CD8 T-Zellen deutlich nachweisbar waren (s. Abschnitt 6.5.1.2 und Abbildung 43), könnten bei diesen Patienten durch die simple Antigen-Behandlung mit Harnstoff zusätzlich zu den CD4 auch CD8 T-Zellen spezifisch aktiviert werden, ohne dass wie in vielen Studien der HLA-Status der jeweiligen Person beachtet werden oder kostenintensive einzelne oder überlappende Peptide synthetisiert werden müssten (MAECKER et al., 2001; KIECKER et al., 2004).

Da bereits durch die Harnstoffbehandlung eines einzelnen Proteins dessen stimulatorische Wirkung verbessert wurde, wurde in den darauffolgenden Experimenten versucht, den Effekt auf andere Proteine oder Proteingemische (Lysate) zu übertragen. Wie jedoch die Analyse des Harnstoff-behandelten IE-1-Proteins veranschaulicht, scheint sich die vermeintlich positive Wirkung des Harnstoffs nicht beliebig auf jedes Protein übertragen zu lassen. Folglich könnte entweder eine bestimmte Größe des Proteins notwendig sein, um durch den Harnstoff dem MHC-I-Signalweg zugeführt zu werden, oder – was noch wahrscheinlicher ist – sind bestimmte Aminosäuren oder eine bestimmte Abfolge von Aminosäuren notwendig, die durch den Harnstoff chemisch so verändert werden, dass sie für eine Kreuzpräsentation zugänglich werden. Bekannt ist bereits, dass die Harnstoffbehandlung von Proteinen beispielsweise zur Carbamylierung der Aminogruppen des N-Terminus bzw. der Aminosäuren Arginin und Lysin führt (KOLLIPARA, ZAHEDI, 2013). Folglich könnte die Gesamtzahl bzw. die Zahl der zugänglichen Aminogruppen eines Proteins dafür verantwortlich sein, ob das Protein durch die Harnstoffbehandlung für eine Kreuzpräsentation zugänglich wird oder nicht. Allerdings ist ansonsten bisher nur wenig über den tatsächlichen Effekt der Harnstoffbehandlung bekannt, sodass nicht klar ist, warum genau bestimmte Proteine stärkere oder andere Immunantworten auslösen als andere.

Zudem kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der Harnstoff sich auf die Immunogenität mancher Proteine negativ auswirkt.

Neben der für manche Proteine beobachteten verbesserten Stimulation von CD8 T-Zellen, scheint ein weiterer positiver Effekt der Harnstoffbehandlung in einer verstärkten IFN $\gamma$ -Expression pro T-Zelle zu liegen, was sowohl bei CMV-spezifischen CD4 als auch CD8 T-Zellen zu beobachten war. Wie genau der Harnstoff dabei auf die Zellen wirkt ist bislang unklar und bedarf noch weiterer Analysen.

Insgesamt konnte für keines der hier analysierten Harnstoff-behandelten Proteine oder Lysate ein deutlicher Nutzen für die diagnostische Anwendung nachgewiesen bzw. identifiziert werden, da die induzierte CMV-spezifische CD8 T-Zellantwort meist gering war und somit kein eindeutiger Vorteil im Vergleich zu dem unbehandelten CMV-Lysat erreicht werden konnte. Für zukünftige Studien wäre es sinnvoll, zunächst den Einfluss der Harnstoffbehandlung auf einzelne CMV-Proteine zu testen und abschließend die Proteine mit positiver Wirkung zusammen als Stimulus zu verwenden, um die größtmögliche CMV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellantwort zu induzieren. Wie bereits in einigen Studien gezeigt wurde, ist das Spektrum der immunogenen CMV-Proteine sehr umfangreich und umfasst nicht nur die CMV-Proteine pp65 und IE-1 (ELKINGTON et al., 2003). So wurden in einer Studie aus dem Jahr 2005 151 von 213 CMV-ORFs als immunogen für CD4 und/oder CD8 T-Zellen getestet (SYLWESTER et al., 2005). Folglich könnten zahlreiche CMV-Proteine mit immunogener Wirkung in zukünftigen Studien einer Harnstoffbehandlung unterzogen werden.

Wie unter anderem durch Deletionsmutanten bereits in einer Studie gezeigt werden konnte, ist pp65 unter den CMV Proteinen dasjenige mit der höchsten Immunogenität für zytotoxische T-Zellen (WILLS et al., 1996). Die hohe immunogene Wirkung von pp65 konnte in dieser Arbeit anhand der deutlich geringeren induzierten CMV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz nach Stimulation mit den pp65-Deletionsmutanten bestätigt werden. Dass jedoch auch ohne pp65 und IE-1 eine meist schwächere aber trotzdem deutlich positive CMV-spezifische Immunantwort induziert werden konnte, unterstreicht die Bedeutung anderer CMV-Proteine für eine effektive CMV-spezifische Immunantwort. Die Tatsache, dass die CMV-spezifische Immunantwort eines Probanden sogar weder durch das Fehlen von IE-1 noch pp65 beeinflusst wurde, lässt vermuten, dass sich Nachweisverfahren nicht auf diese

beiden Proteine beschränken sollten. Dies wird zudem dadurch unterstützt, dass beim Vergleich mit der CMV-Serologie als Goldstandard die Sensitivität der beiden Einzelproteine pp65 und IE-1 jeweils geringer war als die Sensitivität des CMV-Lysates, unabhängig davon, ob die durchflusszytometrische Analyse oder das ELISpot-Verfahren verwendet wurden (s. Abschnitt 6.5.1.1 und 6.5.1.2).

## **7.8 Limitierungen dieser Arbeit**

Die offensichtlichste allgemeine Limitierung aller immunbasierten T-Zellanalysen ist die Anzahl der T-Lymphozyten an sich. Folglich kann die Aussagekraft solcher Analysen bei Patienten mit Leukopenie bzw. Lymphopenie, wie sie z.B. bei sehr starker Immunsuppression direkt nach der Organtransplantation besteht, stark eingeschränkt sein (MARINELLA, 2010). Wie am Beispiel der Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A) oder Steroide (Methylprednisolon) deutlich wurde, ist bei der Verwendung von Blutproben von Patienten unter medikamentöser Therapie zu beachten, dass sich die Einnahme immunsuppressiver Medikamente negativ auf die T-Zell-Reaktivität *in vitro* auswirken kann.

Da der Fokus dieser Arbeit auf der VZV-spezifischen Immunantwort lag, wurde bei der Rekrutierung der Patientenproben zunächst lediglich die „Zosterhistorie“ der Patienten überprüft. Informationen bezüglich akuter bzw. stattgehabter HSV-Reaktivierungen wurden hingegen retrospektiv erhoben und konnten bei den Patienten mit rheumatischen Erkrankungen nicht vervollständigt werden. Folglich konnte bei diesen Patienten nicht eindeutig geklärt werden, ob dort eventuell doch Patienten mit akutem Lippenherpes in die Gruppe der nicht-symptomatischen Patienten eingeschlossen wurden. Da die Patienten mit rheumatischen Erkrankungen jedoch mit Ausnahme der erhöhten TNF $\alpha$ -Expression, die auch bei den SEB-reaktiven Zellen nachweisbar war, keine Veränderungen zu den anderen nicht-symptomatischen Personengruppen besaßen, ist anzunehmen, dass sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme entweder keine akute symptomatische HSV-Reaktivierung hatten, oder sowieso keine Unterschiede zwischen Personen mit und ohne HSV-Reaktivierung bestehen, sodass eine mögliche fehlerhafte Einteilung der Patienten mit rheumatischen Erkrankungen sich nicht auf die Ergebnisse auswirken würde.

Aufgrund der geringen Inzidenz von VZV-bedingten ZNS-Infektionen und der häufig geringen Immunzellzahl in der CSF der in Frage kommenden Patienten, war die für diese Analysen im Zeitraum der Arbeit verfügbare Patientenzahl gering. Im Rahmen dieses Projektes war es

jedoch so, dass die entnommene CSF stets vorrangig der Standard-Diagnostik zugeführt wurde, so dass die Flüssigkeit aufgeteilt wurde und somit der Anteil, der für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung stand bei einzelnen Patienten limitiert war. Da für die Erreger-Diagnostik jedoch vorwiegend der wässrige Anteil der Flüssigkeit eingesetzt wird, könnte in der klinischen Praxis Erreger- und Zell-Diagnostik sinnvoll aus derselben Probe durchgeführt werden. Trotz dieser Einschränkungen in der Anzahl der analysierbaren Probenmaterialien zeigte sich jedoch, dass in dieser Studie bei der Analyse von CSF-Proben signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen herausgearbeitet werden konnten. Zur Stärkung der Aussagekraft empfiehlt es sich jedoch, die Ergebnisse in einem größeren Patientenkollektiv erneut zu evaluieren. Von besonderem Interesse sind hierbei Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion ohne gleichzeitigen Zoster-typischen Hautausschlag, bei denen die korrekte Diagnose bzw. Abgrenzung zu anderen ZNS-Erkrankungen derzeit nur unzureichend gestellt werden kann.

Da verschiedene immunologische Parameter erwiesenermaßen eine Altersabhängigkeit zeigen (s.a. Ergebnisse dieser Arbeit), ist eine weitere Limitierung zudem, dass bei einigen wenigen Teilanalysen keine altersangepassten Personen-Gruppen gebildet werden konnten (s. Personencharakteristika). Folglich kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das Alter der Personen in den betreffenden Analysen nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

## **7.9 Fazit**

Insgesamt konnten in dieser Arbeit immunologische Veränderungen in der Quantität, in der Funktionalität und im Phänotyp der VZV-spezifischen Immunantwort während eines akuten Herpes Zoster herausgearbeitet werden. Es wurde nachgewiesen, dass diese Zoster-assoziierten Veränderungen sowohl bei immunkompetenten als auch bei immunsupprimierten Personen auftreten und dass sie im zeitlichen Verlauf reversibel sind. Zudem wurden Hinweise auf eine mögliche Therapie-bedingte Beeinträchtigung der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen in RA-Patienten identifiziert, die teilweise für die erhöhte Zosterinzidenz dieser Patienten verantwortlich sein könnte. Interessanterweise scheint die HSV-spezifische CD4 Immunantwort hingegen während einer akuten HSV-Reaktivierung nicht charakteristisch verändert zu sein.

Das in dieser Arbeit entwickelte und erfolgreich patentierte neue simultanen Stimulationsverfahren von Immunzellen aus extrasanguinen Flüssigkeiten und im Blut bietet

nicht nur zahlreiche potentielle Anwendungsmöglichkeiten für zukünftige Studien oder in der Diagnostik, sondern konnte in dieser Arbeit in Kombination mit der Analyse Zoster-assoziiertes immunologischer Marker auch bereits zur eindeutigen Identifizierung von Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion verwendet werden. Die in dieser Arbeit auf diagnostische Anwendbarkeit analysierte Harnstoffbehandlung von CMV-Proteinen zur optimierten gleichzeitigen Induktion von CMV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen scheint hingegen nicht geeignet, um die stimulatorische Aktivität jedwedes Antigens oder Antigengemischs zu verbessern.

Die vorliegende Arbeit leistet somit einen Beitrag zur Charakterisierung regulatorischer Mechanismen zur Funktionalität und zum Phänotyp der Herpesvirus-spezifischen Immunantwort bei latenter und aktiver Infektion. Insbesondere in Kombination mit neu entwickelten Nachweisverfahren von Antigen-spezifischen T-Zellen in extrasanguinen Flüssigkeiten ergeben sich zahlreiche neue und interessante Ansatzpunkte für die immunologische Forschung und für die verbesserte Diagnostik von Infektionserkrankungen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. AbbVie (2016) Humira: EPAR Produktinformationen (European Medicines Agency)
2. Ahlenstiel-Grunow T, Koch A, Grosshennig A, Fromke C, Sester M, Sester U, Schroder C, Pape L (2014) A multicenter, randomized, open-labeled study to steer immunosuppressive and antiviral therapy by measurement of virus (CMV, ADV, HSV)-specific T cells in addition to determination of trough levels of immunosuppressants in pediatric kidney allograft recipients (IVIST01-trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 15:324
3. Appay V, Reynard S, Voelker V, Romero P, Speiser DE, Leyvraz S (2006) Immunomonitoring of CD8+ T cells in whole blood versus PBMC samples. *J Immunol Methods* 309:192-199
4. Arndt KA (1988) Adverse reactions to acyclovir: topical, oral, and intravenous. *J Am Acad Dermatol* 18:188-190
5. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E (2007) Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis (Cambridge, Cambridge University Press).
6. Arvin AM (1992) Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 166 Suppl 1:S35-41
7. Asanuma H, Sharp M, Maecker HT, Maino VC, Arvin AM (2000) Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *J Infect Dis* 181:859-866
8. Avci AB, Feist E, Burmester GR (2015) Biologicals in rheumatoid arthritis: current and future. *RMD Open* 1:e000127
9. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Comperat E, Sylvester RJ, Kaasinen E, Bohle A, Palou Redorta J, Roupert M, European Association of U (2013) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 64:639-653
10. Barabas S, Gary R, Bauer T, Lindner J, Lindner P, Weinberger B, Jilg W, Wolf H, Deml L (2008) Urea-mediated cross-presentation of soluble Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *PLoS Pathog* 4:e1000198
11. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687
12. Barry M, Bleackley RC (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2:401-409
13. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ (2010) Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis* 50:1439-1447
14. Bhaskaran A, Racsa L, Gander R, Southern P, Cavuoti D, Alatoon A (2013) Interpretation of positive molecular tests of common viruses in the cerebrospinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77:236-240
15. Brandau S, Suttman H (2007) Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother* 61:299-305

16. Bristol-Myers Squibb (2016) Orencia: EPAR Produktinformationen (European Medicines Agency)
17. Chadban S, Morris R, Hirsch HH, Bunnapradist S, Arns W, Budde K (2008) Immunosuppression in renal transplantation: some aspects for the modern era. *Transplant Rev (Orlando)* 22:241-251
18. Channappanavar R, Twardy BS, Suvas S (2012) Blocking of PDL-1 interaction enhances primary and secondary CD8 T cell response to herpes simplex virus-1 infection. *PLoS One* 7:e39757
19. Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF (2009) Herpes simplex. *Pediatr Rev* 30:119-129; quiz 130
20. Che H, Lukas C, Morel J, Combe B (2014) Risk of herpes/herpes zoster during anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis. Systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 81:215-221
21. Cherrington JM, Mocarski ES (1989) Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J Virol* 63:1435-1440
22. Chiu C, McCausland M, Sidney J, Duh FM, Roupheal N, Mehta A, Mulligan M, Carrington M, Wieland A, Sullivan NL, Weinberg A, Levin MJ, Pulendran B, Peters B, Sette A, Ahmed R (2014) Broadly reactive human CD8 T cells that recognize an epitope conserved between VZV, HSV and EBV. *PLoS Pathog* 10:e1004008
23. Chlibek R, Smetana J, Pauksens K, Rombo L, Van den Hoek JA, Richardus JH, Plassmann G, Schwarz TF, Ledent E, Heineman TC (2014) Safety and immunogenicity of three different formulations of an adjuvanted varicella-zoster virus subunit candidate vaccine in older adults: a phase II, randomized, controlled study. *Vaccine* 32:1745-1753
24. Chugai/Roche Pharma AG (2016) RoActemra: EPAR Produktinformationen (European Medicines Agency)
25. Chung E, Sen J (2012) The ongoing pursuit of a prophylactic HSV vaccine. *Rev Med Virol* 22:285-300
26. Danziger-Isakov L, Kumar D, Practice ASTIDCo (2013) Vaccination in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 13 Suppl 4:311-317
27. Davidovici BB, Balicer RD, Klement E, Green MS, Mendelson E, Smetana Z, Cohen DI (2007) Comparison of the dynamics and correlates of transmission of Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) and Varicella-Zoster Virus (VZV) in a sample of the Israeli population. *Eur J Epidemiol* 22:641-646
28. Davila L, Ranganathan P (2011) Pharmacogenetics: implications for therapy in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 7:537-550
29. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD (2006) PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354
30. de Graaf MT, Smitt PA, Luitwieler RL, van Velzen C, van den Broek PD, Kraan J, Gratama JW (2011) Central memory CD4+ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry B Clin Cytom* 80:43-50
31. Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, Marrack P, Benoist C, Mathis D (1990) Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* 62:1115-1121

32. Demeestere D, Libert C, Vandenbroucke RE (2015) Clinical implications of leukocyte infiltration at the choroid plexus in (neuro)inflammatory disorders. *Drug Discov Today* 20:928-941
33. Dirks J (2016) Phenotype and functionality of pathogen specific T cells in chronic infections and implications for novel diagnostic and therapeutic approaches, Dissertation, Universität des Saarlandes, Homburg.
34. Dirks J, Tas H, Schmidt T, Kirsch S, Gärtner BC, Sester U, Sester M (2013) PD-1 analysis on CD28(-) CD27(-) CD4 T cells allows stimulation-independent assessment of CMV viremic episodes in transplant recipients. *Am J Transplant* 13:3132-3141
35. Doerr HW, Rentschler M, Scheifler G (1987) Serologic detection of active infections with human herpes viruses (CMV, EBV, HSV, VZV): diagnostic potential of IgA class and IgG subclass-specific antibodies. *Infection* 15:93-98
36. Edwards CJ (2012) IL-6 inhibition and infection: treating patients with tocilizumab. *Rheumatology (Oxford)* 51:769-770
37. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T (2004) Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350:2572-2581
38. Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M, Khanna R (2003) Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* 77:5226-5240
39. Elsässer J, Janssen MW, Becker F, Suttman H, Schmitt K, Sester U, Stockle M, Sester M (2013) Antigen-specific CD4 T cells are induced after intravesical BCG-instillation therapy in patients with bladder cancer and show similar cytokine profiles as in active tuberculosis. *PLoS One* 8:e69892
40. Emery VC (2013) Human herpesvirus vaccines and future directions. *Am J Transplant* 13 Suppl 3:79-86; quiz 86
41. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD (2000) Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 355:2032-2036
42. Farid S, Azizi G, Mirshafiey A (2013) Anti-citrullinated protein antibodies and their clinical utility in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 16:379-386
43. Fishman JA (2013) Overview: cytomegalovirus and the herpesviruses in transplantation. *Am J Transplant* 13 Suppl 3:1-8; quiz 8
44. Fishman JA, Issa NC (2010) Infection in organ transplantation: risk factors and evolving patterns of infection. *Infect Dis Clin North Am* 24:273-283
45. Freer G, Rindi L (2013) Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances. *Methods* 61:30-38
46. Furuta Y, Ohtani F, Aizawa H, Fukuda S, Kawabata H, Bergstrom T (2005) Varicella-zoster virus reactivation is an important cause of acute peripheral facial paralysis in children. *Pediatr Infect Dis J* 24:97-101
47. Furuta Y, Ohtani F, Kawabata H, Fukuda S, Bergstrom T (2000) High prevalence of varicella-zoster virus reactivation in herpes simplex virus-seronegative patients with acute peripheral facial palsy. *Clin Infect Dis* 30:529-533
48. Galloway JB, Mercer LK, Moseley A, Dixon WG, Ustianowski AP, Helbert M, Watson KD, Lunt M, Hyrich KL, Symmons DP (2013) Risk of skin and soft tissue infections (including shingles) in patients exposed to anti-tumour necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Ann Rheum Dis* 72:229-234

49. Garcia-Doval I, Perez-Zafrilla B, Descalzo MA, Rosello R, Hernandez MV, Gomez-Reino JJ, Carmona L, Group BS (2010) Incidence and risk of hospitalisation due to shingles and chickenpox in patients with rheumatic diseases treated with TNF antagonists. *Ann Rheum Dis* 69:1751-1755
50. Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, Zelini P, Furione M, Comolli G, Pellegrini C, Sarchi E, Migotto C, Bonora MR, Meloni F, Arbustini E (2011) Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *Am J Transplant* 11:2463-2471
51. Gildeen D, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA (2009) Varicella zoster virus vasculopathies: diverse clinical manifestations, laboratory features, pathogenesis, and treatment. *Lancet Neurol* 8:731-740
52. Gildeen D, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA (2010) Neurological disease produced by varicella zoster virus reactivation without rash. *Curr Top Microbiol Immunol* 342:243-253
53. Gildeen D, Nagel MA, Cohrs RJ, Mahalingam R (2013) The variegated neurological manifestations of varicella zoster virus infection. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:374
54. Good RA, Zak SJ (1956) Disturbances in gamma globulin synthesis as experiments of nature. *Pediatrics* 18:109-149
55. Gourishankar S, McDermid JC, Jhangri GS, Preiksaitis JK (2004) Herpes zoster infection following solid organ transplantation: incidence, risk factors and outcomes in the current immunosuppressive era. *Am J Transplant* 4:108-115
56. Grahn A, Studahl M (2015) Varicella-zoster virus infections of the central nervous system - Prognosis, diagnostics and treatment. *J Infect* 71:281-293
57. Han S, Lin YC, Wu T, Salgado AD, Mexhitaj I, Wuest SC, Romm E, Ohayon J, Goldbach-Mansky R, Vanderver A, Marques A, Toro C, Williamson P, Cortese I, Bielekova B (2014) Comprehensive immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in patients with neuroimmunological diseases. *J Immunol* 192:2551-2563
58. Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G (2006) Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev* 211:236-254
59. Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G (2005) Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 174:1037-1045
60. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132
61. Hayashida K, Ozaki T, Nishimura N, Gotoh K, Funahashi K, Nakane K, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Yamanishi K (2015) Evaluation of varicella zoster virus-specific cell-mediated immunity by using an interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 426:50-55
62. Hayward AR, Cosyns M, Jones M, Levin MJ, Villanueva E, Weinberg A, Chan CY (1998) Cytokine production in varicella-zoster virus-stimulated cultures of human blood lymphocytes. *J Infect Dis* 178 Suppl 1:S95-98
63. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA (2004) Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199:9-26
64. Hjalmarsson A, Blomqvist P, Skoldenberg B (2007) Herpes simplex encephalitis in Sweden, 1990-2001: incidence, morbidity, and mortality. *Clin Infect Dis* 45:875-880

65. Ho M, Suwansirikul S, Dowling JN, Youngblood LA, Armstrong JA (1975) The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 293:1109-1112
66. Hoffmann-La Roche (2016) Rituximab: EPAR Produktinformationen (European Medicines Agency)
67. Hovens MM, Vaessen N, Sijpkens YW, de Fijter JW (2007) Unusual presentation of central nervous system manifestations of Varicella zoster virus vasculopathy in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 9:237-240
68. Huang FF, Wang ZJ, Zhang CR (2013) Tear HSV-specific secretory IgA as a potential indicator for recurrent stromal herpes simplex keratitis: a preliminary study. *Cornea* 32:987-991
69. Ibrahim SF, van den Engh G (2007) Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 106:19-39
70. Ison MG, Grossi P, Practice ASTIDCo (2013) Donor-derived infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 13 Suppl 4:22-30
71. Jafari C, Kessler P, Sotgiu G, Ernst M, Lange C (2011) Impact of a Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-gamma release assay in bronchoalveolar lavage fluid for a rapid diagnosis of tuberculosis. *J Intern Med* 270:254-262
72. Jing L, Haas J, Chong TM, Bruckner JJ, Dann GC, Dong L, Marshak JO, McClurkan CL, Yamamoto TN, Bailer SM, Laing KJ, Wald A, Verjans GM, Koelle DM (2012) Cross-presentation and genome-wide screening reveal candidate T cells antigens for a herpes simplex virus type 1 vaccine. *J Clin Invest* 122:654-673
73. Jing L, Laing KJ, Dong L, Russell RM, Barlow RS, Haas JG, Ramchandani MS, Johnston C, Buus S, Redwood AJ, White KD, Mallal SA, Phillips EJ, Posavad CM, Wald A, Koelle DM (2016) Extensive CD4 and CD8 T Cell Cross-Reactivity between Alphaherpesviruses. *J Immunol* 196:2205-2218
74. Kalejta RF (2008) Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:249-265, table of contents
75. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR (2015) The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol* 15:295-307
76. Kappler J, Kotzin B, Herron L, Gelfand EW, Bigler RD, Boylston A, Carrel S, Posnett DN, Choi Y, Marrack P (1989) V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 244:811-813
77. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, Palmer S, Brockman M, Rathod A, Piechocka-Trocha A, Baker B, Zhu B, Le Gall S, Waring MT, Ahern R, Moss K, Kelleher AD, Coffin JM, Freeman GJ, Rosenberg ES, Walker BD (2007) Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* 8:1246-1254
78. Kawai K, Gebremeskel BG, Acosta CJ (2014) Systematic review of incidence and complications of herpes zoster: towards a global perspective. *BMJ Open* 4:e004833
79. Khan AA, Srivastava R, Spencer D, Garg S, Fremgen D, Vahed H, Lopes PP, Pham TT, Hewett C, Kuang J, Ong N, Huang L, Scarfone VM, Nesburn AB, Wechsler SL, BenMohamed L (2015) Phenotypic and functional characterization of herpes simplex virus glycoprotein B epitope-specific effector and memory CD8+ T cells from symptomatic and asymptomatic individuals with ocular herpes. *J Virol* 89:3776-3792
80. Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Rickinson AB, Moss PA (2007) T cell recognition patterns of immunodominant cytomegalovirus antigens in primary and persistent infection. *J Immunol* 178:4455-4465

81. Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk HD, Volkmer-Engert R, Kern F (2004) Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol* 65:523-536
82. Kilgore PE, Kruszon-Moran D, Seward JF, Jumaan A, Van Loon FP, Forghani B, McQuillan GM, Wharton M, Fehrs LJ, Cossen CK, Hadler SC (2003) Varicella in Americans from NHANES III: implications for control through routine immunization. *J Med Virol* 70 Suppl 1:S111-118
83. Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, Wu L, Baekkevold ES, Lassmann H, Staugaitis SM, Campbell JJ, Ransohoff RM (2003) Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8389-8394
84. Ko GB, Kim T, Kim SH, Choi SH, Kim YS, Woo JH, Kim YH, Park JB, Lee SK, Park SK, Park JS, Han DJ, Lee SO (2013) Increased incidence of herpes zoster in the setting of cytomegalovirus preemptive therapy after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis* 15:416-423
85. Koelle DM (2007). Immunobiology and host response. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, Arvin A, G Campadelli-Fiume, E Mocarski, PS Moore, B Roizman, R Whitley, K Yamanishi, eds. (Cambridge).
86. Kollipara L, Zahedi RP (2013) Protein carbamylation: in vivo modification or in vitro artefact? *Proteomics* 13:941-944
87. Kost RG, Straus SE (1996) Postherpetic neuralgia--pathogenesis, treatment, and prevention. *N Engl J Med* 335:32-42
88. Kotton CN (2013) CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *Am J Transplant* 13 Suppl 3:24-40; quiz 40
89. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A, Transplantation Society International CMVCG (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 96:333-360
90. Kowarik MC, Grummel V, Wemlinger S, Buck D, Weber MS, Berthele A, Hemmer B (2014) Immune cell subtyping in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J Neurol* 261:130-143
91. Kubandova Z, Mathieu S, Pourtier C, Soubrier M (2010) Serious herpes zoster in rheumatoid arthritis under anti-interleukin-6 receptor antibody. *Joint Bone Spine* 77:623-624
92. Lal H, Cunningham AL, Godeaux O, Chlibek R, Diez-Domingo J, Hwang SJ, Levin MJ, McElhaney JE, Poder A, Puig-Barbera J, Vesikari T, Watanabe D, Weckx L, Zahaf T, Heineman TC, Group ZOES (2015) Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults. *N Engl J Med* 372:2087-2096
93. Lang VR, Englbrecht M, Rech J, Nusslein H, Manger K, Schuch F, Tony HP, Fleck M, Manger B, Schett G, Zwerina J (2012) Risk of infections in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab. *Rheumatology (Oxford)* 51:852-857
94. Langan SM, Thomas SL, Smeeth L, Margolis DJ, Nitsch D (2016) Zoster vaccination is associated with a reduction of zoster in elderly patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*
95. Lauzurica R, Bayes B, Frias C, Fontseré N, Hernandez A, Matas L, Jimenez A, Bonet J, Romero R (2003) Disseminated varicella infection in adult renal allograft recipients: role of mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* 35:1758-1759

96. Lee WT, Pasos G, Cecchini L, Mittler JN (2002) Continued antigen stimulation is not required during CD4(+) T cell clonal expansion. *J Immunol* 168:1682-1689
97. Letsch A, Scheibenbogen C (2003) Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods* 31:143-149
98. Levin MJ (2012) Immune senescence and vaccines to prevent herpes zoster in older persons. *Curr Opin Immunol* 24:494-500
99. Levin MJ, Oxman MN, Zhang JH, Johnson GR, Stanley H, Hayward AR, Caulfield MJ, Irwin MR, Smith JG, Clair J, Chan IS, Williams H, Harbecke R, Marchese R, Straus SE, Gershon A, Weinberg A, Veterans Affairs Cooperative Studies Program Shingles Prevention Study I (2008) Varicella-zoster virus-specific immune responses in elderly recipients of a herpes zoster vaccine. *J Infect Dis* 197:825-835
100. Levin MJ, Schmader KE, Pang L, Williams-Diaz A, Zerbe G, Canniff J, Johnson MJ, Caldas Y, Cho A, Lang N, Su SC, Parrino J, Popmihajlov Z, Weinberg A (2016) Cellular and Humoral Responses to a Second Dose of Herpes Zoster Vaccine Administered 10 Years After the First Dose Among Older Adults. *J Infect Dis* 213:14-22
101. Levin MJ, Smith JG, Kaufhold RM, Barber D, Hayward AR, Chan CY, Chan IS, Li DJ, Wang W, Keller PM, Shaw A, Silber JL, Schlienger K, Chalikonda I, Vessey SJ, Caulfield MJ (2003) Decline in varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity with increasing age and boosting with a high-dose VZV vaccine. *J Infect Dis* 188:1336-1344
102. Lim WH, Kireta S, Russ GR, Coates PT (2007) Uremia impairs blood dendritic cell function in hemodialysis patients. *Kidney Int* 71:1122-1131
103. Litjens NH, Huisman M, van den Dorpel M, Betjes MG (2008) Impaired immune responses and antigen-specific memory CD4+ T cells in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 19:1483-1490
104. Ljungman P, Griffiths P, Paya C (2002) Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 34:1094-1097
105. Lynch K, Agarwal P, Paranandi A, Hadley S, Vullaganti M (2014) Extensive VZV Encephalomyelitis without Rash in an Elderly Man. *Case Rep Neurol Med* 2014:694750
106. Lyons AB (1999) Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol* 77:509-515
107. Lyons AB, Doherty KV (2004) Flow cytometric analysis of cell division by dye dilution. *Curr Protoc Cytom* Chapter 9:Unit 9 11
108. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, Khatamzas E, Pitcher CJ, Bunde T, Persaud N, Trigona W, Fu TM, Sinclair E, Brecht BM, McCune JM, Maino VC, Kern F, Picker LJ (2001) Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods* 255:27-40
109. Malavige GN, Jones L, Black AP, Ogg GS (2007) Rapid effector function of varicella-zoster virus glycoprotein I-specific CD4+ T cells many decades after primary infection. *J Infect Dis* 195:660-664
110. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, Kalpoe J, Lisboa L, Ely L, Kaul DR, Schwartz BS, Morris MI, Ison MG, Yen-Lieberman B, Sebastian A, Assi M, Humar A (2013) Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 56:817-824
111. Marinella MA (2010) Hematologic abnormalities following renal transplantation. *Int Urol Nephrol* 42:151-164

112. McAllister SC, Schleiss MR (2014) Prospects and perspectives for development of a vaccine against herpes simplex virus infections. *Expert Rev Vaccines* 13:1349-1360
113. McDonald JR, Zeringue AL, Caplan L, Ranganathan P, Xian H, Burroughs TE, Fraser VJ, Cunningham F, Eisen SA (2009) Herpes zoster risk factors in a national cohort of veterans with rheumatoid arthritis. *Clin Infect Dis* 48:1364-1371
114. McGrath N, Anderson NE, Croxson MC, Powell KF (1997) Herpes simplex encephalitis treated with acyclovir: diagnosis and long term outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63:321-326
115. McVoy MA (2013) Cytomegalovirus vaccines. *Clin Infect Dis* 57 Suppl 4:S196-199
116. Meyding-Lamade U, Strank C (2012) Herpesvirus infections of the central nervous system in immunocompromised patients. *Ther Adv Neurol Disord* 5:279-296
117. Milikan JC, Kuijpers RW, Baarsma GS, Osterhaus AD, Verjans GM (2006) Characterization of the varicella zoster virus (VZV)-specific intra-ocular T-cell response in patients with VZV-induced uveitis. *Exp Eye Res* 83:69-75
118. Miller GG, Dummer JS (2007) Herpes simplex and varicella zoster viruses: forgotten but not gone. *Am J Transplant* 7:741-747
119. Milligan GN, Bernstein DI, Bourne N (1998) T lymphocytes are required for protection of the vaginal mucosae and sensory ganglia of immune mice against reinfection with herpes simplex virus type 2. *J Immunol* 160:6093-6100
120. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, Guyot-Revol V, Gunatheesan R, Klenerman P, Lalvani A (2007) Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 178:5217-5226
121. Minassian C, Thomas SL, Smeeth L, Douglas I, Brauer R, Langan SM (2015) Acute Cardiovascular Events after Herpes Zoster: A Self-Controlled Case Series Analysis in Vaccinated and Unvaccinated Older Residents of the United States. *PLoS Med* 12:e1001919
122. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schaetzel H (2010) *Molekulare Virologie, Vol 3* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
123. Moreland L, Bate G, Kirkpatrick P (2006) Abatacept. *Nat Rev Drug Discov* 5:185-186
124. Mueller NH, Gilden DH, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA (2008) Varicella zoster virus infection: clinical features, molecular pathogenesis of disease, and latency. *Neurol Clin* 26:675-697, viii
125. Mullen KM, Gocke AR, Allie R, Ntranos A, Grishkan IV, Pardo C, Calabresi PA (2012) Expression of CCR7 and CD45RA in CD4+ and CD8+ subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *J Neuroimmunol* 249:86-92
126. Munoz P, Rodriguez C, Bouza E (2005) Mycobacterium tuberculosis infection in recipients of solid organ transplants. *Clin Infect Dis* 40:581-587
127. Murphy K, Travers P, Walport M (2009) *Janeway Immunologie, Vol 7* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
128. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11:823-836
129. Novartis (2013) Sandimmun: EPAR Produktinformationen (European Medicines Agency)
130. Oh KH, Ahn C, Kim YS, Han JS, Kim S, Lee JS, Kim EC, Oh MD, Chung JH (2002) Atypical generalized zoster with suspicious esophageal involvement and early relapse in an adult renal transplant recipient. *Transplant Proc* 34:1174-1177

131. Orbach H, Katz U, Sherer Y, Shoenfeld Y (2005) Intravenous immunoglobulin: adverse effects and safe administration. *Clin Rev Allergy Immunol* 29:173-184
132. Orihuela E, Herr HW, Pinsky CM, Whitmore WF, Jr. (1987) Toxicity of intravesical BCG and its management in patients with superficial bladder tumors. *Cancer* 60:326-333
133. Ouwendijk WJ, Geluk A, Smits SL, Getu S, Osterhaus AD, Verjans GM (2014) Functional characterization of ocular-derived human alphaherpesvirus cross-reactive CD4 T cells. *J Immunol* 192:3730-3739
134. Ouwendijk WJ, Laing KJ, Verjans GM, Koelle DM (2013) T-cell immunity to human alphaherpesviruses. *Curr Opin Virol* 3:452-460
135. Palmer AM (2010) The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment. *Neurobiol Dis* 37:3-12
136. Pantaleo G, Harari A (2006) Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 6:417-423
137. Park HB, Kim KC, Park JH, Kang TY, Lee HS, Kim TH, Jun JB, Bae SC, Yoo DH, Craft J, Jung S (2004) Association of reduced CD4 T cell responses specific to varicella zoster virus with high incidence of herpes zoster in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 31:2151-2155
138. Pasedag T, Weissenborn K, Wurster U, Ganzenmueller T, Stangel M, Skripuletz T (2014) Varicella Zoster Virus Meningitis in a Young Immunocompetent Adult without Rash: A Misleading Clinical Presentation. *Case Rep Neurol Med* 2014:686218
139. Patterson-Bartlett J, Levin MJ, Lang N, Schodel FP, Vessey R, Weinberg A (2007) Phenotypic and functional characterization of ex vivo T cell responses to the live attenuated herpes zoster vaccine. *Vaccine* 25:7087-7093
140. Pavlopoulou ID, Pouloupoulou S, Melexopoulou C, Papazaharia I, Zavos G, Boletis IN (2015) Incidence and risk factors of herpes zoster among adult renal transplant recipients receiving universal antiviral prophylaxis. *BMC Infect Dis* 15:285
141. Pergam SA, Limaye AP, Practice ASTIDCo (2013) Varicella zoster virus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 13 Suppl 4:138-146
142. Pfizer (2016) Enbrel: EPAR Produktinformationen (European Medicines Agency)
143. Pieraerts C, Martin V, Jichlinski P, Nardelli-Haefliger D, Derre L (2012) Detection of functional antigen-specific T cells from urine of non-muscle invasive bladder cancer patients. *Oncoimmunology* 1:694-698
144. Posavad CM, Koelle DM, Shaughnessy MF, Corey L (1997) Severe genital herpes infections in HIV-infected individuals with impaired herpes simplex virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10289-10294
145. Posfay-Barbe KM, Pittet LF, Sottas C, Grillet S, Wildhaber BE, Rodriguez M, Kaiser L, Belli DC, McLin VA, Siegrist CA (2012) Varicella-zoster immunization in pediatric liver transplant recipients: safe and immunogenic. *Am J Transplant* 12:2974-2985
146. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL (1995) Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38:44-48
147. Rabasseda X (2003) Brivudine: a herpes virostatic with rapid antiviral activity and once-daily dosing. *Drugs Today (Barc)* 39:359-371
148. Rajcani J, Andrea V, Ingeborg R (2004) Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes* 28:293-310
149. Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Nam JL, Smolen JS, Buch M, Gossec L, van der Heijde D, Winthrop K, Landewe R (2014) Safety of synthetic and biological DMARDs: a

- systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 73:529-535
150. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 3:569-581
  151. Razonable RR (2005) Epidemiology of cytomegalovirus disease in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Am J Health Syst Pharm* 62:S7-13
  152. Reiber H, Uhr M (2011). Liquordiagnostik. In *Klinische Neurologie*, Berlitz P, ed. (Heidelberg, Springer Verlag), pp. 143-178.
  153. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C (1998) The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 4:111-117
  154. Riley JL, June CH (2005) The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105:13-21
  155. Rondaan C, de Haan A, Horst G, Hempel JC, van Leer C, Bos NA, van Assen S, Bijl M, Westra J (2014) Altered cellular and humoral immunity to varicella-zoster virus in patients with autoimmune diseases. *Arthritis Rheumatol* 66:3122-3128
  156. Roux C, Breuil V, Albert C, Allam V, Grisot C, Chami H, Dasilva V, Euller-Ziegler L (2011) Ophthalmic herpes zoster infection in patients with rheumatoid arthritis who were treated with tocilizumab. *J Rheumatol* 38:399
  157. Sadaoka K, Okamoto S, Gomi Y, Tanimoto T, Ishikawa T, Yoshikawa T, Asano Y, Yamanishi K, Mori Y (2008) Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay. *J Infect Dis* 198:1327-1333
  158. Salem Fourati I, Grenier AJ, Jolette E, Merindol N, Ovetchkine P, Soudeyns H (2014) Development of an IFN-gamma ELISpot assay to assess varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity following umbilical cord blood transplantation. *J Vis Exp*
  159. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712
  160. Sanofi-Aventis (2015) Urbason: Fachinformationen (Rote Liste Service GmbH)
  161. Sauerbrei A, Eichhorn U, Schacke M, Wutzler P (1999) Laboratory diagnosis of herpes zoster. *J Clin Virol* 14:31-36
  162. Sauerbrei A, Schmitt S, Scheper T, Brandstadt A, Saschenbrecker S, Motz M, Soutschek E, Wutzler P (2011) Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Thuringia, Germany, 1999 to 2006. *Euro Surveill* 16
  163. Sauerbrei A, Wutzler P (2002) Laboratory diagnosis of central nervous system infections caused by herpesviruses. *J Clin Virol* 25 Suppl 1:S45-51
  164. Schmidt T, Adam C, Hirsch HH, Janssen MW, Wolf M, Dirks J, Kardas P, Ahlenstiel-Grunow T, Pape L, Rohrer T, Fliser D, Sester M, Sester U (2014a) BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. *Am J Transplant* 14:1334-1345
  165. Schmidt T, Dirks J, Enders M, Gärtner BC, Uhlmann-Schiffler H, Sester U, Sester M (2012) CD4+ T-cell immunity after pandemic influenza vaccination cross-reacts with seasonal antigens and functionally differs from active influenza infection. *Eur J Immunol* 42:1755-1766
  166. Schmidt T, Schub D, Wolf M, Dirks J, Ritter M, Leyking S, Singh M, Zawada AM, Blaes-Eise AB, Samuel U, Sester U, Sester M (2014b) Comparative analysis of assays for

- detection of cell-mediated immunity toward cytomegalovirus and *M. tuberculosis* in samples from deceased organ donors. *Am J Transplant* 14:2159-2167
167. Schmidt T, Sester M (2013) Detection of antigen-specific T cells based on intracellular cytokine staining using flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 1064:267-274
  168. Schub D, Janssen E, Leyking S, Sester U, Assmann G, Hennes P, Smola S, Vogt T, Rohrer T, Sester M, Schmidt T (2015a) Altered phenotype and functionality of varicella zoster virus-specific cellular immunity in individuals with active infection. *J Infect Dis* 211:600-612
  169. Schub D, Schmidt T, Sester M (2015b). Neues Verfahren zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten. Deutsches Patentamt PCT/DE/2015/000569
  170. Sester M, Gärtner BC, Sester U (2008a) Monitoring of CMV-specific T-cell levels after organ transplantation. *Laboratoriumsmedizin-Journal of Laboratory Medicine* 32:121-130
  171. Sester M, Gärtner BC, Sester U, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Kohler H (2003) Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation* 76:1229-1230
  172. Sester M, Leboeuf C, Schmidt T, Hirsch HH (2016) The "ABC" of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant* 16:1697-1706
  173. Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Kohler H (2001) Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71:1287-1294
  174. Sester M, Sester U, Gärtner B, Kubuschok B, Girndt M, Meyerhans A, Kohler H (2002) Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus. *J Virol* 76:3748-3755
  175. Sester U, Fousse M, Dirks J, Mack U, Prasse A, Singh M, Lalvani A, Sester M (2011) Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states. *PLoS One* 6:e17813
  176. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Kohler H, Sester M (2008b) PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus-specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant* 8:1486-1497
  177. Shalom G, Zisman D, Bitterman H, Harman-Boehm I, Greenberg-Dotan S, Dreiher J, Feldhamer I, Moser H, Hammerman A, Cohen Y, Cohen AD (2015) Systemic Therapy for Psoriasis and the Risk of Herpes Zoster: A 500,000 Person-year Study. *JAMA Dermatol* 151:533-538
  178. Silva D, Ponte CG, Hacker MA, Antas PR (2013) A whole blood assay as a simple, broad assessment of cytokines and chemokines to evaluate human immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Acta Trop* 127:75-81
  179. Simms PE, Ellis TM (1996) Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin Diagn Lab Immunol* 3:301-304
  180. Singh N, Dummer JS, Kusne S, Breinig MK, Armstrong JA, Makowka L, Starzl TE, Ho M (1988) Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effect of OKT3 antibodies. *J Infect Dis* 158:124-131

181. Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, Clair J, Caulfield MJ (2001) Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:871-879
182. Smith SG, Joosten SA, Verscheure V, Pathan AA, McShane H, Ottenhoff TH, Dockrell HM, Mascart F (2009) Identification of major factors influencing ELISpot-based monitoring of cellular responses to antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 4:e7972
183. Spruance SL, Evans TG, McKeough MB, Thai L, Araneo BA, Daynes RA, Mishkin EM, Abramovitz AS (1995) Th1/Th2-like immunity and resistance to herpes simplex labialis. *Antiviral Res* 28:39-55
184. Stanzel TP, Diaz JD, Mather R, Wong IG, Margolis TP, Gritz DC (2014) The epidemiology of herpes simplex virus eye disease in Northern California. *Ophthalmic Epidemiol* 21:370-377
185. Steain M, Sutherland JP, Rodriguez M, Cunningham AL, Slobedman B, Abendroth A (2014) Analysis of T cell responses during active varicella-zoster virus reactivation in human ganglia. *J Virol* 88:2704-2716
186. Strangfeld A, Listing J, Herzer P, Liebhaber A, Rockwitz K, Richter C, Zink A (2009) Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. *JAMA* 301:737-744
187. Subira D, Castanon S, Aceituno E, Hernandez J, Jimenez-Garofano C, Jimenez A, Jimenez AM, Roman A, Orfao A (2002) Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am J Clin Pathol* 117:952-958
188. Svenningsson A, Hansson GK, Andersen O, Andersson R, Patarroyo M, Stemme S (1993) Adhesion molecule expression on cerebrospinal fluid T lymphocytes: evidence for common recruitment mechanisms in multiple sclerosis, aseptic meningitis, and normal controls. *Ann Neurol* 34:155-161
189. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, Sleath PR, Grabstein KH, Hosken NA, Kern F, Nelson JA, Picker LJ (2005) Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 202:673-685
190. Thomas MM, Hinks TS, Raghuraman S, Ramalingam N, Ernst M, Nau R, Lange C, Kusters K, Gnanamuthu C, John GT, Marshall B, Lalvani A (2008) Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* meningitis by enumeration of cerebrospinal fluid antigen-specific T-cells. *Int J Tuberc Lung Dis* 12:651-657
191. Tjin EP, Konijnenberg D, Krebbers G, Mallo H, Drijfhout JW, Franken KL, van der Horst CM, Bos JD, Nieweg OE, Kroon BB, Haanen JB, Melief CJ, Vyth-Dreese FA, Luiten RM (2011) T-cell immune function in tumor, skin, and peripheral blood of advanced stage melanoma patients: implications for immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17:5736-5747
192. Tseng HF, Luo Y, Shi J, Sy LS, Tartof SY, Sim JJ, Hechter RC, Jacobsen SJ (2016) Effectiveness of Herpes Zoster Vaccine in Patients 60 Years and Older With End-stage Renal Disease. *Clin Infect Dis* 62:462-467
193. van Besouw NM, Verjans GM, Zuijderwijk JM, Litjens NH, Osterhaus AD, Weimar W (2012) Systemic varicella zoster virus reactive effector memory T-cells impaired in the elderly and in kidney transplant recipients. *J Med Virol* 84:2018-2025
194. van Vollenhoven RF (2009) Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol* 5:531-541
195. Vander Heiden MG (2011) Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov* 10:671-684

196. Veetil BM, Myasoedova E, Matteson EL, Gabriel SE, Green AB, Crowson CS (2013) Incidence and time trends of herpes zoster in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 65:854-861
197. Vermont CL, Jol-van der Zijde EC, Hissink Muller P, Ball LM, Bredius RG, Vossen AC, Lankester AC (2014) Varicella zoster reactivation after hematopoietic stem cell transplant in children is strongly correlated with leukemia treatment and suppression of host T-lymphocyte immunity. *Transpl Infect Dis* 16:188-194
198. Vossen MT, Gent MR, Weel JF, de Jong MD, van Lier RA, Kuijpers TW (2004) Development of virus-specific CD4+ T cells on reexposure to Varicella-Zoster virus. *J Infect Dis* 190:72-82
199. Webster A (1991) Cytomegalovirus as a possible cofactor in HIV disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 4 Suppl 1:S47-52
200. Weinberg A, Lazar AA, Zerbe GO, Hayward AR, Chan IS, Vessey R, Silber JL, MacGregor RR, Chan K, Gershon AA, Levin MJ (2010) Influence of age and nature of primary infection on varicella-zoster virus-specific cell-mediated immune responses. *J Infect Dis* 201:1024-1030
201. Wherry EJ (2011) T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12:492-499
202. Wherry EJ, Kurachi M (2015) Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15:486-499
203. Widmann T, Sester U, Gärtner BC, Schubert J, Pfreundschuh M, Kohler H, Sester M (2008) Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One* 3:e3634
204. Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W (2011) Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol* 32:603-611
205. Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, Ewer K, Prakash M, Klenerman P, Maskell N, Davies R, Pasvol G, Lalvani A (2005) Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. *Clin Infect Dis* 40:184-187
206. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG (1996) The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 70:7569-7579
207. Wingard JR (1993) Viral infections in leukemia and bone marrow transplant patients. *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 2:115-125
208. Witt MN, Braun GS, Ihrler S, Schmid H (2009) Occurrence of HSV-1-induced pneumonitis in patients under standard immunosuppressive therapy for rheumatic, vasculitic, and connective tissue disease. *BMC Pulm Med* 9:22
209. Wolf M, Leyking S, Schaefer M, Elsaesser J, Janssen M, Mihm J, van Bentum K, Sester M, Sester U (2016) Prevalence of preformed alloreactive CD4 and CD8 T-cells in renal transplant candidates and healthy controls characterized by a rapid whole blood assay. eingereicht
210. Yawn BP, Gilden D (2013) The global epidemiology of herpes zoster. *Neurology* 81:928-930
211. Yun H, Xie F, Delzell E, Chen L, Levitan EB, Lewis JD, Saag KG, Beukelman T, Winthrop K, Baddley JW, Curtis JR (2015) Risks of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis according to biologic disease-modifying therapy. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 67:731-736

212. Zerboni L, Sen N, Oliver SL, Arvin AM (2014) Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 12:197-210
213. Zhang Y, White CJ, Levin M, Hayward A (1995) Cytokine production in varicella-zoster virus-stimulated lymphocyte cultures. *Neurology* 45:S38-40
214. Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* 28:445-489
215. Zisman D, Bitterman H, Shalom G, Feldhamer I, Comanesther D, Batat E, Greenberg-Dotan S, Cohen S, Cohen AD (2016) Psoriatic arthritis treatment and the risk of herpes zoster. *Ann Rheum Dis* 75:131-135
216. Zochling J, Smith EU (2010) Seronegative spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24:747-756

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über den allgemeinen Ablauf der Antigen-Präsentation von endogenen und exogenen Antigenen.....	18
Abbildung 2: Modell der VZV-spezifischen T-Zellfrequenz im Zeitverlauf.....	32
Abbildung 3: Einteilung der RA-Patienten anhand ihrer anti-rheumatischen Therapie.....	51
Abbildung 4: Übersicht der Einteilung von Patienten mit Entzündungen des ZNS.....	55
Abbildung 5: Die VZV-spezifische Immunität ist in der Mehrheit immunkompetenter Personen nachweisbar und zeigt altersabhängige Unterschiede.....	81
Abbildung 6: VZV-spezifische CD4 T-Zellen immungesunder Probanden sind multifunktional.....	84
Abbildung 7: Die Proliferationsfähigkeit VZV-reaktiven CD4 T-Zellen korreliert mit der von CD8 T-Zellen, jedoch nicht mit der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz.....	85
Abbildung 8: Ausgeprägte Veränderungen der Frequenz und Zytokinexpression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen während eines akuten Herpes Zoster.....	87
Abbildung 9: Ausgeprägte Veränderungen der Expression von CTLA-4, PD-1 und CD127 auf VZV-spezifischen Immunzellen während eines akuten Herpes Zoster.....	88
Abbildung 10: Normalisierung der meisten Zoster-assoziierten VZV-spezifischen Veränderungen nach Abklingen der Erkrankung.....	89
Abbildung 11: Die Quantität und Qualität der VZV-spezifischen Immunantworten in nicht-symptomatischen immunbeeinträchtigten Patienten sind nur marginal durch die Immundefizienz beeinflusst.....	93
Abbildung 12: Zusammenfassung des Ausmaßes der Zoster-assoziierten immunologischen Veränderungen bei immunkompetenten und immunbeeinträchtigten Personen.....	95
Abbildung 13: Während eines akuten Zosters ist Anteil VZV-spezifischer zentraler Gedächtnis-CD4 T-Zellen erhöht.....	97
Abbildung 14: Die VZV-spezifische Immunantwort eines immungesunden Probanden mit VZV-Primärinfekt weist ebenfalls Zoster-assoziierte Veränderungen auf.....	98
Abbildung 15: Die Analyse der VZV-spezifische Immunantwort einer VZV-seropositiven Probandin im zeitlichen Verlauf nach einer MMRV-Impfung zeigte reversible quantitative und funktionelle Veränderungen.....	100
Abbildung 16: RA-Patienten besitzen gegenüber immungesunden Probanden deutlich geringere VZV-spezifische CD4 T-Zellfrequenzen, wohingegen die VZV-IgG-Level gleich sind.....	102
Abbildung 17: Die Verminderung der VZV-spezifischen CD4 T-Zellfrequenz bei RA-Patienten ist Steroid-unabhängig.....	103
Abbildung 18: Die VZV-spezifische Immunantwort ist bei RA-Patienten unter Biologika beeinträchtigt.....	104
Abbildung 19: VZV-spezifische CD4 T-Zellen von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen unterscheiden sich ihrem Zytokinexpressionsprofil nur geringfügig von gesunden Kontrollen.....	107
Abbildung 20: Die Expression von CTLA-4, PD-1 und CD127 auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen ist bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen im Vergleich zu immungesunden Personen unverändert.....	109

Abbildung 21: Die aktuelle VZV-spezifische T-Zellfrequenz von RA-Patienten wird durch zurückliegende symptomatische VZV-Reaktivierungen nicht beeinflusst.....	110
Abbildung 22: Anti-rheumatische Medikamente zeigen keinen Einfluss auf die „frühe“ Zytokinexpression VZV-spezifischer und SEB-reaktiver T-Zellen. ....	112
Abbildung 23: Die „späte“ IFN $\gamma$ -Expression und die mittels BrdU-Einbaurrate nachgewiesene Proliferation SEB-reaktiver T-Zellen scheint durch anti-rheumatische Medikamente nicht beeinflusst zu werden. ....	114
Abbildung 24: Die T-Zellfrequenzen und IgG-Levels der HSV-spezifischen Immunantwort korrelieren gut. ....	116
Abbildung 25: Die HSV-spezifische zelluläre Immunantwort von immunsupprimierten Patienten zeigt keine Veränderungen in der Frequenz und Expression der Moleküle CTLA-4, PD-1 und CD127. ....	118
Abbildung 26: Die Zytokinexpression HSV-spezifischer CD4 T-Zellen ist lediglich bei Patienten mit rheumatoiden Erkrankungen leicht verändert. ....	120
Abbildung 27: Die HSV-spezifische Immunantwort von Personen mit akuter HSV-Reaktivierung zeigt keine signifikanten Veränderungen in der Quantität sowie der Funktionalität und dem Phänotyp. ....	122
Abbildung 28: Während eines akuten Herpes Zoster ist die HSV-spezifische CTLA-4- und PD-1-Expression bei einem Teil der Personen erhöht, wohingegen die übrigen immunologischen Marker nicht verändert sind. ....	124
Abbildung 29: Kein Nachweis Erreger-spezifischer T-Zellen bei alleiniger Stimulation von CSF-Immunzellen. .	127
Abbildung 30: Die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellsubtypen in CSF einer Patientin mit VZV-bedingter Meningoneuritis offenbarte hohe T-Zellzahlen aber nur eine geringe Anzahl APCs (B-Zellen und Monozyten).....	129
Abbildung 31: Die Markierung der CSF-Immunzellen mit Fluorochrom-gekoppelten anti-CD45 Antikörpern ermöglicht nach der simultanen Stimulation mit Blut die Diskriminierung reaktiver Immunzellen aus CSF und Blut.....	130
Abbildung 32: Die Stimulation von CSF-Immunzellen in Anwesenheit von Blut ermöglicht den Nachweis VZV-spezifischer Immunzellen aus CSF.....	131
Abbildung 33: Die nachweisbare CMV-spezifische CD4 T-Zellfrequenz bleibt bei unterschiedlichen Ausgangszahlen an vorgefärbten CD3 T-Zellen konstant. ....	132
Abbildung 34: CMV-spezifische T-Zellen können in Anwesenheit von Monozyten, aber nicht von B-Zellen stimuliert werden.....	134
Abbildung 35: Fluorochrom-gekoppelte Antikörper werden während der Stimulation nicht auf ungefärbte Immunzellen übertragen. ....	136
Abbildung 36: Übersicht über die Blasenspülflüssigkeits-Proben und die Verwendbarkeit für Stimulationsexperimente.....	137
Abbildung 37: Die Nachweisbarkeit angereicherter PPD-spezifischer T-Zellen aus Blasenspülflüssigkeit wird durch die Verwendung des simultanen Stimulationsverfahrens verbessert. ....	138
Abbildung 38: Das simultane Nachweisverfahren ist zur Analyse von Antigen-spezifischen T-Zellen aus Aszitesflüssigkeit geeignet. ....	141
Abbildung 39: Erhöhte Frequenz und CTLA-4-Expression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen aus CSF und Blut in Patienten mit VZV-bedingter ZNS-Infektion. ....	144

Abbildung 40: Keine deutlichen Unterschiede im Zytokinexpressionsprofil von VZV-spezifischen CD4 T-Zellen in der CSF und im Blut von Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen. ....	147
Abbildung 41: HSV-spezifische CD4 T-Zellen sind in der CSF eines Patienten mit HSV-Enzephalitis stark angereichert.....	148
Abbildung 42: Im ELISpot wird bei CMV-seropositiven Personen nach Stimulation mit dem unbehandelten CMV-Lysat die höchste Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Spots induziert.....	150
Abbildung 43: Das Harnstoff-behandelte pp56 induziert mehrheitlich CD8 T-Zellantworten, wohingegen durch das unbehandelte CMV-Lysat deutliche CMV-spezifische CD4 T-Zellantworten induziert werden. ....	152
Abbildung 44: Patientengruppen- und CMV-Serostatus-abhängige Analyse der Frequenzen reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation mit Harnstoff-behandelten und unbehandelten Antigenen.....	154
Abbildung 45: Gute Korrelation der Ergebnisse der ELISpot-Analyse und des durchflusszytometrischen Nachweisverfahrens.....	155
Abbildung 46: Die Stimulation mit dem Harnstoff-behandelten pp65-Protein induziert eine stärkere IFN $\gamma$ -Expression, verändert das Zytokinexpressionsprofil CMV-reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen jedoch nicht.....	156
Abbildung 47: Nur das unbehandelte CMV-Lysat induziert in CMV-seropositiven Personen eine deutliche T $_h$ 2-Immunantwort, wohingegen eine CMV-spezifische T $_h$ 17-Immunantwort bei allen drei Antigenen ausbleibt. .	158
Abbildung 48: Die Harnstoffbehandlung je eines kommerziellen VZV- und CMV-Lysates hat keinen Einfluss auf die Antigen-spezifische CD4 und CD8 T-Zellfrequenz, scheint jedoch zu einem Anstieg der IFN $\gamma$ -Expression pro reaktive CD4 T-Zelle zu führen.....	160
Abbildung 49: Die Harnstoffbehandlung hat bei einem anderen CMV-Lysat überwiegend ebenfalls keinen Einfluss auf die CMV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellfrequenz.....	162
Abbildung 50: Analyse der durch CMV-Deletionsmutanten induzierten CMV-spezifischen Immunantworten zur Bestimmung der Immunogenität von pp65 und IE-1.....	164
Abbildung 51: Zusammenfassung der markanten Unterschiede zwischen der VZV-spezifischen Immunantwort von nicht-symptomatischen Personen und Zoster-Patienten. ....	167
Abbildung 52: Funktionalitäts-Modell VZV-spezifischer CD4 T-Zellen ab dem Zeitpunkt der primären VZV-Infektion.....	170

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biologika zur Therapie rheumatischer Erkrankungen und deren Funktion.....	26
Tabelle 2: Patientencharakteristiken zur detaillierten Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort in Personen mit und ohne Herpes Zoster .....	49
Tabelle 3: Charakteristika VZV-IgG-positiver bzw. –grenzwertiger Patienten mit rheumatischen Erkrankungen und der Kontroll-Probanden .....	50
Tabelle 4: Patientencharakteristika zur Analyse der HSV-spezifischen Immunantwort .....	53
Tabelle 5: Charakteristika der Patienten mit Entzündungen des ZNS, die mit der Ko-Stimulationsmethode analysiert wurden .....	56
Tabelle 6: Charakteristika der Patienten für die Analyse Harnstoff-behandelter Antigene .....	58
Tabelle 7: Antigene zur Antigen-spezifischen Stimulation aus Vollblut.....	60
Tabelle 8: Antikörper-Gemische zur Fluorochrom-markierten Färbung Antigen-spezifisch stimulierter Blutproben .....	62
Tabelle 9: Antikörper-Gemisch zur Analyse Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten und Blut.....	65
Tabelle 10: Antikörper-Gemisch zum Nachweis verschiedener Lymphozytensubpopulationen.....	66
Tabelle 11: Antigene zur Analyse der VZV-spezifischen T-Zellproliferation.....	72
Tabelle 12: Antikörper-Gemisch zum Nachweis der VZV-spezifischen T-Zellproliferation .....	73
Tabelle 13: Antikörper-Gemisch zur Quantifizierung der Antigen-spezifischen Proliferation anhand der BrdU-Einbaurrate sowie der späten IFN $\gamma$ -Expression.....	74
Tabelle 14: Übersicht der zur Vorinkubation verwendeten anti-rheumatischen und immunsuppressiven Medikamente sowie der jeweiligen verwendeten Medikamentenkonzentration .....	75
Tabelle 15: Antigene zur Stimulation Antigen-spezifischer Immunzellen mit der ELISpot-Technologie .....	76
Tabelle 16: Grenzwerte der verschiedenen Antikörper-ELISA zur Bestimmung des jeweiligen Serostatus.....	77
Tabelle 17: ROC-Analyse zur Identifizierung der besten Diskriminierung zwischen Zoster-Patienten und nicht-symptomatischen immungesunden Personen.....	91
Tabelle 18: ROC-Analyse zur Identifizierung der besten Diskriminierung zwischen Patienten mit VZV-bedingten ZNS-Infektionen und Patienten mit nicht VZV-bedingten ZNS-Erkrankungen.....	145

# 11 Publikationen, Patent und wissenschaftliche Konferenzen

## 11.1 Publikationen

### 11.1.1 *Publikationen/Patente dieser Dissertation*

1. **Schub D**, Janssen E, Leyking S, Sester U, Assmann G, Hennes P, Smola S, Vogt T, Rohrer T, Sester M, Schmidt T (2015) Altered phenotype and functionality of varicella zoster virus-specific cellular immunity in individuals with active infection. *J Infect Dis* 211:600-612
2. **Schub D**, Schmidt T, Sester M (2015) Neues Verfahren zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten. Deutsches Patentamt PCT/DE/2015/000569

### 11.1.2 *Weitere Publikation*

1. Schmidt T, **Schub D**, Wolf M, Dirks J, Ritter M, Leyking S, Singh M, Zawada AM, Blaes-Eise AB, Samuel U, Sester U, Sester M (2014) Comparative analysis of assays for detection of cell-mediated immunity toward cytomegalovirus and *M. tuberculosis* in samples from deceased organ donors. *Am J Transplant* 14:2159-2167

### 11.1.3 *Manuskripte in Vorbereitung*

1. Schub D, Sester U, Aßmann G, Sester M Schmidt T, VZV-specific and polyfunctional T-cell responses in patients with rheumatic diseases
2. Schub D, Schmidt T, Elsässer J, Fousse M, Sester U, Sester M, New stimulatory approach for the simultaneous analysis of antigen-specific immune cells in extrasanguinous fluids and blood
3. Schub D, Fousse M, Faßbender K, Sester U, Sester M, Schmidt T, Increased frequency and CTLA-4 expression of varicella zoster virus-specific T cells in cerebrospinal fluid and blood of patients with VZV-related central nervous system infections
4. Schub D, Aßmann G, Sester U, Schmidt T, Sester M, Phenotype and functionality of herpes simplex virus-specific CD4 T cells during active infection

5. Schub D, Schmidt T, Leyking S, Bendfeldt H, Deml L, Sester U, Sester M, Urea-modified protein and lysate antigens and their potential to simultaneously induce CMV-specific CD4 and CD8 T-cell responses in immunocompetent and immunocompromised individuals

## **11.2 Präsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen**

### **11.2.1 National**

#### 22. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Frankfurt.

Schub D, Janssen E et al. (2013) Altered phenotype and functionality of varicella-zoster virus specific CD4 T-cells in patients with acute herpes zoster. (Poster)

Schub D, Schmidt T et al. (2013) Urea-modified protein antigens for simultaneous assessment of CMV-specific CD4 and CD8 T-cell responses using a new CMV-ELISPOT assay and flow-cytometry. (Vortrag)

#### 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Mainz.

Schub D, Janssen E et al. (2013) Altered phenotype and functionality of varicella zoster virus-specific cellular immunity in immunocompetent and immunocompromised patients with acute herpes zoster. (Poster)

#### 56. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internisten Gesellschaft (SPIG), Neustadt an der Weinstraße.

Schub D, Schmidt T et al. (2012) Merkmale der Varizella-Zoster Virus-spezifischen Immunität zur Beurteilung der Viruskontrolle in immunkompetenten und immunbeeinträchtigten Personen. (Poster)

### **11.2.2 International**

#### 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain.

Schub D, Janssen E et al. (2014) Varicella zoster virus-specific cellular immunity in immunocompetent and immunocompromised patients with acute herpes zoster shows distinct alterations of phenotype and functionality. (Poster)

Schub D, Schmidt T et al. (2014) Urea-modified protein antigens and their potential to simultaneously induce CMV-specific CD4 and CD8 T-cell responses comparing a new CMV-ELISPOT assay and flow-cytometric analysis. (Poster)

American Transplant Congress (ATC) Seattle, USA.

Schub D, Schmidt T et al. (2013) Urea-modified protein antigens to simultaneously assess CMV-specific CD4 and CD8 T-cell responses using a new CMV-ELISPOT assay and flow-cytometry. (Poster)

Schub D, Janssen E et al. (2013) Increased Expression of CTLA-4 and PD-1 and Restricted Functionality as Typical Features of Varicella Zoster Virus-Specific T Cells in Patients with Acute Herpes Zoster. (Poster)

24th International Congress of The Transplantation Society, Berlin, Germany.

Schub D, Hennes P et al. (2012) Phenotype and functionality of varicella zoster virus-specific cellular immunity as correlate of protection in immunocompetent and immunocompromised individuals. (Poster)

American Transplant Congress (ATC), Boston, USA.

Schub D, Schmidt T et al. (2012) Properties of varicella zoster virus-specific cellular immunity as correlate of protection in immunocompetent and immunocompromised individuals. (Poster)

## 12 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Martina Sester, die es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit mit diesem interessanten immunologischen Thema in ihrer Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie durchzuführen. Insbesondere für die exzellente Betreuung, die Erweiterung meines immunologischen Horizonts, die Möglichkeit zur Teilnahme an nationalen und internationalen wissenschaftlichen Kongressen, die Freiheiten beim wissenschaftlichen Arbeiten sowie für die Begutachtung dieser Arbeit möchte ich mich bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Tina Schmidt, die mich sowohl während meines Studiums (F-Arbeit und Diplomarbeit), als auch während meiner Doktorarbeit hervorragend betreut und unterstützt hat und mir mit ihrem wissenschaftlichen Verständnis eine große Hilfe bei der Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen war. Auch für die Unterstützung bei organisatorischen Fragen, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Urban Sester für die Vermittlung medizinischer Sachverhalte und die unnachahmliche Begeisterung beim Bearbeiten statistischer Fragestellungen und Analysen bedanken.

Bei den Mitgliedern der Abteilung für Transplantation- und Infektionsimmunologie („Sesterlinge“) bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Labor. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Jan Dirks („Ex-Sesterling“) bedanken, der mir zudem mit seiner technischen Expertise während meiner Diplomarbeit die Grundlagen der Durchflusszytometrie vermittelt hat, sodass ich diese während meiner Doktorarbeit erweitern konnte.

Ein besonderer Dank für eine angenehme und produktive Zusammenarbeit gilt Frau Dr. Eva Janssen, Frau Dr. Julia Elsäßer und Herrn Dr. Mathias Fousse. Allen weiteren Kooperationspartnern des Uniklinikum des Saarlandes (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie; Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie; Kliniken für Innere Medizin I und IV, Klinik für Urologie und Kinderurologie; Klinik für Neurologie; Institut für Virologie) und den Mitarbeitern der Firma Lophius Biosciences möchte ich ebenfalls danken.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei allen Blutspendern und den Spendern von extrasanguinen Flüssigkeiten sowie nochmal explizit bei Frau Dr. Sarah Leyking, Frau Dr.

Claudia Adam, Frau Dr. Janine Mihm, Herrn Prof. Dr. Gunter Aßmann und Herrn Prof. Dr. Tilman Rohrer für die Organisation und Entnahme dieser Proben, ohne die diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich sowohl während meines Studiums als auch während meiner Doktorarbeit unermüdlich seelisch und moralisch unterstützt hat und mir zudem durch ihre finanzielle Unterstützung meine lange Ausbildung ermöglicht hat.

Zum Schluss, aber von ganzem Herzen, bedanke ich mich bei meiner Lebensgefährtin Tina. Danke dafür, dass du an mich glaubst, mich wenn nötig antreibst oder aufmunterst und mein Leben bereicherst. Schön, dass es dich und unsere kleine Familie gibt!