

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

**Charakterisierung der durch neue proteinbasierte Impfstoffe
induzierten humoralen und zellulären Immunantwort bei
Immungesunden und Risikogruppen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät (M)

der Universität des Saarlandes

2025

vorgelegt von

Franziska Hielscher

geb. am 10.09.1989 in Apolda

Tag der Promotion: 12.01.2026

Dekan: Prof. Dr. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Martina Sester

Prof. Dr. Sören Leif Becker

Prof. Dr. Julia Weinmann-Menke

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	1
3 Einleitung	3
3.1 Immunologische Grundlagen.....	3
3.1.1 Angeborenes Immunsystem.....	3
3.1.2 Adaptives Immunsystem.....	3
3.1.2.1 T-Lymphozyten.....	4
3.1.2.2 B-Lymphozyten und Antikörper	8
3.1.3 Immundefizienz	9
3.1.4 Impfungen	11
3.1.4.1 Impfstoffarten	12
3.1.4.2 Nachweis der impfinduzierten Immunantwort	14
3.2 Das Varizella Zoster Virus (VZV).....	14
3.2.1 Virusaufbau	14
3.2.2 Infektionsverlauf.....	15
3.2.3 Risikofaktoren für eine VZV-Reaktivierung	17
3.2.4 Therapie und Prophylaxe der Varizellen und des Herpes Zoster	19
3.3 Das SARS-Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)	21
3.3.1 Virusaufbau	21
3.3.2 Übertragung und Verbreitung	23
3.3.3 Prophylaxe und Behandlung	23
3.4 Ziel dieser Arbeit	24
4 Material und Methoden.....	27
4.1 Geräte und Reagenzien.....	27
4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	27

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.2	Chemikalien und Kits	28
4.1.3	Puffer und Lösungen	28
4.1.4	Antikörper	29
4.1.5	Antigene	30
4.1.6	UV-inaktivierte Virusstämme	30
4.1.7	Medikamente für <i>in vitro</i> Versuche	31
4.1.8	Software	31
4.2	Probandenkollektive	32
4.2.1	Probandenkollektiv zur Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort nach Impfung mit HZ/su	32
4.2.2	Probandenkollektiv zur Analyse der Immunantwort nach Impfung mit NVX-CoV2373	33
4.3	Quantifizierung und Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen mittels Kurzzeitstimulation	34
4.3.1	Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen	35
4.3.2	Lyse von Erythrozyten und Fixierung der Leukozyten	36
4.3.3	Färbungen zur durchflusszytometrischen Analyse	37
4.3.3.1	Intrazelluläre Färbung	37
4.3.3.2	Intranukleäre Färbung	38
4.4	Oberflächenfärbung zur Charakterisierung von B- und T-Zellsubpopulationen	38
4.5	Proliferations-Assay	40
4.5.1	Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation	40
4.5.2	Färben der PBMCs mit CFDA-SE und Kultivierung der Zellen	41
4.5.3	Zellernte und Messung der PBMCs	42
4.6	<i>In vitro</i> Versuche mit immunsupprimierenden Medikamenten	43
4.7	Durchflusszytometrische Analyse	44
4.8	Auswertung durchflusszytometrischer Messungen	45
4.8.1	Auswertung von Oberflächenfärbungen	45
4.8.2	Auswertung von intrazellulären Färbungen nach Kurzzeitstimulation	47
4.8.3	Auswertung des Differenzierungsstatus VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach intrazellulärer Färbung	49

INHALTSVERZEICHNIS

4.8.4	Auswertstrategie der intranukleären Ki-67 Färbung	51
4.8.5	Auswertung der Proliferationsaktivität	52
4.9	Quantifizierung spezifischer IgG-Antikörper.....	52
4.9.1	Quantifizierung VZV-spezifischer IgG-Antikörper.....	53
4.9.2	Quantifizierung SARS-CoV-2 Spike-spezifischer Antikörper.....	53
4.9.3	Quantifizierung von SARS-CoV-2 NCAP-spezifischen Antikörpern mittels ELISA	53
4.10	Neutralisationstest	54
4.10.1	Untersuchung der VZV-spezifischen Neutralisation.....	54
4.10.2	Neutralisation SARS-CoV-2 Spike- und Varianten-spezifischer Antikörper.....	55
4.10.2.1	Neutralisations-Test mittels Surrogat-Assay.....	55
4.10.2.2	Mikro-Neutralisationstest.....	55
4.11	Statistische Auswertung	56
5	Ergebnisse	57
5.1	Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort nach HZ/su-Impfung	57
5.1.1	Etablierungsversuche zur Analyse der VZV-spezifischen Immunität nach HZ/su-Impfung	57
5.1.1.1	Etablierung der experimentellen Bedingungen für die Kurzzeitstimulation....	57
5.1.1.2	Optimierung des Erntezeitpunkts für den Proliferations-Assay	59
5.1.2	Weitere Charakterisierung der VZV-spezifischen T-Zell-Antwort bei gesunden Probanden	60
5.1.2.1	HZ/su induziert VZV-spezifische CD4 T-Zellen, aber CD8 T-Zellen nur geringfügig.....	60
5.1.2.2	Starke Ki-67 Expression in VZV-spezifischen CD4 T-Zellen kurz nach der Impfung	62
5.1.2.3	Geringe Granzym B Expression auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen	63
5.1.3	Studienpopulationen von Dialysepatienten und gesunden Probanden.....	64
5.1.4	Unterschiede in der Zellzahl der Leukozyten-Subpopulationen.....	66
5.1.5	Quantitative Unterschiede in der HZ/su induzierten T-Zell-Antwort zwischen Dialysepatienten und Kontrollen	66
5.1.6	Phänotypisierung impfinduzierter VZV-spezifischer CD4 T-Zellen.....	70
5.1.6.1	Hohe CTLA-4 Expression auf impfinduzierten VZV-spezifischen CD4 T-Zellen	70

INHALTSVERZEICHNIS

5.1.6.2 Unterschiede in der Zytokinexpression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach HZ/su-Impfung	72
5.1.7 Höherer Anteil an VZV-spezifischen zentralen Gedächtnis-CD4 T-Zellen nach Impfung mit HZ/su in Dialysepatienten	74
5.1.8 Expression von CD39 auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen	78
5.1.9 HZ/su induziert Proliferationsaktivität in VZV-spezifischen T-Zellen.....	79
5.1.10 Keine impfinduzierte Änderung der zirkulierenden follikulären T-Helferzellen... <td>81</td>	81
5.1.11 Höherer Anteil an naiven B-Zellen bei Dialysepatienten	83
5.1.12 Humorale Immunantwort nach HZ/su-Impfung.....	84
5.1.12.1 Geringere VZV-spezifische IgG-Level bei Dialysepatienten	84
5.1.12.2 VZV-spezifische Neutralisationsfähigkeit der Antikörper bei Dialysepatienten geringer	86
5.1.13 Geringere Reaktogenität bei Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollen	88
5.1.14 Unterschiedliche Immunogenität der HZ/su Impfung bei Patienten mit Multipler Sklerose.....	90
5.1.15 Einfluss von immunsupprimierenden Medikamenten auf die Immunogenität nach HZ/su-Impfung	94
5.1.15.1 Probandenkollektiv	94
5.1.15.2 Calcineurininhibitoren und Steroid reduzieren Antigen-spezifische CD4 T-Zell-Frequenzen und Proliferationsfähigkeit	94
5.1.15.3 Geringer Einfluss von Biologika auf reaktive CD4 T-Zell-Frequenzen.....	96
5.1.16 Vergleich verschiedener VZV-Antigene.....	98
5.1.16.1 Unterschiede in der spezifischen T-Zell-Frequenz nach Stimulation mit verschiedenen VZV-Antigenen	98
5.1.16.2 Ähnliche Proliferationsaktivität VZV-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen VZV-Antigenen	102
5.1.17 HZ/su induziert keine HSV-spezifischen CD4 T-Zellen bei Dialysepatienten und Kontrollen	103
5.2 Charakterisierung der SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort bei immungesunden Personen nach Impfung mit dem proteinbasierten Impfstoff NVX-CoV2373.....	105
5.2.1 Probandenkollektiv zur Analyse der Spike-spezifischen Immunantwort nach Impfung mit NVX-CoV2373 im Verlauf	105
5.2.1.1 Vergleich der Spike-spezifischen Immunität von SARS-CoV-2 naiven und infizierten Personen	105

INHALTSVERZEICHNIS

5.2.1.2	Abnahme der NVX-CoV2373 induzierten Immunantwort bei SARS-CoV-2 naiven und infizierten Personen über die Zeit.....	108
5.2.2	Vergleich der spezifischen Immunantwort nach Impfung mit NVX-CoV2373 oder mit mRNA-Impfstoffen	110
5.2.2.1	Probandenkollektiv.....	110
5.2.2.2	Geringere Spike-spezifische IgG-Level nach NVX-CoV2373-Impfung.....	111
5.2.2.3	Quantitative und qualitative Unterschiede in der NVX-CoV2373-induzierten T-Zell-Antwort im Vergleich zu den mRNA-Impfstoffen.....	113
5.2.2.4	NVX-CoV2373-induzierte T-Zellen erkennen gleichermaßen das wildtypische SARS-CoV-2 und besorgniserregende Varianten.....	117
5.2.2.5	Ähnliche Reaktogenität von NVX-CoV2373 im Vergleich zu mRNA-Impfstoffen.....	119
6	Diskussion.....	122
6.1	VZV-spezifische Immunantwort bei Dialysepatienten und Kontrollen nach Impfung mit HZ/su	122
6.1.1	Hohe VZV-Durchseuchung im Probandenkollektiv vor Impfung.....	123
6.1.2	Schwächere Induktion VZV-spezifischer CD4 T-Zellen bei Dialysepatienten	124
6.1.3	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung VZV-spezifischer CD4 T-Zellen	125
6.1.4	Unterschiede in den Lymphozyten-Subpopulationen und der humoralen Immunantwort auf HZ/su	128
6.1.5	Reaktogenität von HZ/su.....	130
6.1.6	Keine Induktion HSV-spezifischer T-Zellen durch HZ/su.....	131
6.1.7	Effekt immunsupprimierender Medikamente auf die VZV-Immunantwort.....	132
6.1.8	Immunogenität von HZ/su bei MS-Patienten.....	133
6.1.9	Ausblick HZ/su-Impfung	135
6.2	SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort bei immungesunden Personen nach Impfung mit dem proteinbasierten Impfstoff NVX-CoV2373	136
6.2.1	NVX-induzierte Immunantwort und der Vergleich mit mRNA-Impfstoffen.....	136
6.2.2	Teilweise Immunogenität von NVX gegen VOCs	139
6.2.3	Ausblick NVX-2373 Impfung	141
6.3	Limitierungen	142
6.4	Fazit.....	144

INHALTSVERZEICHNIS

7	Literaturverzeichnis	146
8	Publikationen und Kongressbeiträge	164
8.1	Publikationen.....	164
8.1.1	Originalarbeiten dieser Dissertation.....	164
8.1.2	Weitere Publikationen.....	164
8.2	Kongressbeiträge.....	165
9	Danksagung.....	166
10	Lebenslauf.....	168

Abkürzungsverzeichnis

ACE-2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
APC	<i>antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APC-H7	Allophycocyanin-Hilite 7
BAU	<i>binding antibody units</i>
BCL6	B-cell Lymphoma 6
BCR	B-Zell-Rezeptor
BFA	Brefeldin A
BSA	bovines Serumalbumin
CCR7	C-C Motif chemokine receptor type 7
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CHO-Zellen	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters
CKD	chronischer Nierenerkrankung
CPE	zytopathischen Effekt
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
CXCR5	C-X-C chemokine receptor type 5
DC	<i>dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
DMARD	<i>Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylen diamin tetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELU	embryonale Lungenfibroblasten
E-MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ER	Endoplasmatische Retikulum
FACS	fluorescene activated cell sorter, Durchflusscytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FK506	Tacrolimus
FSC	forward scatter
gE	Glykoprotein E
Gln	Glutamin
GM	geometrische Mittel
HHV	Humanes Herpes Virus
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> Typ b
HPV	Humane Papillomviren
HSA	Humanes Serumalbumin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HSV	Herpes simplex virus
HZ/su	Herpes Zoster subunit Totimpfstoff
ICOS	<i>inducible T-cell costimulator</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IH	Hemmungsgrad
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand
Ko-Ag	Kontroll-Antigen
MERS	<i>Middle East respiratory syndrome</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMRV	Masern-Mumps-Röteln-Varizellen-Impfung
MP	Methylprednisolon
MPL	Monophosphoryl-Lipid
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
NCAP	Nucleocapsid-Protein
NG	Nachweisgrenze
NK Zellen	natürliche Killerzellen
ORF	offener Leserahmen
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	peripheren mononukleären Blutzellen
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PeCy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PerCP	Peridiniumchlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PHN	Postherpetische Neuralgie
PRR	<i>pattern recognition</i> Rezeptoren
QS-21	Quillaja saponaria Molina, Fraktion 21
RBD	Rezeptorbinedomäne
RKI	Robert-Koch-Institut
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SEB	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B
SSC	side scatter
StabW	Standardabweichung
STIKO	Ständige Impfkommission
TCID50	<i>Tissue Culture Infection Dose 50</i>
TCM-Zelle	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TCR	T cell receptor, T-Zell-Rezeptor
TEMRA-Zelle	Terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
TEM-Zelle	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
Tfh-Zelle	follikuläre T-Helferzelle
TH	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg-Zelle	Regulatorische T-Zelle
V450	Fluorochrom mit Emissionsmaximum bei 450nm
V500	Fluorochrom mit Emissionsmaximum bei 500nm
VOCs	<i>variants of concern</i>
VZV	Varizella-Zoster-Virus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht über den Ablauf der intra-und extrazellulären Antigenpozessierung sowie der T-Zell-Aktivierung über MHC-Komplexe	6
Abbildung 2 Infektionsverlauf mit dem Varizella Zoster Virus.....	16
Abbildung 3 Abnahme der zellulär vermittelten Immunität geht mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer VZV-Reaktivierung einher.....	18
Abbildung 4 SARS-CoV-2 Virusaufbau und Bindung von Spike an ACE2-Rezeptor	22
Abbildung 5 Zeitlicher Ablauf der Blutentnahmen zur Untersuchung der VZV-spezifischen Immunantwort.....	32
Abbildung 6 Studiendesign zur Untersuchung der NVX-CoV2373 induzierten Immunität	34
Abbildung 7 Auswertestrategie zur Analyse von T-Zell-Subpopulationen und follikulären T-Helferzellen nach durchflusszytometrischer Messung.....	46
Abbildung 8 Auswertestrategie zur Untersuchung von B-Zell-Subpopulationen	47
Abbildung 9 Auswertestrategie Zytokin produzierender Antigen-spezifischer T-Zellen	49
Abbildung 10 Auswertestrategie zur Bestimmung des Differenzierungsstatus von CD4 T-Zellen anhand der Marker CD45RO und CD27	50
Abbildung 11 Auswertestrategie der intranukleären Ki-67 Färbung	51
Abbildung 12 Auswertestrategie zur Untersuchung der VZV-spezifischen Proliferationsaktivität	52
Abbildung 13 Etablierung von Messzeitpunkten sowie Austestung und Titration von VZV-Antigenen in der Kurzzeitstimulation	58
Abbildung 14 Höherer prozentualer Anteil proliferierter VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach 7 Tagen.....	60
Abbildung 15 VZV-spezifische T-Zell-Frequenzen erreichen 1 bis 2 Wochen nach beiden Impfungen ein Maximum.....	61
Abbildung 16 Die Ki-67 Expression durch VZV-spezifische CD4 T-Zellen ist eine Woche nach beiden Impfungen am höchsten	63
Abbildung 17 Geringe Granzym B Expression durch CD4 T-Zellen	64
Abbildung 18 Anstieg der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach HZ/su-Impfung (A).....	68
Abbildung 19 Absolute Anzahl VZV-spezifischer CD4 T-Zellen weisen einen dynamischen Verlauf auf.....	69

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 20 Impfinduzierter Anstieg der CTLA-4 Expression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach Hz/su-Impfung	71
Abbildung 21 Die Zytokinexpression von Dialysepatienten und Kontrollen unterscheidet sich nach HZ/su-Impfung.....	73
Abbildung 22 Unterschiede in der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Differenzierung zwischen Dialysepatienten und Kontrollen.....	76
Abbildung 23 Differenzierung von unstimulierten CD4 und CD8 T-Zellen bei Dialysepatienten und Kontrollen.....	77
Abbildung 24 Keine Unterschiede in der CD39 Expression auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen zwischen Patienten	79
Abbildung 25 Induktion der VZV-spezifischen T-Zellproliferation bei Dialysepatienten und Kontrollpersonen nach Impfung mit HZ/su	80
Abbildung 26 Charakterisierung der follikulären T-Helferzellen.....	82
Abbildung 27 Höherer Anteil an naiven B-Zellen bei Dialysepatienten.....	84
Abbildung 28 Geringerer Anstieg der VZV-spezifischen IgG-Level bei Dialysepatienten.....	85
Abbildung 29 Die neutralisierende Aktivität VZV-spezifischer Antikörper steigt nach HZ/su-Impfung bei Dialysepatienten und Kontrollen.....	87
Abbildung 30 Korrelation von VZV-spezifischen IgG und neutralisierender Antikörper-Aktivität sowie der Proliferationsfähigkeit von CD4 und CD8 T-Zellen	88
Abbildung 31 Geringere Reaktogenität bei Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollen.....	89
Abbildung 32 Induktion von VZV-spezifischen T-Zellen bei MS-Patienten nach HZ/su-Impfung	91
Abbildung 33 Keine signifikanten Unterschiede in der CTLA-4 - und Zytokinexpression in VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach zweiter Impfung bei Patienten unter anti-CD20-Therapie im Vergleich zu Kontrollen.....	92
Abbildung 34 Schwache Induktion VZV-spezifischer IgG-Antikörpern bei MS-Patienten.....	93
Abbildung 35 Calcineurininhibitoren und Steroide reduzieren VZV-spezifische Frequenzen von reaktiven und proliferierten CD4 T-Zellen.	96
Abbildung 36 Geringer Einfluss von untersuchten Biologika auf Reaktivität der CD4 T-Zellen	97
Abbildung 37 Durchflusszytometrische Analyse VZV-spezifischer CD4 T-Zellen von Dialysepatienten und Kontrollen im zeitlichen Verlauf.....	99

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 38 CTLA-4 Expression von VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen.....	101
Abbildung 39 Dynamischer Verlauf der proliferierten T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen VZV-Antigenen.....	103
Abbildung 40 HZ/su induziert keine HSV-spezifischen CD4 T-Zellen.....	104
Abbildung 41 Entwicklung von Antikörpern und T-Zellen gegen das SARS-CoV-2-Spike-Protein nach NVX-CoV2373-Impfung	107
Abbildung 42 Reduktion der Spike-spezifischen Immunantwort im Verlauf nach NVX-CoV2373 Impfung und Induktion nach Durchbruchsinfektion.....	109
Abbildung 43 Geringere Konzentrationen von Spike-spezifischem IgG nach NVX-COV2373-Impfung bei ähnlicher neutralisierender Aktivität wie bei mRNA-geimpften Personen.....	113
Abbildung 44 Niedrigere CD4 und CD8 T-Zell-Frequenzen nach NVX-COV2373-Impfung ..	115
Abbildung 45 Geringere CTLA-4 Expression und Unterschiede im Zytokinprofil von Spike-spezifischen CD4 T-Zellen bei NVX-CoV2373 geimpften Probanden.....	117
Abbildung 46 NVX-CoV2373-induzierte T-Zellen erkennen wildtypisches SARS-CoV-2 und bedenkliche Varianten gleichermaßen.....	118
Abbildung 47 Die Reaktogenität von NVX-CoV2373 ähnelt den mRNA-Vakzinen	121

TABELLENVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 2 Chemikalien und Kits	28
Tabelle 3 Verwendete Puffer und Lösungen.....	28
Tabelle 4 Verwendete Antikörper für Durchfluszytometrie und Stimulation	29
Tabelle 5 Antigene für Kurzzeitstimulation und Proliferations-Assay	30
Tabelle 6 UV-inaktivierte SARS-CoV-2 Virusstämme für Neutralisationstests und zur Quantifizierung Spike-spezifischer T-Zellen durch Kurzzeitstimulation.....	30
Tabelle 7 Verwendete Medikamente für in-vitro Versuche zur Untersuchung des Einflusses auf VZV-spezifische Immunantwort.....	31
Tabelle 8 Für die Arbeit verwendete Software	31
Tabelle 9 Zugrunde liegende Erkrankungen der Dialysepatienten	33
Tabelle 10 Antigene und deren Menge, die zur VZV- oder SARS-CoV-2 spezifischen Stimulation eingesetzt wurde	35
Tabelle 11 Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten intrazellulären Färbe-Ansätze	37
Tabelle 12 Antikörper-Gemisch zur intranukleären Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki-67	38
Tabelle 13 Antikörper- Gemisch zur Analyse follikulärer T-Helferzellen nach HZ/su-Impfung	39
Tabelle 14 Zusammensetzung Antikörper-Gemisch zur Analyse von B-Zell-Subpopulationen nach HZ/su-Impfung.....	39
Tabelle 15 Zusammensetzung Antikörper-Gemisch zur Untersuchung von B- und T-Zellsubpopulationen nach SARS-CoV-2 Impfung.....	40
Tabelle 16 Verwendete Antigene für Proliferations-Assay	42
Tabelle 17 Zusammensetzung Antikörper-Gemisch zur Analyse VZV-spezifischer Proliferation von T-Zellen.....	43
Tabelle 18 Verwendete Medikamente, um deren Einfluss auf die VZV-spezifische Immunität zu untersuchen.....	43
Tabelle 19 Demografie und Charakteristik von Dialysepatienten und Kontrollen	65
Tabelle 20 Berechnete Zellzahl der Leukozyten-Subpopulationen pro µl Blut von Kontrollen und Dialysepatienten vor der ersten Impfung mit HZ/su	66

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 21 Geschlechtsspezifische Analyse der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen bei Dialyse-Patienten und Kontrollen als Mediane mit IQR dargestellt.....	70
Tabelle 22 Demografie von MS-Patienten unter anti-CD20 oder S1P-Therapie und gesunde Kontrollen.....	90
Tabelle 23 Probandenkollektiv zur Untersuchung des Einflusses von immunsupprimierenden Medikamenten auf die Immunogenität nach HZ/su-Impfung.....	94
Tabelle 24 Demografische und grundlegende Merkmale der Studienpopulation.....	110
Tabelle 25 Ergebnisse der Antikörper- und T-Zell-Induktion nach der zweiten Impfung.....	112

1 Zusammenfassung

Impfungen sind eine essenzielle Präventionsmaßnahme zur Verhinderung oder Abschwächung von Infektionen. Proteinbasierte Impfstoffe bieten als Totimpfstoffe die Möglichkeit auch Menschen mit Immundefizienz zu impfen, die ein erhöhtes Infektionsrisiko aufweisen. In dieser Arbeit wurde die impfinduzierte humorale und zelluläre Immunantwort von zwei proteinbasierten Impfstoffen untersucht. Spezifische T-Zellen wurden nach Antigen-spezifischer Stimulation anhand der Induktion von Zytokinen (IFNy, IL-2, TNF α) und der CTLA-4 Expression mittels Durchflusszytometrie charakterisiert, während spezifische Antikörper mittels ELISA und Neutralisationsassays quantifiziert wurden. Die Reaktogenität der Impfstoffe wurde mittels Fragebögen erfasst.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgte die Charakterisierung der Varizella Zoster Virus (VZV) spezifischen Immunität bei Dialysepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach Impfung mit dem VZV-Glykoprotein E (gE) Subunit Totimpfstoff HZ/su. Über die Immunogenität des HZ/su-Impfstoffs bei Dialysepatienten, die aufgrund ihrer urämischen Immundefizienz ein erhöhtes Risiko für eine VZV-Reaktivierung haben, war bisher wenig bekannt. Es zeigte sich sowohl bei immungesunden als auch bei dialysepflichtigen Probanden im zeitlichen Verlauf ein Anstieg der VZV-gE-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen ($p<0,0001$), wobei die nach der zweiten Impfung erreichten Mediane bei den Patienten (0,17 % (IQR 0,21 %)) geringer waren als bei den Kontrollen (0,24 % (IQR 0,3 %), $p=0,042$). VZV-spezifische CD8 T-Zellen wurden in beiden Gruppen nur im geringen Maße induziert. Nach beiden Impfungen wurde eine erhöhte Proliferationsfähigkeit der VZV-spezifischen T-Zellen beobachtet. VZV-spezifische CD4 T-Zellen waren in beiden Gruppen durch einen Anstieg der Expression des inhibitorischen Rezeptors CTLA-4 sowie einer Multifunktionalität durch Expression der Zytokine IL-2, IFNy und TNF α charakterisiert. Wie bei den CD4 T-Zellen erreichten die medianen VZV-spezifischen IgG-Level zwei Wochen nach der zweiten Impfung ein Maximum, wobei diese bei den Patienten signifikant geringer waren (10796 (IQR 12482) IU/l) als bei den Kontrollen (16899 (IQR 14019) IU/l, $p=0,009$). Trotz ähnlicher CD4 T-Zell-Frequenzen nach einem Jahr waren die Antikörper-Level bei den Patienten signifikant geringer. Der Impfstoff wurde von den Probanden beider Gruppen gut vertragen, wobei Dialysepatienten über weniger Beschwerden nach den Impfungen berichteten. Quantitative und qualitative Unterschiede in der impfinduzierten Immunität bei Patienten könnte auf eine

ZUSAMMENFASSUNG

verkürzte Schutzdauer hindeuten und möglicherweise Auffrischimpfungen erforderlich machen. Erste Daten bei Patienten mit Multipler Sklerose zeigten ebenfalls Beeinträchtigungen in der durch die Impfung induzierten Immunität in Abhängigkeit der verabreichten immunmodulatorischen Therapie. Bei *in vitro* Experimenten zur Charakterisierung der Hemmwirkung der Immunsuppressiva Cyclosporin A, Tacrolimus und Methylprednisolon auf die spezifische T-Zell-Antwort wurde mit steigender Konzentration eine Abnahme der reaktiven T-Zell-Frequenzen beobachtet. Hingegen konnten Biologika keine Reduktion der reaktiven T-Zell-Frequenzen *in vitro* induzieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Spike-spezifische Immunität von Probanden nach Impfung mit dem proteinbasierten COVID-19 Impfstoff NVX-CoV2373 untersucht, für den bislang keine Immunogenitätsdaten vorlagen. Dieser induzierte sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene eine spezifische Immunantwort, wobei diese nach der zweiten Impfung deutlich stärker ausfiel. Während Spike-spezifische CD4 T-Zellen deutlich induziert wurden, konnten spezifische CD8 T-Zellen nur bei 3 von 22 Probanden nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit den mRNA Impfstoffen BNT162b2 und mRNA-1273 zeigte, dass die induzierte Immunantwort von NVX-CoV2373 sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene deutlich schwächer ausfiel. Zudem wurden bei den mRNA-Impfstoffen wesentlich mehr spezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen. Die Spike-spezifischen IgG Antikörper-Level waren im Vergleich zu den mRNA-geimpften Probanden geringer. In Bezug auf die SARS-CoV-2 Virusvarianten (*variants of concern*, VOCs) war die neutralisierende Aktivität gegenüber Delta am höchsten, gefolgt von BA.2 und BA.1. Auf zellulärer Ebene induzierte der Impfstoff gleichermaßen Spike-spezifische CD4 T-Zellen gegen alle getesteten VOCs. Nach Durchbruchsinfektionen wurden Anstiege der Spike-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen sowie Antikörper beobachtet. Beide Impfdosen NVX-CoV2373 wurde von den Probanden gut vertragen.

Auch wenn nach Impfung mit den beiden proteinbasierten Impfstoffen erwartungsgemäß spezifische CD8 T-Zellen nur schwach induziert wurden, konnten die Impfstoffe eine spezifische CD4 T-Zell-Antwort und Antikörper induzieren. Die gute Immunogenität sowie eine gute Verträglichkeit könnten zur Steigerung der Impfbereitschaft und zum Schutz vulnerabler Patientengruppen beitragen. Zukünftig könnten Erkenntnisse dieser Arbeit als Strategien zum Monitoring des Impferfolges sowie zur Erfassung der Notwendigkeit einer Auffrischimpfung bei Risikopatienten entwickelt werden.

2 Summary

Vaccinations are essential to prevent or reduce infections. As inactivated vaccines, protein-based vaccines also offer the possibility of vaccinating individuals with immunodeficiency who are at particular risk for infectious complications. In this study, the vaccine-induced humoral and cellular immune response of two protein-based vaccines was analyzed. Specific T cells were characterized after antigen-specific stimulation based on the induction of cytokines (IFN γ , IL-2, TNF α) and CTLA-4 expression by flow cytometry, while specific antibodies were quantified by ELISA and neutralization tests. The reactogenicity of the vaccines was assessed using a questionnaire.

In the first part of this thesis, the varicella zoster virus (VZV) specific immunity in patients on dialysis was characterized in comparison to healthy individuals after vaccination with the VZV glycoprotein E (gE) subunit vaccine HZ/su. Previous knowledge about the immunogenicity of the HZ/su vaccine in dialysis patients, who have an increased risk of VZV reactivation due to their uraemic immunodeficiency, was limited. We found an increase in VZV-gE-specific CD4 T-cell levels ($p<0.0001$) over time in both healthy controls and dialysis-patients, with the medians achieved after the second vaccination being lower in patients (0.17% (IQR 0.21%)) than in controls (0.24% (IQR 0.3%), $p=0.042$). VZV-specific CD8 T cells were only induced to a small extent in both groups. An increased proliferation capacity of VZV-specific T cells was observed after both vaccinations. VZV-specific CD4 T cells were characterized by an increase in the expression of the inhibitory receptor CTLA-4 as well as multifunctionality based on expression of the cytokines IL-2, IFN γ and TNF α . As with CD4 T cells, median VZV-specific IgG levels reached a maximum two weeks after the second vaccination, although IgG levels were significantly lower in patients (10796 (IQR 12482) IU/l) than in controls (16899 (IQR 14019) IU/l, $p=0.009$). Despite similar CD4 T cell frequencies after one year, antibody levels were significantly lower in patients. The vaccine was well tolerated in both groups, with dialysis patients reporting less side effects after vaccination. Quantitative and qualitative differences in vaccine-induced immunity in patients may indicate a shortened duration of protection, which may necessitate booster vaccinations. First data in patients with multiple sclerosis show impairments in the vaccine induced immunity that were dependent on the type of immunomodulatory therapy. In *in vitro* experiments to characterize the inhibitory effect of the immunosuppressive drugs cyclosporin A, tacrolimus and methylprednisolone on the specific T

SUMMARY

cell response showed a decrease in reactive T cell frequencies with increasing concentration. In contrast, the use of biologicals in the same assay system *in vitro* did not induce a reduction in reactive T cell frequencies.

In the second part of the thesis, the SARS-CoV-2 spike-specific immunity was analysed after vaccination with the protein-based COVID-19 vaccine NVX-CoV2373, where knowledge on immunogenicity was limited. The vaccine induced a specific immune response at both the cellular and humoral level, with a significantly stronger response after the second vaccination. While spike-specific CD4 T cells were clearly induced, specific CD8 T cells were only detected in 3 out of 22 individuals. A comparison with the mRNA vaccines BNT162b2 and mRNA-1273 showed that the NVX-CoV2373-induced immune response was significantly lower at both the cellular and humoral level. In addition, significantly more specific CD8 T cells were detected after mRNA vaccination. As with CD4 T cells, the spike-specific IgG levels were lower compared to the mRNA-vaccinated individuals. With regard to the SARS-CoV-2 variants of concern (VOCs), the neutralizing activity against Delta was highest, followed by BA.2 and BA.1. At the cellular level, the vaccine induced spike-specific CD4 T cells equally recognized all VOCs tested. Increases in spike-specific CD4 and CD8 T cells and antibodies were observed after breakthrough infections. NVX-CoV2373 was well tolerated by the individuals.

Even though specific CD8 T cells expectedly were only weakly induced after vaccination with the two protein-based vaccines, the vaccines strongly induced a specific CD4 T cell response and antibodies. The good immunogenicity and tolerability could contribute to increasing the willingness to adhere to vaccinations and to protecting vulnerable patient groups. The findings from this thesis may in future be developed as strategies for monitoring vaccination success and for determining the need for booster vaccinations in high-risk patients.

3 Einleitung

3.1 Immunologische Grundlagen

Der menschliche Körper wird mit einer Vielzahl an Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilzen sowie Parasiten konfrontiert. Zudem müssen neben exogenen Pathogenen auch entstehende Tumorzellen bekämpft werden. Dennoch kommt es nur selten zu Erkrankungen. Der Grund hierfür ist eine effiziente Zusammenarbeit von angeborenem und adaptivem Immunsystem.

3.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem charakterisiert sich durch eine schnelle, jedoch unspezifische Eliminierung von Pathogenen. Ohne diese Spezifität kann das angeborene Immunsystem in sehr kurzer Zeit agieren und damit eine rasche Vermehrung der Erreger unspezifisch unterbinden. Das Eindringen vieler Pathogene scheitert bereits an äußeren Schutzbarrieren wie Haut und Schleimhäute des Verdauungs- oder Urogenitaltraktes, welche als physikalische Barriere auch chemische Substanzen produziert, die Pathogene abtöten. Sollten dennoch Pathogene die Schutzbarriere überwinden, treten verschiedene Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sowie lösliche Komponenten des angeborenen Immunsystems in Aktion und bekämpfen die Pathogene unspezifisch. Die Erregererkennung erfolgt aufgrund von Strukturmerkmalen, die *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), welche für die Pathogene charakteristisch sind und im menschlichen Körper nicht vorkommen. Zu den PAMPs zählen unter anderem Liposaccharide, Lipide, Peptidoglykan sowie doppelsträngige RNA. Diese werden von Membranrezeptoren, den *pattern recognition* Rezeptoren (PRR), der Immunzellen erkannt und lösen eine Signalkaskade sowie die Ausschüttung von Zytokinen und Mediatoren aus, was zu einer weiteren Rekrutierung von Immunzellen führt, die über Phagozytose zur Eliminierung von Erregern beitragen. Auch lösliche Faktoren wie das Komplementsystem unterstützen Zellen des angeborenen Immunsystems (MURPHY et al., 2018).

3.1.2 Adaptives Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem kann das adaptive Immunsystem spezifisch Erreger erkennen und eliminieren. Nach Erstkontakt mit dem Erreger bildet sich ein immunologisches Gedächtnis aus, wodurch bei einer erneuten Exposition mit dem gleichen Erreger eine schnelle und gezielte Immunantwort stattfinden kann. Die Etablierung der

EINLEITUNG

spezifischen Immunantwort erfolgt zum einen auf humoraler Ebene durch Antikörper, zum anderen auf zellulärer Ebene durch B- und T-Lymphozyten.

3.1.2.1 **T-Lymphozyten**

T-Lymphozyten (T-Zellen) erkennen Antigene auf Oberflächen von körpereigenen Zellen und können dadurch aktiviert werden. Die Aktivierung wird durch die Bindung des membranständigen T-Zell-Rezeptors (TCR) an den Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) der Zelle induziert, welcher prozessierte Peptide von Antigenen präsentiert. Der TCR besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten und besitzt einen konstanten membrangebundenen sowie einen variablen Teil. Bei den Polypeptidketten handelt es sich in der Regel um α - und β -Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind und für die Antigenerkennung der T-Zelle essenziell sind. Ein weiterer kleinerer Teil der T-Zellen trägt stattdessen $\gamma:\delta$ -Rezeptoren. Zusätzlich besitzen T-Zellen Oberflächenmoleküle anhand derer diese in zytotoxische T-Zellen (CD8 T-Zellen) und T-Helferzellen (CD4 T-Zellen) unterschieden werden können. Sowohl das CD4 als auch das CD8-Molekül stabilisieren die Verbindung von TCR an den Peptid-MHC-Komplex (MURPHY et al., 2018).

Während die Vorläufer-T-Zellen im Knochenmark lokalisiert sind, erfolgt die Reifung der Zellen im Thymus. Dort werden die Zellen verschiedenen Tests, wie einer positiven und einer negativen Selektion ausgesetzt. Die positive Selektion erfolgt im Cortex, wo epitheliale Stromazellen MHC-I und II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, welche von den T-Zellen erkannt werden müssen. T-Zellen, die nicht in der Lage sind, die Moleküle zu erkennen, sterben durch Vernachlässigung (*death of neglect*). Weiterhin präsentieren dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) im Thymusmark MHC-Moleküle mit Selbst-Antigenen des Körpers. T-Zellen, welche diese Selbst-Antigene erkennen, werden durch Apoptose eliminiert, da sie potenziell autoreaktiv sind. Die verbleibenden Zellen verlassen als reife naive T-Zellen den Thymus und zirkulieren zwischen Blut und lymphatischem Gewebe, bis sie auf eine Antigen-präsentierende Zelle (*Antigen-presenting cell*, APC) mit Peptid-MHC-Komplex auf der Zelloberfläche treffen und aktiviert werden. APCs nehmen Antigene im peripheren Gewebe auf und wandern in sekundäre Lymphorgane wie Milz oder Lymphknoten, von wo aus sie spezifisch B- und T-Zellen aktivieren können. MHC-Moleküle werden in zwei Klassen eingeteilt: MHC-I und MHC-II (MURPHY et al., 2018). MHC-I-Moleküle präsentieren Fragmente von Antigenen, die im Cytosol infizierter Zellen vorkommen (Abbildung 1A). Diese intrazellulären Proteine

EINLEITUNG

werden in Proteasomen zu Peptiden abgebaut und über den *Transporter associated with antigen processing* (TAP)-Transporter ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Hier findet die Beladung des MHC-I-Moleküls mit dem Peptid statt. Über den Golgi-Apparat wird der Peptid-MHC-I-Komplex zur Zelloberfläche transportiert, dort präsentiert und kann vom TCR einer spezifischen CD8 T-Zelle erkannt werden (BLUM et al., 2013; MURPHY et al., 2018). Zusätzlich zum endogenen Weg können MHC-I-Komplexe auch extrazellulär aufgenommene Proteine präsentieren. Bestimmte APCs, insbesondere dendritische Zellen können extrazelluläre Proteine phagozytieren, verarbeiten und diese Peptid-MHC-I-Komplexe den CD8 T-Zellen präsentieren. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Während MHC-I-Moleküle in allen kernhaltigen Zellen vorkommen, werden MHC-II-Moleküle von APCs wie Makrophagen, dendritischen Zellen sowie B-Zellen exprimiert und präsentieren Antigenfragmente, die aus extrazellulärer Flüssigkeit aufgenommen wurden. Über Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose werden extrazelluläre Erreger von den APCs aufgenommen (Abbildung 1B). Die Antigene werden in den Endosomen in Peptidfragmente prozessiert und an MHC-II-Moleküle gebunden. Der Peptid-MHC-II-Komplex wird an die Oberfläche der APC transportiert, wo er vom TCR der CD4 T-Zellen erkannt wird (MURPHY et al., 2018).

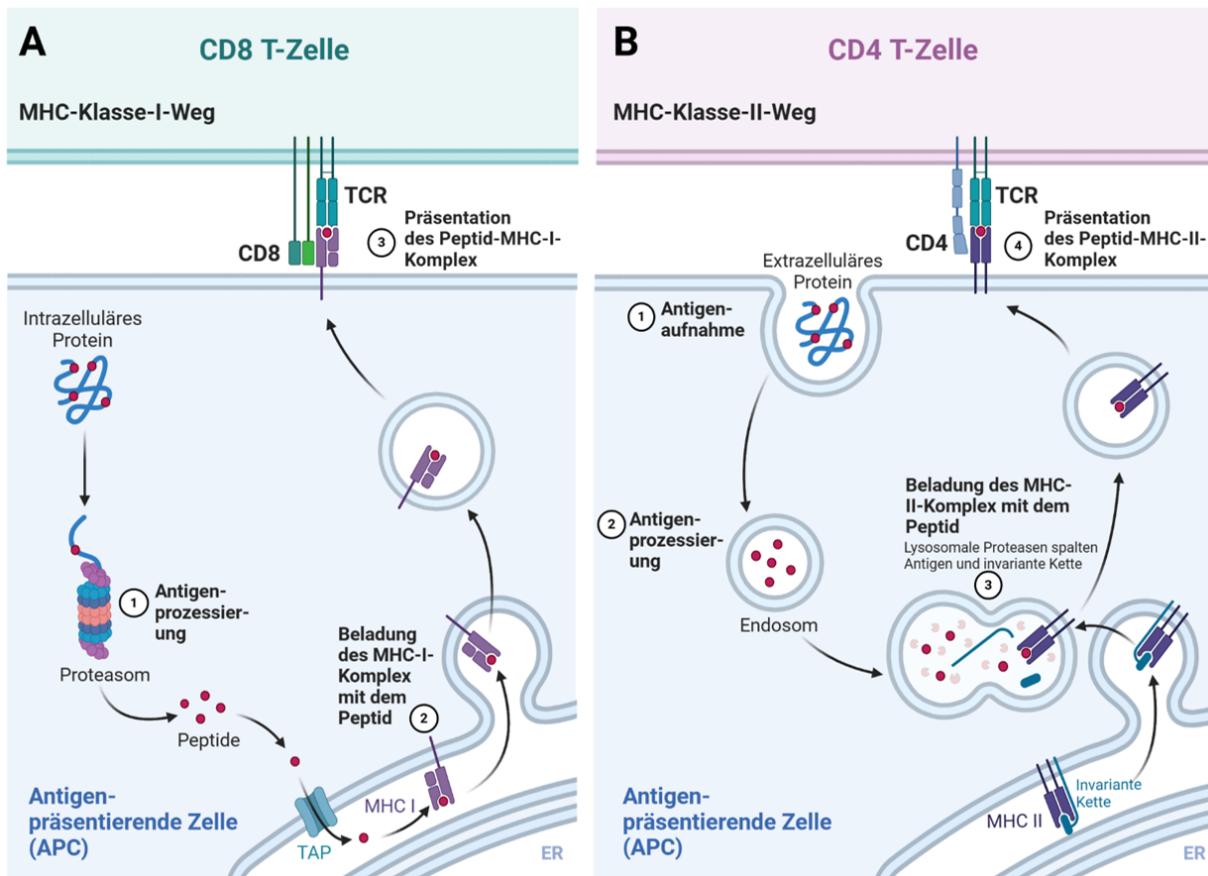


Abbildung 1 Übersicht über den Ablauf der intra- und extrazellulären Antigenpräzessierung sowie der T-Zell-Aktivierung über MHC-Komplexe (A) Antigene, die innerhalb der Zelle lokalisiert sind, werden über den endogenen Weg intrazellulär präzessiert, indem sie in Proteasomen zu Peptiden abgebaut werden (1). Über den *Transporter associated with antigen processing* (TAP)-Transporter werden die Peptide ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo die Beladung des MHC-I-Moleküls mit dem Peptid stattfindet (2). Der Peptid-MHC-I-Komplex wird über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert, dort präsentiert und kann vom TCR der CD8 T-Zellen erkannt werden (3). **(B)** Extrazelluläre Erreger werden über Phagozytose oder Endozytose von den APCs aufgenommen (1). Die Antigene werden in den Endosomen in Peptidfragmente präzessiert (2). MHC-II-Moleküle werden vom ER in Endosomen transportiert, die invariante Kette abgespalten und die Peptide gebunden (3). Der Peptid-MHC-II-Komplex wird an die Oberfläche der APC transportiert, wo er vom TCR der CD4 T-Zellen erkannt wird (4). Erstellt mit der Vorlage von Akiko Iwasaki in BioRender.

Für die Aktivierung naiver T-Zellen werden neben dem Peptid-MHC-Komplex zusätzlich kostimulatorische Signale benötigt, die von CD80/CD86 auf den APCs geliefert und von CD28 auf den T-Zellen erkannt werden. Die Bindung induziert die Produktion und Ausschüttung autokrin stimulierender Faktoren wie Interleukin (IL) 2 und die Aktivierung naiver T-Zellen. In der Folge kommt es zu einer klonalen Expansion von identischen Tochterzellen, sowie zur Differenzierung in Effektorzellen, die in infizierte Gewebe migrieren, um Pathogene spezifisch zu eliminieren (MURPHY et al., 2018). Effektorzellen zeichnen sich durch Sekretion von Effektormolekülen wie Interferon (γ) aus und exprimieren verschiedene Aktivierungsmarker wie CD69, anhand derer sie als aktivierte T-Zellen identifiziert werden können. CD8 T-Zellen

EINLEITUNG

differenzieren nach der Aktivierung zu zytotoxischen Effektor-T-Zellen, welche durch Produktion und Sekretion von Effektor-Molekülen wie Perforin und Granzym infizierte Zellen töten können. Zusätzlich können CD8 T-Zellen auch Apoptose induzieren, indem sie mit ihrem FAS-Rezeptor an den FAS-Liganden der Zielzelle binden. CD4 T-Zellen werden aufgrund ihrer Unterstützung des angeborenen Immunsystems sowie der humoralen Immunität auch als T-Helferzellen (Th-Zellen) bezeichnet. Je nach Erreger können sich CD4 T-Zellen in verschiedene Subtypen von Effektor-T-Zellen wie Th1-, Th2-, Th17-Zellen, follikuläre T-Helferzellen (Tfh), oder regulatorische T-Helferzellen (Treg) differenzieren. Zudem wurden Th9 und Th22-Zellen als weitere Subtypen identifiziert (CANO, LOPERA, 2013; GASPER et al., 2014). Th1-Zellen sind durch die Produktion der Zytokine IFN γ , IL-2 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF oder TNF α) charakterisiert. Das Zytokin IFN γ spielt eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Viren und Bakterien. TNF α ist an Entzündungsprozessen beteiligt. Zudem führt die Sekretion der beiden Zytokine zur Aktivierung von Makrophagen. IL-2 induziert die B- und T-Zellproliferation. Hingegen sind Th2-Zellen in die Eliminierung von Parasiten involviert und unterstützen B-Zellen bei der Antikörper-Produktion. Zudem gelten Th2-Zellen als Gegenspieler der Th1-Zellen, da sie unter anderem durch die Sekretion von IL-4 die Aktivierung von Makrophagen reduzieren. Zusätzlich werden IL-5, IL-10 und IL-13 sezerniert. Th17-Zellen sezernieren IL-17 sowie IL-22 und tragen entscheidend zur Abwehr von bakteriellen Pathogenen bei, indem sie unter anderem neutrophile Granulozyten zum Infektionsherd navigieren (KAIKO et al., 2008). Follikuläre T-Helferzellen (Tfh) unterstützen die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen, die aus dem Blut in B-Zell-Follikel des Keimzentrums der Lymphknoten migrieren. Dabei induzieren Tfh-Zellen durch Sezernierung von IL-4 und IL-21 die Produktion von Antikörpern durch die B-Zellen (KING, 2009). Tfh-Zellen lassen sich durch Expression von Markern wie CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CXCR5), *inducible T-cell costimulator* (ICOS), *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1), *B-cell Lymphoma 6* (BCL6) und IL-21 identifizieren (HAYNES et al., 2007; WANG et al., 2017). Treg-Zellen besitzen eine regulierende Funktion, indem die Zellen inhibitorische Zytokine produzieren, welche die Immunantwort begrenzen und zur Verhinderung von Autoimmunreaktionen beitragen (CANO, LOPERA, 2013).

Im zeitlichen Verlauf nach Erregerbekämpfung werden in den Effektor-T-Zellen inhibitorische Moleküle wie zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) oder PD-1 hochreguliert, wodurch die Zelle weniger reaktiv und funktionell ist. Dieser Mechanismus dient dem Körper

EINLEITUNG

als Schutz vor einer übermäßigen Proliferation der T-Zellen und Autoimmunität (KRUMMEL, ALLISON, 1995; RILEY, JUNE, 2005). CTLA-4 konkurriert mit CD28 um die Bindung an CD80/86, besitzt jedoch eine höhere Affinität als CD28, wodurch eine CD28-abhängige Kostimulation unterbunden wird (BUCHBINDER, DESAI, 2016). Nach Erregereliminierung werden Effektor-T-Zellen mehrheitlich durch Apoptose abgebaut, jedoch entwickelt sich ein kleiner Teil zu langlebigen Gedächtnis-T-Zellen. Je nach Differenzierungsstatus können die T-Zellen in Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory T cells*, T_{EM}), zentrale Gedächtnis-T-Zellen (*central memory T cells*, T_{CM}) und terminal differenzierte Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory-expressing CD45RA T cells*, T_{EMRA}) eingeteilt werden (MAHNKE et al., 2013). T_{EM} wandern zu den Entzündungsherden, wo sie ihre Effektorfunktion ausüben. Hingegen exprimieren naive T-Zellen und T_{CM} Homing-Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen, in die sekundären lymphatischen Organe zu wandern. T_{CM} haben eine geringe Effektorfunktion, können jedoch bei erneutem Erregerkontakt schnell proliferieren und zu T_{EM} differenzieren. T_{EMRA} zirkulieren im Blut, Gewebe und sekundären Lymphgewebe (GUPTA et al., 2004; SALLUSTO et al., 1999).

3.1.2.2 B-Lymphozyten und Antikörper

B-Lymphozyten (B-Zellen) reifen im Knochenmark heran und zirkulieren als naive B-Zellen zwischen Blut und sekundärem lymphatischen Gewebe. B-Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche Antigen-spezifische B-Zell-Rezeptoren (BCR) in Form von membranständigen Antikörpern. Die Bindung des B-Zell-Rezeptors an spezifisches Antigen, welches in löslicher unprozessierter Form vorliegt, führt zur Aktivierung der B-Zellen. Die Aktivierung erfolgt je nach Antigen T-Zell abhängig oder unabhängig. Bei der T-Zell-abhängigen Aktivierung wird das Antigen über Endozytose aufgenommen, prozessiert und als Peptid-MHC-II-Komplex auf der Oberfläche der B-Zelle präsentiert. Bereits aktivierte Antigen-spezifische CD4 T-Zellen erkennen den Peptid-MHC-II-Komplex und schütten Zytokine wie IL-2 aus, wodurch in B-Zellen die Proliferation sowie Differenzierung induziert wird. Zusätzlich bindet der CD40 Ligand (CD40L) der T-Zelle an CD40 auf den B-Zellen und induziert deren Aktivierung (MURPHY et al., 2018). Im weiteren Verlauf wird eine Genumlagerung in den B-Zellen induziert und es kommt zum Isotypenwechsel der Immunglobulinklasse (*switch*), wodurch Antikörper ihre hochaffine Spezifität erhalten und in verschiedenen Klassen produziert werden. Nach der Aktivierung können sich B-Zellen in kurzlebige, Antikörper produzierende Plasmazellen oder in Gedächtnis-B-Zellen differenzieren, die im Blut zirkulieren. Gedächtnis-B-Zellen werden je nachdem ob

EINLEITUNG

bereits ein Klassenwechsel stattgefunden hat, in *switched memory* oder *non switched memory* Zellen eingeteilt. Aus *switched memory* B-Zellen entwickeln sich Plasmablasten, die sich wiederum zu langlebigen Plasmazellen differenzieren. Die Plasmazellen wandern zurück ins Knochenmark, um von dort aus Antikörper zu sezernieren. Antikörper, auch Immunglobuline genannt, besitzen die gleiche Spezifität wie der B-Zell-Rezeptor, der initial vom Antigen stimuliert wurde, liegen jedoch in löslicher Form vor und können Antigene spezifisch binden. Antikörper besitzen eine konstante (Fc-Fragment) sowie eine variable Region, die die Antigenbindungsstelle darstellt und für die Antigenspezifität verantwortlich ist. Durch spezifische Bindung der Antikörper an Antigene können Erreger neutralisiert werden, wodurch das Eindringen des Erregers in die Zelle verhindert und damit eine Vermehrung unterbunden wird. Weiterhin kann eine Opsonisierung der Antigene durch Bindung der spezifischen Antikörper erfolgen, wodurch Immunzellen den Erreger phagozytieren können. Die Aktivierung der Komplementkaskade durch Antikörper kann die Phagozytose zusätzlich erleichtern (MURPHY et al., 2018). Neben dem BCR verfügen B-Zellen auch über MHC-I und II-Klasse Moleküle und können somit als APCs Antigene aufnehmen, prozessieren und präsentieren (RASTOGI et al., 2022).

3.1.3 Immundefizienz

Ist das Immunsystem in seiner Funktion gestört, so spricht man von einer Immundefizienz, welcher verschiedenste Ursachen zu Grunde liegen können. Aufgrund einer Immundefizienz kann es zu einem erhöhten Infektionsrisiko mit schwereren Verläufen oder einer verminderten Immunantwort nach Impfungen kommen. Bei der primären oder angeborenen Immundefizienz handelt es sich in der Regel um genetische Defekte, die zum Beispiel verschiedene Typen von Immunzellen betreffen. Hierzu zählen unter anderem IgA-Mangel, Agammaglobulinämie und das variable Immundefektsyndrom (PICARD et al., 2018). Sekundäre, erworbene Immundefekte können sich unter anderem durch Infektionskrankheiten wie HIV, Chemotherapien zur Behandlung maligner Erkrankungen, oder medikamentöse Immunsuppressiva bei Autoimmunerkrankungen oder nach Transplantation ergeben.

Dialysepflichtige Menschen mit chronischer Nierenerkrankung (CKD) leiden ebenfalls unter einer erworbenen Immunschwäche. Das Nierenversagen führt zu einer gestörten Nierenstoffwechselaktivität mit einer verminderten Produktion von Renin, Erythropoetin und Vitamin-D. Zudem verringert sich die glomeruläre Filtrationsrate, wodurch Toxine nicht

EINLEITUNG

ausgeschieden werden können. Die Anreicherung dieser Toxine im Körper wird als Urämie bezeichnet, die sich negativ auf die Funktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems auswirken kann (LIM et al., 2007). Insgesamt sind über 90 verschiedene urämische Toxine bekannt. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um kleine wasserlösliche Verbindungen aus dem Darmmikrobiom, leichte Immunglobulinketten, Retinol-bindendes Protein oder die Adipokine Leptin und Resistin. Die Urämie kann unter anderem posttranskriptionale Modifikationen verursachen. Zudem kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Lipoproteins, wodurch die entzündungshemmende Wirkung verringert wird (COHEN, 2020). Neben dem Nierenversagen steht auch das Dialyseverfahren in Zusammenhang mit einer erhöhten Infektanfälligkeit bei Dialysepatienten. So stellt der Durchbruch der Hautbarriere eine ideale Eintrittspforte für Pathogene dar. Eine weitere Rolle spielt die Dialysemembran zum Herausfiltern von Toxinen. Die Dialysemembran, mit der Blutzellen dreimal wöchentlich in Kontakt kommen, wird mit einer erhöhten Monozytenaktivierung in Verbindung gebracht. Wenngleich die Biokompatibilität der verfügbaren Membranen in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat (KOHLOVÁ et al., 2019), induziert ein chronisch aktiviertes Immunsystem oxidativen Stress, welcher wiederum die Seneszenz der Immunzellen begünstigt. Die Patienten weisen häufig eine gestörte Interaktion zwischen APCs und T-Zellen sowie eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen auf (GIRNDT et al., 2001). Weiterhin wurde im Zusammenhang mit der Dialyse beschrieben, dass es zu einer vermehrten Apoptose von T-Zellen kommt, begründet durch die ineffektive Aktivierung durch APCs (ELEFTHERIADIS et al., 2007). Auch eine verringerte IL-2 Produktion wurde bei Dialysepatienten beobachtet, welche sich negativ auf die T- und B-Zell-Proliferation auswirken kann (LITJENS et al., 2008). Diese Änderungen stehen im Zusammenhang mit häufigeren und schwereren Infektionen (SARNAK, JABER, 2000) sowie einer unzureichenden Impfreaktion, z. B. gegen Hepatitis B, Tetanus (GIRNDT et al., 1995), Diphtherie (KREFT et al., 1997) und Influenza (RAUTENBERG et al., 1989; SESTER et al., 2013).

Auch der Einsatz von Immunsuppressiva bei Menschen nach Organtransplantation oder mit Autoimmunerkrankungen führt zu einer Unterdrückung des Immunsystems und dadurch ebenfalls zu einer Immundefizienz. Um eine Transplantatabstoßung zu verhindern, wird meist eine Kombination aus den Wirkstoffgruppen der mTOR-Inhibitoren, Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A oder Tacrolimus und Glucocorticoide wie Methylprednisolon eingesetzt. Zur

EINLEITUNG

Behandlung von rheumatoiden Erkrankungen werden neben Schmerzmitteln auch sogenannte Basismedikamente (*Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs*, DMARDs) eingesetzt. Eine Untergruppe dieser DMARDs bilden Biologika, die als biotechnologisch hergestellte Wirkstoffe gegen entzündungsfördernde Botenstoffe, Immunzellen oder Signalwege wirken können. Zu den häufig verordneten Medikamenten gegen rheumatoide Erkrankungen zählen TNF-Blocker wie Adalimumab, Etanercept, Infliximab, Golimumab und Certolizumab, der Kostimulations-Blocker Abatacept, welcher die T-Zell-Aktivierung hemmt, Rituximab ein Antikörper gegen CD20 auf B-Zellen, Tocilizumab als IL-6 Blocker und der JAK-Inhibitor Tofacitinib (ABBASI et al., 2019). Bei multipler Sklerose (MS) können ebenfalls monoklonale anti-CD20 Antikörper als krankheitsmodifizierende Therapie genutzt werden (FLOROU et al., 2020). Neben einer B-Zell depletierenden Therapie, besteht auch die Möglichkeit der Behandlung mit Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptormodulatoren, wie Fingolimod, die dafür sorgen, dass die T-Zell-Migration aus den Lymphknoten unterbunden wird (CHUN, HARTUNG, 2010). Durch die hemmende Wirkung der Immunsuppressiva steigt die Infektanfälligkeit und das Risiko für schwere Krankheitsverläufe. Zudem erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für Virus-Reaktivierungen, da sich persistierenden Viren unter Immunsuppression besser vermehren können (DUNCAN, WILKES, 2005; EPSTEIN et al., 2018; ROBERTS, FISHMAN, 2021).

Auch bei gesunden Menschen kommt es im Alter zu einer assoziierten Dysregulation des Immunsystems, der Immunseneszenz. Während der Anteil an naiven T-Zellen durch die Thymusatrophie abnimmt, steigt die Zahl an Gedächtniszellen. Altersbedingte Änderungen gehen ebenfalls mit einer steigenden Infektanfälligkeit und verminderter Impfantwort einher (NIKOLICH-ZUGICH, RUDD, 2010).

3.1.4 Impfungen

Ende des 18. Jahrhundert wurde erstmalig eine Impfung entwickelt, in dem Edward Jenner Menschen mit Kuhpocken infizierte und damit eine Immunisierung gegen die hochansteckenden und häufig tödlich verlaufenden Pocken herbeiführte. Aufgrund der entwickelten Schutzimpfung gegen Pocken sind diese als natürliche Infektion heutzutage eradiziert (RIEDEL, 2005). Im Laufe der Zeit wurden Impfungen gegen verschiedenste Krankheitserreger entwickelt und etabliert. Neben dem Ziel der Eradikation von Erregern leisten Impfungen als eine der wichtigsten und wirkungsvollsten Präventivmaßnahmen einen entscheidenden Betrag zur Reduktion der Mortalität und Morbidität von Krankheiten.

EINLEITUNG

Impfungen stellen die Nachahmung einer Infektion dar, bei welcher der menschliche Körper mit abgeschwächten (Lebendimpfstoff) oder abgetöteten Erregern beziehungsweise Erregerbestandteilen (Totimpfstoff) konfrontiert wird und daraufhin eine spezifische Immunantwort ausbildet. Dabei werden wie in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben Effektor- und Gedächtniszellen sowie Antikörper gebildet. Bei einem späteren natürlichen Kontakt mit dem Erreger kann das adaptive Immunsystem, aufgrund des immunologischen Gedächtnisses, schnell und spezifisch reagieren, den Erreger eliminieren und damit einen schweren Krankheitsverlauf verhindern. Um eine ausreichende impfinduzierte Immunantwort zu erzielen, werden neben mehreren Impfdosen zur Grundimmunisierung häufig Auffrischimpfungen durchgeführt. Zur Nutzen-Risiko-Abwägung von verfügbaren Impfstoffen werden bestehende Daten von der ständigen Impfkommission (STIKO) in Deutschland geprüft und Empfehlungen zur Impfung der Bevölkerung ausgesprochen. Dabei wird entschieden, welche Impfungen in welchem Alter und bei welchem Gesundheitszustand als sinnvoll erachtet werden.

3.1.4.1 *Impfstoffarten*

Lebendimpfstoffe beinhalten abgeschwächte Erreger und wurden so konzipiert, dass diese sich zwar noch im Körper vermehren, jedoch nicht mehr krankheitserregend sind, wodurch häufig ein lebenslanger Schutz gegen den Erreger induziert wird. Unter anderem stehen Lebendimpfstoffe gegen Mumps, Masern, Röteln und Windpocken zur Verfügung. Neben Lebendimpfstoffen gibt es Totimpfstoffe, die abgetötete Erreger oder deren Bestandteile enthalten. Zu dieser Impfstoffart zählen Impfstoffe gegen Diphtherie, Hepatitis B, *Haemophilus influenzae* Typ b (Hib), Keuchhusten, Kinderlähmung und Tetanus. Totimpfstoffe bieten den Vorteil, dass sie keine vermehrungsfähigen Erreger enthalten und daher auch für vulnerable Personen mit geschwächtem Immunsystem geeignet sind. Jedoch werden ohne eine Vermehrung die Erregerbestandteile schneller abgebaut und damit kürzer den Immunzellen ausgesetzt. Um die Wirkung der Totimpfstoffe zu verstärken, können Trägersubstanzen (Adjuvantien) verwendet werden, wodurch eine adäquate Immunantwort hervorgerufen wird. Zu diesen Adjuvantien gehören z.B. Aluminiumsalze, Emulsionen, Mikropartikel und Immunpotentiatoren (FACCIOLÀ et al., 2022). Adjuvantien besitzen PAMPs, die von dendritischen Zellen erkannt werden. Infolgedessen wird das im Impfstoff enthaltene Antigen des Erregers in die Zelle aufgenommen, prozessiert und den T-Zellen präsentiert wird.

EINLEITUNG

Totimpfstoffe auf Proteinbasis enthalten Proteine oder Proteinfragmente eines Krankheitserregers, um die Immunreaktion zu stimulieren. Es wurden bereits proteinbasierte Impfstoffe gegen Hepatitis B und Humane Papillomviren (HPV) sowie saisonale Grippe entwickelt und eingesetzt. In den letzten Jahren wurden zudem proteinbasierte Impfstoffe gegen Gürtelrose (Shingrix) und COVID-19 (NVX-CoV2373) zugelassen. Proteinbasierte Impfstoffe bestehen aus einem im Erreger häufig vorkommenden Protein. Meist handelt es sich dabei um ein Oberflächenprotein. Das Gen, welches für das entsprechende Protein codiert, wird in einem eukaryotischen Expressionssystem synthetisiert, aufgereinigt und als Impfstoff meist zusammen mit einem Adjuvans appliziert (MODROW et al., 2022).

Neben den klassischen Lebend - und Totimpfstoffen wurden in den letzten Jahren auch virale Vektoren, RNA- und DNA-Impfstoffe und virusähnliche Partikel (*Virus-like particles*, VLP) als neue Impfstoffplattformen entwickelt (POLLARD, BIJKER, 2021). Bei den RNA-Impfstoffen codiert die mRNA Informationen für die gewünschten Proteine des Erregers, meist Oberflächenproteine, die später von der Zelle produziert werden. Die mRNA wird hierfür gentechnisch in Zellkultursystemen hergestellt, gereinigt und anschließend in lipidbasierte Nanopartikel verpackt. Nach der Applikation des mRNA-Impfstoffs werden die Lipidnanopartikel intrazellulär aufgenommen, wo die mRNA translatiert werden kann. Das Protein wird prozessiert, auf der Zelloberfläche präsentiert und induziert eine zelluläre und humorale Immunantwort (CHAUDHARY et al., 2021; MODROW et al., 2022). Ein Vorteil dieser Impfstoffart liegt in der schnellen, kostengünstigen biotechnologischen Herstellbarkeit. Dieser Vorteil zeigte sich insbesondere während der COVID-19 Pandemie, wo nach verhältnismäßig kurzer Zeit die beiden mRNA-Impfstoffe BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) und mRNA-1273 (Moderna) zur Verfügung standen. Die rasche Verfügbarkeit der Impfstoffe machte es möglich eine Vielzahl von Menschen zu immunisieren und damit gegen Infektionen und schwere Verläufe zu schützen. Jedoch sind diese Impfstoffe weniger temperaturresistent, was insbesondere in Ländern mit geringerem Einkommen und bei Notwendigkeit langer Transportwege ein logistisches Problem darstellt (UDDIN, RONI, 2021). Bei Vektorimpfstoffen werden für den Menschen harmlose Vektoren wie z.B. Adenoviren genutzt. Dabei wird der für das Erreger-spezifische Antigen codierende Abschnitt des Genoms in die DNA der Adenoviren eingefügt. Nach Injektion des Vektorimpfstoffs infizieren die Adenoviren die Zellen, die

daraufhin das Antigen produzieren, wodurch eine zelluläre und humorale Immunantwort induziert wird (MASCELLINO et al., 2021; MODROW et al., 2022).

3.1.4.2 Nachweis der impfinduzierten Immunantwort

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass nach einer Impfung eine ausreichende Immunantwort induziert wird. Jedoch gibt es Impflinge die nicht (Non-Responder) oder nur eingeschränkt (Low-Responder) auf die Impfung ansprechen. So kann es insbesondere bei immunsupprimierten Menschen dazu kommen, dass nur eine unzureichende Impfantwort induziert wird oder diese über die Zeit weniger stabil ist. Dies kann fatale Folgen für die Betroffenen haben, da sie im Glauben eines ausreichenden Immunschutzes möglicherweise weniger sorgsam agieren und sich damit dem Risiko einer Infektion aussetzen. Ein Monitoring der durch Impfungen induzierten Immunantwort ist daher eine wichtige Maßnahme, um festzustellen wie effizient die Impfung eine humorale und zelluläre Immunantwort auslöst und gegebenenfalls Impfempfehlungen anzupassen. In erster Linie werden Antikörernachweise durch *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Zur Untersuchung der zellulären Immunantwort gegen Impfantigene können Methoden wie ELISpot und Durchflusszytometrie genutzt werden. Letztere bietet zusätzlich die Möglichkeit, Immunzellen phänotypisch und funktionell zu charakterisieren und gegebenenfalls Unterschiede zwischen Respondern und Low- oder Non-Respondern festzustellen.

3.2 Das Varizella Zoster Virus (VZV)

Mehr als 90 % der Weltbevölkerung sind mit dem Varizella Zoster Virus (VZV) infiziert (ELZOUKI et al., 2012; KILGORE et al., 2003). Die primäre VZV-Infektion, die im Allgemeinen als Windpocken bekannt ist, erfolgt für gewöhnlich im Kindes- oder Jugendalter. Nach Abklingen der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang im menschlichen Körper. Eine Reaktivierung, meist im fortgeschrittenen Erwachsenenalter, führt häufig zu einem gürtelartigen Ausschlag, der sogenannten Gürtelrose oder Herpes Zoster (HOPE-SIMPSON, 1965; WUTZLER et al., 2001).

3.2.1 Virusaufbau

Das Varizella Zoster Virus (VZV) zählt wie die Herpes Simplex Viren 1 (HSV1) und 2 (HSV2) zu den Alphaherpesviren und wird auch als Humanes Herpes Virus 3 (HHV3) bezeichnet. Mit einem Durchmesser zwischen 150 bis 200 nm ist es der kleinste Vertreter der Herpesviren. Alle

EINLEITUNG

drei Herpesviren bestehen aus den drei Hauptstrukturen: Hüllmembran, Tegument und Nucleocapsid. Das ikosaedrische Nucleocapsid, mit einem Durchmesser von 90-125 nm, enthält die lineare doppelsträngige DNA mit 72 offenen Leserahmen (ORF) (DEPLEDGE et al., 2018). Zudem besitzt das Virus eine Hüllmembran, in der mehrere glykosylierte Oberflächenproteine eingelagert sind. Insgesamt codiert VZV für neun Hüllproteine, wobei Glykoprotein E (gE), der prominenteste Vertreter ist (FOWLER et al., 1995). Dieses Membranglykoprotein besteht aus 623 Aminosäuren und wird im ORF68 codiert. Als multifunktionelles Protein spielt es eine entscheidende Rolle bei der Zellfusion, Zell-Zell-Ausbreitung und Virusreplikation (BERARDUCCI et al., 2006). Den Zwischenraum zwischen der Hüllmembran und dem Capsid füllt das Tegument, das regulatorische Proteine enthält, aus. Um die menschliche Immunantwort zu umgehen hat VZV einen Mechanismus entwickelt, indem es im ORF66 für eine Serin/Threonin-Kinase codiert, welche bei Expression den Transport von Peptid-MHC-I-Komplexen an die Zelloberfläche verhindert und die infizierte Zelle dadurch weniger gut von CD8 T-Zellen erkannt werden kann (MODROW et al., 2022).

3.2.2 Infektionsverlauf

Die Übertragung des Virus erfolgt durch Tröpfcheninfektion oder als Schmierinfektion durch Kontakt mit Hautläsionen. Nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 2 Wochen treten die ersten Symptome in Form von Fieber, gefolgt von einem bläschenartigen Ausschlag auf. Dieser breitet sich von der Mundschleimhaut über Kopf und Rumpf bis zu den Extremitäten aus. Die Bläschenbildung verläuft über einen Zeitraum von 3-5 Tagen. Während der Ausschlag zurückgeht, kommt es zu einer Krustenbildung auf den Bläschen, welche nach etwa 2-3 Wochen verheilt sind. Ein asymptomatischer Verlauf der Primärinfektion ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 % sehr selten (MODROW et al., 2022). Im Erwachsenenalter kann eine Primärinfektion mit schwerwiegenden Komplikationen wie Hepatitis oder Enzephalitis einhergehen. Zudem können insbesondere bei Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten schwere, generalisierte Infektionsverläufe auftreten (GNANN, 2002).

EINLEITUNG

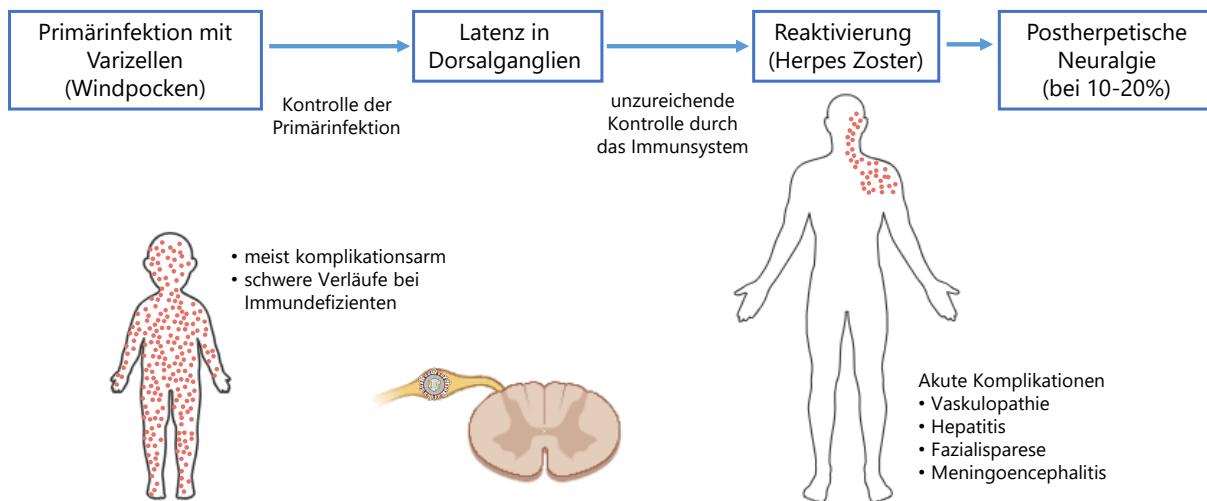


Abbildung 2 Infektionsverlauf mit dem Varizella Zoster Virus. Die Primärinfektion mit dem Varizella Zoster Virus (VZV) im Kindesalter manifestiert sich meist durch einen, über den ganzen Körper verteilten, juckenden Hautausschlag und verläuft bei immungesunden Kindern komplikationsarm. Nach Eindämmung der Infektion durch die Immunzellen wandert das Virus retrograd in die Dorsalganglien und verbleibt dort latent. Durch fehlende Kontrolle des Immunsystems, im fortschreitenden Erwachsenenalter kann das Virus erneut reaktivieren und als Herpes Zoster auftreten. Dabei bildet sich ein charakteristischer Hautausschlag aus, der meist auf das vom neuronalen Ganglion innervierte Dermatom begrenzt ist. Insbesondere bei immungeschwächten Menschen können schwerwiegende Komplikationen auftreten. Zudem entwickeln 10-20 % der Betroffenen eine postherpetische Neuralgie. Modifiziert nach (GERSHON et al., 2015), erstellt mit BioRender.

Nach der Primärinfektion wandert das Virus retrograd in die sensorischen Ganglien. Eine Apoptose der Neurone wird dabei durch das *immediate early*-Protein IE63 von VZV unterbunden (HOOD et al., 2006). Aufgrund der Persistenz muss eine lebenslange Kontrolle durch das Immunsystem erfolgen. Ist dieses beeinträchtigt, kann sich das Virus nach einer Latenzphase erneut vermehren und es kommt zu einer Reaktivierung (Abbildung 2). Hierbei wandert das Virus anterograd entlang der Nervenleitschienen zu dem Hautareal, welches vom entsprechenden Ganglion versorgt wird (Dermatom) und verursacht in der Epidermis die Bildung des unilateralen Ausschlags. Bereits einige Tage vorher kündigt sich die Reaktivierung mit allgemeinen Krankheitssymptomen wie Erschöpfung und Unwohlsein an (MODROW et al., 2022). Zudem treten am betroffenen Dermatom Schmerzen, erhöhte Hautempfindlichkeit, Juckreiz und Kribbeln auf. Mit einer Verzögerung von 2 bis 3 Tagen bildet sich ein charakteristischer bläschenartiger Hautausschlag. Neue Läsionen bilden sich innerhalb der nächsten 3 bis 5 Tage. Nach 7 bis 10 Tagen trocknet der Ausschlag aus und es folgt die Krustenbildung (COHEN, 2013). Während der Reaktivierung kommt es auch zu Entzündungen und Nekrosen in den betroffenen Ganglien und der Nerven, was zu Schmerzen und Empfindungsstörungen führen kann. Da der Ausschlag sich häufig im Bereich des Rumpfes ausbreitet und auf den Bereich begrenzt ist, welcher vom betroffenen Ganglion innerviert wird,

EINLEITUNG

wird der Herpes Zoster im Allgemeinen als Gürtelrose bezeichnet. Jedoch können auch andere Regionen des Körpers wie der Kopfbereich betroffen sein. Insbesondere Beteiligungen der Hirnnerven stellen eine große Gefahr bei Zoster dar. So kann Zoster ophthalmicus zu Erblindungen führen oder bei Zoster oticus eine Fazialisparese hervorrufen. In seltenen Fällen kann es zu einer, als Zoster sine herpete bezeichneten, symptomlosen Reaktivierung kommen (GILDEN et al., 2010; MODROW et al., 2022). Während bei Immungesunden ein rezidivierender Herpes Zoster mit 6 % innerhalb der ersten 8 Jahre der Reaktivierung eher die Ausnahme darstellt, wird bei bis zu 30 % der immundefizienten Personen ein erneutes Auftreten eines Herpes Zosters beobachtet (EHRENSTEIN, 2021; YAWN et al., 2011).

Eine häufige und schwerwiegende Komplikation der VZV-Reaktivierung stellt die postherpetische Neuralgie (PHN) dar. Diese wird als chronischer, neuropathischer Schmerz im betroffenen Hautbereich definiert, der über einen Zeitraum von 90 Tagen hinweg anhält. Betroffene berichten von starken Schmerzen meist über Monate bis Jahre, was zu erheblichen Einschränkungen im Alltag, beim Schlafen oder bei täglichen Aktivitäten führt (COHEN, 2013). Zwischen 10 und 20 % der Patienten entwickeln nach der VZV-Reaktivierung eine PHN (DROLET et al., 2010; GAUTHIER et al., 2009; GIALLORETI et al., 2010), wobei das Risiko mit zunehmendem Alter deutlich ansteigt (STEIN et al., 2009). Zu den weiteren Faktoren, die eine PHN begünstigen können, zählen höhere Schweregrade der akuten Schmerzen und des Hautausschlages, sowie eine Immundefizienz (JOHNSON et al., 2015). Neben einer Neuralgie werden weitere postherpetische Komplikationen mit einer VZV-Reaktivierung in Verbindung gebracht. So kann es durch die Entzündungsreaktionen zu Vaskulopathien kommen, wodurch die Gefahr von Herzinfarkt und Schlaganfall zunehmen kann (CHIANG et al., 2014; CURHAN et al., 2022; YAMAOKA-TOJO, TOJO, 2024). Nach einem Zoster ophthalmicus ist das Schlaganfall-Risiko sogar um das 4,3-fache erhöht (LIN et al., 2010). In letzter Zeit gibt es zudem Hinweise das VZV eine Rolle bei der Entstehung von Demenz spielen könnte (EYTING et al., 2023).

3.2.3 Risikofaktoren für eine VZV-Reaktivierung

Insbesondere Menschen mit Immundefizienz haben im Vergleich zu Immungesunden ein 2- bis 10-fach höheres Risiko für eine VZV-Reaktivierung (CHEN et al., 2014). Zu dieser Risikogruppe zählen dialysepflchtige Patienten (LI et al., 2021) sowie Menschen mit chronischen Atemwegserkrankungen (MORENA et al., 2023), mit Diabetes mellitus (MUÑOZ-QUILES et al., 2017) oder auch mit psychischen Erkrankungen (FORBES et al., 2014; WANG et

EINLEITUNG

al., 2014). Bei Menschen mit rheumatischen Erkrankungen und Transplantierten mit entsprechender Einnahme von immunsupprimierenden Medikamenten wurde ebenfalls ein erhöhtes Risiko für eine VZV-Reaktivierung festgestellt (BATRAM et al., 2021; LIAO et al., 2017). Auch Patienten mit multipler Sklerose besitzen aufgrund der medikamentösen Behandlung z.B. mit S1P-Modulatoren eine erhöhte Reaktivierungsrate (SHARMA et al., 2022).

Das Risiko für einen Herpes Zoster steigt auch bei Immungesunden ab 50 Jahren deutlich an (CURRAN et al., 2022; KAWAI et al., 2014). So erleiden in Deutschland ab einem Alter von etwa 50 Jahren 4 von 1000 Menschen eine VZV-Reaktivierung. Die Inzidenz steigt in der Folge kontinuierlich an (12-14 von 1000 Personen/Jahr im Alter von über 80 Jahren) (HILLEBRAND et al., 2015; ULTSCH et al., 2011). Dabei scheint die Abnahme der zellulär vermittelten Immunität bei der VZV-Reaktivierung eine entscheidende Rolle zu spielen (LEVIN et al., 2003). Nach dem primären Kontakt mit dem Virus bilden sich Effektorzellen aus, was zu einem Anstieg der zellulären Immunität führt (Abbildung 3).

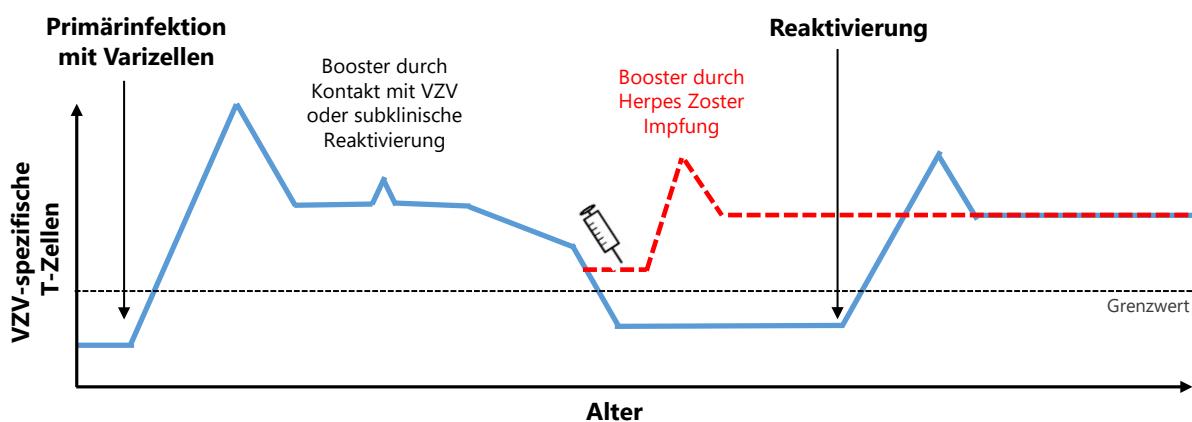


Abbildung 3 Abnahme der zellulär vermittelten Immunität geht mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer VZV-Reaktivierung einher Nach der Primärinfektion steigt die zelluläre Immunität deutlich an und verbleibt im mittleren Alter auf einem Plateau. Erneuter Kontakt mit VZV oder eine subklinische Reaktivierung führen zu einem Anstieg der zellulären Immunität. Im Alter nimmt diese jedoch wieder ab. Bei Unterschreiten eines Grenzwertes besteht ein deutlich erhöhtes Risiko eines Herpes Zoster. Nach durchgemachter Reaktivierung steigt die zelluläre Immunität erneut an. Die zelluläre Immunität kann durch eine Zoster-Impfung geboostert werden, wodurch sich das Risiko einer Reaktivierung reduziert. Modifiziert nach (WASSILEW, WUTZLER, 2010).

Im fortgeschrittenen Alter kommt es zu einem Rückgang der zellulären Immunität, wohingegen diese im mittleren Alter noch konstant auf einem hohen Niveau nachweisbar bleibt (SCHUB et al., 2015). Ein erneuter Kontakt mit VZV oder eine subklinische Reaktivierung führen zu einem erneuten Anstieg der zellulären Immunität. Im Alter ab 50 Jahren nimmt die zelluläre Immunität zunehmend ab, was das Risiko eines Herpes Zoster begünstigt. Da hier auch individuelle

EINLEITUNG

Faktoren einen starken Einfluss haben, gibt es keine klare Definition für den Grenzwert in der zellulären Immunität. Nach durchgemachter Reaktivierung oder nach einer Zoster-Impfung steigt die zelluläre Immunität erneut an (WASSILEW, WUTZLER, 2010; WEINBERG et al., 2010).

Auf humoraler Ebene kommt es bei der Primärinfektion zu einem Anstieg von IgA und IgM gefolgt von IgG Antikörpern gegen VZV. Während die VZV-spezifische IgA und IgM Konzentration nach der Primärinfektion abnimmt, bleiben IgG-Level über einen langen Zeitraum stabil (LAING et al., 2018). VZV-IgG Antikörper haben eine neutralisierende Funktion, welche bei einer erneuten Exposition zum Tragen kommt. Serologisch kommt es unmittelbar nach der Reaktivierung zu einem Anstieg der IgA-Level und im weiteren Verlauf erhöht sich die IgG-Konzentration (MODROW et al., 2022).

Neben dem Alter können auch weitere Faktoren wie z.B. Stress einen Herpes Zoster Ausbruch begünstigen. Alle Faktoren führen zu einer Schwächung des Immunsystems, wodurch das Virus nicht mehr adäquat kontrolliert wird. Mit dem demografischen Wandel durch bessere medizinische Versorgung, aber auch durch Zunahme von immunsupprimierenden Behandlungsstrategien kam es in den letzten Jahren zu einem deutlichen Anstieg der Herpes Zoster Fälle sowie der mit der Reaktivierung verbundenen Komplikationen (KAWAI et al., 2014; LEUNG et al., 2011; VAN OORSCHOT et al., 2021). Neben den individuellen Auswirkungen für betroffene Patienten hat diese Zunahme auch wirtschaftliche Folgen, durch z.B. Krankenhausaufenthalte und Arbeitsausfälle. Daher nimmt die Verfügbarkeit einer immunogenen und wirksamen Impfung zur Verhinderung einer VZV-Reaktivierung eine wichtige Rolle ein.

Inwieweit durch die Einführung der Varizellen-Impfung die Inzidenz von Herpes Zoster steigt und sich der Zeitpunkt einer Reaktivierung nach vorne verschiebt, da eine exogene Boosterung im mittleren Erwachsenenalter durch ausbleibende Primärinfektionen im nahen Personenumfeld fehlt, ist noch nicht abschließend geklärt (WUTZLER et al., 2018).

3.2.4 Therapie und Prophylaxe der Varizellen und des Herpes Zoster

Da während der Primärinfektion mit Varizellen im Kindes- und Jugendalter häufig nur milde Symptome auftreten und die Erkrankung in der Regel unkompliziert verläuft, bedarf es in den meisten Fällen keiner Therapie. In Ausnahmefällen wie bei Infektionen im Erwachsenenalter sowie bei Neugeborenen und immungeschwächten Kindern, erfolgt eine Behandlung. Zur

EINLEITUNG

postexpositionellen Prophylaxe können Immunglobuline von neutralisierenden Antikörpern gegen VZV bei vulnerablen Personen wie Schwangeren, Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten verabreicht werden, um eine Infektion zu verhindern oder den Krankheitsverlauf abzuschwächen (GERSHON et al., 2015; MODROW et al., 2022). Zudem ist seit 2004 die Impfung gegen Varizellen ab dem 11. Monat als Einzel- oder Kombinationsimpfstoff mit Mumps, Masern und Röteln (MMRV) von der STIKO empfohlen, welche vor Windpocken und damit auch vor einer möglichen Reaktivierung schützen soll (IMPFKOMMISSION, 2004, 2009). Seronegativen Frauen mit Kinderwunsch und Beschäftigten die einen beruflichen Kontakt zu Kindern haben, wird ebenfalls eine Varizellen-Impfung empfohlen (IMPFKOMMISSION, 2024).

Bei einer VZV-Reaktivierung gestaltet sich die Behandlungsstrategie schwierig, da sich der charakteristische Hauthausschlag erst nach einigen Tagen ausbildet, eine Behandlung jedoch so schnell wie möglich erfolgen sollte. Normalerweise lässt der typische Hauthausschlag auf einen Herpes Zoster schließen, sodass keine weitere Diagnostik notwendig ist. Jedoch können insbesondere bei immungeschwächten Personen atypische Verläufe auftreten. Als Therapie-Ansatz steht das Virostatikum Aciclovir und dessen Derivate Valaciclovir, Famciclovir, und Brivudin zur Verfügung (GROSS et al., 2020). Die antivirale Therapie sollte möglichst schnell erfolgen. Studien zeigten, dass die Gabe von Aciclovir innerhalb von 72 Stunden nach Reaktivierung die Dauer und Schwere des Herpes Zoster positiv beeinflusst. Zusätzlich ist eine rasche Behandlung notwendig, um die möglichen Komplikationen wie PHN zu vermeiden bzw. zu lindern (JEON, 2015). Zur Linderung der PHN werden meist Schmerzmedikamente verabreicht. Aufgrund psychischer Belastung durch die anhaltend starken Schmerzen kommen häufig auch Antidepressiva zum Einsatz (KOSHY et al., 2018).

Da eine VZV-Reaktivierung mit schwerwiegenden und langanhaltenden Komplikationen einhergehen kann und eine Behandlung nicht immer erfolgreich ist, empfiehlt es sich vorbeugende Maßnahmen zu treffen. Zur Prophylaxe stehen mittlerweile zwei Impfstoffe zur Verfügung. Der seit 2006 zugelassene Lebendimpfstoff Zostavax besteht wie die Varizellen-Impfung aus dem attenuierten VZV-Stamm Oka/Merck, jedoch in 14-fach höherer Konzentration (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016; HARPAZ et al., 2008). Da in Studien eine eingeschränkte Wirksamkeit sowie eine begrenzte Wirkdauer beobachtet wurden, wird der Lebendimpfstoff von der STIKO nicht empfohlen (IMPFKOMMISSION, 2017; MORRISON et al.,

2014; OXMAN, 2018). Ein weiterer Nachteil des Lebendimpfstoffes besteht darin, dass für immunsupprimierte Patienten, welche zur Risikogruppe für eine VZV-Reaktivierung zählen, Lebendimpfstoffe kontraindiziert sind (ALEXANDER et al., 2018; KEATING, 2016). Aus diesem Grund gilt der rekombinante Totimpfstoff Shingrix insbesondere für Risikopatienten als Hoffnung. Der adjuvante HZ-Untereinheiten (HZ/su)-Totimpfstoff wird seit Dezember 2018 von der STIKO für Immungesunde ab 60 Jahren und immungeschwächte Menschen ab 50 Jahren empfohlen. Die Empfehlung gilt auch für Personen, die bereits eine VZV-Reaktivierung durchgemacht haben, mit dem Ziel weitere Rezidive zu vermeiden (IMPFKOMMISSION, 2018). Insgesamt werden zwei Impfdosen im Abstand von 2 bis 6 Monaten intramuskulär appliziert. Der rekombinante Impfstoff besteht aus dem trunkierten Glykoprotein E (gE), bei dem der Transmembrananker und die Carboxyterminale Domäne fehlen, wodurch eine Sezernierung ins Zellkulturmedium möglich ist (HAUMONT et al., 1996; LEVIN et al., 2008). Zur Herstellung des Glykoproteins werden immortalisierte Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) genutzt. Als Adjuvans wird AS01_B verwendet, welches Monophosphoryl-Lipid (MPL) A von *Salmonella minnesota* und *Quillaja saponaria* Molina, Fraktion 21 (QS-21) enthält. Beide Komponenten werden in Liposomen formuliert (LECRENIER et al., 2018). Bisherige Studien zeigten eine gute Wirksamkeit und Verträglichkeit, insbesondere bei immungesunden Menschen (CUNNINGHAM et al., 2016; LAL et al., 2015; MWAKINGWE-OMARI et al., 2023).

3.3 Das SARS-Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

Das SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) trat erstmalig im Dezember 2019 in der chinesischen Provinz Wuhan auf und wurde Anfang 2020 als Erreger von COVID-19 identifiziert. In kürzester Zeit breitete sich das Virus weltweit aus (HU et al., 2021).

3.3.1 Virusaufbau

Das Virus gehört zur Familie der Coronaviridae und wird als Betacoronavirus eingeordnet. SARS-CoV-2 charakterisiert sich als membranumhülltes einzelsträngiges RNA-Virus und ist mit SARS-CoV und MERS-CoV verwandt. SARS-CoV-2 setzt sich aus den vier Strukturproteinen Spike-Protein (S), Nucleocapsid-Protein (NCAP, N), Hüllprotein (*Envelope*, E) und Membranprotein (M) zusammen (Abbildung 4). Das Spike-Protein setzt sich aus den beiden Untereinheit S1 und S2 zusammen und bildet auf der Zelloberfläche Trimere. Während S1 die Rezeptorbindedomäne (RBD) enthält und dadurch an den Rezeptor der Wirtszelle binden kann, ist die S2 Untereinheit für die Fusion des Virus mit der Zellmembran verantwortlich. Als

EINLEITUNG

Rezeptor für den Zelleintritt wird Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (ACE-2), eine Metalloprotease, genutzt (BEYERSTEDT et al., 2021; MAIA et al., 2022). Diese Rezeptoren sind hauptsächlich auf Zellen der oberen und unteren Atemwege lokalisiert, aber auch in anderen Geweben wie der Lunge, dem Herzen, den Nieren und dem Darm. Nachdem das Virus an die ACE2-Rezeptoren gebunden hat, kann es mit Hilfe der Serinprotease TMPRSS2 in die Zelle eindringen und beginnen, sich dort zu replizieren. Die Vermehrung von SARS-CoV-2 führt zur Freisetzung neuer Viren, die dann benachbarte Zellen infizieren können. Dieser Prozess setzt sich fort und ermöglicht eine schnelle Ausbreitung des Virus im Körper (HOFFMANN et al., 2020).

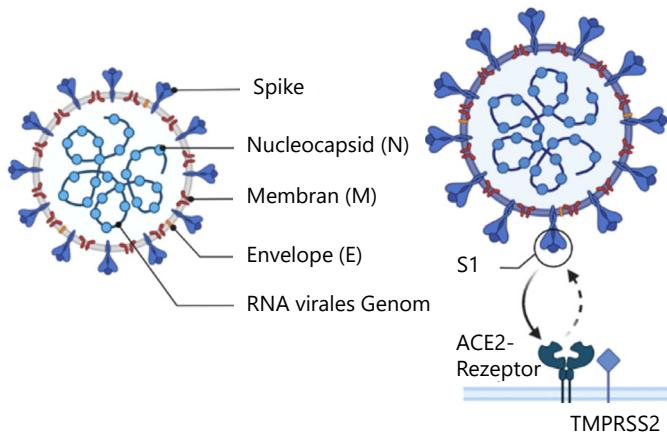


Abbildung 4 SARS-CoV-2 Virusaufbau und Bindung von Spike an ACE2-Rezeptor SARS-CoV-2 besitzt eine einzelsträngige RNA und ist aus vier Strukturproteinen aufgebaut Spike (S), Nucleocapsid (N), Envelope (E) und Membran (M) (links). Die S1-Untereinheit des Spike-Proteins kann an ACE2-Rezeptoren menschlicher Zellen binden und ermöglicht so den Viruseintritt in die Zelle (rechts). Modifiziert nach (MAIA et al., 2022).

Aufgrund des Replikationsmechanismus und damit einhergehender sehr hoher Mutationsrate wurden im Verlauf der Pandemie immer wieder neue Varianten nachgewiesen. Zuerst wurden Infektionen mit den mutierten Stämmen des SARS-CoV-2 in Großbritannien (Alpha-Variante, B.1.1.7-Variante) nachgewiesen, gefolgt von Südafrika (Beta-Variante, B.1.351-Variante) und die Gamma-Variante, P.1-Variante in Brasilien (MODROW et al., 2022), anschließend in Indien die Delta-Variante (B.1.617.2-Variante) und Omikron-Varianten BA.1, BA.2, BA.4 und BA.5 (CARABELLI et al., 2023). 2023 dominierten dann Varianten von XBB, 2024 Varianten von JN-1. Die Varianten weisen bestimmte Mutationen auf, die einen Einfluss auf Infektiosität und Pathogenität von SARS-CoV-2 haben können.

3.3.2 Übertragung und Verbreitung

Die Übertragung von SARS-CoV-2 erfolgt zoonotisch durch infizierte Tiere oder über Tröpfchen- oder Schmierinfektion durch den Menschen. Nach einer Inkubationszeit von bis zu 10 Tagen können zunächst grippeähnliche Krankheitssymptome mit Lymphknotenschwellung und Fieber auftreten. Im weiteren Verlauf geht die Erkrankung meist mit trocknem Husten einher. Charakteristisch ist der vorübergehende Verlust des Riech- und Geschmacksvermögens, was ein Hinweis auf eine Beteiligung des zentralen Nervensystems darstellt (MODROW et al., 2022). Inkubationszeiten und Krankheitssymptome variieren je nach Variante. Bei Menschen in höherem Lebensalter oder mit Vorerkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, chronische Nierenerkrankungen und schwerem Übergewicht kann die durch SARS-CoV-2 verursachte Erkrankung COVID-19 einen schwerwiegenden und teilweise tödlichen Verlauf nehmen (ZHANG et al., 2023). Dabei können die Patienten nach Auftreten der ersten Symptome eine schwerwiegende Lungenentzündung entwickeln, die häufig von akutem Herz- und Nierenversagen, septischem Schock und letztendlich Multiorganversagen begleitet ist (HUANG et al., 2020). Neben den respiratorischen Symptomen können auch Erkrankungen des renalen und gastrointestinalen Systems oder Thrombozytopenien auftreten (BOBAN, 2021; MODROW et al., 2022). Die Langzeitfolgen durch Long und Post COVID sind noch nicht abzusehen und werden weiter intensiv erforscht.

3.3.3 Prophylaxe und Behandlung

Da zu Beginn der Pandemie noch kein Impfstoff zur Verfügung stand, waren die häufigsten Schutzmaßnahmen zur Verhinderung einer Ansteckung die Kontaktminimierung sowie das Tragen von Schutzkleidung, insbesondere Mund-Nasen-Schutz, um ein Ausbreiten des Virus zu reduzieren und eine Überlastung des Krankenhaussystems zu verhindern.

Die Therapie erfolgt dabei in Abhängigkeit der Schwere der Erkrankung. Während bei milden Verläufen die Behandlung meist symptombezogen erfolgt, können schwerwiegende Verläufe hingegen einen Krankhausaufenthalt, zum Teil mit intensivstationärer Behandlung, Sauerstofftherapie, antiviralen Medikamenten und anderen unterstützenden Maßnahmen notwendig machen. Zur Bekämpfung der SARS-CoV-2 Ausbreitung und Verhinderung der Erkrankung bzw. um schwere Krankheitsverläufe zu verringern wurden verschiedene Impfstoffe entwickelt und zur Jahreswende 2020/21 in Europa zugelassen. Die beiden Impfstoffe BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) und mRNA-1273 (Moderna) basieren auf einer mRNA-Plattform

EINLEITUNG

zur Expression des viralen Spike-Proteins. Die gegen COVID-19 zugelassenen Impfstoffe ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) und Ad26-CoV2.S (Johnson & Johnson) nutzen hingegen eine Vektorplattform für die Impfstoffstrategie. NVX-CoV2373 (Novavax), ein rekombinanter Protein-Impfstoff wurde Ende 2021 zugelassen und seit Anfang 2022 von der STIKO empfohlen (MATYSIAK-KLOSE et al., 2022). Neben dem Vollängen SARS-CoV-2-Wildtyp-Spike-Glykoprotein enthält der Impfstoff Matrix-M1, ein Adjuvans auf Saponin-Basis (KEECH et al., 2020).

Inwieweit die bisher zugelassenen Impfstoffe einen Schutz vor neuen SARS-CoV-2-Varianten bieten, war zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit nicht abschließend geklärt. Auch war zu erwarten, dass sich durch Mutationen weitere SARS-CoV-2-Varianten mit neuen antigenen Eigenschaften entwickeln werden. Aufgrund dessen werden die Impfstoffe kontinuierlich an die neuen SARS-CoV-2-Varianten angepasst und Auffrischimpfungen für vulnerable Personen empfohlen (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2024).

3.4 Ziel dieser Arbeit

Als Prophylaxe spielen Impfungen eine entscheidende Rolle bei der Ausrottung von Krankheiten und Verhinderung von schwerwiegenden Infektionsverläufen. Proteinbasierte Impfstoffe haben dabei den großen Vorteil, dass diese auch für Risikogruppen geeignet sind, welche besonders häufig und meist von schwerwiegenderen Infektionsverläufen betroffen sind, weshalb diese Impfstoffe häufig zum Einsatz kommen. Die Datenlage zu den zugelassenen Impfstoffen bezüglich der impfinduzierten Immunantwort bei verschiedenen Risikogruppen ist jedoch eher begrenzt. Zudem gab es trotz der rasanten Entwicklung mehrerer neuer Impfstoffprinzipien gegen COVID-19 keine vergleichenden Analysen der Immunogenität. In dieser Arbeit werden deshalb zwei verschiedene Fragestellungen behandelt.

1. Einfluss der Immundefizienz auf die durch den proteinbasierten Impfstoff HZ/su induzierte VZV-spezifische Immunantwort

Das Hauptaugenmerk dieses Teils der Arbeit liegt in der Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort nach HZ/su-Impfung bei Dialysepatienten. Diese Personengruppe besitzt aufgrund ihrer Urämie ein erhöhtes Risiko für VZV-Reaktivierungen und damit einhergehenden schwerwiegenden Komplikationen wie PHN. Jedoch lagen bisher keine Daten zur Immunogenität des HZ/su-Impfstoffs für diese Risikogruppe vor. Daher erfolgte eine

EINLEITUNG

vergleichende Untersuchung der zellulären und humoralen Immunität im zeitlichen Verlauf nach Standardimpfung von Dialysepatienten und immungesunden Probanden.

In Vorbereitung der technischen Prozeduren zur Charakterisierung VZV-spezifischer T-Zellen gegen den Impfstoff erfolgte zunächst eine Methodenabstimmung mit Proben von Immungesunden, um geeignete Messzeitpunkte, Antigene sowie deren Konzentration zu bestimmen.

Darauf aufbauend wurde eine vergleichende phänotypische und funktionelle Charakterisierung der impfinduzierten VZV-spezifischen T-Zell-Antwort von Dialysepatienten und Kontrollpersonen durchgeführt. Weiterhin wurde die Proliferationsfähigkeit der VZV-spezifischen T-Zellen und Differenzierung der Gedächtnis-T-Zellen untersucht. Auf humoraler Ebene wurden VZV-spezifische IgGs mittels ELISA quantifiziert und die neutralisierende Aktivität der VZV-spezifischen Antikörper analysiert. Zudem erfolgte eine allgemeine Analyse der B- und T-Zellsubpopulationen. Zusätzlich wurde die Reaktogenität des Impfstoffes bei Dialysepatienten und Immungesunden mittels Fragebogen erfasst.

Eine Immundefizienz kann auch durch verschiedene Medikamente hervorgerufen werden. Daher wurden zusätzlich in dieser Arbeit *in vitro* Versuche mit Immunsuppressiva, die nach Transplantation oder bei rheumatischen Erkrankungen eingesetzt werden, durchgeführt, um den Einfluss auf die T-Zell-Antwort zu untersuchen.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können als Grundlage zum Monitoring der impfinduzierten VZV-spezifischen Immunantwort bei anderen Risikogruppen wie zum Beispiel Patienten mit MS genutzt werden. Erste Daten zur Immunogenität von HZ/su bei Patienten mit MS unter immunmodulatorischer Therapie werden ebenfalls in dieser Arbeit vorgestellt.

2. Charakterisierung der SARS-CoV-2 spezifischen Immunantwort nach Impfung mit dem proteinbasierten Impfstoff NVX-CoV2373

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Immunogenität und Reaktogenität von NVX-CoV2373 im Vergleich zu den mRNA-basierten Impfstoffen BNT162b2 und mRNA-1273 untersucht. Hierbei wurden vergleichende Analysen zur humoralen und zellulären Immunantwort durchgeführt. Auf humoraler Ebene wurde die Spike-spezifische IgG-Antikörperfokussierung sowie die neutralisierende Aktivität untersucht. Zusätzlich erfolgte auf zellulärer Ebene die vergleichende Charakterisierung und Phänotypisierung der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zellen. Zusätzlich wurde die Immunogenität der drei Impfstoffe gegenüber verschiedenen, zu diesem Zeitpunkt

EINLEITUNG

vorherrschenden Virus-Varianten analysiert. Da es trotz Impfungen zu Durchbruchinfektionen kommen kann, wurde weiterhin der Einfluss von SARS-CoV-2 Infektionen auf die NVX-CoV2373 induzierte Immunantwort auf zellulärer und humoraler Ebene untersucht.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Reagenzien

In den Tabellen 1 bis 8 sind Geräte, Verbrauchsmittel, Reagenzien und Software aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Firmensitz
96-Loch Kulturplatten, Flachboden, steril	Greiner, Frickenhausen
Brutschrank HERAcell 240ti	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer (FACS Canto II, FACS Lyric)	BD Biosciences, Heidelberg
Elektronische Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Röhrchen für Durchflusszytometrie (5ml FACS Röhrchen, Rundboden)	Sarstedt, Nümbrecht
Kolbenhubpipette (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
MACS Roller (MACS Mix)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mikroskop CKX31	Olympus, Hamburg
Monovetten Li-Hep, Serum, EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Multipipette (Abimed HC Discovery Comfort 50-300 µl)	Abimed, Langenfeld
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Parafilm	Bemis, Neenah (USA)
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Plattenleser/Photometer multifunktional (Viktor X4)	PerkinElmer, Rodgau
Plattenleser/Photometer (PR4100)	Bio-Rad, Hercules (USA)
Präzisions Dispenser Tips (2,5; 5ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen Polypropylen (15, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Steril Werkbank (Hera Safe KS)	Heraeus, Hanau
Vortex Mixer 7-2020	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge 5418	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Thermo Scientific Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

MATERIAL UND METHODEN

4.1.2 Chemikalien und Kits

Tabelle 2 Chemikalien und Kits

Chemikalien und Kits	Hersteller, Firmensitz
Anti-VZV-ELISA-KIT (IgG)	Euroimmun, Lübeck
SARS-CoV-2-QuantiVac (IgG)	Euroimmun, Lübeck
Anti-SARS-CoV-2-NCP-ELISA	Euroimmun, Lübeck
SARS-CoV-2-NeutraLISA	Euroimmun, Lübeck
„Roswell Park Memorial Institute“ (RPMI) Medium 1640 mit 1% L-Glutamin (Gln)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Brefeldin A (BFA, Stock 5mg/ml in Ethanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
CFDA-SE (Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit, 10mM Stock in DMSO)	Life technologies, Darmstadt
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Apotheke des Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Shutdown	BD Biosciences, Heidelberg
fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
FicoLite-H (Ficoll)	Linaris (blue), Wertheim-Bettingen
Fixierungs-Permeabilisierungs-Konzentrat	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Fixierungs-Permeabilisierungs-Verdünnung	Invitrogen, Carlsbad (USA)
humanes Serumalbumin (HSA)	CSL Behring, Marburg
Lysing-Solution (10x konzentriert, 1x Verdünnung mit H ₂ O dest.)	BD Biosciences, Heidelberg
Natriumazid (NaN ₃ , 10 % in H ₂ O)	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd, (PFA, pH 7,4 – 7,6)	AppliChem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom, Berlin
Permeabilisierungspuffer (10x konzentriert, 1x Verdünnung mit H ₂ O dest.)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim

4.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3 Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer und Medium	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS, 5 % FCS, 0,5 % BSA, 0,07 % NaN ₃

MATERIAL UND METHODEN

Puffer und Medium	Zusammensetzung
Markierlösung	PBS, 0,1 % HSA, 10 µM CFDA-SE
Markiermedium	RPMI, 1 % Gln, 1 % P/S, 0,5 % HSA
PBS-EDTA	PBS, 0,02 % EDTA
PBS-HSA	PBS, 0,1 % HSA
Saponin-Puffer	FACS-Puffer, 0,1 % Saponin
Wachstumsmedium	RPMI, 1% Gln, 1 % P/S, 5 % FCS

4.1.4 Antikörper

Die Antikörper wurden von der Firma BD bezogen und hatten menschliche Antigene als Zielorganismus. Fluorochrom gekoppelte Antikörper wurden für durchflusszytometrische Untersuchungen verwendet. Unkonjugierte Antikörper kamen bei der Stimulation zum Einsatz.

Tabelle 4 Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie und Stimulation

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Ig Klasse	Herkunfts-organismus
CD152 (CTLA-4)	APC	BNI3	IgG2a k	Maus
CD185 (CXCR5)	PerCP-Cy5.5	RF8B2	IgG2b k	Ratte
CD19	FITC	HIB19	IgG1 k	Maus
CD27	PE	L128	IgG1 k	Maus
CD27	FITC	L128	IgG1 k	Maus
CD27	V450	M-T271	IgG1 k	Maus
CD27	APC	L128	IgG1 k	Maus
CD278 (ICOS)	PE	DX29	IgG1 k	Maus
CD279 (PD1)	APC	MIH4	IgG1 k	Maus
CD28	unkonjugiert	L293	IgG1 k	Maus
CD3	APC	SK7	IgG1 k	Maus
CD3	PerCP	SK7	IgG1 k	Maus
CD38	PE	HB-7	IgG1 k	Maus
CD4	APC	SK3	IgG1 k	Maus
CD4	PE	SK3	IgG1	Maus
CD4	APC-H7	SK3	IgG1 k	Maus
CD4	PE-Cy7	SK3	IgG1 k	Maus
CD45R0	PE-Cy7	UCHL-1	IgG2a k	Maus
CD49d	unkonjugiert	9F10	IgG1 k	Maus
CD69	PerCP	L78	IgG1 k	Maus
CD69	PE-Cy7	L78	IgG1 k	Maus
CD8	V500	RPA-T8	IgG1 k	Maus
CD8	PerCP	SK1	IgG1	Maus

MATERIAL UND METHODEN

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Ig Klasse	Herkunfts-organismus
Granzym B	V450	GB11	IgG1 k	Maus
IFNγ	FITC	4S.B3	IgG1 k	Maus
IgD	PE-Cy7	IA6-2	IgG2a k	Maus
IL2	PE	MQ1-17H12	IgG2a	Ratte
Ki-67	AlexaFluor 647	B56	IgG1 k	Maus
TNFα	V450	Mab 11	IgG1 k	Maus

4.1.5 Antigene

Tabelle 5 Antigene für Kurzzeitstimulation und Proliferations-Assay

Antigene	Firma, Firmensitz
Kontroll-Antigen für HSV- und VZV-Lysat	Virion/Serion, Würzburg
HSV-1/2-Lysat	Virion/Serion, Würzburg
SEB	Sigma-Aldrich, Steinheim
VZV-Lysat	Virion/Serion, Würzburg
VZV-Lysat (Proliferations-Assay)	AbD Serotec, Düsseldorf
VZV-gE Protein	GenWay, San Diego, USA
VZV-gE Protein	GlaxoSmithKline, London, Großbritannien
VZV-gE Peptide	Genome Identification Diagnostics GmbH, AID, Straßberg
VZV-gE Peptide (Swiss-Prot ID: P09259)	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein (Swiss-Prot ID: P0DTC2)	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
SARS-CoV-2 NCAP (Swiss-Prot ID: P0DTC9)	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
SARS-CoV-2 VME1 (Swiss-Prot ID: P0DTC5)	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin

4.1.6 UV-inaktivierte Virusstämme

Die in Tabelle 6 gelisteten UV-inaktivierten Virusstämme wurden als Stocklösung von Dr. Marek Widera im Rahmen einer Kollaboration zur Verfügung gestellt (TOPTAN et al., 2020; WIDERA et al., 2021; WILHELM et al., 2022).

Tabelle 6 UV-inaktivierte SARS-CoV-2 Virusstämme für Neutralisationstests und zur Quantifizierung Spike-spezifischer T-Zellen durch Kurzzeitstimulation

SARS-CoV-2 Isolate	GenBank ID
Wildtyp (SARS-CoV-2 B.1 FFM7/2020)*	MT358643
Alpha (SARS-CoV-2 B1.1.7 FFM-UK7931/2021)	MZ427280.1
Beta (SARS-CoV-2 B1.1.7 FFM-ZAF/2021)	MW822592
Delta (SARS-CoV-2 B1.617.2 FFM-IND8424/2021)	MZ315141
BA.1 (B.1.1.529 FFM-SIM0550/2021 (EPI_ISL_6959871)	OL800702

MATERIAL UND METHODEN

SARS-CoV-2 Isolate	GenBank ID
BA.2 (BA.2 FFM-BA.2-3833/2022)	OM617939
*als Wildtyp wurde die Variante FFM7 verwendet, welche bis auf eine Mutation (D614G) dem ursprünglich isolierten Wildtyp entspricht.	

4.1.7 Medikamente für *in vitro* Versuche

Tabelle 7 Verwendete Medikamente für in-vitro Versuche zur Untersuchung des Einflusses auf VZV-spezifische Immunantwort

Medikament (Handelsname)	Hersteller, Firmensitz
Abatacept (Orencia)	Bristol-Myers Squibb, München
Adalimumab (Humira)	AbbVie, Wiesbaden
Cyclosporin A (Sandimmun)	Novartis, Nürnberg
Etanercept (Enbrel)	Pfizer, Berlin
Methylprednisolon	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rituximab (MabThera)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Tacrolimus (FK506)	Astellas, München
Tocilizumab (RoActemra)	Chugai, Frankfurt
Tofacitinib (Xeljanz)	Pfizer, Berlin

4.1.8 Software

Tabelle 8 Für die Arbeit verwendete Software

Software	Anwendung	Hersteller/Firmensitz
BioRender	Grafikerstellung	BioRender, Toronto (Kanada)
BD FACSDiva Software V.6.1.3	Analyse und Auswertung von durchflusszytometrischen Daten	BD Biosciences, Heidelberg
Flow Jo v10.8.0	Auswertung von FACS-Daten	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism 8/9/10	Statistik und Grafik	GraphPad, La Jolla (USA)
Microsoft Access 2016	Datenverwaltung	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft Excel 2016	Datenverarbeitung	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft PowerPoint 2016	Präsentation	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft Word 2016	Textverarbeitung	Microsoft, Redmond (USA)
EndNote X8/X9	Literaturverwaltung	Clarivate Analytics, Philadelphia (USA)
WorkOut Software 2.5	Analyse und Auswertung von ELISA-Daten	Dazdaq LTD, Brighton (England)

4.2 Probandenkollektive

4.2.1 Probandenkollektiv zur Analyse der VZV-spezifischen Immunantwort nach Impfung mit HZ/su

Zur Untersuchung der VZV-spezifischen Immunantwort nach Impfung mit HZ/su liegt ein Ethikvotum der Ärztekammer des Saarlandes (27/19) vor. Alle Probanden wurden im Vorfeld ausführlich aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an den Untersuchungen. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arztpraxis Dr. Sarah Leyking, der Heimdialyse Homburg e.V. und der Heimdialyse St. Wendel im Zeitraum von Juni 2019 bis Januar 2022. Zur Bestimmung von Impfreaktionen wurde von den Probanden ein Impftagebuch über einen Zeitraum von 7 Tagen nach beiden Impfungen geführt. Es wurden Blutproben von 39 Immungesunden sowie 29 Dialysepatienten für diese Studie untersucht. Insgesamt wurden pro Blutentnahme 2x 9 ml Lithium-Heparin-Blut, 1x 4,7 ml Serum-Blut und 1x 4,7 ml EDTA-Blut abgenommen. Die Blutentnahmen wurden zu den Zeitpunkten vor (pre v1, pre v2) und zwei Wochen nach beiden Impfungen (post v1, post v2) durchgeführt. Zudem wurde eine Verlaufsmessung 9 Monate nach der zweiten Impfung, was in etwa den Zeitpunkt 12 Monate nach erster Impfung entspricht, durchgeführt (Follow-up, Abbildung 5).

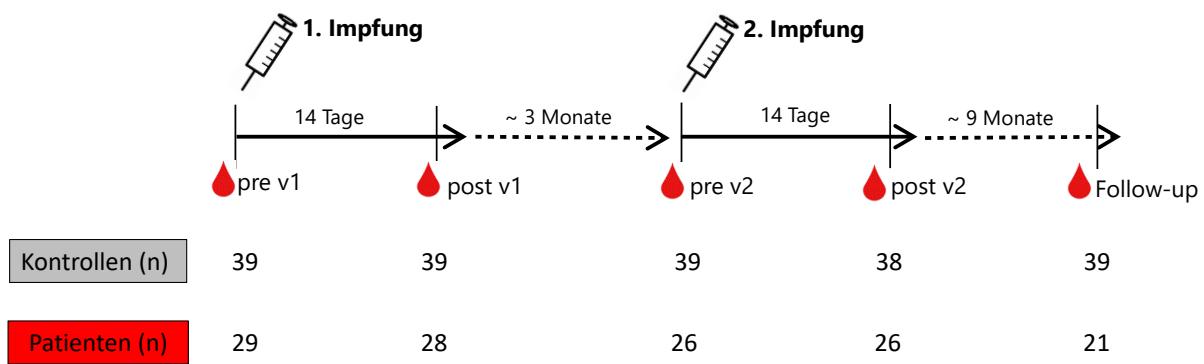


Abbildung 5 Zeitlicher Ablauf der Blutentnahmen zur Untersuchung der VZV-spezifischen Immunantwort.
Die Blutentnahmen erfolgten vor beiden Shingrix-Impfungen sowie zwei Wochen danach. Eine Abschlussmessung erfolgte etwa 9 Monate nach der zweiten Impfung. Der Abstand zwischen beiden Impfungen betrug etwa 3 Monate.

Die Patienten waren seit mindestens 6 Monaten an der Dialyse und die Blutentnahme erfolgte vor der jeweiligen Dialysesitzung. Eine Patientin erhielt eine Apherese-Therapie, alle anderen Patienten waren an der Hämodialyse. Die ursächlichen Erkrankungen, die bei den Patienten zur Dialyse führten, sind in Tabelle 9 aufgelistet.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 9 Zugrunde liegende Erkrankungen der Dialysepatienten

Zugrundeliegende Erkrankungen	n (%)
Chronische Glomerulonephritis	4 (13,8)
Hereditäre Nephropathie	4 (13,8) ^{\$}
Urologische Nephropathien (obstruktiv, Nephrektomie)	4 (13,8)
Diabetische Nephropathie	6 (20,7)
Hypertensive/vaskuläre Nephropathie	6 (20,7)
Andere	5 (17,2) [#]

^{\$}einschl. autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung; [#] eine Patientin mit Lipidapherese.

4.2.2 Probandenkollektiv zur Analyse der Immunantwort nach Impfung mit NVX-CoV2373

Für die Untersuchung der NVX-CoV2373 induzierten Immunantwort wurden 29 immungesunde Probanden rekrutiert. Die Rekrutierung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Impfzentrum Neunkirchen und dem betriebsärztlichen Dienst des Universitätsklinikums des Saarlandes (Frau Christina Baum). Für die Untersuchungen wurden 1x 4,7 ml Lithium-Heparin-Blut und 1x 4,7 ml EDTA-Blut abgenommen. Die Blutentnahmen fanden vor erster Impfung sowie zwei Wochen nach erster und zweiter Impfung statt. Zudem wurden Verlaufsmessungen 3 und 6 Monate nach der zweiten Impfung durchgeführt. 4 Probanden waren bereits vor der ersten Impfung mit SARS-CoV-2 infiziert. Die restlichen Probanden hatten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses keine vorherige Infektion. Bei Probanden, die im zeitlichen Verlauf der Untersuchung eine SARS-CoV-2-Infektion durchgemacht haben, wurde 14 bis 30 Tage nach Feststellung der Infektion ebenfalls Blut abgenommen und untersucht (Abbildung 6A). Für die Untersuchung der Immunogenität verschiedener SARS-CoV-2-Impfstoffe wurden Daten 13 bis 18 Tage nach der zweiten Impfung von 22 NVX-CoV2373 geimpften Personen alters- und geschlechtsangepasst mit 22 BNT162b2 (Biontech) und 22 mRNA-1273 (Moderna) geimpften Probanden verglichen (Abbildung 6B). Die Probanden aus den mRNA-Impfregimen wurden bereits im Rahmen vorheriger Projekte unserer Arbeitsgruppe rekrutiert. An den Analysen der Proben war ich ebenfalls beteiligt (KLEMIS et al., 2022; SCHMIDT et al., 2021a). Ein Ethikvotum der Ärztekammer des Saarlandes (76/20 inklusive Ergänzungen) liegt vor und alle Probanden wurden im Vorfeld ausführlich aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an den Untersuchungen.

MATERIAL UND METHODEN

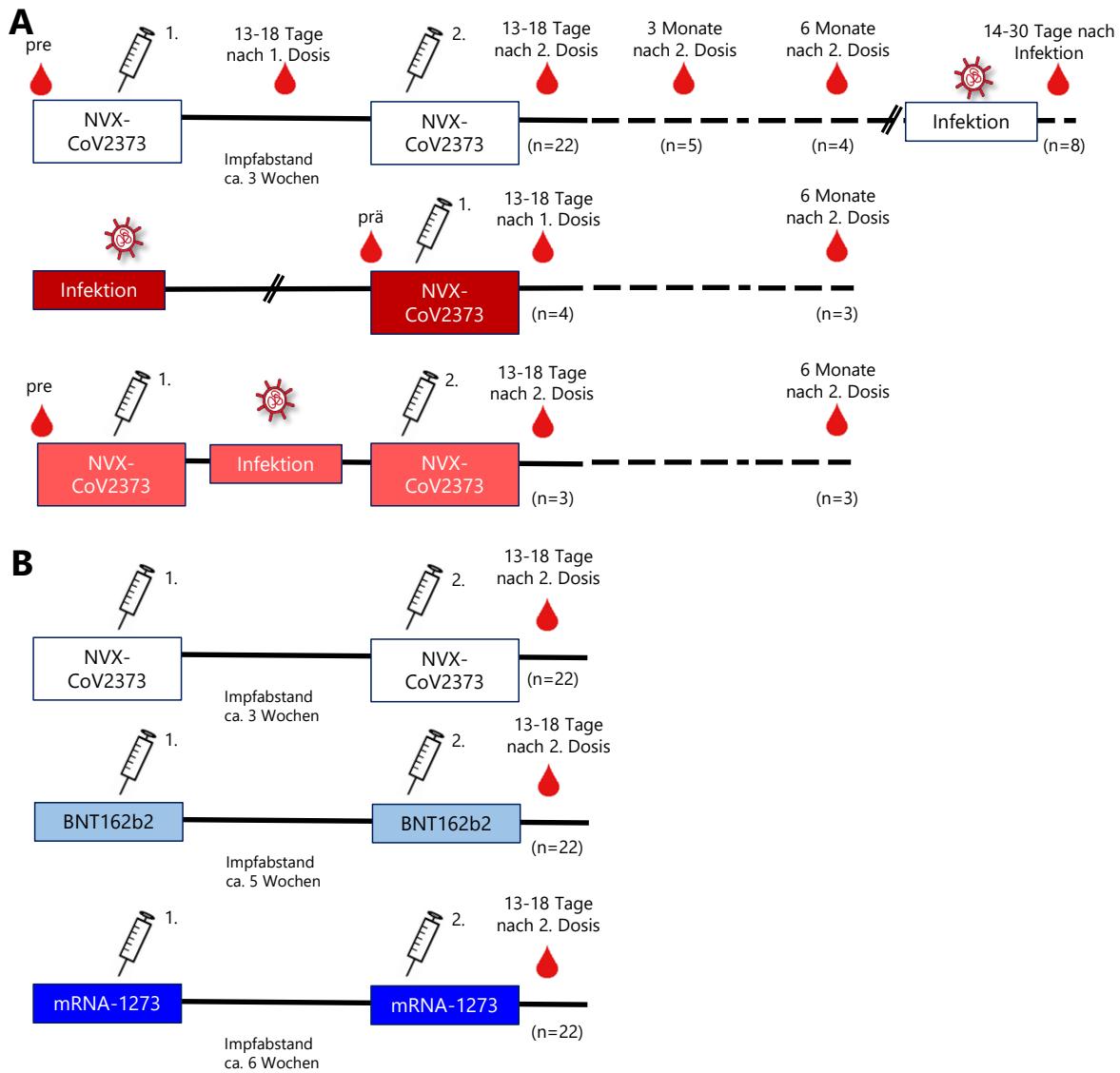


Abbildung 6 Studiendesign zur Untersuchung der NVX-CoV2373 induzierten Immunität (A) Einfluss von SARS-CoV-2-Infektionen auf die Immunität NVX-CoV2373 geimpfter immungesunder Probanden im zeitlichen Verlauf. **(B)** Vergleich der impfinduzierten Immunität des proteinbasierten Impfstoffes NVX-CoV2373 mit den beiden mRNA-Impfstoffen BNT162b2 und mRNA-1273 nach der 2. Impfdosis bei immungesunden Menschen.

4.3 Quantifizierung und Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen mittels Kurzzeitstimulation

Zur Quantifizierung und Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen werden Lymphozyten im heparinisierten Vollblut durch die Zugabe von Antigenen stimuliert. Dabei wird die Stimulation der T-Zellen durch das Hinzufügen von kostimulatorischen Antikörpern unterstützt. Die Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und als Peptide auf den MHC-Molekülen präsentiert. Sobald T-Zellen den Peptid-MHC-Komplex erkennen, erfolgt ihre Aktivierung. Dies führt zur Expression von

MATERIAL UND METHODEN

Aktivierungsmarkern wie CD69 auf der Zelloberfläche sowie zur Produktion und Sekretion verschiedener Zytokine wie IFN γ , IL-2 und TNF α . Durch die Zugabe des Sekretionsinhibitor Brefeldin A (BFA) wird der retrograde Export der Zytokine über die Transportvesikel vom Golgi zum ER gestoppt, wodurch die Zytokine nicht mehr sezerniert werden und intrazellulär akkumulieren. Dies ermöglicht später eine intrazelluläre Analyse der Zytokine im Durchflusszytometer. Nach der Inkubation werden Erythrozyten lysiert und die Leukozyten fixiert. Um intrazelluläre Moleküle untersuchen zu können, werden die Zellen permeabilisiert und anschließend mit Fluorchrom-gekoppelten Antikörpern behandelt. Die gebundenen Antikörper können mittels Durchflusszytometrie detektiert werden.

4.3.1 Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen

Zur Untersuchung SARS-CoV-2-spezifischer T-Zellen mit einem Färbeansatz wurden 225 μ l heparinisiertes Vollblut verwendet. Für die Untersuchung der VZV-spezifischen T-Zell-Antwort wurden 450 μ l bei zwei Färbungen und 600 μ l Vollblut bei drei Färbungen verwendet. Die Stimulation erfolgte mit 1 μ g/ml anti-CD28 und anti-CD49d (kostimulatorische Antikörper) und Zugabe der spezifischen Antigene in der entsprechenden Konzentration (Tabelle 10). Für die in der Arbeit verwendeten Antigene von JPT und GSK wurde DMSO 1:10 verdünnt in PBS als Negativkontrolle genutzt. Sowohl VZV- als auch HSV-Lysate stammen aus infizierten Fibroblasten, weshalb Lysat von nicht infizierten Fibroblasten als Negativkontrolle verwendet wurde. *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) diente als Positivkontrolle. SEB zählt zu den Superantigenen, welches an MHC-Moleküle der APCs und an spezifische V β -Regionen von T-Zell-Rezeptoren (TCR) bindet, wodurch eine polyklonale Stimulation der T-Zellen hervorgerufen wird. Nach Durchmischung der Proben, wurden die Röhrchen aufrechtstehend und mit leicht angeschraubtem Deckel für 6 h bei 37° C und 5 % CO $_2$ im Brutschrank inkubiert, um einen optimalen Gasaustausch zu gewährleisten. Nach 2 h Inkubation wurden 10 μ g/ml BFA hinzugegeben, wodurch die Sekretion der produzierten Zytokine gehemmt wurde. Anschließend wurden die Ansätze für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 10 Antigene und deren Menge, die zur VZV- oder SARS-CoV-2 spezifischen Stimulation eingesetzt wurde

Antigen	Lösungsmittel	Menge / ml Vollblut
VZV- und HSV-spezifische Stimulation		
Kontroll-Lysat (Negativkontrolle)	H ₂ O dest.	32 μ l

MATERIAL UND METHODEN

DMSO, 1:10 in PBS verdünnt (Negativkontrolle)		56 µl, 0,56 %
VZV-Lysat	H ₂ O dest.	32 µl
VZV-gE Protein (GSK)	PBS	10 µg
VZV-gE Protein (GenWay)	k.A.	10 µg
VZV-gE Peptide (JPT)	DMSO, 1:10 verdünnt in PBS	2 µg
VZV-gE Peptide (AID)	PBS	2 µg
SEB	H ₂ O dest.	2,5 µg
HSV-Lysat	H ₂ O dest.	32 µl
SARS-CoV-2 spezifische Stimulation		
DMSO, 1:10 in PBS verdünnt (Negativkontrolle)		64 µl, 0,64 %
Spike Glycoprotein Peptide (JPT)	DMSO, 1:10 verdünnt in PBS	2 µg
NCAP Peptide (JPT)	DMSO, 1:10 verdünnt in PBS	2 µg
VME1 Peptide (JPT)	DMSO, 1:10 verdünnt in PBS	2 µg
Wildtyp/FFM7	MEM	100 µl
Alpha	MEM	100 µl
Beta	MEM	100 µl
Delta	MEM	100 µl
BA.1	MEM	100 µl
BA.2	MEM	100 µl
MEM (Negativkontrolle)	MEM	100 µl

4.3.2 Lyse von Erythrozyten und Fixierung der Leukozyten

Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 µl/ml 20 mM Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), welches als Chelator Zell-Zell-Interaktionen sowie an der Gefäßwand haftende Zellen löst. Die Proben wurden anschließend 10 s mittels Vortex kräftig durchmischt und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Um die Erythrozyten zu lysieren und die Lymphozyten zu fixieren, wurden die Proben mit 9 ml Lysinglösung pro ml Vollblut versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 353 g für 7 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und das Zellpellet durch Ziehen der Röhrchen über ein Gitter gelöst. Die Proben wurden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut bei 353 g für 7 min abzentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert. Das Volumen richtete sich nach der Anzahl der verschiedenen Färbungen. Pro Färbe-Ansatz wurden 200 µl FACS-Puffer zur Zellsuspension gegeben. Die Proben wurden bis zur Färbung für maximal 3 Tage im Kühlschrank bei 4° C gelagert.

4.3.3 Färbungen zur durchflusszytometrischen Analyse

Um die Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie analysieren zu können, werden die fixierten Proben mit Fluorochrom-gekoppelten, monoklonalen Antikörpern behandelt. Dadurch können sowohl Oberflächenmarker als auch intrazellulare Moleküle nachgewiesen werden.

4.3.3.1 Intrazelluläre Färbung

Nach der Stimulation und Fixierung der Proben wurden pro Färbung 200 µl der Zellsuspension mit 2 ml Saponin-Puffer versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von Saponin wurden die Zellen permeabilisiert, wodurch die Antikörper ins Zellinnere gelangen konnten. Nach der Inkubation mit Saponin-Puffer wurden die Proben bei 353 g für 7 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes, wurden die Proben mit 50 µl Saponin-haltigem Antikörpermisch (Tabelle 11) versetzt und für 30 bis 45 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch Zugabe von 3 ml FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 353 g für 7 min entfernt. Nach Absaugen der Überstände wurden die Proben in 150 µl 1 % Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Tabelle 11 Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten intrazellulären Färbe-Ansätze

Antikörper	Fluorochrom	Färbung 1 Menge [µl]	Färbung 2 a Menge [µl]	Färbung 2 b Menge [µl]
CD4	APC-H7	1,50		
	APC		0,5	0,5
CD69	PE-Cy7	1,50		
	PerCP		2	2
CD8	PerCP	4,00		
IFNγ	FITC	0,50	0,5	0,5
IL2	PE	3,00/4,00*		
TNFα	V450	1,00		
CTLA-4	APC	2,00		
CD45R0	PE-CY7		1,25	1,25
CD27	V450		2,5	2,5
CD39	PE		3	
CD62L	PE			8
SAP 5%		1,00	1	1
FACS-Puffer		35,50/34,50*	39,25	34,25
Gesamt		50	50	50

*Zur Untersuchung SARS-CoV-2 spezifischer T-Zellen wurde nur Färbung 1 durchgeführt, wobei eine größere Menge des IL-2 Antikörpers eingesetzt und entsprechend das Volumen an FACS-Puffer verringert wurde.

4.3.3.2 Intranukleäre Färbung

Um die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 zu untersuchen, ist es notwendig diesen intranuklear anzufärben. Für diese Untersuchung wurde von 5 gesunden Probanden zu den verschiedenen Zeitpunkten eine intranukleäre Färbung durchgeführt. Hierfür wurden 200 µl Zellsuspension mit 1 ml FIX/PERM versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Permeabilisierungspuffer hinzugefügt und die Proben für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Proben mit Antikörper-Gemisch (Tabelle 12) versetzt und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden 2 ml Permeabilisierungspuffer hinzugefügt und die Proben 7 min bei 353 g zentrifugiert. Abschließend wurden die Proben mit 150 µl 1 % PFA versetzt und durchflusszytometrisch untersucht.

Tabelle 12 Antikörper-Gemisch zur intranukleären Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki-67

Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
CD4	PE-Cy7	1,5
CD27	PE	2
IFNy	FITC	0,5
CD8	PerCP	4
Ki-67	APC	1
Granzym B	V450	2
Permeabilisierungspuffer (eBiosciences)		39
Gesamt		50

4.4 Oberflächenfärbung zur Charakterisierung von B- und T-Zellsubpopulationen

Zur Untersuchung von B- und T-Zellsubpopulationen werden die Immunzellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen Oberflächenmarker gefärbt. Anhand der Expression charakteristischer Oberflächenmarker können die Zellsubtypen im Durchflusszytometer identifiziert werden.

Für die Untersuchung der Antigen-unabhängigen Immunreaktion nach HZ/su-Impfung wurden zwei Färbungen, wie zuvor beschrieben, durchgeführt (SCHOCH et al., 2017). Zum einen wurden die T-Zellsubpopulationen und insbesondere die follikulären T-Helferzellen sowie der Differenzierungsstatus betrachtet (Tabelle 13). Zum anderen erfolgte die Analyse der B-Zellsubpopulation einschließlich Plasmablasten (Tabelle 14). Für die Antigen-unspezifische Immunreaktion nach Impfung gegen COVID-19 wurden die Proben bezüglich ihrer B- und T-Zellsubpopulationen in einer Färbung untersucht (

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 15). Pro Färbung wurde jeweils 100 µl heparinisiertes Vollblut verwendet, das zunächst mit 500 µl (unsterilem) RPMI-Medium versetzt und bei 353 g für 10 min zentrifugiert wurde. Der Waschschnitt war notwendig, da freies IgD oder CD27 im Plasma die für die Färbung verwendeten Antikörper binden könnten und diese dadurch nicht mehr zur Bindung an den Oberflächenmolekülen der Lymphozyten zur Verfügung ständen und damit auch nicht in der Messung detektiert wären. Um dabei ein Absaugen des Zellpellets zu verhindern, wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Antikörper-Lösung und die Proben wurden für 25 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden die Proben anschließend mit 2 ml Lysinglösung versetzt und nochmals für 10 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben bei 353 g für 7 min zentrifugiert und der Überstand wurde absaugt. Die Proben wurden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut bei 353 g für 7 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Proben in 150 µl 1 % PFA resuspendiert und durchflusszytometrisch gemessen.

Tabelle 13 Antikörper- Gemisch zur Analyse follikulärer T-Helferzellen nach HZ/su-Impfung

Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
CD4	APC-H7	1
CD8	V500	1
CD45RO	PE-Cy7	1,25
CD27	FITC	4
CXCR5	PerCP-Cy5.5	1
ICOS/CD278	PE	5
PD1	APC	5
Gesamt		18,5

Tabelle 14 Zusammensetzung Antikörper-Gemisch zur Analyse von B-Zell-Subpopulationen nach HZ/su-Impfung

Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
CD19	FITC	2,5
IgD	PE-Cy7	3
CD27	APC	0,5
CD38	PE	5
CD3	PerCP	4
Gesamt		15

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 15 Zusammensetzung Antikörper-Gemisch zur Untersuchung von B- und T-Zellsubpopulationen nach SARS-CoV-2 Impfung

Antikörper	Fluorochrom	Menge [μ l]
CD19	FITC	2,5
IgD	PE-Cy7	3
CD27	APC	0,5
CD38	PE	5
CD3	PerCP	4
CD4	APC-H7	1
CD8	V500	1
Gesamt		17

4.5 Proliferations-Assay

Durch Antigen-spezifische Aktivierung können T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden. Neben der Analyse der Ki-67-Expression wurde in dieser Arbeit auch die VZV-spezifische Proliferationsfähigkeit von CD4 und CD8 T-Zellen mittels Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE)-Proliferations-Assay untersucht. Hierfür werden wie zuvor beschrieben frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) mit Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFDA-SE) gefärbt (SESTER et al., 2008). Der membran durchlässige Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE wird intrazellular durch Esterasen zu CFSE gespalten, wodurch der Farbstoff nicht mehr aus der Zelle dislozieren kann. Bei jeder Zellteilung halbiert sich die Konzentration des Farbstoffs, was später in der Durchflusszytometrie detektiert werden kann (QUAH et al., 2007). Die Arbeitsschritte werden soweit möglich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zellkulturmedien und Lösungen werden vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

4.5.1 Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolierung von PBMCs aus Vollblut erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll-Gradienten. Hierfür wurden in einem 50 ml Reaktionsröhren 8 bis 9 ml heparinisiertes Vollblut mit PBS-0,02 % EDTA auf 35 ml aufgefüllt und gemischt. Anschließend wurde das Gemisch mit 13 ml Ficoll vorsichtig unterschichtet. Durch die nachfolgende Zentrifugation bei 1306 g für 20 min ohne Bremse kam es zur Auftrennung der Blutbestandteile in einzelne Schichten. Aufgrund ihrer geringen Dichte lagern sich Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Röhrens als rote Schicht ab. Darüber befindet sich die Ficoll-Schicht. Monozyten und Lymphozyten besitzen eine höhere Dichte und bilden daher eine

MATERIAL UND METHODEN

Intermediärschicht zwischen Ficoll und dem Plasma, welches zusammen mit Thrombozyten die oberste Schicht bildet. Nach der Zentrifugation wurden die PBMCs in der Intermediärschicht vorsichtig mit einer 5 ml serologischen Pipette abgesaugt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Da die Ficoll-Lösung einen zytotoxischen Effekt besitzt, wurden die PBMCs gewaschen. Hierfür wurde die Zellsuspension mit PBS-0,02 % EDTA auf 50 ml aufgefüllt und bei 677 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde durch Ziehen über ein Metallgitter gelockert. Das Röhrchen mit der Zellsuspension wurde erneut mit PBS-0,02 % EDTA auf 30 ml aufgefüllt und gewaschen. Nach der Zentrifugation bei 301 g für 10 min wurde der Überstand entfernt und das Pellet erneut resuspendiert.

4.5.2 Färben der PBMCs mit CFDA-SE und Kultivierung der Zellen

Die isolierten PBMCs wurden in 1 ml PBS-0,1% humanes Serum Albumin (HSA) resuspendiert und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden die PBMCs mit 10 mM CFDA-SE in PBS-0,1 % HSA inkubiert, wobei nach der Zugabe des CFDA-SE darauf geachtet wurde, dass die Proben stets dunkel standen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation der Zellen bei 37 °C auf dem Rollschüttler. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 11 ml Markierungsmedium abgestoppt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 353 g für 10 min. Nach Abkippen des Überstandes und Lösen des Zellpellets wurden die Zellen mit 13 ml Markierungsmedium für 5 min bei 37 °C auf dem Rollschüttler gewaschen. Die Zellen wurden danach bei 353 g für 10 min zentrifugiert. Der Waschschnitt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach Entfernen des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets wurden die Zellen in 2 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl Zellsuspension 1:10 in 3 % Essigsäure verdünnt, wodurch die Erythrozyten lysiert wurden, und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Für den Proliferations-Assay wurden pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte 600.000 PBMCs eingesetzt. Um die exakte Zellzahl einzustellen, wurde die Zellsuspension bei 353 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und die Zellen mit dem berechneten Volumen an Wachstumsmedium resuspendiert. Es wurden 30 µl Zellsuspension und 30 µl Antigenansatz (Tabelle 16) möglichst blasenfrei in die Vertiefungen einer 96-Loch Platte mit Flachboden pipettiert. Aus technischen Gründen wurde ein anderes VZV-Lysat als in der Antigen-spezifischen Kurzzeitstimulation verwendet, für welches gezeigt wurde, dass es über einen längeren Zeitraum nicht toxisch auf die Zellen wirkt. Zudem wurde eine Vertiefung freigehalten, da Zellen, welche mit SEB stimuliert wurden, aufgrund der stärkeren Proliferation zu einem

MATERIAL UND METHODEN

späteren Zeitpunkt gesplittet werden mussten. Je zwei an die Proben angrenzende Reihen wurden mit jeweils 200 µl sterilem PBS aufgefüllt, um eine Verdunstung der Proben zu verhindern. Die Platte wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ in Brutschrank inkubiert.

Tabelle 16 Verwendete Antigene für Proliferations-Assay

Antigen	Menge / ml Vollblut
Kontroll-Antigen (MEWO-Lysat, Negativkontrolle)	1,46 mg
VZV-Lysat (AbD Serotec)	1,46 mg
DMSO, 1:10 in PBS verdünnt (Negativkontrolle)	0,56 %
VZV-gE Peptid-Mix, 1:10 in PBS verdünnt	2 µg
VZV-gE Protein	10 µg
SEB	2,5 µg

Am Folgetag wurden die Vertiefungen, welche das Zell-Antigen-Gemisch enthielten, mit 240 µl vorgewärmten Wachstumsmedium aufgefüllt, wodurch sich ein Gesamtvolumen von 300 µl pro Vertiefung ergab. Aufgrund ihrer starken Proliferation mussten die mit SEB stimulierten Zellen, welche als Positivkontrolle dienten, nach 3 bis 4 Tagen 1:1 gesplittet werden, um das bereits verbrauchte Medium auszutauschen. Hierfür wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und 150 µl der Zellsuspension in eine neue Vertiefung überführt. Anschließend wurden beide Vertiefungen mit 150 µl Wachstumsmedium aufgefüllt.

4.5.3 Zellernte und Messung der PBMCs

Nach 7-tägiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurden zunächst 150 µl des Überstandes entnommen und bei -80 °C eingefroren. Danach wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und die Zellsuspension wurde in ein Durchflusszytometer-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Vertiefungen zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und die Suspensionsmengen in einem Durchflusszytometer-Röhrchen vereint. Durch die Zugabe von 100 µl/ml 20mM EDTA wurden die Zell-Zell-Interaktionen gelöst. Die Röhrchen wurden 10 s gemischt und dann für 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe von 2 ml FACS-Puffer wurden die Proben bei 353 g für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit dem Antikörper-Gemisch versetzt (Tabelle 17) und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 ml FACS-Puffer und Zentrifugation für 10 min bei 353 g, wodurch das

MATERIAL UND METHODEN

überschüssige Antikörpermischung entfernt wurde. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Proben in 150 µl 1 % PFA aufgenommen und durchflusszytometrisch gemessen.

Tabelle 17 Zusammensetzung Antikörper-Gemisch zur Analyse VZV-spezifischer Proliferation von T-Zellen

Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
CD4	PE	4
CD8	PerCP	6
CD3	APC	1
FACS-Puffer		39
Gesamt		50

4.6 In vitro Versuche mit immunsupprimierenden Medikamenten

In dieser Arbeit wurden *in vitro* Versuche durchgeführt, bei denen Blutproben von gesunden Probanden nach der zweiten HZ/su-Impfung mit verschiedenen Medikamenten inkubiert wurden, um den Einfluss dieser Medikamente auf die VZV-spezifische Immunogenität zu untersuchen (Tabelle 18). Zum einen wurden die Immunsuppressiva Methylprednisolon, Cyclosporin A und Tacrolimus eingesetzt, welche bei Transplantierten als Immunsuppressiva zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung verabreicht werden. Weiterhin wurden Abatacept, Adalimumab, Etanercept, Rituximab, Tocilizumab und Tofacitinib als repräsentative Medikamente gegen rheumatoide Erkrankungen verwendet. Die Medikamente wurden in drei verschiedenen Konzentrationen zu den Proben hinzugefügt, wobei die mittlere Konzentration dem maximalen Plasmaspiegel für jedes Medikament entspricht. Zudem wurde die 5-fach höhere und die 5-fach geringere Konzentration untersucht. Bei Methylprednisolon erfolgte die Abstufung in der 10-fach höheren und 10-fach niedrigeren Konzentration. Die Konzentrationsstufen wurden bereits in vorherigen Arbeiten etabliert (SCHUB, 2016). Die verwendeten Lösungsmittel H₂O dest. für Immunsuppressiva und EtOH für Rheuma-Medikamente dienten als Referenzwert.

Tabelle 18 Verwendete Medikamente, um deren Einfluss auf die VZV-spezifische Immunität zu untersuchen

Medikament	niedrige Konzentration [µg/ml]	mittlere Konzentration [µg/ml]	hohe Konzentration [µg/ml]
Cyclosporin A	0,16	0,8	4
Methylprednisolon	0,1	1	10
Tacrolimus (Antigen-spezifische Stimulation)	4	20	100
Tacrolimus (Proliferations-Assay)	0,8	4	20
Abatacept	30	150	750

MATERIAL UND METHODEN

Adalimumab	20	100	500
Etanercept	0,5	2,5	12,5
Rituximab	60	300	1500
Tocilizumab	60	300	1500
Tofacitinib	0,01	0,05	0,25

Für die Kurzzeitstimulation wurden die Medikamente in den Konzentrationen gering, mittel und hoch sowie das Lösemittel zu je 225 µl Vollblut pipettiert und für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der kostimulatorischen Antikörper sowie der VZV-gE Peptide als Antigen, 0,56 % DMSO als Negativkontrolle und SEB als Positivkontrolle. Der weitere Ablauf wurde wie zuvor beschrieben (Abschnitt 4.3) durchgeführt.

Zudem wurde der Einfluss von Immunsuppressiva auf die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen untersucht. Hierfür wurden PBMCs wie im Abschnitt 4.5 beschrieben isoliert, mit CFDA-SE gefärbt und die Zellzahl eingestellt. Von der Zellsuspension wurden 30 µl in die Vertiefungen pipettiert, das Antigen-Gemisch wurde auf ein Volumen von 20 µl eingestellt und hinzugefügt. Die drei verschiedenen Konzentrationen der Medikamente Methylprednisolon, Cyclosporin A und Tacrolimus wurden in 10 µl Volumen hinzu pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 60 µl ergab. Aufgrund der starken Reduktion der Proliferationsfähigkeit durch das Medikament (LASKIN et al., 2017) wurde bei Tacrolimus im Vergleich zur Kurzzeitstimulation geringere Konzentrationen eingesetzt, um eine Auswertung von verschiedenen Konzentrationsstufen zu ermöglichen. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten wie beschrieben.

4.7 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Charakterisierung der Immunzellen aus Vollblut und isolierten PBMCs wurde in der Arbeit die Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) genutzt. Bei dieser Methode können Immunzellen aufgrund ihrer zellulären Eigenschaften, sowie dem Vorhandensein von Fluoreszenzsignalen identifiziert werden. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen aus den Proben zunächst über einen Hüllstrom an der Mikrokapillare vereinzelt, sodass die Zellen nacheinander den Laserstrahl passieren. Das Laserlicht, welches auf die partikulären Strukturen trifft, wird in Abhängigkeit der äußeren und inneren Struktur der Zelle gestreut. Die Intensität des nach vorn abgelenkten Streulichts (*forward scatter, FSC*) gibt Aufschluss über die Größe der Zelle, während abgestrahltes Seitwärtslicht (*sideward scatter, SSC*) als Maß für die Zellgranularität dient (MCKINNON, 2018).

MATERIAL UND METHODEN

Dabei wird die Lichtintensität von verschiedenen im FACS-Gerät befindlichen Detektoren erkannt und quantifiziert. Dadurch können bei der Analyse der Blutproben Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterschieden werden (Abbildung 7, oberer Plot). Zusätzlich zu diesen Eigenschaften können die Zellen im Vorfeld mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern behandelt werden, um weitere Zellstrukturen zu charakterisieren und Zellsubtypen zu untersuchen. Die Antikörper können spezifisch an Oberflächenmoleküle wie CD4, CD8, CD69 oder nach Permeabilisierung der Zellmembran an intrazelluläre Moleküle binden. Im Durchflusszytometer wird die Energie des Laserlichts vom Fluoreszenzfarbstoff absorbiert und in einer für den Farbstoff charakteristischen Wellenlänge emittiert, die über ein Filtersystem zu den Detektoren geleitet und dort quantifiziert werden kann. Durch die charakteristischen Wellenlängen der Farbstoffe besteht die Möglichkeit mehrere Farbstoffe gleichzeitig einzusetzen und damit auch verschiedene Moleküle in einer Messung zu untersuchen (LUTTMANN et al., 2014).

4.8 Auswertung durchflusszytometrischer Messungen

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an zwei verschiedenen Geräten (BD Canto II und BD Lyric). Die anschließende Auswertung wurde mit der BD Diva Software (Version 6.1.3) bzw. FlowJo v10.8.0 durchgeführt. Die Darstellung der Messung erfolgte in Form von Dotplots, wobei jeder Punkt eine Zelle zeigt.

4.8.1 Auswertung von Oberflächenfärbungen

Bei allen Oberflächenfärbungen werden zunächst die Leukozyten-Subpopulationen anhand des SSC und FSC identifiziert. Dabei liegen Granulozyten aufgrund ihrer Größe und Granularität langgezogen im oberen Bereich des Dotplots. Monozyten besitzen eine ähnliche Granularität sind aber deutlich kleiner und daher unterhalb der Granulozyten lokalisiert. Wegen ihrer geringeren Größe und Granularität sind die Lymphozyten im linken unteren Bereich des Dotplots zu finden. Im Folgenden werden die Auswertestrategien zur Ermittlung der jeweiligen Zellpopulationen dargestellt.

Zur Untersuchung der T-Zellsubpopulationen werden innerhalb der Lymphozyten CD4 und CD8 T-Zellen identifiziert. Follikuläre T-Helferzellen (Tfh) werden innerhalb der CD4 T-Zellen als CXCR5⁺ identifiziert und anschließend auf die Expression von PD-1 und ICOS untersucht.

MATERIAL UND METHODEN

Zusätzlich wird der Differenzierungsstatus von CD4, CD8 und Tfh-Zellen mit Hilfe der Oberflächenmarker CD45RO und CD27 analysiert (Abbildung 7).

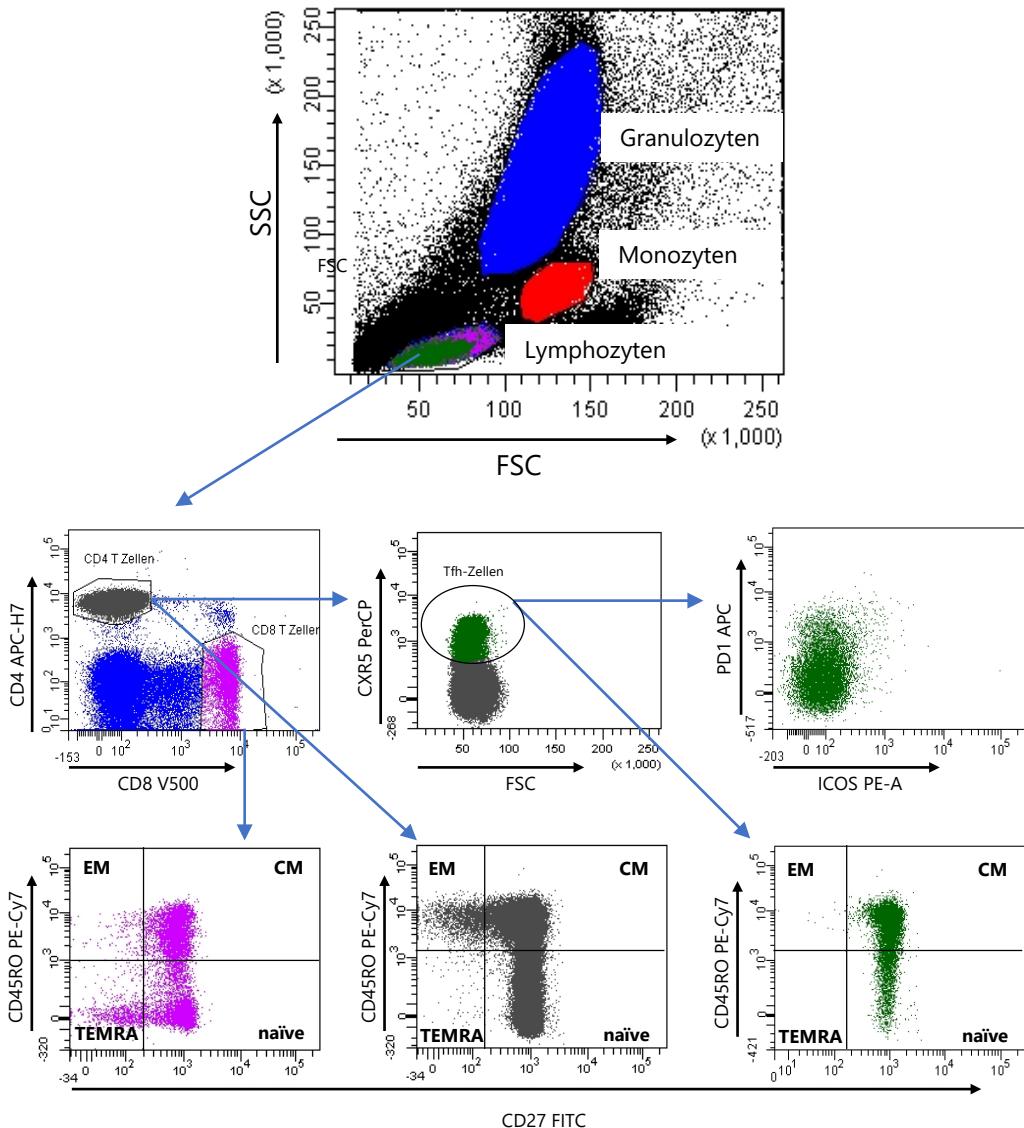


Abbildung 7 Auswertestrategie zur Analyse von T-Zell-Subpopulationen und follikulären T-Helferzellen nach durchflusszytometrischer Messung Lymphozyten werden durch FSC und SSC identifiziert. Innerhalb der Lymphozyten werden CD4 (grau) und CD8 T-Zellen (pink) dargestellt. Follikuläre T-Helferzellen (Tfh, grün) werden als CXCR5 positive CD4 T-Zellen identifiziert. Tfh-Zellen werden weiterhin auf die Expression der Marker PD-1 und ICOS analysiert. CD4, CD8 und Tfh-Zellen werden anhand der Expression von CD45RO und CD27 in naive, zentrale Gedächtnis- (CM), Effektor-Gedächtnis- (EM) und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-Zellen (TEMRA) eingeteilt (untere Reihe).

Für die Analyse der B-Zell-Subpopulationen erfolgt ausgehend von den Lymphozyten die Auftrennung von B-Zellen ($CD19^+CD3^-$) und T-Zellen ($CD3^+CD19^-$; Abbildung 8). Die B-Zellen werden bezüglich ihres Differenzierungsstatus mit Hilfe der Marker IgD und CD27 untersucht. Naive B-Zellen werden als IgD^+CD27^- , non switched memory B-Zellen als IgD^+CD27^+ und

MATERIAL UND METHODEN

switched memory B-Zellen als IgD⁻CD27⁺ identifiziert. Um die Plasmablasten zu identifizieren, wird parallel die gleiche Auswertestrategie durchgeführt (Abbildung 8, Mitte) mit dem Unterschied, dass das Lymphozyten-Gate größer gelegt wird, da die Plasmablasten weitflächiger verteilt sind. Die Plasmablasten werden innerhalb der *switched memory* B-Zell-Population als CD38⁺CD27⁺ identifiziert.

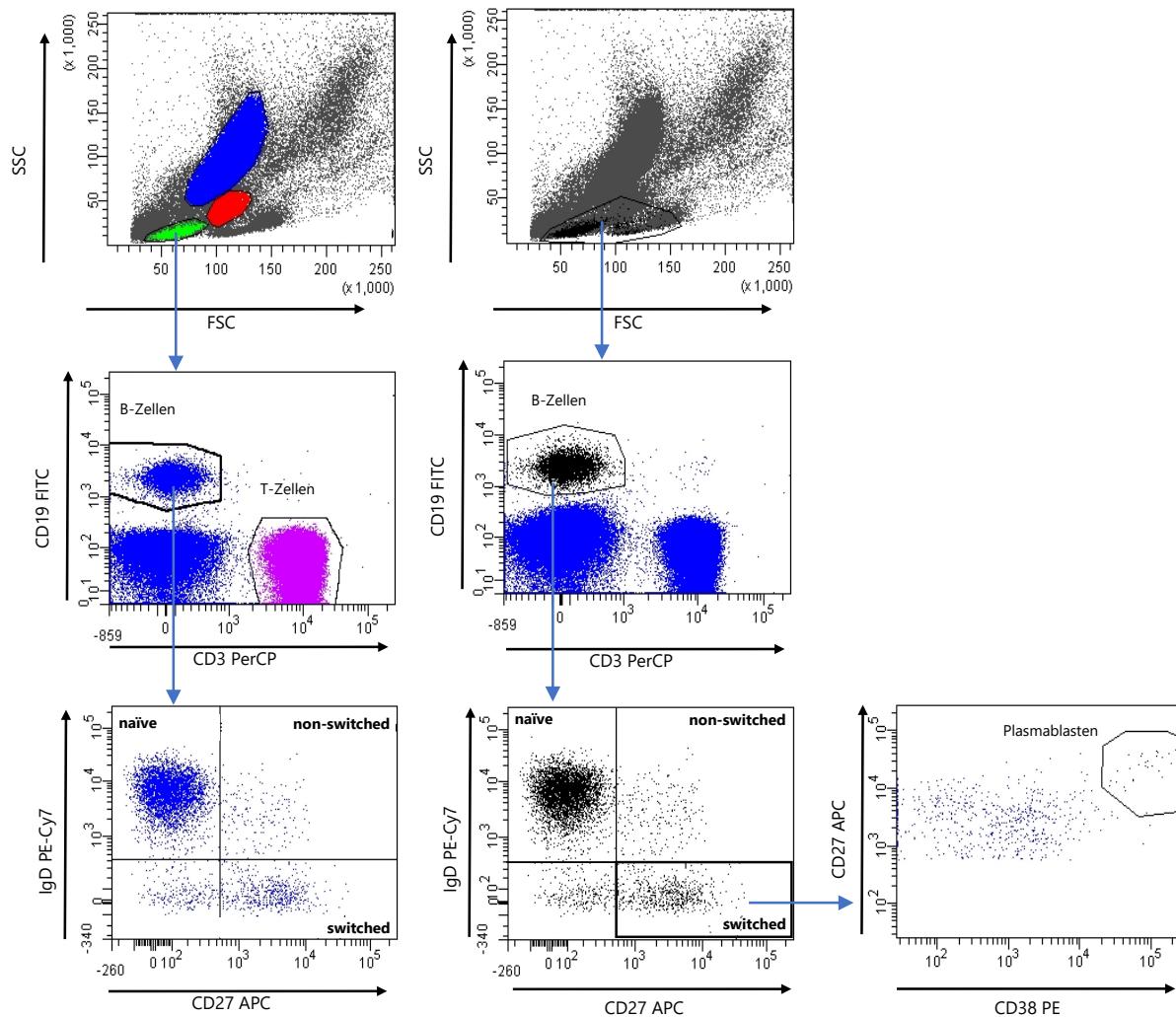


Abbildung 8 Auswertestrategie zur Untersuchung von B-Zell-Subpopulationen Nach Identifikation der Lymphozyten, erfolgt die Einteilung von B- und T-Zellen anhand der Marker CD19 und CD3. B-Zellen werden unter Verwendung von IgD und CD27 in naïve, non-switched und *switched memory* B-Zellen eingeteilt. Plasmablasten werden innerhalb der *switched memory* B-Zellen als CD38⁺ identifiziert.

4.8.2 Auswertung von intrazellulären Färbungen nach Kurzzeitstimulation

Für die Analyse wurden alle Proben eingeschlossen, in welchen mindestens 10000 CD4 T-Zellen detektiert wurden. Messungen mit einer Anzahl von 8000-10000 T-Zellen wurden lediglich eingeschlossen, wenn ausreichend reaktive T-Zellen detektiert wurden. Zur Untersuchung des

MATERIAL UND METHODEN

Antigen-spezifischen Zytokinprofils wurden nur Proben für die statistische Analyse genutzt, welche mindestens 30 CD69 positive T-Zellen nach Abzug der Negativkontrolle aufwiesen. Für die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 wurden Proben mit mindestens 20 CD69 positiven T-Zellen verwendet.

Zuerst werden die Lymphozyten mittels FSC und SSC dargestellt. Da aneinanderhaftende Zellen (Dubletten) falsche Signale erzeugen können, werden im nächsten Schritt, mittels FSC-Höhe und FSC-Fläche nur die einzelnen Lymphozyten charakterisiert. Zudem werden unspezifische Signale mit Hilfe des V500-Kanals ausgeschlossen. Anhand der eingeschlossenen Population werden CD4 und CD8 T-Zellen inklusive ihrer IFN γ Ko-Expression dargestellt, um beide Subpopulationen zu identifizieren. Da einige Zellen sowohl CD4 als auch CD8 exprimieren, werden im nächsten Schritt nur noch CD4 $^+$ CD8 $^-$ T-Zellen (Abbildung 9, rot, links) oder CD8 $^+$ CD4 $^-$ T-Zellen (Abbildung 9, blau, rechts) dargestellt. Anschließend werden die beiden T-Zellpopulationen bezüglich ihrer Ko-Expression von CD69 und IFN γ charakterisiert und die doppelt-positiven Zellen als Antigen-spezifische T-Zellen quantifiziert. Zusätzlich wird die Expression von IL-2 und TNF α jeweils zusammen mit der CD69 Expression dargestellt. Die Darstellung erfolgt zum einen mit IFN γ exprimierenden Zellen, zum anderen ohne. Anhand dieser Darstellungen können sieben Subpopulationen von Zytokin exprimierenden CD69 $^+$ T-Zellen identifiziert werden: IFN γ $^+$ TNF α $^+$; dreifach $^+$; IFN γ $^+$ einfach, IFN γ $^+$ IL-2 $^+$; TNF α $^+$ einfach; TNF α $^+$ IL-2 $^+$; IL-2 $^+$ einfach.

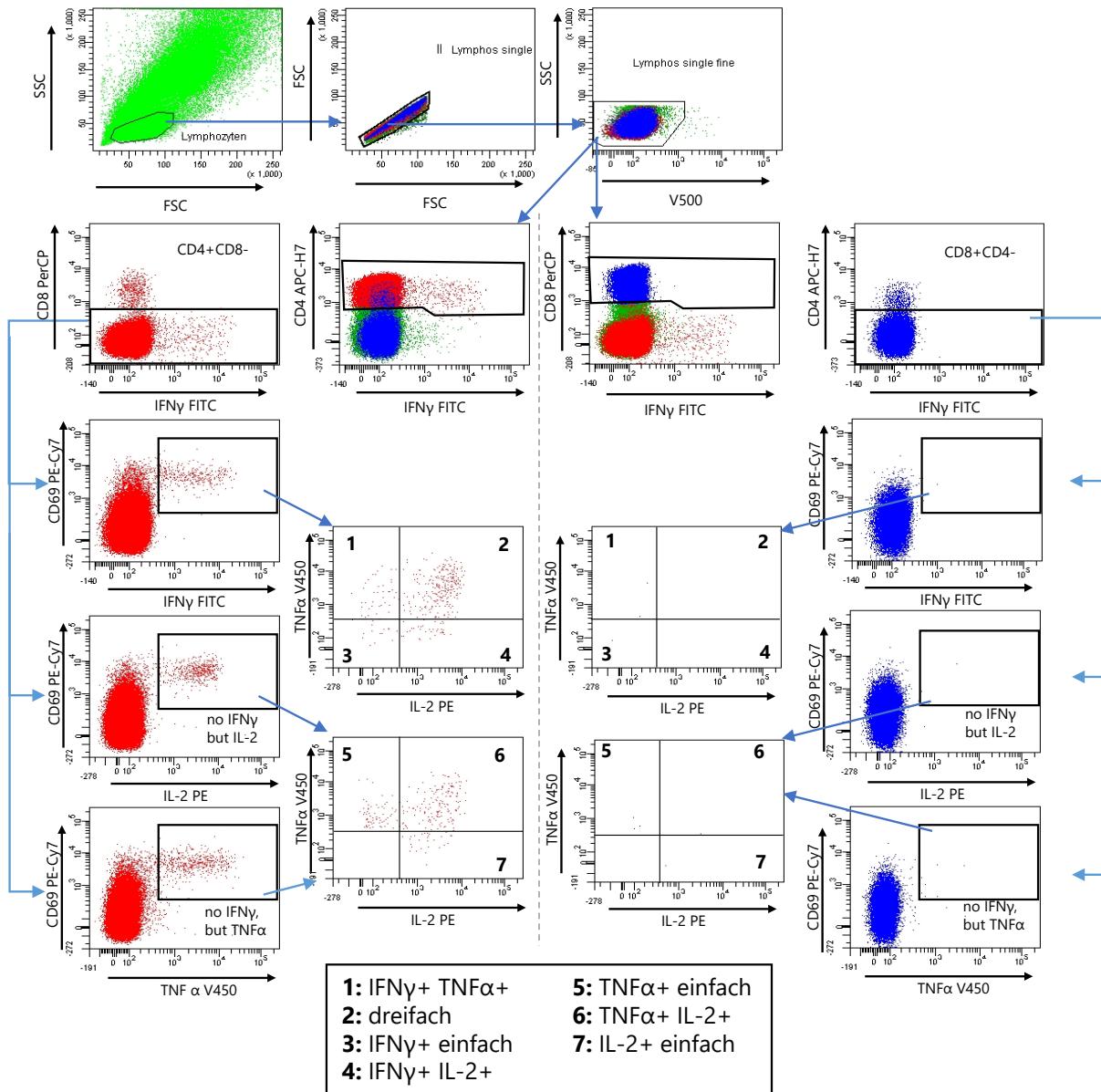


Abbildung 9 Auswertestrategie Zytokin produzierender Antigen-spezifischer T-Zellen Lymphozyten werden anhand von FSC und SSC detektiert. Im weiteren Schritt werden Dubletten ausgeschlossen. Anschließend werden Lymphozyten die ausschließlich CD4 oder CD8 exprimieren identifiziert. Antigenspezifische CD4 und CD8 T-Zellen werden durch die Ko-Expression von CD69 und IFN γ quantifiziert. Zusätzlich werden CD69 $^{+}$ T-Zellen bezüglich der Expression der Zytokine IL-2 und TNF α untersucht. Anhand der Zytokinexpressionsmuster können die T-Zellen in 7 Subpopulationen eingeteilt werden.

4.8.3 Auswertung des Differenzierungsstatus VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach intrazellulärer Färbung

Zur Untersuchung des Differenzierungsstatus VZV-spezifischer CD4 T-Zellen wurden zunächst die Lymphozyten-Population durch FSC und SSC dargestellt und die einzelnen Lymphozyten identifiziert (Abbildung 10). Innerhalb der Lymphozyten-Einzel-Subpopulation werden CD4 T-Zellen identifiziert. Danach wird der Differenzierungsstatus aller CD4 T-Zellen mit Hilfe der

MATERIAL UND METHODEN

Marker CD45RO und CD27 bestimmt. Dabei werden Effektor-Gedächtnis-Zellen (EM) als CD45RO⁺CD27⁻, zentrale Gedächtnis-Zellen (CM) als CD45RO⁺CD27⁺, naive Zellen als CD45RO⁻CD27⁺ und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-Zellen (TEMRA) als CD45RO⁻CD27⁻ definiert. Desweitern werden innerhalb der CD4 T-Zellen reaktive CD69⁺IFNy⁺ T-Zellen detektiert, welche dann wiederum bezüglich ihres Differenzierungsstatus eingeteilt werden. Zusätzlich wird in dieser Färbung die MFI von CD39 auf CD4 T-Zellen untersucht.

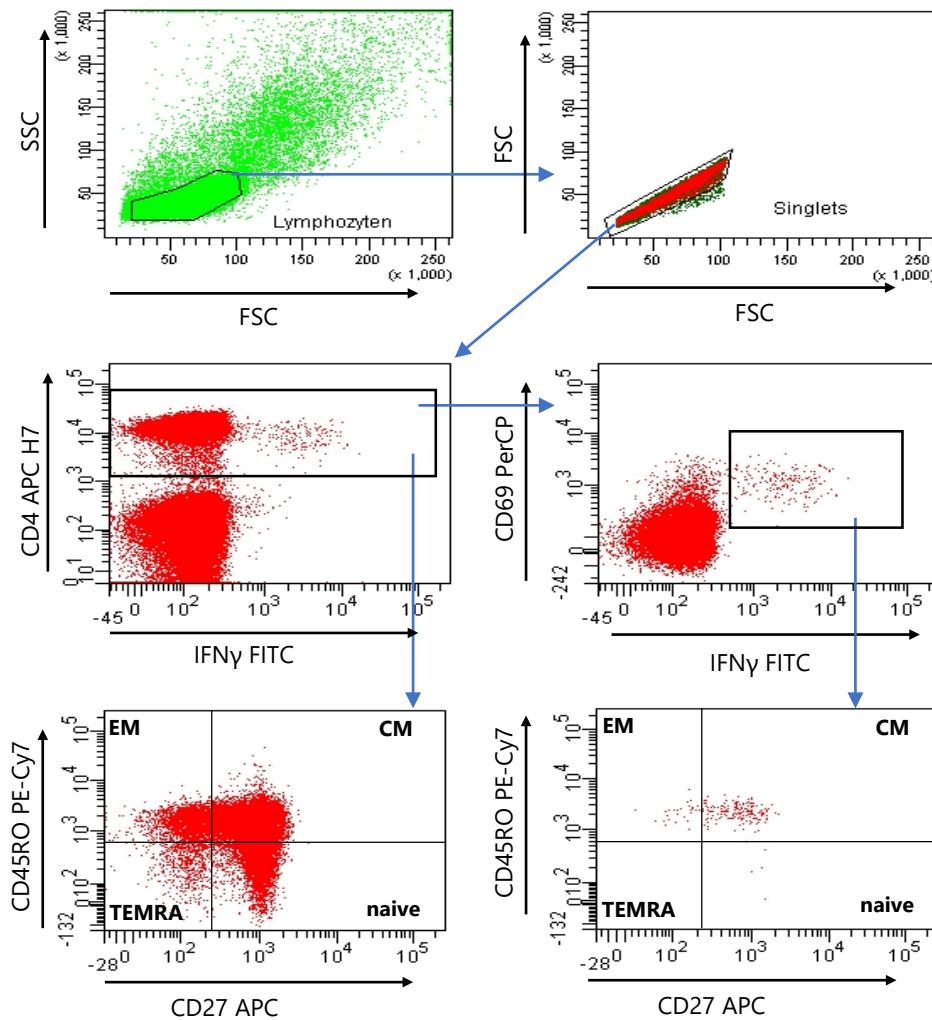


Abbildung 10 Auswertestrategie zur Bestimmung des Differenzierungsstatus von CD4 T-Zellen anhand der Marker CD45RO und CD27 Lymphozyten werden durch FSC und SSC identifiziert und Dubletten ausgeschlossen. Innerhalb der Lymphozyten-Einzel-Population werden CD4⁺ T-Zellen identifiziert. Im weiteren Schritt erfolgt die Einteilung der CD4 T-Zellen anhand der Expression von CD45RO und CD27 in naive, zentrale Gedächtnis- (CM), Effektor-Gedächtnis- (EM) und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-Zellen (TEMRA). Zusätzlich werden Antigen-spezifische CD4 T-Zellen durch die Ko-Expression von CD69 und IFNy quantifiziert und ebenfalls in die Subpopulationen der Gedächtnis-Zellen eingeteilt.

4.8.4 Auswertestrategie der intranukleären Ki-67 Färbung

Nach der Darstellung von Lymphozyten und der Identifizierung der Lymphozyten Einzel-Population werden CD4 und CD8⁺ Zellen identifiziert. Bei beiden Subpopulationen werden die Antigen-spezifischen Zellen anhand der Expression von IFNy identifiziert. Um die Mischpopulation von CD4 und CD8 ko-exprimierenden Zellen auszuschließen, werden in einem weiteren Schritt nur CD4 bzw. CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Danach werden zum einen alle und zum anderen nur IFNy⁺ CD4 bzw. CD8 exprimierenden T-Zellen bezüglich ihrer Expression von Ki-67 und Granzym B charakterisiert (Abbildung 11).

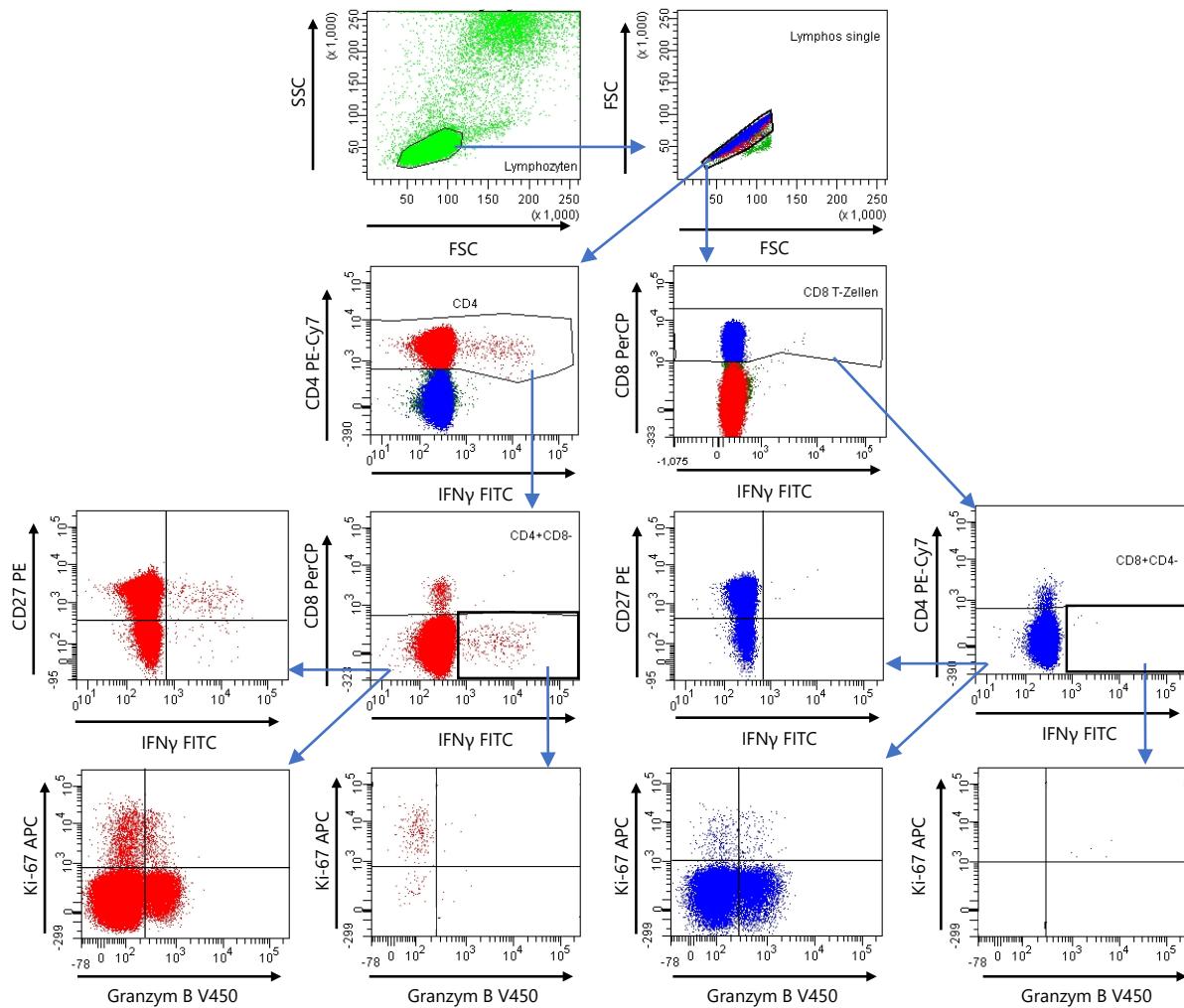


Abbildung 11 Auswertestrategie der intranukleären Ki-67 Färbung Zunächst werden Lymphozyten sowie deren Einzelpopulation identifiziert. Anschließend erfolgt die Identifizierung der CD4 und CD8 Subpopulation, wobei Antigenspezifische T-Zellen als IFNy quantifiziert werden. Weiterhin werden zum einen alle CD4 und CD8 T-Zellen bezüglich der Expression von Ki-67 und Granzym B charakterisiert. Zusätzlich die Expression von Ki-67 und Granzym B auf reaktiven T-Zellen charakterisiert.

4.8.5 Auswertung der Proliferationsaktivität

Zur Analyse der Proliferationsaktivität werden nur Messungen verwendet, bei denen mindestens 10000 CD3 T-Zellen gemessen wurden. Es werden Lymphozyten mit Hilfe von SSC und FSC charakterisiert, mit anschließender Darstellung der Lymphozyten Einzelpopulation über CFSE und FSC. Aus dieser Population werden T-Zellen anhand der CD3 Expression identifiziert, welche aufgrund ihres CFSE-Signals zusätzlich in proliferierte (abnehmendes CFSE-Signal) und unproliferierte (hohes CFSE-Signal) CD3 T-Zellen gruppiert werden. Aus der Gesamtheit der CD3 T-Zellen können im nächsten Schritt CD4 und CD8 T-Zellen inklusive proliferierter Zellen identifiziert werden (Abbildung 12).

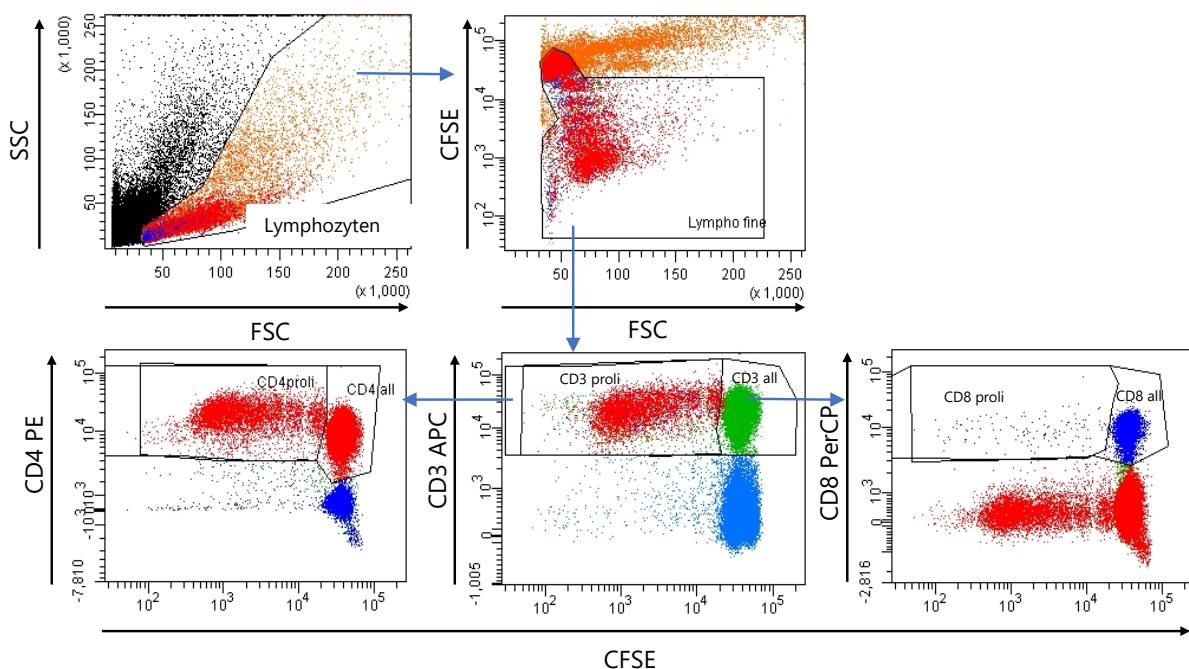


Abbildung 12 Auswertestrategie zur Untersuchung der VZV-spezifischen Proliferationsaktivität
Lymphozyten werden anhand von SSC und FSC identifiziert. Aus den vereinzelten Lymphozyten werden T-Zellen anhand von CD3 dargestellt. CD4 und CD8 T-Zellen werden im weiteren Schritt innerhalb der CD3 T-Zellpopulation identifiziert. Bei allen drei Populationen erfolgt zudem eine Einteilung in proliferierte (abnehmendes CFSE-Signal) und unproliferierte (starkes CFSE-Signal) Zellen.

4.9 Quantifizierung spezifischer IgG-Antikörper

Der Nachweis spezifischer IgG-Antikörper erfolgte in dieser Arbeit mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Diese Methode wird verwendet, um Antikörper in Plasmaproben nachzuweisen. Dabei basiert das Prinzip auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an Antigene. In eine mit Antigenen beschichtete Mikrotiterplatte werden die Proben hinzugegeben. Enthält die Probe spezifische Antikörper, binden diese an die Antigene in der

MATERIAL UND METHODEN

Mikrotiterplatte. Ein weiterer Enzym-gekoppelter Antikörper wird hinzugefügt und bindet an den Antikörper-Antigen-Komplex. Durch Zugabe eines Substrates erfolgt eine enzymatische Reaktion, welche im Lesegerät detektiert werden kann, wobei sich die Intensität des Signals proportional zu Konzentration verhält. Die Messungen wurden mit dem ELISA-Lesegerät Victor X4 oder Bio-Rad PR4100 bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt, wobei die Referenzwellenlängen 620 nm und 650 nm betrugen.

4.9.1 Quantifizierung VZV-spezifischer IgG-Antikörper

Zur Quantifizierung der VZV-spezifischen Antikörper wurde ein ELISA nach Protokoll des Herstellers (Euroimmun AG) durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden Plasmaproben verwendet, welche nach der Blutentnahme bei 1690 g für 10 min abzentrifugiert wurden und bis zur Durchführung bei -20 °C gelagert wurden. Vor der Durchführung des ELISA wurden die Proben aufgetaut und für 10 min bei 2561 g zentrifugiert, um Bestandteile, welche das Ergebnis beeinflussen könnten zu entfernen. Anschließend wurden die Proben 1:101 mit Probenpuffer verdünnt. Proben, welche zu den Zeitpunkten post v1, pre v2 und Follow-up wurden zusätzlich 1:5 verdünnt. Zudem erfolgte eine 1:10 Verdünnung der Proben zum Zeitpunkt post v2. Gemäß den Herstellerangaben wurden IgG-Werte < 80 *international unit* (IU)/L als negativ, Werte von 80-110 IU/L als grenzwertig und Werte > 110 IU/L als positiv eingestuft.

4.9.2 Quantifizierung SARS-CoV-2 Spike-spezifischer Antikörper

Zur Untersuchung Spike-spezifischer Antikörper wurden die Proben wie zuvor beschrieben abgesert und bis zur Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden aufgetaut, für 10 min bei 2561 g zentrifugiert und 1:101 in Probenpuffer verdünnt. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Herstellerangaben. Nach Herstellerangaben wurden IgG-Werte <25,6 *binding antibody units* (BAU)/ml als negativ, zwischen ≥25,6 und <35,2 BAU/ml als grenzwertig und ≥35,2 BAU/ml als positiv eingestuft.

4.9.3 Quantifizierung von SARS-CoV-2 NCAP-spezifischen Antikörpern mittels ELISA

Der NCAP-ELISA wurde durchgeführt, um auszuschließen, dass geimpfte Probanden, denen keine vorherige SARS-CoV-2-Infektion bekannt war, asymptomatisch infiziert waren, was einen Einfluss auf die untersuchte Impfantwort haben kann. Die Durchführung des NCAP-ELISA erfolgte nach Herstellerangaben. Die Proben wurden aufgetaut, für 10 min bei 2561 g zentrifugiert und 1:101 in Probenpuffer verdünnt. Die Ergebnisse wurden durch Bildung des

MATERIAL UND METHODEN

Extinktionsverhältnisses zwischen der Probe und dem Kalibrator ermittelt. Semiquantitative Verhältnisse von $\geq 1,1$ wurden als positiv, $\geq 0,8$ bis $< 1,1$ als grenzwertig und $< 0,8$ als negativ eingestuft.

4.10 Neutralisationstest

Neben der Antikörper-Konzentration lässt sich auch die Funktionalität der spezifischen Antikörper durch Verwendung eines Neutralisationstestes untersuchen.

4.10.1 Untersuchung der VZV-spezifischen Neutralisation

Der Neutralisationstest wurde unter Anleitung im Labor Enders, Stuttgart durchgeführt. Alle Arbeiten wurden bis zur Fixierung unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zudem wurden die Platten während des Aufenthalts außerhalb des Brutschranks in Boxen feucht gehalten, um eine Verdunstung der Flüssigkeit zu verhindern. Für jede Serumprobe wurde ein Doppelansatz durchgeführt. Zuerst wurden in eine 96-Loch Platte 100 µl E-MEM-2% FCS-0,1% P/S vorlegt. In die erste Vertiefung wurden anschließend 100 µl Serum 1:2,5 hinzugefügt, sodass sich für die erste Vertiefung eine Verdünnung des Serums von 1:5 ergab. Die weiteren Vertiefungen nach unten wurden durch Zugabe von je 100 µl Medium 1:2 verdünnt, sodass sich eine Verdünnungsreihe von 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 und 1:640 ergab. Anschließend wurden 100 µl VZV-Virus (Clade 3, Stamm Nr. 13, Original-Nr.: 1219/07, bereitgestellt von Prof. Dr. med. Hartmut Hengel; Konsiliarlabor für Herpes-Simplex-Virus (HSV) und Varicella-Zoster-Virus (VZV); Freiburg; Deutschland), in einer 1:40 Verdünnung hinzugegeben. Zudem wurden eine Verdünnungsreihe mit Zellsuspension und Virus-Ansatz als Positivkontrolle sowie eine Verdünnungsreihe mit ausschließlich Zellsuspension als Negativkontrolle angesetzt. Danach erfolgte eine 90-minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Zellsuspension. Hierbei handelte es sich um embryonale Lungenfibroblasten (ELU) mit einer eingestellten Zellzahl von 100.000 Zellen/ml. Durch die Zentrifugation der Platte für 30 min bei 1200 g, wurde ein schnellerer Kontakt von Virus und Zellen hergestellt. Es folgte eine 5-tägige Inkubation der Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Zur Fixierung wurden die Zellen mit 100 µl Aceton/Methanol (40:60, eisgekühlt) für 10 min bei RT behandelt. Um unspezifische Signale zu reduzieren, wurde 100 µl Blocking Puffer hinzugegeben und die Platte für 30 min im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert. Danach erfolgte die Zugabe von 25 µl des Primärantikörpers gegen immediate early gene 62 (MAB 8616, 1:1000, Sigma-Aldrich) mit anschließender Inkubation im Brutschrank für 30 min

MATERIAL UND METHODEN

bei 37°C und 5% CO₂. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Platte danach dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 25 µl Sekundärantikörper (Ziegen-Anti-Maus-IgG, 1:200, Thermo Scientific) hinzugegeben und die Platte erneut für 30 min im Brutschrank gelagert. Wie beim Primärantikörper wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl AEC-Substrat und eine weitere Inkubation im Brutschrank für 30 min. Um die Farbreaktion zu stoppen, wurde die Platte dreimal mit H₂O dest. gewaschen und mit 100 µl H₂O dest. überschichtet. Abschließend wurden die Plaques in den einzelnen Vertiefungen mikroskopisch gezählt und das geometrische Mittel (GM) bestimmt.

4.10.2 Neutralisation SARS-CoV-2 Spike- und Varianten-spezifischer Antikörper

4.10.2.1 *Neutralisations-Test mittels Surrogat-Assay*

Zunächst wurden die Plasma-Proben vor der Durchführung der Messungen aufgetaut. Danach wurden 50 µl der verdünnten Proben zu 200 µl ACE2-Puffer pipettiert. Die weitere Durchführung des Surrogate Assay erfolgte nach Herstellerangaben (Euroimmun, Lübeck, Deutschland). Die Messung wurde mit dem ELISA-Lesegerät Bio-Rad PR4100 bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt, wobei die Referenzwellenlängen 620 nm und 650 nm betrugen. Die Surrogat-Neutralisationskapazität wurde als Prozentsatz der Hemmung (IH) durch 1 minus das Verhältnis der Extinktion der jeweiligen Probe und der Extinktion des Blindwertes berechnet. Dabei wurde ein Prozentsatz der Hemmung (IH) <20% als negativ, IH≥20 und <35 als grenzwertig und IH≥35% als positiv bewertet. Bei einem weiteren Durchlauf wurde die Neutralisation nach Verdünnung untersucht, weshalb die Proben 1:16 in Humanalbumin-Verdünnungspuffer verdünnt wurden. Die weitere Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

4.10.2.2 *Mikro-Neutralisationstest*

Dieser Neutralisationstest wurde von Mitarbeitern des Instituts für Klinische Virologie am Universitätsklinikum Frankfurt im Rahmen einer Kollaboration wie zuvor beschrieben durchgeführt (WILHELM et al., 2022). Die folgenden SARS-CoV-2-Isolate wurden für den Neutralisationstest verwendet: Wildtyp (SARS-CoV-2 B1 FFM7/2020, GenBank ID MT358643), Delta (SARS-CoV-2 B1.617.2 FFM-IND8424/2021, GenBank ID MZ315141), BA.1 (SARS-CoV-2 B1.1.529 FFM-SIM0550/2021 (EPI_ISL_ 6.959.871), GenBank ID OL800702), BA.2 (SARS-CoV-2

MATERIAL UND METHODEN

BA.2 FFMBA. 2-3833/2022, GenBank ID OM617939). Zur Vermehrung der SARS-CoV-2-Isolate wurden Caco-2-Zellen kultiviert. Der zellfreie Zellkulturüberstand, der die infektiösen Viren enthielt, wurde nach vollständigem zytopathischen Effekt (CPE) geerntet und UV-inaktiviert. Für den Neutralisationstest wurden A549-AT-Zellen, die ACE2 und TMPRSS2 stabil exprimieren, genutzt. Die Plasmaproben wurden 1:2 verdünnt und mit 4000 TCID 50 /ml der SARS-CoV-2-Isolate inkubiert. Infizierte Zellen wurden 48 h nach der Inokulation auf die Bildung eines zytopathischen Effekts mikroskopisch untersucht. Als Neutralisations-Titer wurde die höchste Verdünnung, welche den zytopathischen Effekt noch hemmt, definiert.

4.11 Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 9.1. und 10.1. Der Mann-Whitney-Test wurde für die Analyse von nichtparametrischen Daten zwischen zwei Gruppen verwendet. Der Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Dunn-Post-Test wurde durchgeführt, um ungepaarte nichtparametrische Daten zwischen mehr als zwei Gruppen zu vergleichen. Parametrische Analysen wurden mit dem ungepaarten t-Test durchgeführt. Longitudinale Analysen von gepaarten Stichproben wurden mit dem Friedman-Test mit Dunns Post-Test oder dem Wilcoxon-Test (Proliferationsfähigkeit) durchgeführt. Zur Analyse von Unterschieden bei kategorialen Parametern wie Geschlecht, Infekt-Historie oder Impfreaktion wurden der Fisher's exakt Test und der Chi-Quadrat-Test verwendet. Die Korrelationen zwischen spezifischen Antikörpern, Neutralisationsfähigkeit, Proliferationsaktivität und Frequenz reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen wurden mit dem nichtparametrischen Spearman-Test berechnet. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der VZV-spezifischen Immunantwort nach HZ/su-Impfung

Dialysepatienten haben aufgrund ihrer Urämie ein erhöhtes Risiko für eine VZV-Reaktivierung. Zudem bilden diese Patienten meist eine schlechtere Impfantwort aus. Da bisher keine Daten zur Immunogenität von HZ/su bei Dialysepatienten vorlagen, wurde dies in einem Teilprojekt der Dissertation im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen untersucht.

5.1.1 Etablierungsversuche zur Analyse der VZV-spezifischen Immunität nach HZ/su-Impfung

5.1.1.1 Etablierung der experimentellen Bedingungen für die Kurzzeitstimulation

Zu Beginn des Projekts wurden Vorversuche mit dem Blut von zwei gesunden Probanden durchgeführt. Dabei sollten zum einen die optimalen Messzeitpunkte nach den Impfungen ermittelt werden, zum anderen wurden verschiedene VZV-Antigene und deren Konzentration zur Stimulation der T-Zellen ausgetestet. Hierfür wurde heparinisiertes Vollblut vor der ersten Impfung und anschließend vier Wochen lang im Abstand von 7 Tagen von den beiden Probanden entnommen. Das gleiche Prozedere wurde vor und nach der zweiten Impfung durchgeführt. Das Vollblut wurde mit VZV-Antigenen aus verschiedenen Quellen in Form von Lysat infizierter Zellen, VZV-gE Peptide und VZV-gE Protein stimuliert (Abbildung 13). VZV-spezifische T-Zellen wurden anhand der Ko-Expression von CD69 und IFNy im Durchflusszytometer quantifiziert und als Anteil der reaktiven Zellen (Frequenz) nach Abzug der Reaktivität in der Negativkontrolle quantifiziert. In Abbildung 13A sind die VZV-spezifischen T-Zell-Frequenzen über den zeitlichen Verlauf vor sowie jeweils 4 Wochen nach beiden Impfungen dargestellt. Es zeigte sich ein Anstieg der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen in Woche 1 und 2 nach beiden Impfungen, gefolgt von einem Rückgang in den folgenden Wochen. VZV-Lysat, VZV-gE Peptide (JPT) und VZV-gE Protein (GSK) induzierten bei beiden Probanden die höchsten reaktiven CD4 T-Zell-Frequenzen und wurden daher im weiteren Verlauf des Projekts zur Stimulation verwendet. Diese Ergebnisse nach Stimualtion mit dem VZV-Lysat und VZV-gE Protein werden in Kapitel 5.1.16 ausführlich beschrieben. Die Reaktivität VZV-spezifischer CD8 T-Zellen war bei den getesteten Antigenen durchweg gering. Eine Ausnahme bildete die Stimulation mit VZV-gE Peptiden von JPT bei Proband 2. Jedoch wurde bereits vor der ersten Impfung ein hohes Level an reaktiven CD8 T-Zellen detektiert, die

ERGEBNISSE

nach Impfung keinen weiteren Anstieg zeigte, so dass nicht von einer impfinduzierten Antwort auszugehen ist. Da insbesondere nach der zweiten Impfung die VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen nach zwei Wochen den höchsten Anstieg aufwiesen, wurde für die weiteren Untersuchungen der Zeitpunkt zwei Wochen nach jeder Impfung gewählt.

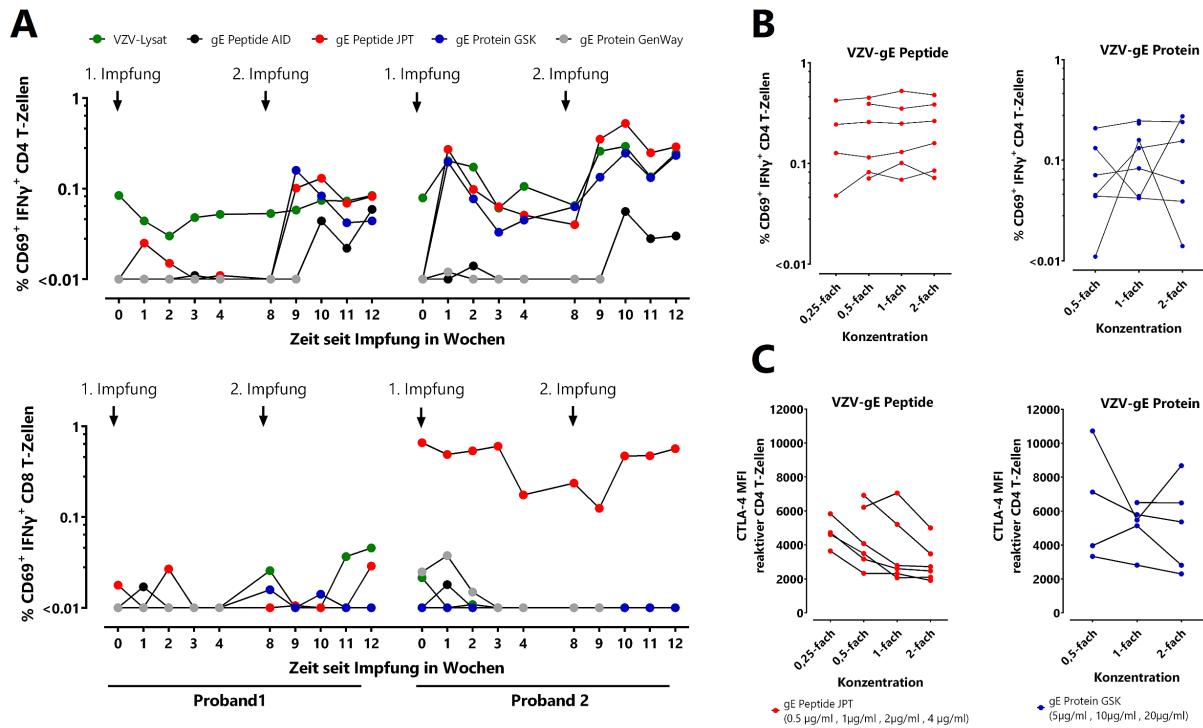


Abbildung 13 Etablierung von Messzeitpunkten sowie Austestung und Titration von VZV-Antigenen in der Kurzzeitstimulation (A) Heparinisiertes Vollblut von zwei gesunden Personen wurde vor beiden Impfungen sowie im Abstand von 7 Tagen für weitere 4 Wochen entnommen und mit den VZV-Antigenen VZV-Lysat (grün), überlappenden VZV-gE Peptiden von JPT (rot) und AID (schwarz) sowie VZV-gE Protein von GSK (blau) und GenWay (grau) stimuliert. VZV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen wurden durch Ko-Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und dem Zytokin IFN γ mittels Durchflusszytometrie detektiert und als Anteil der reaktiven Zellen (Frequenz) nach Abzug der Reaktivität in der Negativkontrolle quantifiziert. **(B)** Die Frequenz VZV-spezifischer CD4 T-Zellen (CD69⁺ IFN γ ⁺ Zellen) und **(C)** deren CTLA-4 Expression wurden nach Stimulation mit den Antigenen VZV-gE Peptide (JPT, links) und VZV-gE Protein (GSK, rechts) in 0,25-; 0,5-; 1- und 2-facher Konzentration analysiert. Die 1-fache Konzentration entspricht 2 µg VZV-gE Peptide pro ml Vollblut. Insgesamt wurde das Blut von 2 Probanden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Für eine robuste statistische Analyse der CTLA-4 Expression wurden nur Messungen mit mindestens 20 CD69⁺IFN γ ⁺ CD4 T-Zellen eingeschlossen. CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4; VZV, Varizella-Zoster-Virus

Neben der Frage, welche Antigene zur Untersuchung der VZV-spezifischen T-Zell-Antwort geeignet sind, bedurfte es der Klärung in welcher Konzentration die Zugabe der Antigene erfolgen sollte, um eine optimale Aktivierung der VZV-spezifischen T-Zellen hervorzurufen. Die Titration des VZV-Lysats erfolgte bereits in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe, sodass hier keine Austestung notwendig war. Für die VZV-gE Peptide von JPT wurden die Konzentrationen 0,5, 1, 2 und 4 µg/ml verwendet. VZV-gE Protein von GSK wurde in den

Konzentrationen 5, 10 und 20 µg/ml eingesetzt. Die Austestung erfolgte mit dem Blut von 2 Probanden an 3 aufeinander folgenden Zeitpunkten nach der HZ/su-Impfung (Abbildung 13B und C). Mit steigender Antigen-Konzentration konnte eine geringfügige Zunahme VZV-spezifischer CD4 T-Zell-Frequenzen nach Stimulation mit VZV-gE Peptiden und Protein beobachtet werden. Bei einer Messung induzierte die 1-fache Konzentration VZV-gE Protein (GSK) eine höhere CD4 T-Zell-Frequenz als die 2-fache Konzentration, was sich möglicherweise auf einen methodischen Fehler beim Pipettieren des Antigens zurückführen lässt und daher diese Messreihe nicht weiter berücksichtigt wurde. Interessanterweise ließ sich mit steigender Konzentration der VZV-gE Peptide eine Abnahme des CTLA-4 Signals von VZV-spezifischen CD4 T-Zellen beobachten. Die Stimulation mit den verschiedenen Konzentrationen an VZV-gE Protein führte zu einer recht heterogenen CTLA-4 Expression. Jedoch wurde ebenso mit steigender Konzentration eine tendenzielle Abnahme der CTLA-4 Expression auf CD4 T-Zellen detektiert. Basierend auf den Ergebnissen reaktiver CD4 T-Zell-Frequenzen und CTLA-4 Expression wurden für die weitere Durchführung der Versuche beide Antigene in einer Konzentration von 2 µg/ml (VZV-gE Peptide JPT) und 10 µg/ml (VZV-gE Protein GSK) verwendet, um zu gewährleisten, dass mit einem Hauptaugenmerk auf die CD4 T-Zell-Frequenzen der Sättigungsbereich für das Antigen erreicht ist.

5.1.1.2 Optimierung des Erntezeitpunkts für den Proliferations-Assay

Ein weiterer Vorversuch befasste sich mit der Analyse der spezifischen Proliferationsfähigkeit, was mit Hilfe des CFDA-SE-Proliferations-Assays untersucht wurde. Hierbei galt es zunächst zu klären, wie lang die Inkubation der isolierten PBMCs mit den Antigenen erfolgen sollte, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Daher wurden die stimulierten Zellen an Tag 5 und Tag 7 geerntet und die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu diesen beiden Zeitpunkten anhand von 8 verschiedenen Messungen verglichen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei zum einen auf der Hintergrundproliferation bei den verwendeten Negativkontrollen Ko-VZV und DMSO (1:10 verdünnt mit PBS). Zum anderen wurde getestet inwieweit sich die Proliferationsfähigkeit VZV-spezifischer T-Zellen erhöht, wenn diese länger den Antigenen VZV-Lysat, VZV-gE Peptiden und Protein ausgesetzt sind. Da das in der Kurzzeitstimulation verwendete VZV-Lysat über einen längeren Zeitraum toxisch wirkt, wurde für die Untersuchung der Proliferation auf ein anderes Lysat zurückgegriffen. Sowohl bei mit VZV-gE Peptiden ($p=0,016$) als auch bei mit VZV-gE Protein ($p=0,039$) stimulierten PBMCs konnten signifikante Anstiege der proliferierten

ERGEBNISSE

CD4 T-Zellen von Tag 5 zu Tag 7 beobachtet werden (Abbildung 14B). Dagegen änderte sich der prozentuale Anteil an proliferierten CD4 T-Zellen, die mit dem VZV-Lysat stimuliert wurden, nicht signifikant. Auch bei den verwendeten Negativkontrollen Ko-VZV und DMSO wurde ein geringer Anstieg der proliferierten CD4 T-Zellen beobachtet, was auf eine erhöhte Basisproliferation nach 7 Tagen schließen lässt (Abbildung 14A). Da bei den VZV-Antigenen deutlich höhere Proliferationsaktivität der CD4 T-Zellen nach 7 Tagen detektiert wurde, wurde dieser Zeitpunkt als zukünftiger Erntezeitpunkt gewählt.

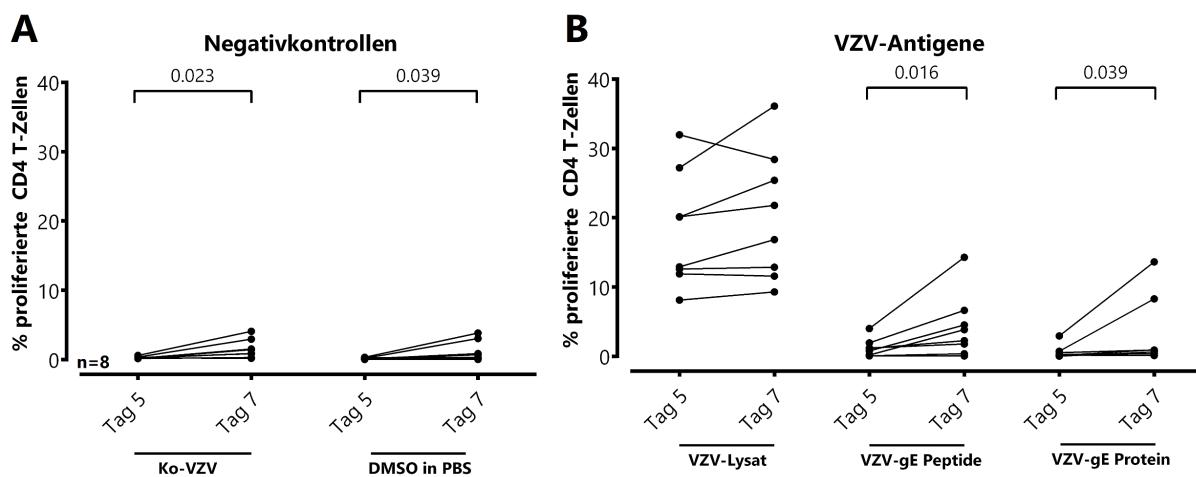


Abbildung 14 Höherer prozentualer Anteil proliferierter VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach 7 Tagen Isolierte PBMCs von gesunden Probanden wurden mit CFDA-SE gefärbt und mit VZV-Lysat, VZV-gE Peptiden (JPT) oder Protein (GSK) stimuliert. **(A)** Als Negativkontrolle wurde nicht-infiziertes Zelllysat (Ko-VZV) und DMSO verdünnt in PBS verwendet. PBMCs wurden nach 5 und 7 Tagen geerntet und bezüglich der Proliferation durchflusszytometrisch untersucht. **(B)** Prozentualer Anteil der proliferierten CD4 T-Zellen nach Stimulation mit den VZV-Antigenen. Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon Test verwendet. VZV, Varizella-Zoster-Virus

5.1.2 Weitere Charakterisierung der VZV-spezifischen T-Zell-Antwort bei gesunden Probanden

Um eine noch detailliertere Charakterisierung der impfinduzierten Immunantwort in einem kleineren Kollektiv vornehmen zu können wurde für die nachfolgenden Versuche Blut von 5 gesunden Probanden vor beiden Impfungen, anschließend viermalig im Abstand von 7 Tagen sowie im Verlauf 6 und 9 Monate nach der zweiten Impfung abgenommen und analysiert.

5.1.2.1 HZ/su induziert VZV-spezifische CD4 T-Zellen, aber CD8 T-Zellen nur geringfügig

Für die engmaschige Untersuchung der VZV-spezifischen T-Zell-Antwort wurde Blut von 5 gesunden Probanden mit überlappenden VZV-gE Peptiden stimuliert. Als Positivkontrolle diente *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) und als Negativkontrolle wurde DMSO (1:10

ERGEBNISSE

in PBS verdünnt) verwendet. Reaktive T-Zellen wurden anhand der Ko-Expression von CD69 und IFN γ mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die engmaschigen Messungen der VZV-spezifischen T-Zell-Antwort zeigten ebenfalls einen dynamischen Verlauf der T-Zell-Frequenzen mit einem Maximum zwei Wochen nach der zweiten Impfung (Abbildung 15). Im Vergleich dazu war nach der ersten Impfung der höchste Anstieg der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen bei 4 Probanden bereits nach einer Woche zu beobachten, gefolgt mit einem leichten Rückgang ab der 2. Woche. Nach der zweiten Impfung stiegen in Woche 1 die VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen wieder an, gefolgt von einer weiteren Zunahme in Woche 2 sowie einem langsamen Rückgang der T-Zell-Frequenzen ab Woche 3. Ein gesunder Proband konnte während des gesamten Verlaufs nur eine minimale VZV-spezifische CD4 T-Zell-Antwort aufbauen, die ihr Maximallevel eine Woche nach der zweiten Impfung erreichte. Eine durch den Impfstoff induzierte Dynamik, wie bei den CD4 T-Zellen, konnte bei VZV-spezifischen CD8 T-Zellen nicht beobachtet werden. Ebenfalls lässt sich kein Unterschied in der Frequenz SEB-reaktiver T-Zellen erkennen, welche über die Zeit stabil und auf einem hohen Level blieb.

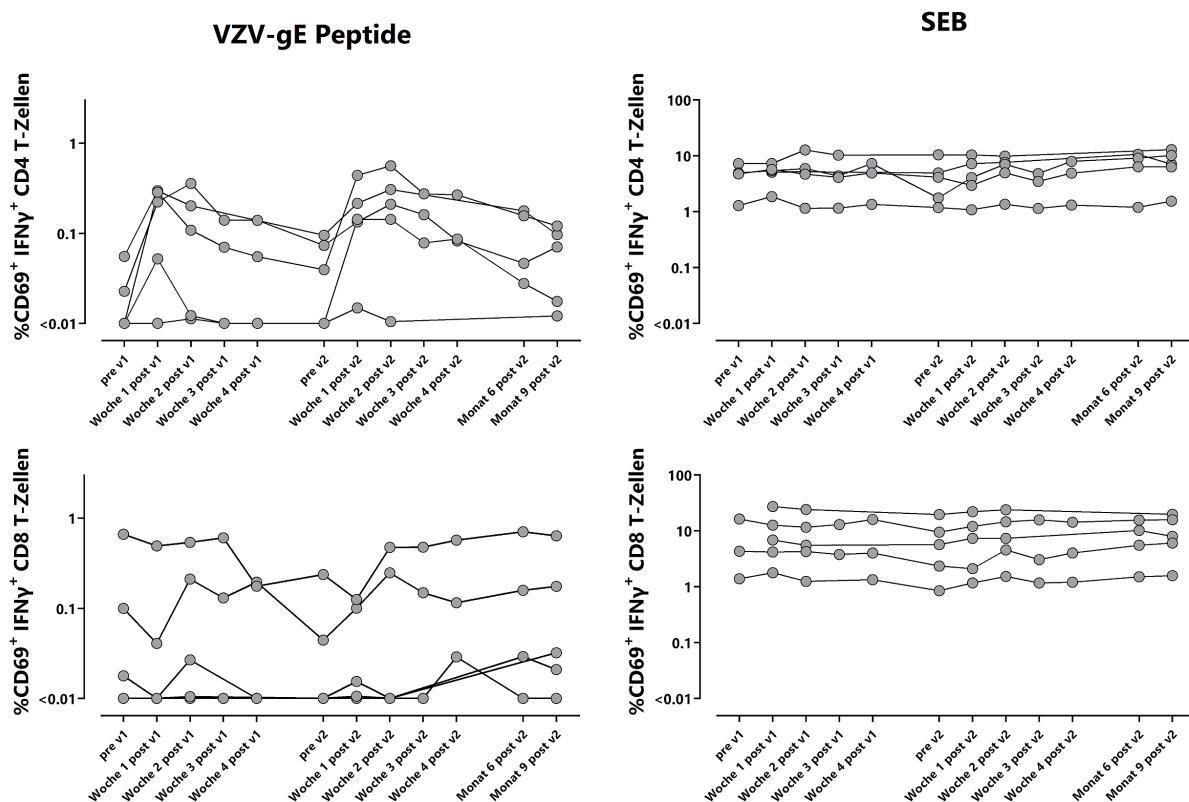


Abbildung 15 VZV-spezifische T-Zell-Frequenzen erreichen 1 bis 2 Wochen nach beiden Impfungen ein Maximum Für die engmaschige Untersuchung der impfinduzierten Immunantwort wurde Vollblut von 5 Immungesunden vor beiden Impfungen (pre v1, pre v2) und im Abstand von 7 Tagen für weitere 4 Wochen sowie 6 Monate und 9 Monate nach zweiter Impfung mit überlappenden VZV-gE Peptiden stimuliert. SEB diente als

ERGEBNISSE

Positivkontrolle, verdünntes DMSO als Negativkontrolle. VZV-spezifische CD4 (oben) und CD8 T-Zellen (unten) wurde durch Ko-Expression von CD69 und IFNy durchflusszytometrisch quantifiziert, wobei die Reaktivität nach Abzug der Kontrollstimulation dargestellt ist. VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

5.1.2.2 Starke Ki-67 Expression in VZV-spezifischen CD4 T-Zellen kurz nach der Impfung

Ki-67 ist ein Marker, mit dem die proliferative Aktivität der Zellen bestimmt werden kann. Aus organisatorischen Gründen wurde nur ein kleiner Teil der Proben bezüglich der Ki-67-Aktivität durchflusszytometrisch nach intranukleärer Färbung untersucht. Der prozentuale Anteil der Ki-67 exprimierenden reaktiven CD4 T-Zellen nach Stimulation mit VZV-gE Peptiden erreichte bereits eine Woche nach beiden Impfungen das Maximum, wobei nach der ersten Impfung ein höherer Anstieg detektiert wurde (post v1: 77,4 % (IQR 34), post v2: 39,3 % (IQR 48,4); Abbildung 16). Mit VZV-Lysat stimulierte reaktive CD4 T-Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf. Jedoch waren diese etwas heterogener, da der Anteil der Ki-67 exprimierenden CD4 T-Zellen bis drei Wochen nach Impfung noch erhöht war. Bei den VZV-gE Protein stimulierten CD4 T-Zellen kam es nach der ersten Impfung zu einem Anstieg der Ki-67 exprimierenden CD4 T-Zellen, danach verhielten sich die Verläufe recht heterogen. Bei der Stimulation mit SEB war der Anteil an Ki-67 exprimierenden CD4 T-Zellen gleichbleibend gering. Lediglich ein leichter Anstieg vor der zweiten Impfung war bei zwei Probanden zu beobachten.

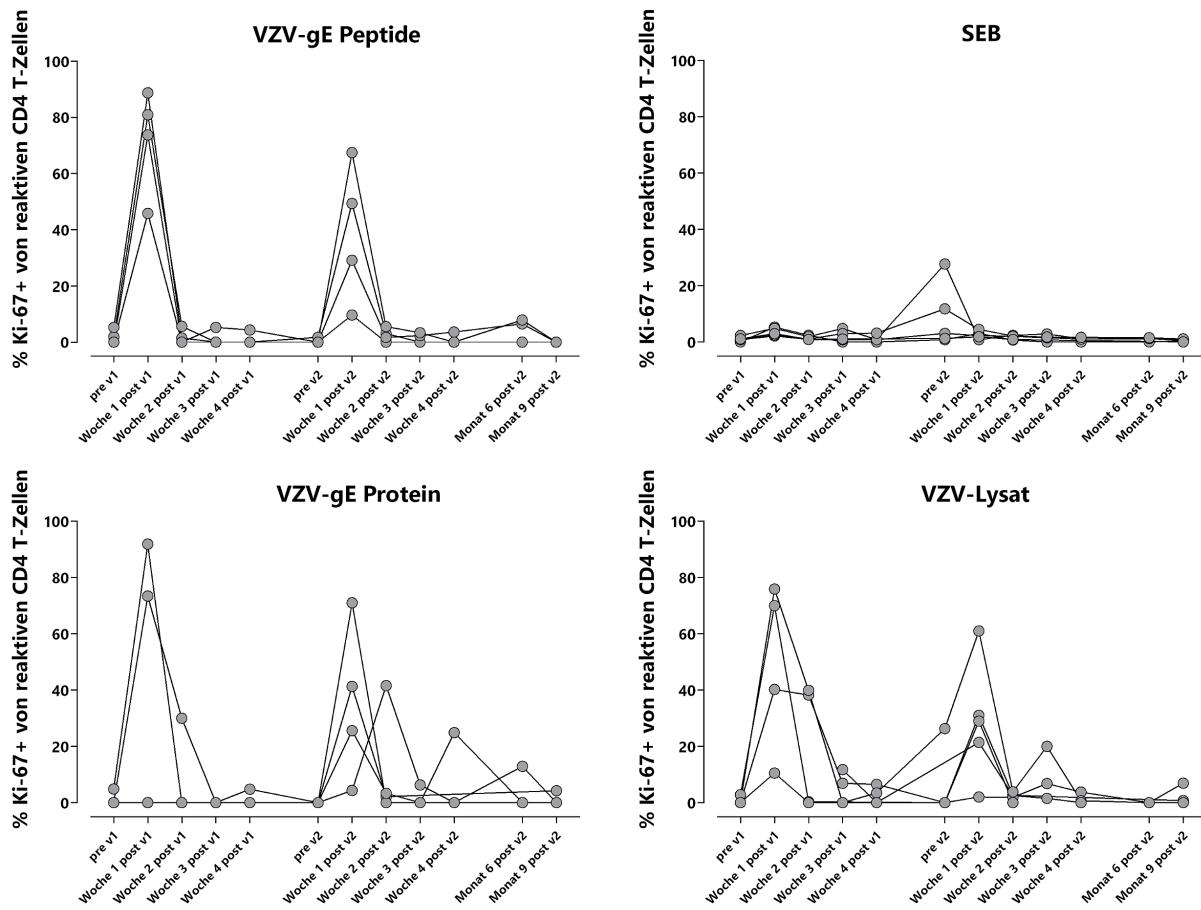


Abbildung 16 Die Ki-67 Expression durch VZV-spezifische CD4 T-Zellen ist eine Woche nach beiden Impfungen am höchsten Vollblut von 5 Immungesunden wurde vor beiden Impfungen (pre v1, pre v2) und im Abstand von 7 Tagen für weitere 4 Wochen nach beiden Impfungen sowie 6 Monate und 9 Monate nach zweiter Impfung mit VZV-gE Peptiden, Protein oder Lysat stimuliert und nach intranukleärer Färbung durchflusszytometrisch untersucht. SEB diente als Positivkontrolle, als Negativkontrolle für VZV-gE Peptide und Protein wurde verdünntes DMSO verwendet, für VZV-Lysat nicht infiziertes Zelllysat. Reaktive CD4 T-Zellen wurden anhand ihrer Expression von IFN γ identifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Ki-67 exprimierenden reaktiven CD4 T-Zellen nach Abzug der korrespondierenden Negativkontrolle. VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

5.1.2.3 Geringe Granzym B Expression auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen

Um zu klären, ob VZV-spezifische CD4 T-Zellen neben der unterstützenden Funktion auch zytotoxische Funktion durch die Produktion von Granzym B haben, wurden Blutproben von 5 Kontrollen mit überlappenden VZV-gE Peptiden, SEB als Positivkontrolle und DMSO als Negativkontrolle stimuliert. Anschließend wurde Granzym B intrazellulär gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

Der prozentuale Anteil an Granzym B exprimierenden VZV-spezifischen CD4 T-Zellen war über den gesamten Messzeitraum gleichbleibend gering und wurde nicht durch die HZ/su-Impfung induziert (Abbildung 17). SEB-reaktive CD4 T-Zellen wiesen einen größeren Anteil an Granzym

ERGEBNISSE

B exprimierenden Zellen auf, der ebenfalls zeitlich stabil verlief. Die Granzym B Expression der Gesamt-CD4 T-Zellen ähnelten im Verlauf und Anteil den Granzym B exprimierenden SEB-reaktiven Zellen. Im Vergleich dazu wiesen Gesamt-CD8 T-Zellen einen deutlich höheren prozentualen Anteil an Granzym B exprimierenden Zellen auf. Aufgrund der insgesamt geringen Anzahl VZV-spezifischen CD8 T-Zellen erfolgte in dieser Zellpopulation keine Analyse der Granzym B Expression.

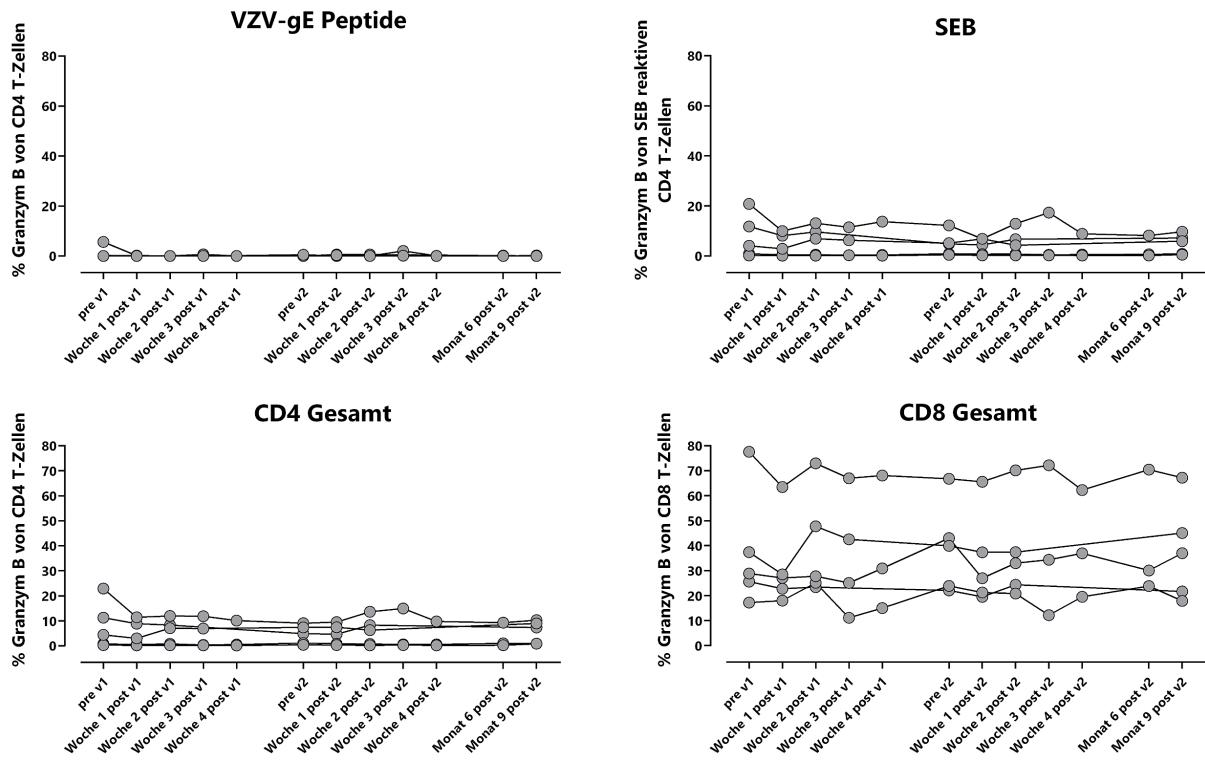


Abbildung 17 Geringe Granzym B Expression durch CD4 T-Zellen Heparinisiertes Vollblut von 5 Immungesunden wurde vor beiden Impfungen (pre v1, pre v2) und im Abstand von 7 Tagen für weitere 4 Wochen nach beiden Impfungen sowie 6 Monate und 9 Monate nach zweiter Impfung mit VZV-gE Peptiden stimuliert. SEB diente als Positivkontrolle, DMSO verdünnt als Negativkontrolle. Reaktive CD4 und CD8 T-Zellen wurden durch Expression von IFNy identifiziert. Die Expression von Granzym B wurde für VZV-spezifische und SEB-reaktive CD4 T-Zellen sowie für die gesamten CD4 und CD8 T-Zellen untersucht. VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

5.1.3 Studienpopulationen von Dialysepatienten und gesunden Probanden

Insgesamt wurden 29 Dialysepatienten ($70,3 \pm 11,7$ Jahre) und 39 gesunde Probanden ($67,9 \pm 8,2$ Jahre) eingeschlossen, die eine zweimalige Impfung mit dem inaktivierten HZ/su-Impfstoff im Abstand von $15,5 \pm 2,9$ Wochen (Patienten) bzw. $13,3 \pm 4,1$ Wochen (Kontrollen) erhielten (Tabelle 19). Bei einer gesunden Probandin konnten keine Messungen zwei Wochen nach der zweiten Impfung durchgeführt werden, da zu diesem Zeitpunkt ein Lockdown aufgrund der Corona-Pandemie bestand. Zudem gab es von 9 Dialysepatienten keine vollständigen

ERGEBNISSE

Datensätze, da 7 Patienten verstorben sind, eine Patientin transplantiert wurde und eine Patientin einen Krankenhausaufenthalt hatte, währenddessen keine Blutentnahme für die Studie möglich war.

Alle Teilnehmer wurden gebeten einen Fragebogen auszufüllen, um festzustellen, ob sie in der Vergangenheit eine Primärinfektion mit VZV (Windpocken) und gegebenenfalls eine VZV-Reaktivierung durchgemacht haben. Insgesamt konnten von 34 Kontrollen und 21 Dialysepatienten Angaben zur Primärinfektion sowie von 38 Kontrollen und 25 Dialysepatienten zur Herpes Zoster Erkrankung erfasst werden. In der Kontrollgruppe hatten nach Angabe der Probanden 91,18 % Windpocken, während es bei den Dialysepatienten 76,19 % waren. Die Primärinfektion trat bei den meisten Probanden bereits im Kindesalter auf. Zudem hatten 18,4 % der gesunden Probanden und 24 % der Dialysepatienten bereits einen Herpes Zoster durchgemacht. Keiner der Teilnehmenden hatte zuvor eine Impfung gegen Herpes Zoster erhalten.

Tabelle 19 Demografie und Charakteristik von Dialysepatienten und Kontrollen

	Dialysepatienten	Kontrollen	p-Wert
Anzahl	29	39	
Alter in Jahren, MW±StabW	70,3 ± 11,7	67,9 ± 8,2	0,331 [‡]
Geschlecht, n (%) weiblich	12 (41,4)	24 (61,5)	0,141 [†]
männlich	17 (58,6)	15 (38,5)	
Jahre an der Dialyse, MW±StabW	4,81±4,57	n.a.	
Windpocken, n (%)	16 (76,2)	31 (91,2)	0,236 [†]
Herpes Zoster, n (%)	6 (24,0)	7 (18,4)	0,752 [†]
Wochen zwischen 1. und 2. Impfung, MW±StabW	15,5 ± 2,9	13,3 ± 4,1	
Messzeitpunkt [Tage nach 1. Impfung], Median (IQR)	14 (0)	14 (0)	
Messzeitpunkt [Tage nach 2. Impfung], Median (IQR)	14 (0)	14 (0,25)	
Abschlusswert (Follow-up)			
Ja	20	38	
Nein (COVID-19 Infektion, Lockdown)	1	1	
Nein (transplantiert)	1	n.a.	
Nein (verstorben)	7	0	

[†]Fisher's exakt Test; [‡]ungepaarter t-Test

ERGEBNISSE

5.1.4 Unterschiede in der Zellzahl der Leukozyten-Subpopulationen

Sowohl von gesunden als auch von dialysepflichtigen Probanden wurden die in Tabelle 20 dargestellten Zellzahlen der Leukozyten-Subpopulationen mit Hilfe eines Differentialblutbildes und den Ergebnissen aus den durchflusszytometrischen Oberflächenfärbungen vor der ersten Impfung bestimmt. Patienten wiesen signifikant mehr Granulozyten ($p=0,035$) und Monozyten ($p=0,006$) auf als gesunde Probanden. Im Gegensatz dazu war die Anzahl an Lymphozyten ($p<0,0001$), CD3 T-Zellen ($p=0,005$) und CD4 T-Zellen ($p=0,031$) bei Patienten signifikant geringer. CD8 T-Zellen und follikuläre T-Helferzellen (Tfh)-Zellen unterschieden sich hingegen nicht zwischen den beiden Gruppen. Jedoch wiesen Patienten signifikant geringere Zahlen an CD19 B-Zellen ($p<0,0001$) und Plasmablasten auf ($p=0,004$).

Tabelle 20 Berechnete Zellzahl der Leukozyten-Subpopulationen pro μl Blut von Kontrollen und Dialysepatienten vor der ersten Impfung mit HZ/su

Zelltyp (Zellen/ μl), Median (IQR)	Dialysepatienten (n=29)	Kontrollen (n=38)	p-Wert [§]
Leukozyten	6200 (2395)	6150 (1530)	0,394
Granulozyten	4736 (2221)	3713 (1256)	0,035
Monozyten	650 (328)	471 (183)	0,006
Lymphozyten	1222 (750)	1811 (855)	0,0001
CD3 T-Zellen	935 (524)	1276 (711)	0,005
CD4 T-Zellen	659 (369)	926 (410)	0,031
CD8 T-Zellen	260 (166)	279 (250)	0,41
CD19 B-Zellen	81 (92)	173 (133)	<0,0001
Plasmablasten	0,224 (0,562)	0,488 (0,498)	0,004
Follikuläre T-Helferzellen	108,7 (67,24)	105 (64,59)	0,674

[§]Mann-Whitney-Test

5.1.5 Quantitative Unterschiede in der HZ/su induzierten T-Zell-Antwort zwischen Dialysepatienten und Kontrollen

Zur Quantifizierung der VZV-spezifischen T-Zell-Antwort nach Impfung mit HZ/su bei Dialysepatienten im Vergleich zu gesunden Probanden wurden Blutproben vor beiden Impfungen (pre v1, pre v2) sowie zwei Wochen nach beiden Impfungen (post v1, post v2) und

ERGEBNISSE

12 Monate nach der ersten Impfung (Follow-up) entnommen. Das Blut wurde für 6 Stunden mit überlappenden VZV-gE Peptiden stimuliert. Als Positivkontrolle diente SEB und als Negativkontrolle wurde DMSO (1:10 in PBS verdünnt) verwendet. Reaktive T-Zellen wurden anhand der Ko-Expression von CD69 und IFNy durchflusszytometrisch quantifiziert. Charakteristische Konturdiagramme von einem 56-jährigen Dialysepatienten im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit VZV-gE Peptiden unter Angaben der Prozentzahl reaktiver Zellen sind in Abbildung 18A dargestellt. VZV-spezifische T-Zell-Frequenzen wurden nach Subtraktion der Frequenzen reaktiver Zellen aus der korrespondierenden Negativkontrolle ermittelt. Sowohl bei Dialysepatienten als auch bei gesunden Probanden wurden zwei Wochen nach erster und zweiter Impfung signifikante Anstiege der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen detektiert, wobei das Maximum zwei Wochen nach der zweiten Impfung erreicht wurde. In der Verlaufsmessung 12 Monate nach der ersten Impfung (Follow-up) sank die VZV-spezifische CD4 T-Zell-Frequenz wieder, lag jedoch weiterhin deutlich über dem Ausgangswert ($p<0,0001$, Abbildung 18B). Im Gegensatz dazu wurden VZV-spezifische CD8 T-Zellen nur im geringen Maße induziert und zeigten keine signifikanten Anstiege. Vielmehr wiesen VZV-spezifische CD8 T-Zell-Frequenzen einen heterogenen Verlauf auf. Bei einzelnen Probanden wurden bereits vor Impfung hohe CD8 T-Zell-Frequenzen quantifiziert, die über den zeitlichen Verlauf stabil blieben, so dass es sich hier vermutlich nicht um eine impfinduzierte Antwort handelte.

Nach der ersten Impfung konnte kein Unterschied in der Induktion der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden. Jedoch wiesen Dialysepatienten eine signifikant geringere mediane VZV-spezifische CD4 T-Zell-Frequenz zum Zeitpunkt zwei Wochen nach zweiter Impfung auf (0,17 % (IQR 0,21 %)) als gesunde Probanden (0,24 % (IQR 0,3 %) $p=0,042$; Abbildung 18C). Zudem war in der Abschlussmessung tendenziell ein stärkerer Rückgang der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen bei Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollen zu beobachten. Dementsprechend zeigte die Quantifizierung des Prozentsatzes VZV-spezifischer CD4 T-Zellen vom Ausgangswert (pre v1) bis zwei Wochen nach zweiter Impfung (post v2) bei Dialysepatienten einen geringeren Anstieg (7,7-fach) als bei Kontrollpersonen (23,3-fach; $p=0,01$). Auch im Follow-up nach einem Jahr war der Anstieg bei Patienten deutlich geringer (2,9-fach) als bei den Kontrollen (6,6-fach; $p=0,048$, Abbildung 18D).

ERGEBNISSE

Dass es sich um eine durch den Impfstoff induzierte VZV-spezifische Reaktion der CD4 T-Zellen handelt, lässt sich erkennen, wenn die Frequenzen der jeweils polyklonal mit SEB stimulierten T Zellen betrachtet werden, die auch als Positivkontrolle dienten. In beiden Gruppen wurden nur geringfügige Änderungen der SEB-reaktiven T-Zell-Frequenzen im zeitlichen Verlauf beobachtet. Zudem wiesen wie erwartet sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen die höchsten T-Zell-Frequenzen nach Stimulation mit SEB auf.

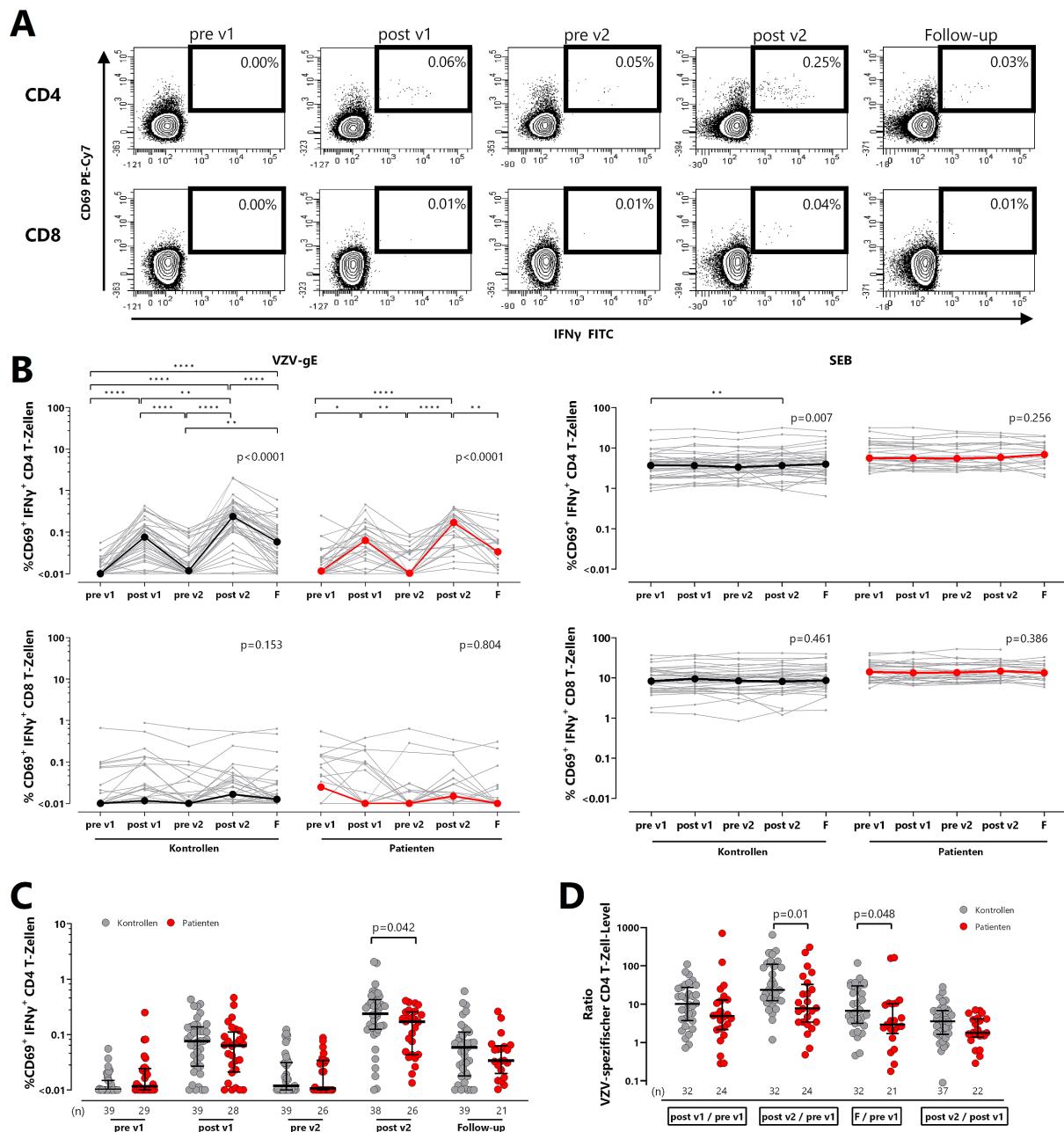


Abbildung 18 Anstieg der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach HZ/su-Impfung (A) Repräsentative Konturdiagramme spezifischer CD4 (oben) und CD8 (unten) T-Zellen von einem 56-jährigen männlichen Hämodialysepatienten vor den beiden Impfungen (pre v1, pre v2), zwei Wochen danach (post v1, post v2) sowie 9 Monate nach der zweiten Impfung (Follow-up, F) nach Stimulation des Vollbluts mit überlappenden VZV-gE

ERGEBNISSE

Peptiden. Die Zahlen geben den Prozentsatz reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen an, die durch Ko-Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Zytokins IFNy identifiziert wurden. **(B)** Frequenz VZV-spezifischer CD4 (oben) und CD8 T-Zellen (unten) nach Abzug der entsprechenden Negativkontrolle (links) und der SEB-reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen (rechts) von Kontrollen und Patienten im zeitlichen Verlauf. Die dicken Linien stellen Mediane dar. Zur statistischen Auswertung wurde ein Friedman-Test mit Dunn Post-Test durchgeführt. **(C)** Vergleich der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenz von Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) im Zeitverlauf. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. **(D)** Für jeden Probanden wurde die Ratio der VZV-gE spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen nach erster und zweiter Impfung sowie bei Follow-up im Vergleich zum Ausgangswert sowie zwischen erster und zweiter Impfung (post v1/pre v1, post v2/pre v1, Follow-up/ pre v1 und post v2/post v1) berechnet. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. IFN, Interferon; VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B. * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$; **** für $p < 0,0001$. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

Zusätzlich wurden die absoluten Zellzahlen VZV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 T-Zellen berechnet und im zeitlichen Verlauf dargestellt (Abbildung 19). Wie beim prozentualen Anteil wiesen sowohl Patienten als auch Kontrollen eine impfinduzierte Dynamik VZV-spezifischer CD4 T-Zellen auf ($p < 0,0001$). Erwartungsgemäß konnte bei der absoluten Zellzahl SEB-reaktiver CD4 T-Zellen keine zeitliche Änderung in den beiden Gruppen beobachtet werden.

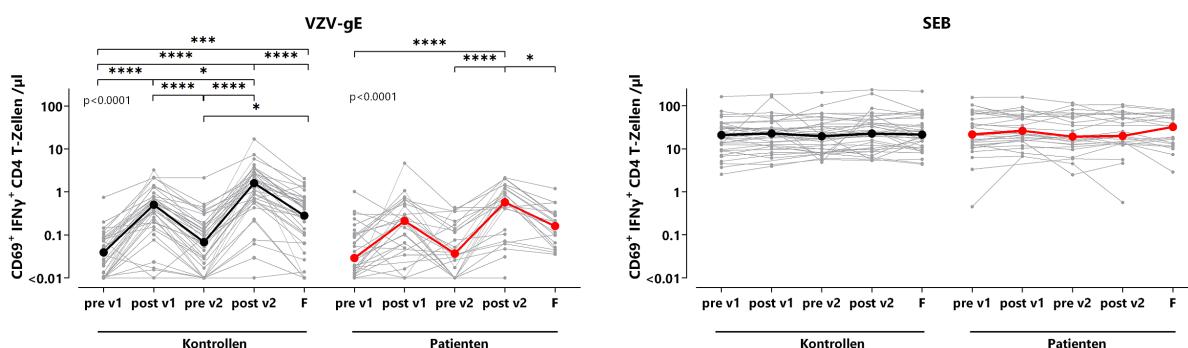


Abbildung 19 Absolute Anzahl VZV-spezifischer CD4 T-Zellen weisen einen dynamischen Verlauf auf Die absolute Anzahl an VZV-spezifischen (links) und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen (rechts) pro μl Blut wurde nach der Vollblut-Stimulation aus dem prozentualen Anteil $\text{CD69}^+ \text{IFNy}^+$ CD4 T-Zellen (Abbildung 15) und den dazugehörigen Differentialblutbildern der Probanden für Kontrollen (schwarz) und Patienten (rot) ermittelt und im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die dicken Linien stellen Mediane dar. Zur statistischen Auswertung wurde ein Friedman-Test mit Dunn Post-Test durchgeführt. IFN, Interferon; VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B. * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$; **** für $p < 0,0001$. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

Weiterhin wurde der Einfluss des Geschlechts auf die VZV-spezifische T-Zell-Antwort innerhalb der beiden Gruppen vor beiden Impfungen, zwei Wochen danach und im Follow-Up untersucht. Allerdings konnten weder bei Patienten noch bei gesunden Kontrollen geschlechtsspezifische Unterschiede der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenz zu den verschiedenen Zeitpunkten festgestellt werden (Tabelle 21).

ERGEBNISSE

Tabelle 21 Geschlechtsspezifische Analyse der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen bei Dialyse-Patienten und Kontrollen als Mediane mit IQR dargestellt

Zeitpunkt	Dialyse-Patienten			Kontrollen		
	weiblich	männlich	p-Wert [§]	weiblich	männlich	p-Wert [§]
pre v1	0,013 (0,025)	0,009 (0,02)	0,87	0,006 (0,009)	0,01 (0,018)	0,452
post v1	0,033 (0,106)	0,067 (0,083)	0,133	0,068 (0,077)	0,111 (0,134)	0,722
pre v2	0,011 (0,03)	0,009 (0,029)	0,608	0,01 (0,031)	0,016 (0,028)	0,616
post v2	0,085 (0,22)	0,188 (0,215)	0,54	0,229 (0,394)	0,301 (0,21)	0,93
Follow-up	0,053 (0,043)	0,033 (0,044)	0,75	0,049 (0,08)	0,07 (0,535)	0,338

[§] p-Werte mit Hilfe des Mann-Whitney Tests berechnet

5.1.6 Phänotypisierung impfinduzierter VZV-spezifischer CD4 T-Zellen

5.1.6.1 Hohe CTLA-4 Expression auf impfinduzierten VZV-spezifischen CD4 T-Zellen

Das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) ist ein inhibitorisches Rezeptormolekül, das von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Somit kann CTLA-4 zum Nachweis eines kürzlich stattgefundenen Antigen-Kontakts genutzt werden. Daher wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 in T-Zellen nach Stimulation mit VZV-gE Peptiden untersucht und zu allen Zeitpunkten von allen Probanden gemessen. Für eine aussagekräftige Statistik wurden jedoch nur Messungen in die Auswertung eingeschlossen in denen mindestens 20 CD69⁺IFNy⁺ T-Zellen detektiert wurden. Da die Anzahl der verwertbaren Messungen vor beiden Impfungen zu gering war, wurden nur die Zeitpunkte nach beiden Messungen (post v1, post v2) sowie der Follow-up-Wert betrachtet. Charakteristische Konturdiagramme der CTLA-4 Expression durch VZV-spezifische und SEB-reaktive CD4 T-Zellen eines 56-jährigen männlichen Dialysepatienten zwei Wochen nach der zweiten Impfung sind in Abbildung 20A dargestellt. Zwischen Patienten und Kontrollen konnte weder nach beiden Impfungen noch im Follow-up ein Unterschied in der CTLA-4 Expression festgestellt werden (Abbildung 20B). Die CTLA-4 Expression durch VZV-spezifische CD4 T-Zellen war sowohl bei Dialysepatienten (post v1: 3292 (IQR 2195); post v2: 4381 (IQR 4586)) als auch bei Kontrollen (post v1: 3208 (IQR 1864); post v2: 4251 (IQR 2551)) nach der zweiten Impfung höher als nach der ersten Impfung. Jedoch war dieser Unterschied nur bei den Kontrollen signifikant ($p=0,013$; Abbildung 20C). Im Abschlusswert war erwartungsgemäß ein deutlicher Rückgang der CTLA-4 Expression in beiden Gruppen zu erkennen. Dass es sich um eine impfinduzierte Reaktion der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen handelt, zeigte der Vergleich mit SEB-stimulierten

ERGEBNISSE

CD4 T-Zellen. Bei SEB-reaktiven CD4 T-Zellen konnte keine Änderung der CTLA-4 Expression während des Messzeitraums beobachtet werden. Zudem war die CTLA-4 Expression durch VZV-spezifische CD4 T-Zellen deutlich höher als bei SEB-reaktiven Zellen. CD8 T-Zellen wurden aufgrund der geringen Anzahl an reaktiven Zellen nicht bezüglich der CTLA-4 Expression analysiert.

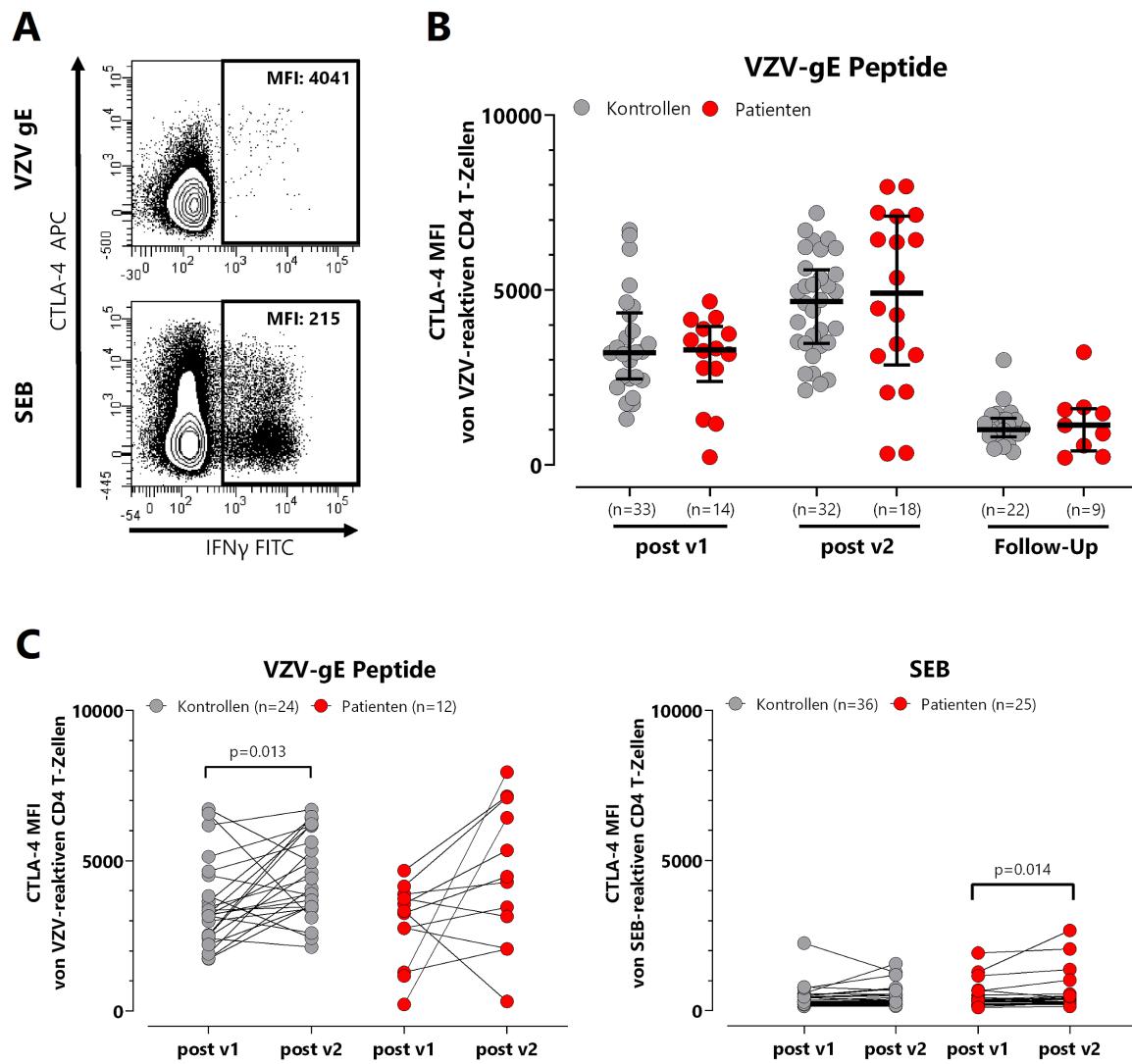


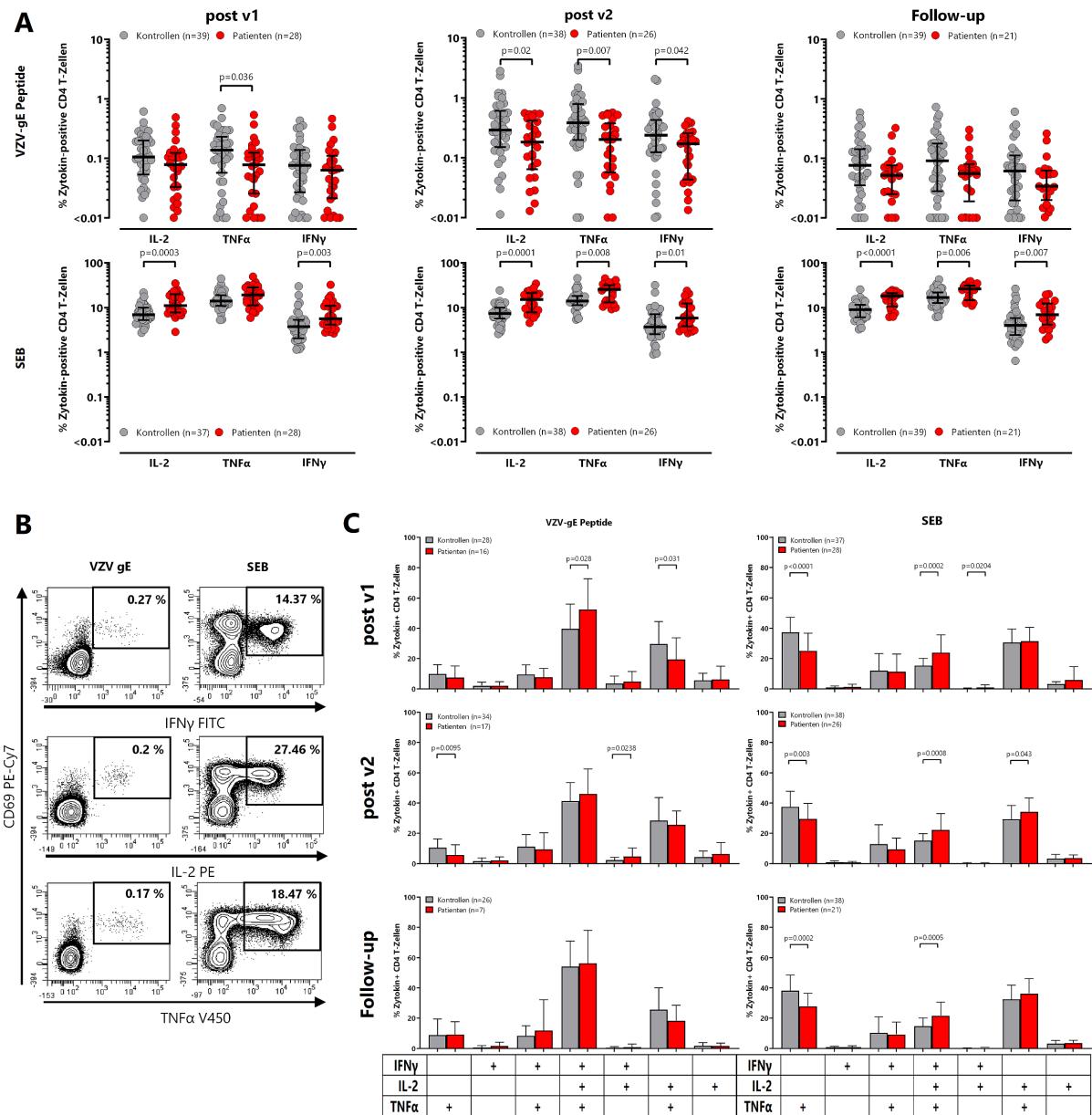
Abbildung 20 Impfinduzierter Anstieg der CTLA-4 Expression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach Hz/su-Impfung (A) Repräsentative Konturdiagramme der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 exprimierenden VZV- und SEB-reaktiven CD69+IFNy⁺ CD4 T-Zellen bei einem 56-jährigen männlichen Dialysepatienten. (B) Vergleich der CTLA-4-MFI von VZV-reaktiven CD4 T-Zellen nach beiden Impfungen und im Follow-up zwischen Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot). Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. Für eine robuste statistische Analyse wurden nur gepaarte Proben mit mindestens 20 CD69+IFNy⁺ CD4 T-Zellen eingeschlossen. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. (C) Vergleich der CTLA-4-MFI von VZV- (links) und SEB-reaktiven (rechts) CD4 T-Zellen nach erster und zweiter Impfung bei Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot). Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten in jeder Gruppe wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4; MFI, mediane Fluoreszenzintensität; VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

5.1.6.2 Unterschiede in der Zytokinexpression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach HZ/su-Impfung

Zusätzlich zur Expression von IFNy wurde auch die Expression der Zytokine IL-2 und TNF α in VZV-spezifischen CD69 $^{+}$ CD4 T-Zellen nach Stimulation analysiert. Die Zytokinexpression wurde von allen Probanden zu allen Zeitpunkten gemessen. Für eine robuste Statistik wurden jedoch nur Messungen eingeschlossen, in denen mindestens 30 Zytokin-exprimierende CD4 T-Zellen nach Abzug der entsprechenden Negativkontrolle detektiert wurden. Insofern erfolgte die Analyse der Zytokinexpression nur zu den Zeitpunkten nach beiden Impfungen sowie im Follow-up. Bei Betrachtung der Expression einzelner Zytokine durch aktivierte CD69 $^{+}$ T-Zellen fällt auf, dass Dialysepatienten nach der ersten Impfung weniger TNF α exprimierende CD4 T-Zellen aufwiesen (0,08 % (IQR 0,1 %)) als Kontrollen (0,14 % (IQR 0,17 %); p=0,036, Abbildung 21A). Nach der zweiten Impfung wurden zusätzlich zu TNF α (p=0,007) und IFNy (p=0,042) bei Dialysepatienten signifikant weniger IL-2 exprimierende CD4 T-Zellen im Vergleich zu Kontrollen detektiert (p=0,02). Im Follow-up konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mehr detektiert werden.

Hingegen wiesen bei den SEB-reaktiven T-Zellen Patienten zu allen Zeitpunkten fast immer eine höhere Expression von IFNy, IL-2 und TNF α auf als Kontrollen, sodass davon auszugehen ist, dass die eingeschränkte Zytokinexpression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen bei Dialysepatienten im Verlauf durch die Impfung beeinflusst wird. In Abbildung 21B sind charakteristische Konturdiagramme von VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD69 $^{+}$ CD4 T-Zellen eines 56-jährigen Dialysepatienten dargestellt, die jeweils die Zytokine IFNy, IL-2 und TNF α exprimieren.

ERGEBNISSE



**Abbildung 21 Die Zytokinexpression von Dialysepatienten und Kontrollen unterscheidet sich nach HZ/su-
Impfung (A)** VZV-spezifische und SEB-reaktive CD4 T-Zellen wurden stimuliert und CD69-positive CD4 T-Zellen, die IL-2, TNF α oder IFN γ produzieren, wurden nach erster und zweiter Impfung sowie im Follow-up ein Jahr nach erster Impfung quantifiziert. Die VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen werden nach Abzug der Negativkontrollen angezeigt. Proben von gesunden Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) wurden zu jedem Zeitpunkt verglichen. Die Linien stellen Medianwerte mit Interquartilsbereichen dar. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. **(B)** Beispiele für Konturdiagramme von VZV-spezifischen oder SEB-reaktiven CD4-T-Zellen, welche die Zytokine IFN γ , TNF α und IL-2 exprimieren, nach Stimulation von Vollblut eines 56-jährigen männlichen Dialysepatienten. **(C)** Zytokin-exprimierende CD4 T-Zellen wurden in 7 Subpopulationen unterteilt, je nachdem, ob sie IFN γ , TNF α und IL-2 einzeln oder kombiniert exprimierten. Es wurden die Blutproben aller Personen analysiert. Für eine robuste Statistik wurden nur Proben mit mindestens 30 Zytokin-exprimierenden CD4-T-Zellen nach Abzug der entsprechenden Negativkontrolle berücksichtigt. Vergleich der Zytokinprofile von VZV-spezifischen (links) und SEB-reaktiven CD4-T-Zellen (rechts) bei Kontrollen und Dialysepatienten post v1, post v2 und im Follow-up. Die Balken stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dar. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten t-Test durchgeführt. Die endgültige Stichprobengröße ist in jedem Feld angegeben. IL-2, Interleukin 2; IFN, Interferon; TNF, Tumor-Nekrose-Faktor; VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

ERGEBNISSE

Mit Hilfe des Boolean-Gating wurde die Verteilung der Zytokinexpression in CD4 T-Zellen genauer untersucht, indem die reaktiven CD4 T-Zellen in 7 Subpopulationen unterteilt wurden, je nachdem, ob sie IFNy, TNF α und IL-2 einzeln oder kombiniert exprimierten. Die Mehrheit der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen exprimierte alle drei Zytokine, was für eine Multifunktionalität der Zellen spricht (Abbildung 21C). Den geringsten Anteil hingegen machten reaktive CD4 T-Zellen aus, welche nur ein Zytokin exprimierten. Bei Betrachtung der einzelnen Subpopulationen fällt auf, dass nach der ersten Impfung signifikant mehr dreifachpositive VZV-spezifische CD4 T-Zellen bei Dialysepatienten detektiert wurden als bei Kontrollen ($p=0,028$), wohingegen der Anteil IL-2/TNF α exprimierender Zellen bei Patienten niedriger ausfiel ($p=0,031$). Die Zytokinexpressionmuster beider Gruppen verhielten sich im weiteren Verlauf ähnlich.

SEB-reaktive CD4 T-Zellen exprimierten in beiden Gruppen überwiegend TNF α einzeln oder in Kombination mit IL-2. Interessanterweise wiesen Patienten sowohl nach beiden Impfungen als auch im Follow-up einen geringeren prozentualen Anteil an reaktiven Zellen auf die TNF α einzeln exprimieren, während der Anteil an dreifach exprimierenden Zellen signifikant erhöht war. CD8 T-Zellen wurden aufgrund der geringen Anzahl an reaktiven Zellen nicht bezüglich der Zytokinexpression analysiert.

5.1.7 Höherer Anteil an VZV-spezifischen zentralen Gedächtnis-CD4 T-Zellen nach Impfung mit HZ/su in Dialysepatienten

Zur Bestimmung des Differenzierungsstatus von VZV-spezifischen T-Zellen wurden CD69 $^+$ IFNy $^+$ CD4 T-Zellen anhand der Expression von CD45RO und CD27 nach Stimulation mit überlappenden VZV-gE Peptiden in naive (CD27 $^+$, CD45RO $^-$), zentrale Gedächtnis- (CM, CD27 $^+$, CD45RO $^+$), Effektor-Gedächtnis- (EM, CD27 $^-$, CD45RO $^+$) und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis- (TEMRA, CD27 $^-$, CD45RO $^-$) Zellen unterteilt. Repräsentative Punktdiagramme sind in Abbildung 22A dargestellt. Nach der ersten Impfung machten zentrale Gedächtnis-T-Zellen sowohl bei Dialysepatienten (80,8 % (IQR 20,3 %)) als auch bei Kontrollen (76,0 % (IQR 20,3 %)) prozentual den größten Anteil der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen aus, gefolgt von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (Patienten: 18,2 % (IQR 22,8 %); Kontrollen 14,5 % (IQR 19,8 %)). Hingegen wurden TEMRA und naive CD4 T-Zellen nur in sehr geringen Maßen detektiert. Eine ähnliche Verteilung wurde auch zwei Wochen nach der zweiten Impfung und im Follow-up beobachtet, wobei nach der zweiten Impfung einige Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen zu

ERGEBNISSE

beobachten waren. Während die Patienten einen höheren Prozentsatz an zentralen Gedächtnis-T-Zellen aufwiesen ($p=0,003$), war der prozentuale Anteil an Effektor-Gedächtnis-T-Zellen signifikant niedriger als bei den Kontrollen ($p=0,004$, Abbildung 22B).

Obwohl die Mehrheit der SEB-reaktiven T-Zellen ebenfalls einen zentralen Gedächtnisphänotyp aufwies, unterschied sich das Verteilungsmuster von dem VZV-spezifischer CD4 T-Zellen, da der Unterschied der prozentualen Anteile zwischen zentralen Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen weniger stark ausgeprägt war (Abbildung 22C). Den geringsten Anteil machten wiederum TEMRA- und naive CD4 T-Zellen aus. SEB-reaktive Subpopulationen zeigten auch keine Veränderung im zeitlichen Verlauf nach Impfung und zwischen Patienten und Kontrollen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

ERGEBNISSE

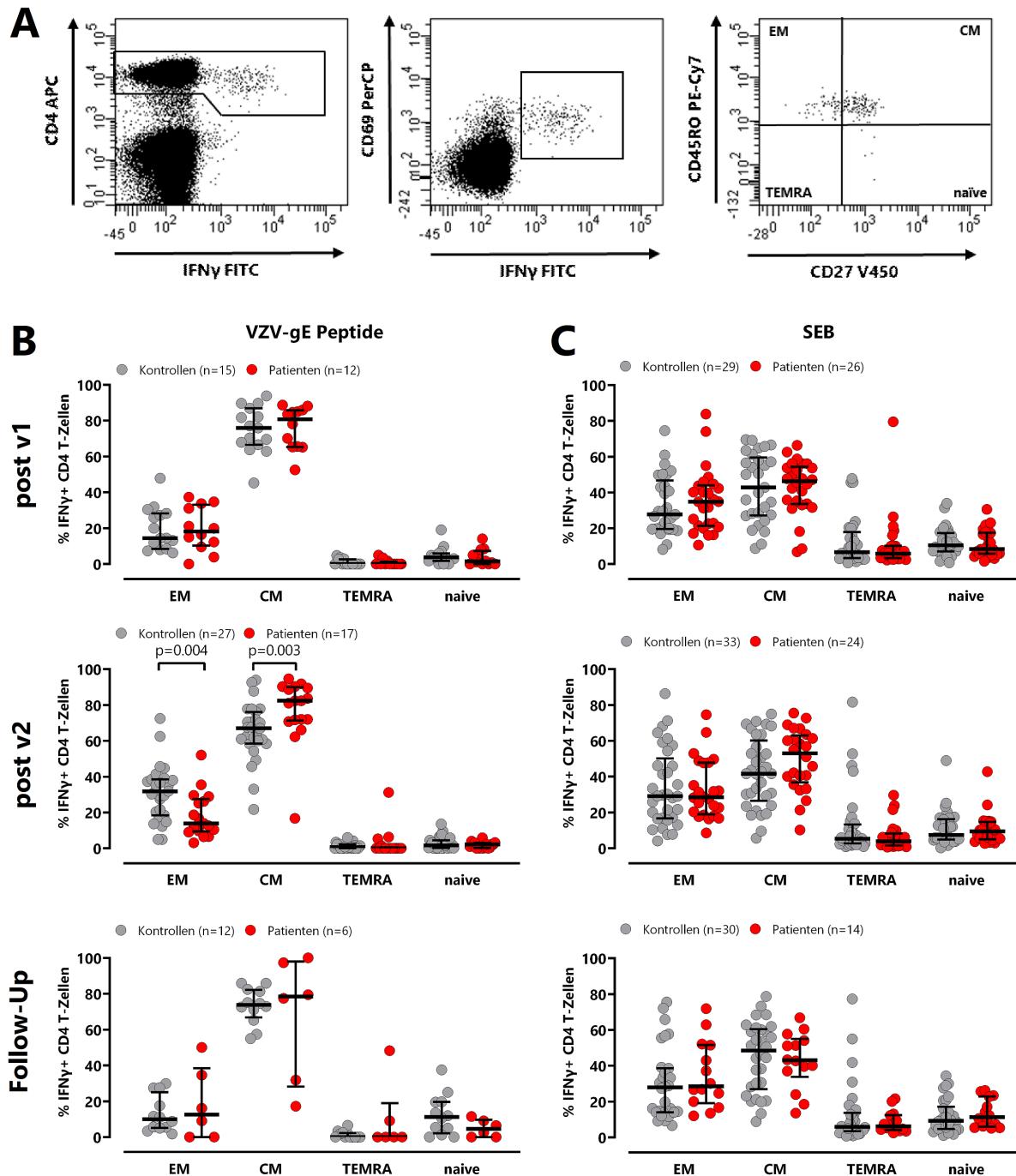


Abbildung 22 Unterschiede in der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Differenzierung zwischen Dialysepatienten und Kontrollen **(A)** Repräsentative Konturdiagramme des Differenzierungsstatus von CD69 und IFN γ ko-exprimierenden VZV-spezifischen CD4 T-Zellen, die basierend auf der Expression von CD45RO und CD27 in naive, zentrale Gedächtnis- (CM), Effektor-Gedächtnis- (EM) und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis- (TEMRA) Zellen klassifiziert wurden. **(B)** T-Zell-Populationen innerhalb der VZV-spezifischen oder **(C)** SEB-reaktiven CD4-T-Zellen wurden zwischen Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) nach erster und zweiter Impfung und im Follow-up verglichen. Alle Proben wurden gemessen, aber die endgültige Analyse wurde auf Proben mit mindestens 20 CD69 $^{+}$ IFN γ $^{+}$ CD4 T-Zellen beschränkt, um eine robuste statistische Analyse zu gewährleisten. Die endgültige Stichprobengröße ist in jedem Panel angegeben. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B, Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

ERGEBNISSE

Neben den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen wurden stimulationsunabhängig CD4- und CD8 T-Zellen bezüglich des Differenzierungsstatus anhand der Expression von CD45RO und CD27 untersucht. Dabei unterschied sich die Verteilung der nicht stimulierten CD4 und CD8 T-Zell-Subpopulationen deutlich von der Verteilung der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen. Gesamt CD4 T-Zellen waren mehrheitlich durch einen zentralen Gedächtnis- und naiven T-Zell-Phänotyp geprägt (Abbildung 23A), wohingegen Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und TEMRA-T-Zellen nur einen geringen prozentualen Anteil ausmachten. Interessanterweise waren die Subpopulationen bei den CD8 T-Zellen sehr homogen verteilt (Abbildung 23B). Unterschiede in der Verteilung der Subpopulationen konnten weder zwischen beiden Gruppen noch im zeitlichen Verlauf beobachtet werden.

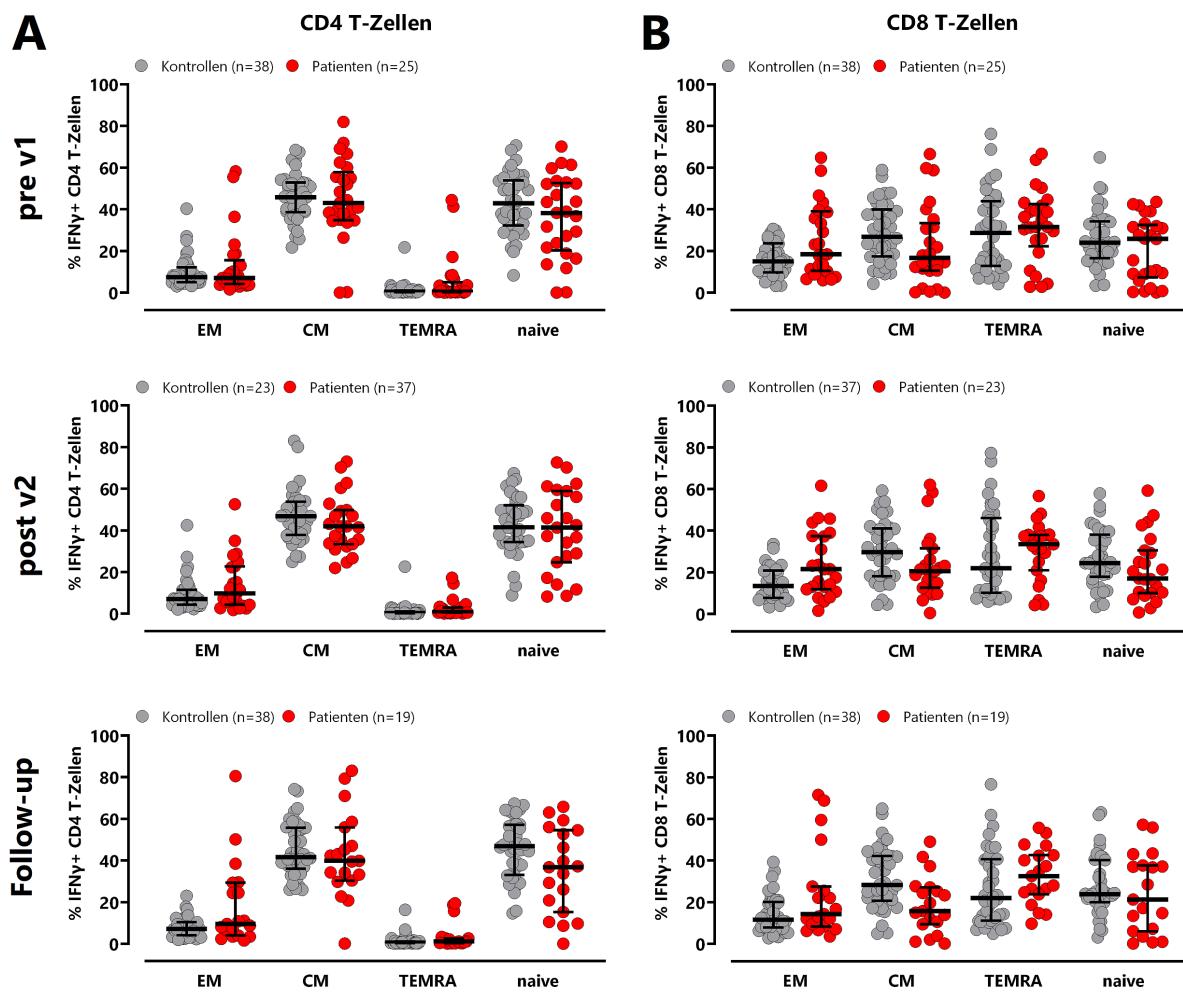


Abbildung 23 Differenzierung von unstimulierten CD4 und CD8 T-Zellen bei Dialysepatienten und Kontrollen
Differenzierungsstatus von (A) CD4 T-Zellen oder (B) CD8 T-Zellen, die anhand der Expression von CD45RO und CD27 in naive, zentrale Gedächtnis- (CM), Effektor-Gedächtnis- (EM) und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis- (TEMRA) Zellen eingeteilt werden. Die T-Zell-Populationen wurden zwischen Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) nach erster und zweiter Impfung sowie im Follow-up verglichen. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

5.1.8 Expression von CD39 auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen

Die Expression der ATPase CD39 wurde im Zuge dieses Projekts auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen untersucht, um einen möglichen Zusammenhang mit der Impfantwort zu charakterisieren. Die Stimulation des Vollbluts von Dialysepatienten und gesunden Kontrollen erfolgte mit überlappenden VZV-gE Peptiden oder VZV-Lysat. SEB diente als Positivkontrolle, DMSO bzw. nicht infiziertes Zelllysat als Negativkontrolle. VZV-spezifische CD4 T-Zellen wurden anhand der Ko-Expression von CD69 und IFNy quantifiziert und die entsprechende Negativkontrolle wurde von der reaktiven T-Zell-Frequenz abgezogen. Für eine aussagekräftige Statistik wurden nur Messungen eingeschlossen in denen mindestens 20 CD69⁺IFNy⁺ CD4 T-Zellen detektiert wurden. Die CD39 Expression der mit VZV-gE Peptiden und Lysat stimulierten CD4 T-Zellen war sowohl nach erster als auch nach zweiter Impfung auf einem niedrigen Niveau (Abbildung 24A). Einzig eine signifikante Zunahme nach Stimulation mit VZV-Lysat nach der zweiten Impfung wurde bei Dialysepatienten beobachtet ($p=0,032$), wenngleich die Expression nach wie vor gering war. Zudem unterschied sich die CD39 Expression auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach der zweiten Impfung nicht signifikant zwischen Dialysepatienten und Kontrollen. Auf SEB-reaktiven CD4 T-Zellen war die Expression von CD39 bei Patienten zwar signifikant höher ($p=0,006$), jedoch war auch hier die Expressionsdichte gering (Abbildung 24B).

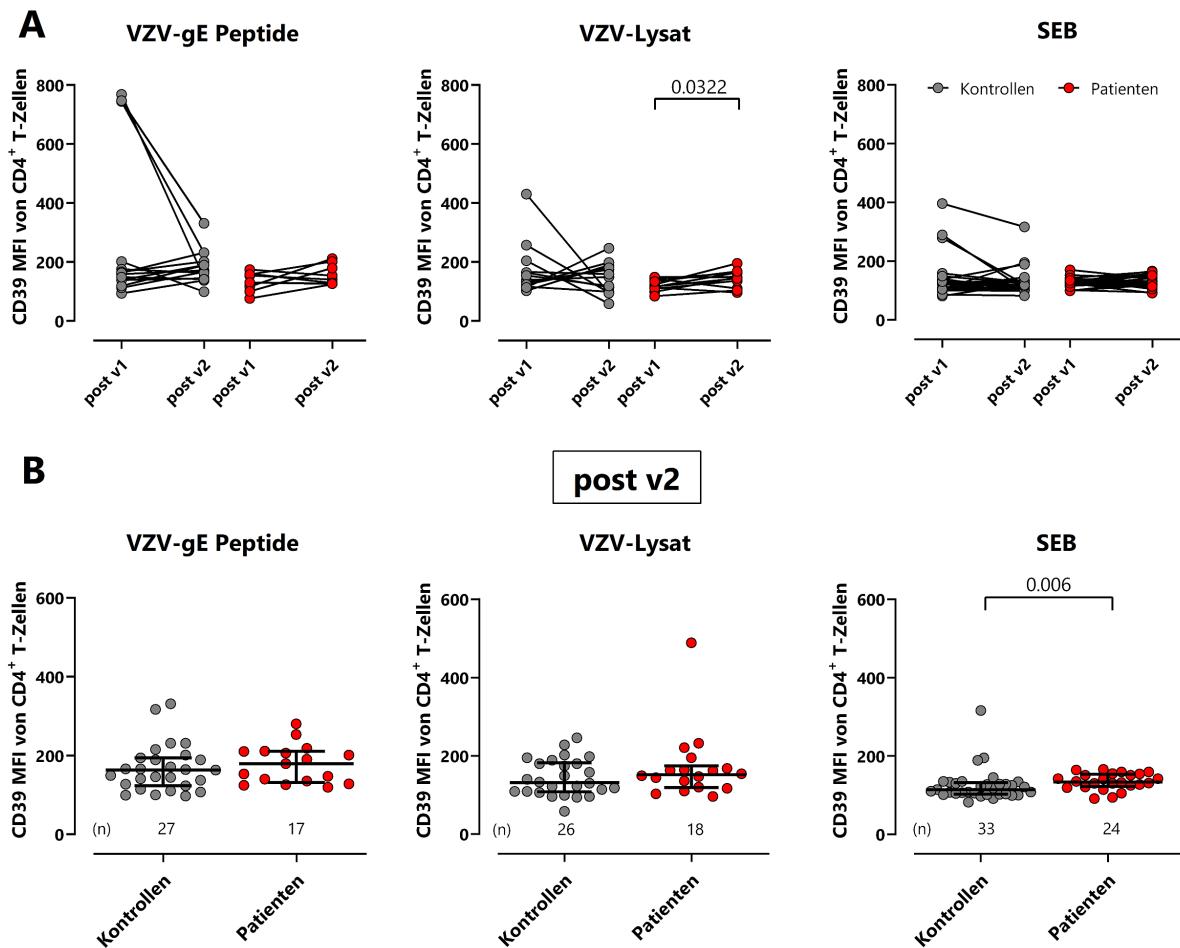


Abbildung 24 Keine Unterschiede in der CD39 Expression auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen zwischen Patienten (A) Nach Stimulation mit überlappenden VZV-gE Peptiden und VZV-Lysat wurde die CD39 Expression auf spezifischen CD4 T-Zellen bei Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) nach beiden Impfungen untersucht. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. **(B)** Vergleich der CD39 MFI zwischen Patienten und Kontrollen nach zweiter Impfung. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. Der Mann-Whitney-Test wurde für die statistische Auswertung genutzt. MFI, mediane Fluoreszenzintensität; VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

5.1.9 HZ/su induziert Proliferationsaktivität in VZV-spezifischen T-Zellen

Zur Analyse der Proliferationsfähigkeit wurden frisch isolierte PBMCs mit CFDA-SE gefärbt und anschließend stimuliert. Nach 7-tägiger Inkubation erfolgte die durchflusszytometrische Analyse proliferierter Zellen, die anhand der Abnahme des CFSE-Signals identifiziert wurden. In Abbildung 25A sind charakteristische Konturdiagramme dargestellt. Angegeben sind die Prozentzahlen proliferierter CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation mit den überlappenden VZV-gE Peptiden. DMSO diente als Negativkontrolle und SEB als Positivkontrolle. Die Prozentzahl der proliferierten VZV-spezifischen T-Zellen wurde durch Subtraktion der entsprechenden Negativkontrolle normiert.

ERGEBNISSE

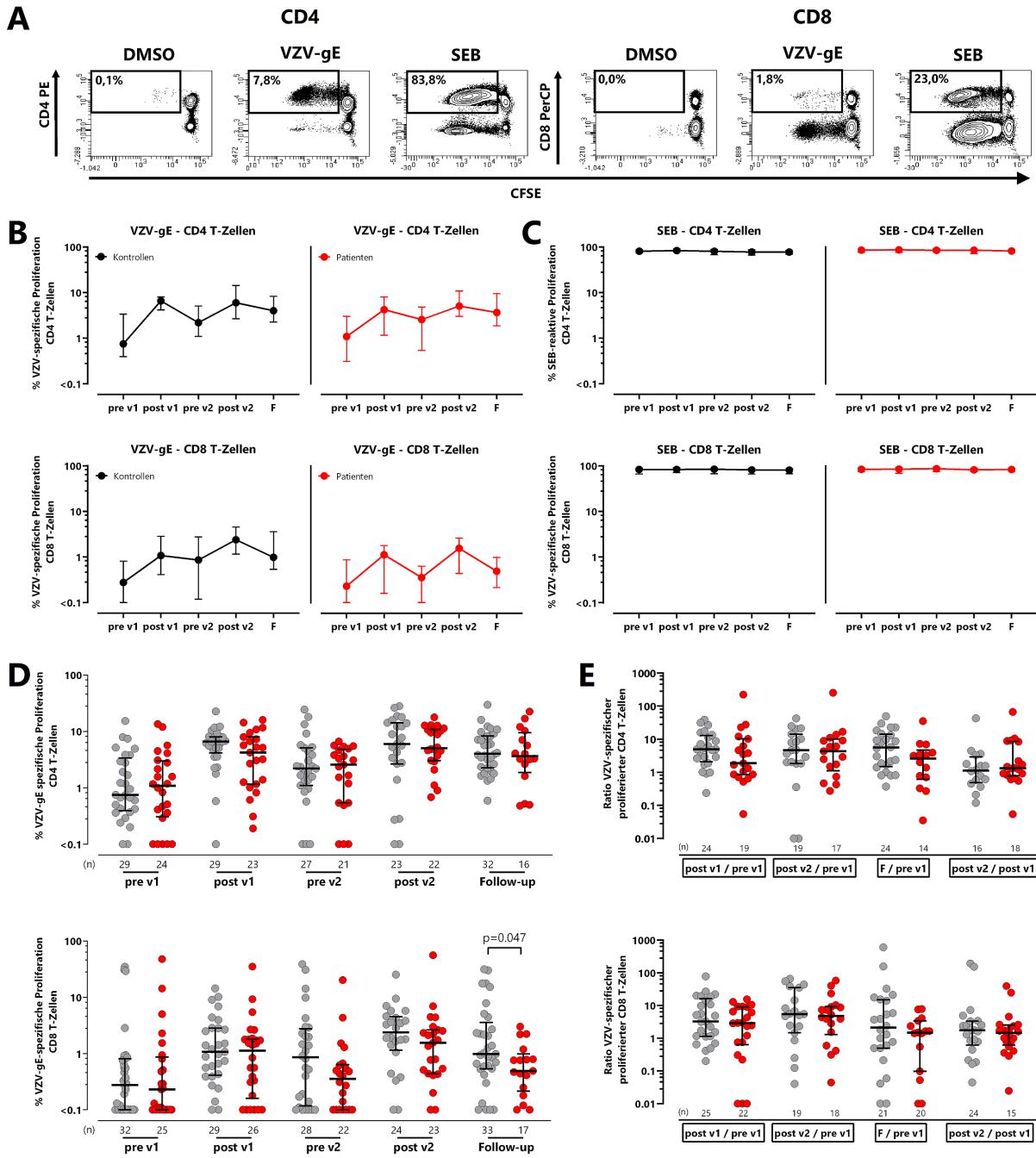


Abbildung 25 Induktion der VZV-spezifischen T-Zellproliferation bei Dialysepatienten und Kontrollpersonen nach Impfung mit HZ/su (A) Konturdiagramme zur Identifizierung der proliferierten CD4 und CD8 T-Zellen nach Färbung mit CFDA-SE und Stimulation mit überlappenden VZV-gE-Peptiden, SEB (Positivkontrolle) oder DMSO (Negativkontrolle) für 7 Tage. **(B)** Mediane Prozentsätze und Interquartilsbereiche der proliferierenden VZV-spezifischen CD4 (oben) oder CD8 T-Zellen (unten) oder **(C)** SEB-reaktiven CD4 oder CD8 T-Zellen vor und nach den Impfungen. VZV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen sind nach Subtraktion der entsprechenden Negativkontrolle im zeitlichen Verlauf bei gesunden Kontrollen (grau) im Vergleich zu Dialysepatienten (rot) dargestellt. **(D)** Der Prozentsatz der proliferierten VZV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen von Patienten und Kontrollen wird zu jedem Zeitpunkt verglichen. **(E)** Für jeden Probanden wurde die Zunahme der proliferierten VZV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen nach erster und zweiter Impfung sowie im Follow-up im Vergleich zum Ausgangswert und zwischen erster und zweiter Impfung berechnet (post v1/pre v1, post v2/pre v1, Follow-up/ pre v1 und post v2/post v1). Die Balken beziehen sich auf Mediane mit Interquartilsbereichen. Der Mann-Whitney-Test wurde für die statistische Analyse verwendet. VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B, Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

ERGEBNISSE

Zwei Wochen nach der ersten und zweiten Impfung war ein Anstieg der proliferierenden VZV-spezifischen T-Zellen bei Patienten und Kontrollen zu beobachten (Abbildung 25B). Auch wenn im zeitlichen Verlauf die Proliferationsfähigkeit wieder abnahm, so lag der prozentuale Anteil an proliferierenden T-Zellen weiterhin über dem Ausgangswert. Interessanterweise wurden bei der Langzeitsimulation auch eine Proliferation VZV-spezifischer CD8 T-Zellen induziert. Diese war nach beiden Impfungen zu beobachten, wenngleich die Proliferation bei CD8 T Zellen schwächer ausfiel als bei den CD4 T-Zellen. Die Proliferation von SEB-reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen blieb wie erwartet im zeitlichen Verlauf stabil (Abbildung 25C). Der Vergleich der Anstiege der proliferierten VZV-spezifischen T-Zellen von Dialysepatienten und Kontrollen zeigte nur geringe Unterschiede. Lediglich im Follow-up war der prozentuale Anteil proliferierter CD8 T-Zellen nach VZV-spezifischer Stimulation bei Patienten etwas geringer als bei Kontrollen ($p=0,047$; Abbildung 25D). Auch in den Ratios im Vergleich zur Proliferation vor Impfung konnten zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 25E).

5.1.10 Keine impfinduzierte Änderung der zirkulierenden follikulären T-Helferzellen

Follikuläre T-Helferzellen (Tfh), eine Subpopulation der CD4 T-Zellen sind im Keimzentrum der sekundären Lymphorgane an der Differenzierung von B-Zellen beteiligt. In dieser Arbeit wurden Tfh-Zellen in Zirkulation stimulationsunabhängig innerhalb der CD4 T-Zellen als CXCR5⁺ Zellen identifiziert. Zusätzlich wurde die Expression von PD-1 und ICOS sowie der Differenzierungsstatus von Tfh-Zellen charakterisiert. Repräsentative Punkt- und Konturdiagramme sind in Abbildung 26A dargestellt. Im zeitlichen Verlauf traten sowohl bei Kontrollen ($p<0,0001$) als auch bei Patienten ($p=0,019$) Unterschiede in der Anzahl an im Blut zirkulierenden Tfh-Zellen auf, die jedoch keine impfinduzierte Dynamik aufwiesen (Abbildung 26B). In der longitudinalen Analyse waren sowohl ICOS als auch PD-1 recht heterogen auf Tfh-Zellen exprimiert, was jedoch ebenfalls keinen Zusammenhang mit der Impfung erkennen ließ (Abbildung 26C und D). Tfh-Zellen wiesen auf Basis der Expression von CD45RO und CD27 sowohl bei Dialysepatienten als auch bei Kontrollen mehrheitlich einen zentralen Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp auf, gefolgt von einem naiven T-Zell-Phänotyp (Abbildung 26E). Tfh-Zellen mit Effektor-Gedächtnis- und TEMRA-Phänotyp wurden hingegen nur in geringen Maßen detektiert. Dieses Verteilungsmuster blieb über den zeitlichen Verlauf gleich, wobei

ERGEBNISSE

lediglich vor erster Impfung ein Unterschied zwischen Dialysepatienten und Kontrollen im prozentualen Anteil an zentralen Gedächtnis-T-Zellen beobachtet werden konnten ($p=0,006$).

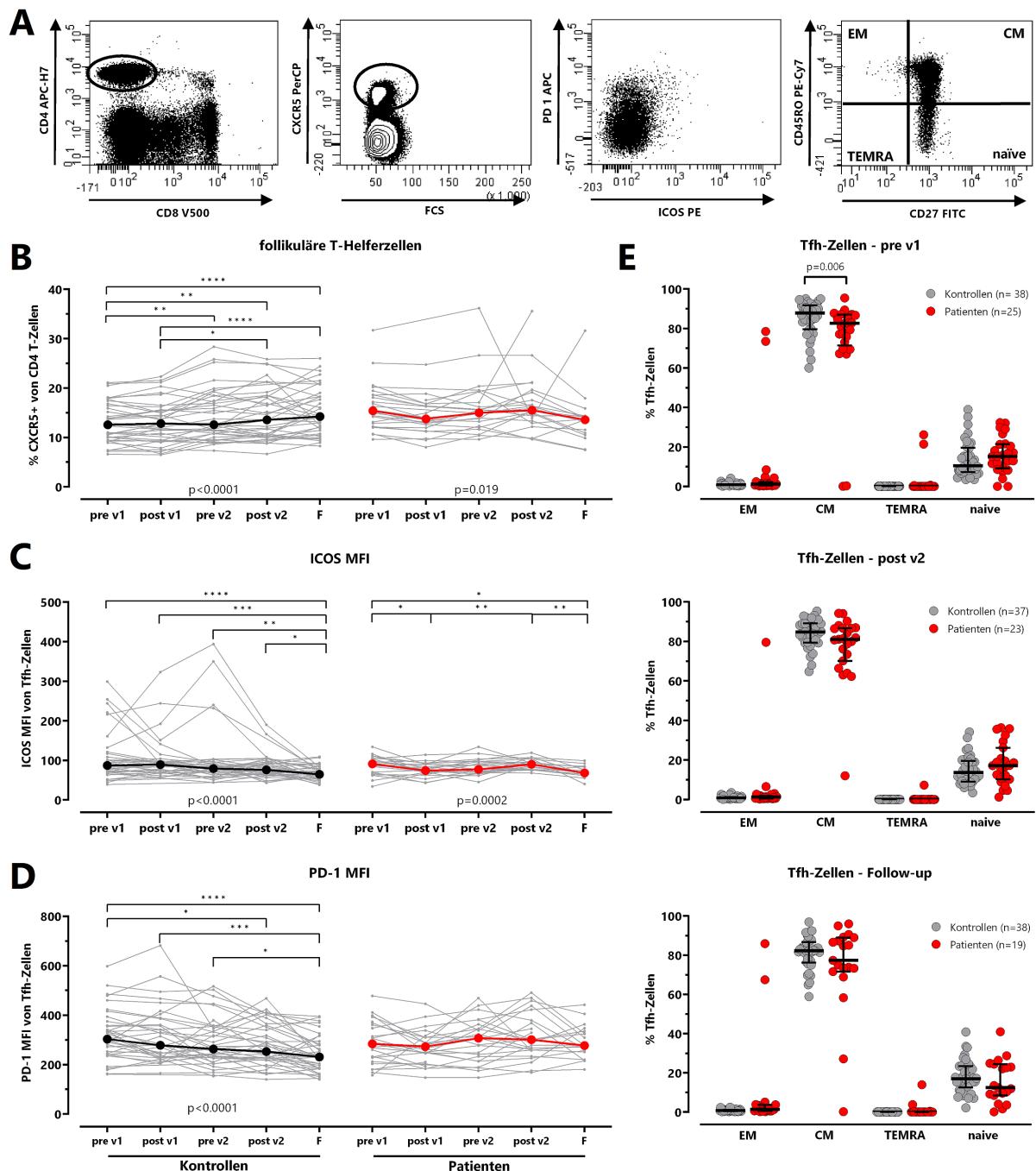


Abbildung 26 Charakterisierung der follikulären T-Helferzellen (A) Repräsentative Punktdiagramme und Konturdiagramme von follikulären T-Helferzellen (Tfh), die als CXCR5⁺ CD4 T-Zellen identifiziert wurden. Die Tfh-Zellen wurden auf die Expression von PD-1 und ICOS untersucht und die Differenzierung in naive, zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CM), Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (EM) und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (TEMRA) wurde anhand von CD45RO und CD27 bestimmt. (B) Der prozentuale Anteil der Tfh-Zellen innerhalb der CD4 T-Zellen und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von (C) ICOS und (D) PD-1 wurden bei Kontrollen (schwarz) und Dialysepatienten (rot) im zeitlichen Verlauf bestimmt. Die dicken Linien stellen Mediane dar und der Friedman-Test mit Dunn Post-Test wurde für die statistischen Analysen durchgeführt. (E) Der Differenzierungsstatus der Tfh-Zellen vor erster Impfung, nach zweiter Impfung und nach einem Jahr (Follow-up) wurde bei Kontrollen

(grau) und bei Patienten (rot) analysiert. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. ICOS, induzierbarer T-Zell-Kostimulator; PD-1, Programmed Cell Death Protein 1. * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$; **** für $p < 0,0001$. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

5.1.11 Höherer Anteil an naiven B-Zellen bei Dialysepatienten

B-Zellen gelten als Bindeglied zwischen dem humoralen und dem zellulären Arm des adaptiven Immunsystems. Durch Aktivierung können sich B-Zellen zu Plasmablasten entwickeln, welche in der Lage sind Antikörper zu sezernieren. In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der B-Zell-Subpopulationen stimulationsunabhängig. Zunächst wurden die B-Zellen anhand der Marker CD19 und CD3 als $CD19^+$ und $CD3^-$ Lymphozyten identifiziert. In einem weiteren Schritt lassen sich die B-Zellen auf Basis der Marker IgD und CD27 in naive B-Zellen (IgD^+ , $CD27^-$), *non switched* (IgD^+ , $CD27^+$) und *switched* (IgD^- , $CD27^+$) Gedächtnis-B-Zellen unterteilen. Letztere wurden für die Marker CD38 und CD27 untersucht und Plasmablasten ($CD38^+$, $CD27^+$) wurden innerhalb dieser Population identifiziert (Abbildung 27A).

Sowohl bei Dialysepatienten als auch bei Kontrollpersonen war der Prozentsatz der Plasmablasten innerhalb der B-Zellen gering und blieb im zeitlichen Verlauf stabil, ohne dass es zu einer durch Impfung bedingten Dynamik kam (Kontrollen: $p=0,901$; Patienten: $p=0,063$, Abbildung 27B). Bei der Analyse der Verteilung der Subpopulationen im Zeitverlauf zeigte sich, dass die meisten B-Zellen zu allen Zeitpunkten einen naiven Phänotyp aufwiesen (Abbildung 27C). Interessanterweise war der Anteil der naiven B-Zellen bei den Dialysepatienten höher als bei den Kontrollen, was zwei Wochen nach der zweiten Impfung statistische Signifikanz erreichte ($p=0,045$). Im Gegensatz dazu wiesen Dialysepatienten während des gesamten Beobachtungszeitraums einen signifikant geringeren Anteil an *non switched* Gedächtnis-B-Zellen auf als die Kontrollgruppe (pre v1: $p=0,011$; post v2: $p=0,011$; Follow-up: $p=0,004$; Abbildung 27C).

ERGEBNISSE

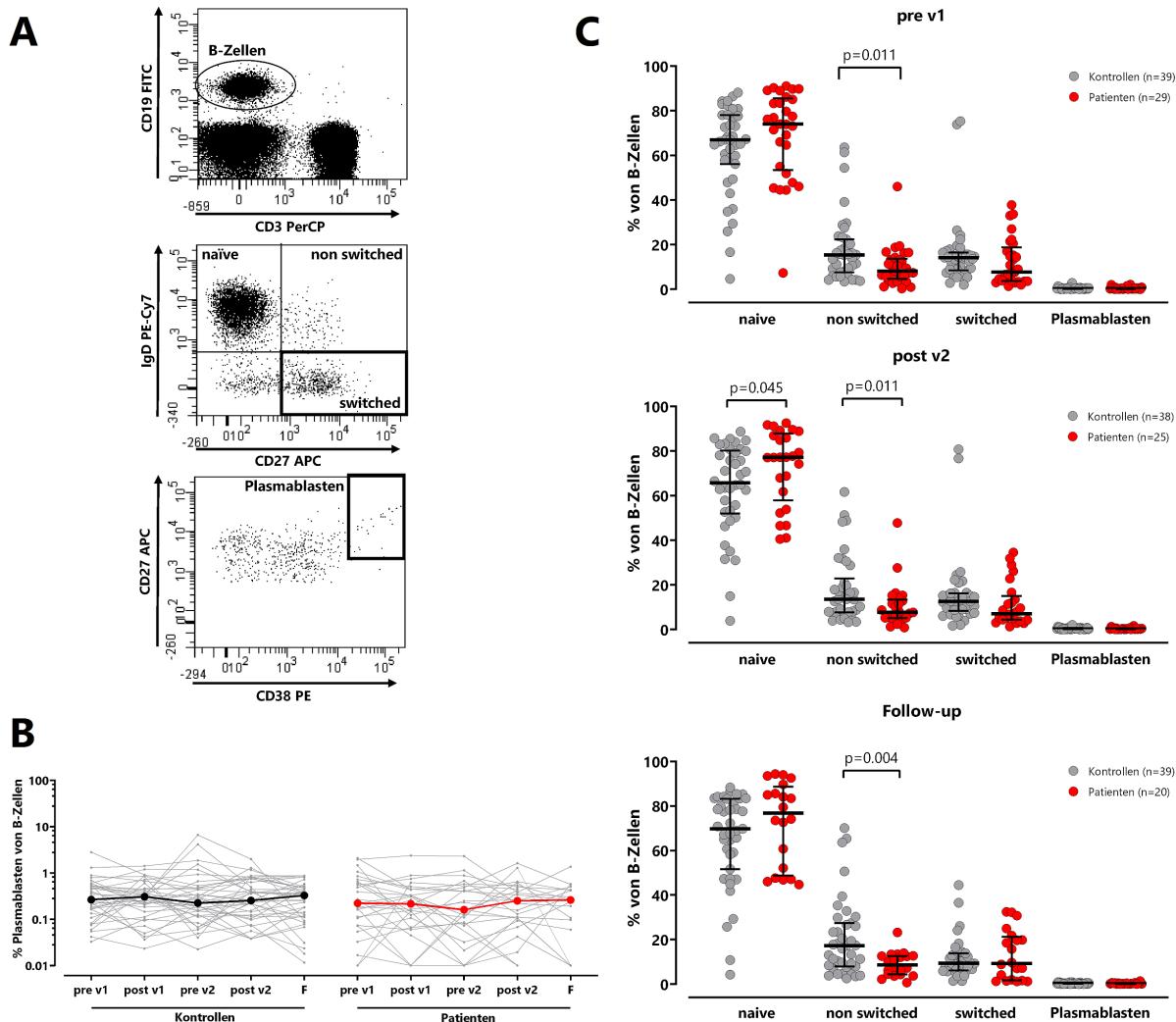


Abbildung 27 Höherer Anteil an naiven B-Zellen bei Dialysepatienten (A) Repräsentative Punktdiagramme von CD19⁺ B-Zellen, die anhand der Oberflächenmarker IgD und CD27 in naive B-Zellen (IgD⁺, CD27⁻), non switched (IgD⁺, CD27⁺) und switched (IgD⁻, CD27⁺) Gedächtnis-B-Zellen eingeteilt wurden. Plasmablasten wurden als CD38⁺ Zellen innerhalb der switched Gedächtnis-B-Zellen identifiziert. **(B)** Der Prozentsatz der Plasmablasten wurde bei den Kontrollen (links, grau) und den Patienten (rechts, rot) im zeitlichen Verlauf bestimmt. Die dicken Linien stellen Medianwerte dar. **(C)** B-Zell-Subpopulationen von Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) wurden vor der ersten Impfung (pre v1), nach der zweiten Impfung (post v2) und im Follow-up verglichen. Die Balken stellen Medianwerte mit Interquartilsbereichen dar. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

5.1.12 Humorale Immunantwort nach HZ/su-Impfung

5.1.12.1 Geringere VZV-spezifische IgG-Level bei Dialysepatienten

Zur Untersuchung der durch den Impfstoff induzierten humoralen Immunantwort wurden die VZV-spezifischen IgG-Level vor beiden Impfungen (pre v1, prev2), zwei Wochen nach beiden Impfungen (post v1, post v2) sowie 12 Monate nach der ersten Impfung (Follow-up) mittels ELISA bestimmt. Insgesamt waren nur 2 Dialysepatienten und 4 gesunde Kontrollpersonen vor

ERGEBNISSE

der ersten Impfung seronegativ (<80 IU/l), während alle anderen Probanden über der Nachweisgrenze lagen. Wie die spezifischen CD4 T-Zellen zeigten auch die VZV-spezifischen IgG-Antikörper in beiden Gruppen einen entsprechend der Impfung dynamischen Verlauf (Abbildung 28A). Zwei Wochen nach jeder Impfung wurde ein Anstieg der IgG-Konzentration bei den Dialysepatienten (post v1: 9139 (IQR 9582) IU/l; post v2: 10796 (IQR 12482) IU/l) und Kontrollen (post v1: 11843 (IQR 12231) IU/l; post v2: 16899 (IQR 14019) IU/l) beobachtet, wobei das Maximum jeweils nach der zweiten Impfung erreicht wurde. Die VZV-IgG-Level der Dialysepatienten waren zu diesem Zeitpunkt signifikant geringer als die der Kontrollen ($p=0,009$). Zudem wiesen Dialysepatienten auch im Follow-Up signifikant geringere VZV-spezifische IgG-Level auf ($p=0,0008$, Abbildung 28B). Folglich war auch die mediane Ratio der VZV-spezifischen IgG-Werte vom Ausgangswert bis zwei Wochen nach der zweiten Impfung bei Dialysepatienten geringer (5-fach) als bei den Kontrollen (9,1-fach; $p=0,002$), ebenso wie die Ratio vom Ausgangswert bis zur Nachuntersuchung (Patienten: 2,2-fach; Kontrollen: 5,4-fach; $p=0,004$) sowie der Anstieg von der ersten zur zweiten Impfung ($p=0,0003$, Abbildung 28C).

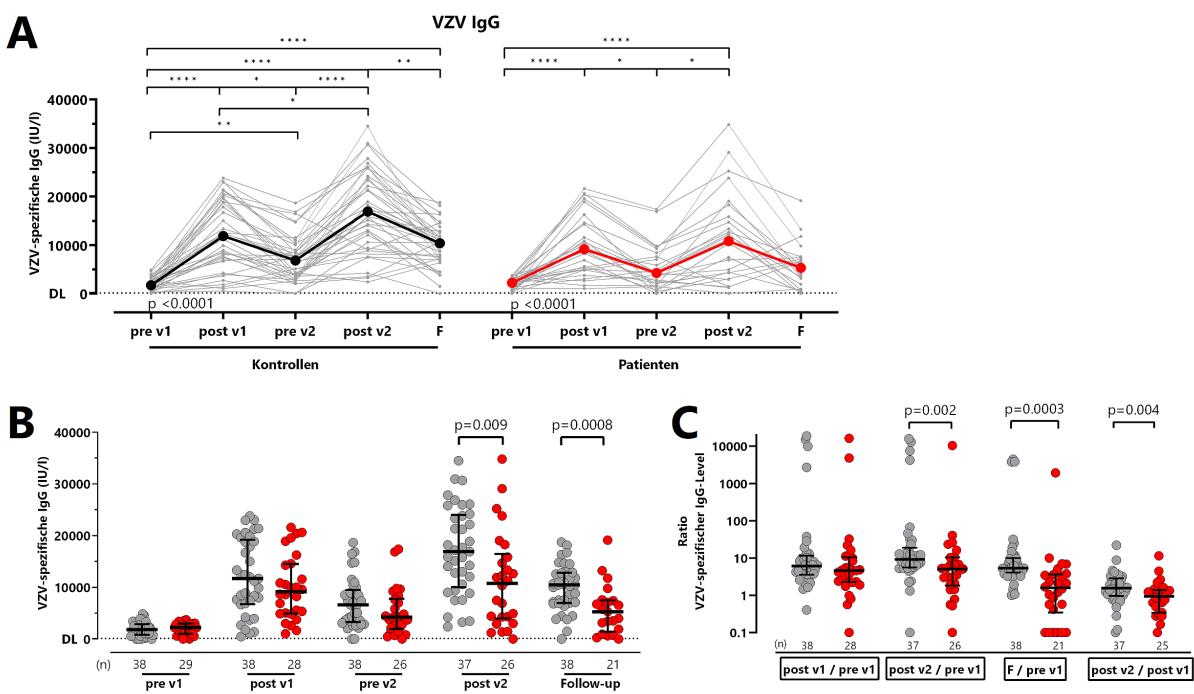


Abbildung 28 Geringerer Anstieg der VZV-spezifischen IgG-Level bei Dialysepatienten (A) VZV-IgG-Level von Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) wurden im zeitlichen Verlauf gemessen. Der Friedmann-Test mit Dunn Post-Test wurde zur statistischen Auswertung herangezogen. Dicke Linien stellen die Mediane dar. (B) Vergleich der VZV-spezifischen IgG-Level zwischen beiden Gruppen zu jedem Zeitpunkt. (C) Für jede Person wurde der Anstieg der VZV-spezifischen IgG-Level nach erster und zweiter Impfung und im Follow-up (F) im Vergleich zum Ausgangswert sowie zwischen erster und zweiter Impfung berechnet (post v1/pre v1, post v2/pre v1, Follow-up/

pre v1 und post v2/post v1). Die Statistik wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$; **** für $p < 0,0001$. VZV, Varizella-Zoster-Virus, Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

5.1.12.2 VZV-spezifische Neutralisationsfähigkeit der Antikörper bei Dialysepatienten geringer

Die neutralisierende Aktivität von Antikörpern gilt als wichtige Eigenschaft zur Verhinderung von Infektionen. Um die neutralisierende Aktivität VZV-spezifischer Antikörper nach HZ/su-Impfung zu untersuchen, wurden hierzu Versuche in Kooperation mit dem Labor Enders in Stuttgart durchgeführt. Die neutralisierende Aktivität wurde vor der ersten Impfung (pre v1), zwei Wochen nach zweiter Impfung (post v2) und 12 Monate nach erster Impfung (Follow-up) bestimmt. In Abbildung 29A sind repräsentative Beispiele des Neutralisationstests ohne VZV-Infektion der Zellen (aufgrund ausreichender Konzentration an neutralisierenden Antikörpern, links) sowie mit Infektion (rechts) dargestellt. Vor der ersten Impfung lag der neutralisierende Antikörpertiter von 17 Kontrollen und 5 Dialysepatienten unterhalb des nachweisbaren Bereichs. Die durch die Impfung induzierten neutralisierenden Antikörpertiter erreichten in beiden Gruppen nach der zweiten Impfung ihr Maximum, wobei hier die Titer aller Probanden über der Nachweigrenze lagen. Trotz eines anschließenden Rückgangs war die neutralisierende Aktivität bei der Nachuntersuchung immer noch höher als vor der ersten Impfung (Abbildung 29B). Jeweils eine Person in beiden Gruppen lag im Verlaufswert 12 Monate nach erster Impfung unter der Nachweigrenze. Obwohl keine signifikanten Unterschiede in der neutralisierenden Aktivität zwischen den beiden Gruppen gefunden wurden (Abbildung 29C), zeigten Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollprobanden einen weniger stark ausgeprägten Anstieg der neutralisierenden Aktivität vom Ausgangswert bis zwei Wochen nach der zweiten Impfung ($p=0,006$) sowie vom Ausgangswert bis zum Follow-up ($p=0,003$, Abbildung 29D).

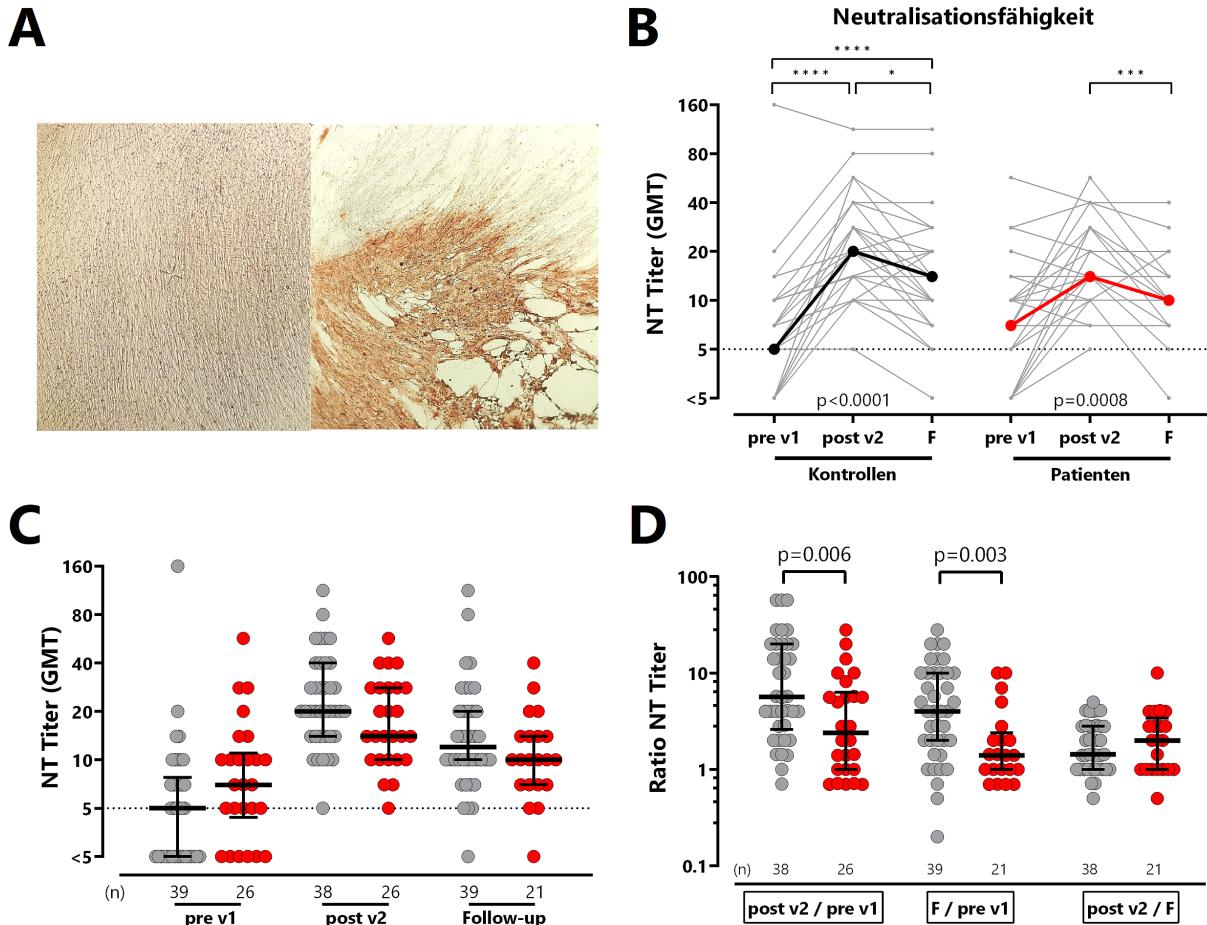


Abbildung 29 Die neutralisierende Aktivität VZV-spezifischer Antikörper steigt nach HZ/su-Impfung bei Dialysepatienten und Kontrollen **(A)** Exemplarische Darstellung der mit dem Probandenserum (post v2) inkubierten Zellkultur ohne VZV-Infektion (links, bei ausreichender Neutralisation) und mit VZV-Infektion (rechts, unzureichende Neutralisationsfähigkeit). **(B)** Die VZV-spezifische Neutralisierung bei Kontrollen (schwarz) und Dialysepatienten (rot) ist vor erster Impfung (pre v1), nach zweiter Impfung (post v2) und nach einem Jahr (Follow-up) dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit dem Friedman-Test mit Dunn Post-Test durchgeführt. Die dicken Linien stellen die Mediane dar. **(C)** Vergleich der neutralisierenden Aktivität zwischen beiden Gruppen und **(D)** der Ratio, berechnet nach zweiter Impfung und im Follow-up im Vergleich zur ersten Impfung sowie zwischen zweiter Impfung und Follow-up. Statistische Analysen der Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen wurden mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt und die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$; **** für $p < 0,0001$. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

Anhand einer Korrelationsmatrix wurde die Beziehung zwischen den Größenordnungen von impfstoffinduziertem IgG, neutralisierender Aktivität, CD4 T-Zellen und proliferativer Kapazität in beiden Gruppen nach der zweiten Impfung untersucht. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen den VZV-spezifischen IgG-Level und der neutralisierenden Aktivität sowohl bei den Kontrollen ($r=0,48$; $p=0,002$) als auch bei den Patienten ($r=0,62$; $p=0,008$) festgestellt. Interessanterweise zeigten beide Gruppen auch eine Korrelation zwischen der Proliferationsfähigkeit der VZV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen (Kontrollen: $r=0,53$; $p=0,009$; Patienten: $r=0,5$; $p=0,017$; Abbildung 30), wohingegen zwischen VZV-spezifischen

ERGEBNISSE

CD4 T-Zellen und der proliferativen Kapazität von CD4 T-Zellen sowohl bei Dialysepatienten ($p=0,057$) als auch bei Kontrollen ($p=0,051$) nur eine Tendenz zu erkennen war.

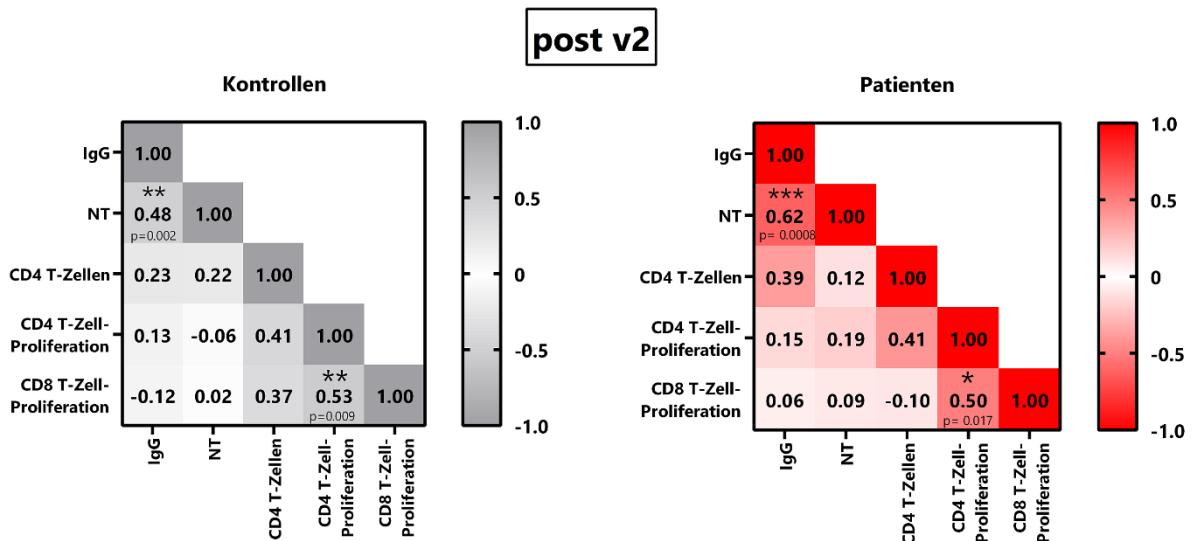


Abbildung 30 Korrelation von VZV-spezifischen IgG und neutralisierender Antikörper-Aktivität sowie der Proliferationsfähigkeit von CD4 und CD8 T-Zellen Korrelationsmatrix zwischen dem Prozentsatz der impfinduzierten VZV-spezifischen CD4 T-Zellen, den IgG-Leveln, der neutralisierenden Aktivität und dem prozentualen Anteil der proliferierenden VZV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen bei Kontrollen (links, grau) und Dialysepatienten (rechts, rot) nach 2. Impfung. Die Korrelationskoeffizienten wurden nach dem zweiseitigen Spearman-Test berechnet und mit einem Farbcode dargestellt. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

5.1.13 Geringere Reaktogenität bei Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollen

Impfstoffe können in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung unterschiedlich reaktogen wirken. Zudem können individuelle Empfindungen, die Einnahme von Medikamenten oder Durchführung von Therapien einen Einfluss auf die Impfreaktionen haben. Daher wurden impfstoffassoziierte unerwünschte Ereignisse und Beschwerden in der ersten Woche nach beiden Impfungen anhand von Selbstauskünften mit Hilfe eines Fragebogens zwischen Patienten und Kontrollen verglichen. Im Allgemeinen wurden beide Impfungen von den Probanden gut vertragen. Am häufigsten berichteten die Probanden von Schmerzen an der Injektionsstelle, gefolgt von Rötungen an der Injektionsstelle und Müdigkeit. Hingegen gaben weder Kontrollprobanden noch Dialysepatienten Fieber über 38,5°C an (Abbildung 31A). Mehrheitlich berichteten Probanden beider Gruppen über die Kombination von lokalen und systemischen Beschwerden sowohl nach der ersten Impfung (Patienten: 47,7 %; Kontrollen: 61,6 %) als auch nach der zweiten Impfung (Patienten: 35,7 %; Kontrollen: 57,9 %, Abbildung 31B).

ERGEBNISSE

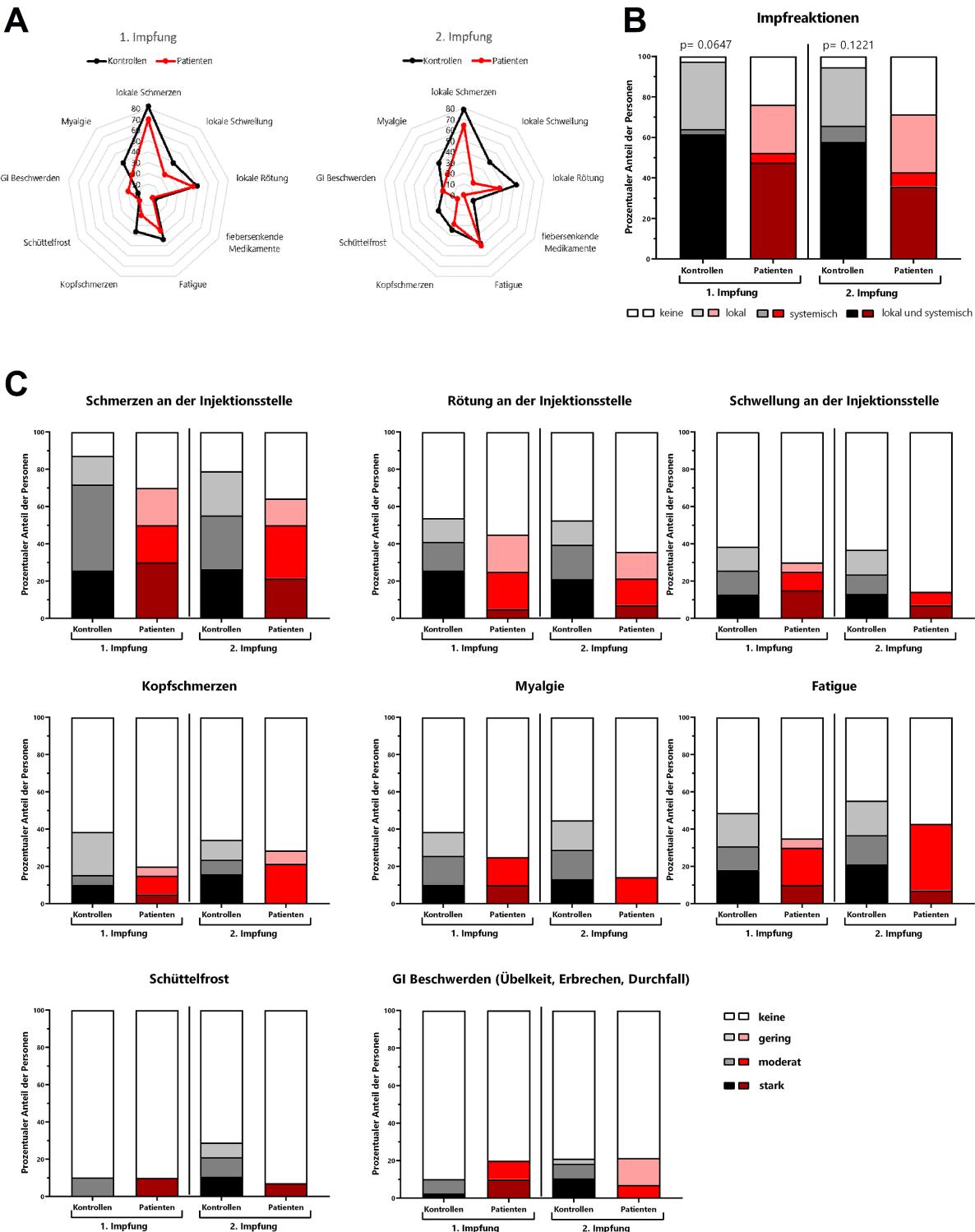


Abbildung 31 Geringere Reaktogenität bei Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollen Die Reaktogenität innerhalb der ersten Woche nach jeder Impfstoffdosis wurde anhand eines standardisierten Fragebogens von den Probanden selbst erfasst. **(A)** Die Verteilung lokaler und systemischer Beschwerden bei gesunden Kontrollen (schwarz) und Dialysepatienten (rot). Dargestellt ist jeweils der Prozentsatz der Personen mit den entsprechenden Beschwerden. **(B)** Angegeben ist der Prozentsatz der Probanden, die keine, nur lokale, nur systemische Beschwerden oder beides hatten. **(C)** Die von den Probanden wahrgenommenen Impfreaktionen wurden in eine Rangfolge gebracht und nach Schweregrad klassifiziert. Die Vergleiche zwischen den beiden Gruppen wurden mit dem χ^2 -Test analysiert. GI, Gastrointestinal, Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2024).

ERGEBNISSE

Insgesamt berichteten Dialysepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Impfung über weniger lokale, systemische oder lokale und systemische Beschwerden. Während die meisten gesunden Probanden ähnlich häufige Beschwerden nach erster und zweiter Impfung angaben, traten Beschwerden, mit Ausnahme von Müdigkeit und Kopfschmerzen, bei Dialysepatienten nach der zweiten Impfung tendenziell seltener auf (Abbildung 31C). Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse wurden von keinen Probanden gemeldet.

5.1.14 Unterschiedliche Immunogenität der HZ/su Impfung bei Patienten mit Multipler Sklerose

Im Folgenden wurde die VZV-spezifische Immunantwort nach HZ/su-Impfung bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) unter verschiedenen krankheitsmodulierenden Therapie-Formen untersucht. Hierfür wurden von 28 Patienten unter B-Zell depletierender anti-CD20-Therapie ($58,4 \pm 5,2$ Jahre) und 7 Patienten unter S1P-Therapie ($55,5 \pm 4,7$ Jahre, Tabelle 22) vor der ersten Impfung sowie zwei Wochen nach der zweiten Impfung Vollblut abgenommen. Die durch den HZ/su Impfstoff induzierten VZV-spezifische T-Zellen und Antikörper wurden charakterisiert und im Vergleich zu den bereits eingeschlossenen 39 gesunden Kontrollen analysiert.

Tabelle 22 Demografie von MS-Patienten unter anti-CD20 oder S1P-Therapie und gesunde Kontrollen

	anti-CD20	S1P	Kontrollen	p-Wert
Anzahl	28	7	39	
Alter in Jahren, MW±StabW	$58,4 \pm 5,2$	$55,5 \pm 4,7$	$67,9 \pm 8,2$	<0,0001 [§]
Geschlecht, n (%) weiblich	19 (67,9)	5 (71,4)	24 (61,5)	0,806 [†]
männlich	9 (32,1)	2 (28,6)	15 (38,5)	

[§]einfaktorieller ANOVA mit Tukey's Post-Test, [†] χ^2 -Test

Erste Ergebnisse zeigen, dass es bei MS-Patienten die eine anti-CD20-Therapie erhielten zu einem signifikanten Anstieg der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach der zweiten Impfung kam ($p < 0,0001$, Abbildung 32A), wie es bereits bei den Kontrollen und Dialysepatienten beobachtet wurde. Auch hier konnte nur eine schwache Induktion VZV-spezifischer CD8 T-Zellen detektiert werden. Bei Patienten die S1P-Modulatoren einnahmen wurden ebenfalls alle Proben bezüglich der Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort untersucht. Jedoch konnte aufgrund der geringen Gesamt-T-Zellzahlen keine zuverlässige Aussage zur VZV-spezifischen T-Zell-Antwort

ERGEBNISSE

getroffen werden, weshalb diese Werte nicht dargestellt wurden. Es wurden lediglich die Frequenzen SEB-reaktiver T-Zellen dargestellt, welche sich sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen zu den beiden Zeitpunkten ähnlich verhielten (Abbildung 32B). Patienten unter anti-CD20-Therapie wiesen im Vergleich zu Kontrollen tendenziell geringere VZV-spezifische CD4 T-Zell-Frequenzen nach der zweiten Impfung auf ($p=0.051$, Abbildung 32C). Der Anstieg der T-Zell Frequenz (Ratio von post v2/pre v1) unterschied sich hingegen nicht zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 32D).

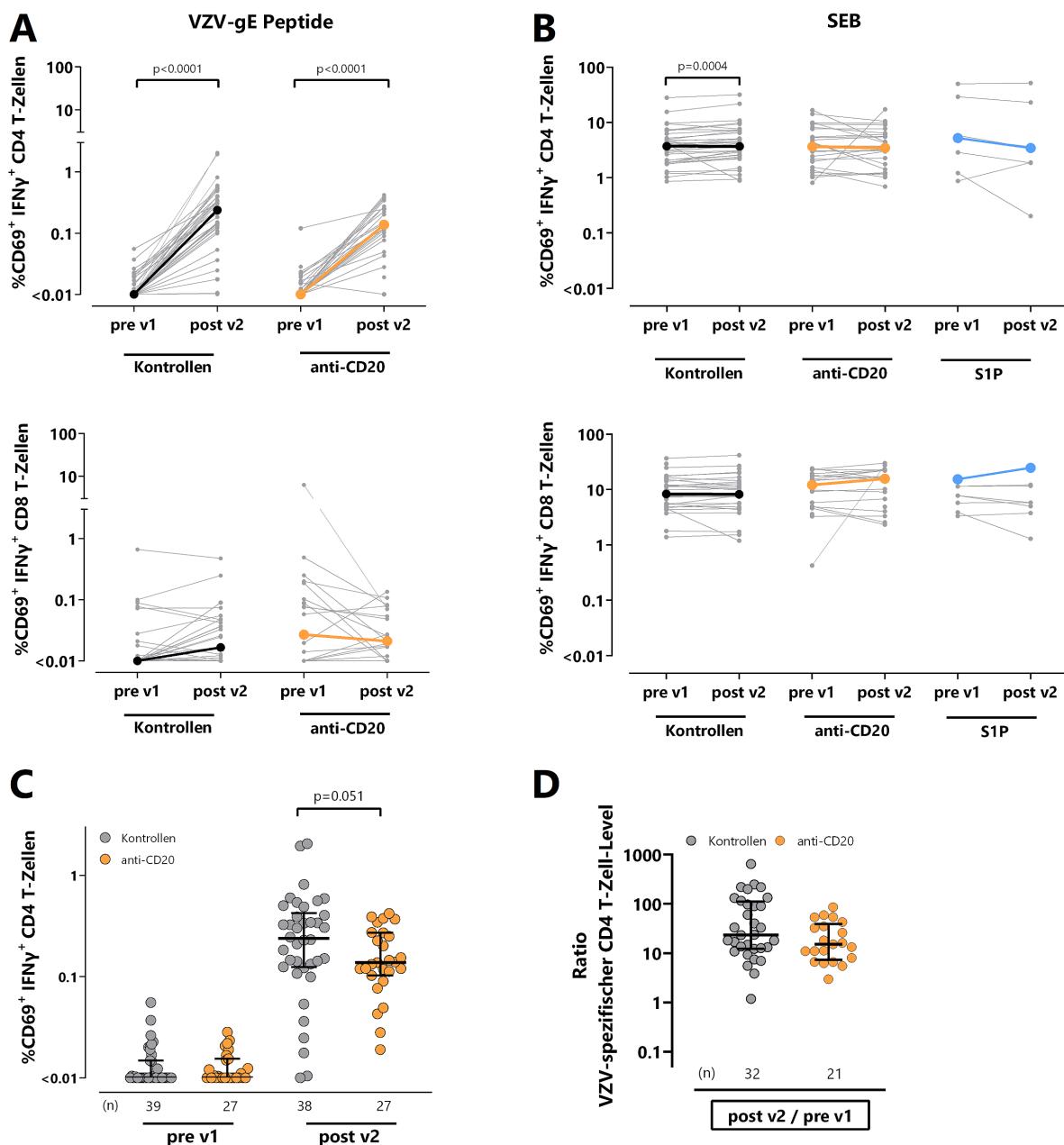


Abbildung 32 Induktion von VZV-spezifischen T-Zellen bei MS-Patienten nach HZ/su-Impfung Vollblut von Kontrollpersonen und MS-Patienten wurde mit überlappenden VZV-gE Peptiden stimuliert. SEB diente als

ERGEBNISSE

Positivkontrolle, DMSO als Negativkontrolle. Reaktive Zellen wurden anhand der Ko-Expression von CD69 und IFN γ identifiziert. **(A)** Frequenz VZV-spezifischer CD4 (oben) und CD8 T-Zellen (unten) nach Abzug der entsprechenden Negativkontrolle und **(B)** der SEB-reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen von Kontrollen und MS-Patienten vor erster Impfung und zwei Wochen nach zweiter Impfung. Von MS-Patienten unter S1P-Therapie wurden alle Messungen durchgeführt, jedoch aufgrund zu geringer Gesamt-T-Zell-Zahlen nur Daten nach SEB-Stimulation dargestellt. Die dicken Linien stellen Mediane dar. Zur statistischen Auswertung wurde ein Wilcoxon-Test durchgeführt. **(C)** Vergleich der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenz von Kontrollen (grau) und Patienten mit anti-CD20-Therapie (orange). Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. **(D)** Für jeden Probanden wurde die Ratio der VZV-gE spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen I nach zweiter Impfung Vergleich zum Ausgangswert (post v2/pre v1) berechnet. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. IFN, Interferon; S1P, Sphingosin1-Phosphat-Rezeptormodulatoren; VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

Zusätzlich wurden VZV-spezifische CD4 T-Zellen nach der zweiten Impfung bezüglich der CTLA-4 Expression und des Zytokinprofils untersucht. Bei der Expression von CTLA-4 auf reaktiven CD4 T-Zellen konnte zwischen Patienten unter anti-CD20-Therapie und Kontrollen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 33). Zudem wurde eine Multifunktionalität der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen, gekennzeichnet durch die Expression von IFN γ , IL-2 und TNF α beobachtet, wobei nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen im Zytokinprofil zu erkennen waren (Abbildung 33B).

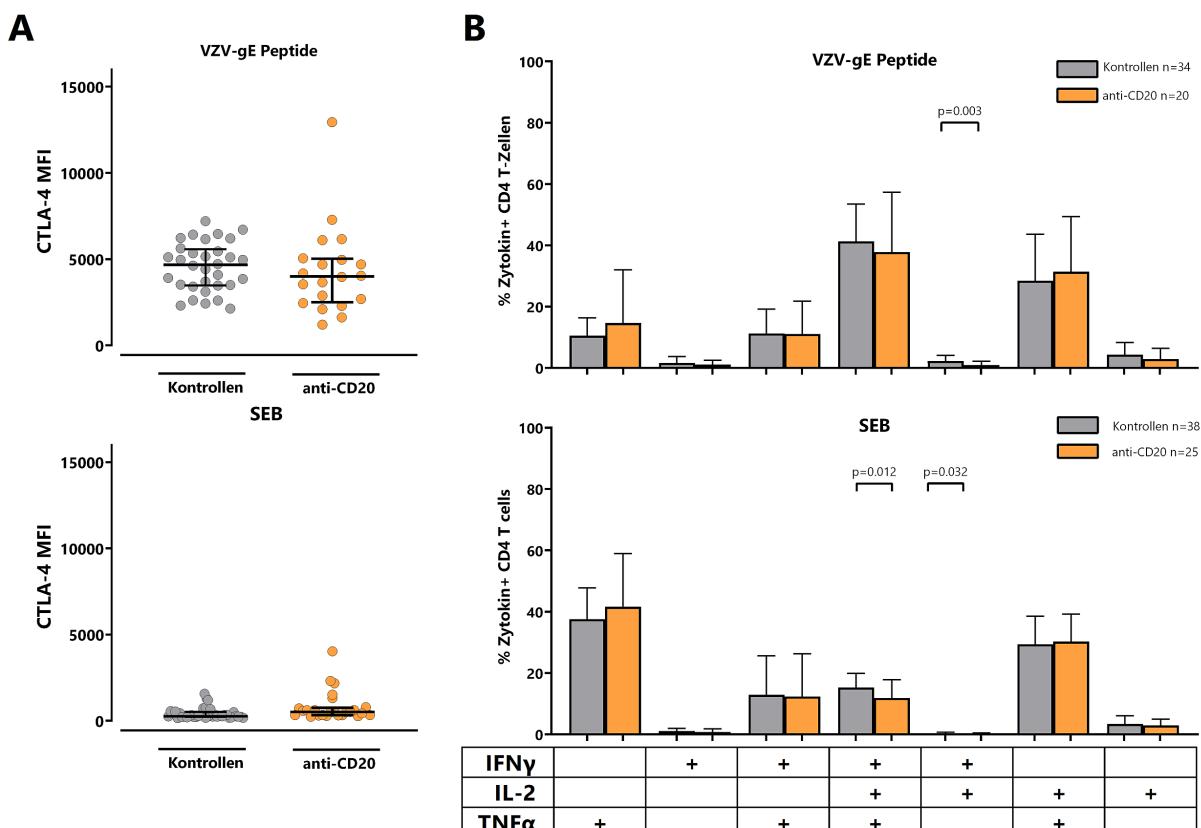


Abbildung 33 Keine signifikanten Unterschiede in der CTLA-4 - und Zytokinexpression in VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach zweiter Impfung bei Patienten unter anti-CD20-Therapie im Vergleich zu Kontrollen (A) Vergleich der CTLA-4-MFI von VZV (oben) und SEB (unten) reaktiven CD4 T-Zellen nach zweiter Impfung zwischen

ERGEBNISSE

Kontrollen (grau) und MS-Patienten mit anti-CD20-Therapie (orange). Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. Für eine robuste statistische Analyse wurden nur gepaarte Proben mit mindestens 20 CD69+IFNy+ CD4 T-Zellen eingeschlossen. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. **(B)** Zytokin-exprimierende CD4 T-Zellen wurden in 7 Subpopulationen unterteilt, je nachdem, ob sie IFNy, TNF α und IL-2 einzeln oder kombiniert exprimierten. Es wurden die Blutproben aller Personen analysiert. Für eine robuste Statistik wurden nur Proben mit mindestens 30 Zytokin-exprimierenden CD4-T-Zellen nach Abzug der entsprechenden Negativkontrolle berücksichtigt. Vergleich der Zytokinprofile von VZV-spezifischen (oben) und SEB-reaktiven CD4-T-Zellen (unten) bei Kontrollen und MS-Patienten mit anti-CD20-Therapie nach zweiter Impfung (post v2). Die Balken stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dar. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten t-Test durchgeführt. Die endgültige Stichprobengröße ist in jedem Feld angegeben. CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4; MFI, mediane Fluoreszenzintensität; IL-2, Interleukin 2; IFN, Interferon; TNF, Tumor-Nekrose-Faktor; VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B. Auf humoraler Ebene war bei Patienten unter anti-CD20-Therapie ein geringer, dennoch signifikanter Anstieg der VZV-spezifischen IgG-Level zu beobachten ($p=0,014$; Abbildung 34A). Bei Patienten unter S1P-Therapie war ebenfalls ein Anstieg der VZV-spezifischen IgG-Level zu erkennen, wenngleich dieser keine statistische Signifikanz erreichte. Dabei waren die Antikörper-Level nach der zweiten Impfung signifikant geringer als bei den gesunden Probanden ($p=0,016$; Abbildung 34B). Erwartungsgemäß wiesen Patienten unter anti-CD20-Therapie nach der zweiten Impfung die geringsten Antikörper-Level (2814 (IQR 1911) IU/l) im Vergleich zu Kontrollen (16899 (IQR 14019) IU/l; $p<0,0001$) und Patienten unter S1P-Therapie (6448 (IQR 5901) IU/l; $p=0,006$) auf.

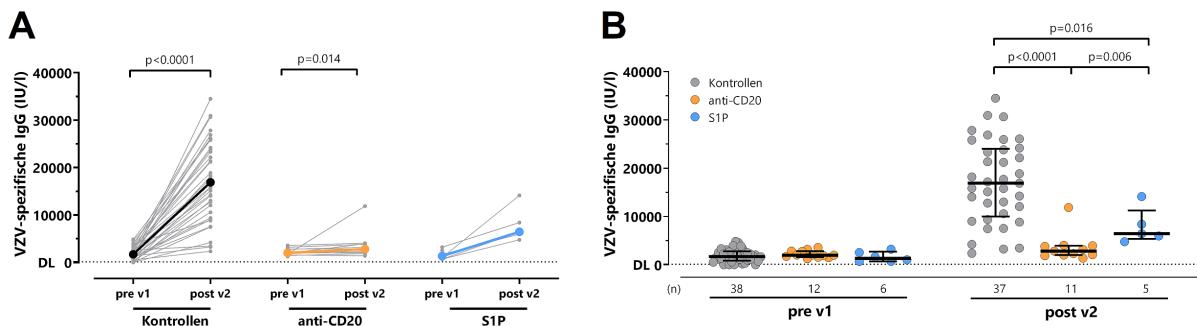


Abbildung 34 Schwache Induktion VZV-spezifischer IgG-Antikörpern bei MS-Patienten **(A)** VZV-IgG-Level von Kontrollen (grau, schwarz) und MS-Patienten unter anti-CD20-Therapie (orange) oder S1P-Therapie (blau) wurden vor erster Impfung (pre v1) und zwei Wochen nach zweiter Impfung (post v2) gemessen. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten in jeder Gruppe wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. Dicke Linien stellen die Mediane dar. **(B)** Vergleich der VZV-spezifischen IgG-Level zwischen den Gruppen zu beiden Zeitpunkten. Die Statistik wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. S1P, Sphingosin1-Phosphat-Rezeptormodulatoren; VZV, Varizella-Zoster-Virus.

5.1.15 Einfluss von immunsupprimierenden Medikamenten auf die Immunogenität nach HZ/su-Impfung

5.1.15.1 Probandenkollektiv

Zur Analyse, welchen Einfluss immunsupprimierende Medikamente auf die Immunogenität nach HZ/su-Impfung haben, wurden Proben von 19 Probanden untersucht. Die Probenentnahme fand mindestens 14 Tage nach der zweiten Impfung statt und kein Proband nahm immunsupprimierende Medikamente ein. Untersucht wurde der Einfluss der Immunsuppressiva, welche nach Transplantation eingesetzt werden, auf die Proliferationsfähigkeit und Kurzzeitstimulation, sowie der Einfluss von Medikamenten gegen rheumatoide Erkrankung (Biologika) in der Kurzzeitstimulation (Tabelle 23).

Tabelle 23 Probandenkollektiv zur Untersuchung des Einflusses von immunsupprimierenden Medikamenten auf die Immunogenität nach HZ/su-Impfung

	Einfluss von Immunsuppressiva		Einfluss von Biologika
	Proliferationsfähigkeit	Kurzzeitstimulation	Kurzzeitstimulation
Anzahl, n	10	13	6
weiblich, n	6	9	4
männlich, n	4	4	2
Alter in Jahren, MW±StabW	67,55 ± 8,9	66,7 ± 7,9	67,1 ± 10,97
Abstand nach 2. Impfung	14 (0)	14 (0)	17,5 (83,75)

5.1.15.2 Calcineurininhibitoren und Steroid reduzieren Antigen-spezifische CD4 T-Zell-Frequenzen und Proliferationsfähigkeit

Menschen die Immunsuppressiva einnehmen, besitzen ein erhöhtes Risiko für Infektionen, wodurch sie auch zur Risikogruppe zählen, die häufiger und mit schweren Komplikationen einer VZV-Reaktivierung zu kämpfen haben. Zudem kann die Einnahme von Immunsuppressiva zu einem verringerten Aufbau einer impfinduzierten Immunantwort führen, sodass diese Risikogruppe weniger geschützt ist. Um die Auswirkungen von Immunsuppressiva auf die VZV-spezifische T-Zell-Antwort zu untersuchen wurden *in vitro* Experimente unter physiologischen Bedingungen mit Vollblut von 13 gesunden Probanden zum Zeitpunkt der maximalen Immunantwort nach 2. HZ/su-Impfung durchgeführt. Die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus sowie das Steroid Methylprednisolon wurden in jeweils drei verschiedenen Konzentrationsstufen (niedrig, mittel, hoch, Tabelle 7) sowie EtOH als Lösungsmittelkontrolle

ERGEBNISSE

dem Blut zugesetzt. Nach einer 1-stündigen Inkubation wurde das Blut mit überlappenden VZV-gE Peptiden oder SEB stimuliert. Die Quantifizierung der reaktiven CD4 T-Zellen erfolgte anhand der Ko-Expression von CD69 und IFNy mittels Durchflusszytometrie. Zur Untersuchung der Auswirkung auf die Proliferation wurde ein Proliferations-Assay mit CFDA-SE nach Isolation von PBMCs durchgeführt. Parallel zur Zugabe der Antigene VZV-gE und SEB wurden hier auch die Immunsuppressiva in den verschiedenen Konzentrationsstufen hinzupipettiert und anschließend für 7 Tage inkubiert. Die Ergebnisse der einzelnen Medikamente wurden innerhalb der Konzentrationsstufen zunächst gemittelt. Der inhibitorische Effekt der Immunsuppressiva bezieht sich prozentual auf den Anteil reaktiver CD4 T-Zellen in Relation zur Messung mit dem Lösungsmittel EtOH, welche auf 100% gesetzt wurde.

Alle untersuchten Immunsuppressiva verringerten die VZV-spezifische und SEB-reaktive CD4 T-Zell-Antwort (Abbildung 35A) sowie die Proliferationsfähigkeit (Abbildung 35B) der stimulierten Zellen. Dabei sank der prozentuale Anteil an reaktiven und proliferierten CD4 T-Zellen mit steigender Medikamentenkonzentration. Cyclosporin A und Tacrolimus riefen stärkere Effekte bei der Abnahme der Frequenz reaktiver CD4 T-Zellen in der Kurzzeitstimulation als Methylprednisolon hervor. Hingegen scheint Methylprednisolon insbesondere einen supprimierenden Einfluss auf die Proliferation VZV-spezifischer CD4 T-Zellen zu haben, da hier die stärkste Abnahme der proliferierten CD4 T-Zellen beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu war die Abnahme der SEB-reaktiven proliferierten CD4 T-Zellen bei Zugabe von Cyclosporin A und Tacrolimus größer. Bei der Proliferationsaktivität von VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen ist bereits bei mittlerer Konzentration aller Immunsuppressiva ein Plateau erreicht.

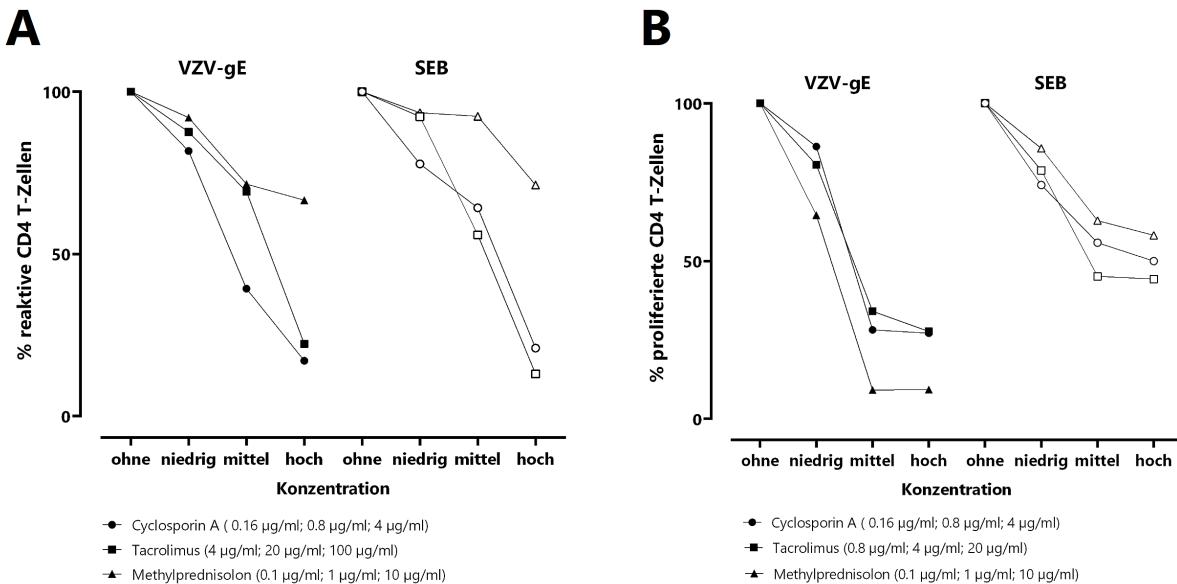


Abbildung 35 Calcineurininhibitoren und Steroide reduzieren VZV-spezifische Frequenzen von reaktiven und proliferierten CD4 T-Zellen. (A) Vollblut von 13 gesunden Probanden wurde *in vitro* mit den Immunsuppressiva Cyclosporin A (175, 800 und 4000 ng/ml, n=8), Tacrolimus (10, 50 und 250 ng/ml, n=10) und Methylprednisolon (100, 1000 und 10000 ng/ml, n=10) in den verschiedenen Konzentrationsstufen sowie EtOH als Lösungsmittelkontrolle inkubiert und anschließend jeweils mit VZV-gE Peptiden, SEB (Positivkontrolle) und DMSO (Negativkontrolle) stimuliert. Reaktive CD4 T-Zellen wurden anhand der Ko-Expression von CD69 und IFN γ quantifiziert. (B) Frisch isolierte PBMCs wurden mit den Immunsuppressiva Cyclosporin A, Tacrolimus und Methylprednisolon in verschiedenen Konzentrationsstufen sowie EtOH als Lösungsmittelkontrolle inkubiert und mit jeweils VZV-gE Peptiden, SEB (Positivkontrolle) und DMSO (Negativkontrolle) stimuliert, für 7 Tage kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte. Der inhibitorische Effekt der Immunsuppressiva bezieht sich prozentual auf den Anteil reaktiver CD4 T-Zellen in Relation zur Messung mit dem Lösungsmittel EtOH, welche auf 100% gesetzt wurde. VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

5.1.15.3 Geringer Einfluss von Biologika auf reaktive CD4 T-Zell-Frequenzen

In einen weiteren Versuch wurde analysiert, inwieweit Medikamente gegen rheumatoide Erkrankungen eine Auswirkung auf die durch Impfung induzierte VZV-spezifische Immunantwort haben. Hierfür wurde Vollblut von 6 Immungesunden exemplarisch mit den 6 Medikamenten Abatacept, Adalimumab, Etanercept, Tocilizumab, Rituximab und Tofacitinib in drei Konzentrationsstufen (niedrig, mittel und hoch, Tabelle 7) vorinkubiert und anschließend mit überlappenden VZV-gE Peptiden oder SEB stimuliert. VZV-spezifische CD4 T-Zellen wurden durchflusszytometrisch durch die Ko-Expression von CD69 und IFN γ quantifiziert. Zusätzlich wurde auch die Expression der Zytokine TNF α und IL-2 in Kombination mit CD69 untersucht. Als Negativkontrolle für die Medikamente wurde das Lösungsmittel H₂O dest. verwendet. In den *in vitro* Versuchen zeigten sich im Vergleich zu den nach Transplantation eingesetzten Immunsuppressiva nur eine minimale Reduzierung der VZV-spezifischen und SEB-reaktiven T-Zell-Frequenzen bei zunehmender Konzentration der Medikamente (Abbildung 36).

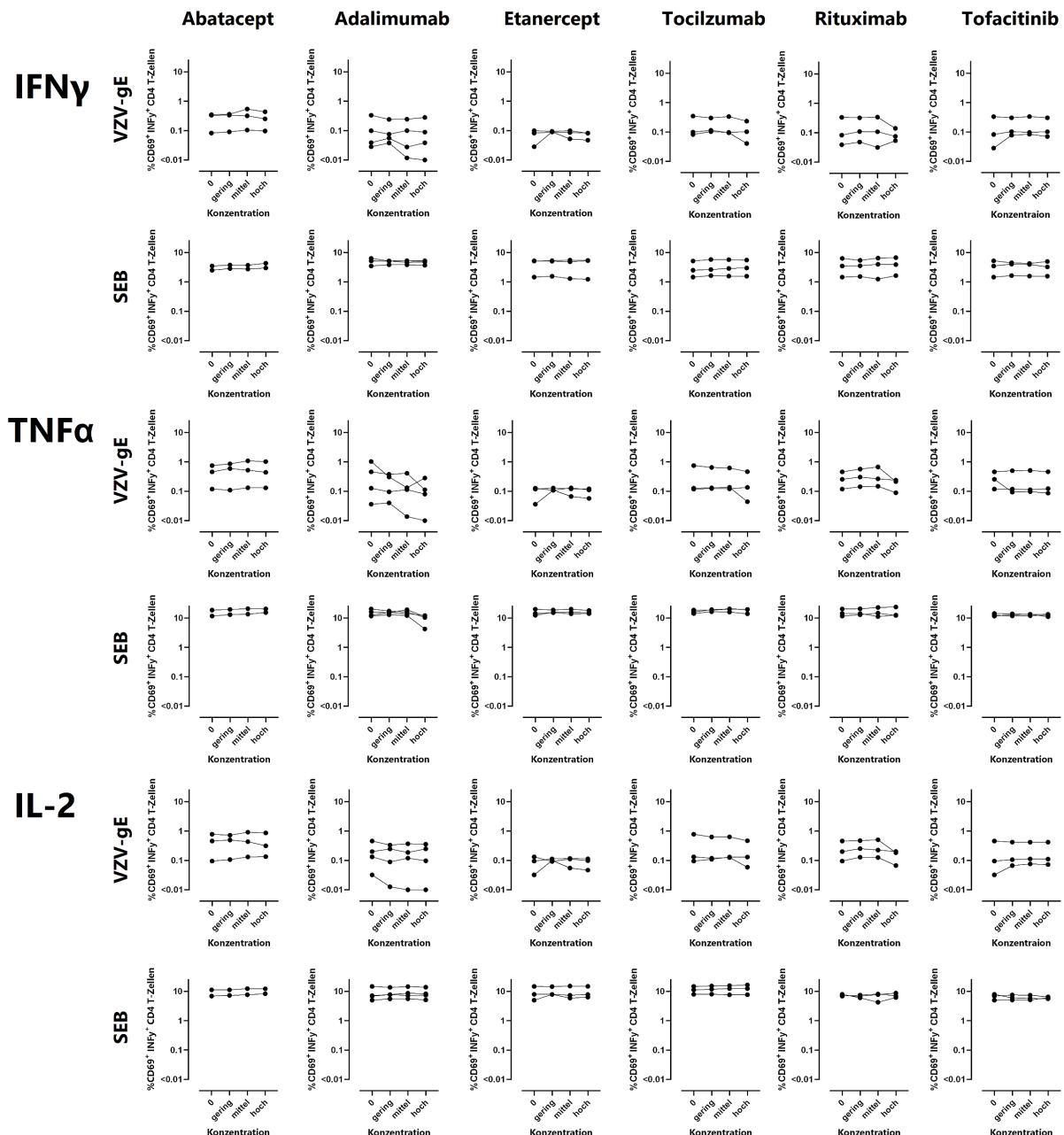


Abbildung 36 Geringer Einfluss von untersuchten Biologika auf Reaktivität der CD4 T-Zellen Vollblut von Immungesunden wurde mit den Medikamenten Abatacept, Adalimumab, Etanercept, Tocilizumab, Rituximab und Tofacitinib in unterschiedlichen Konzentrationsstufen inkubiert und mit VZV-gE (oben) oder SEB (unten) stimuliert. Reaktive CD4 T-Zellen wurden anhand der Ko-Expression von CD69 und der Zytokine IFN γ , TNF α oder IL-2 mittels Durchfluszytometrie quantifiziert. Die Beschriftung 0 entspricht H₂O dest., dem zugegebenen Lösungsmittel. Die mittlere Konzentration stellt den maximalen Plasmaspiegel dar, niedrig die 5-fach niedrigere und hoch die 5-fach höhere Konzentration des maximalen Plasmaspiegels dar. VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

5.1.16 Vergleich verschiedener VZV-Antigene

5.1.16.1 Unterschiede in der spezifischen T-Zell-Frequenz nach Stimulation mit verschiedenen VZV-Antigenen

Weiterhin sollte geklärt werden, inwieweit sich die Aktivierung VZV-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen VZV-Antigenen unterscheidet. Neben den VZV-gE Peptiden, deren Ergebnisse bereits ausführlich dargestellt wurden, erfolgte die Stimulation zudem mit VZV-Lysat aus infizierten Fibroblasten und dem VZV-gE Protein von GSK, welches auch in der Impfung verwendet wird. Als Negativkontrolle wurde für VZV-gE Protein das Lösungsmittel DMSO in entsprechender Verdünnung genutzt, für VZV-Lysat wurde nicht infiziertes Zelllysat von Fibroblasten verwendet. Wie bei den VZV-gE Peptiden konnte ein dynamischer Verlauf nach Stimulation mit VZV-Lysat und VZV-gE Protein beobachtet werden (Abbildung 37A). Interessanterweise wurden bereits vor erster Impfung höhere VZV-spezifische CD4 T-Zell-Frequenzen nach der Stimulation mit VZV-Lysat im Vergleich zu VZV-gE Peptiden und Protein detektiert. Jedoch waren die Anstiege der VZV-Lysat stimulierten CD4 T-Zellen nach zwei Wochen ähnlich stark ausgeprägt wie bei den Peptiden und dem Protein. Die gemessenen VZV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen waren über den gesamten Untersuchungszeitraum bei allen VZV-Antigen-Quellen auf niedrigem Niveau.

Bei Betrachtung der einzelnen Messzeitpunkte zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen in Bezug auf die VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen. Zwar wurde nach Stimulation mit dem VZV-gE Protein eine geringere CD4 T-Zell-Frequenz bei Dialysepatienten zwei Wochen nach zweiter Impfung (Patienten: (0,09 % (IQR 0,14 %), Kontrollen: 0,13 % (IQR 0,2 %), Abbildung 37B) beobachtet, was im Einklang mit dem Ergebnis der Stimulation mit den Peptiden steht. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,103$). Der Vergleich der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen nach Stimulation mit den einzelnen VZV-Stimuli auf dem Höchstlevel zum Zeitpunkt zwei Wochen nach zweiter Impfung zeigt, dass sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen nach Stimulation mit VZV-gE Peptiden signifikant höhere CD4 T-Zell-Frequenzen messbar waren als nach Stimulation mit VZV-gE Protein (Kontrollen: $p<0,0001$; Patienten: $p=0,001$, Abbildung 37C). Zudem wurden bei Kontrollen signifikant höhere Frequenzen der mit Peptiden stimulierten spezifischen CD4 T-Zellen beobachtet im Vergleich zum VZV-Lysat ($p<0,0001$). Im Gegensatz dazu waren die Anstiege

ERGEBNISSE

von VZV-gE Protein und Peptiden post v2/pre v1 deutlich höher als bei VZV-Lysat (Abbildung 37D).

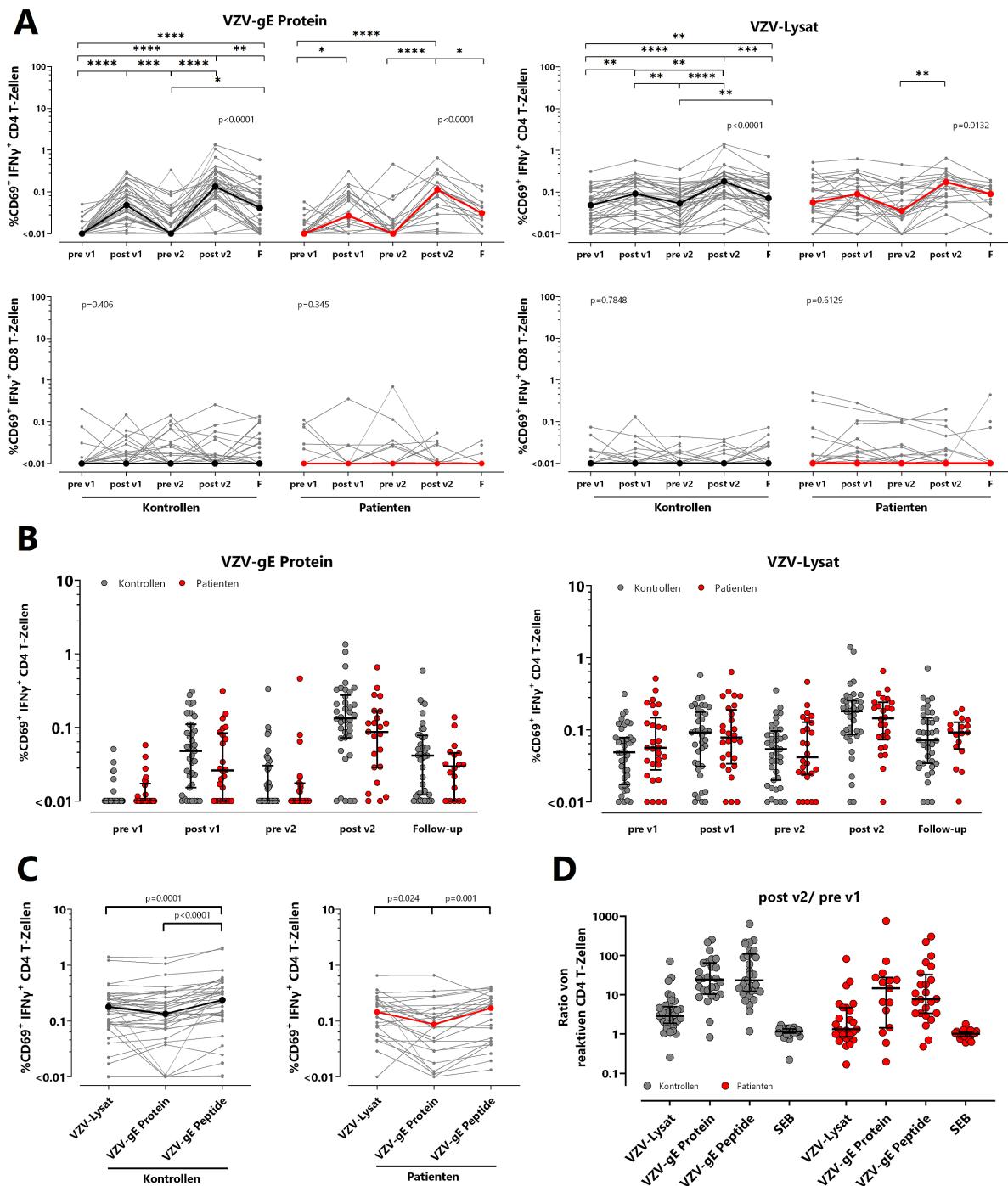


Abbildung 37 Durchflusszytometrische Analyse VZV-spezifischer CD4 T-Zellen von Dialysepatienten und Kontrollen im zeitlichen Verlauf (A) Spezifische CD4 T-Zellen wurden nach Stimulation mit dem VZV-gE Protein (links) und VZV-Lysat (rechts) anhand der Ko-Expression von CD69 und IFNy durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die Frequenzen nach Abzug der entsprechenden Negativkontrolle. Die dicken Linien stellen Mediane dar. Zur statistischen Auswertung wurde ein Friedman-Test mit Dunn Post-Test durchgeführt. (B) Vergleich der Proben von Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) zu den unterschiedlichen Analysezeitpunkten. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. (C) Vergleich der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenz von Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) nach Stimulation mit VZV-Lysat, VZV-gE Protein oder VZV-gE Peptide. (D) Ratio von reaktiven CD4 T-Zellen post v2/pre v1 für VZV-Lysat, VZV-gE Protein, VZV-gE Peptide und SEB.

ERGEBNISSE

Stimulation mit VZV-Lysat, VZV-gE Protein und Peptiden nach zweiter Impfung. Dicke Linien stellen die Medianwerte dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Friedmann-Test mit Dunn Post-Test. (**D**) Für jeden Probanden wurde die Ratio der VZV-gE spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen nach Stimulation mit VZV-Lysat, VZV-gE Protein, VZV-gE Peptiden und SEB nach zweiter Impfung im Vergleich zum Ausgangswert (post v2/pre v1) berechnet. * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$; **** für $p < 0,0001$. VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

Im Hinblick auf die CTLA-4 Expression VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach beiden Impfungen zeigte sich in beiden Gruppen sowohl nach Stimulation mit VZV-Lysat als auch mit VZV-gE Protein eine Zunahme der Expression (MFI) nach zweiter Impfung, die jedoch nur nach Stimulation mit VZV-Lysat bei den Kontrollen statistische Signifikanz erreichte ($p=0,014$; Abbildung 38A). Zusätzlich wurden hier Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten nach der ersten Impfung (post v1, $p=0,0498$; Abbildung 38B) beobachtet. Nach der zweiten Impfung wiesen mit VZV-gE Protein stimulierte CD4 T-Zellen interessanterweise eine höhere CTLA-4 MFI auf als die spezifischen CD4 T-Zellen, die mit Lysat oder Peptiden stimuliert wurden (Abbildung 38C). Aufgrund der geringen Anzahl reaktiver CD8 T-Zellen konnte bezüglich der CTLA-4 Expression dieser Zellen keine Aussage getroffen werden.

ERGEBNISSE

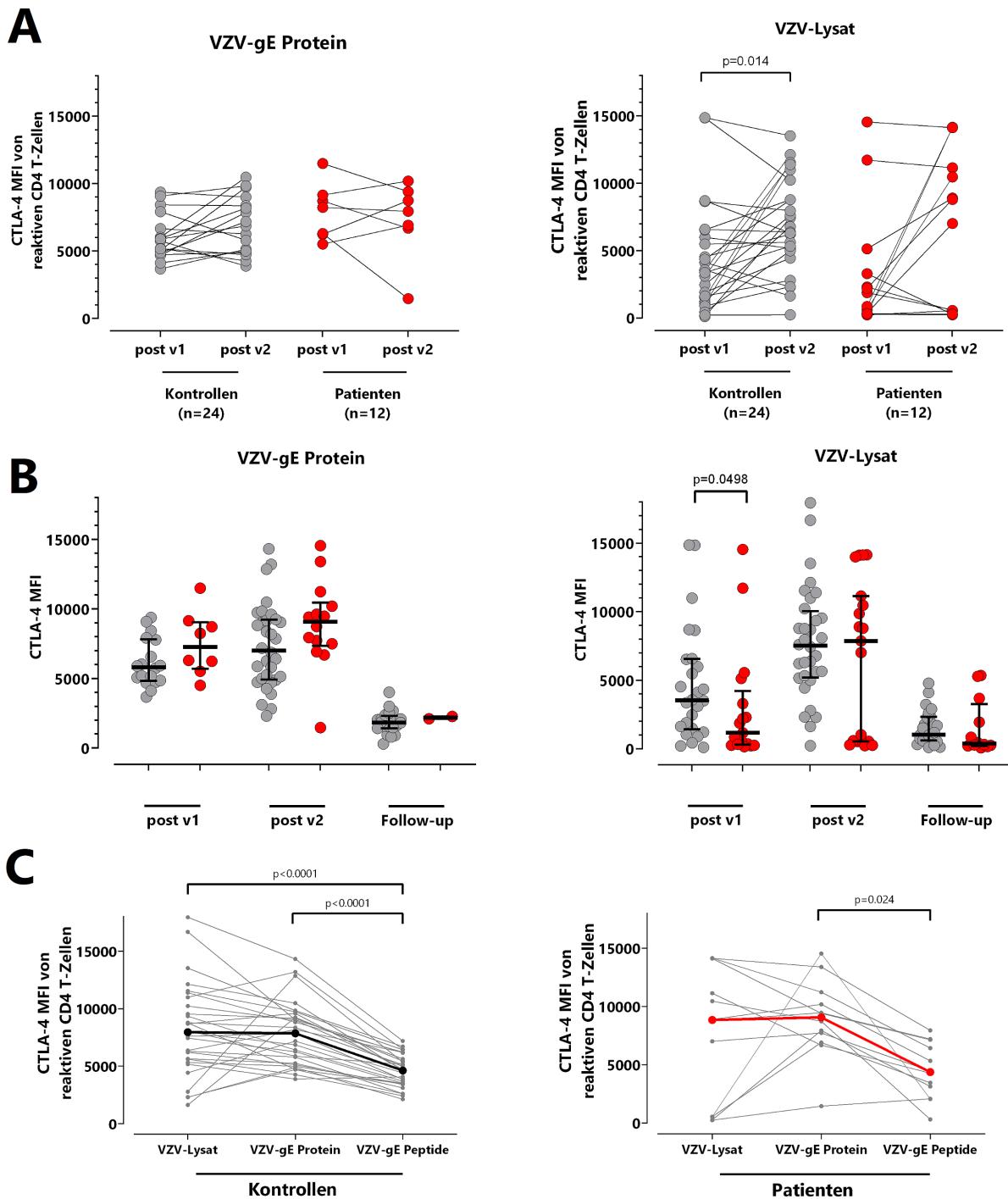


Abbildung 38 CTLA-4 Expression von VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen (A) CTLA-4 Expression von VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach Stimulation mit VZV-gE Protein (links) und VZV-Lysat (rechts) nach beiden Impfungen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. **(B)** Vergleich der CTLA-4 MFI von Kontrollen (grau) und Dialysepatienten (rot) zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. Der Mann-Whitney-Test wurde zur statistischen Auswertung verwendet. **(C)** Vergleich der CTLA-4 MFI nach zweiter Impfung zwischen den verschiedenen Antigen-Quellen (Lysat, Protein und Peptide). Dicke Linien stellen die Medianwerte dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Friedmann-Test mit Dunn Post-Test. CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4, MFI, mediane Fluoreszenzintensität; VZV, Varizella-Zoster-Virus.

5.1.16.2 Ähnliche Proliferationsaktivität VZV-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen VZV-Antigenen

Wie bei der Kurzzeitstimulation wurde zusätzlich die Proliferationsfähigkeit von T-Zellen nach Stimulation mit dem VZV-gE Protein und dem VZV-Lysat analysiert, wobei ein anderes VZV-Lysat als bei der Kurzzeitstimulation verwendet wurde. In Abbildung 39 sind die entsprechenden Reaktivitäten auf alle VZV-Antigene im zeitlichen Verlauf dargestellt. Es wurden Anstiege der proliferierten VZV-spezifischen T-Zellen nach Stimulation mit VZV-gE Protein nach beiden Impfungen sowohl bei CD4 als auch bei CD8 T-Zellen detektiert. Während VZV-Lysat bei Dialysepatienten einen ähnlichen Verlauf wie die beiden anderen VZV-Antigene induzierte, nahm der Anteil proliferierter CD4 (Abbildung 39A) und CD8 T-Zellen (Abbildung 39B) bei Kontrollen im zeitlichen Verlauf ab. Diese Beobachtung ist sehr wahrscheinlich auf einen Wechsel des VZV-Lysats zu einer neuen Charge zurückzuführen, die möglicherweise nicht die gleiche Konzentration an VZV-Antigenen aufweist. Da die gesunden Probanden mehrheitlich vor den Dialysepatienten rekrutiert und gemessen wurden, erfolgt hier die Stimulation zu den frühen Zeitpunkten mit der vermutlich höher konzentrierten ersten Charge, was zu einer höheren Proliferation VZV-spezifischer T-Zellen führte. Daher lassen sich die Ergebnisse weder mit denen der Dialysepatienten noch mit denen nach Stimulation mit anderen VZV-Antigenen vergleichen.

ERGEBNISSE

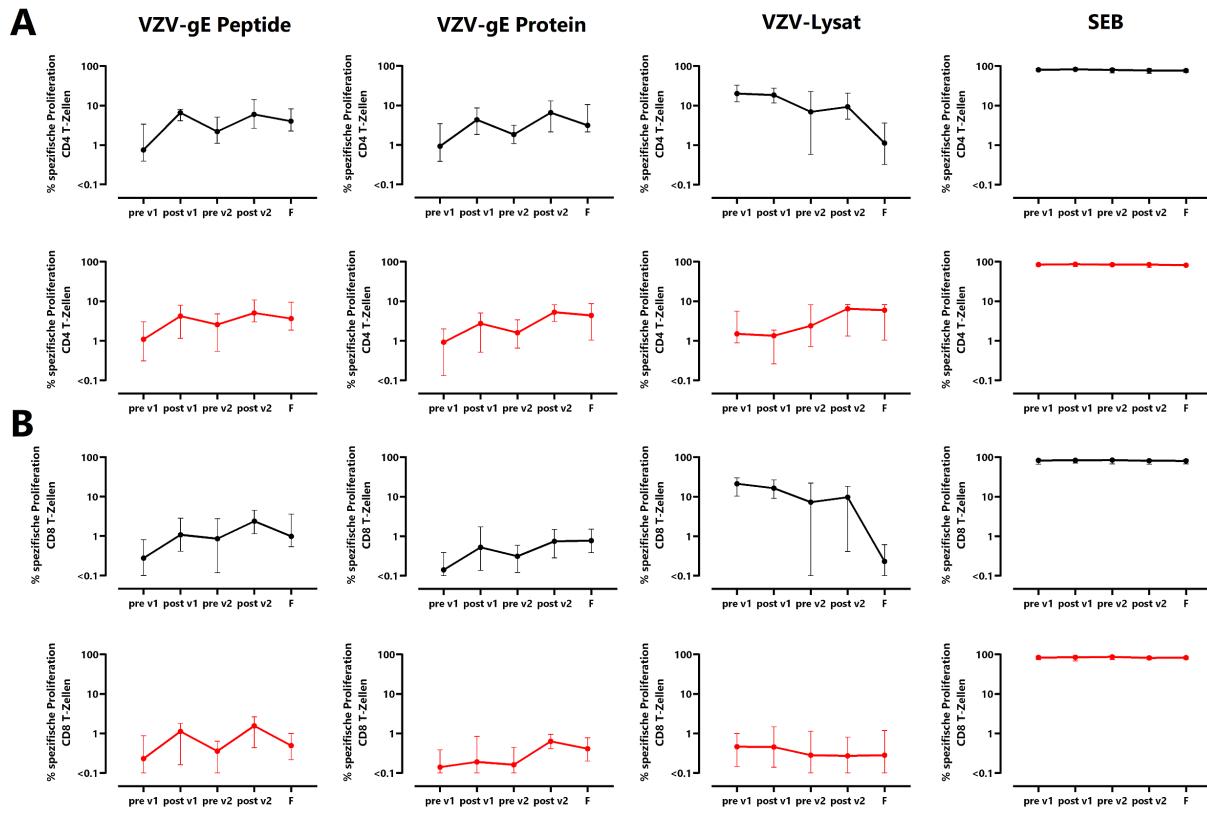


Abbildung 39 Dynamischer Verlauf der proliferierten T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen VZV-Antigenen Mediane mit Interquartilsbereichen der prozentualen Anteile proliferierter (A) CD4 und (B) CD8 T-Zellen nach 7-tägiger Stimulation mit den VZV-Antigenen VZV-gE Peptide, VZV-gE Protein und VZV-Lysat von Kontrollen (schwarz) und Patienten (rot) im zeitlichen Verlauf vor beiden Impfungen (pre v1, pre v2), zwei Wochen danach (post v1, post v2) und 12 Monate nach erster Impfung (Follow-up, F). SEB diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle für VZV-gE Peptide und Protein diente 0,56 % DMSO, für VZV-Lysat wurde nicht infiziertes Zelllysat verwendet. VZV, Varizella-Zoster-Virus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

5.1.17 HZ/su induziert keine HSV-spezifischen CD4 T-Zellen bei Dialysepatienten und Kontrollen

Da VZV eng mit den beiden Herpes Simplex Viren HSV1 und HSV2 verwandt ist, wurde untersucht, ob die Impfung mit HZ/su auch Auswirkungen auf die Immunogenität gegen HSV hat. Hierfür wurde Vollblut von 39 immungesunden sowie 29 dialysepflichtigen Probanden mit HSV Lysat, analog und parallel zur Stimulation mit VZV-Lysat, stimuliert. Anschließend wurden HSV-spezifische CD4 T-Zellen durchflusszytometrisch bezüglich der Ko-Expression von CD69 und IFNy sowie der CTLA-4 Expression untersucht und mit VZV-spezifischen T-Zellen verglichen. Sowohl gesunde als auch dialysepflichtige Probanden wiesen bereits im vor der HZ/su-Impfung HSV-spezifische CD4 T-Zell-Frequenzen auf, die im Median über den VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen lagen. Insgesamt wurden 32 Kontrollen und 26 Dialysepatienten identifiziert, die vor der Impfung über der Nachweigrenze von 0,025 % CD69⁺IFNy⁺ CD4 T-Zellen lagen und daher als HSV positiv betrachtet werden können (SCHUB,

ERGEBNISSE

2016). HSV-spezifische CD4 T-Zellen wiesen jedoch im Vergleich zu VZV-spezifischen CD4 T-Zellen keinen durch die Impfung induzierten dynamischen Verlauf mit Anstiegen nach beiden Impfungen auf (Abbildung 40A und B). Auch die CTLA-4 MFI HSV-spezifischer CD4 T-Zellen blieb im zeitlichen Verlauf weitestgehend konstant und stieg auch nach beiden Impfungen nicht an, was im Gegensatz zur MFI in VZV-spezifischen T-Zellen zwei Wochen nach beiden Impfungen steht (Abbildung 40C und D).

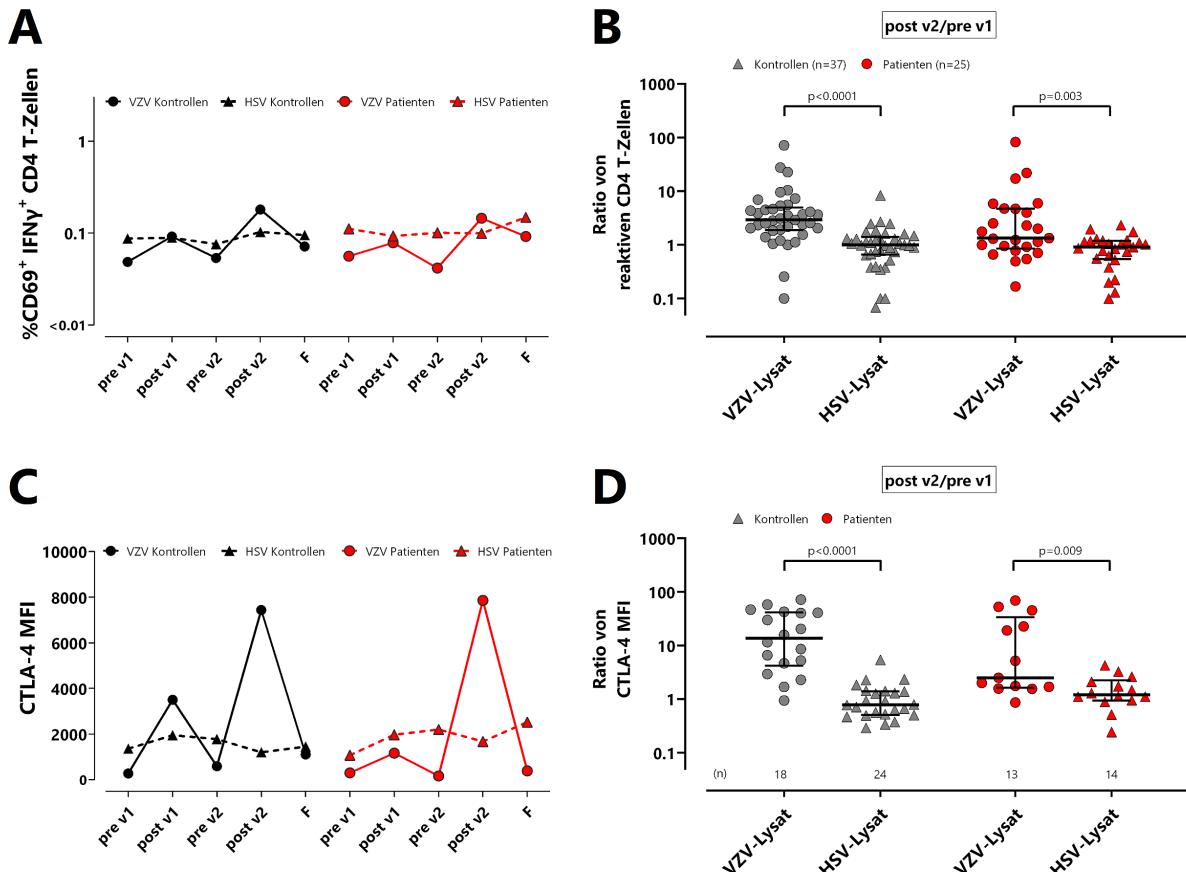


Abbildung 40 HZ/su induziert keine HSV-spezifischen CD4 T-Zellen Vollblut von Kontrollen (schwarz) und Patienten (rot) wurde vor beiden Impfungen (pre v1, pre v2), zwei Wochen danach (post v1, post v2) und nach einem Jahr (Follow-up, F) mit VZV- oder HSV-Lysat stimuliert. Als Negativkontrolle diente nicht infiziertes Zelllysat. Mediane (A) Frequenzen und (C) CTLA-4 Expression von VZV (Kreis-Symbol) und HSV (Dreieck-Symbol) -spezifischen CD4 T-Zellen wurden im zeitlichen Verlauf durchflusszytometrisch detektiert. Für jeden Probanden wurde die Ratio der VZV-gE spezifischen (B) CD4 T-Zell-Frequenzen und (D) CTLA-4 MFI nach zweiter Impfung im Vergleich zum Ausgangswert (post v2/pre v1) berechnet. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test (A und C) oder Wilcoxon-Test (B und D) durchgeführt. CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4; HSV, Herpes-Simplex-Virus 1 und 2; VZV, Varizella-Zoster-Virus.

5.2 Charakterisierung der SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort bei immungesunden

Personen nach Impfung mit dem proteinbasierten Impfstoff NVX-CoV2373

Während der SARS-CoV-2 Pandemie wurden verschiedene Impfstoffe entwickelt, unter anderem auch der proteinbasierte Impfstoff NVX-CoV2373, für den initial eine zweimalige Impfung empfohlen wurde. Jedoch war die Datenlage bezüglich Qualität und Quantität der impfinduzierten Immunantwort im Vergleich zu mRNA-Impfstoffen bis dato sehr begrenzt. Auch die Stabilität der Immunantwort und der Einfluss einer vorangegangenen Infektion wurde bei NVX-CoV2373 geimpften Personen in dieser Arbeit genauer untersucht.

5.2.1 Probandenkollektiv zur Analyse der Spike-spezifischen Immunantwort nach Impfung mit NVX-CoV2373 im Verlauf

Zur Charakterisierung der durch NVX-CoV2373-induzierten Immunantwort wurden insgesamt 29 immungesunde Personen rekrutiert. Sofern es möglich war, wurde Blut vor erster Impfung, zwei Wochen nach zweiter Impfung sowie etwa 3 und 6 Monate nach der zweiten Impfung entnommen. Von den rekrutierten Probanden erhielten 4 Probanden lediglich eine einmalige Impfung, da bereits vorab eine SARS-CoV-2 Infektion stattgefunden hatte und zum Zeitpunkt der Studie zwei Immunisierungsergebnisse ausreichten, um als vollständig geimpft eingestuft zu werden. Weiterhin kam es bei 3 Probanden kurz nach der ersten Impfung zu einer SARS-CoV-2 Infektion. Jedoch war der Abstand zur Impfung hier zu gering, als dass die Infektion als zusätzliches Immunisierungsergebnis gezählt werden konnte.

5.2.1.1 Vergleich der Spike-spezifischen Immunität von SARS-CoV-2 naiven und infizierten Personen

Um die Entwicklung von NVX-CoV2373-induzierten Spike-spezifischen IgG-Antikörpern, neutralisierenden Antikörpern sowie CD4 und CD8 T-Zellen nach erster und zweiter Impfung zu untersuchen, wurden 5 Personen vor der ersten Impfung sowie 14 Tage nach der ersten und zweiten Impfdosis untersucht. Zusätzlich wurden 4 Personen mit einer früheren SARS-CoV-2-Infektion vor und 14 Tage nach einer einmaligen Impfung mit NVX-CoV2373 untersucht. Die Spike-spezifischen IgGs wurden mittels anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA quantifiziert und ihre neutralisierende Aktivität wurde mit einem Surrogat-Assay bestimmt. Spike-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen wurden aus Vollblutproben nach Stimulation mit überlappenden Peptiden des Spike-Proteins, mit 0,64 % DMSO und SEB als Negativ- bzw. Positivkontrolle quantifiziert. Anschließend wurden reaktive CD4 und CD8 T-Zellen anhand der Ko-Expression

ERGEBNISSE

von CD69 und IFNy durchflusszytometrisch quantifiziert. Repräsentativ für die Spike-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellanalysen sind Punktdiagramme einer 37-jährigen Frau nach der zweiten Impfung mit entsprechenden Kontrollstimulationen in Abbildung 41A dargestellt. Bei den infektnaiven Probanden war keine spezifische Immunität in Form von IgG-Antikörpern, neutralisierender Aktivität und T-Zellen in den Vorwerten nachweisbar. Auch nach der ersten Impfung wies nur ein Teil der Probanden spezifische Antikörper und neutralisierende Aktivität auf, was auch bei den Spike-spezifischen T-Zell-Frequenzen zu beobachten war (Abbildung 41B). Nach der zweiten Impfung konnte jedoch bei allen Probanden eine Induktion der anti-Spike-Antikörper beobachtet werden, was sich durch einen deutlichen Anstieg der IgG-Level und der neutralisierenden Aktivität zeigte. Hingegen induzierte die zweite Impfung mit NVX-CoV2373 auf der zellulären Ebene Spike-spezifische T-Zellen unterschiedlich stark. Bei einem Teil der Probanden (3/5) wurde ein Anstieg der Spike-spezifischen CD4 T-Zellen beobachtet. Jedoch lagen die Frequenzen der übrigen Probanden weiterhin unterhalb der Nachweigrenze von 0,03% (SCHMIDT et al., 2021a). Zudem konnten bei keinen der Probanden Anstiege der Spike-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen detektiert werden. Im Vergleich induzierte bei allen Personen mit vorheriger Infektion eine Dosis des NVX-CoV2373-Impfstoffs messbare Level Spike-spezifischer IgG, eine starke neutralisierende Aktivität und CD4 T-Zellen. Jedoch lagen auch hier die Spike-spezifischen CD8 T-Zellen unterhalb der Nachweigrenze (Abbildung 41C). Die Frequenz der SEB-reaktiven T-Zellen blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum auf einem konstant hohen Niveau.

ERGEBNISSE

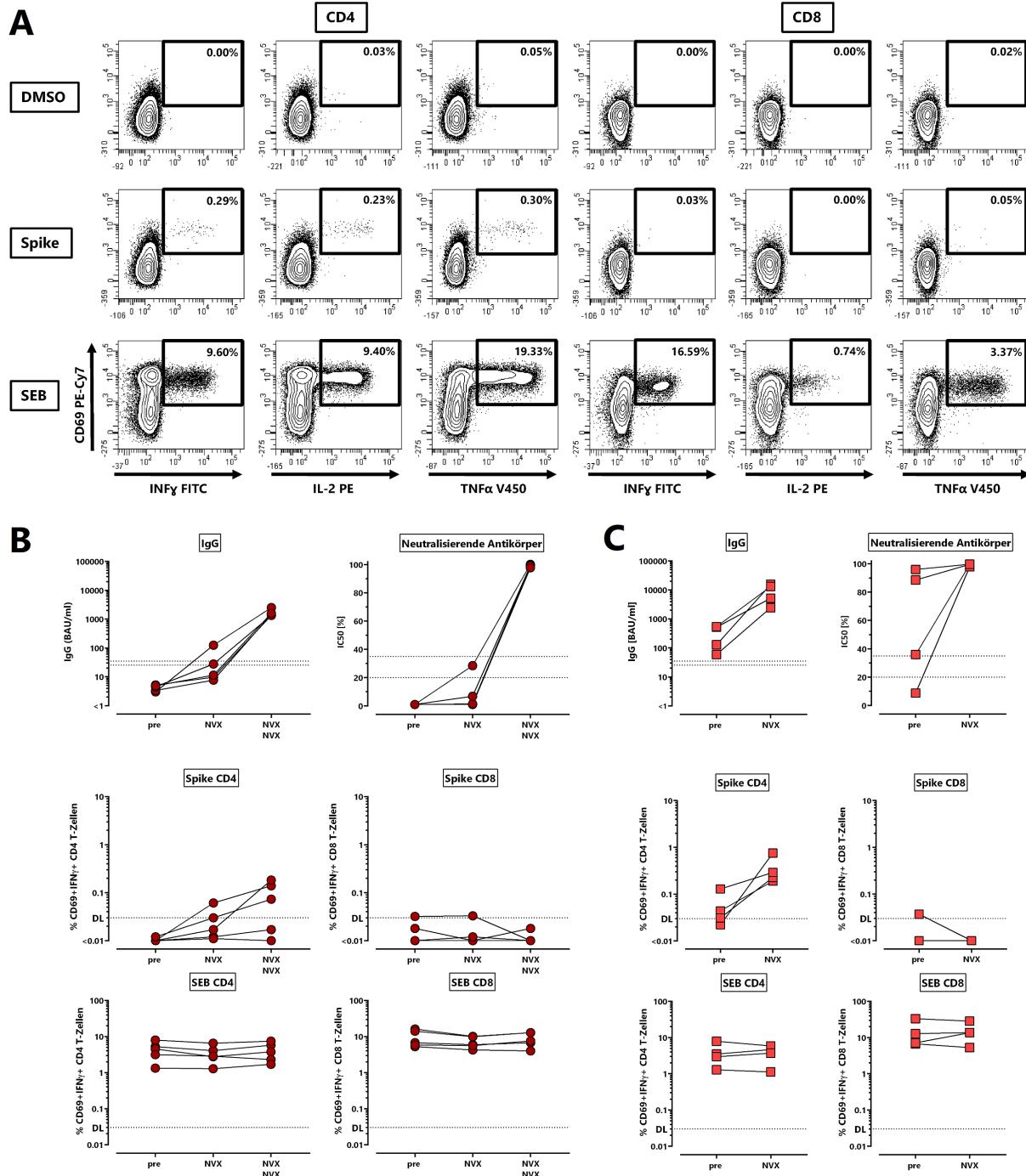


Abbildung 41 Entwicklung von Antikörpern und T-Zellen gegen das SARS-CoV-2-Spike-Protein nach NVX-CoV2373-Impfung (A) Repräsentative Konturdiagramme einer 37-jährigen Frau 14 Tage nach der zweiten Dosis des NVX-CoV2373-Impfstoffs (NVX) von CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation mit DMSO (Negativkontrolle), überlappenden Peptiden des SARS-CoV-2-Spike-Proteins oder SEB (Positivkontrolle). Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der aktivierten CD69⁺ T-Zellen, die zusätzlich IFN γ , TNF α oder IL-2 innerhalb der CD4 oder CD8 T-Zellen an. Spike-spezifische IgG, neutralisierende Aktivität, Spike-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen sowie SEB-reaktive CD4- und CD8-T-Zellen wurden **(B)** bei nicht infizierten Personen ($n=5$) vor der Impfung sowie nach erster und zweiter Impfung oder **(C)** bei Personen mit einer früheren Infektion ($n=4$) vor und nach einer einmaligen Gabe des NVX-CoV2373-Impfstoffs bestimmt. Die spezifischen T-Zellen in den Feldern B und C zeigen CD4 oder CD8 T-Zellen, die CD69 und IFN γ ko-exprimieren, wobei die jeweilige Reaktivität nach Abzug der Kontrollstimulation dargestellt ist. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. Die gestrichelten Linien stellen die Nachweisgrenzen für Antikörper dar, die negative, mittlere und positive Werte bzw. Hemmungsgrade gemäß den Angaben des Herstellers anzeigen, sowie die Nachweisgrenzen für Spike-spezifische T-Zellen (SCHMIDT et al.,

2021a). IFN, Interferon; IL, Interleukin; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumor-Nekrose-Faktor. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2022).

5.2.1.2 Abnahme der NVX-CoV2373 induzierten Immunantwort bei SARS-CoV-2 naiven und infizierten Personen über die Zeit

Im Weiteren wurde die Stabilität der impfinduzierten Immunantwort im zeitlichen Verlauf und der Einfluss von nachfolgenden SARS-CoV2-Infektionen auf die Immunantwort untersucht. Für eine longitudinale Analyse wurden zunächst 5 infektnaive Probanden etwa 3 Monate nach der zweiten Impfung erneut untersucht. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen nach 6 Monaten bei 5 Probanden mit zwei Impfdosen, 3 Probanden mit einer Infektion und einer Impfung sowie 3 Probanden mit zwei Impfdosen und einer dazwischenliegenden Infektion. Bereits nach 3 Monaten wurde bei den 5 infektnaiven Probanden ein Rückgang der Spike-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen und IgG Antikörper beobachtet. Ein signifikanter Abfall der Spike-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen wurde nach 6 Monaten detektiert ($p=0,002$; Abbildung 42A). Dabei war sowohl bei infektnaiven als auch bei den Probanden mit Infektion ein Rückgang zu erkennen. Auch in der CTLA-4 Expression von Spike-spezifischen CD4 T-Zellen zeigte sich eine signifikante Abnahme ($p=0,008$, Abbildung 42B). Auf humoraler Ebene kam es ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme von Anti-Spike-IgGs nach 6 Monaten ($p=0,002$). Jedoch lagen alle Werte der Probanden weiterhin über der Nachweisgrenze.

Zusätzlich wurden in der longitudinalen Analyse 8 Probanden untersucht, die zwischenzeitlich nach beiden Impfungen eine SARS-CoV-2-Durchbruchsinfektion durchgemacht haben. Die Analyse erfolgte dabei 14-30 Tage nach dem positiven Ergebnis des PCR- oder Schnelltests. Nach den Durchbruchsinfektionen konnte ein Anstieg Spike-spezifischer IgG-Level beobachtet werden (post v2: 2943 (IQR 4848) BAU/ml, nach Infektion: 11766 (IQR 9175) BAU/ml, $p=0,008$, Abbildung 42C). Auf T-Zell-Ebene war ebenfalls eine signifikante Zunahme der Spike-spezifischen CD4 T-Zellen (post v2: 0,09 % (IQR 0,17 %), nach Infektion: 0,19 % (IQR 0,18 %), $p=0,008$) zu beobachten. Ein Anstieg der CTLA-4 Expression war ebenfalls zu beobachten, jedoch nicht signifikant (post v2: 571 (IQR 548), nach Infektion: 2427 (IQR 2313), $p=0,125$). Interessanterweise wurden nach der Durchbruchsinfektion bei einem Teil der Probanden auch Spike-spezifische CD8 T-Zellen induziert, wenngleich die Zunahme keine statistische Signifikanz erreichte. SEB-reaktive CD4 und CD8 T-Zellen blieben über alle Zeitpunkte hinweg auf einem hohen und stabilen Level.

ERGEBNISSE

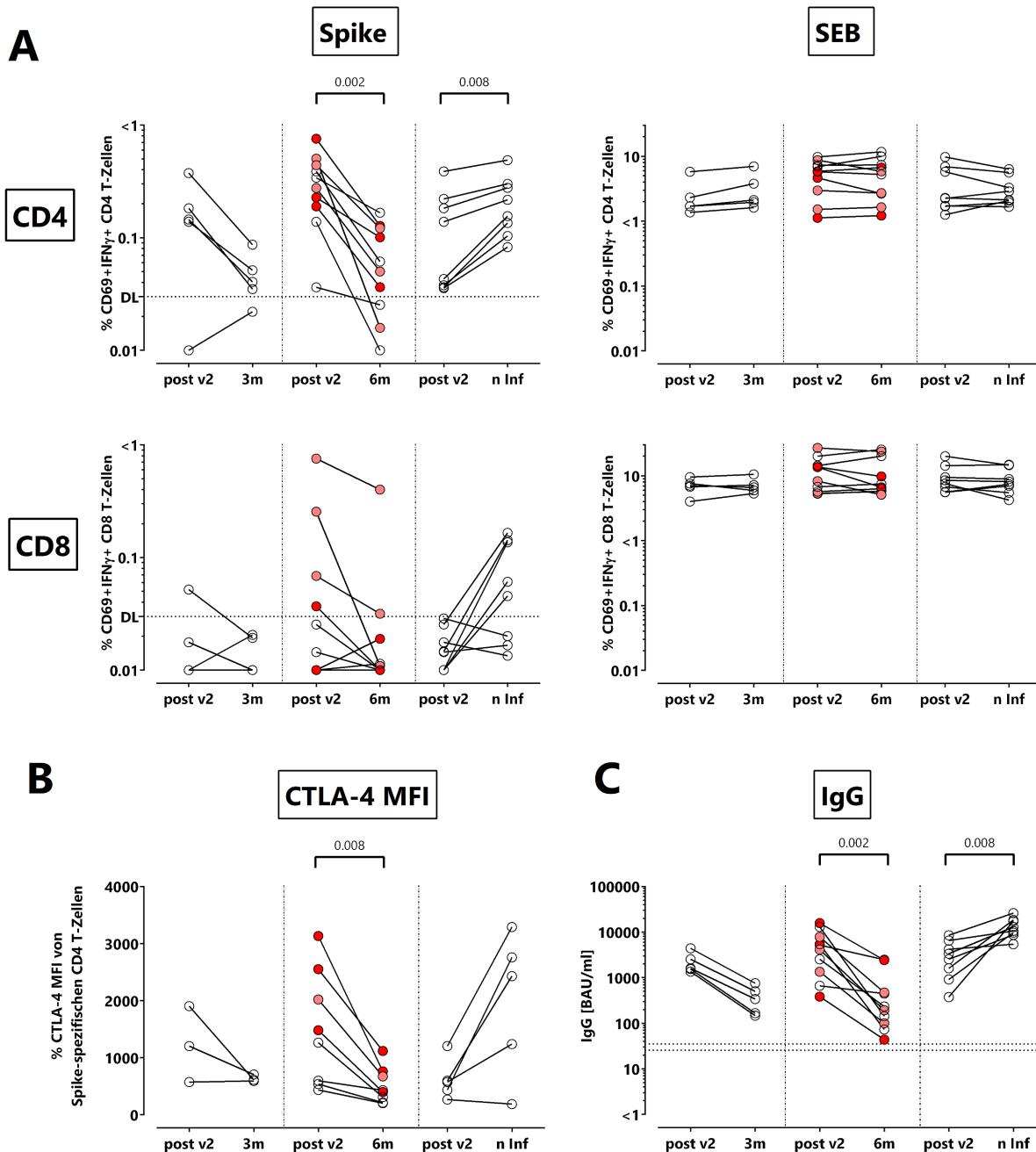


Abbildung 42 Reduktion der Spike-spezifischen Immunantwort im Verlauf nach NVX-CoV2373 Impfung und Induktion nach Durchbruchsinfektion Zur longitudinalen Analyse der Spike-spezifischen Immunantwort wurden Probanden zu den Zeitpunkten 3 Monate ($n=5$, links) und 6 Monate ($n=10$, mittig) nach zweiter Impfung/Immunisierung (post v2) sowie nach Durchbruchsinfektion ($n=8$, rechts) untersucht. Probanden wurden anhand ihrer Immunisierungshistorie farblich wie folgt dargestellt: zwei Impfdosen (weiß), eine Impfdosis und vorherige Infektion (rot) und zwei Impfdosen und eine Infektion dazwischen (rosa). **(A)** Für die Analyse der Spike-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen (links) sowie SEB-reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen (rechts) wurden Vollblutproben mit überlappenden Spike-Peptiden stimuliert. DMSO verdünnt diente als Negativkontrolle, SEB als Positivkontrolle. Anhand der Ko-Expression von CD69 und IFNy wurden spezifische T-Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert, wobei die jeweilige Reaktivität nach Abzug der Kontrollstimulation dargestellt ist. **(B)** Vergleich der CTLA-4 Expression Spike-spezifischer CD4 T-Zellen und **(C)** Anti-Spike-IgG-Level nach zweiter Impfung/Immunisierung mit den Messungen nach 3 und 6 Monaten sowie nach Durchbruchsinfektion. Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt. Die gestrichelten Linien stellen die Nachweisgrenzen für Antikörper dar. CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; IFN, Interferon; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

5.2.2 Vergleich der spezifischen Immunantwort nach Impfung mit NVX-CoV2373 oder mit mRNA-Impfstoffen

5.2.2.1 Probandenkollektiv

Für die Beobachtungsstudie zur Spike-spezifischen Immunantwort nach der 2. COVID-19-Impfung wurden aus dem zuvor beschriebenen Kollektiv 22 immungesunde Probanden ausgewählt, welche zweimalig mit NVX-CoV2373 geimpft waren. Um die Immunogenität besser einordnen zu können, wurden diese mit bereits vorab unter meiner Beteiligung in der Arbeitsgruppe erhobenen Daten von Probanden, die mit mRNA-Impfstoffen geimpft worden waren, verglichen. Als Vergleich dienten dabei Personen, die eine Zweifachimpfung mit BNT162b2 ($n=22$) oder mRNA-1273 ($n=22$) erhalten hatten. Die Probanden der verschiedenen Impfregime waren alters- und geschlechtsgematcht. Eine vorherige SARS-CoV-2-Infektion war bei keinem der Probanden bekannt. Zudem waren im ELISA keine NCAP-IgG nachweisbar, was eine negative SARS-CoV-2 Infekthistorie bekräftigt.

Das Zeitintervall zwischen den beiden Impfungen betrug im Mittel $21,5 \pm 1,5$ Tage für NVX-CoV2373, $31,2 \pm 9,5$ Tage für BNT162b2 und $40,2 \pm 4$ Tage für mRNA-1273 und richtete sich nach den jeweiligen Empfehlungen der STIKO. Die Blutentnahme nach der zweiten Impfung erfolgte zwischen Tag 13-19, wobei die Mediane 15 (IQR 2) Tage bei NVX-CoV2373 und mRNA-1273 und 14 (IQR 1) Tage bei BNT162b2 betrugen. Mit Ausnahme der Granulozyten ($p=0,023$) gab es zwischen den einzelnen Impfregimen keine signifikanten Unterschiede der Zellzahlen in den Leukozyten-Subpopulationen. Auch bei den Lymphozyten-Subpopulationen und der Anzahl an Plasmablasten konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Impfregimen festgestellt werden (Tabelle 24).

Tabelle 24 Demografische und grundlegende Merkmale der Studienpopulation.

1. Impfung	NVX-CoV2373	BNT162b2	mRNA-1273	
2. Impfung	NVX-CoV2373	BNT162b2	mRNA-1273	
Anzahl, n	22	22	22	p-Werte
Alter in Jahren, MW±StabW	$47,3 \pm 14,1$	$47,0 \pm 14,6$	$47,8 \pm 14,7$	0,988 ^s
Weibliches Geschlecht, n (%)	13 (59,1)	14 (66,6)	14 (63,6)	0,938 ^t
Wochen zwischen 1. und 2. Impfung, MW±StabW	$21,5 \pm 1,5$	$31,2 \pm 9,5$	$40,2 \pm 4,0$	n.a.
Messzeitpunkt [Tage nach 2. Impfung], Median (IQR)	15 (2)	14 (1)	15 (2)	0,712
Differentialblutbild	n=22	n=21	n=22	

ERGEBNISSE

(Zellen/ μ l), Median (IQR)				
Leukozyten	7100 (1625)	6400 (2350)	7900 (2150)	0,057 [#]
Granulocyten	4459 (1777)	3549 (2108)	5033 (1830)	0,023 [#]
Monozyten	559 (289)	529 (230)	632 (176)	0,109 [#]
Lymphozyten	2087 (455)	2215 (792)	2124 (1128)	0,916 [#]
Lymphozyten-Subpopulationen (Zellen/ μ l), Median (IQR)	n=21	n=16	n=21	
CD3 T-Zellen	1556 (567)	1572 (884)	1636 (1068)	0,846 [#]
CD4 T-Zellen	971 (378)	933 (518)	1073 (595)	0,970 [#]
CD8 T-Zellen [#]	327 (193)	348 (365)	402 (177)	0,653 [#]
CD19 B-Zellen [#]	152 (125)	199 (176)	169 (160)	0,291 [#]
Plasmablasten [#]	0,49 (0,455)	0,369 (0,544)	0,678 (0,655)	0,128 [#]

#Die Anzahl der CD4 und CD8 T-Zellen wurde von 10 BNT162b2-geimpften und 19 mRNA-1273-geimpften Personen berechnet.
§ein faktorieller ANOVA mit Tukey's Post-Test; [#] χ^2 -Test; [#]zweiseitiger Kruskal-Wallis-Test.

5.2.2.2 Geringere Spike-spezifische IgG-Level nach NVX-CoV2373-Impfung

Zur Analyse Spike-spezifischer IgGs wurde ein ELISA genutzt, der nach Herstellervorgaben durchgeführt wurde. Der NVX-CoV2373-Impfstoff induzierte bei allen 22 Probanden nach zweiter Impfung Spike-spezifische IgGs (Tabelle 25), wobei die medianen IgG-Level nach NVX-CoV2373-Impfung signifikant geringer waren (2633 (IQR 3566) BAU/ml), im Vergleich zu Personen nach homologer BNT162b2- oder mRNA-1273-Impfung ((4870 (IQR 3414) BAU/ml) bzw. (4932 (IQR 6686) BAU/ml), Abbildung 43A, p=0,006). Trotz der geringeren IgG-Level nach NVX-CoV2373-Impfung konnten bei der neutralisierenden Aktivität Spike-spezifischer Antikörper gegen das wildtypische Spike-Protein, die mittels Surrogat-Assay bestimmt wurde, keine Unterschiede zwischen den Impfstoffgruppen festgestellt werden. Da alle Probanden der verschiedenen Impfregime im Originalassay eine neutralisierende Aktivität von nahezu 100% erreichten, wurde zusätzlich eine Messung mit vorheriger Verdünnung der Plasmen durchgeführt, um kleinere Unterschiede zwischen den Impfstoffregimen zu untersuchen. NVX-CoV2373 geimpfte Probanden wiesen im 1:16 verdünnten Ansatz eine geringere neutralisierende Antikörper-Aktivität auf (Median 55 % (IQR 50,2 %)), gefolgt von BNT162b2-geimpften (Median 57% (IQR 33,3 %)), während der mRNA-1273-Impfstoff die höchste

ERGEBNISSE

neutralisierende Aktivität induzierte (Median 76 % (IQR 25,5 %); Abbildung 43B). Jedoch zeigten die Unterschiede zwischen den Gruppen keine statistische Signifikanz (Abbildung 43B).

Tabelle 25 Ergebnisse der Antikörper- und T-Zell-Induktion nach der zweiten Impfung.

1. Impfung	NVX-CoV2373	BNT162b2	mRNA-1273	
2. Impfung	NVX-CoV2373	BNT162b2	mRNA-1273	
n (% positive)	n=22	n=22	n=22	p-Werte
IgG (≥ 35.2 BAU/ml)	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)	p=1,00
Neutralisierende Aktivität				
Parental (IH $\geq 35\%$) ¹	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)	p=1,00
Delta (>0%) ²	17 (77,3%)	21 (95,5%)	21 (95,5%)	p=0,07
BA.1 (>0%) ²	1 (4,5%)	0 (0%)	4 (18,2%)	p=0,06
BA.2 (>0%) ^{2,3}	8 (36,4%)	4 (25%) ¹	11 (50,0%)	p=0,29
CD4 T-Zellen ($\geq 0,03\%$)	18 (81,8%)	22 (100%)	22 (100%)	p=0,01
CD8 T-Zellen ($\geq 0,03\%$)	3 (13,6%)	14 (63,6%)	17 (77,3%)	p<0,0001

¹bestimmt durch einen Surrogat-Assay; ²bestimmt durch einen Mikroneutralisationstest; ³BA.2-Tests nur für n=16 Personen verfügbar. Angegeben ist die Anzahl (in Prozent) der Personen mit spezifischen Immunreaktionen oberhalb der jeweiligen Nachweisgrenze.

Zusätzlich wurde die neutralisierende Aktivität der impfstoffinduzierten Antikörper gegen die besorgniserregenden Varianten (*Variants of Concern*, VOC) Delta, sowie Omikron, BA.1 und BA.2, die zum Zeitpunkt der Studiendurchführung vorherrschend oder gerade abgelöst waren, mit Hilfe eines Mikroneutralisationstests untersucht. Die Proben wurden am Institut für Klinische Virologie in Frankfurt im Rahmen einer Kollaboration analysiert. Der prozentuale Anteil der Personen mit neutralisierender Aktivität war gegenüber Delta am höchsten (17/22 nach NVX-CoV2373-Impfung und 21/22 nach BNT- und mRNA-1273-Impfung), gefolgt von BA.2 (25-50 % der Personen), wohingegen die Aktivität gegenüber BA.1 weitestgehend fehlte. Dabei konnten zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

Neben den 66 Probanden ohne Infektion wurden auch Messungen von den 4 infizierten Probanden durchgeführt, die nur mit einer Dosis NVX-CoV2373 geimpft worden waren. Bemerkenswerterweise konnte bereits eine Dosis von NVX-CoV2373 eine neutralisierende Aktivität gegenüber allen VOCs hervorrufen. Zum Teil konnten deutlich höhere IC50-Werte (Abbildung 43D) im Vergleich zu den Probanden der drei Impfregime ohne Infektion, aber mit zwei Impfungen nachgewiesen werden. Insbesondere gegen Delta und BA.1 wurde eine hohe neutralisierende Aktivität beobachtet.

ERGEBNISSE

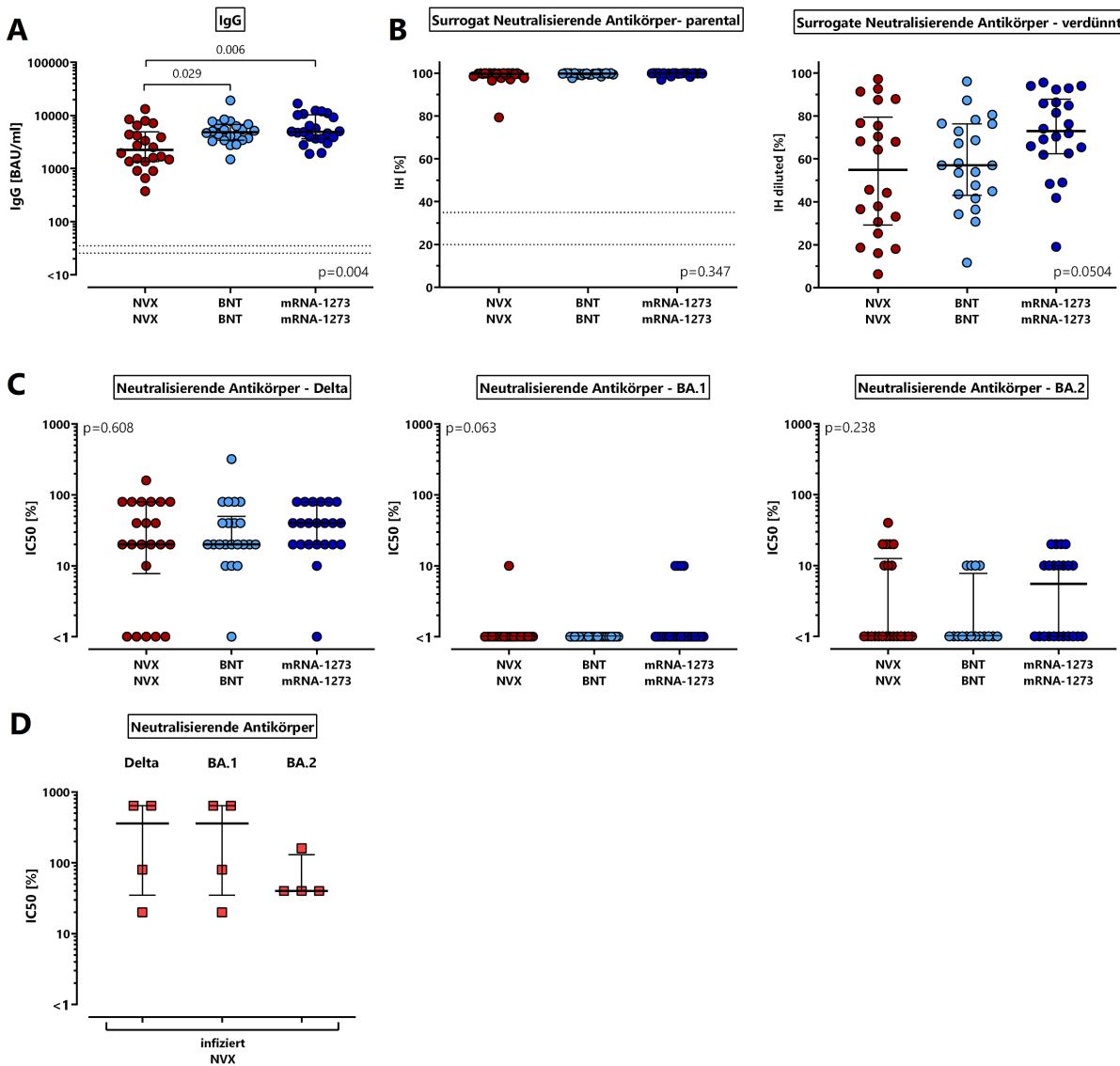


Abbildung 43 Geringere Konzentrationen von Spike-spezifischem IgG nach NVX-CoV2373-Impfung bei ähnlicher neutralisierender Aktivität wie bei mRNA-geimpften Personen. Spike-spezifische Antikörper wurden von 66 Personen 13-18 Tage nach zweiter Impfung mit NVX-CoV2373 (NVX), BNT162b2 (BNT) oder mRNA-1273 (jeweils n=22) charakterisiert. **(A)** ELISA sowie **(B)** ein Surrogat-Neutralisationstest unverdünnt und verdünnt (1:16) wurden durchgeführt, um die Konzentrationen von Spike-spezifischen IgG und neutralisierenden Antikörpern (ausgedrückt als Prozentsatz der Hemmung (IH)) gegen das wildtypische SARS-CoV-2 zu quantifizieren. **(C)** Die Antikörper-vermittelte Neutralisierung der authentischen SARS-CoV-2-Varianten Delta und Omikron BA.1 und BA.2 wurde in den drei Impfstoffgruppen und **(D)** bei den 4 Personen mit einer Infektionsgeschichte nach der ersten NVX-CoV2373-Impfstoffdosis getestet. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Kruskal-Wallis-Tests mit Dunns Post-Test berechnet. Die gepunkteten Linien stellen Nachweisgrenzen dar, die negative, mittlere und positive IgG-Level bzw. Hemmungsgrade gemäß den Anweisungen des Herstellers angeben. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2022).

5.2.2.3 Quantitative und qualitative Unterschiede in der NVX-CoV2373-induzierten T-Zell-Antwort im Vergleich zu den mRNA-Impfstoffen

Neben der Untersuchung der NVX-CoV2373-induzierten humoralen Immunantwort, wurden zusätzlich auf zellulärer Ebene impfinduzierte Spike-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen

ERGEBNISSE

analysiert. Diese wurden anhand der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und der Zytokine IFN γ , IL-2 und TNF α nach Stimulation mit überlappenden Peptiden des Spike-Proteins quantifiziert. Wie bei den Spike-spezifischen IgGs wiesen NVX-CoV2373 geimpfte Personen gegenüber den Probanden aus den beiden mRNA-Regimen signifikant geringere Spike-spezifische CD4 und CD8 T-Zell-Frequenzen auf. Besonders deutlich waren die Unterschiede bei den Spike-spezifischen CD8 T-Zellen Abbildung 44A, $p<0.0001$), wo lediglich bei 3/22 (13,6 %) Personen nach der zweiten NVX-CoV2373-Impfung Spike-spezifische CD8 T-Zellen oberhalb der Nachweisgrenze von 0,03 % detektiert wurden, während die mRNA-Impfstoffe bei den meisten Probanden Spike-spezifische CD8 T-Zellen induzierten. Spike-spezifische CD4 T-Zellen wurden bei 18/22 (81,8 %) der mit NVX-CoV2373 geimpften Personen induziert, allerdings war der Medianwert signifikant niedriger (0,11 % (IQR 0,27 %)) als bei Personen nach der Impfung mit BNT162b2 (0,13 % (IQR 0,21 %)) oder mRNA-1273 (0,29 % (IQR 0,22 %), $p=0.001$, Abbildung 44A), bei denen alle nachweisbare CD4 T-Zellen hatten.

SEB-reaktive CD4 und CD8 T-Zell-Frequenzen waren bei allen drei Impfstoffregimen auf dem gleichen Niveau (Abbildung 44B). Die Analyse der Induktion der Th1 Zytokine IL-2 und TNF α in Spike-spezifischen CD4 T-Zellen wies ähnliche Verteilungsmuster auf wie die der IFN γ Expression.

ERGEBNISSE

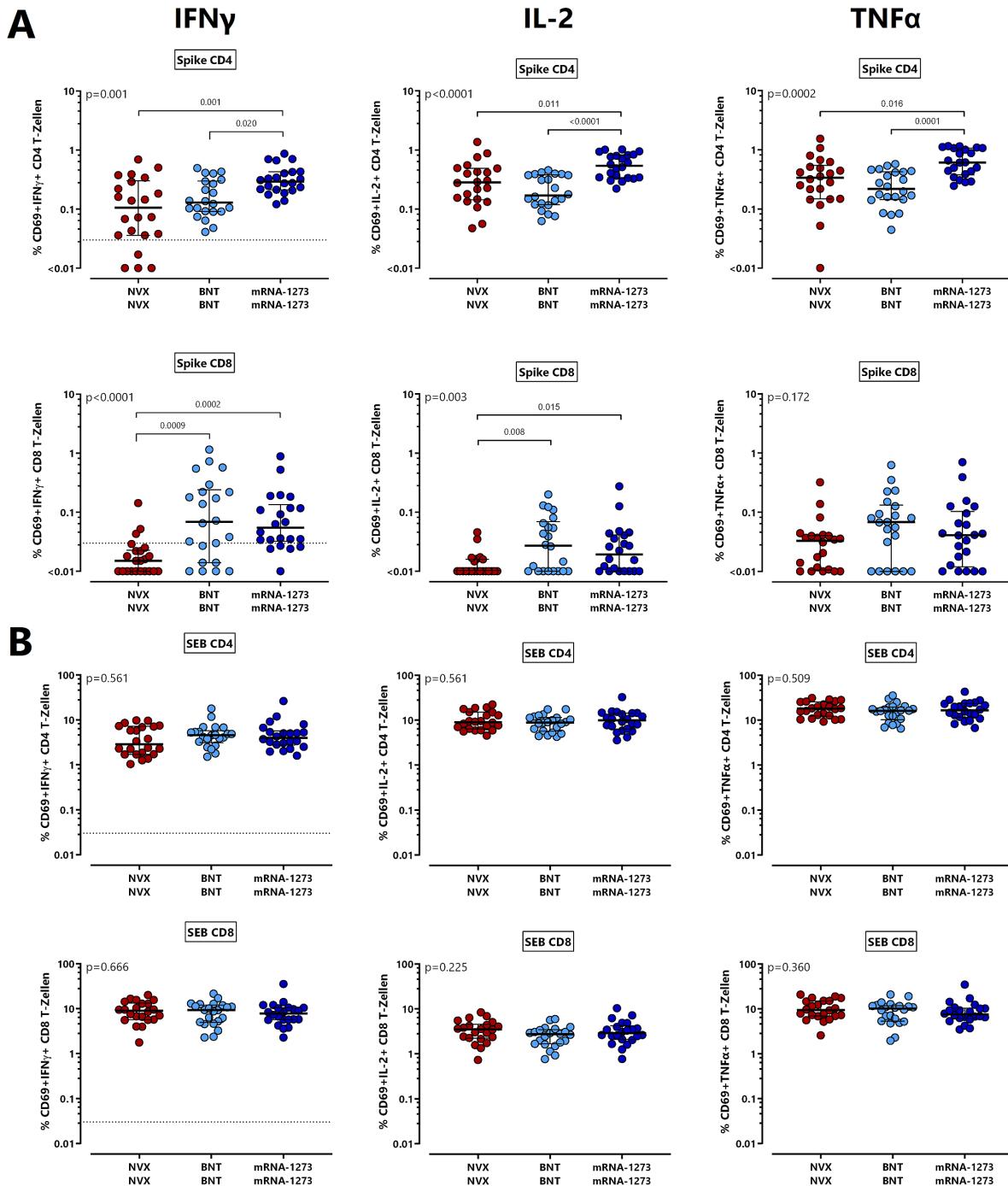


Abbildung 44 Niedrigere CD4 und CD8 T-Zell-Frequenzen nach NVX-CoV2373-Impfung Spike-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen wurden quantifiziert und durch intrazelluläre Zytokinfärbung nach Antigen-spezifischer Stimulation der Vollblutproben von 66 Personen 13-18 Tage nach der zweiten Impfung mit NVX-CoV2373 (NVX), BNT162b2 (BNT) oder mRNA-1273 (jeweils n=22) charakterisiert. **(A)** Spike-spezifische und **(B)** SEB-reaktive CD4 und CD8 T-Zellen wurden anhand der Ko-Expression von CD69 und der Zytokine IFNy, IL-2 und TNF α bestimmt, wobei die jeweilige Reaktivität nach Kontrollstimulation abgezogen wurde. Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. Die gepunkteten Linien zeigen die Nachweisgrenzen für spezifische ($CD69^+ IFNy^+$) T-Zellen an. IFN, Interferon; IL, Interleukin; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumor-Nekrose-Faktor. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2022).

ERGEBNISSE

Die durch den Impfstoff induzierten Spike-spezifischen CD4 T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer phänotypischen und funktionellen Eigenschaften weiter charakterisiert. Zum einen wurde die Spike-spezifischen CD4 T-Zellen bezüglich ihrer Expression der Zytokine IFNy, IL-2 und TNF α untersucht. Zur Darstellung der Zytokinprofile wurden mittels Boolean Gating in 7 Subpopulationen entsprechend der Expression von IFNy, IL-2 und TNF α in Kombination oder einzeln eingeteilt. Dabei zeigte sich, dass der prozentuale Anteil an multifunktionellen CD4 T-Zellen, die alle drei Zytokine exprimieren nach der NVX-CoV2373-Impfung signifikant geringer war als bei den CD4 T-Zellen nach mRNA-Impfung (Abbildung 45A). Stattdessen wiesen NVX-CoV2373 geimpfte Personen einen signifikant höheren Anteil an TNF α und IL-2 exprimierenden CD4 T-Zellen auf. Auch bei der Expression von IFNy allein oder in Kombination mit IL-2 oder TNF α zeigten sich Unterschiede zwischen den Impfstoffen. Jedoch war der prozentuale Anteil dieser Subpopulationen insgesamt sehr gering. Bei der polyklonalen Stimulation mit SEB waren wie erwartet keine Unterschiede zwischen den Impfregimen zu beobachten. Weiterhin wurde die Expression des inhibitorischen Rezeptors CTLA-4 von Spike-spezifischen CD4 T-Zellen untersucht. Im Einklang mit den geringeren Spike-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen wurde auch eine signifikant geringere CTLA-4 Expression nach der zweiten NVX-CoV2373-Impfung im Vergleich zu beiden mRNA-Gruppen beobachtet ($p<0,0001$; Abbildung 45B), was auf geringeren Antigenkontakt während der Induktionsphase zurückzuführen sein könnte. Hingegen waren die Mediane der CTLA-4 exprimierenden Spike-spezifischen CD4 T-Zellen bei BNT162b2 und mRNA-1273 geimpften Personen ähnlich hoch. Die CTLA-4 MFI von SEB-reaktiven CD4 T-Zellen zeigte keine Unterschiede zwischen den Impfstoffregimen. Aufgrund der geringen Anzahl an reaktiven CD8 T-Zellen bei NVX-CoV2373 geimpften Personen konnte hier keine phänotypische Analyse durchgeführt werden.

ERGEBNISSE

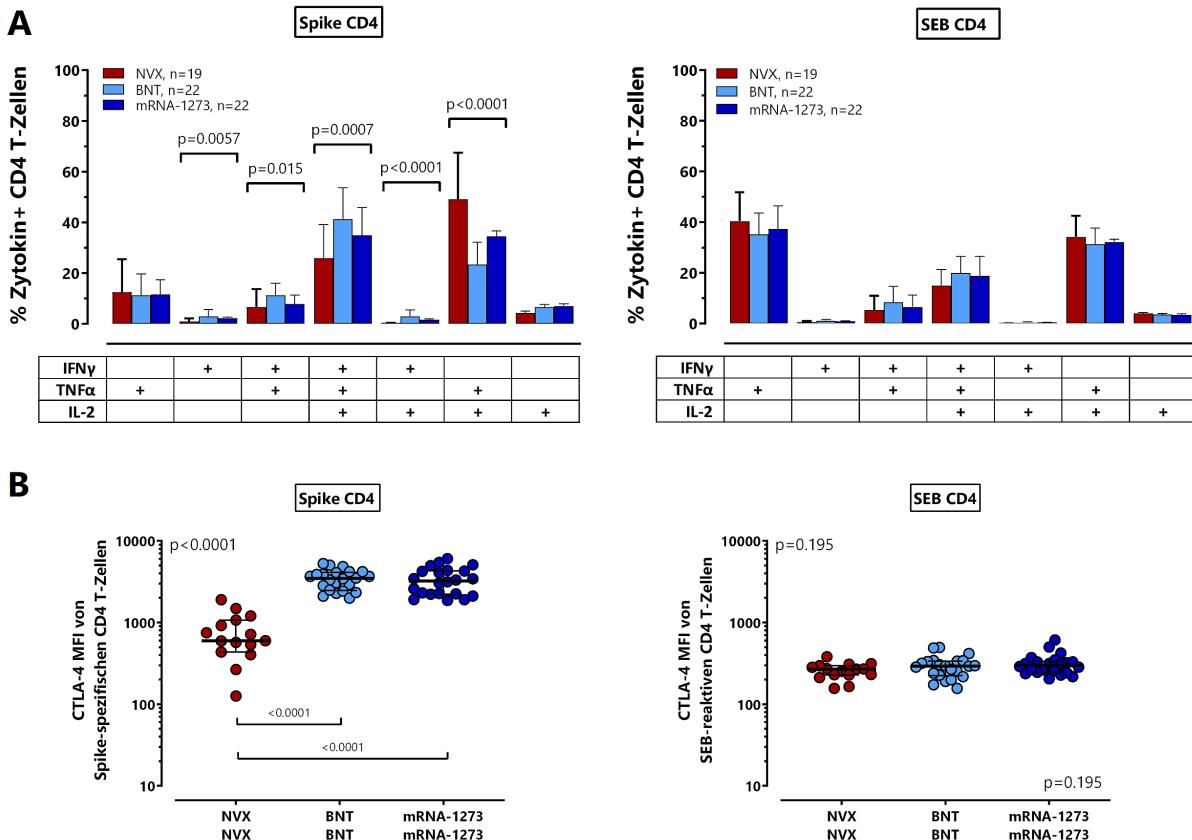


Abbildung 45 Geringere CTLA-4 Expression und Unterschiede im Zytokinprofil von Spike-spezifischen CD4 T-Zellen bei NVX-CoV2373 geimpften Probanden (A) Nach Spike-spezifischer oder polyklonalner Stimulation wurden die Zytokin-exprimierenden CD4 T-Zellen in 7 Subpopulationen unterteilt, je nach einzelner oder kombinierter Expression von IFN γ , TNF α und IL-2. Es wurden Blutproben von allen Personen analysiert. Um aussagekräftige Statistiken zu gewährleisten, wurden nur Proben mit mindestens 30 Zytokin-exprimierenden CD4 T-Zellen nach Normierung auf die Negativkontrolle berücksichtigt (der Probenumfang jeder Impfstoffgruppe ist in den Abbildungen angegeben). Die Balken stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dar, und es wurden ordinary one-way ANOVA-Tests durchgeführt. **(B)** Die CTLA-4 Expression von Spike-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 T-Zellen wurde in allen Proben mit mindestens 20 CD69 $^{+}$ IFN γ^{+} CD4 T-Zellen bestimmt (n=15 für NVX CoV2373, n=22 für mRNA-geimpfte Personen). Die Balken stellen Mediane mit Interquartilsbereichen dar. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Kruskal-Wallis-Tests mit Dunns Post-Test berechnet. CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4; IFN, Interferon; IL, Interleukin; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; TNF, Tumor-Nekrose-Faktor. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2022).

5.2.2.4 NVX-CoV2373-induzierte T-Zellen erkennen gleichermaßen das wildtypische SARS-CoV-2 und besorgniserregende Varianten

Da der Impfstoff für die parentale Wildtyp-Variante konzipiert wurde, jedoch in der Zwischenzeit eine Ausbreitung weiterer Mutationen stattfand, wurde zusätzlich untersucht, inwieweit NVX-CoV2373 induzierte CD4 T-Zellen in der Lage sind, Antigene von VOCs zu erkennen. Hierfür wurden UV-inaktivierte Viren der VOCs Alpha, Beta, Delta und Omikron BA.1 und BA.2 zur Stimulation von heparinisiertem Vollblut verwendet und anschließend die induzierte T-Zell-Antwort untereinander und mit dem wildtypischen Stamm (D614G, FFM7)

ERGEBNISSE

verglichen. Repräsentative Konturdiagramme von zwei gesunden Probanden sind in Abbildung 46A dargestellt. Die VOCs riefen ähnlich hohe Spike-spezifische CD4 T-Zell-Frequenzen hervor wie der Wildtyp. Lediglich zwischen den einzelnen Personen konnten sichtbare Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 46B). Dieses Ergebnis wird auch durch die Korrelationsmatrix unterstrichen (Abbildung 46C). Beim paarweisen Vergleich der stimulierten CD4 T-Zell-Frequenzen ist eine starke signifikante Korrelation zu beobachten ($r=0,92$; $p<0,0001$). Zudem wurden zwei verschiedene Antigenarten der Wildtyp-Variante verglichen, das UV-inaktivierte Virus sowie überlappende Peptide des Spike-Proteins. Die signifikante Korrelation der CD4 T-Zell-Frequenzen nach Stimulation mit den beiden Antigen-Quellen führt zu dem Schluss, dass die beiden Antigenarten gleichermaßen als Stimulanz zur Untersuchung Spike-spezifischer CD4 T-Zellen geeignet sind.

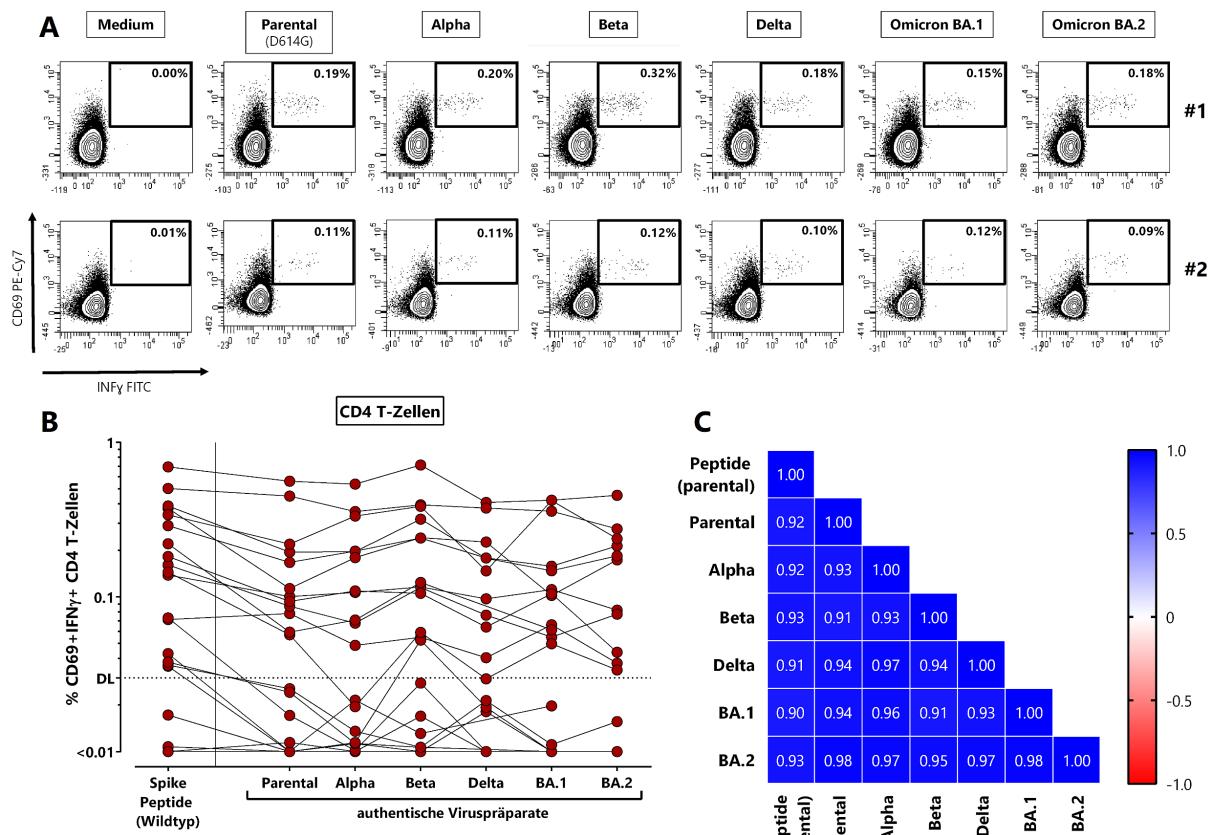


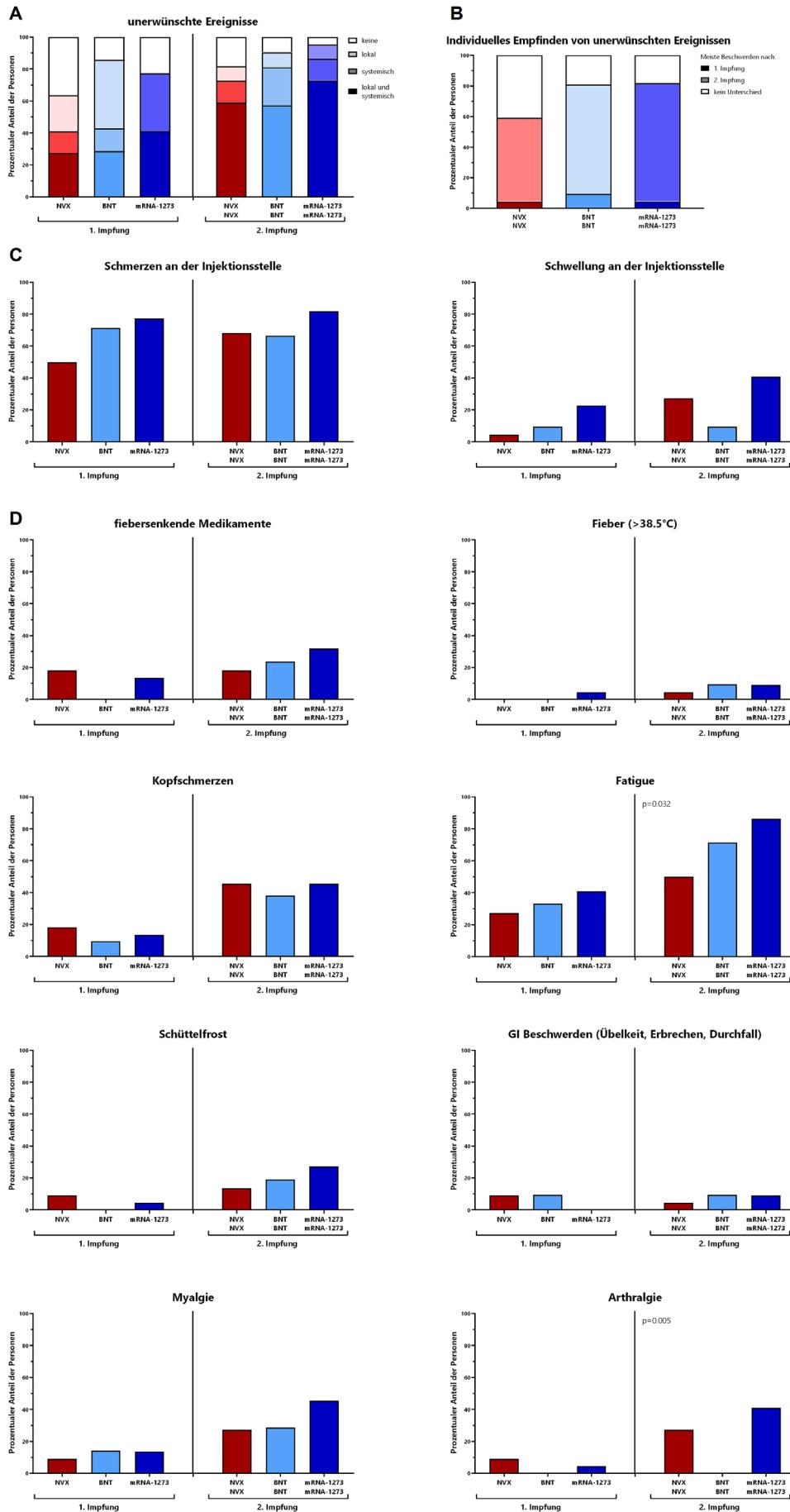
Abbildung 46 NVX-CoV2373-induzierte T-Zellen erkennen wildtypisches SARS-CoV-2 und bedenkliche Varianten gleichermaßen Vollblutproben von 22 NVX-COV2373-geimpften Personen wurden 13-18 Tage nach zweiter Impfung jeweils mit überlappenden Peptiden von parentalem SARS-CoV-2-Spike und UV-inaktivierten Viren des parentalen SARS-CoV-2 Stammes oder bedenklicher Varianten stimuliert. **(A)** Abgebildet sind Konturdiagramme von zwei Personen mit nachweisbaren Spike-spezifischen CD4 T-Zellen (#1: 56-jährige Frau, #2: 32-jähriger Mann). Die Zahlen geben den prozentualen Anteil aktivierter CD69⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Medium (Negativkontrolle), wildtypischen SARS-CoV-2 oder den Varianten Alpha, Beta, Delta, Omikron BA.1 und BA.2 an. **(B)** Die spezifischen CD4-T-Zellen wurden für alle Personen auf der Grundlage der Ko-Expression von CD69

und IFNy quantifiziert, wobei die jeweilige Reaktivität nach Kontrollstimulation abgezogen wurde. Ergebnisse einer Person mussten aufgrund einer übermäßigen Hintergrundreakтивität in der Negativkontrolle ausgeschlossen werden; Delta- und BA.2-Stimulationen waren nur von 19 Personen verfügbar. **(C)** Korrelationsmatrix spezifischer T-Zell-Frequenzen nach Stimulation mit Spike-Peptiden und den verschiedenen UV-inaktivierten Viruspräparaten. Die Korrelationskoeffizienten (r -Werte) wurden nach dem zweiseitigen Spearman-Verfahren berechnet und mit einem Farbcode dargestellt. IFN, Interferon. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2022).

5.2.2.5 Ähnliche Reaktogenität von NVX-CoV2373 im Vergleich zu mRNA-Impfstoffen

Die Verträglichkeit eines Impfstoffes trägt auch zur Impfbereitschaft in der Bevölkerung bei. Wie stark die Reaktogenität von NVX-CoV2373 im Vergleich zu den mRNA-Impfstoffen bei gesunden Probanden ausfällt, wurde durch Selbstauskünfte mit Hilfe eines Fragebogens ermittelt. Dabei wurden sowohl lokale als auch systemische Impfreaktionen in der ersten Woche nach den beiden Impfungen erfasst. Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse wurden bei keinem der Impfregime beschrieben. Weitestgehend wurden ähnliche Beschwerden und ähnliche Schweregrade in den drei Impfregimen berichtet (Abbildung 47). Unabhängig vom applizierten Impfstoff wurden nach der zweiten Impfung die Beschwerden als ausgeprägter wahrgenommen als nach der ersten Impfung. Als häufigste lokale Beschwerde wurde bei allen Impfstoffen Schmerzen an der Injektionsstelle genannt, wohingegen eine Schwellung an der Injektionsstelle nur bei einer kleinen Anzahl an Probanden auftrat. Zwischen den Gruppen konnten dabei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Neben lokalen Beschwerden wurden systemische Reaktionen auf die Impfung dokumentiert. Am häufigsten berichteten die Probanden dabei von Fatigue, welche nach der zweiten Impfung häufiger auftrat als nach der ersten Impfung. Jedoch berichteten NVX-CoV2373 geimpfte Personen weniger über Fatigue als mRNA-geimpfte Teilnehmer ($p=0,032$). Fieber, Kopfschmerzen, Schüttelfrost, gastrointestinale Symptome und Myalgien waren in allen Impfregimen ähnlich. Kopfschmerzen und Myalgie traten ebenfalls häufiger nach der zweiten Impfung auf. Gelenkschmerzen traten bei NVX-CoV2373 nach der zweiten Impfung häufiger auf als bei BNT162b2 geimpften Personen ($p=0,005$). Die Einnahme von fiebersenkenden Medikamenten erfolgte in den drei Gruppen mit ähnlich geringer Häufigkeit.

ERGEBNISSE



ERGEBNISSE

Abbildung 47 Die Reaktogenität von NVX-CoV2373 ähnelt den mRNA-Vakzinen Die Reaktogenität innerhalb der ersten Woche nach jeder Impfstoffdosis wurde anhand eines standardisierten Fragebogens von den Probanden selbst erfasst. Dargestellt sind (**A**) das Vorhandensein von lokalen oder systemischen unerwünschten Ereignissen oder von beidem, (**B**) die individuelle Wahrnehmung, welche der beiden Impfungen stärker war, (**C**) lokale unerwünschte Ereignisse oder (**D**) systemische unerwünschte Ereignisse. Die statistische Analyse wurde mit dem χ^2 -Test durchgeführt. BNT, BNT162b2-Impfstoff; NVX, NVX-CoV2373-Impfstoff. Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (HIELSCHER et al., 2022).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der NVX-CoV2373-Impfstoff gut vertragen wurde und es keine auffälligen Unterschiede bei den berichteten Beschwerden zwischen den verschiedenen Impfstoffgruppen gab.

6 Diskussion

Impfstoffe gelten als wichtige Präventionsmaßnahme, um Infektionen zu verhindern oder deren Krankheitsschwere abzuschwächen. Totimpfstoffe auf Proteinbasis sind im Gegensatz zu Lebendimpfstoffen für Risikogruppen wie Dialysepatienten oder Personen geeignet, die immunsupprimierende Medikamente einnehmen. Die bessere Stabilität und dadurch einfachere Lagerung stellt dabei einen Vorteil gegenüber mRNA-Impfstoffen dar. Aufgrund der kurzen Verfügbarkeit war die Datenlage zur Charakterisierung der impfinduzierten T-Zell-Antwort zu Beginn dieser Arbeit sowohl für den proteinbasierten COVID-19 Impfstoff als auch für den rekombinanten HZ/su-Zosterimpfstoff, insbesondere bei Risikogruppen begrenzt.

6.1 VZV-spezifische Immunantwort bei Dialysepatienten und Kontrollen nach Impfung mit HZ/su

Der rekombinante Totimpfstoff HZ/su wurde zur Vorbeugung von Herpes Zoster und damit verbundenen schwerwiegenden Komplikationen bei immungeschwächten Personen wie Dialysepatienten zugelassen, bei denen aufgrund der urämischen Immundefizienz ein erhöhtes Risiko einer VZV-Reaktivierung besteht (KUO et al., 2012; LI et al., 2021). Da die Zahl der dialysepflichtigen Personen weiter zunimmt und da bei Dialysepatienten nach Impfungen gegen Hepatitis B, Tetanus (GIRNDT et al., 1995) und Influenza (SESTER et al., 2013) ein unzureichender Aufbau einer stabilen Immunantwort beobachtet wurde, ist die Frage, inwieweit der HZ/su-Impfstoff auch bei Dialysepatienten eine ausreichende VZV-spezifischen Immunität induziert, von hoher praktischer Relevanz. Das Wissen über die Immunogenität und Reaktogenität von HZ/su bei Dialysepatienten im Vergleich zu immunkompetenten Kontrollpersonen war bisher begrenzt.

In dieser Arbeit wurden gezeigt, dass HZ/su eine VZV-spezifische Immunantwort bei Dialysepatienten induziert. Dabei wurden jedoch quantitative und qualitative Unterschiede in der HZ/su induzierten Immunantwort auf zellulärer und humoraler Ebene bei Dialysepatienten im Vergleich zu Immungesunden beobachtet. Weiterhin haben Immunsuppressiva im Gegensatz zu Biologika einen inhibitorischen Effekt auf die zelluläre Immunantwort. Zudem wurde festgestellt, dass die HZ/su-Impfung keinen Einfluss auf die HSV-spezifische Immunität hat. Die Ergebnisse werden im Detail nachfolgend diskutiert.

6.1.1 Hohe VZV-Durchseuchung im Probandenkollektiv vor Impfung

Mit über 90 % ist die Durchseuchung mit VZV in der Weltbevölkerung sehr hoch (ELZOUKI et al., 2012; KILGORE et al., 2003; NARDONE et al., 2007). In dieser Arbeit lag laut Anamnese der Anteil an Patienten mit einer Primärinfektion (Windpocken) mit 76,19 % unterhalb dieses Wertes. Dies lässt sich damit erklären, dass die Infektion häufig im frühen Kindesalter stattfindet und die Probanden sich nicht zuverlässig an die Primärinfektion erinnern, was auch zu der hohen Anzahl an Probanden passt (27,6 %), die keine Angaben machen konnten. Jedoch konnten vor 1. HZ/su-Impfung bei einem Großteil der Probanden VZV-spezifische CD4 T-Zellen, nach Stimulation mit dem VZV-Lysat, nachgewiesen werden, was auf eine ähnlich hohe Durchseuchung wie in der Allgemeinbevölkerung schließen lässt. Die höheren Ausgangswerte VZV-spezifischer CD4 T-Zellen nach Stimulation mit dem VZV-Lysat in beiden Gruppen, im Vergleich zu VZV-gE Peptiden und VZV-gE Protein reaktiven T Zellen sind dabei vermutlich darauf zurückzuführen, dass im Lysat ein breiteres Spektrum an Antigenen vorliegt. Dadurch wird den Immunzellen das komplette Repertoire an VZV-spezifischen Proteinen als Antigene dargeboten, wohingegen durch die anderen beiden Stimulanzien lediglich die Immunität gegen das stark exprimierte gE Protein erfasst wird. Auch wenn Dialysepatienten aufgrund der Urämie eine Beeinträchtigung der Immunität sowie ein höheres Risiko für VZV-Reaktivierungen besitzen, konnten vor der ersten Impfung keine Unterschiede in den VZV-spezifischen T-Zell-Frequenzen zwischen Patienten und Kontrollen beobachtet werden, was im Einklang mit früheren Beobachtungen steht, wonach sich die VZV-spezifische T-Zell-Antwort im Allgemeinen nicht von gesunden Personen unterscheidet (RONDAAN et al., 2018).

Auf humoraler Ebene wurden vor der Impfung ebenfalls VZV-spezifische Antikörper bei den meisten Probanden detektiert. Lediglich 2 Dialysepatienten und 4 Kontrollpersonen waren seronegativ. Jedoch gaben alle seronegativen Probanden an, eine Windpockeninfektion durchgemacht zu haben, sodass möglicherweise die Antikörper-Level bereits unter die Nachweisgrenze gesunken waren. Aufgrund des Alters der Probanden ist davon auszugehen, dass die vorbestehende VZV-spezifische Immunantwort als Folge einer natürlichen Infektion gebildet wurde, da in Deutschland die Varizellen-Impfung erst seit 2004 empfohlen ist (IMPFKOMMISSION, 2004) und zudem keiner der Probanden angab, eine solche Impfung erhalten zu haben. Die hohe Seroprävalenz auch in dieser Studienkohorte verdeutlicht, wie groß das potenzielle Risiko für eine VZV-Reaktivierung ist. Dieser Aspekt unterstreicht die hohe

Relevanz eines immunogenen Impfstoffs zur Prävention von Herpes Zoster und mit der Reaktivierung assoziierten Komplikationen.

6.1.2 Schwächere Induktion VZV-spezifischer CD4 T-Zellen bei Dialysepatienten

HZ/su löste bei Dialysepatienten eine VZV-spezifische CD4 T-Zell-Antwort aus, was sich in einem signifikanten Anstieg der CD4 T-Zell-Frequenzen nach beiden Impfungen widerspiegelte. Die ebenfalls bei den Kontrollen beobachtete impfinduzierte Dynamik wurde bereits in anderen Studien beschrieben (CHLIBEK et al., 2016; CUNNINGHAM et al., 2016; LAL et al., 2015; LEROUX-ROELS et al., 2012). In beiden Gruppen konnte bei den VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen nach der zweiten Impfung ein deutlicher Verstärkungseffekt beobachtet werden, was die Bedeutung einer zweiten Impfstoffdosis für den Aufbau einer robusten Immunantwort hervorhebt. Jedoch wiesen Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollprobanden deutlich geringere CD4 T-Zell-Frequenzen nach beiden Impfdosen sowie in der Verlaufsmessung nach einem Jahr auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Impfung bei den Patienten eine geringere und weniger stabile CD4 T-Zell-Antwort induziert. Wenngleich keine Schutzkorrelate auf Ebene einer Immunität definiert sind, liegt nahe, dass die protektive Immunantwort der Patienten schneller abnimmt und damit das Risiko einer VZV-Reaktivierung erneut steigt (LEVIN et al., 2003).

Bekanntermaßen ist das Risiko für VZV-Reaktivierungen bei Frauen höher als bei Männern (CHAPMAN et al., 2003; FLEMING et al., 2004; KAWAI, YAWN, 2017). Da die CD4 T-Zell-Antwort eine wichtige Rolle zur Verhinderung einer Reaktivierung spielt, lag daher die Frage nahe, ob es möglicherweise geschlechtsspezifische Unterschiede in den CD4 T-Zell-Frequenzen gibt. Jedoch konnten innerhalb der beiden Gruppen weder vor den Impfungen noch danach geschlechtsspezifischen Unterschiede der VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Antwort beobachtet werden. Aufgrund des relativ kleinen Probandenkollektivs lässt sich jedoch keine robuste Schlussfolgerung ziehen. In Bezug auf die Impfung konnte bereits gezeigt werden, dass es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der Wirksamkeit von HZ/su gibt (WILLER et al., 2019).

Im Vergleich zu den VZV-spezifischen CD4 T-Zell-Frequenzen war die Induktion spezifischer CD8 T-Zellen sowohl bei Dialysepatienten als auch bei den Kontrollen unabhängig von der Wahl des Stimulus sehr gering. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Studien, die

ebenfalls gezeigt haben, dass HZ/su vorwiegend eine spezifische CD4 T-Zell-Reaktion induziert (DENDOUGA et al., 2012; LEROUX-ROELS et al., 2012). Diese reduzierte CD8 T-Zell-Antwort wurde ebenfalls in dieser Arbeit und von anderen für den proteinbasiertem Impfstoff NVX-CoV2373 beobachtet (HIELSCHER et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass CD8 T-Zellen über MHC-I auf dem intrinsischen Weg aktiviert werden. Das VZV-gE Protein wird jedoch von den APCs extrazellulär aufgenommen und damit in erster Linie über den MHC-II-Komplex präsentiert, wodurch primär CD4 T-Zellen aktiviert werden (MURPHY et al., 2018). Aufgrund der Beobachtung anderer Studien, dass der Impfstoff auch bei schwacher CD8 T-Zell-Antwort wirksam ist, liegt es nahe, dass CD4 T-Zellen eine wesentlich größere Rolle bei der Verhinderung einer VZV-Reaktivierung spielen (CHLIBEK et al., 2014).

6.1.3 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung VZV-spezifischer CD4 T-Zellen

Neben der quantitativen Analyse wurden VZV-spezifische CD4 T-Zellen auch phänotypisch und funktionell untersucht. Es liegt nahe, dass die Zunahme der CTLA-4-Expression in den VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach beiden Impfungen auf die Aktivierung der T-Zellen nach Kontakt mit dem Antigen zurückzuführen ist (LINSLEY et al., 1996; RILEY, JUNE, 2005). Dementsprechend wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass die VZV-Reaktivierung bei Patienten mit Herpes Zoster zu einer Hochregulierung von CTLA-4 auf VZV-spezifischen T-Zellen führt, welches sich nach Abklingen der Symptome wieder normalisiert (SCHUB et al., 2015). Ähnliches konnte auch bei Patienten mit VZV-assoziierten Meningitiden und bei aktiven Infektionen mit anderen Erregern beobachtet werden (SCHUB et al., 2018b). Die Beobachtung einer solchen Dynamik der CTLA-4 Expression nach Impfung mit HZ/su deutet darauf hin, dass die CTLA-4 Expression auf VZV-spezifischen CD4 T-Zellen ein direktes Maß für den kürzlichen Antigenkontakt infolge einer Infektion oder Impfung sein könnte. Im Gegensatz dazu zeigt die bei den Verlaufsmessungen beobachtete Abnahme der CTLA-4 Expression, dass kein erneuter Antigenkontakt stattgefunden hat und die Hochregulierung von CTLA-4 durch den Impfstoff induziert wurde. Während eine hohe CTLA-4 Expression sowohl nach Impfung als auch nach Reaktivierung zu beobachten ist, scheint sich das Zytokinprofil der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach den beiden Ereignissen jedoch deutlich voneinander zu unterscheiden. Impfinduzierte VZV-spezifischen CD4 T-Zellen wiesen einen multifunktionalen Th1-Phänotyp auf, der durch die Ko-Expression der Zytokine IFNy, IL-2 und TNF α charakterisiert ist, wohingegen die Th1 CD4 T-Zellen nach akutem Zoster funktionell eingeschränkt waren und

DISKUSSION

überwiegend nur IFNy exprimierten (SCHUB et al., 2015). Die Multifunktionalität der impfstoffinduzierten CD4 T-Zellen könnte durch Proliferation und Sekretion von Effektormolekülen zu einem besseren Schutz beitragen (DARRAH et al., 2007).

Insgesamt wiesen VZV-spezifische CD4 T-Zellen eine hohe Expression von CD45RO auf, wie dies auch in der Literatur bereits beschrieben wurde (VOSSEN et al., 2004). Die Analyse der VZV-spezifischen CD4 Gedächtnis-T-Zellen auf der Grundlage der Expression von CD27 und CD45RO ergab einen höheren Anteil an zentralen Gedächtnis-T-Zellen und einen geringeren Anteil an Effektor-Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen zeichnen sich durch einen höheren Schutz vor Apoptose aus (MAHNKE et al., 2013; RIOU et al., 2007). Da Dialysepatienten eine hohe Apoptoserate von T-Zellen aufweisen (MEIER et al., 2002; MOSER et al., 2003), ist es denkbar, dass Effektor-Gedächtnis-T-Zellen schneller abgebaut werden und somit eine Verschiebung des Anteils der zentralen Gedächtnis-T-Zellen stattfindet. Ähnliche Beobachtungen existieren im Rahmen der Hepatitis B-Impfung, bei der die Zahl der CD4 IL-2⁺ T-Zellen mit Effektor-Gedächtnis-Phänotyp bei Dialysepatienten zwei Wochen nach der Hepatitis-B-Impfung geringer war (LITJENS et al., 2008). Hieraus wurde eine zeitliche Verzögerung bei der Bildung von T-Zellen mit Effektor-Gedächtnis-Phänotyp postuliert. Allerdings fanden sie keine signifikanten Unterschiede bei den CD4 IFNy⁺ T-Zellen (LITJENS et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit basierte die Untersuchung des Gedächtnis-Phänotyps ausschließlich auf spezifischen CD4 IFNy⁺ T-Zellen, sodass CD4 IL-2⁺ T-Zellen nicht bezüglich ihres Differenzierungsstatus untersucht werden konnten.

In einer weiteren Arbeit wurde eine geringere T-Zell-Antwort bei älteren Personen beobachtet, die eine hohe CD39 Expression der CD4 T-Zellen aufwiesen. Dies wurde im Kontext mit einer höheren Apoptoserate von CD39⁺ CD4⁺ Effektor-T-Zellen diskutiert, welche sich dadurch nicht zu langlebigen Gedächtniszellen entwickeln können und somit der Aufbau einer stabilen Immunantwort gehemmt wird (FANG et al., 2016). Da Dialysepatienten ebenfalls eine leicht erhöhte CD39 Expression aufwiesen, könnte dies eine Erklärung für den geringeren Anteil an Effektorzellen sein. Folglich wäre es möglich, dass durch erhöhte Apoptose der Effektorzellen eine weniger robuste VZV-spezifische T-Zell-Antwort aufgebaut wird, was die geringeren CD4 T-Zell-Frequenzen der Patienten nach einem Jahr erklären könnte. Während die Mehrheit der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen einen Effektor-Gedächtnis- oder Zentral-Gedächtnis-Charakter hatte, wurden bei der antigenunabhängigen Analyse im Einklang mit vorigen Studien

DISKUSSION

hauptsächlich naive und zentrale CD4 Gedächtnis-T-Zellen in beiden Gruppen nachgewiesen (YOON et al., 2006).

Das Zytotoxin Granzym B spielt eine wichtige Rolle bei der Erregerbekämpfung, indem es unter anderem bei der Apoptose mitwirkt. Granzym B wird häufig von T-Zellen mit zytotoxischen Funktionen, aber auch NK-Zellen exprimiert (CHOWDHURY, LIEBERMAN, 2008). Aufgrund der hohen zytotoxischen Eigenschaften von CD8 T-Zellen war die Untersuchung der Granzym B Expression nach HZ/su-Impfung daher naheliegend. Jedoch war eine Analyse der Granzym B Expression in VZV-spezifischen CD8 T-Zellen aufgrund der geringen Reaktivität nicht möglich. In VZV-spezifischen CD4 T-Zellen konnte nur eine geringe Grundexpression von Granzym B beobachtet werden, die zudem zeitlich unabhängig und nicht durch die Impfung induziert war. Erwartungsgemäß war jedoch eine höhere Granzym B Expression bei der CD8 T-Zell-Gesamtpopulation im Vergleich zur CD4 T-Zell-Gesamtpopulation erkennbar, die im Einklang mit anderen Studien steht (LIN et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit kann wegen der geringen Probandenzahl und geringer Anzahl an VZV-spezifischen Zellen bei einzelnen Personen jedoch keine eindeutige Aussage zur Granzym B Expression getroffen werden, vielmehr könnte es ein Ansatz für weitere Untersuchungen darstellen.

Dialysepatienten zeigten nach der VZV-spezifischen Stimulation eine ähnliche Proliferationskapazität der T-Zellen wie die Kontrollpersonen. Aufgrund der längeren Antigenstimulation im Proliferations-Assay ist die Zeit für die T-Zell-Aktivierung deutlich länger (7 Tage) als bei der Kurzzeitstimulation (6 Stunden), wodurch die geringfügigen Unterschiede der initialen Frequenzen ausgeglichen wurden. Interessanterweise war im Vergleich zur VZV-spezifischen Kurzzeitstimulation, bei der kaum VZV-spezifische CD8 T-Zellen induziert wurden, nach der Stimulation über einen Zeitraum von 7 Tagen eine Proliferation spezifischer CD8 T-Zellen nachweisbar, wenngleich diese deutlich geringer ausfiel als bei CD4 T-Zellen. Möglicherweise konnten, aufgrund der längeren Inkubationszeit, die VZV-gE Peptide sowie das Protein über die Kreuzpräsentation an MHC-I binden und dadurch von CD8 T-Zellen erkannt werden. Das für HZ/su verwendete Adjuvans AS01_B enthält MLP/QS21, von dem bekannt ist, dass es die Zytotoxizität von CD8-T-Zellen erhöht (MIKLOSKA et al., 2000) und die Antigen-Kreuzpräsentation verbessert (DEN BROK et al., 2016), was zu einer Induktion von CD8 T-Zellen *in vivo* führt, deren Vermehrung über einen längeren Zeitraum im Proliferations-Assay detektierbar wird.

DISKUSSION

Die Analyse der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 erfolgte in einem Vorversuch bei 5 gesunden Probanden, die für detaillierte engmaschige Messungen zur Charakterisierung der zellulären Immunität eingeschlossen wurden. Der Anstieg der Ki-67 Expression in VZV-spezifischen CD4 T-Zellen eine Woche nach beiden Impfungen weist dabei auf eine schnelle Proliferation der spezifischen CD4 T-Zellen nach der Induktion durch die Impfung hin, da Ki-67 ausschließlich in den aktiven Zellphasen exprimiert wird (GERDES et al., 1984; SCHOLZEN, GERDES, 2000). Trotz geringer Probandenzahl sind die erzielten Ergebnisse sehr homogen und liefern ein eindeutiges Indiz für eine rasche Proliferation von VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach der Impfung mit HZ/su. Aus logistischen Gründen war es leider nicht möglich, dieselben engmaschigen Untersuchungen bei Dialysepatienten durchzuführen und daher sind keine vergleichenden Aussagen möglich.

Zur Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Wahl des Antigens zur Verfügung; dabei kann es sich z.B. um Lysate von mit Erreger infizierten Zellkulturen (VZV-Lysat), aber auch um einzelne Erregerproteine oder Peptide handeln. Beim Vergleich der unterschiedlichen VZV-Antigen-Quellen wurde bei allen untersuchten Antigenen eine impfinduzierte Dynamik beobachtet, wenngleich geringe Unterschiede in den Frequenzen der VZV-spezifischen CD4 T-Zellen und der CTLA-4 Expression festgestellt werden konnten. Auffällig war insbesondere die deutlich höhere CTLA-4 Expression bei VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nach Stimulation mit dem VZV-gE Protein. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass dieses Antigen sehr effektiv die impfinduzierten CD4 T-Zellen stimulierte, da es sich auch um das im Impfstoff enthaltene gE Protein handelt. Die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen VZV-Antigenen fiel weitestgehend gleich aus. Auch die ausschließlich moderate Induktion VZV-spezifischer CD8 T-Zellen wurde bei allen verwendeten Antigenen beobachtet. Anhand dessen lässt sich schlussfolgern, dass VZV-Lysat, VZV-gE Peptide und Protein geeignete Stimuli zum Nachweis VZV-spezifischer CD4 T-Zellen darstellen. Zu beachten ist, dass dennoch kleinere Unterschiede innerhalb der verschiedenen Antigenquellen auftraten, was die Notwendigkeit der Austestung unterstreicht.

6.1.4 Unterschiede in den Lymphozyten-Subpopulationen und der humoralen Immunantwort auf HZ/su

Dialysepatienten weisen eine Immundefizienz auf, welche bei der Untersuchung der Lymphozyten-Subpopulationen anhand der signifikant geringeren Anzahl an CD3 und CD4 T-

DISKUSSION

Zellen, sowie B-Zellen und Plasmablasten auch in dieser Arbeit beobachtet wurde. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, die ähnliche Auffälligkeiten in der Lymphozytenzellzahl detektiert haben (GRIVEAS et al., 2005; MOLINA et al., 2018).

In dieser Arbeit wurde der zirkulierende Anteil der Tfh-Zellen im Blut quantifiziert und charakterisiert. Follikuläre T-Helferzellen (Tfh) interagieren mit B-Zellen in sekundären lymphoiden Organen und unterstützen diese bei der Produktion von hochaffinen Antikörpern, weshalb sie im Kontext der Induktion einer Immunantwort von besonderem Interesse sind (CROTTY, 2019). Jedoch konnten keine impfinduzierten Veränderungen beobachtet werden. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die Analyse direkt aus dem Blut ohne spezifische Stimulation erfolgte, sodass der gesamte Anteil an Tfh-Zellen im Blut betrachtet wurde. Zu beachten ist auch, dass die Analyse der Blutproben nicht unbedingt dynamische Veränderungen in den Lymphknoten widerspiegelt.

Im zeitlichen Verlauf konnten auch keine Änderungen in der Zusammensetzung der B-Zell-Subpopulationen in den beiden Gruppen festgestellt werden. Auch der Anteil an Plasmablasten, welche für die Sezernierung von spezifischen Antikörpern verantwortlich sind, änderte sich im Verlauf nicht. Das Ergebnis lässt sich damit begründen, dass die Zellen nicht VZV-spezifisch stimuliert wurden und somit die Gesamtheit aller Plasmablasten dargestellt sind, wodurch etwaige geringfügige Unterschiede maskiert werden und dadurch nicht nachweisbar sind. Zudem wurde beschrieben, dass das Maximum der Plasmablasten im Blut in der Regel in der ersten Woche nach einer Impfung (FINK, 2012; LEDO et al., 2020) oder nach einer VZV-Reaktivierung (FUKUCHI et al., 2018) erreicht wird und anschließend wieder abnimmt. Die Analyse der Blutzellen zeigte jedoch, dass Dialysepatienten insgesamt eine signifikant geringere Anzahl an B-Zellen und Plasmablasten als Kontrollpersonen aufwiesen, was vermutlich auf die urämische Erkrankung zurückzuführen ist (DESCAMPS-LATSCHA, CHATENOUD, 1996; MOLINA et al., 2018). Auffällige allgemeine Unterschiede wurden auch bei den weiteren B-Zell-Subpopulationen festgestellt. Während Dialysepatienten einen höheren Anteil an naiven B-Zellen aufwiesen, war der Anteil an *non-switched* Gedächtnis-B-Zellen zu allen Zeitpunkten signifikant geringer als bei den Kontrollen. Ähnliche Unterschiede in der Verteilung der B-Zell-Subpopulationen wurden auch bei anderen Krankheiten wie der systemischen Sklerose beschrieben (SIMON et al., 2016). Ein Grund für den höheren prozentualen Anteil an naiven B-Zellen könnte eine erhöhte Produktion zur Aufrechterhaltung

der Homöostase sein, da es auch bei Dialysepatienten bekanntermaßen krankheitsbedingt zur Apoptose von Lymphozyten kommt (ELEFTHERIADIS et al., 2007). Durch eben diese Apoptose könnte die Verringerung der *non-switched* Gedächtnis-B-Zellen bei Patienten verursacht werden (FERNÁNDEZ-FRESNEDO et al., 2000).

Eine reduzierte Anzahl an B-Zellen und Plasmablasten würde vermuten lassen, dass der HZ/su-Impfstoff bei Dialysepatienten in geringerem Maße VZV-spezifische IgGs induziert. Interessanterweise lösten beide Impfstoffdosen eine Induktion von VZV-spezifischem IgG mit starker Neutralisierungsaktivität sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen aus. Wie bei den CD4 T-Zellen war der Anstieg der spezifischen IgGs bei Dialysepatienten jedoch weniger ausgeprägt und im zeitlichen Verlauf weniger stabil. Allerdings zeigten verschiedene Studien, dass die humorale Komponente eine weitaus geringere Rolle beim Schutz vor Herpes Zoster spielt als die zelluläre (BURKE et al., 1982; WEBSTER et al., 1989). Anhand dieser Erkenntnisse lässt sich vermuten, dass geringere impfinduzierte VZV-spezifische IgG-Level kein Indiz für ein höheres Risiko einer VZV-Reaktivierung darstellen. Auch wenn die Induktion der humoralen VZV-Antwort bei der Verhinderung einer VZV-Reaktivierung vermutlich eine weniger wichtige Rolle spielt, könnte sie für die Verhinderung einer Reinfektion mit Varizellen relevant sein (ARVIN, 2008).

6.1.5 Reaktogenität von HZ/su

Da die im proteinbasierten Impfstoff eingesetzten Proteine keine alleinige Immunantwort auslösen würden, sondern die Immunzellen hierfür Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) benötigen, wird als zusätzliche Komponente ein Adjuvans mitgeführt. Dieses enthält PRR, auf welche die Immunzellen entsprechend reagieren können. Das für HZ/su verwendete Adjuvans AS01_B enthält unter anderem Saponin, welches eine temporäre Porenbildung in den Zellen hervorruft (LACAILLE-DUBOIS, 2019). Aufgrund dieser Eigenschaft lässt sich vermuten, dass es bei der Impfung dadurch zu lokalen Impfreaktionen kommen könnte. Auch einige Kontrollpersonen dieser Arbeit beschrieben in den Impftagebüchern leichte bis moderate Impfreaktionen. Jedoch wurde der HZ/su-Impfstoff von Dialysepatienten im Allgemeinen gut vertragen, was mit anderen Ergebnissen im Einklang steht (MARTINO et al., 2023). Die sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen überwiegend beklagten lokalen Beschwerden, , stimmen mit Beobachtungen der Reaktionen nach einer Impfdosis überein (SCHMADER et al., 2019). Der Effekt der geringeren Reaktogenität bei Dialysepatienten konnte bereits bei der Impfung

gegen SARS-CoV-2 beobachtet werden (BRONDER et al., 2024). Dialysepatienten leiden aufgrund ihrer Urämie und dem Dialyseverfahren häufig unter chronischen Beschwerden wie Müdigkeit oder Kopfschmerzen (CAPLIN et al., 2011), so dass Impfreaktionen, insbesondere systemische Beschwerden möglicherweise weniger häufig wahrgenommen und dokumentiert werden. In vorhergehenden Studien berichteten jüngere Impflinge über stärkere Impfnebenwirkungen als ältere (ZEEVAERT et al., 2023). Auch in dieser Arbeit wurden von vereinzelten insbesondere jüngeren Probanden stärkere Impfreaktionen wahrgenommen. Eine Erklärung hierfür könnte das Alter sein, da bei den jüngeren Probanden möglicherweise das Immunsystem auf das Adjuvans stärker reagiert beziehungsweise noch eine vorbestehende Immunität vorliegt, die durch die Impfung stärker geboostert wird. Interessanterweise kam es auf Basis von Fallberichten insbesondere kurz nach der ersten Impfung bei einzelnen Personen zu einen Herpes Zoster (ÄRZTESCHAFT, 2020; ASSMANN et al., 2024). Ein Zusammenhang zwischen der HZ/su-Impfung und zeitnahen VZV-Reaktivierungen wurde in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet. Auch das Paul-Ehrlich-Institut konnte hierzu keine Kausalität mit dem VZV-Antigen feststellen (ORRU et al., 2023).

6.1.6 Keine Induktion HSV-spezifischer T-Zellen durch HZ/su

Aufgrund der Verwandtschaft von VZV zu HSV1 und HSV2 sowie einer bekannten Kreuzreaktivität von T-Zellen zwischen HSV und VZV (JING et al., 2016), wurde untersucht, ob die HZ/su-Impfung auch zur Induktion einer HSV-spezifischen Immunantwort führt. Jedoch scheint der Impfstoff keinen Einfluss auf die HSV-Immunogenität zu haben, da im Verlauf weder bei Kontrollen noch bei dialysepflichtigen Probanden eine impfinduzierte Änderung der Dynamik HSV-spezifischer CD4 T-Zell-Frequenzen festgestellt werden konnte. Auch die CTLA-4 Expression der HSV-spezifischen CD4 T-Zellen änderte sich im Vergleich zu der von VZV-spezifischen CD4 T-Zellen nicht. Die allgemein höhere impfunabhängige Frequenz und CTLA-4 Expression von HSV-spezifischen CD4 T-Zellen bei den Probanden könnte hingegen auf einen häufigeren Erregerkontakt der Zellen durch wiederholte Reaktivierung von HSV zurückzuführen sein. Auch wenn sowohl VZV als auch HSV Vertreter der Alphaherpesviren sind, weisen die Viren in Bezug auf das Glykoprotein E nur 47 % Ähnlichkeit und 27 % Identität auf (LITWIN et al., 1992). So ist das gE von VZV länger als das von HSV und besitzt einen einzigartigen Rest, der wichtige Funktionen bei Virusreplikation und Zell-Zell-Verbreitung übernimmt, da VZV im Vergleich zu HSV kein Glykoprotein D besitzt, das diese Funktionen

übernimmt (KINCHINGTON et al., 2012; MODROW et al., 2022). Aufgrund dieser Unterschiede und der Ergebnisse der Arbeit lässt sich schließen, dass der HZ/su-Impfstoff keine HSV-spezifische CD4 T-Zell-Antwort induziert und daher nicht als Impfstoff zur Vorbeugung einer HSV-Reaktivierung geeignet ist.

6.1.7 Effekt immunsupprimierender Medikamente auf die VZV-Immunantwort

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A und Tacrolimus) und des Steroids Methylprednisolon, die nach einer Organtransplantation zur Verhinderung einer Abstoßung eingesetzt werden, untersucht. Durch die Einnahme dieser Immunsuppressiva kommt es häufig zu einem verminderten Aufbau einer impfinduzierten Immunantwort (KRUEGER et al., 2020; SCHMIDT et al., 2021b). Dies zeigten auch die *in vitro* Versuche dieser Arbeit, da sowohl die VZV-spezifische CD4 T-Zell-Frequenz als auch die Proliferationsfähigkeit mit steigender Konzentration dieser Immunsuppressiva abnahmen. Ebenso wurde die Immunantwort auf die polyklonale Stimulation mit SEB gehemmt, was die generelle unspezifische immunsupprimierende Wirkung unterstreicht. Diese Ergebnisse lassen schließen, dass die Einnahme immunsuppressiver Medikamente die Induktion und Funktion VZV-spezifischer T Zellen nach Impfung von Transplantierten beeinträchtigen. Die durchgeföhrten *in vitro* Versuche spiegeln jedoch nicht den komplexen Zusammenhang im Patienten wider. So erhalten Transplantierte meist eine kombinierte Behandlung mit immunsupprimierenden Medikamenten, um mehr Angriffspunkte des Immunsystems abdecken zu können. Von unserer Arbeitsgruppe wurde bereits zeigt, dass eine Kombination dieser Immunsuppressiva *in vitro* eine noch stärkere Hemmung verursachen kann (LEYKING et al., 2015). Auch der Einfluss von Komorbidität konnte in diesem Versuch nicht berücksichtigt werden. Interessanterweise konnten Vink et al. bei Patienten nach Nierentransplantation die Immunogenität von HZ/su auf humoraler und zellulärer Ebene beobachten (VINK et al., 2020). Ähnliche Ergebnisse erzielten Studien bei Lungentransplantierten (HIRZEL et al., 2021; L'HUILLIER et al., 2021), was darauf schließen lässt das HZ/su trotz der Behandlung mit immunsupprimierenden Medikamenten bei den Patienten VZV-spezifische CD4 T-Zellen induziert und somit das Herpes Zoster Risiko reduzieren kann. In den genannten Studien wurden jedoch keine immungesunden Kontrollpersonen miteingeschlossen, so dass unklar bleibt, inwieweit und in welchem Ausmaß die durch Impfung induzierte Immunität durch die medikamentöse Immunsuppression eingeschränkt ist.

Eine höhere VZV-Reaktivierungsrate wird auch bei Patienten beobachtet, die Medikamente gegen rheumatoide Erkrankungen einnehmen (MCDONALD et al., 2009; SMITTEN et al., 2007; VEETIL et al., 2013). Im Vergleich zur Transplantation handelt es sich in der Regel um Immunsuppressiva mit anderen Wirkprinzipien. Von unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass Patienten, die aufgrund einer rheumatischen Erkrankung Medikamente einnahmen, geringere VZV-spezifische T-Zell-Frequenzen aufwiesen. Interessanterweise konnte jedoch in *in vitro* Versuchen mit Blut von gesunden Probanden nur eine geringe Reduktion der reaktiven CD4 T-Zell-Frequenzen unter Einwirkung von TNF α -Blockern, Kostimulations-Blocker, IL-6 Blocker oder JAK-Inhibitor beobachtet werden (SCHUB et al., 2018a). Dies steht im Einklang zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wo lediglich auf individueller Ebene ein geringer Rückgang der reaktiven CD4 T-Zell-Frequenzen nach Inkubation mit diesen Rheuma-Medikamenten beobachtet wurde. Gegenüber den Medikamenten zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung haben die meisten getesteten Rheuma-Medikamente keine direkte Auswirkung auf die Zytokininduktion, was die ausbleibende Reduktion der T-Zell-Frequenzen erklären könnte. Bisherige Studien sprechen für eine gute Verträglichkeit und Wirksamkeit von HZ/su bei Rheuma-Patienten (DAGNEW et al., 2020; LENFANT et al., 2021). Daten zur Immunogenität von HZ/su bei Menschen mit rheumatoiden Erkrankungen deuten zudem auf eine Induktion der VZV-spezifischen Immunantwort hin, wobei keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollprobanden beobachtet wurden (KOJIMA et al., 2024; VENERITO et al., 2023).

6.1.8 Immunogenität von HZ/su bei MS-Patienten

Eine weitere Risikogruppe mit einer erhöhten Reaktivierungsrate stellen Patienten mit multipler Sklerose (MS) dar. Auch bei diesem Patientenkollektiv gab es bisher wenig Daten zur Immunogenität von HZ/su. In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf Therapien mit anti-CD20 Antikörpern und S1P-Rezeptormodulatoren. Erste Ergebnisse dieses Projektes, dessen finale Messungen Ende 2024 abgeschlossen wurden, zeigen, dass der HZ/su-Impfstoff nach zwei Impfungen bei Patienten unter B-Zell-depletierender anti-CD20-Therapie VZV-spezifische CD4 T-Zellen induziert. Die ähnlich hohen CD4-T-Zell-Frequenzen wie bei den gesunden Kontrollen sind ein Indiz für eine gute Induktion der zellulären Immunantwort. Hingegen weist die schwache Induktion von VZV-spezifischen Antikörpern auf einen erwartungsgemäß unzureichenden Aufbau der humoralen Immunantwort hin, was auf die B-

DISKUSSION

Zell-depletierende Eigenschaft der anti-CD20-Medikamente zurückzuführen ist (SELLEBJERG et al., 2020). Eine unzureichende Induktion der humoralen Immunantwort wurde schon nach anderen Impfungen beobachtet (ALFONSO-DUNN et al., 2022; VIJENTHIRA et al., 2021). Da eine VZV-Reaktivierung hauptsächlich auf eine schwache zelluläre Immunantwort zurückzuführen ist, ist zu vermuten, dass die Wirksamkeit der Impfung auch bei unzureichender Induktion von Antikörpern gegeben ist.

Bei Patienten, die eine Behandlung mit S1P-Rezeptormodulatoren erhalten haben, zeigte sich, dass keine Aussage über eine Induktion einer zellulären Immunität möglich war, da erwartungsgemäß insgesamt nur wenige T-Zellen in Zirkulation detektierbar waren. Dies begründet sich durch den Wirkmechanismus der S1P-Rezeptormodulatoren, über die eine T-Zell-Migration aus den Lymphknoten unterbunden wird, wodurch T-Zellen nicht mehr im Blut zirkulieren können (CHUN, HARTUNG, 2010). Die nur geringfügig höheren VZV-spezifischen Antikörper-Level als bei anti-CD20-Therapie verdeutlichen die unterstützende Funktion von CD4 T-Zellen bei der B-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion. Inwieweit dennoch in den drainierenden Lymphknoten T-Zellen induziert werden, lässt sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht klären. Interessant wäre hier die Frage, ob ein Absetzen des S1P-Rezeptormodulators zu einem Anstieg der VZV-spezifischen T-Zellen im Blut führen würde. Schlussfolgernd ist zu vermuten, dass die durch die Impfung erzielte Schutzwirkung bei Patienten mit S1P-Rezeptormodulatoren geringer ausfällt, da dementsprechend VZV-spezifische T-Zellen nicht in ausreichendem Maße im Körper zirkulieren, um eine Reaktivierung zu verhindern. Dies wird durch den Aspekt unterstrichen, dass Patienten unter Fingolimod, einem S1P-Rezeptormodulator, eine höhere Herpes Zoster Rate haben als unbehandelten Personen (11 vs. 6 pro 1000 Patientenjahre) oder Patienten unter anderen krankheitsmodifizierenden Therapien (ARVIN et al., 2015). In Bezug auf die impfinduzierte Immunantwort wurde bereits nach einer Influenza-Impfung eine verminderte humorale Immunantwort mittels Hämagglutinationshemmungstest beobachtet (OLBERG et al., 2018). Eine weitere Studie nach Influenza-Impfung, die sowohl humorale als auch zelluläre Immunität untersuchte, konnte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten unter Fingolimod und gesunden Probanden feststellen (MEHLING et al., 2011). Dass überhaupt spezifische T-Zellen in ähnlicher Größenordnung wie bei Gesunden nachweisbar sind, ist vor dem Hintergrund in der vorliegenden Arbeit beobachteten geringen T-Zell-Zahl in Zirkulation

überraschend. Möglicherweise wurde die bei den Patienten ausgeprägte Lymphopenie im experimentellen Ansatz durch eine normierte Zellzahl an PBMCs kompensiert, die für den ELISpot eingesetzt wurde, um IFNy sezernierende Zellen zu bestimmen. Zu beachten ist hier auch die kleine Probandenanzahl und das fehlende Matching im Alter und Geschlecht. Im Allgemeinen ist die Datenlage zur Immunogenität von Impfungen bei Patienten unter S1P-Therapie jedoch weiterhin sehr begrenzt und bietet das Potential für zusätzliche Untersuchungen.

6.1.9 Ausblick HZ/su-Impfung

Im Gegensatz zur SARS-CoV2-Impfung induziert HZ/su bei Dialysepatienten bereits nach einer bzw. nach zwei Impfstoffdosen eine deutliche spezifische CD4 T-Zell-Antwort und IgG-Antikörper (ESPI et al., 2021; SIMON et al., 2021). Es ist sehr wahrscheinlich, dass Dialysepatienten dabei von dem früheren Kontakt mit VZV und damit von einer bereits vorhandenen Immunantwort profitieren, die durch die beiden HZ/su-Impfstoffdosen verstärkt wird. In einer Studie mit gesunden Personen wurde bereits eine robuste Immunantwort durch HZ/su über einen Zeitraum von 10 Jahren beobachtet (STREZOVA et al., 2022). Für immungeschwächte Personen liegen jedoch noch keine Daten zur Langzeitstabilität und der durch Impfung vermittelten Dauer der Schutzwirkung vor. Die Notwendigkeit einer solchen Analyse ergibt sich aus den Ergebnissen zu anderen Impfstoffen, z. B. gegen Influenza. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Immunreaktion bei Dialysepatienten nach nur einem Jahr auf das Ausgangsniveau zurückfiel, während die Immunreaktion bei gesunden Personen stabil blieb. Die Immunität ließ sich jedoch im Folgejahr bei Dialysepatienten sehr gut boostern, während der Effekt der Folgeimpfung bei Kontrollpersonen mit besser erhaltener Immunität schwächer ausfiel (SESTER et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit nahm die VZV-spezifische Immunantwort im Vergleich zu den Kontrollen sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene stärker ab, blieb aber über den Ausgangswerten, was auf eine robuste Induktion der Immunantwort hindeutet. Es bleibt jedoch unklar, wie lange die Immunität und die Schutzwirkung erhalten bleibt. Zukünftige Studien müssen daher zeigen, ob Dialysepatienten und andere Risikogruppen im Vergleich zu Immungesunden möglicherweise von einer weiteren Impfung zur Auffrischung profitieren könnten. Neben der zunehmend älter werdenden Bevölkerung steigt auch die Zahl an Dialysepatienten weiter an (HÄCKL et al., 2021;

DISKUSSION

LIYANAGE et al., 2015). Dies birgt die Gefahr einer weiteren Zunahme von VZV-Reaktivierungen.

Diese Aspekte unterstreichen die klinische Relevanz für die Untersuchung der Immunogenität von Impfstoffen bei vulnerablen Personen. Zukünftig könnten aus den Erkenntnissen dieser Arbeit Strategien zum Monitoring des Impferfolges sowie zur Erfassung der Notwendigkeit einer Auffrischimpfung bei Risikopatienten entwickelt werden.

Zur Verhinderung von Herpes Zoster steht zum jetzigen Zeitpunkt nur der proteinbasierte Impfstoff HZ/Su als Totimpfstoff zu Verfügung. Jedoch forschen BioNTech und Pfizer an einem mRNA-Impfstoff gegen Herpes Zoster (BNT167), welcher sich aktuell in Phase 2 befindet (BIONTECH, 2023). In Bezug auf die impfinduzierte Immunantwort wäre ähnlich wie bei den COVID-19 mRNA-Impfstoffen eine im Vergleich zum proteinbasierten HZ/su-Impfstoff ausgeprägtere CD8 T-Zell-Antwort zu erwarten. Ob dies auch mit einer verbesserten Schutzwirkung vor Herpes Zoster einhergeht, sollten die zugehörigen Zulassungsstudien und vergleichende Beobachtungsstudien mit dem proteinbasierten Impfstoff zeigen.

6.2 SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort bei immungesunden Personen nach Impfung mit dem proteinbasierten Impfstoff NVX-CoV2373

Die Zulassung des Impfstoffs NVX-CoV2373 in Europa und den Vereinigten Staaten als Zweifachdosis-Impfung erfolgte Ende 2021 (EUROPEAN MEDICINE AGENCY (EMA), 2021; U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2022). Da zu diesem Zeitpunkt erst wenige Immunogenitätsdaten zur zellulären Immunität und zur Reaktivität insbesondere gegenüber vorherrschenden bedenklichen Varianten (VOC) vorlagen, wurde eine detaillierte Analyse der Immunogenität des NVX-CoV2373 Impfstoffs durchgeführt. Ein besonderes Augenmerk lag auf dem Vergleich der Immunogenität mit den mRNA-Impfstoffen BNT152b2 und mRNA-1273. In der longitudinalen Analyse wurde die quantitative zelluläre und humorale Immunantwort auch im Hinblick auf Durchbruchsinfektionen untersucht.

6.2.1 NVX-induzierte Immunantwort und der Vergleich mit mRNA-Impfstoffen

Der Impfstoff NVX-CoV2373 induzierte in den meisten Personen Spike-spezifische CD4 T-Zellen, wie es auch in einer Phase-I/II-Substudie beschrieben wurde (RYDYZNSKI MODERBACHER et al., 2022). Die Spike-spezifische CD4 T-Zellen wiesen einen Th1-Phänotyp auf, der durch die Expression der Zytokine IFNy, IL-2 und TNF α charakterisiert ist. Diese

DISKUSSION

Beobachtung steht im Einklang mit anderen Studien zur Untersuchung der NVX-CoV2373-induzierten zellulären Immunität (KEECH et al., 2020; RYDYZNSKI MODERBACHER et al., 2022). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls eine Induktion von Spike-spezifischen CD4 T-Zellen bei 12 Personen beschrieben; die Analyse erfolgte hier jedoch erst 3 bis 4 Monate nach der zweiten Impfung (ZHANG et al., 2022), wodurch nach aktuellem Kenntnisstand der Zeitpunkt der maximalen T-Zell-Aktivität bereits überschritten war. Interessanterweise konnte bei Personen mit vorheriger Infektion bereits nach einer Impfung mit NVX-CoV2373 eine gleichwertige CD4 T-Zell-Antwort induziert werden, was darauf schließen lässt, dass eine natürliche Infektion bereits eine gute Immunantwort induzierte. Der zusätzliche Boost der Spike-spezifischen Immunantwort durch eine Dosis NVX-CoV2373 unterstrich zu diesem Zeitpunkt die Bedeutung der Impfempfehlung für eine weitere Immunisierung (SCHLABERG et al., 2022).

Im Vergleich mit den mRNA-Impfstoffregimen war die durch NVX-CoV2373-induzierte CD4 T-Zell-Antwort schwächer ausgeprägt als nach der mRNA-1273- und BNT162b2-Impfung. Zudem waren die geringeren CD4 T-Zell-Frequenzen mit einer deutlich schwächeren Expression von CTLA-4 und einem geringeren Anteil an multifunktionalen Zellen verbunden. Sowohl die VZV-Impfstudie dieser Arbeit als auch vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass ein Anstieg der CTLA-4 Expression und die Multifunktionalität antigenspezifischer T-Zellen mit der Antigenbelastung während einer aktiven Infektion (SCHUB et al., 2018b; SCHUB et al., 2020) oder Impfung (KLEMIS et al., 2022; LEDO et al., 2020; SCHMIDT et al., 2021a) korreliert, um eine übermäßigen T-Zell-Proliferation oder autoimmune Reaktionen zu verhindern. Daher können die phänotypischen und funktionellen Unterschiede auf eine geringere Auseinandersetzung mit dem Antigen während der Induktionsphase bei mit NVX-CoV2373 geimpften Personen hinweisen. Möglicherweise steht bei der NVX-CoV2373-Impfung im Vergleich zur mRNA-Impfung weniger Antigen zur Verfügung, um eine Aktivierung der T-Zellen hervorzurufen.

Der auffälligste Unterschied zwischen NVX-CoV2373- und mRNA-geimpften Personen war jedoch die schwache Induktion Spike-spezifischer CD8 T-Zellen. Insgesamt konnten nur bei 3 von 22 Probanden spezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen werden, was mit einer anderen Studie im Einklang steht, bei der ebenfalls nur bei 5 von 27 Personen eine CD8 T-Zell-Antwort nach einer NVX-CoV2373-Impfung detektiert wurden (RYDYZNSKI MODERBACHER et al.,

DISKUSSION

2022). Eine ähnlich schwache Induktion Spike-spezifischer CD8 T-Zellen beobachteten auch Zhang und Kollegen (ZHANG et al., 2022). Es ist anzunehmen, dass die moderate Reaktion darauf zurückzuführen ist, dass NVX-CoV2373 zu den proteinbasierten Impfstoffen zählt und das Spike-Protein als Antigen enthält. Wie beim HZ/su-Impfstoff bereits beschrieben wird das im Impfstoff enthaltene Protein während der Induktionsphase weniger effizient über den MHC-I-Komplex den CD8 T-Zellen präsentiert. Dies steht im Gegensatz zu mRNA-Impfstoffen, die auf der Translation des Spike-Proteins in den Wirtszellen beruhen (CHAUDHARY et al., 2021) und somit die Präsentation von Spike-spezifischen Peptiden sowohl über MHC-I- als auch MHC-II-Komplexe ermöglicht CD4 und CD8 T-Zellen zu induzieren. Die Unterschiede in der Fähigkeit der verschiedenen Impfstoffplattformen könnten somit eine Erklärung für die schwache Induktion von Spike-spezifischen CD8 T-Zellen nach Impfung mit NVX-CoV2373 sein.

Auf humoraler Ebene wurden nach zweimaliger NVX-CoV2373-Impfung ebenfalls geringere Anti-Spike IgGs detektiert als nach zwei Impfungen mit einem mRNA-Impfstoff, während die neutralisierende Aktivität in allen drei Impfregimen durchweg hoch war. Durch die geringeren Spike-spezifischen IgG-Level bei den mit NVX-CoV2373 geimpften Personen besteht die Möglichkeit, dass sich diese zu einem früheren Zeitpunkt mit SARS-CoV-2 infizieren könnten (ABEBE, DEJENIE, 2023; MARTÍN PÉREZ et al., 2024). Im direkten Vergleich zu Personen nach Impfung mit Vektor-Impfstoffen wurden jedoch weitaus höhere IgG-Level erreicht als mit einer Einzel- oder Doppeldosis Vektorimpfstoff (KLEMIS et al., 2022), was wiederum ein geringeres Infektionsrisiko im Vergleich zu Vektor-geimpften Personen zur Folge haben könnte.

Das Auftreten schwerer Nebenwirkungen wie Thrombose (GREINACHER et al., 2021; SCHULTZ et al., 2021) oder Myokarditis (BOZKURT et al., 2021) nach vektor- oder mRNA-basierter Impfung hat zur Impfskepsis beigetragen, die durch die Verfügbarkeit traditioneller Impfstoffformulierungen auf Basis rekombinanter Proteine überwunden werden könnte. Auch wenn in selten Fällen von Myokarditis oder Perikarditis nach Impfung mit NVX-CoV2373 berichtet wurde, ergab sich unter Einbeziehung der Daten verschiedener Studien ein positives Nutzen-Risiko-Verhältnis des Impfstoffs im Vergleich ohne Impfung (FIX et al., 2024). Die gute Verträglichkeit des Impfstoffs, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, könnte die Impfbereitschaft stärken, was sich auch im anfänglichen Interesse der Teilnehmer für eine Auffrischimpfung widerspiegelte. Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass eine

heterologe Auffrischimpfung mit NVX-CoV2373 nach Immunisierung mit mRNA-Impfstoffen ebenfalls eine geringere Reaktogenität verursacht, was sich ebenfalls positiv auf die Impfakzeptanz auswirken könnte (MARCHESE et al., 2024).

6.2.2 Teilweise Immunogenität von NVX gegen VOCs

Da der auf dem Wildtyp-Spike basierte NVX-CoV2373 Impfstoff erst im Frühjahr 2022 in Deutschland empfohlen wurde (IMPFKOMMISSION, 2022) und dessen Anwendung dadurch mit der Verbreitung von VOCs, einschließlich Delta und Omikron, zusammenfiel (CARABELLI et al., 2023), waren die Ergebnisse zur neutralisierenden Aktivität von Antikörpern und zur T-Zell-Reaktivität gegenüber VOCs von besonderem Interesse, um Informationen über die Fähigkeit zum Schutz vor Infektionen und schweren Erkrankungen zu erhalten.

Während die neutralisierende Aktivität der Antikörper gegen den Wildtyp bei allen drei untersuchten Impfstoffen sehr hoch war, wurde eine deutlich geringere neutralisierende Aktivität gegenüber den VOCs Delta, BA.1 und BA.2 beobachtet. Im zeitlichen Kontext mit Ergebnissen dieser Arbeit wurden mehrere Studien publiziert, die sieben verschiedene Impfschemata umfassten und ebenfalls eine starke Abschwächung der neutralisierenden Antikörperaktivität gegen VOCs im Vergleich zum parentalen Virus in allen getesteten Impfstoffgruppen gezeigt haben (BOWEN et al., 2022; TARKE et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Dabei wurden auch zehn Personen nach NVX-CoV2373-Impfung, die an der randomisierten Zulassungsstudie teilnahmen, untersucht. Jedoch variieren die durchschnittlichen Zeitabstände zwischen der letzten Impfung und der Analyse zwischen 13 Tagen in den beiden mRNA-Impfstoffgruppen und bis zu 82 Tagen bei Personen nach NVX-CoV2373-Impfung (BOWEN et al., 2022). Angesichts der bekannten Dynamik der Antikörpertiter über die Zeit wurden Proben in einigen Gruppen, einschließlich NVX-CoV2373, demzufolge nicht zum Zeitpunkt des Maximums erfasst. Auch wenn die neutralisierende Aktivität gegenüber VOCs innerhalb einer Impfstoffgruppe durchweg geringer war als gegenüber dem Wildtyp, sind Vergleiche zwischen den Impfstoffgruppen aufgrund dieser zeitlichen Diskrepanzen schwierig. Im Gegensatz dazu war die Stichprobengröße in der vorliegenden Arbeit größer und die Analysezeit in allen getesteten Gruppen standardisiert, was einen besseren direkten Vergleich der Antikörpertiter und der neutralisierenden Funktion zwischen den Impfschemata ermöglicht. Erklären lässt sich die geringere neutralisierende Aktivität gegenüber den VOCs dadurch, dass alle drei untersuchten Impfstoffe vor den auftretenden Varianten Delta, BA.1 und BA.2 entwickelt

DISKUSSION

wurden und das Spike-Protein entsprechend nicht die in den Varianten vorkommenden Mutationen enthielt. So weist zum Beispiel die Variante B.1.1.529 im Spike-Protein 39 Mutationen auf, wobei 15 innerhalb der RBD vorliegen (ALKHATIB et al., 2022). Neutralisierende Antikörper sind in der Lage die dreidimensionale Proteinstruktur spezifisch zu erkennen. Kommt es durch Mutationen zu Veränderungen der Proteinstruktur, insbesondere an der RBD des Virus, welche häufig das Ziel von neutralisierenden Antikörpern ist, kann die Bindung des Antikörpers an das Antigen erschwert werden und so die neutralisierende Aktivität beeinträchtigt sein (ABEBE, DEJENIE, 2023; LIU et al., 2021a). Die reduzierte neutralisierende Aktivität gegenüber den VOCs kann folglich mit einem erhöhten Infektionsrisiko gegen diese einhergehen (CELE et al., 2022).

Während neutralisierende Antikörper mit einem Schutz vor Infektionen in Verbindung gebracht werden (KHOURY et al., 2021), scheinen impfstoffinduzierte T-Zellen eine wichtige Rolle beim Schutz vor schweren Erkrankungen zu spielen (GEURTSVANKESSEL et al., 2022; TARKE et al., 2022). Im Gegensatz zur neutralisierenden Antikörperaktivität zeigen NVX-CoV2373-induzierte CD4 T-Zellen zwei Wochen nach der zweiten Impfung eine deutliche Kreuzreaktivität gegenüber allen getesteten VOCs. Dies steht im Einklang mit Befunden von Personen nach BNT162b2- oder Ad26.CoV2.S-Impfung während der Induktionsphase (LIU et al., 2022) oder mit Gedächtnis-T-Zellen von acht mit NVX-CoV2373 geimpften Personen, die 3 bis 4 Monate nach der Impfung getestet wurden (TARKE et al., 2022). Insgesamt deutet dies darauf hin, dass von T-Zellen erkannte, aus Spikes stammende, MHC-gebundene Peptide weniger anfällig für Mutationen und Immunevasion sind als Antikörper gegen Spike-Protein-Epitope. Trotz des Anstiegs der Omikron-Infektionen aufgrund der beeinträchtigten neutralisierenden Aktivität spielt die Induktion von T-Zellen mit robuster Kreuzreaktivität gegenüber VOCs über mehrere Impfschemata hinweg eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des Schutzes vor schweren Erkrankungen. In dieser Hinsicht könnte der Th1-Phänotyp der durch NVX-CoV2373 induzierten CD4-T-Zellen mit der Fähigkeit zur Produktion von IFNy, TNF α und IL-2, der bekanntermaßen antiviral wirkt (GRAHAM et al., 1994), bei der zellvermittelten Eliminierung infizierter Zellen von entscheidender Bedeutung sein (SHAW et al., 2022; VABRET et al., 2020).

Bemerkenswert ist, dass bei Personen mit einer früheren Infektion eine Dosis von NVX-CoV2373 ausreichte, um ähnliche Anti-Spike-IgG-Level mit hoher neutralisierender Aktivität

gegenüber allen VOCs zu induzieren wie zwei Dosen bei infektionsnaiven Personen. Dies ist mutmaßlich auf die Begegnung des Immunsystems mit dem natürlichen Vollvirus zurückzuführen. Zudem ist es nicht unwahrscheinlich, dass die infizierten Personen bereits mit VOCs in Kontakt gekommen waren. Der Rückgang der Spike-spezifischen IgGs und der CD4 T-Zell-Aktivität im zeitlichen Verlauf 3 bzw. 6 Monate nach der 2. NVX-CoV2373-Impfung sowie die gleichzeitige Zunahme an Infektionen in der Studienkohorte sprechen für eine weniger stabile Immunantwort und einen geringeren Schutz vor Infektionen. Jedoch berichteten alle infizierten Probanden über einen milden Verlauf (Daten nicht gezeigt), was wiederum dafürspricht, dass die induzierte CD4 T-Zell-Antwort in der Lage ist schwere Verläufe zu minimieren.

6.2.3 Ausblick NVX-2373 Impfung

Zukünftige Wirksamkeitsstudien sollten zeigen, ob die unterschiedliche Quantität und Qualität der CD4 T-Zell-Antwort sowie das relative Fehlen von impfstoffinduzierten CD8 T-Zellen nach NVX-CoV2373-Impfung im Vergleich zu anderen Impfschemata auch mit einer erhöhten Schwere der Erkrankung bei einer Durchbruchinfektion assoziiert sind.

Möglicherweise könnten NVX-CoV2373 Geimpfte auch von Auffrischimpfungen mit mRNA-Impfstoffen profitieren. Das ein solch heterologes Impfregime die Induktion der Immunantwort verstärken kann, wurde bereits bei vektorbasierten Impfungen mit ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) gefolgt von einer mRNA-Impfung gezeigt (BARROS-MARTINS et al., 2021; HILLUS et al., 2021; KLEMIS et al., 2022; LIU et al., 2021b; SCHMIDT et al., 2021a). Die niedrigen Anti-Spike IgG-Level sowie die mangelhafte Induktion von CD8 T-Zellen konnten durch die mRNA-Impfungen geboostert werden. Interessanterweise überstiegen die Level sogar homologe Impfregime (SCHMIDT et al., 2021a). Hinsichtlich der neutralisierenden Aktivität wurde postuliert, dass eine dritte Auffrischungsdosis nach NVX-CoV2373 ebenso wertvoll für die Verbesserung des Schutzes sein könnte, wie dies für andere Impfschemata gezeigt wurde (GRUELL et al., 2022; MUNRO et al., 2021; VANSHYLLA et al., 2022). Diese Annahme wurde zunächst durch Daten aus einer kleinen Studie gestützt, die zeigte, dass die neutralisierenden Antikörpertiter gegen VOCs bei allen sieben mit NVX-CoV2373 geimpften Personen anstiegen, die entweder mRNA-1273, BNT162b2 oder Ad26.COV.2 als Auffrischungsdosis erhalten hatten (BOWEN et al., 2022). In der vorliegenden Arbeit war diese Analyse jedoch schwer umsetzbar,

DISKUSSION

da die Personen, die für die NVX-2373-Impfung rekrutiert werden konnten, eine deutliche Skepsis gegenüber mRNA-Impfstoffen gezeigt hatten.

Zum Zeitpunkt der Studie gab es noch keine Zulassung für eine dritte Dosis mit NVX-CoV2373. Dies hat sich zwischenzeitlich geändert, da im September 2022 NVX-CoV2373 als Booster-Impfung zugelassen wurde und Ende 2022 von der STIKO als Auffrischimpfung empfohlen wurde (SCHLÄBERG et al., 2022). Leider war eine Ausweitung der Studie zur Analyse der Immunantwort nach 3. und 4. Impfung im hier untersuchten Kollektiv nicht mehr möglich. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine 3. und 4. Dosis mit NVX-CoV2373 verträglich ist und zu einem Anstieg der humoralen Immunantwort gegen SARS-CoV-2 führt (ALVES et al., 2023; MALLORY et al., 2022; RAISER et al., 2023). Bisher liegen keine Studienergebnisse vor, welche eine vergleichende Analyse von Auffrischimpfungen mit den verschiedenen Impfstoffplattformen untersucht hat. Zudem ist die Datenlage zur zellulären Immunität nach Auffrischimpfungen mit NVX-CoV2373 insgesamt nach wie vor sehr begrenzt.

6.3 Limitierungen

Sowohl bei der Untersuchung der VZV-spezifischen als auch bei der SARS-CoV-2 Spike-spezifischen Immunantwort nach Impfung handelt es sich um ein nicht-randomisiertes Studiendesign mit Zufallsstichproben, wobei die Gesamtzahl der Versuchsteilnehmer relativ klein ausfiel. Dies ist bei der Untersuchung der VZV-spezifischen Immunantwort zum Teil der Corona-Pandemie geschuldet. Zudem wurde insbesondere bei der phänotypischen und funktionellen Untersuchung spezifischer T-Zellen nicht bei allen Probanden eine ausreichende Anzahl an Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten erreicht, um eine robuste statistische Auswertung durchführen zu können. Die erhöhte Mortalität der Dialysepatienten führte zusätzlich dazu, dass nicht alle Folgewerte von Patienten ermittelt werden konnten. Auch ein Einschluss weiterer Probanden erwies sich als schwierig, da während der Pandemie erhebliche Kontakt einschränkungen vorlagen, um vor allem auch die vulnerablen Patienten zu schützen. In der Pandemie wurden zudem COVID-19-Impfungen priorisiert und andere Impfungen auf einen späteren Zeitpunkt verschoben. Aus ethischen und logistischen Gründen wurde sich auf ein Minimum von Blutentnahmen beschränkt, wobei die Zeitpunkte der Blutentnahmen für den Nachweis von antigenspezifischen Antikörpern und T-Zellen optimiert wurden. Daraus ergab sich jedoch, dass die Analyse der Plasmablasten, welche eine frühere Analyse erfordert hätte

DISKUSSION

hätten, nicht zum optimalen Zeitpunkt durchgeführt werden konnte. Auch eine Phänotypisierung mit weiteren Markern wie CD62L oder CCR7, welche häufig für die Analyse des Differenzierungsstatus verwendet werden, konnte nicht durchgeführt werden. Dies begründet sich durch die limitierte Blutmenge und mit dem zur Verfügungen stehenden Durchflusszytometer, welches nur eine gleichzeitige Analyse von maximal 8 Parametern erlaubte. Zur Untersuchung der Spike-spezifischen Immunantwort im Rahmen der Impfung mit dem NVX-CoV2373-Impfstoff konnten nicht so viele Probanden rekrutiert werden, da viele Personen zuvor bereits mit anderen COVID-19-Impfstoffen geimpft worden waren. Zu den Einschränkungen gehören auch das Fehlen einer klinischen Nachbeobachtung über ein Jahr hinaus, um die Robustheit der impfinduzierten Immunantwort und die Wirksamkeit zu erfassen, was in weiteren Studien erfolgen sollte. Dennoch konnten einige Personen eingeschlossen werden, von denen zum Teil auch Verlaufsmessungen bis 6 Monate nach zweiter Impfung durchgeführt wurden.

Trotz geringer Probandenzahl war die Stichprobengröße ausreichend, um Immunogenität und Reaktogenität zu charakterisieren und Unterschiede in der VZV-spezifischen Immunantwort zwischen Kontrollen und Patienten aufzuzeigen, sowie Unterschiede in der Spike-spezifischen Immunantwort nach Impfung mit verschiedenen Impfstoffen zu detektieren. Beim Vergleich der Impfstoffregime zur COVID-19 Impfung wurden die Studienteilnehmer nicht im gleichen Zeitrahmen rekrutiert. Durch den Ausschluss von Personen mit vorheriger Infektion bei diesem Vergleich, hatte die Zirkulation verschiedener Virusstämme in dieser Zeitspanne jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Die Teilnehmer wurden gemäß den STIKO-Empfehlungen geimpft, wodurch sich bei der Rekrutierung der Probanden einige impfstoffspezifische Unterschiede in den Zeitabständen zwischen der ersten und zweiten Impfung einen Einfluss auf das Ausmaß der spezifischen Immunität haben könnten. Jedoch deuten Erkenntnisse darauf hin, dass ein relativ kurzes Intervall im Bereich von 3-6 Wochen wie in dieser Arbeit keinen nachteiligen Einfluss auf die Immunogenität zu haben scheint (HALL et al., 2022). Informationen über die neutralisierende Aktivität oder die T-Zell-Reaktivität gegenüber neueren Varianten wie BA.4, BA.5, XBB.1.5 oder JN.1 liegen nicht vor. Allerdings wurde gezeigt, dass die neutralisierende Aktivität gegenüber BA.4 und BA.5 bei Personen 3 bis 4 Monate nach der NVX-CoV2373-Impfung deutlich geringer ist als für BA.1 oder BA.2, was auch bei anderen Impfstoffregimen beobachtet wurde (BOWEN et al., 2022).

6.4 Fazit

Im Allgemeinen bieten proteinbasierte Impfstoffe den Vorteil, dass diese gegenüber Lebendimpfstoffen auch bei Menschen mit eingeschränkter Immunfunktion die Impfung angewandt werden können. Dadurch können diese Menschen von der Prophylaxe gegenüber genau den Krankheiten profitieren, für die sie aufgrund der Immundefizienz ein erhöhtes Risiko haben. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der proteinbasierte Herpes Zoster Totimpfstoff HZ/su bei Dialysepatienten VZV-spezifische CD4 T-Zellen und Antikörper induzierte. Neben der induzierten Immunogenität von HZ/su könnte die geringe Reaktogenität des Impfstoffes die Bereitschaft zur Impfung bei Dialysepatienten zudem steigern und damit Herpes Zoster Fälle reduzieren. Dennoch wiesen quantitative und qualitative Unterschiede auf eine etwas schwächere Immunogenität bei Dialysepatienten hin, was zu gegebener Zeit eine Auffrischimpfung erforderlich machen könnte, um einen ausreichenden Schutz vor Herpes Zoster aufrechtzuerhalten.

Ein weiterer Vorteil von proteinbasierten Impfstoffen zeigte sich während der SARS-CoV-2 Pandemie. Einige Menschen hatten Bedenken gegenüber neuen Impfstoff-Plattenformen wie mRNA-basierten Impfstoffen. Der proteinbasierte Impfstoff NVX-CoV2373 bot diesen Menschen die Möglichkeit einer Immunisierung gegen COVID-19 und sorgte somit für eine Steigerung der Impfbereitschaft, was im Hinblick auf die Verhinderung von schweren Krankheitsverläufen von großer Relevanz ist. Aufgrund der in dieser Arbeit beobachteten geringen Reaktogenität und der Fähigkeit, eine starke Antikörper- und CD4 T-Zell-Reaktion zu induzieren bietet sich NVX-CoV2373 als gute Alternative zu mRNA- und Vektor-Impfstoffen für Personen an, die sich impfen lassen möchten, aber neue Impfstoff-Plattformen ablehnen.

Die auffällig schwache Induktion der spezifischen CD8 T-Zell-Antwort durch die beiden Impfstoffe ist auf deren Zusammensetzung zurückzuführen. Beide Impfstoffe zählen zu den proteinbasierten Impfstoffen, bei denen häufig vorkommende Erregerproteine wie Oberflächenprotein gE bei HZ/su und Spike bei NVX-CoV2373 zur Anwendung kommen. Aufgrund des damit verbundenen exogenen Prozessierungsweges fällt eine Aktivierung spezifischer CD8 T-Zellen deutlich geringer aus. Diesen Aspekt gilt es bei der zukünftigen Impfstoffentwicklung zu berücksichtigen.

DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden generelle Mechanismen der beiden Impfstoffe charakterisiert, wodurch wichtige Grundlagen für die Optimierung von Impfschemata insbesondere für immunbeeinträchtigte Personen gelegt wurden, bei denen eine solche Optimierung von besonderer Bedeutung ist, um sie vor schwerwiegenden Infektionen zu schützen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzehi S, Alimohammadi R, Bezvan MH, Mohammadi H, Aslani S (2019) Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol* 234:10018-10031
2. Abebe EC, Dejenie TA (2023) Protective roles and protective mechanisms of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 infection and their potential clinical implications. *Front Immunol* 14:1055457
3. Alexander KE, Tong PL, Macartney K, Beresford R, Sheppeard V, Gupta M (2018) Live zoster vaccination in an immunocompromised patient leading to death secondary to disseminated varicella zoster virus infection. *Vaccine* 36:3890-3893
4. Alfonso-Dunn R, Lin J, Kirschner V, Lei J, Feuer G, Malin M, Liu J, Roche M, Sadiq SA (2022) Strong T-cell activation in response to COVID-19 vaccination in multiple sclerosis patients receiving B-cell depleting therapies. *Front Immunol* 13:926318
5. Alkhatib M, Salpini R, Carioti L, Ambrosio FA, D'Anna S, Duca L, Costa G, Bellocchi MC, Piermatteo L, Artese A, Santoro MM, Alcaro S, Svicher V, Ceccherini-Silberstein F (2022) Update on SARS-CoV-2 Omicron Variant of Concern and Its Peculiar Mutational Profile. *Microbiol Spectr* 10:e0273221
6. Alves K, Plested JS, Galbiati S, Chau G, Cloney-Clark S, Zhu M, Kalkeri R, Patel N, Smith K, Marcheschi A, Pfeiffer S, McFall H, Smith G, Glenn GM, Dubovsky F, Mallory RM (2023) Immunogenicity and safety of a fourth homologous dose of NVX-CoV2373. *Vaccine* 41:4280-4286
7. Arvin AM (2008) Humoral and Cellular Immunity to Varicella-Zoster Virus: An Overview. *The Journal of Infectious Diseases* 197:S58-S60
8. Arvin AM, Wolinsky JS, Kappos L, Morris MI, Reder AT, Tornatore C, Gershon A, Gershon M, Levin MJ, Bezuidenhout M, Putzki N (2015) Varicella-zoster virus infections in patients treated with fingolimod: risk assessment and consensus recommendations for management. *JAMA Neurol* 72:31-39
9. Ärzteschaft Add (2020) Fallberichte von Herpes zoster bzw. Zoster-artigen Hautläsionen nach Shingrix-Impfung®. *Deutsches Ärzteblatt* 26:1356-1357
10. Assmann G, Schmidt M, Sester M (2024) Scattered pustular lesions 10 days after Shingrix vaccination in systemic sclerosis patient after successful autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation. *BMJ Case Rep* 17:e259620
11. Barros-Martins J, Hammerschmidt SI, Coßmann A, Odak I, Stankov MV, Morillas Ramos G, Dopfer-Jablonka A, Heidemann A, Ritter C, Friedrichsen M, Schultze-Florey C, Ravens I, Willenzon S, Bubke A, Ristenpart J, Janssen A, Ssebyatika G, Bernhardt G, Munch J, Hoffmann M, Pohlmann S, Krey T, Bosnjak B, Forster R, Behrens GMN (2021) Immune responses against SARS-CoV-2 variants after heterologous and homologous ChAdOx1 nCoV-19/BNT162b2 vaccination. *Nat Med* 27:1525-1529
12. Batram M, Witte J, Schwarz M, Hain J, Ultsch B, Steinmann M, Bhavsar A, Wutzler P, Criée CP, Hermann C, Wahle K, Füchtenbusch M, Greiner W (2021) Burden of Herpes Zoster in Adult Patients with Underlying Conditions: Analysis of German Claims Data, 2007-2018. *Dermatol Ther (Heidelb)* 11:1009-1026
13. Berarducci B, Ikoma M, Stamatis S, Sommer M, Grose C, Arvin AM (2006) Essential functions of the unique N-terminal region of the varicella-zoster virus glycoprotein E ectodomain in viral replication and in the pathogenesis of skin infection. *J Virol* 80:9481-9496

LITERATURVERZEICHNIS

14. Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel É B (2021) COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 40:905-919
 15. BioNTech (2023) Pfizer und BioNTech beginnen Phase-1_2-Studie mit erstem mRNA-basierten Impfstoffprogramm gegen Gürtelrose.
 16. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P (2013) Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31:443-473
 17. Boban M (2021) Novel coronavirus disease (COVID-19) update on epidemiology, pathogenicity, clinical course and treatments. *Int J Clin Pract* 75:e13868
 18. Bowen JE, Addetia A, Dang HV, Stewart C, Brown JT, Sharkey WK, Sprouse KR, Walls AC, Mazzitelli IG, Logue JK, Franko NM, Czudnochowski N, Powell AE, Dellota E, Jr., Ahmed K, Ansari AS, Cameroni E, Gori A, Bandera A, Posavad CM, Dan JM, Zhang Z, Weiskopf D, Sette A, Crotty S, Iqbal NT, Corti D, Geffner J, Snell G, Grifantini R, Chu HY, Veesler D (2022) Omicron spike function and neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of vaccines. *Science*:eabq0203
 19. Bozkurt B, Kamat I, Hotez PJ (2021) Myocarditis With COVID-19 mRNA Vaccines. *Circulation* 144:471-484
 20. Bronder S, Mihm J, Urschel R, Klemis V, Schmidt T, Marx S, Abu-Omar A, Hielscher F, Guckelmus C, Widera M, Sester U, Sester M (2024) Potent induction of humoral and cellular immunity after bivalent BA.4/5 mRNA vaccination in dialysis patients. *NPJ Vaccines* 9:25
 21. Buchbinder EI, Desai A (2016) CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* 39:98-106
 22. Burke BL, Steele RW, Beard OW, Wood JS, Cain TD, Marmer DJ (1982) Immune Responses to Varicella-Zoster in the Aged. *Archives of Internal Medicine* 142:291-293
 23. Cano RLE, Lopera HDE (2013). Introduction to T and B lymphocytes. In *Autoimmunity: From Bench to Bedside*, Anaya JM, Y Shoenfeld, A Rojas-Villarraga, RA Levy, R Cervera, eds. (Bogota (Colombia), El Rosario University Press © 2013 Universidad del Rosario).
 24. Caplin B, Kumar S, Davenport A (2011) Patients' perspective of haemodialysis-associated symptoms. *Nephrology Dialysis Transplantation* 26:2656-2663
 25. Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, Harvey WT, Hughes J, Peacock SJ, Barclay WS, de Silva TI, Towers GJ, Robertson DL (2023) SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol* 21:162-177
 26. Cele S, Jackson L, Khouri DS, Khan K, Moyo-Gwete T, Tegally H, San JE, Cromer D, Scheepers C, Amoako DG, Karim F, Bernstein M, Lustig G, Archary D, Smith M, Ganga Y, Jule Z, Reedoy K, Hwa S-H, Giandhari J, Blackburn JM, Gosnell BI, Abdool Karim SS, Hanekom W, Davies M-A, Hsiao M, Martin D, Mlisana K, Wibmer CK, Williamson C, York D, Harrichandparsad R, Herbst K, Jeena P, Khoza T, Kløverpris H, Leslie A, Madansein R, Magula N, Manickchund N, Marakalala M, Mazibuko M, Moshabela M, Mthabela N, Naidoo K, Ndhlovu Z, Ndung'u T, Ngcobo N, Nyamande K, Patel V, Smit T, Steyn A, Wong E, von Gottberg A, Bhiman JN, Lessells RJ, Moosa M-YS, Davenport MP, de Oliveira T, Moore PL, Sigal A, Ngs SA, Team C-K (2022) Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. *Nature* 602:654-656
 27. Chapman RS, Cross KW, Fleming DM (2003) The incidence of shingles and its implications for vaccination policy. *Vaccine* 21:2541-2547
 28. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA (2021) mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov* 20:817-838
-

LITERATURVERZEICHNIS

29. Chen SY, Suaya JA, Li Q, Galindo CM, Misurski D, Burstin S, Levin MJ (2014) Incidence of herpes zoster in patients with altered immune function. *Infection* 42:325-334
30. Chiang F, Panyaping T, Tedesqui G, Sossa D, Costa Leite C, Castillo M (2014) Varicella zoster CNS vascular complications. A report of four cases and literature review. *Neuroradiol J* 27:327-333
31. Chlibek R, Pauksens K, Rombo L, van Rijckevorsel G, Richardus JH, Plassmann G, Schwarz TF, Catteau G, Lal H, Heineman TC (2016) Long-term immunogenicity and safety of an investigational herpes zoster subunit vaccine in older adults. *Vaccine* 34:863-868
32. Chlibek R, Smetana J, Pauksens K, Rombo L, Van den Hoek JAR, 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
33. Chowdhury D, Lieberman J (2008) Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 26:389-420
34. Chun J, Hartung HP (2010) Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol* 33:91-101
35. Cohen G (2020) Immune Dysfunction in Uremia 2020. *Toxins (Basel)* 12:439
36. Cohen JI (2013) Clinical practice: Herpes zoster. *N Engl J Med* 369:255-263
37. Crotty S (2019) T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 50:1132-1148
38. Cunningham AL, Lal H, Kovac M, Chlibek R, Hwang SJ, Diez-Domingo J, Godeaux O, Levin MJ, McElhaney JE, Puig-Barbera J, Vanden Abeele C, Vesikari T, Watanabe D, Zahaf T, Ahonen A, Athan E, Barba-Gomez JF, Campora L, de Looze F, Downey HJ, Ghesquiere W, Gorfinkel I, Korhonen T, Leung E, McNeil SA, Oostvogels L, Rombo L, Smetana J, Weckx L, Yeo W, Heineman TC (2016) Efficacy of the Herpes Zoster Subunit Vaccine in Adults 70 Years of Age or Older. *N Engl J Med* 375:1019-1032
39. Curhan SG, Kawai K, Yawn B, Rexrode KM, Rimm EB, Curhan GC (2022) Herpes Zoster and Long-Term Risk of Cardiovascular Disease. *J Am Heart Assoc* 11:e027451
40. Curran D, Callegaro A, Fahrbach K, Neupane B, Vroling H, van Oorschot D, Yawn BP (2022) Meta-Regression of Herpes Zoster Incidence Worldwide. *Infectious Diseases and Therapy* 11:389-403
41. Dagnew AF, Rausch D, Hervé C, Zahaf T, Levin MJ, Schuind A, group ftZ-s (2020) Efficacy and serious adverse events profile of the adjuvanted recombinant zoster vaccine in adults with pre-existing potential immune-mediated diseases: a pooled post hoc analysis on two parallel randomized trials. *Rheumatology* 60:1226-1233
42. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RWB, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M, Seder RA (2007) Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature Medicine* 13:843-850
43. den Brok MH, Büll C, Wassink M, de Graaf AM, Wagenaars JA, Minderman M, Thakur M, Amigorena S, Rijke EO, Schrier CC, Adema GJ (2016) Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat Commun* 7:13324
44. Dendouga N, Fochesato M, Lockman L, Mossman S, Giannini SL (2012) Cell-mediated immune responses to a varicella-zoster virus glycoprotein E vaccine using both a TLR agonist and QS21 in mice. *Vaccine* 30:3126-3135

LITERATURVERZEICHNIS

45. Depledge DP, Sadaoka T, Ouwendijk WJD (2018) Molecular Aspects of Varicella-Zoster Virus Latency. *Viruses* 10:349
46. Descamps-Latscha B, Chatenoud L (1996) T cells and B cells in chronic renal failure. *Seminars in nephrology* 16:183-191
47. Drolet M, Brisson M, Schmader K, Levin M, Johnson R, Oxman M, Patrick D, Camden S, Mansi JA (2010) Predictors of Postherpetic Neuralgia Among Patients With Herpes Zoster: A Prospective Study. *The Journal of Pain* 11:1211-1221
48. Duncan MD, Wilkes DS (2005) Transplant-related immunosuppression: a review of immunosuppression and pulmonary infections. *Proc Am Thorac Soc* 2:449-455
49. Ehrenstein B (2021) Diagnostik, Therapie und Prophylaxe des Herpes zoster. *hautnah dermatologie* 37:32-41
50. Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I (2007) Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients. *Semin Dial* 20:440-451
51. Elzouki AY, Harfi HA, Nazer H, Oh W, Stapleton FB, Whitley RJ (2012) Textbook of Clinical Pediatrics, Springer Berlin Heidelberg).
52. Epstein DJ, Dunn J, Deresinski S (2018) Infectious Complications of Multiple Sclerosis Therapies: Implications for Screening, Prophylaxis, and Management. *Open Forum Infect Dis* 5:ofy174
53. Espi M, Charmant X, Barba T, Koppe L, Pelletier C, Kalbacher E, Chalencon E, Mathias V, Ovize A, Cart-Tanneur E, Bouz C, Pellegrina L, Morelon E, Fouque D, Juillard L, Thaunat O (2021) The ROMANOV study found impaired humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccine in virus-unexposed patients receiving maintenance hemodialysis. *Kidney Int* 100:928-936
54. European Medicine Agency (EMA) (2021). EMA recommends Nuvaxovid for authorisation in the EU
55. European Medicines Agency E (2016) Zostavax [shingles (herpes zoster) vaccine (live)]: EU summary of product characteristics.
56. Eting M, Xie M, Heß S, Heß S, Geldsetzer P (2023) Causal evidence that herpes zoster vaccination prevents a proportion of dementia cases. *medRxiv:2023.2005.2023.23290253*
57. Facciolà A, Visalli G, Laganà A, Di Pietro A (2022) An Overview of Vaccine Adjuvants: Current Evidence and Future Perspectives. *Vaccines (Basel)* 10:819
58. Fang F, Yu M, Cavanagh MM, Hutter Saunders J, Qi Q, Ye Z, Le Saux S, Sultan W, Turgano E, Dekker CL, Tian L, Weyand CM, Goronzy JJ (2016) Expression of CD39 on Activated T Cells Impairs their Survival in Older Individuals. *Cell Rep* 14:1218-1231
59. Fernández-Fresnedo G, Ramos MA, González-Pardo MC, de Francisco AL, López-Hoyos M, Arias M (2000) B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol Dial Transplant* 15:502-510
60. Fink K (2012) Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front Immunol* 3:78
61. Fix J, Christopher Mast T, Smith K, Baker N (2024) Benefit-risk assessment for the Novavax COVID-19 vaccine (NVX-CoV2373). *Vaccine* 42:2161-2165
62. Fleming DM, Cross KW, Cobb WA, Chapman RS (2004) Gender difference in the incidence of shingles. *Epidemiol Infect* 132:1-5
63. Florou D, Katsara M, Feehan J, Dardiotis E, Apostolopoulos V (2020) Anti-CD20 Agents for Multiple Sclerosis: Spotlight on Ocrelizumab and Ofatumumab. *Brain Sciences* 10:758

LITERATURVERZEICHNIS

64. Forbes HJ, Bhaskaran K, Thomas SL, Smeeth L, Clayton T, Langan SM (2014) Quantification of risk factors for herpes zoster: population based case-control study. *Bmj* 348:g2911
65. Fowler WJ, Garcia-Valcarcel M, Hill-Perkins MS, Murphy G, Harper DR, Jeffries DJ, Burns NR, Adams SE, Kingsman AJ, Layton GT (1995) Identification of Immunodominant Regions and Linear B Cell Epitopes of the gE Envelope Protein of Varicella-Zoster Virus. *Virology* 214:531-540
66. Fukuchi K, Shimauchi T, Tatsuno K, Tokura Y (2018) Induction of plasmablasts by follicular helper T cell-CXCL13 axis upon occurrence of herpes zoster. *Clin Immunol* 195:93-100
67. Gasper DJ, Tejera MM, Suresh M (2014) CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Crit Rev Immunol* 34:121-146
68. Gauthier A, Breuer J, Carrington D, Martin M, RÉMy V (2009) Epidemiology and cost of herpes zoster and post-herpetic neuralgia in the United Kingdom. *Epidemiology & Infection* 137:38-47
69. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-1715
70. Gershon AA, Breuer J, Cohen JI, Cohrs RJ, Gershon MD, Gilden D, Grose C, Hambleton S, Kennedy PG, Oxman MN, Seward JF, Yamanishi K (2015) Varicella zoster virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 1:15016
71. GeurtsvanKessel CH, Geers D, Schmitz KS, Mykytyn AZ, Lamers MM, Bogers S, Scherbeijn S, Gommers L, Sablerolles RSG, Nieuwkoop NN, Rijsbergen LC, van Dijk LLA, de Wilde J, Alblas K, Breugem TI, Rijnders BJA, de Jager H, Weiskopf D, van der Kuy PHM, Sette A, Koopmans MPG, Grifoni A, Haagmans BL, de Vries RD (2022) Divergent SARS-CoV-2 Omicron-reactive T and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients. *Sci Immunol* 7:eabo2202
72. Gialloreti LE, Merito M, Pezzotti P, Naldi L, Gatti A, Beillat M, Serradell L, di Marzo R, Volpi A (2010) Epidemiology and economic burden of herpes zoster and post-herpetic neuralgia in Italy: A retrospective, population-based study. *BMC Infectious Diseases* 10:230
73. Gilden 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
74. Girndt M, Pietsch M, Köhler H (1995) Tetanus immunization and its association to hepatitis B vaccination in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 26:454-460
75. Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Köhler H (2001) Molecular aspects of T-and B-cell function in uremia. *Kidney International* 59:S206-S211
76. Gnann JW, Jr. (2002) Varicella-Zoster Virus: Atypical Presentations and Unusual Complications. *The Journal of Infectious Diseases* 186:S91-S98
77. Graham MB, Braciale VL, Braciale TJ (1994) Influenza virus-specific CD4+ T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection. *J Exp Med* 180:1273-1282
78. Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, Weisser K, Kyrle PA, Eichinger S (2021) Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *N Engl J Med* 384:2092-2101

LITERATURVERZEICHNIS

79. Griveas I, Visvardis G, Fleva A, Papadopoulou D, Mitsopoulos E, Kyriklidou P, Manou E, Ginikopoulou E, Meimarisou D, Paulitou A, Sakellariou G (2005) Comparative Analysis of Immunophenotypic Abnormalities in Cellular Immunity of Uremic Patients Undergoing Either Hemodialysis or Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *Renal Failure* 27:279-282
80. Gross GE, Eisert L, Doerr HW, Fickenscher H, Knuf M, Maier P, Maschke M, Müller R, Pleyer U, Schäfer M, Sunderkötter C, Werner RN, Wutzler P, Nast A (2020) [S2k guideline for the diagnosis and therapy of zoster and post-zoster neuralgia]. *GMS Infect Dis* 8:Doc01
81. Gruell H, Vanshylla K, Tober-Lau P, Hillus D, Schommers P, Lehmann C, Kurth F, Sander LE, Klein F (2022) mRNA booster immunization elicits potent neutralizing serum activity against the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nat Med* 28:477-480
82. Gupta S, Bi R, Su K, Yel L, Chiplunkar S, Gollapudi S (2004) Characterization of naive, memory and effector CD8+ T cells: effect of age. *Experimental Gerontology* 39:545-550
83. Häckl D, Kossack N, Schoenfelder T (2021) [Prevalence, Costs of Medical Treatment and Modalities of Dialysis-dependent Chronic Renal Failure in Germany: Comparison of Dialysis Care of Nursing Home Residents and in Outpatient Units]. *Gesundheitswesen* 83:818-828
84. Hall VG, Ferreira VH, Wood H, Ierullo M, Majchrzak-Kita B, Manguiat K, Robinson A, Kulasingam V, Humar A, Kumar D (2022) Delayed-interval BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination enhances humoral immunity and induces robust T cell responses. *Nat Immunol* 23:380-385
85. Harpaz R, Ortega-Sanchez IR, Seward JF (2008) Prevention of herpes zoster: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 57:1-30; quiz CE32-34
86. Haumont M, Jacquet A, Massaer M, Deleersnyder V, Mazzu P, Bollen A, Jacobs P (1996) Purification, characterization and immunogenicity of recombinant varicella-zoster virus glycoprotein gE secreted by Chinese hamster ovary cells. *Virus Res* 40:199-204
87. Haynes NM, Allen CDC, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG (2007) Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1High Germinal Center-Associated Subpopulation1. *The Journal of Immunology* 179:5099-5108
88. Hielscher F, Schmidt T, Enders M, Leyking S, Gerhart M, van Bentum K, Mihm J, Schub D, Sester U, Sester M (2024) The inactivated herpes zoster vaccine HZ/su induces a varicella zoster virus specific cellular and humoral immune response in patients on dialysis. *eBioMedicine* 108:105335
89. Hielscher F, Schmidt T, Klemis V, Wilhelm A, Marx S, Abu-Omar A, Ziegler L, Guckelmuß C, Urschel R, Sester U, Widera M, Sester M (2022) NVX-CoV2373-induced cellular and humoral immunity towards parental SARS-CoV-2 and VOCs compared to BNT162b2 and mRNA-1273-regimens. *J Clin Virol* 157:105321
90. Hillebrand K, Bricout H, Schulze-Rath R, Schink T, Garbe E (2015) Incidence of herpes zoster and its complications in Germany, 2005-2009. *J Infect* 70:178-186
91. Hillus D, Schwarz T, Tober-Lau P, Vanshylla K, Hastor H, Thibeault C, Jentzsch S, Helbig ET, Lippert UJ, Tscheak P, Schmidt ML, Riege J, Solarek A, von Kalle C, Dang-Heine C, Gruell H, Kopankiewicz P, Suttorp N, Drosten C, Bias H, Seybold J, Group ECS, Klein F, Kurth F, Corman VM, Sander LE (2021) Safety, reactogenicity, and immunogenicity of

- homologous and heterologous prime-boost immunisation with ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med* 9:1255-1265
92. Hirzel C, L'Huillier AG, Ferreira VH, Marinelli T, Ku T, Ierullo M, Miao C, Schmid DS, Juvet S, Humar A, Kumar D (2021) Safety and immunogenicity of adjuvanted recombinant subunit herpes zoster vaccine in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 21:2246-2253
93. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181:271-280.e278
94. Hood C, Cunningham AL, Slobedman B, Arvin AM, Sommer MH, Kinchington PR, Abendroth A (2006) Varicella-zoster virus ORF63 inhibits apoptosis of primary human neurons. *J Virol* 80:1025-1031
95. Hope-Simpson RE (1965) THE NATURE OF HERPES ZOSTER: A LONG-TERM STUDY AND A NEW HYPOTHESIS. *Proc R Soc Med* 58:9-20
96. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L (2021) Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* 19:141-154
97. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395:497-506
98. Impfkommission S (2004). Epidemiologisches Bulletin 49 / 2004 (Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung)
99. Impfkommission S (2009). Epidemiologisches Bulletin 32 / 2009 (Robert Koch-Institut), pp. 20
100. Impfkommission S (2017). Wissenschaftliche Begründung für die Entscheidung, die Herpeszoster- Lebendimpfung nicht als Standardimpfung zu empfehlen (Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung), pp. 391 – 411
101. Impfkommission S (2018) Wissenschaftliche Begründung zur Empfehlung einer Impfung mit dem Herpes zoster-subunit-Totimpfstoff. Epidemiologisches Bulletin:541-567
102. Impfkommission S (2022) Beschluss der STIKO zur 23. Aktualisierung der COVID-19-Impfempfehlung.
103. Impfkommission S (2024) Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) beim Robert Koch-Institut 2024. Epidemiologisches Bulletin:72
104. Jeon YH (2015) Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia: Practical Consideration for Prevention and Treatment. *kjp* 28:177-184
105. 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
106. Johnson RW, Alvarez-Pasquin M-J, Bijl M, Franco E, Gaillat J, Clara JG, Labetoulle M, Michel J-P, Naldi L, Sanmarti LS, Weinke T (2015) Herpes zoster epidemiology, management, and disease and economic burden in Europe: a multidisciplinary perspective. *Therapeutic Advances in Vaccines* 3:109-120

LITERATURVERZEICHNIS

107. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123:326-338
108. Kawai K, Gebremeskel BG, Acosta CJ (2014) Systematic review of incidence and complications of herpes zoster: towards a global perspective. *BMJ Open* 4:e004833
109. Kawai K, Yawn BP (2017) Risk Factors for Herpes Zoster: A Systematic Review and Meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings* 92:1806-1821
110. Keating GM (2016) Shingles (Herpes Zoster) Vaccine (Zostavax®): A Review in the Prevention of Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia. *BioDrugs* 30:243-254
111. Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S, Plested JS, Zhu M, Cloney-Clark S, Zhou H, Smith G, Patel N, Frieman MB, Haupt RE, Logue J, McGrath M, Weston S, Piedra PA, Desai C, Callahan K, Lewis M, Price-Abbott P, Formica N, Shinde V, Fries L, Lickliter JD, Griffin P, Wilkinson B, Glenn GM (2020) Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *N Engl J Med* 383:2320-2332
112. Khouri DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, Subbarao K, Kent SJ, Triccas JA, Davenport MP (2021) Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 27:1205-1211
113. 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
114. Kinchington PR, Leger AJ, Guedon JM, Hendricks RL (2012) Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave. *Herpesviridae* 3:5
115. King C (2009) New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nature Reviews Immunology* 9:757-766
116. Klemis V, Schmidt T, Schub D, Mihm J, Marx S, Abu-Omar A, Ziegler L, Hielscher F, Guckelmus C, Urschel R, Wagenpfeil S, Schneitler S, Becker SL, Gärtner BC, Sester U, Sester M (2022) Comparative immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1-nCoV-19-priming and BNT162b2 or mRNA-1273-boosting with homologous COVID-19 vaccine regimens. *Nature Communications* 13:4710
117. Kohlová M, Amorim CG, Araújo A, Santos-Silva A, Solich P, Montenegro MCBSM (2019) The biocompatibility and bioactivity of hemodialysis membranes: their impact in end-stage renal disease. *Journal of Artificial Organs* 22:14-28
118. Kojima S, Iwamoto T, Kobayashi Y, Kato M, Takizawa F, Ida T, Suzuki J, Toda Y, Miyachi K, Iwata A, Furuta S, Ikeda K, Nakajima H (2024) Immunogenicity and influence on disease activity of recombinant zoster vaccine in patients with rheumatoid arthritis treated with DMARDs. *RMD Open* 10:e003902
119. Koshy E, Mengting L, Kumar H, Jianbo W (2018) Epidemiology, treatment and prevention of herpes zoster: A comprehensive review. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 84:251-262
120. Kreft B, Klouche M, Kreft R, Kirchner H, Sack K (1997) Low efficiency of active immunization against diphtheria in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 52:212-216
121. Krueger KM, Ison MG, Ghossein C (2020) Practical Guide to Vaccination in All Stages of CKD, Including Patients Treated by Dialysis or Kidney Transplantation. *American Journal of Kidney Diseases* 75:417-425

LITERATURVERZEICHNIS

122. Krummel MF, Allison JP (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182:459-465
123. Kuo CC, Lee CT, Lee IM, Ho SC, Yang CY (2012) Risk of herpes zoster in patients treated with long-term hemodialysis: a matched cohort study. *Am J Kidney Dis* 59:428-433
124. L'Huillier AG, Hirzel C, Ferreira VH, Ierullo M, Ku T, Selzner N, Schiff J, Juvet S, Miao C, Schmid DS, Humar A, Kumar D (2021) Evaluation of Recombinant Herpes Zoster Vaccine for Primary Immunization of Varicella-seronegative Transplant Recipients. *Transplantation* 105:2316-2323
125. Lacaille-Dubois MA (2019) Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. *Phytomedicine* 60:152905
126. Laing KJ, Ouwendijk WJD, Koelle DM, Verjans GMGM (2018) Immunobiology of Varicella-Zoster Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 218:S68-S74
127. 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 (2015) Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults. *N Engl J Med* 372:2087-2096
128. Laskin BL, Jiao J, Baluarte HJ, Amaral S, Furth SL, Akimova T, Hancock WW, Levine MH, Reese PP, Beier UH (2017) The Effects of Tacrolimus on T-Cell Proliferation Are Short-Lived: A Pilot Analysis of Immune Function Testing. *Transplant Direct* 3:e199
129. Lecrenier N, Beukelaers P, Colindres R, Curran D, De Kesel C, De Saegher J-P, Didierlaurent AM, Ledent EY, Mols JF, Mrkvan T, Normand-Bayle M, Oostvogels L, Da Silva FT, Vassilev V, Vinals C, Brex A (2018) Development of adjuvanted recombinant zoster vaccine and its implications for shingles prevention. *Expert Review of Vaccines* 17:619-634
130. Ledo A, Schub D, Ziller C, Enders M, Stenger T, Gartner BC, Schmidt T, Meyer T, Sester M (2020) Elite athletes on regular training show more pronounced induction of vaccine-specific T-cells and antibodies after tetravalent influenza vaccination than controls. *Brain Behav Immun* 83:135-145
131. Lenfant T, Jin Y, Kirchner E, Hajj-Ali RA, Calabrese LH, Calabrese C (2021) Safety of recombinant zoster vaccine: a retrospective study of 622 rheumatology patients. *Rheumatology (Oxford)* 60:5149-5157
132. Leroux-Roels I, Leroux-Roels G, Clement F, Vandepapelière P, Vassilev V, Ledent E, Heineman TC (2012) A Phase 1/2 Clinical Trial Evaluating Safety and Immunogenicity of a Varicella Zoster Glycoprotein E Subunit Vaccine Candidate in Young and Older Adults. *The Journal of Infectious Diseases* 206:1280-1290
133. Leung J, Harpaz R, Molinari NA, Jumaan A, Zhou F (2011) Herpes zoster incidence among insured persons in the United States, 1993-2006: evaluation of impact of varicella vaccination. *Clin Infect Dis* 52:332-340
134. Levin MJ, Oxman MN, Zhang JH, Johnson GR, Stanley H, Hayward AR, Caulfield MJ, Irwin MR, Smith JG, Clair J, Chan ISF, Williams H, Harbecke R, Marchese R, Straus SE, Gershon A, Weinberg A (2008) Varicella-Zoster Virus-Specific Immune Responses in Elderly Recipients of a Herpes Zoster Vaccine. *The Journal of Infectious Diseases* 197:825-835
135. 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

136. Leyking S, Budich K, van Bentum K, Thijssen S, Abdul-Khalil H, Fliser D, Sester M, Sester U (2015) Calcineurin inhibitors differentially alter the circadian rhythm of T-cell functionality in transplant recipients. *J Transl Med* 13:51
137. Li Z, Wang Q, Ma J, Li Z, Huang D, Huang Y, Zhou H (2021) Risk Factors for Herpes Zoster in Patients with Chronic Kidney Disease: A Case-Control Study. *Vaccines (Basel)* 9:963
138. Liao TL, Chen YM, Liu HJ, Chen DY (2017) Risk and severity of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis receiving different immunosuppressive medications: a case-control study in Asia. *BMJ Open* 7:e014032
139. Lim WH, Kireta S, Russ GR, Coates PT (2007) Uremia impairs blood dendritic cell function in hemodialysis patients. *Kidney International* 71:1122-1131
140. Lin HC, Chien CW, Ho JD (2010) Herpes zoster ophthalmicus and the risk of stroke: a population-based follow-up study. *Neurology* 74:792-797
141. Lin L, Couturier J, Yu X, Medina MA, Kozinetz CA, Lewis DE (2014) Granzyme B secretion by human memory CD4 T cells is less strictly regulated compared to memory CD8 T cells. *BMC Immunol* 15:36
142. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS (1996) Intracellular Trafficking of CTLA-4 and Focal Localization Towards Sites of TCR Engagement. *Immunity* 4:535-543
143. 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
144. Litwin V, Jackson W, Grose C (1992) Receptor properties of two varicella-zoster virus glycoproteins, gpl and gplIV, homologous to herpes simplex virus gE and gl. *Journal of Virology* 66:3643-3651
145. Liu C, Ginn HM, Dejnirattisai W, Supasa P, Wang B, Tuekprakhon A, Nutalai R, Zhou D, Mentzer AJ, Zhao Y, Duyvesteyn HME, López-Camacho C, Slon-Campos J, Walter TS, Skelly D, Johnson SA, Ritter TG, Mason C, Costa Clemens SA, Gomes Naveca F, Nascimento V, Nascimento F, Fernandes da Costa C, Resende PC, Pauvolid-Correia A, Siqueira MM, Dold C, Temperton N, Dong T, Pollard AJ, Knight JC, Crook D, Lambe T, Clutterbuck E, Bibi S, Flaxman A, Bittaye M, Belij-Rammerstorfer S, Gilbert SC, Malik T, Carroll MW, Klenerman P, Barnes E, Dunachie SJ, Baillie V, Serafin N, Ditse Z, Da Silva K, Paterson NG, Williams MA, Hall DR, Madhi S, Nunes MC, Goulder P, Fry EE, Mongkolsapaya J, Ren J, Stuart DI, Screaton GR (2021a) Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.617 by vaccine and convalescent serum. *Cell* 184:4220-4236.e4213
146. Liu J, Chandrashekhar A, Sellers D, Barrett J, Jacob-Dolan C, Lifton M, McMahan K, Sciacca M, VanWyk H, Wu C, Yu J, Collier AY, Barouch DH (2022) Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron. *Nature* 603:493-496
147. Liu X, Shaw RH, Stuart ASV, Greenland M, Aley PK, Andrews NJ, Cameron JC, Charlton S, Clutterbuck EA, Collins AM, Dinesh T, England A, Faust SN, Ferreira DM, Finn A, Green CA, Hallis B, Heath PT, Hill H, Lambe T, Lazarus R, Libri V, Long F, Mujadidi YF, Plested EL, Provstgaard-Morys S, Ramasamy MN, Ramsay M, Read RC, Robinson H, Singh N, Turner DPJ, Turner PJ, Walker LL, White R, Nguyen-Van-Tam JS, Snape MD, Com COVSG (2021b) Safety and immunogenicity of heterologous versus homologous prime-boost schedules with an adenoviral vectored and mRNA COVID-19 vaccine (Com-COV): a single-blind, randomised, non-inferiority trial. *Lancet* 398:856-869

LITERATURVERZEICHNIS

148. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, Zhao MH, Lv J, Garg AX, Knight J, Rodgers A, Gallagher M, Kotwal S, Cass A, Perkovic V (2015) Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet* 385:1975-1982
149. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2014). Durchflusscytometrie. In *Der Experimentator: Immunologie* (Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg), pp. 73-101.
150. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E (2013) The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 43:2797-2809
151. Maia R, Carvalho V, Faria B, Miranda I, Catarino S, Teixeira S, Lima R, Minas G, Ribeiro J (2022) Diagnosis Methods for COVID-19: A Systematic Review. *Micromachines* 13:1349
152. Mallory RM, Formica N, Pfeiffer S, Wilkinson B, Marcheschi A, Albert G, McFall H, Robinson M, Plested JS, Zhu M, Cloney-Clark S, Zhou B, Chau G, Robertson A, Maciejewski S, Hammond HL, Baracco L, Logue J, Frieman MB, Smith G, Patel N, Glenn GM (2022) Safety and immunogenicity following a homologous booster dose of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein vaccine (NVX-CoV2373): a secondary analysis of a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* 22:1565-1576
153. Marchese AM, Rousculp M, Macbeth J, Beyhaghi H, Seet BT, Toback S (2024) The Novavax Heterologous Coronavirus Disease 2019 Booster Demonstrates Lower Reactogenicity Than Messenger RNA: A Targeted Review. *J Infect Dis* 230:e496-e502
154. Martín Pérez C, Aguilar R, Jiménez A, Salmerón G, Canyelles M, Rubio R, Vidal M, Cuamba I, Barrios D, Díaz N, Santano R, Serra P, Santamaría P, Izquierdo L, Trilla A, Vilella A, Barroso S, Tortajada M, García-Basteiro AL, Moncunill G, Dobaño C (2024) Correlates of protection and determinants of SARS-CoV-2 breakthrough infections 1 year after third dose vaccination. *BMC Med* 22:103
155. Martino FK, Pini S, Scaparrotta G, Schirinzi M, Gnappi M, Fragasso A, Zanella R, Naso E, De Giorgi ML, Carraro G, Nalessi F, Calò LA (2023) Recombinant Varicella Zoster vaccine in haemodialysis facilities: adherence and safety. *Journal of Nephrology* 36:2155-2158
156. Mascellino MT, Di Timoteo F, De Angelis M, Oliva A (2021) Overview of the Main Anti-SARS-CoV-2 Vaccines: Mechanism of Action, Efficacy and Safety. *Infect Drug Resist* 14:3459-3476
157. Matysiak-Klose D, Takla A, Schlaberg J, Piechotta V, Schmid-Küpke N, Neufeind J, Harder T, Vygen-Bonnet S, Koch J, Bogdan C, Burchard G, Garbe E, Heininger U, Hummers E, von Kries R, Ledig T, Littmann M, Meerpohl J, Mertens T, Meyer H, Röbl-Mathieu M, van der Sande M, Terhardt M, Überla K, Wichmann O, Wicker S, Wiedermann-Schmidt U, Widders G, Zepp F (2022) Wissenschaftliche Begründung der STIKO zur Grundimmunisierung von Personen \geq 18 Jahre mit dem COVID-19-Impfstoff Nuvaxovid von Novavax. *Epidemiologisches Bulletin* 7:19-40
158. 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
159. McKinnon KM (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 120:5.1.1-5.1.11
160. Mehling M, Hilbert P, Fritz S, Durovic B, Eichin D, Gasser O, Kuhle J, Klimkait T, Lindberg RL, Kappos L, Hess C (2011) Antigen-specific adaptive immune responses in fingolimod-treated multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 69:408-413

161. Meier P, Dayer E, Blanc E, Wauters J-P (2002) Early T Cell Activation Correlates with Expression of Apoptosis Markers in Patients with End-Stage Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 13:204-212
162. Mikloska Z, Rückholdt M, Ghadiminejad I, Dunckley H, Denis M, Cunningham AL (2000) Monophosphoryl Lipid A and QS21 Increase CD8 T Lymphocyte Cytotoxicity to Herpes Simplex Virus-2 Infected Cell Proteins 4 and 27 Through IFN- γ and IL-12 Production1. *The Journal of Immunology* 164:5167-5176
163. Modrow S, Truyen U, Schätzl H (2022) *Molekulare Virologie*, Springer Berlin Heidelberg).
164. Molina M, Allende LM, Ramos LE, Gutiérrez E, Pleguezuelo DE, Hernández ER, Ríos F, Fernández C, Praga M, Morales E (2018) CD19(+) B-Cells, a New Biomarker of Mortality in Hemodialysis Patients. *Front Immunol* 9:1221
165. Morena D, Lumbreras S, Rodríguez JM, Campos C, Castillo M, Benavent M, Izquierdo JL (2023) Chronic Respiratory Diseases as a Risk Factor for Herpes Zoster Infection. *Archivos de Bronconeumología* 59:797-804
166. Morrison VA, Johnson GR, Schmader KE, Levin MJ, Zhang JH, Looney DJ, Betts R, Gelb L, Guatelli JC, Harbecke R, Pachucki C, Keay S, Menzies B, Griffin MR, Kauffman CA, Marques A, Toney J, Boardman K, Su S-C, Li X, Chan ISF, Parrino J, Annunziato P, Oxman MN, Group ftSPS, Davis L, Kauffman C, Keay S, Straus S, Marques A, Soto N, Brunell P, Gnann J, Serrao R, Cotton D, Goodman R, Arbeit R, Pachucki C, Levin M, Schmader K, Keitel W, Greenberg R, Morrison V, Wright P, Griffin M, Simberkoff M, Yeh S, Lobo Z, Holodniy M, Loutit J, Betts R, Gelb L, Crawford G, Guatelli J, Brooks P, Looney D, Neuzil K, Toney J, Kauffman C, Keay S, Marques A, Pachucki C, Levin M, Schmader K, Morrison V, Wright P, Griffin M, Betts R, Gelb L, Guatelli J, Looney D, Neuzil K, Menzies B, Toney J, Group ftSPS (2014) Long-term Persistence of Zoster Vaccine Efficacy. *Clinical Infectious Diseases* 60:900-909
167. Moser B, Roth G, Brunner M, Lilaj T, Deicher R, Wolner E, Kovarik J, Boltz-Nitulescu G, Vychytal A, Ankersmit HJ (2003) Aberrant T cell activation and heightened apoptotic turnover in end-stage renal failure patients: a comparative evaluation between non-dialysis, haemodialysis, and peritoneal dialysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308:581-585
168. Muñoz-Quiles C, López-Lacort M, Ampudia-Blasco FJ, Díez-Domingo J (2017) Risk and impact of herpes zoster on patients with diabetes: A population-based study, 2009–2014. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 13:2606-2611
169. Munro APS, Janani L, Cornelius V, Aley PK, Babbage G, Baxter D, Bula M, Cathie K, Chatterjee K, Dodd K, Enever Y, Gokani K, Goodman AL, Green CA, Harndahl L, Haughney J, Hicks A, van der Klaauw AA, Kwok J, Lambe T, Libri V, Llewelyn MJ, McGregor AC, Minassian AM, Moore P, Mughal M, Mujadidi YF, Murira J, Osanlou O, Osanlou R, Owens DR, Pacurar M, Palfreeman A, Pan D, Rampling T, Regan K, Saich S, Salkeld J, Saralaya D, Sharma S, Sheridan R, Sturdy A, Thomson EC, Todd S, Twelves C, Read RC, Charlton S, Hallis B, Ramsay M, Andrews N, Nguyen-Van-Tam JS, Snape MD, Liu X, Faust SN, group C-Bs (2021) Safety and immunogenicity of seven COVID-19 vaccines as a third dose (booster) following two doses of ChAdOx1 nCov-19 or BNT162b2 in the UK (COV-BOOST): a blinded, multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* 398:2258-2276
170. Murphy K, Weaver C, Seidler L (2018) *Janeway Immunologie*, Springer Berlin Heidelberg).

LITERATURVERZEICHNIS

171. Mwakingwe-Omari A, Lecrenier N, Naficy A, Curran D, Posiuniene I (2023) Recombinant zoster vaccine in immunocompetent and immunocompromised adults: A review of clinical studies. *Hum Vaccin Immunother* 19:2278362
172. Nardone A, de Ory F, Carton M, Cohen D, van Damme P, Davidkin I, Rota MC, de Melker H, Mossong J, Slacikova M, Tischer A, Andrews N, Berbers G, Gabutti G, Gay N, Jones L, Jokinen S, Kafatos G, de Aragón MVM, Schneider F, Smetana Z, Vargova B, Vranckx R, Miller E (2007) The comparative sero-epidemiology of varicella zoster virus in 11 countries in the European region. *Vaccine* 25:7866-7872
173. Nikolich-Zugich J, Rudd BD (2010) Immune memory and aging: an infinite or finite resource? *Curr Opin Immunol* 22:535-540
174. Olberg HK, Eide GE, Cox RJ, Jul-Larsen Å, Lartey SL, Vedeler CA, Myhr KM (2018) Antibody response to seasonal influenza vaccination in patients with multiple sclerosis receiving immunomodulatory therapy. *Eur J Neurol* 25:527-534
175. Orru S, Bierbaum S, Enk A, Hengel H, Hoffelner M, Huzly D, Keller-Stanislawski B, Mahler V, Mockenhaupt M, Oberle D (2023) Skin manifestations after immunisation with an adjuvanted recombinant zoster vaccine, Germany, 2020. *Euro Surveill* 28:2300261
176. Oxman MN (2018) Advances and Controversies in Our Understanding of Herpes Zoster-Introduction. *J Infect Dis* 218:S55-S56
177. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Crow YJ, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck J, Tang MLK, Tangye SG, Torgerson TR, Sullivan KE (2018) International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* 38:96-128
178. Pollard AJ, Bijker EM (2021) A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology* 21:83-100
179. Quah BJC, Warren HS, Parish CR (2007) Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols* 2:2049-2056
180. Raiser F, Davis M, Adelglass J, Cai MR, Chau G, Cloney-Clark S, Eickhoff M, Kalkeri R, McKnight I, Plested J, Zhu M, Dunkle LM (2023) Immunogenicity and safety of NVX-CoV2373 as a booster: A phase 3 randomized clinical trial in adults. *Vaccine* 41:5965-5973
181. Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG (2022) Role of B cells as antigen presenting cells. *Front Immunol* 13:954936
182. Rautenberg P, Proppe D, Schütte A, Ullmann U (1989) Influenza subtype-specific immunoglobulin A and G responses after booster versus one double-dose vaccination in hemodialysis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8:897-900
183. Riedel S (2005) Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Baylor Univ Med Cent)* 18:21-25
184. Riley JL, June CH (2005) The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105:13-21
185. Riou C, Yassine-Diab B, Van grevenynghe J, Somogyi R, Greller LD, Gagnon D, Gimmig S, Wilkinson P, Shi Y, Cameron MJ, Campos-Gonzalez R, Balderas RS, Kelvin D, Sekaly RP, Haddad EK (2007) Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* 204:79-91

LITERATURVERZEICHNIS

186. Robert-Koch-Institut (2024) RKI-Ratgeber COVID-19. Epidemiologisches Bulletin 22:3-14
187. Roberts MB, Fishman JA (2021) Immunosuppressive Agents and Infectious Risk in Transplantation: Managing the "Net State of Immunosuppression". Clin Infect Dis 73:e1302-e1317
188. Rondaan C, de Joode AAE, van Assen S, Bos NA, Westerhuis R, Westra J (2018) Increased incidence of herpes zoster in patients on renal replacement therapy cannot be explained by intrinsic defects of cellular or humoral immunity to varicella-zoster virus. Antiviral Research 158:206-212
189. Rydzynski Moderbacher C, Kim C, Mateus J, Plested J, Zhu M, Cloney-Clark S, Weiskopf D, Sette A, Fries L, Glenn G, Crotty S (2022) NVX-CoV2373 vaccination induces functional SARS-CoV-2-specific CD4+ and CD8+ T cell responses. J Clin Invest 132:e160898
190. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature 401:708-712
191. Sarnak MJ, Jaber BL (2000) Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. Kidney Int 58:1758-1764
192. Schlaberg J, Matysiak-Klose D, Vygen-Bonnet S, Koch J, Bogdan C, Burchard G, Garbe E, Heininger U, Hummers E, von Kries R, Ledig T, Littmann M, Meerpohl J, Mertens T, Meyer H, Röbl-Mathieu M, van der Sande M, Terhardt M, Überla K, Wichmann O, Wicker S, Wiedermann-Schmidt U, Widders G, Zepp F (2022) Wissenschaftliche Begründung der STIKO zur Auffrischimpfung von Personen ab 18 Jahren mit dem COVID-19-Impfstoff Nuvaxovid (Novavax). Epidemiologisches Bulletin 50:22-31
193. Schmader KE, Levin MJ, Grupping K, Matthews S, Butuk D, Chen M, Idrissi ME, Fissette LA, Fogarty C, Hartley P, Klein NP, Nevarez M, Uusinarkaus K, Oostvogels L, Curran D (2019) The Impact of Reactogenicity After the First Dose of Recombinant Zoster Vaccine on the Physical Functioning and Quality of Life of Older Adults: An Open-Label, Phase III Trial. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 74:1217-1224
194. Schmidt T, Klemis V, Schub D, Mihm J, Hielscher F, Marx S, Abu-Omar A, Ziegler L, Guckelmus C, Urschel R, Schneitler S, Becker SL, Gärtner BC, Sester U, Sester M (2021a) Immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination. Nat Med 27:1530-1535
195. Schmidt T, Klemis V, Schub D, Schneitler S, Reichert MC, Wilkens H, Sester U, Sester M, Mihm J (2021b) Cellular immunity predominates over humoral immunity after homologous and heterologous mRNA and vector-based COVID-19 vaccine regimens in solid organ transplant recipients. Am J Transplant 21:3990-4002
196. Schoch J, Rohrer TR, Kaestner M, Abdul-Khalil H, Gortner L, Sester U, Sester M, Schmidt T (2017) Quantitative, Phenotypical, and Functional Characterization of Cellular Immunity in Children and Adolescents With Down Syndrome. The Journal of Infectious Diseases 215:1619-1628
197. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol 182:311-322
198. Schub D (2016) Charakterisierung der spezifischen Immunantwort gegen Herpesviren und die Entwicklung und Anwendung eines neuen Stimulationsverfahrens zum Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten.

LITERATURVERZEICHNIS

199. Schub D, Assmann G, Sester U, Sester M, Schmidt T (2018a) VZV-specific T-cell levels in patients with rheumatic diseases are reduced and differentially influenced by antirheumatic drugs. *Arthritis Res Ther* 20:252
200. Schub D, Fousse M, Fassbender K, Gartner BC, Sester U, Sester M, Schmidt T (2018b) CTLA-4-expression on VZV-specific T cells in CSF and blood is specifically increased in patients with VZV related central nervous system infections. *Eur J Immunol* 48:151-160
201. 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
202. Schub D, Klemis V, Schneitler S, Mihm J, Lepper PM, Wilkens H, Bals R, Eichler H, Gärtner BC, Becker SL, Sester U, Sester M, Schmidt T (2020) High levels of SARS-CoV-2-specific T cells with restricted functionality in severe courses of COVID-19. *JCI Insight* 5:e142167
203. Schultz NH, Sorvoll IH, Michelsen AE, Munthe LA, Lund-Johansen F, Ahlen MT, Wiedmann M, Aamodt AH, Skattor TH, Tjonnfjord GE, Holme PA (2021) Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *N Engl J Med* 384:2124-2130
204. Sellebjerg F, Blennenberg M, Sorensen PS (2020) Anti-CD20 Monoclonal Antibodies for Relapsing and Progressive Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 34:269-280
205. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Köhler H, Sester M (2008) 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
206. Sester U, Schmidt T, Kuhlmann MK, Gärtner BC, Uhlmann-Schiffler H, Sester M (2013) Serial influenza-vaccination reveals impaired maintenance of specific T-cell memory in patients with end-stage renal failure. *Vaccine* 31:4111-4120
207. Sharma K, Chaudhary D, Beard K, Srivastava S, Khalid SH, Sriwastava S (2022) A comprehensive review of varicella-zoster virus, herpes simplex virus and cryptococcal infections associated with sphingosine-1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis patients. *Mult Scler Relat Disord* 59:103675
208. Shaw RH, Liu X, Stuart ASV, Greenland M, Aley PK, Andrews NJ, Cameron JC, Charlton S, Clutterbuck EA, Collins AM, Dejnirattisai W, Dinesh T, Faust SN, Ferreira DM, Finn A, Green CA, Hallis B, Heath PT, Hill H, Lambe T, Lazarus R, Libri V, Long F, Mujadidi YF, Plested EL, Morey ER, Provstgaard-Morys S, Ramasamy MN, Ramsay M, Read RC, Robinson H, Scream GR, Singh N, Turner DPJ, Turner PJ, Vichos I, Walker LL, White R, Nguyen-Van-Tam JS, Snape MD, Com COVSG (2022) Effect of priming interval on reactogenicity, peak immunological response, and waning after homologous and heterologous COVID-19 vaccine schedules: exploratory analyses of Com-COV, a randomised control trial. *Lancet Respir Med* 10:1049-1060
209. Simon B, Rubey H, Treipl A, Gromann M, Hemedi B, Zehetmayer S, Kirsch B (2021) Haemodialysis patients show a highly diminished antibody response after COVID-19 mRNA vaccination compared with healthy controls. *Nephrol Dial Transplant* 36:1709-1716
210. Simon D, Balogh P, Bognár A, Kellermayer Z, Engelmann P, Németh P, Farkas N, Minier T, Lóránd V, Czirják L, Berki T (2016) Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 34 Suppl 100:30-36

LITERATURVERZEICHNIS

211. Smitten AL, Choi HK, Hochberg MC, Suissa S, Simon TA, Testa MA, Chan KA (2007) The risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis in the United States and the United Kingdom. *Arthritis Rheum* 57:1431-1438
212. Stein AN, Britt H, Harrison C, Conway EL, Cunningham A, MacIntyre CR (2009) Herpes zoster burden of illness and health care resource utilisation in the Australian population aged 50 years and older. *Vaccine* 27:520-529
213. Strezova A, Diez-Domingo J, Al Shawafi K, Tinoco JC, Shi M, Pirrotta P, Mwakingwe-Omari A (2022) Long-term Protection Against Herpes Zoster by the Adjuvanted Recombinant Zoster Vaccine: Interim Efficacy, Immunogenicity, and Safety Results up to 10 Years After Initial Vaccination. *Open Forum Infect Dis* 9:ofac485
214. Tarke A, Coelho CH, Zhang Z, Dan JM, Yu ED, Methot N, Bloom NI, Goodwin B, Phillips E, Mallal S, Sidney J, Filaci G, Weiskopf D, da Silva Antunes R, Crotty S, Grifoni A, Sette A (2022) SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron. *Cell* 185:847-859 e811
215. Toptan T, Hoehl S, Westhaus S, Bojkova D, Berger A, Rotter B, Hoffmeier K, Cinatl J, Jr., Ciesek S, Widera M (2020) Optimized qRT-PCR Approach for the Detection of Intra- and Extra-Cellular SARS-CoV-2 RNAs. *Int J Mol Sci* 21
216. U.S. Food & Drug Administration (FDA) (2022). Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Emergency Use of Novavax COVID-19 Vaccine, Adjuvanted
217. Uddin MN, Roni MA (2021) Challenges of Storage and Stability of mRNA-Based COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)* 9:1033
218. Ultsch B, Siedler A, Rieck T, Reinhold T, Krause G, Wichmann O (2011) Herpes zoster in Germany: Quantifying the burden of disease. *BMC Infectious Diseases* 11:173
219. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hegde S, Kim J, Kuksin M, Levantovsky R, Malle L, Moreira A, Park MD, Pia L, Risson E, Saffern M, Salome B, Esai Selvan M, Spindler MP, Tan J, van der Heide V, Gregory JK, Alexandropoulos K, Bhardwaj N, Brown BD, Greenbaum B, Gumus ZH, Homann D, Horowitz A, Kamphorst AO, Curotto de Lafaille MA, Mehandru S, Merad M, Samstein RM, Sinai Immunology Review P (2020) Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* 52:910-941
220. van Oorschot D, Vroeling H, Bunge E, Diaz-Decaro J, Curran D, Yawn B (2021) A systematic literature review of herpes zoster incidence worldwide. *Hum Vaccin Immunother* 17:1714-1732
221. Vanshylla K, Tober-Lau P, Gruell H, Munn F, Eggeling R, Pfeifer N, Le NH, Landgraf I, Kurth F, Sander LE, Klein F (2022) Durability of omicron-neutralising serum activity after mRNA booster immunisation in older adults. *Lancet Infect Dis* 22:445-446
222. 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
223. Venerito V, Stefanizzi P, Cantarini L, Lavista M, Galeone MG, Di Lorenzo A, Iannone F, Tafuri S, Lopalco G (2023) Immunogenicity and Safety of Adjuvanted Recombinant Zoster Vaccine in Rheumatoid Arthritis Patients on Anti-Cellular Biologic Agents or JAK Inhibitors: A Prospective Observational Study. *Int J Mol Sci* 24:6967
224. Vijenthira A, Gong I, Betschel SD, Cheung M, Hicks LK (2021) Vaccine response following anti-CD20 therapy: a systematic review and meta-analysis of 905 patients. *Blood Advances* 5:2624-2643
225. Vink P, Ramon Torrell JM, Sanchez Fructuoso A, Kim SJ, Kim SI, Zaltzman J, Ortiz F, Campistol Plana JM, Fernandez Rodriguez AM, Rebollo Rodrigo H, Campins Marti M,

- Perez R, González Roncero FM, Kumar D, Chiang YJ, Doucette K, Pipeleers L, Agüera Morales ML, Rodriguez-Ferrero ML, Secchi A, McNeil SA, Campora L, Di Paolo E, El Idrissi M, López-Fauqued M, Salaun B, Heineman TC, Oostvogels L (2020) Immunogenicity and Safety of the Adjuvanted Recombinant Zoster Vaccine in Chronically Immunosuppressed Adults Following Renal Transplant: A Phase 3, Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis* 70:181-190
226. Vossen MTM, Gent M-R, Weel JFL, de Jong MD, van Lier RAW, Kuijpers TW (2004) Development of Virus-Specific CD4+ T Cells on Reexposure to Varicella-Zoster Virus. *The Journal of Infectious Diseases* 190:72-82
227. Wang X, Zhang L, Lei Y, Liu X, Zhou X, Liu Y, Wang M, Yang L, Zhang L, Fan S, Xie P (2014) Meta-analysis of infectious agents and depression. *Sci Rep* 4:4530
228. Wang Z, Li M, Zhou M, Zhang Y, Yang J, Cao Y, Wang K, Cui M, Chen H, Fu ZF, Zhao L (2017) A Novel Rabies Vaccine Expressing CXCL13 Enhances Humoral Immunity by Recruiting both T Follicular Helper and Germinal Center B Cells. *Journal of Virology* 91:10.1128/jvi.01956-01916
229. Wassilew SW, Wutzler P (2010) Schutz vor Zoster. *Prävention und Gesundheitsförderung* 5:23-27
230. Webster A, Grint P, Brenner MK, Prentice HG, Griffiths PD (1989) Titration of IgG antibodies against varicella zoster virus before bone marrow transplantation is not predictive of future zoster. *J Med Virol* 27:117-119
231. 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
232. Widera M, Wilhelm A, Hoehl S, Pallas C, Kohmer N, Wolf T, Rabenau HF, Corman VM, Drosten C, Vehreschild M, Goetsch U, Gottschalk R, Ciesek S (2021) Limited Neutralization of Authentic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants Carrying E484K In Vitro. *J Infect Dis* 224:1109-1114
233. Wilhelm A, Widera M, Grikscheit K, Toptan T, Schenk B, Pallas C, Metzler M, Kohmer N, Hoehl S, Marschalek R, Herrmann E, Helfritz FA, Wolf T, Goetsch U, Ciesek S (2022) Limited neutralisation of the SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1 and BA.2 by convalescent and vaccine serum and monoclonal antibodies. *EBioMedicine* 82:104158
234. Willer DO, Oostvogels L, Cunningham AL, Gervais P, Gorfinkel I, Hyung Kim J, Talarico C, Wascotte V, Zahaf T, Colindres R, Schuind A, Ahonen A, Andrews C, Athan E, Avelino-Silva TJ, Barba-Gomez J-F, Berglund J, Cuixart CB, Caso C, Chlibek R, Choi WS, de Looze F, Desole MG, Domingo JD, Downey JH, Eizenberg P, Esen M, Ghesquiere W, Hui DSC, Hwang S-J, Ikematsu H, Johnson RW, Korhonen T, Leung E, Levin M, de Los Santos AM, McElhaney J, McNeil S, Narejos Perez S, Pauksens K, Pellegrino A, Poder A, Barbera JP, dos Santos RR, de la Pinta MLR, Rombo L, Schwarz TF, Seppa I, Smetana J, Stanisca T, Thompson A, Tinoco JC, Toma A, Watanabe D, Weckx L, Wilfred Y (2019) Efficacy of the adjuvanted recombinant zoster vaccine (RZV) by sex, geographic region, and geographic ancestry/ethnicity: A post-hoc analysis of the ZOE-50 and ZOE-70 randomized trials. *Vaccine* 37:6262-6267
235. Wutzler P, Casabona G, Cnops J, Akpo EI, Safadi MAP (2018) Herpes zoster in the context of varicella vaccination – An equation with several variables. *Vaccine* 36:7072-7082

LITERATURVERZEICHNIS

236. Wutzler P, Färber I, Wagenpfeil S, Bisanz H, Tischer A (2001) Seroprevalence of varicella-zoster virus in the German population. *Vaccine* 20:121-124
237. Yamaoka-Tojo M, Tojo T (2024) Herpes Zoster and Cardiovascular Disease: Exploring Associations and Preventive Measures through Vaccination. *Vaccines (Basel)* 12:252
238. Yawn BP, Wollan PC, Kurland MJ, St Sauver JL, Saddier P (2011) Herpes zoster recurrences more frequent than previously reported. *Mayo Clin Proc* 86:88-93
239. Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND (2006) Naïve and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney International* 70:371-376
240. Zeevaert R, Thiry N, Maertens de Noordhout C, Roberfroid D (2023) Efficacy and safety of the recombinant zoster vaccine: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*: X 15:100397
241. Zhang JJ, Dong X, Liu GH, Gao YD (2023) Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. *Clin Rev Allergy Immunol* 64:90-107
242. Zhang Z, Mateus J, Coelho CH, Dan JM, Moderbacher CR, Galvez RI, Cortes FH, Grifoni A, Tarke A, Chang J, Escarregaa EA, Kim C, Goodwin B, Bloom NI, Frazier A, Weiskopf D, Sette A, Crotty S (2022) Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines. *Cell* 185:2434-2451 e2417

8 Publikationen und Kongressbeiträge

8.1 Publikationen

8.1.1 Originalarbeiten dieser Dissertation

1. Hielscher F, Schmidt T, Enders M, Leyking S, Gerhart M, van Bentum K, Mihm J, Schub D, Sester U, Sester M. **The inactivated herpes zoster vaccine HZ/su induces a varicella zoster virus specific cellular and humoral immune response in patients on dialysis.** (2024) eBioMedicine 108:105335.
2. Hielscher F, Schmidt T, Klemis V, Wilhelm A, Marx S, Abu-Omar A, Ziegler L, Guckelmus C, Urschel R, Sester U, Widera M, Sester M. **NVX-CoV2373-induced cellular and humoral immunity towards parental SARS-CoV-2 and VOCs compared to BNT162b2 and mRNA-1273-regimens.** (2022) J Clin Virol 157: 105321.

8.1.2 Weitere Publikationen

1. Urschel R, Bronder S, Klemis V, Marx S, Hielscher F, Abu-Omar A, Guckelmus C, Schneitler S, Baum C, Becker SL, Gärtner BC, Sester U, Martinez L, Widera M, Schmidt T, Sester M. **SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after bivalent BA.4/5 COVID-19-vaccination in previously infected and non-infected individuals.** (2024) Nat Commun 15: 3077.
2. Bronder S, Mihm J, Urschel R, Klemis V, Schmidt T, Marx S, Abu-Omar A, Hielscher F, Guckelmus C, Widera M, Sester U, Sester M. **Potent induction of humoral and cellular immunity after bivalent BA.4/5 mRNA vaccination in dialysis patients.** (2024) NPJ Vaccines 9: 25.
3. Klemis V, Schmidt T, Schub D, Mihm J, Marx S, Abu-Omar A, Ziegler L, Hielscher F, Guckelmus C, Urschel R, Wagenpfeil S, Schneitler S, Becker SL, Gärtner BC, Sester U, Sester M. **Comparative immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1-nCoV-19-priming and BNT162b2 or mRNA-1273-boosting with homologous COVID-19 vaccine regimens.** (2022) Nat Commun 13: 4710.
4. Schmidt T, Klemis V, Schub D, Mihm J, Hielscher F, Marx S, Abu-Omar A, Ziegler L, Guckelmus C, Urschel R, Schneitler S, Becker SL, Gärtner BC, Sester U, Sester M. **Immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination.** (2021) Nat Med 27: 1530.

5. Fecher-Trost C, Lux F, Busch KM, Raza A, Winter M, Hielscher F, Belkacemi T, van der Eerden B, Boehm U, Freichel M, Weissgerber P. **Maternal transient receptor potential vanilloid 6 (Trpv6) is involved in offspring bone development.** (2019) J Bone Miner Res 34: 699.

8.2 Kongressbeiträge

16. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, 2024

Hielscher F, Schmidt T, Enders M, Leyking S, Gerhart M, van Bentum K, Mihm J, Schub D, Sester U, und Sester M. Varizella-Zoster-Virus (VZV) spezifische Immunantwort bei Dialysepatienten nach Impfung mit dem inaktivierten Herpes-Zoster-Impfstoff (Poster mit Vortrag)

Gemeinsame Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) und der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI), Hannover, 2022

Hielscher F, Schmidt T, Klemis V, Marx S, Wilhelm A, Abu-Omar A, Ziegler L, Guckelmus C, Urschel R, Sester U, Widera M und Sester M. Immunogenicity of two doses of the NVX-CoV2373 SARS-CoV-2 vaccine in comparison to homologous BNT162b and mRNA1273 regimens (Poster)

Hielscher F, Schmidt T, Enders M, Leyking S, Gerhart M, van Bentum K, Mihm J, Schub D, Sester U, und Sester M. Varicella zoster virus (VZV) specific immune response in dialysis patients after vaccination with the herpes zoster attenuated vaccine (Poster)

30. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Stuttgart, 2021

Hielscher F, Leyking S, Gerhart M, van Bentum K, Mihm J, Sester M und Schub D. Varizella-Zoster-Virus (VZV) spezifische Immunantwort bei Dialysepatienten nach Impfung mit dem Herpes-Zoster-Totimpfstoff (Poster)

9 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Martina Sester für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie durchführen zu dürfen, für die Begutachtung und die Gelegenheit die Ergebnisse der Arbeit bei Kongressen zu präsentieren. Durch ihre fachliche Expertise konnte ich mich wissenschaftlich weiterentwickeln.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. David Schub danken, der das Projekt initiiert und die Förderung über HomforExzellent ermöglicht hat. Auch gilt mein Dank für seine Betreuung und die Einarbeitung in die Thematik, insbesondere in die Durchflusszytometrie und Auswertung der Ergebnisse.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Urban Sester und Frau Dr. Janine Mihm (Klinik für Innere Medizin IV bzw. SHG Klinikum Völklingen) für ihre klinische Expertise und für Vorschläge zur Projektumsetzung sowie Herrn Dr. Mathias Fousse für die Erweiterung des Projekts in Richtung der Analyse von Patienten mit immunmodulatorischen Therapien.

Frau Dr. Tina Schmidt danke ich für ihre Ratschläge sowie das Korrekturlesen der Arbeit und der Kongressbeiträge.

Herzlichen Dank geht an alle aktuellen und ehemaligen „Sesterlinge“ die mich auf meinen Weg begleitet haben. Insbesondere möchte ich Frau Candida Guckelmus, Frau Rebecca Urschel, Frau Verena Klemis, Frau Saskia Bronder und Frau Stefanie Marx danken, dass sie mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein großes Dankschön geht an alle Probanden, die sich bereit erklärt haben Blut zu spenden und dadurch die wissenschaftliche Untersuchung erst ermöglicht haben. Da ohne Probandenrekrutierung und Organisation der Proben diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre, bedanke ich mich auch bei folgenden Kooperationspartnern und deren Mitarbeitern: Arztpraxis Leyking St. Ingbert (Frau Dr. Sarah Leyking), Heimdialyse Homburg e.V. (Herr Dr. Kai van Bentum), Heimdialyse St. Wendel (Herr Dr. Markus Gerhart), Impfzentrum Neunkirchen, betriebsärztlicher Dienst und Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Enders für die Möglichkeit, die VZV-Neutralisationstests in seinem Labor in Stuttgart durchführen zu können. Insbesondere möchte ich Frau Dr. Maren

DANKSAGUNG

Eggers und Frau Silvia Meier für das Nahebringen der Methodik danken. Zudem danke ich Herrn Dr. Marek Widera und seinen Mitarbeitern für die Durchführung des SARS-CoV-2 Mikro-Neutralisationstest in seinem Labor in Frankfurt.

Abschließend danke ich meinen Eltern und Großeltern die immer für mich da waren und mich in all meinen Vorhaben unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt meinen Mann Jean-Luc, der immer für mich da ist, mich motiviert und aufbaut.

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.