

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Optimierung einer transkutanen Immunisierungsstrategie gegen Influenza-Peptide

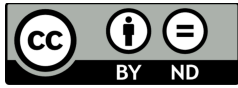
Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Joana Çule
aus Korçë, Albanien

Mainz, 2025

Nutzungsbedingungen:



Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 21.08.2025

*Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Das Immunsystem.....	3
2.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	3
2.1.2 Das erworbene Immunsystem.....	4
2.2 Dendritische Zellen	4
2.2.1 Aufnahme und Prozessierung der Antigene durch die dendritischen Zellen	5
2.2.2 Wanderung der geweberesidenten dendritischen Zellen zu den lymphatischen Organen	8
2.3 T-Lymphozyten.....	9
2.3.1 CD8 ⁺ T-Zellen.....	10
2.3.2 CD4 ⁺ T-Zellen.....	11
2.3.3 Das immunologische Gedächtnis	12
2.4 Das Influenzavirus.....	13
2.4.1 Struktur des Influenzavirus und die Entstehung neuer Virussubtypen	13
2.4.2 Epidemiologie und Klinik	14
2.5 Impfungen	15
2.5.1 Zugelassene Impfstoffe gegen Influenza.....	16
2.5.2 Einschränkungen derzeitiger Influenza-Impfstoffe	18
2.5.3 Der aktuelle Stand der Impfstoffforschung	19
2.6 Transkutane Immunisierung mit Imiquimod und Dithranol	27
2.6.1 OVA ₂₅₇₋₂₆₄	28
2.6.2 Imiquimod.....	28
2.6.3 Dithranol	29
2.6.4 Optimierung der Antigen dosis und Frequenz der Immunisierung nach Radsak et al.	30
2.7 Zielsetzung	31
3 Material und Methoden	32
3.1 Material	32
3.1.1 Versuchstiere.....	32
3.1.2 Virus	32
3.1.3 Medien	32
3.1.4 Puffer.....	32
3.1.5 Antikörper und Tetramere	33
3.1.6 Reagenzien und Chemikalien.....	34
3.1.7 Kits	35

3.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	35
3.1.9	Laborgeräte	36
3.2	Methoden	37
3.2.1	Transkutane Immunisierung	37
3.2.2	Betäubung der Versuchstiere	37
3.2.3	Blutentnahme	37
3.2.4	Intraperitoneale Infektion.....	38
3.2.5	Intranasale Infektion	38
3.2.6	Serumgewinnung.....	38
3.2.7	Milzentnahme und Herstellung einer Splenozyten-Einzelzellsuspension	38
3.2.8	Durchflusszytometrie	39
3.2.9	Tetramer- und Antikörperfärbung	39
3.2.10	IFN- γ -ELISpot-Assay	40
3.2.11	Nachweis der intrazellulären Produktion von IFN- γ	41
3.2.12	ELISA-Assay	41
3.2.13	Statistik.....	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Optimierung des Immunisierungsprotokolls.....	43
4.1.1	Minimierung von Nebenwirkungen durch einmalige Dithranol-Applikation im Rahmen des Immunisierungsprotokolls	43
4.2	TCl als Immunisierungsansatz gegen das Influenzavirus	45
4.2.1	Die Verlängerung der Peptidkette am N-Terminus mit drei zusätzlichen Leucin-Resten ermöglicht die Induktion einer T-Zell-Antwort	46
4.2.2	Die Immunisierung mit L-ASN führt zu einer IFN- γ -Produktion durch CD8 ⁺ T-Zellen nach Restimulation mit L-ASN und ASN	48
4.2.3	DIVA ² mit ASN oder L-ASN führt zur Bildung ASN-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	50
4.2.4	Die Immunisierung mit ASN oder L-ASN führt zur Erhöhung des Überlebens nach der Virus-Challenge.....	52
4.2.5	Die Optimierung des Immunisierungsprotokolls führt zur weiteren Erhöhung des Überlebens nach der Virus-Challenge	55
4.2.6	Antikörperproduktion nach DIVA ² mit ASN, L-ASN und HA ₁₂₇₋₁₃₇	58
5	Diskussion.....	60
5.1	Optimierung des Immunisierungsschemas in dem Ovalbuminpeptid-Modell.....	61
5.2	Die TCl mit Dithranol, Imiquimod und NP ₃₆₆₋₃₇₄ fördert die Entstehung hochqualitativer CD8 ⁺ T-Zellen	62
5.3	Erhöhung der antigenen Effizienz durch die kombinierte Anwendung mit einem MHC-II-Peptid	64
5.4	Bestehende Limitierungen und Möglichkeiten für den Übergang der TCl mit Dithranol und IMI-Sol+ in die klinische Phase	66
6	Zusammenfassung.....	68
7	Literaturverzeichnis	69
8	Anhang.....	89

9	Danksagung	92
10	Tabellarischer Lebenslauf	93

Abkürzungsverzeichnis

AG	<i>Arbeitsgruppe</i>
ANOVA	<i>Varianzanalyse</i>
APC	Allophycocyanin
APCs	<i>antigenpräsentierende Zellen</i>
ASNENMETM (ASN)	NP366-374
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	<i>bovines Serumalbumin, bovines Serumalbumin</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
COPD	<i>chronisch obstruktive Lungenerkrankung</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
DCs	<i>dendritische Zellen</i>
DIVA	Dithranol/Imiquimod-basierte Vakzinierung
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	<i>enzyme-linked immunospot</i>
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum, fötales Kälberserum
GRAVY	grand average of hydrophobicity
HRP	Meerrettichperoxidase, Meerrettichperoxidase
i. n.	intranasal
i. p.	intraoperitoneal
i. v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	<i>Immunglobuline</i>
IL	<i>Interleukine</i>
Influenzavirus PR8	Influenza A Virus (A/Puerto Rico/8/1934(H1N1))
LAIV	Live Attenuated Influenza Vaccine
LD50	letale Dosis 50
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MyD88	myeloischer Differenzierungsfaktor 88
NLRs	NOD-like-Rezeptoren
OTII	OVA323-339
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PRR	pattern recognition receptor
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm.	Umdrehungen pro Minute
SALT	Skin Associated Lymphocyte Tissue
SFU	spot forming unit
SIINFEKL	SIINF, OVA257-264
STIKO	Ständige Impfkommision
TCI	transkutane Immunisierung
TCID50	50% tissue culture infectious dose
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{FH} -Zellen	follikulären T-Helferzellen
T _H	T-Helferzelle

TLR		Toll-like-Rezeptor
TM		Testmedium, Testmedium
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin,	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF		Tumornekrosefaktor
TWEEN20		Polysorbat 20, Polysorbat 20
WHO		World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Dendritische Zellen lösen erworbene Immunreaktionen aus.	6
Abbildung 2. Struktur der MHC-Moleküle. MHC-Moleküle bestehen aus zwei Ketten (α - und β -Ketten).	6
Abbildung 3. Struktur des Influenzavirus (Orthomyxoviridae)	14
Abbildung 4. Schichten der Epidermis. (Abbildung von Murphy et al. 2018)	23
Abbildung 5. Aktive und passive Impfmethode zur dermalen Immunisierung.	25
Abbildung 6. Durchflusszytometrische Auswertung der peptidspezifischen T-Zellen	40
Abbildung 7. DIVA ² Anpassung des Immunisierungsschemas.	44
Abbildung 8. DIVA ² bei einmaliger Dithranol-Applikation vor der ersten Immunisierung	45
Abbildung 9. Die Verlängerung der Peptidkette am N-Terminus mit drei zusätzlichen Leucin-Resten ermöglicht die Auslösung einer T-Zellantwort	47
Abbildung 10. Die Behandlung mit L-ASN führt zur Produktion ASN-Tetramer-spezifischer CD8 ⁺ -T-Zellen.....	49
Abbildung 11. Produktion und Freisetzung von IFN- γ durch die CD8 ⁺ -T-Zellen nach Restimulation mit L-ASN und ASN	50
Abbildung 12. Zweifache Immunisierung mit ASN oder L-ASN führt zur Bildung peptidspezifischer CD8 ⁺ -T-Zellen	51
Abbildung 13. Die Applikation höherer Mengen an ASN oder L-ASN führt zu einer höheren CD8 ⁺ -T-Zellantwort	53
Abbildung 14. Überleben nach zweimaliger Immunisierung mit 100 μ g ASN oder 100 μ g L-ASN	54
Abbildung 15. Die zusätzliche Gabe eines MHC-II-Peptids führt zu einer höheren CD8 ⁺ -T-Zellantwort	56
Abbildung 16. Erhöhtes Überleben bei zusätzlicher Gabe eines Influenza MHC-II-Peptids.	57
Abbildung 17. Antikörpernachweis.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Antikörper und Tetramere	33
Tabelle 2 Reagenzien und Chemikalien	34
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien	35
Tabelle 4 Laborgeräte.....	36
Tabelle 5 Peptide.....	37

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Die Bekämpfung der Ausbreitung von Infektionskrankheiten stellt eine große Herausforderung für die ganze Welt dar. Die COVID-19 Pandemie hat unserer Gesellschaft gezeigt, wie wichtig es ist, mehr Wert auf die Prävention von Infektionskrankheiten zu legen. Während die Globalisierung ihre Ausbreitung immer mehr begünstigt, besteht ein dringender Bedarf, neue Maßnahmen und Impfstrategien zu entwickeln.

Die Influenza repräsentiert global eine der prävalentesten Infektionskrankheiten. Das Influenzavirus verursacht saisonale Epidemien, die eine große soziale und wirtschaftliche Belastung darstellen und jedes Jahr 290.000 bis 650.000 Todesopfer fordert. Pandemische Ausbrüche beeinträchtigen die Bevölkerung in noch stärkerem Maße (*WHO Fact Sheet*, 2018). Durch Antigen-Shift entstehen hochpathogene Virusvarianten, die schwerwiegende Pandemien auslösen können, wie z. B. die Schweinegrippe-Pandemie aus dem Jahr 2009. Auch heute stehen wir vor einer ähnlichen Bedrohung, die vor allem durch eine aviäre Influenza-Variante (Vogelgrippevirus, Variante H5N1) aufgebaut wird (Hof, 2019).

Zu den Risikogruppen für einen schweren Verlauf zählen insbesondere ältere Menschen ab 60 Jahre und Menschen mit Grunderkrankungen. Trotz weit verbreiteter Grippeimpfprogramme ist die Influenza nach wie vor eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei älteren Erwachsenen. Grund dafür ist nicht nur die relativ niedrige Impfquote (Michaelis et al., 2021). In Deutschland lag das im Jahr 2022 bei den über 65-Jährigen bei 43,3% (destatis.de). Die Dysregulation der Produktion von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Botenstoffen in dieser Altersgruppe trägt zu einem Rückgang der Bildung einer wirksamen CD8⁺T-Zell-Antwort bei, die zur Beseitigung des Influenzavirus aus der Lunge erforderlich ist. Die derzeitigen Grippeimpfstoffe bieten nur einen schwachen Stimulus für diesen Teil der adaptiven Immunantwort und beruhen auf einer erneuten Stimulierung des CD8⁺T-Zell-Gedächtnisses, das durch eine frühere Exposition gegenüber dem Influenzavirus entstanden ist (McElhaney et al., 2020). Neben den klassischen Nadelbasierten Impfstoffen, steht seit 2012 auch ein attenuierter Lebendimpfstoff zur Verfügung, der als Nasenspray verabreicht wird. Voraussetzung für dessen Anwendung ist ein potentes Immunsystem, deshalb ist dieser Impfstoff nur für Kinder und Jugendliche von 2-17 Jahren zugelassen (Hof, 2019).

In diesem Kontext gewinnen neue Immunisierungsansätze wie die Transkutane Immunisierung (TCI) eine immer größere Bedeutung. Die TCI ist eine neue Impfmethode, bei der ein Impfstoffantigen und die notwendigen Adjuvantien auf die intakte Epidermis aufgetragen werden, um eine Immunreaktion transkutan zu induzieren (Glenn et al., 1998).

Die Antigenpräsentierenden Zellen der Haut werden aktiviert und stimulieren eine effektive T-Zell- Immunantwort.

Die TCI-Methode mit dem TLR (*Toll-like-Receptor*) -7-Ligand Imiquimod als Adjuvans und einem CTL (*cytotoxic T-lymphocyte*)-Epitop wurde von der Arbeitsgruppe (AG) Radsak entwickelt und etabliert. Durch diese Methode entstanden sehr wirksame T-Zellen gegen das Ziel-Epitop, deren Aktivierung zu einer umfassenden Immunantwort führte (Rechtsteiner et al., 2005, Patentanmeldung Schild et al., 2006). Die AG Radsak hat diesen neuen Impfansatz durch ihre bisherigen Arbeiten weiter verbessert und eine neue Imiquimod-Nanoemulsion – IMI-Sol – entwickelt. IMI-Sol hat die Effizienz der TCI gegenüber der kommerziell erhältlichen Creme Aldara[®] deutlich erhöht (beide Präparate enthalten jeweils 5% Imiquimod) (Lopez et al., 2017). Zudem wurde das Immunisierungsprotokoll durch das Antipsoriatikum Dithranol erweitert (Dithranol/Imiquimod-basierte Vakzinierung (DIVA)) (Sohl et al., 2022). Die bei DIVA angewandte Kombination aus Dithranol und Imiquimod als Adjuvantien zusammen mit synthetisch hergestellten Peptiden löst eine effektive primäre und Gedächtnis-T-Zell-Immunantwort aus und wurde von der AG Radsak zum Patent angemeldet (Patentanmeldung Radsak et al., 2018). Diese Strategie ist uneingeschränkt anwendbar.

Die TCI bringt als nicht-invasive Methode mehrere Vorteile mit. Das Meiden von Kanülen vereinfacht die Applikation und verhindert Verletzungen, Infektionen und Nadelphobien. Auch in der erwachsenen Bevölkerung führt letztere nicht selten zur Vermeidung der Gripeschutzimpfung (McLenon und Rogers, 2018). All diese Vorteile von TCI könnten dazu beitragen, die Kosten der Immunisierung zu senken und die Impfquote zu verbessern. Die Überwindung der Hautbarriere als Teil des angeborenen Immunsystems stellt bei der Entwicklung transkutaner Impfstoffe eine erhebliche Herausforderung dar.

Im Rahmen dieser experimentellen Doktorarbeit wurde der Einsatz von DIVA zur Immunisierung gegen Influenza untersucht. Das Ziel der Dissertation umfasste die Optimierung der transkutanen Immunisierungsstrategie DIVA und die Etablierung einer transkutanen Influenza-Impfung im Mausmodell als Grundlage für den Übergang in die klinische Phase.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Immunsystem

Der Mensch ist in seiner Umwelt durchgehend pathogenen Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren, ausgesetzt. Das Immunsystem aus verschiedenen Effektorzellen, Organen, Geweben und Molekülen schützt den Organismus vor Krankheitserregern und ihren Toxinen. Die Immunantwort besteht aus einer humoralen und einer zellulären Komponente. Die humorale Immunantwort wird durch Antikörper (adaptive Immunität) und das Komplementsystem (angeborene Immunität) gebildet. Die zelluläre spezifische Immunantwort basiert auf Antworten der Leukozyten. Pluripotente Stammzellen aus dem hämatopoetischen Knochenmark erzeugen lymphatische und myeloische Vorläuferzelle. Aus der lymphatischen Reihe entstehen die angeborenen lymphatischen Zellen, die natürlichen Killerzellen sowie die T- und B-Lymphozyten. Aus der myeloischen Reihe differenzieren die übrigen Typen der Leukozyten, die Erythrozyten und die Megakaryozyten. Anatomische und biochemische Barrieren der Haut, Schleimhäute, des Komplementsystems und diverse antimikrobielle Proteine bilden die erste Abwehrlinie gegen das Eindringen von Mikroorganismen. Das Überwinden dieser Schutzmechanismen und somit das Eindringen von Krankheitserregern aktiviert humorale und zelluläre Immunreaktionen zur Detektion und Eliminierung der pathogenen Noxen (Murphy et al., 2018).

2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie und wirkt schnell, sobald es zum Kontakt mit einem Erreger kommt. Es wirkt unspezifisch gegen alle Bestandteile der Mikroorganismen, die als „fremd“ erkannt werden. Die Zellen der angeborenen Immunität erkennen die Mikroorganismen und andere Auslöser von Entzündungen, indem sie eine begrenzte Anzahl an angeborene Erkennungsrezeptoren exprimieren. Zu diesen Zellen gehören u.a. die Makrophagen, dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) und die neutrophilen Zellen. Sie verfügen über Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), die regelmäßige molekulare Muster erkennen, die als pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) benannt werden und Bestandteile zahlreicher Mikroorganismen sind. PAMPs sind die Strukturen, die Mikroorganismen von den körpereigenen Zellen unterscheiden. Einige PRRs sind Transmembranproteine, beispielsweise die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Sie dienen der Erkennung von PAMPs, die aus extrazellulären Bakterien stammen. Weitere PRRs sind zytoplasmatische Proteine, wie beispielsweise NOD-like-Rezeptoren (NLRs), die intrazelluläre bakterielle Strukturen erkennen. Andere zytoplasmatische Rezeptoren detektieren Virusinfektionen aufgrund der unterschiedlichen Struktur der viralen DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA

(Ribonukleinsäure). Die Aktivierung von PRRs auf Sensorzellen löst in diesen Zellen Effektor-Funktionen aus. Diese umfassen die Zerstörung und Phagozytose eingedrungener Erreger, die Aktivierung des Komplementsystems, die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen etc. Eine weitere wichtige Funktion der Makrophagen und dendritischen Zellen ist die Antigenprozessierung, also die Bildung von Peptiden aus den Proteinen der aufgenommenen Mikroorganismen. Diese Peptidantigene werden auf der Zelloberfläche auf MHC (*Major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex)-Moleküle präsentiert und von den Zellen des adaptiven Immunsystems erkannt (Murphy et al., 2018).

2.1.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem löst eine hochspezifische Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen aus. Man spricht von einer adaptiven oder erworbenen Immunantwort, da sie als Anpassung an eine Infektion mit einem spezifischen Krankheitserreger entsteht. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem benötigt eine adaptive Immunantwort mehrere Tage, um sich zu entwickeln und ist in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis zu bilden. Dieses führt bei erneuter Infektion mit demselben Erreger zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort. Das adaptive Immunsystem ist wirksamer und effizienter in der Bekämpfung von Krankheitserregern, aufgrund der Spezifität der Antigenerkennung durch die Lymphozyten. Die Population der Lymphozyten umfasst die sogenannten B- und T-Lymphozyten. Sie zeichnen sich u.a. durch die Expression unterschiedlicher Antigenrezeptoren aus. Anders als bei dem begrenzten Repertoire von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, exprimieren die B- und T-Lymphozyten hoch variable Antigenrezeptoren mit einem großen Spektrum an Epitop-Spezifitäten. Dadurch kann das adaptive Immunsystem im Prinzip auf jeden Krankheitserreger hochspezifisch reagieren. Der B-Zell-Rezeptor (*B-cell receptor*, BCR), auch als Oberflächenimmunglobulin bezeichnet, wird von denselben Genen produziert, die die Antikörper kodieren. Der T-Zell-Rezeptor (*T-cell receptor*, TCR) unterscheidet sich von den Immunglobulinen in der Struktur und den Bindungseigenschaften. Nach Kontakt mit einem Antigen differenzieren sich die B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Die T-Zellen entwickeln sich zu T-Effektorzellen. Das angeborene und adaptive Immunsystem interagierten eng miteinander (Murphy et al., 2018).

2.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen sind die wichtigsten Zelltypen, die auf ihrer Zelloberfläche T-Zell-Antigene präsentieren; deshalb die Bezeichnung professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs). Sie ermöglichen die Antigenerkennung durch die T-Lymphozyten und produzieren Signalstoffe, die die Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten beeinflussen. Die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen dient vor allem zur Aktivierung naiver T-Zellen, wodurch sie sich vermehren und differenzieren. Makrophagen

und B-Zellen präsentieren Antigene insbesondere dafür, dass sie von T-Effektorzellen über Cytokine oder Oberflächenmoleküle spezifisch stimuliert werden (Kambayashi und Laufer, 2014).

Die dendritischen Zellen sind darauf spezialisiert, die adaptive Immunantwort auszulösen. Sie werden als entscheidende Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem angesehen (Guermontprez et al., 2002). Die meisten DCs entwickeln sich aus der gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle. Nur einige spezielle Subtypen von DCs gehen möglicherweise aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle aus (Wu und Liu, 2007). Dendritische Zellen können in zwei Typen differenziert werden: konventionelle (klassische) und plasmazytoide DCs. Bei den unreifen konventionellen DCs handelt es sich um phagozytotische Zellen, die Krankheitserreger erkennen, aufnehmen und prozessierte Antigene auf der Oberfläche präsentieren können (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999; Murphy et al., 2018). Die plasmazytoiden DCs produzieren eine Gruppe von Zytokinen, die als Typ-I-Interferone (IFN) oder antivirale Interferone bezeichnet und als Teil der angeborenen Immunität betrachtet werden (Siegal et al., 1999).

2.2.1 Aufnahme und Prozessierung der Antigene durch die dendritischen Zellen

Die Membran der DCs bildet komplexe Zellfortsätze, die zur Vergrößerung der Oberfläche dienen (Banchereau und Steinman, 1998). Partikuläres Material wird über PRRs durch Phagozytose aufgenommen. Zu den Rezeptoren der konventionellen DCs gehören C-Lektine, Komplementrezeptoren und Fc-Rezeptoren (Banchereau und Steinman, 1998; Guermontprez et al., 2002). Letztere erkennen die konstanten Regionen von Antikörpern in Antigen-Antikörper-Komplexen. Ein weiterer unspezifischer Prozess, über den DCs Krankheitserreger und deren Bestandteile aufnehmen, wird als Makropinozytose bezeichnet (Abb. 1). Darunter versteht man die rezeptorunabhängige Aufnahme großer Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit und deren Inhaltsstoffe (Sallusto et al., 1995). Die aufgenommenen Antigene werden in den Zellkompartimenten prozessiert, an die MHC-Moleküle gebunden und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert (Abb. 1).

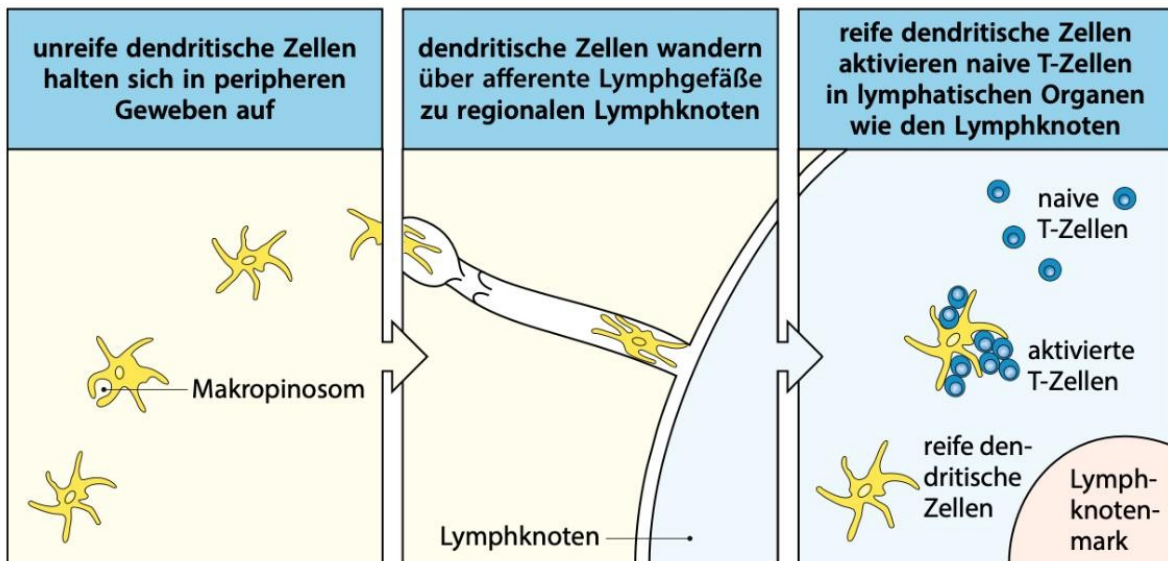


Abbildung 1. Dendritische Zellen lösen erworbene Immunreaktionen aus. „Unreife dendritische Zellen, die sich in Geweben aufhalten, nehmen durch Makropinozytose und rezeptorvermittelte Phagozytose Krankheitserreger und deren Antigene auf. Das Vorhandensein und die Erkennung von Pathogenen veranlassen diese Zellen, über die Lymphgefäße zu regionalen Lymphknoten zu wandern, wo sie als vollständig gereifte nicht-phagozytische dendritische Zellen ankommen. Sie präsentieren sowohl das Antigen als auch die ko-stimulierenden Moleküle, die für die Aktivierung einer naiven T-Zelle notwendig sind, die das Antigen erkennt, und stimulieren so die Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten“. (Abbildung von Murphy et al., 2018, Seite 23)

MHC-Moleküle sind spezialisierte Glykoproteine, die fremde Peptide zur Zelloberfläche transportieren und präsentieren. Die Gene, die für diese Glykoproteine kodieren, bezeichnet man als *major histocompatibility complex* (Haupthistokompatibilitätskomplex, MHC) (Ryan und Cobb, 2012). Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen – MHC-Klasse I und MHC-Klasse II – die sich in ihrer Struktur und Expressionsmuster unterscheiden. MHC-Moleküle bestehen aus eine α - und einer β -Kette (Abb. 2).

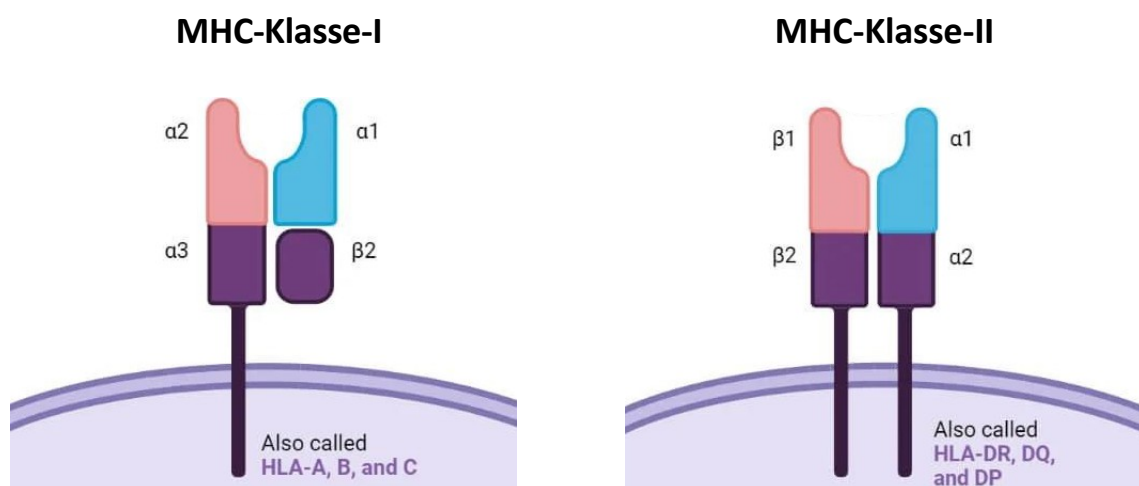


Abbildung 2. Struktur der MHC-Moleküle. MHC-Moleküle bestehen aus zwei Ketten (α - und β -Ketten). Die beiden gepaarten Domänen, die der Membran am nächsten liegen, die Immunglobulin-Domänen, sind in beiden Klassen sehr ähnlich. Die beiden entfernt von der Membran lokalisierten Domänen bilden zusammen einen langen Spalt oder eine furche, worin ein Peptid gebunden wird. (Abbildung von <https://microbenotes.com/mhc-molecules/>)

MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen nukleären Zellen (Zellen mit einem Zellkern) präsentiert (Hewitt, 2003). Sie bestehen aus einer α -Kette mit 3 Domänen, die im MHC-Lokus kodiert ist, und einer kleinen β_2 -Mikroglobulin-Kette, bestehend aus einer Domäne. Diese wird nicht vom MHC-Lokus kodiert. Die Domänen α_1 und α_2 der α -Kette bilden die Wände eines Spalts auf der Oberfläche des Moleküls – den peptidbindenden Spalt (Madden, 1995). MHC-I-Moleküle präsentieren endogen erzeugte Peptide, wie z.B. Fragmente von viralen Proteinen oder Proteinen, die in der Zelle synthetisiert werden. Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden, sind in der Regel acht bis zehn Aminosäuren lang (Bouvier und Wiley, 1994). Längere Peptide können zwar gebunden werden, insbesondere an den Carboxylenden, werden aber dann von Exopeptidasen des endoplasmatischen Retikulums auch auf acht bis zehn Aminosäuren verkürzt. Unterschiedliche Peptidlängen lassen sich durch Faltung des Peptidrückgrats anpassen. Alternativ ragt das Peptid an seinem Carboxylende über die Furche heraus (Murphy et al., 2018; Bell et al., 2009). Die Enden eines Peptids sind allerdings größtenteils im Inneren des Moleküls verborgen. Die Bindung erfolgt durch Kontakte zwischen Atomen in den freien Amino- und Carboxylenden und den unveränderlichen Bereichen an jedem Ende des Spalts. Mehrere unterschiedliche Peptide, die an zwei oder drei bestimmten Positionen innerhalb der Peptidsequenz dieselben oder sehr ähnliche Aminosäurereste haben, können von einem MHC-Molekül gebunden werden. Das sind die Stellen des MHC-Moleküls, die von polymorphen Aminosäureresten gebildet werden. Man spricht von Verankerungsresten, weil sie das Peptid an das MHC-Molekül binden. Diese können sich in der Position oder in der Aminosäure unterscheiden und haben einen hydrophoben oder basischen Verankerungsrest am Carboxylende (Murphy et al., 2018). Die Produktion von Antigenen im Zytosol, z. B. als Ergebnis einer Virusinfektion, führt zur Bindung von Peptiden an MHC-Klasse-I-Moleküle, die dann von den CD (*cluster of differentiation*) 8⁺T-Zellen präsentiert werden (Norment et al., 1988).

MHC-Klasse-II-Moleküle werden hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen präsentiert. Sie bestehen aus zwei Ketten (α und β) mit jeweils zwei Domänen (Drake und Drake, 2016). Beide Ketten sind im MHC-Lokus kodiert. Der peptidbindende Spalt wird von der α_1 - und β_1 -Domäne gebildet. Die Bindung von Peptiden an MHC-Klasse-II-Moleküle unterscheidet sich von der Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle (Stern et al., 1994). Die Enden des Spalts bei MHC-Klasse-II-Molekülen sind weiter geöffnet. Daraus folgt, dass die Enden von gebundenen Peptiden zugänglich sind (Stern et al., 1994; Jardetzky et al., 1994). MHC-Klasse-II-Proteine präsentieren Peptide mit einer Länge von 13 - 25 Aminosäuren (Wieczorek et al., 2017). Da bei MHC-Klasse-II-Molekülen die Gruppen von konservierten Aminosäuren an den Peptidenden nicht vorkommen, werden diese nicht gebunden, sondern sind durch Wechselwirkungen entlang des bindenden Spalts assoziiert. Längere Peptide werden danach

auf 13-17 Aminosäuren verkürzt (Murphy et al., 2018). MHC-II-Moleküle präsentieren vornehmlich exogene Peptide, die von APCs aus der extrazellulären Umgebung aufgenommen wurden, beispielsweise von phagozytierten Krankheitserregern. Die von MHC-Klasse-II-Molekülen auf DCs präsentierten Peptide können naive $CD4^+$ T-Zellen aktivieren (Vignali, 1994; Hiltbold und Roche, 2002).

Krankheitserreger, die nicht durch Phagozyten aufgenommen und prozessiert werden, können als exogene Antigene erkannt werden, indem sie von dendritischen Zellen phagozytiert, weiter prozessiert und deren Peptide auf der Oberfläche der Immunzellen durch MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden. Dieser exogene Reaktionsweg zur Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen mit extrazellulären Peptiden wird als Kreuzpräsentation und die Aktivierung von naiven T-Zellen über diesen Weg als Kreuz-Priming bezeichnet (Guermontprez et al., 2003; Joffre et al., 2012). Insbesondere $CD205^+CD8a^+$ DCs sind zur Kreuzpräsentation befähigt (Heath et al., 2004). Um beispielsweise ein Virus zu eliminieren, das ausschließlich Epithelzellen infiziert, ist die Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen essenziell. Das erfordert, dass die DCs die aus virusinfizierten Zellen stammenden Virusantigene durch Phagozytose internalisieren. Die exogenen Peptide werden dann auf der Oberfläche der DCs auf MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert und von den $CD8^+$ T-Zellen erkannt. Die Kreuzpräsentation kann auch zwischen zwei DCs stattfinden. Das bedeutet, dass Antigene von Viren, die DCs infizieren und schnell töten, auch von nichtinfizierten DCs präsentiert werden können (Murphy et al., 2018). Unreife DCs präsentieren auf ihrer Oberfläche ebenfalls eine Vielzahl an Phagozytose-Rezeptoren, beispielsweise den Mannose-Rezeptor DEC205 oder Fc-Rezeptoren, welche die Aufnahme von Antigenen ermöglichen (Guermontprez et al., 2002).

2.2.2 Wanderung der geweberesidenten dendritischen Zellen zu den lymphatischen Organen

Nach den oben genannten Vorgängen wandern die DCs vom peripheren Gewebe über afferente Lymphgefäße zu den regionalen Lymphknoten, wo sie auf naive T-Zellen treffen und deren Antigenrezeptoren aktivieren (Hemmi et al., 2001). Dafür ist primär die Reifung der DCs notwendig, welche durch Antigenkontakt induziert bzw. beeinflusst wird. Toll-like-Rezeptoren sind eine Gruppe von PRRs, die der Erkennung von PAMPs dienen und die u. a. von den DCs exprimiert werden. Die Bindung von PAMPs, wie LPS (Lipopolysaccharide), CpG-DNA oder dsRNA, an TLRs induziert die Differenzierung der DCs (Akira et al., 2001) und führt zu Veränderungen der Proteinexpression auf deren Oberfläche. Die Hochregulierung des Chemokin-Rezeptors 7 (CCR7) führt zu einer verstärkten Migration in die lymphatischen Organe, ausgelöst durch Interaktion mit dem Chemokin-Ligand 19 (CCL19) und CCL21 (Bachmann et al., 2006; Ohl et al., 2004). Diese Vorgänge, die der Aktivierung der TLRs folgen, bezeichnet man häufig als Lizenzierung. Alternativ kann die Reifung dendritischer Zellen von

Zytokinen, wie IL-1 β , GM-CSF oder TNF- α ausgelöst werden (Gallucci und Matzinger, 2001). Die DCs gehen in ein Differenzierungsprogramm über, was deren Eintritt in das Lymphsystem und die Aktivierung der T-Zellen ermöglicht. Die Abbildung 1 stellt die Wanderung der dendritischen Zellen zu den lymphatischen Organen nach Antigenaufnahme dar. So gelangen sie über afferente Lymphgefäße direkt vom Randsinus in die T-Zell-Zonen. Vom TLR ausgehende Signale tragen zu einer verstärkten Antigenpräsentation bei, indem darauffolgend die Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen hochreguliert wird. Zusätzlich exprimieren die DCs Adhäsionsmoleküle und setzen Chemokine frei, um naive T-Zellen anzulocken (Murphy et al., 2018). Weiterhin exprimieren sie große Mengen an ko-stimulierenden Molekülen. Dazugehören unter anderem die Transmembranglykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die mit Rezeptoren auf naiven T-Zellen interagieren und diese stimulieren (Chen und Flies, 2013).

Zusammenfassend können die Eigenschaften der dendritischen Zellen naive T-Zellen aktivieren und so die adaptive Immunantwort induzieren.

2.3 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind v.a. für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene von Bedeutung und stammen aus der lymphatischen Stammzellreihe. Jeder Lymphozyt besitzt eine spezifische Variante eines Antigenrezeptors (TCR). So weisen die Populationen von T-Lymphozyten ein großes Repertoire an Rezeptoren auf (Dembic et al., 1986). Der TCR besteht aus zwei Ketten, einer α - und einer β -Kette, wobei jede einen konstanten und einen variablen Anteil hat. Die variablen Teile der beiden Ketten bilden die Epitop spezifische Region. TCRs erkennen nur Peptid epitope, die an MHC-Moleküle gebunden sind (Allison et al., 1982; Kappler et al., 1983).

T-Zellen entstehen aus den lymphatischen Progenitoren im Knochenmark. Die Reifung der Zellen findet nach Migration in den kortikalen Bereich des Thymus statt (Kurd et al., 2016). Dort differenzieren die Vorläuferzellen und treten in eine Phase der Proliferation ein. Die korrespondierenden Zellen werden doppelt negative Thymozyten genannt, da in diesem Stadium auf der Zelloberfläche weder CD4 noch CD8 exprimiert sind. In diesem frühen Stadium der T-Zell-Entwicklung werden zwei T-Zell-Linien unterschieden, die sogenannten α : β - oder γ : δ -T-Zellen (Kreslavsky et al., 2010), Diese auf Basis ihrer charakteristischen Untereinheiten des jeweiligen TCR voneinander abgegrenzt werden können. Etwa 95 % der Subpopulationen stammen aus den α : β -T-Zellen. In einem späteren Entwicklungsstadium beginnt die Expression von CD4 und CD8, so dass doppelt positive T-Zellen generiert werden. γ : δ -T-Zellen treten als intraepitheliale T-Zellen in der Haut und Schleimhäuten auf.

α : β -T-Zellen durchlaufen im Thymus positive und negative Selektionsprozesse (Takaba & Takayanagi, 2017). Bei der positiven Selektion werden den $CD4^+ CD8^-$ -Thymozyten Antigene auf MHC-I- oder MHC-II-Molekülen im Kortex des Thymus präsentiert. Thymozyten mit geringer Affinität zu MHC-Molekülen werden apoptotisch. Nach positiver Selektion beenden die doppelt positiven Zellen die Expression eines der beiden Ko-Rezeptormoleküle. Es entstehen einfach positive $CD4^-$ oder $CD8^-$ Thymozyten (Murphy et al., 2018). Die differenzierten T-Zellen werden entsprechend in $CD8^+$ und $CD4^+T$ -Zellen eingeteilt. $CD4^-$ und $CD8^-$ Moleküle sind für die Interaktion der T-Zellen mit anderen Zellen von großer Bedeutung. $CD8$ bindet an MHC-I-Moleküle und $CD4$ an MHC-II-Moleküle. $CD8^+T$ -Zellen erkennen nur Peptide, die an MHC-I-Moleküle präsentiert und $CD4^+T$ - Zellen nur Peptide, die von MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Zusätzlich sind sie beteiligt an der Signalkaskade des TCR und werden als Ko-Rezeptoren bezeichnet (Wieczorek et al., 2017).

Bei der negativen Selektion werden den selektierten Thymozyten körpereigene Antigene präsentiert. Bei diesem Selektionsschritt sterben die autoreaktiven Thymozyten ab. Dieser Vorgang verhindert die Entstehung von Autoimmunität (Rosenblum et al., 2015). Nur etwa 10 % der Thymozyten überleben diese Selektionsvorgänge und migrieren nachfolgend in T-Zell-Regionen der sekundären lymphatischen Organe. Diese werden als naive T-Zellen bezeichnet, da sie zu diesem Zeitpunkt noch keinen Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatten. Erst nach der Interaktion des TCR mit einem spezifischen MHC-Antigen-Komplex auf einer professionellen APC werden naive T-Zellen aktiviert und entwickeln ihre funktionellen Eigenschaften (Takaba und Takayanagi, 2017).

Naive T-Lymphozyten kommen in den peripheren lymphatischen Organen mit Antigenen in Kontakt, die vor allem durch dendritische Zellen aus Infektionsherden transportiert werden. Erst wenn der TCR mit einem spezifischen Antigen in Wechselwirkung tritt, gehen sie in die Phase der Proliferation und Differenzierung über (von Essen et al., 2010). Danach verlassen sie als Effektorzellen den Lymphknoten und gelangen schließlich über den Blutkreislauf in die infizierten Gewebe. Dieser Vorgang dauert vier bis sechs Tage. Man unterscheidet drei verschiedenen Arten von T-Effektorzellen: die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (CTL), die $CD4^+T$ -Helferzellen (T_H) und die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) (Murphy et al., 2018).

2.3.1 $CD8^+$ T-Zellen

In ihrer aktivierten Form entwickeln sich $CD8^+T$ -Zellen zu zytotoxische T-Zellen. Zytotoxische $CD8^+T$ -Effektorzellen spielen eine wesentliche Rolle bei dem Schutz gegen intrazelluläre Krankheitserreger. Dabei handelt es sich größtenteils um Viren. Sie erkennen Fremdpeptide, die an MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden zur Zelloberfläche transportiert wurden (Norment

et al., 1988). Zytotoxische CD8⁺T-Zellen töten Zellen, indem sie zytotoxische Proteine freisetzen: Granzyme, die bei der Zielzelle einen programmierten Zelltod auslösen, das zytolytische Protein Perforin, und Granulysin, das eine antimikrobielle Aktivität besitzt und Apoptose induzieren kann (Henkart, 1985; Heusel et al., 1994). Auch der membranständige Fas-Ligand auf CD8⁺ und einigen CD4⁺T-Zellen kann durch Bindung von Fas-Protein an den Zielzellen eine Apoptose auslösen. Dieser Weg ist bei den meisten Infektionen von geringer Bedeutung (Rouvier et al., 1993). Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen synthetisieren ebenfalls IFN- γ . Es inhibiert die virale Replikation und beeinflusst die Expression von MHC-I-Molekülen sowie die Aktivierung von Makrophagen. Aufgrund dieser Charakteristika kann die zytotoxische T-Zelle präzise infizierte Zelle angreifen und eliminieren (Murphy et al., 2018).

2.3.2 CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺T-Zellen erkennen Antigene, die von MHC-Klasse-II-Proteinen präsentiert werden. Diese MHC-Moleküle werden von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert (Doyle und Strominger, 1987). Sie entwickeln sich zu einer Reihe verschiedener Untergruppen von Effektorzellen: den T-Helferzellen und den regulatorischen T-Zellen. Die T-Helferzellen werden anhand der Zytokin-Produktion weiter in verschiedenen Untergruppen differenziert: T_H1 (T-Helferzelle Typ 1), T_H2, T_H17 und so weiter (Murphy et al., 2018).

- T_H1-Zellen spielen sowohl bei der Abwehr intrazellulärer, verkapselter Bakterien durch Makrophagen, als auch bei der humoralen Immunantwort eine Rolle. Aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle mit den T_H2-Zellen differenzieren sie sich in Anwesenheit von IL-12 unter Einfluss des Transkriptionsfaktors Stat4 (*Signal transducer and activator of transcription 4*) (Gately et al., 1998; Bacon et al., 1995). Die Sekretion von IFN- γ und die Zytokine TNF- β und IL-1 modulieren die Aktivität der Makrophagen (Stout und Bottomly, 1989; Munoz-Fernandez et al., 1992). Darüber hinaus werden aktivierte B-Zellen zur Antikörperproduktion stimuliert und der Antikörper- Klassenwechsel beeinflusst (Snapper und Paul, 1987).
- T_H2-Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 (Mosmann und Sad, 1996) und regulieren dadurch die Antikörperproduktion bei B-Zellen (Croft und Swain, 1991). Die sezernierten Zytokine lösen ein breites Spektrum von Immunreaktionen aus, die für den Schutz des Wirts vor parasitären Infektionen und für die Stimulierung der Reparatur von geschädigtem Gewebe entscheidend sind (Walker und McKenzie, 2018). IL-4 ist ein prädominanter Faktor bei der Entwicklung der T_H2-Zellen. Seine Anwesenheit beeinflusst autokrin den Transkriptionsfaktor Stat6 (Kaplan et al., 1996), der wiederum die Freisetzung von IL-4 verstärkt (Seder und Paul, 1994).

- Die T_H17 -Zellen sind bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten sowie der Beseitigung frei zirkulierender Antigene von Bedeutung und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Sie sind gekennzeichnet durch die Produktion von IL-17, IL-21 und IL-22 (Murphy et al., 2018), (Korn et al., 2009).
- Regulatorische T-Zellen unterstützen die Kontrolle der Immunantworten. Sie verhindern Autoimmunreaktionen und unterdrücken die Aktivität anderer Lymphozyten (Sakaguchi, 2004). Ihre inhibitorische Wirkung vermitteln sie durch die Hemmung von IL-2 (Thornton et al., 2004), die Ausschüttung von TNF- β , IL-4, IL-10 (Chen et al., 1994), sowie durch den Einfluss von CTLA-4 (*cytotoxic T-Lymphocyte associated antigen 4*) (Wing et al., 2008).

2.3.3 Das immunologische Gedächtnis

Die adaptive Immunität ist maßgeblich verantwortlich für die Bildung des immunologischen Gedächtnisses zum Schutz vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger. Das beruht auf die Ausbildung einer Population langlebiger B- und T-Gedächtniszellen. Bei erneutem Kontakt mit demselben Krankheitserreger können die Gedächtniszellen viel rascher als unreife Lymphozyten aktiviert werden und sorgen dafür, dass eine erneute Infektion verhindert wird.

Die Keimzentrumsreaktion ist ein entscheidender Prozess für die Affinitätsreifung der Antikörper. Die B-Zellen, die die Keimzentrumsreaktion überleben, differenzieren sich entweder zu Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen. Plasmazellen sind ausdifferenzierte aktivierte B-Lymphozyten, die große Mengen an Antikörpern produzieren. Eine andere B-Zellpopulation differenziert sich zu B-Gedächtniszellen. Anstelle von Antikörpern produzieren sie Oberflächenimmunglobuline. Bei erneutem Antigenkontakt können sie sich zu Antikörpersezernierenden Plasmazellen differenzieren. Klassische Impfstoffe wirken dadurch, dass sie die Entstehung von B-Gedächtniszellen gegen das Pathogen anregen (Murphy et al., 2018).

$CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Gedächtniszellen überleben die Primärantwort durch Stimulation mit IL-7 und IL-15 und verbleiben im Organismus (Kaech et al., 2003; Becker et al., 2002). Innerhalb der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Gedächtniszellen wird zwischen zentralen Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen und geweberesidenten Gedächtniszellen unterschieden. Die Effektor-T-Gedächtniszellen exprimieren CCR7, CD44 und kein CD62L (L-Selektin). Sie zirkulieren zwischen Blutbahn und Gewebe. Mit Hilfe von Chemokin-Rezeptoren migrieren sie in das infizierte Gewebe und eliminieren eingedrungene Pathogene. Zentrale T-Gedächtniszellen exprimieren CCR7, CD44 und CD62L. Sie sekretieren ausschließlich IL-2 und patrouillieren zwischen Blut und den lymphatischen Organen (Martin und Badovinac, 2018). Gewebsresidente T-Gedächtniszellen befinden sich an Grenzflächen zur Umwelt,

beispielsweise der Haut, Lunge oder im Bereich des Gastrointestinaltrakts. Sie sind durch die Expression der Oberflächenmarker CD69 und CD103 charakterisiert (Schenkel & Masopust, 2014).

2.4 Das Influenzavirus

2.4.1 Struktur des Influenzavirus und die Entstehung neuer Virussubtypen

Influenzaviren lösen weltweit das Krankheitsbild der Influenza oder der „jährlichen Grippe“ aus. Sie gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Diese sind RNA-Viren mit negativsträngigem, segmentiertem Genom. Es werden drei verschiedene Serotypen A, B, und C differenziert. Davon haben die Influenza-A-Viren die höchste Pathogenität. Influenza-B-Virus-Infektionen unterscheiden sich klinisch nicht von denen der Influenza-A-Viren, während Influenza-C-Virus-Infektionen sehr mild verlaufen. Auf der Lipidhülle des Virus sind zwei weitere Proteine lokalisiert, das Hämagglutinin und die Neuraminidase, die von großer Bedeutung für die Epidemiologie des Virus sind. Die Struktur des Influenzavirus ist in Abbildung 3 gezeigt. Da das Hämagglutinin und die Neuraminidase auf verschiedenen RNA-Molekülen kodiert sind, können sie bei Doppelinfektionen mit zwei verschiedenen Virustypen im gleichen Wirt untereinander getauscht werden. Dieser Vorgang wird als *Reassortment* bezeichnet und führt zu einer erheblichen Variabilität bei den Influenzaviren. Daraus resultieren die verschiedenen Virussubtypen (Hof, 2019).

Bei den Influenza-A-Viren unterscheidet man 16 verschiedene Hämagglutinine (H1 bis H16) und 9 Neuraminidasen (N1 bis N9). Influenza-A-Viren infizieren neben den Menschen auch zahlreiche Tierarten, vor allem Vögel, und bilden deshalb besonders viele Varianten durch *Reassortment*. Die Entstehung neuer Virussubtypen durch Neukombinationen der Hämagglutinin und der Neuraminidase wird als Antigen-Shift bezeichnet und ist für den Menschen eine latente, aber ernsthafte Bedrohung, wenn dadurch neue Virusvarianten mit erhöhter Pathogenität entstehen (Hof, 2019). Jahrhundertlang haben verschiedene Influenza-Subtypen weit verbreitete Pandemien mit schwerwiegenden Folgen für die Gesellschaft hervorgerufen. Die durch die Globalisierung bedingten sozialen und wirtschaftlichen Veränderungen in den letzten Jahrzehnten haben die Verbreitung neuer Influenza-Subtypen begünstigt (Saunders und Krewski, 2016). Beispiele dafür aus dem letzten Jahrhundert sind die „spanische Grippe“ H1N1 (1918), die „asiatische Grippe“ H2N2 (1957), die „Hong-Kong-Grippe“ H3N2 (1968) und die Schweinegrippe H1N1neu im Jahr 2009. Heute stellt vor allem ein aviäres Influenzavirus (Vogelgrippevirus, Variante H5N1) ein ernstes Bedrohungsszenario dar (Hof, 2019). Zusätzlich führt die mangelnde Präzision der virusspezifischen RNA-Polymerase zu Punktmutationen innerhalb der Hämagglutinin- und

Neuraminidase Gene, was als Antigen-Drift bezeichnet wird. Während der Antigen-Shift für die großen Grippepandemien verantwortlich ist, ist der Antigen-Drift für kleine Grippeepidemien ursächlich, die in einem Abstand von 2-3 Jahren auftreten (Hof, 2019).

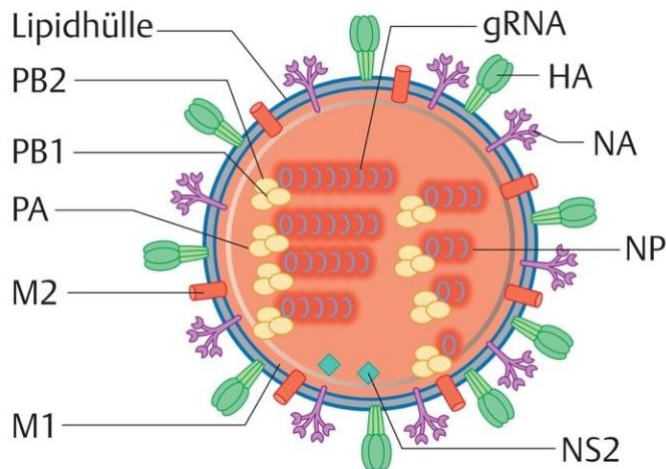


Abbildung 3. Struktur des Influenzavirus (Orthomyxoviridae). „Das Genom des Influenzavirus besteht aus 8 einzelsträngigen RNA-Elementen (gRNA), die mit dem Nukleoprotein (NP) verpackt sind. Mit jedem Segment ist der Polymerasekomplex (PA, PB1, PB2) assoziiert, der für die Transkription und Replikation der Gensegmente zuständig ist. Im Virus sind auch noch wenige Kopien des NS 2-Proteins verpackt, das beim Transport der viralen Nukleokapside aus dem Zellkern eine Rolle spielt. Die innere Lipidschicht ist mit dem Matrixprotein M1 ausgekleidet. In der Hülle befindet sich ein weiteres Matrixprotein M2, das eine Kanalfunktion für Ionen und hier insbesondere von H⁺-Ionen zur Verfügung stellt. Weiterhin befinden sich in der Hülle Trimere des Hämagglutinins (HA), die zur Adsorption des Virus an seinen zellulären Rezeptor und nach proteolytischer Spaltung für die Fusion der viralen Hülle mit der endosomalen Membran notwendig sind. Schließlich sind in der Hülle noch Tetramere des Enzyms Neuraminidase (NA) eingelagert. Dieses Enzym kann zelluläre Rezeptoren für das Virus zerstören. Er verhindert vermutlich, dass das von der Zelle knospende Viruspartikel sofort wieder an dem zellulären Rezeptor gebunden werden“. (Abbildung von Hof 2019, Seite 242)

2.4.2 Epidemiologie und Klinik

Aufgrund ihrer hohen Inzidenz und Mortalität ist die Influenza eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten (Herold, 2021). Das Influenzavirus verursacht weltweit jährlich saisonale Epidemien mit bis zu 650.000 Todesopfer (WHO Fact Sheet, 2018), während pandemische Ausbrüche mit einer viel höheren Sterblichkeit verbunden sind (WHO News, 2021; RKI, 2015). Insbesondere im Rahmen von Pandemien hat sie bereits Millionen Menschen weltweit das Leben gekostet (WHO News, 2021). Das unterstreicht die Wichtigkeit neuer Impfstrategien und Maßnahmen zur Begegnung zukünftiger Pandemien. Die Übertragung erfolgt aerogen als Tröpfcheninfektion durch das nasopharyngeale Sekret infizierter Individuen. Das Symptomspektrum variiert von klinisch inapparenten Verläufen mit milden Erkältungszeichen bis zu schweren Pneumonien. Nach einer Inkubationszeit von 1 - 4 Tagen kommt es zu ersten klinischen Symptomen, u. a. Fieber bis 41°C, Rhinitis, Pharyngitis, Kopf-, Glieder- und Muskelschmerzen, Übelkeit und Appetitlosigkeit. Die Krankheitsdauer ohne Komplikationen beträgt ca. eine Woche (Herold, 2021). Eine Beteiligung der unteren Atemwege ist prognostisch sehr ungünstig, wenn es sich dabei um eine primäre Influenza-A- Pneumonie handelt. Bei schweren Verlaufsformen können auch die inneren Organe oder das

ZNS betroffen sein (Hof, 2019). Zu den Risikogruppen für schwere Influenza-Verläufe gehören ältere Menschen, Schwangere, Kleinkinder, Menschen mit chronischen Erkrankungen und Immungeschwächte (*WHO Weekly epidemiological Record*, 2022). Ältere Erwachsene, mit chronischen Erkrankungen und/oder Gebrechlichkeit (*frailty*) sind sehr anfällig für schwere Folgen der Influenza. Die sechs häufigsten Ursachen für Komorbiditäten bei Senioren, darunter Schlaganfall, kongestive Herzinsuffizienz, Lungenentzündung, ischämische Herzkrankheit, Krebs und Hüftfrakturen, wurden ebenfalls mit einer Influenza-Erkrankung in Verbindung gebracht. Weiterhin erleiden 15 % der älteren Erwachsenen mit einer im Labor bestätigten Influenza eine Behinderung mit einem Verlust der Unabhängigkeit bei mehr als zwei grundlegenden Selbstpflegeaktivitäten (McElhaney, 2020). Tatsächlich sind akute Infektionskrankheiten für 76 % aller pflegebedürftigen Lebensjahre verantwortlich; 30% davon sind auf Influenza zurückzuführen (Cassini et al., 2018). Somit erzeugen Influenza-Epidemien und -Pandemien eine schwere sozioökonomische Last für die ganze Gesellschaft (Gasparini et al., 2012).

2.5 Impfungen

Die Einführung von Schutzimpfungen und die Verbesserung der Hygiene gehören zu den wichtigsten medizinischen Maßnahmen in den letzten 100 Jahren. Sie haben dazu beigetragen, die Anzahl der Todesfälle aufgrund von Infektionen zu verringern und die Lebenszeit der Menschen deutlich zu verlängern (Eckart, 2007). Unter Impfung versteht man die Stimulation einer Immunantwort durch die Gabe eines Antigens, mit dem Ziel, einen langanhaltenden Schutz gegen einen bestimmten Krankheitserreger herbeizuführen (Murphy et al., 2018). Man unterscheidet zwischen aktiver und passiver Immunisierung. Unter aktiver Immunisierung versteht man das Auslösen einer Immunreaktion durch die Verabreichung von attenuierten Pathogenen oder deren Antigenen. Diese Art der Immunisierung kann zu einem immunologischen Gedächtnis führen. Die Dosis und die Verabreichungsform sind entscheidend für die Stärke der Immunantwort. Eine passive Immunisierung umfasst die Verabreichung eines Antiserums oder aufgereinigter Antikörper. Der Schutz tritt zwar sofort ein, es kommt jedoch nicht zu einer längerfristigen Immunität, weil die verabreichten Immunglobuline vom Körper abgebaut werden (Hof, 2019).

Die erste Herangehensweise zur Entwicklung von Impfstoffen basierte auf attenuierten Organismen mit verringerter Pathogenität, die zwar keine Krankheit verursachen sollten, aber zur Immunität gegen dem jeweiligen Pathogen führen. Andere Herangehensweisen beruhen auf abgetöteten Organismen oder von deren gereinigten Komponenten. Im Allgemeinen sind Impfungen mit attenuierten Lebendimpfstoffen besser wirksam, weil sie die Immunantwort

durch tatsächliche Infektionen imitieren und dadurch eine größere Zahl wichtiger Effektor-Mechanismen, einschließlich CD4⁺ und zytotoxischer CD8⁺T-Zellen, stimulieren (Murphy et al., 2018). Abgetötete Impfstoffe wurden bevorzugt, da jeder Lebendimpfstoff ähnliche Beschwerden wie die Krankheit selbst auslösen kann und insbesondere bei immunsupprimierten Personen eine tödlich verlaufende systemische Infektion hervorrufen kann (Hof, 2019).

Aufgrund dieser Nachteile hat die alternative Impfstoffentwicklung das Ziel, weder Organismen in abgetöteter noch in attenuierter Form für die Immunisierung zu nutzen. Die Entwicklung wirksamer zellfreier Impfstoffe war aus mehreren Gründen eine Herausforderung. Einzelne Fremdproteine oder isolierte Bestandteile von Mikroorganismen rufen keine Immunreaktion hervor. Sie lösen bei den antigenpräsentierenden Zellen keine kostimulierende Aktivität aus. Zusätzlich ist für die Erzeugung einer effektiven Immunantwort die Beteiligung vieler verschiedener Zelltypen erforderlich. Diese Probleme sollen durch die Entwicklung von Konjugatimpfstoffen, bei denen gereinigte Antigene miteinander verknüpft sind, gelöst werden. Zur Verbesserung der Wirksamkeit, wurden mehrere Antigene simultan verabreicht und mit Adjuvantien versetzt. Adjuvantien stellen eine Gruppe von Substanzen dar, die in Impfstoffen inkorporiert werden, um die immunologische Reaktion auf den Impfstoff zu potenzieren. Ihre primäre Funktion besteht darin, die Effektivität des Impfstoffs zu steigern, indem sie die Immunantwort des Organismus auf das im Impfstoff enthaltene Antigen verstärken oder modulieren. Die Wirkung besteht darin, dass sie die angeborenen Sensorsignalwege für Viren und Bakterien bei den APCs aktivieren. Das geschieht über TLRs und Proteine aus der Familie der NOD-like-Rezeptoren. Dadurch werden die APCs aktiviert und lösen eine adaptive Immunantwort aus. Als Adjuvantien dienen u.a. bakterielle Bestandteile, die die essenzielle kostimulierende Aktivität in APCs induzieren. Auch die Kombination mit Liganden, die TLRs oder andere Sensoren der angeborenen Immunität aktivieren, hat eine ähnliche Wirkung. Diese Methoden unterstützen den Verlauf tatsächlicher Infektionen zu imitieren. T-Zell-Peptidpitope können ebenfalls einen Immunschutz herbeiführen; sie erfordern jedoch ebenfalls Adjuvantien und müssen auf geeignete Zellen und Zellkompartimente ausgerichtet sein (Murphy et al., 2018).

2.5.1 Zugelassene Impfstoffe gegen Influenza

Gegen Influenza sind derzeit verschiedene Impfstoffe zahlreicher Hersteller erhältlich. Die Ständige Impfkommission (STIKO) empfiehlt die Influenza-Impfung für Personen ab 60 Jahre, Schwangere ab dem 2. Trimenon, Personen mit erhöhter gesundheitlicher Gefährdung infolge eines Grundleidens und für medizinisches Personal. Alle Impfstoffe werden jährlich angepasst und enthalten die von der WHO festgelegten Antigene (RKI.de, Link 1).

Derzeit gibt es drei Varianten von Grippeimpfstoffen (inaktivierte, attenuierte und rekombinante), die für verschiedene Bevölkerungsgruppen bestimmt sind (Mohn und Zhou, 2018). Bei den meisten in Deutschland zugelassenen Influenza-Impfstoffen handelt es sich um Totimpfstoffe. Totimpfstoffe enthalten inaktivierte Viren bzw. Bestandteile davon. Spaltvakzine werden bevorzugt. Ganze Influenzaviren in Totimpfstoffen können auch Lipide aus der Membran der Wirtszelle (meist Hühnerzellen) aufweisen, die anaphylaktischen Reaktionen verursachen könnten. Spaltvakzine enthalten Hämagglutinin und Neuraminidase, die aus Viruspartikeln gereinigt werden (Hof, 2019). Die STIKO empfiehlt generell die Impfung mit einem quadrivalenten Influenzaimpfstoff, der Schutz gegen 4 verschiedene Virussubtypen bietet. Sie enthalten Bestandteile von 2 Subtypen der Influenza A-Viruslinie sowie 2 Subtypen der Influenza B-Viruslinie (RKI-Epidemiologisches Bulletin 2/2018). Für ältere Menschen gibt es angepasste Impfstoffe, die eine höhere Menge an Antigenen oder Adjuvantien enthalten, um eine starke Immunantwort und somit eine bessere Wirksamkeit zu erreichen (RKI.de, Link 1). Neben der B-Zell-vermittelten humoralen Immunität ist auch die antigenspezifische T-Zell-Antwort für eine wirksame Immunität gegen Influenzavirusinfektionen essenziell. Totimpfstoffe erzeugen durch Aktivierung von B-Lymphozyten und T-Helferzellen ausschließlich eine humorale Immunität. Im Gegensatz zur Lebendimpfung erfolgt keine Stimulierung von CD8⁺T-Lymphozyten und damit auch keine zellvermittelte Immunität (Dutta et al., 2016).

Für Kinder im Alter von zwei bis einschließlich 17 Jahren ist zusätzlich ein Lebendimpfstoff (*Live Attenuated Influenza Vaccine, LAIV*) zugelassen, der als Nasenspray verabreicht wird (RKI.de, Link 1). Der Lebendimpfstoff besteht aus gentechnisch hergestellten Temperaturmutanten von Influenza A (H1N1, H3N2) und B. Temperaturmutanten sind ungefährlich, weil sie nur in der Nasenschleimhaut, aber nicht bei 37°C replizieren können (Hof, 2019). Eine intranasale Impfung führt zu einer besseren Immunität als eine intramuskuläre Injektion, weil sie eine natürliche Infektion imitiert. Somit erzeugen intranasale Impfungen neben einer lokalen Immunität der Nasenschleimhaut auch eine systemische Immunität (Hasegawa et al., 2007; Alsharifi et al., 2009; Hof, 2019). Ein Nachteil von Lebendimpfstoffen besteht darin, dass ihre Anwendung ein sehr potentes Immunsystem bei dem Patienten voraussetzt, denn im Falle einer Immunschwäche könnten sich die attenuierten Viren vermehren und eine schwere Infektion auslösen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Rückmutation mit der Folge, dass die wenig gefährlichen attenuierten Varianten wieder virulent und für jeden Menschen gefährlich werden könnten. Weiterhin sollte bedacht werden, dass bei einer Doppelinfektion mit einem nicht-menschlichen und einem menschlichen Stamm (wild oder attenuiert) eine neue Variante mit Pandemiepotenzial entstehen könnte (Beyer et al., 2002).

2.5.2 Einschränkungen derzeitiger Influenza-Impfstoffe

Trotz der bisherigen Fortschritte in der Impfstoffforschung sind Infektionskrankheiten der unteren Atemwege nach der ischämischen Herzerkrankung, dem Schlaganfall und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung weltweit die vierthäufigste Todesursache (WHO, 2020). Unter anderem gehören Influenza-Pandemien zu den 10 größten Bedrohungen für die öffentliche Gesundheit (WHO, 2019).

Eine Schwierigkeit besteht darin, dass derzeit verfügbare Formulierungen insbesondere die Verwendung des Impfstoffs in Ländern mit hohem Einkommen begünstigen (Lambach et al., 2015; Palache et al., 2017). Der Einsatz von Influenza-Impfstoffen konzentriert sich nach wie vor auf die reichsten Länder (Ortiz et al., 2016; Palache et al., 2017), obwohl von der Influenza-Krankheit insbesondere Länder mit niedrigem und mittlerem Einkommen stärker betroffen sind (GBD, 2017; Iuliano et al., 2018; Nair et al. 2011). Etwa 50 % der Weltbevölkerung verfügen über nur 5 % der Grippeimpfstoffdosen (Palache et al., 2014). Das bedeutet, dass die meisten Länder unzureichend auf eine globale Grippepandemie vorbereitet sind. Diese Ungleichheiten beruhen auf technischen und ökonomischen Problemen. So können beispielsweise schon die Kosten für Lagerung, Verteilung und Verabreichung die Anwendung von Impfstoffen in den ärmeren Ländern der Welt erheblich beeinträchtigen (Murphy et al., 2018). In Ländern mit mittlerem Einkommen lassen sich keine Schlussfolgerungen zur Kosteneffizienz derzeitiger Grippeimpfstoffe ziehen, während Belege für die Kosteneffizienz aus Ländern mit niedrigem Einkommen gänzlich fehlen (Ott et al., 2013).

Die Wirksamkeit heutiger Grippeimpfstoffe unterliegt bestimmten Einschränkungen (Keshavarz et al., 2019). Die Immunantwort zur Bekämpfung von Virusinfektionen umfasst alle Bereiche der adaptiven Immunität. Zum einen unterstützen die $CD4^+T_H1$ -Zellen die Produktion virusspezifischer Antikörper. Zum anderen werden $CD8^+$ T-Zellen aktiviert, die virusinfizierte Zellen töten und $IFN-\gamma$ produzieren. Das Komplementsystem wird zusätzlich aktiviert und kann verkapselte Viren eliminieren. Antikörper können die Infektion einer Zelle durch Neutralisierung der Viren gleich zu Beginn verhindern (Klasse, 2014). Die zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen tragen dazu bei, bereits infizierte Zellen zu töten und ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln (Henkart, 1985; Heusel et al., 1994). Eine der wichtigsten Einschränkungen heutiger Influenza-Impfstoffe besteht darin, dass $CD8^+$ T-Zellen, die zur Beseitigung des Virus aus der Lunge notwendig sind, nicht effektiv stimuliert werden (McElhaney et al., 2020). Die Immunisierung entsteht bei den meisten heutigen Impfstoffen dadurch, dass die $CD4^+$ T-Zellen und die Antikörperbildung angeregt werden. Daher bleibt die Entwicklung neuer, verbesserter Impfstoffe ein wichtiges Ziel der Grippeimpfstoffforschung.

Trotz der neuen Fortschritte bei der Entwicklung von Impfstoffen, weit verbreiteter Grippeimpfprogramme und hoher Impfquoten in der älteren Bevölkerung, gibt es nach wie vor

erhebliche Herausforderungen bei der Entwicklung wirksamerer Influenza-Impfstoffe, insbesondere mit Blick auf die Vorbeugung schwerwiegender Komplikationen bei älteren immungeschwächten Erwachsenen (McElhaney et al., 2020). Bei geimpften Patienten kann das Virus eine schwere Infektion, insbesondere bei Senioren, verursachen (Alsharifi et al., 2009; Jefferson et al., 2012; Simpson et al. 2015). Neunzigprozent der Mortalität durch eine Influenza-Erkrankung pro Jahr entfällt auf ältere Menschen (Thompson et al., 2003; Thompson et al., 2004). Außerdem ist die Dauer der Krankenhausaufenthalte von älteren Erwachsenen fast dreimal so hoch wie bei 50- bis 64-Jährigen und sechsmal so hoch wie bei jüngeren Erwachsenen (Molinari et al., 2007). Aufgrund von Immunoseneszenz oder eingeschränkter Immunfunktion sprechen die Personen in Hochrisikopopulationen nicht ausreichend auf die Influenza-Impfung an (Kunisaki und Janoff, 2009). Das kann ggf. auf altersbedingte Veränderungen in der Funktion der B- und T-Zellen zurückgeführt werden (Nikolich, 2018; Goronzy, 2019; Dugan et al., 2020).

2.5.3 Der aktuelle Stand der Impfstoffforschung

Eine sterilisierende Immunität ist ein Immunstatus, bei dem die Immunreaktion des Wirtes sowohl eine wirksame Virusinfektion als auch die Krankheit verhindert. Sie ist deswegen das Ziel einer optimalen Influenza-Impfung. Unter anderem ist eine effiziente lokale antigenspezifische T-Zell-Reaktion in der Lunge erforderlich, um eine sterilisierende Immunität zu bilden (Dutta et al., 2016). Wenn Antikörper eine Influenza-Infektion nicht verhindern können, kommen zellvermittelte Immunmechanismen ins Spiel, um das Virus aus den infizierten Wirtszellen zu beseitigen und die Komplikationen der Influenza zu verhindern (McElhaney et al., 2020). Daher besteht das Ziel bei der Impfstoffentwicklung eine optimierte T-Zell-Antwort mit besserer Wirksamkeit zu etablieren.

Neben den Neutralisationsantikörper und der zytotoxischen T-Zell-Reaktion ist ein weiterer kritischer Faktor für die Influenza-Immunität die Art der Verabreichung. Bei Tierversuchen löste nur die intranasale Inokulation attenuierter Viren (*Live attenuated Influenza Vaccine*, LAIV) eine sterilisierende Immunität aus, während die intramuskuläre Injektion diesen Effekt nicht induzierte (Dutta et al, 2016). Die intranasale Inokulation löste u. a. eine antigenspezifische T-Zell-Aktivierung in der Lunge aus, die für eine vollständige Blockade einer erneuten Infektion mit demselben Influenzavirusstamm grundlegend ist. In ähnlicher Weise verleihen LAIV-Impfstoffe in Form von Nasenspray eine bessere Schutzwirkung mit einer verstärkten T-Zell-Reaktion in den Atemwegen (Dutta et al., 2016). Im Gegensatz zu parenteralen Impfstoffen, die nur systemische Immunantworten hervorrufen, induzieren intranasale Impfstoffe sowohl systemische als auch mukosale Immunantworten. LAIV-Impfstoffe können ebenfalls eine Immunität gegen heterologe Virusstämme vermitteln, möglicherweise durch mukosale IgA oder zytotoxische T-Lymphozyten. Sie sind sehr wirksam bei der Auslösung von Immunantworten bei Kindern und jungen Erwachsenen. Bei älteren Menschen ist eine

intranasale LAIV-Impfung jedoch nicht wirksamer als eine intramuskuläre Impfung (Cox et al., 2004; Amorij et al., 2010).

Die Lunge stellt durch ihre starke Vaskularisierung, ihre große Adsorptionsfläche und durch das bronchoalveoläre lymphatische Gewebe einen attraktiven Zielort zur Impfung dar (Johnson, 2010; Groneberg und Paul, 2006; Holmgren und Czerkinsky, 2005). Der pulmonale Weg für die Impfung gegen Influenza wurde in verschiedenen präklinischen Studien untersucht. Diese Studien zeigen, dass die pulmonale Immunisierung wirksamer als die intranasale Immunisierung ist und mit einer geringen Antigenmenge in Kombination mit einem starken Adjuvans durchgeführt werden kann (Minne et al., 2007; Smith et al., 2003; Wee et al., 2008). Das größte Risiko der pulmonalen Influenza-Impfung ist die Verschlimmerung von Atemwegserkrankungen wie COPD, allergisches Asthma oder Pneumonie (Lu und Hickey, 2007). Ein alternativer Verabreichungsweg wäre die orale Gabe des Antigens. Trotz jahrelanger Forschung zur oralen Grippeimpfung gibt es keine überzeugenden Daten. Bisher ist die intranasale Impfung der einzige Ansatz für die Schleimhautimpfung, der erfolgreich eingesetzt wurde (Amorij et al., 2010).

Epikutane, dermale und mukosale Immunisierungsstrategien stellen nicht-invasive Methoden dar. Durch die nadelfreie Applikation wird Nadelphobien entgegengewirkt, was die Impfakzeptanz verbessern könnte (Kersten und Hirschberg, 2007; Ekwueme et al., 2002). Nadelstichverletzungen werden vermieden und somit Folgeinfektionen unterbunden. Durch ihre einfache und sichere Anwendung sind sie potenziell für eine Selbstapplikation und für den Einsatz für Massenimpfprogramme geeignet, was den Bedarf an medizinisch ausgebildetem Personal reduziert. Neben der Wirksamkeit betreffen die Einschränkungen derzeitiger Impfstoffe auch die Verfügbarkeit und die Logistik (Soema et al., 2015). Die Impfstofflogistik kann durch die Verwendung von Trockenimpfstoffformulierungen weiter vereinfacht werden, die keine Kühlkette bedürfen. Das könnte die Impfquote in Entwicklungsländern deutlich verbessern (Amorij et al., 2008). In einer Studie von Sendi und Kollegen entschieden sich 1552 (97 %) von 1600 Teilnehmern für ein intranasales Impfstoffspray, wenn sie die Wahl zwischen dem Spray und einer intramuskulären Injektion hatten. Außerdem sind nadelfreie Impfstoffe potenziell besser wirksam. Intramuskuläre Impfstoffe, die nur systemische IgG-Antworten hervorrufen, schützen vor schweren Komplikationen der Influenza, aber nicht unbedingt vor frühen Symptomen. Zusätzlich zu Serum-IgG können Impfstoffe, die über die Schleimhäute verabreicht werden, auch lokale IgA-Reaktionen in den oberen Atemwegen auslösen, die das Virus am Eintrittspunkt neutralisieren können. IgA ist kreuzreaktiver als IgG und kann einen Schutz gegen Drift- und sogar Shift-Virusvarianten bieten (Asahi et al. 2004; Hasegawa et al., 2005; Ichinohe et al., 2007).

Eine andere Möglichkeit zur Impfstoffverbesserung wäre die Herstellung neuartiger Impfstoffe, die gezielt die T-Zellen aktivieren. Ein neuartiges Impfstoffkonzept, das auf der Induktion von Influenza-spezifischen T-Zellen (gerichtet gegen MVA-NP und M1) beruht, verringerte die Symptome und die Virusausscheidung bei Influenza-Infizierten (Lillie et al., 2012). Der größte Vorteil besteht darin, dass zelluläre Immunantworten eine wichtige Bedeutung für die kreuzprotektive Immunantwort gegen das Influenzavirus aufweisen (Soema et al., 2015 a). Die meisten hochkonservierten T-Zell-Epitope befinden sich auf internen Influenza-Proteinen, wie dem Nukleoprotein (NP), Matrix-Protein 1 (M1) oder den Polymerase-Untereinheiten (PA, PB1 und PB2). Verschiedene Formulierungsstrategien können helfen die Immunogenität dieser Antigene zu verbessern und dadurch eine effiziente T-Zell-Antwort zu induzieren (Soema et al., 2015 b). Das könnte potenziell zur Entwicklung kreuzprotektiver Impfstoffe führen.

Peptide können ebenfalls zur Induktion Influenza spezifischer Reaktionen (insbesondere T-Zell-Reaktionen) gegen konservierte Epitope verwendet werden (Taneichi et al., 2010). Sie sind somit vielversprechende Influenza-Antigene. Die Formulierung dieser Antigene bleibt aber nach wie vor eine Herausforderung. Trotzdem haben bisher einige Ansätze vielversprechende Ergebnisse gezeigt (Soema et al., 2015 b). Die Peptidantigene sind stabiler und müssen posttranslational nicht modifiziert werden, was möglicherweise die Kosten für Lagerung und Verteilung des Impfstoffs senken könnte (Soema et al., 2015 b). Peptidantigene unterscheiden sich im Hinblick auf das Herstellungsverfahren grundlegend von den zuvor genannten Proteinantigenen. Kurze bis mittellange Peptide, die keine spezifische Faltung erfordern, können schnell chemisch synthetisiert und müssen nicht biologisch hergestellt werden. Die mit der Verwendung biologischer Systeme verbundenen Risiken und Kosten könnten so vermieden werden (Bray, 2003). Zur Verstärkung der Immunogenität werden die meisten Peptidantigene zusätzlich mit Adjuvantien oder anderen Verabreichungssystemen formuliert. Das macht den Produktionsprozess komplizierter und zeitaufwendiger. Die Etablierung neuer wirksamer Adjuvantien könnte die Wirksamkeit in den gefährdeten Risiko- Gruppen deutlich verbessern. Der Zusatz von Adjuvantien unterstützt zusätzlich dabei, die Reaktion auf die zelluläre Immunreaktion zu lenken. Die Entwicklung geeigneter Adjuvantien für Influenza-Vakzine ist daher zwingend erforderlich. Die derzeit verwendeten Adjuvantien umfassen Aluminium-Salze, verschiedene Öl-in-Wasser-Emulsionen, Liposomen, Saponinen, Glykolipide, bakterielle Komponenten, Zytokine und Immunmodulatoren, wie z. B. TLR-Agonisten. Eine andere Option wäre die Kombination von Universalimpfstoffen mit den aktuellen saisonalen Impfstoffen, um die Immunantwort zu erweitern (Soema et al., 2015 b).

Die hohe Mortalität und die weltweite Ausbreitung der Krankheit machen deutlich, dass konventionelle Immunisierungskonzepte neu definiert und wirksame Massenimpfungsstrategien entwickelt werden müssen (Skountzou et al., 2006). Angesichts

der Tatsache, dass Influenzaviren mit Pandemiepotential jederzeit auftauchen könnten (WHO News, 21 Mai 2021), besteht ein dringender Bedarf für einen neuen, verbesserten Impfstoff.

2.5.3.1 Transkutane Impfungen gegen Influenza

„Die transkutane Immunisierung (TCI) ist eine neue Impfmethode, bei der ein Adjuvans und ein Impfstoffantigen auf die intakte Haut aufgetragen werden, um eine Immunreaktion hervorzurufen“ (Glenn et al., 1998). Als topische Applikationsmethode bietet die TCI mehrere Vorteile: die nadelfreie Verabreichung und die gezielte Ansprache Antigen-präsentierender Zellen (APCs) in der Haut (Glenn et al., 2000). Diese nadelfreie Methode der Impfstoffverabreichung könnte das Risiko von durch Nadeln übertragenen Krankheiten verringern, das Problem der Nadelphobie vermeiden, die Akzeptanz der Bevölkerung verbessern und den Zugang zur Impfung verbessern, da kein geschultes Personal und keine sterile Ausrüstung mehr nötig wären (Glenn et al., 1999). Nadelphobie führt bei 16 % der erwachsenen Patienten und 8 % des Gesundheitspersonals zur Ablehnung der Influenza-Impfung (McLenon und Rogers, 2018). Aus diesen Gründen könnte eine transkutane Impfmethode die Compliance der Bevölkerung deutlich erhöhen.

Um den Wirkmechanismus einer TCI zu verstehen, ist die anatomische Betrachtung der Haut notwendig. Die Haut ist unser größtes Organ und dient als Barriere, die den Organismus vor Pathogenen und äußeren Reizen schützt. Als Teil vom angeborenem Immunsystem stellt das Körperoberflächenepithel einen spezialisierten physikalischen und chemischen Schutz dar. Zusätzlich bilden eine Reihe von Immunzellen ein immunologisches Netzwerk, um Pathogene zu erkennen und abzuwehren. Man unterteilt die Haut in drei Schichten, die *Epidermis*, *Dermis* und die *Subkutis*, die versorgende Gefäße und Nerven führt. Die Epidermis besteht aus mehreren Schichten von Keratinozyten, unterteilt in das *Stratum corneum*, *lucidum*, *granulosum*, *spinosum* und *basale* (Abb. 4). Die Epithelzellen sind durch *Tight Junctions* miteinander verbunden, was den mechanischen Schutz bildet. Die Hornhautschicht besteht aus abgestorbenen Keratinozyten, die sich in keratinreiche, lipoproteinreiche Hüllen und Lipiddoppelschichten verwandelt haben. Die Intrazellularräume sind hydrophile Bereiche. Die Keratinozyten vom *Stratum spinosum* produzieren β -Defensine und Cathelicidine, die antimikrobielle Aktivität haben und in den Intrazellularraum freigesetzt werden. Als immunologische Wächter findet man in dem *Stratum basale* eine Vielzahl an DCs. Die *Dermis* besteht größtenteils aus Fibroblasten und verleiht der Haut so die nötige Stabilität und Elastizität. Hier ist das *Skin Associated Lymphocyte Tissue* (SALT) mit dendritischen Zellen, Makrophagen, Mastzellen und naiven Lymphozyten situiert. Sie regulieren Inflammation und Toleranz durch Interaktion mit der adaptiven Immunabwehr (Tay et al. 2013).

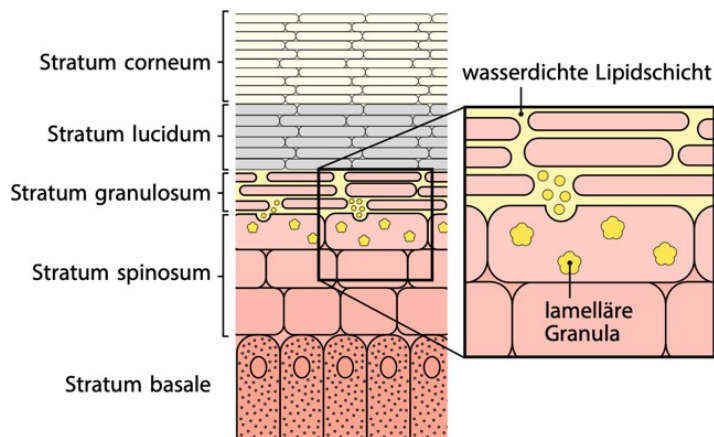


Abbildung 4. Schichten der Epidermis. (Abbildung von Murphy et al., 2018)

2.5.3.2 Applikationsmethoden zur trans- und intradermalen Immunisierung

Die Anwesenheit von APCs macht die Haut sehr attraktiv für Immunisierungen (Amorij et al., 2010). Das *Stratum corneum* als natürliche Barriere verhindert allerdings das Eindringen von Fremdmolekülen über 500 Da. Wenn das *Stratum corneum* durchdrungen ist, können Antigene mit einer Größe von bis zu 1×10^6 die tieferen Schichten erreichen (Glenn und Kenney, 2006). Daher haben sich die ersten Forschungsbemühungen auf die Entwicklung von Impfmethode konzentriert, die die Verabreichung von Impfstoffen durch das *Stratum corneum* ermöglichen (Abb. 5) (Mitragotri, 2005).

Herkömmliche Nadeln wurden in mehreren klinischen Studien zur intradermalen Injektion mehrerer Impfstoffe getestet. Diese Studien haben gezeigt, dass bei intradermalen Immunisierungen eine niedrigere Dosis (zwei Drittel bis ein Fünftel der normalen Dosis) notwendig ist, um die gleiche Wirksamkeit im Vergleich zu intramuskulären Volldosisimpfstoffen zu erreichen (Amorij et al., 2010). Der Nachteil besteht darin, dass die intradermale Verabreichung von Impfstoffen mit herkömmlichen Nadeln technisch anspruchsvoll und korrespondierend nicht für Massenimpfungen geeignet ist (Hunsaker und Perino, 2001). Speziell dafür entwickelte Geräte, die eine kontrollierte Eindringtiefe ermöglichen, würden dieses Problem umgehen (Vandervoort und Ludwig, 2008). Diese Methode ist auch für Influenzaimpfungen geeignet (Alarcon et al., 2007). In Europa wurde ein intradermaler Grippeimpfstoff mit einem derartigen Gerät der Firma BD Soluvia von der Europäischen Arzneimittelagentur zugelassen (EMA 2010).

Einen weiteren Ansatz zur intradermalen Verabreichung von Impfstoffen bietet die Verwendung von Arrays aus spitzen Mikronadeln (25 - 50 μm), die das *Stratum corneum* durchdringen können. Die Arrays zielen auf Langerhans-Zellen in der Epidermis ab. Sie treffen

nicht auf Nerven im darunterliegenden Gewebe und verursachen deshalb keine Schmerzen. (Mikszta et al., 2002; McAllister et al., 2003). Sie bieten ebenfalls die Möglichkeit der Dosisreduktion (Van Damme et al., 2009). Die einfachere Anwendung im Vergleich zu den oben genannten Geräten würde die Verabreichung des Impfstoffs auch von Personen mit geringer medizinischer Ausbildung ermöglichen (Giudice und Campbell, 2006). In einer Studie von Van Damme et al. hat die Impfung gegen Influenza-Hämagglutinin mit dieser Methode eine gleichwertig starke Immunantwort wie die intramuskuläre Impfung mit einer zweifach höheren Dosis ausgelöst (Van Damme et al., 2009).

Eine alternative Möglichkeit der Impfstoffapplikation stellen Jet-Injektoren dar. Diese Methode eignet sich besonders für Massenimpfungen. Die Immunisierung erfolgt in vergleichbarer Wirksamkeit wie mit konventionellen Applikationsformen (z.B. *i.m.*). Aufgrund eines geringen Risikos einer Kreuzkontamination von durch Blut übertragbaren Infektionen hat diese Methode jedoch bislang keine breite Anwendung gefunden (Baxter und Mitragotri, 2006; Mitragotri, 2006; Jackson et al., 2001). Trockenimpfstoffformulierungen erfordern andere Verabreichungssysteme. Ein Düseninjektor für Pulver, der PowderJect, beschleunigt Pulverpartikel, damit diese das *Stratum corneum* durchdringen können (Sarphe et al., 1997; Chen et al., 2000). In einer Phase-1-Studie erwies sich ein pulverförmiger trivalenter Influenzaimpfstoff als sicher und führte zu ähnlichen Serokonversionsraten wie intramuskuläre Standardimpfstoffe (Dean und Chen, 2004). Die Herstellung von Pulvern mit geeigneten physikalischen Eigenschaften ist eine Herausforderung. Daher sind weitere klinische Studien notwendig, um die Wirksamkeit und Sicherheit von Trockenimpfstoffformulierungen zu belegen (Amorij et al., 2010).

Elektroporation und Iontophorese sind physikalische Methoden, die auf der Applikation elektrischer Spannung auf der Haut basieren, was die Penetration der Haut verbessert (Bernardi et al., 2016). Die Elektroporation erfordert jedoch die Verwendung hoher Spannung, was zu irreversiblen Zellschäden in der Haut führen kann (Edwards et al., 1995; Garcia et al., 2014). Anstelle der Hochspannungsimpulse, die bei der Elektroporation verwendet werden, erfolgt die Iontophorese durch konstanten elektrischen Strom niedriger Dichte (Bernardi et al., 2016). Trotz der erfolgreichen Durchbrechung der Hornschicht kann durch Elektroporation oder Iontophorese keine starke Immunantwort erreicht werden.

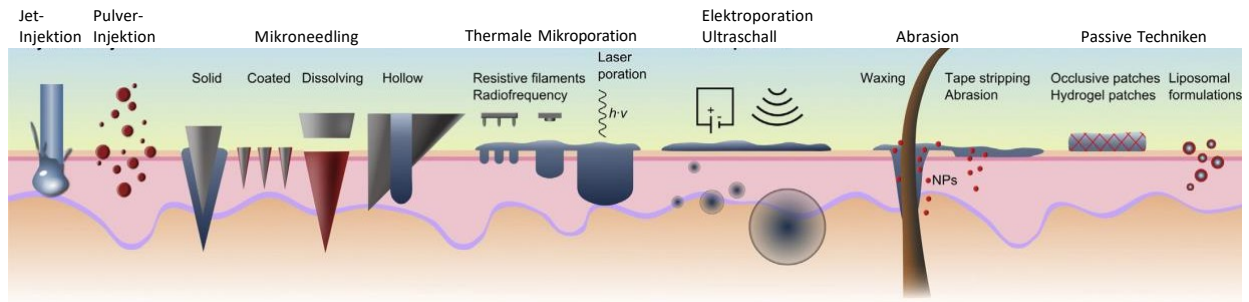


Abbildung 5. Aktive und passive Impfmethode zur dermalen Immunisierung. (Abbildung von Engelke et al., 2015)

Jede mechanische Unterbrechung der Hautbarriere durch aktive Methoden bringt ein erhöhtes Risiko für Infektionen mit. Die Erhöhung der Hautpermeabilität durch passive Methoden, die die Hautintegrität nicht beeinträchtigen, ist daher wünschenswert (Pielenhofer et al., 2020).

2.5.3.3 Passive Methoden zur Applikation von transkutanen Impfstoffen

Die größte Herausforderung bei der Herstellung transkutaner Impfungen ist die Überwindung der Hautbarriere. Nur Verbindungen mit einem Molekulargewicht unter 500 Dalton können die Hornhautschicht passieren. Ebenso beeinflusst die Hydrophobizität einer Substanz die Penetration durch die Haut. Daraus resultierend kann bei Verwendung einer geeigneten Formulierung oder eines Trägersystems das Arzneimittel unter Berücksichtigung seines lipophilen oder hydrophilen Charakters aufgenommen werden. Der Wirkstoff erreicht die Zielzellen, indem das Trägermedium so adaptiert wird, dass der Wirkstoff es bevorzugt verlässt und in die Haut eindringt (Bos und Meinardi, 2000). Die meisten Medikamente passieren die epidermale Barriere interzellulär (Roberts, 1997). Aufgrund ihrer hydrophoben Beschaffenheit lässt die Hornschicht das Eindringen lipophiler Moleküle leichter zu als hydrophile Verbindungen. Stark lipophile Verbindungen werden jedoch durch die hydrophilen intrazellulären Bereiche behindert (Bos und Meinardi, 2000). Ein alternativer Weg, über den die hydrophilen Moleküle eindringen können, sind die Öffnungen der Schweißdrüsen und der Haarfollikel. Die Gesamtoberfläche dieser Öffnungen beträgt 0,1% der gesamten Hautoberfläche und ist damit nicht signifikant (Bos und Meinardi, 2000).

Durch die Verwendung von Trägersystemen kann das *Stratum corneum* auch nicht-invasiv ohne die Notwendigkeit einer mechanischen Unterbrechung durchdrungen werden. Der transkutane Weg umfasst Mikro- und Nanopartikel sowie Lipid-basierte Systeme und beruht auf passiver Diffusion der Partikel durch die intakte Haut (Pielenhofer et al., 2020). Ein weiterer Faktor, der bei diesen Methoden die Penetration erhöht, ist die Hydratation der Haut durch die Impfformulierung. Sie führt zu einer Schwellung und intrazellulären Ansammlung von

Flüssigkeit, wodurch die Antigene das *Stratum corneum* passieren können (Glenn et al., 2003). Diese Impfstoffe können als Pflaster auf der Haut appliziert werden (Glenn et al., 2007; (Kersten und Hirschberg, 2004). Sie zielen insbesondere auf Langerhans-Zellen ab, die die Haarfollikel umgeben (Combadiere et al., 2010). In einer kleinen klinischen Studie der Phase 1 löste die pflasterunterstützte Immunisierung mit einer Standarddosis eines Influenza-Untereinheit-Impfstoffs nicht nur eine CD4⁺ sondern auch eine CD8⁺T-Zellreaktion aus. Vor der Immunisierung wurde *cianoacrylate skin surface stripping* (CSSS) durchgeführt, was das Abziehen der oberen Schicht der Epidermis bewirkt. Neutralisierende Antikörpertiter wurden jedoch nur bei zwei von sieben Pflaster-Empfängern festgestellt (Vogt et al., 2008). Eine weitere klinische Studie der Phase 1, die ebenfalls auf TCI mit vorheriger CSSS basierte, hat gezeigt, dass Impfstoffe, die ursprünglich für die Induktion von Antikörpern mittels intravenöser Verabreichung entwickelt wurden, bei transkutane Verabreichung impfstoffspezifische CD8⁺T-Zellen erzeugen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Art der Immunisierung beim Menschen das Ausmaß und die Qualität der CD4⁺ und CD8⁺T-Zell-Antworten beeinflusst. (Combadiere et al., 2010). Die Durchführung der CSSS ist jedoch zeitaufwendig, was für große Impfkampagnen einen deutlichen Nachteil darstellt.

Derzeit werden weitere Studien an Tieren durchgeführt, um wirksamere Pflaster zu entwickeln (Garg et al., 2007). Die Applikation in Form eines Pflasters wurde von Fernando et al. in einem Mausmodell getestet. Als Grundlage dieser Methode diente ein speziell dafür entwickeltes Pflaster – Nanopatch™ - das trocken mit Impfstoff beschichtet und zwei Minuten lang auf die Haut aufgebracht wurde. Es konnte nachgewiesen werden, dass der saisonale Grippeimpfstoff (Fluvax® 2008) in direkten Kontakt mit den APCs gebracht werden konnte, was bei Mäusen eine Antikörperreaktion und einen Schutz gegen das Influenzavirus hervorgerufen hat, der mit dem intramuskulär mit Nadel und Spritze verabreichten Impfstoff vergleichbar war. Ein weiterer Vorteil war, dass für die Immunisierung mit Nanopatch™ weniger als 1/100 des Antigens notwendig ist, was zur intramuskulären Immunisierung verabreicht wurde. Weiterhin ist zu betonen, dass bei dieser Methode keine Adjuvantien notwendig waren (Fernando et al., 2010).

In einer anderen Studie wurde das Potenzial der TCI mit inaktivierten ganzen Influenzaviren untersucht. Es konnte evaluiert werden, dass die TCI mit inaktivierten Influenzaviren Influenzavirus-spezifische Antikörper sowie zelluläre Immunantworten induzierte und eine schützende Immunität verlieh. Der zusätzliche Einsatz eines Adjuvans war nicht unbedingt notwendig. Allerdings konnte festgestellt werden, dass die simultane Verabreichung von Cholera-toxin (CT), einem wirksamen Adjuvans für TCI, die Immunantwort erheblich verstärkte. Die Vorbehandlung der Mäusehaut mit Ölsäure führte zu einer Erhöhung der Influenzavirus-spezifischen Bindung und der neutralisierenden Antikörper auf ein Niveau, das dem einer intranasalen Immunisierung mit inaktivierten Influenzaviren entspricht. Diese Ergebnisse

zeigen die vielversprechende Perspektive der Anwendung von TCI gegen Influenza (Skountzou et al., 2006).

Die Immunisierung über die Haut besitzt das Potenzial, mit nur einer geringen Dosis eines Antigens eine starke systemische Immunantwort auszulösen. Bislang sind die einzigen zugelassenen nadelfreien Grippeimpfstoffe die intranasalen LAIV-Impfstoffe. Für die anderen nadelfreien Strategien sind weitere klinische Untersuchungen notwendig. Der Einsatz neuartiger Verabreichungsmethoden und die Entwicklung von wirksameren Impfstoffformulierungen in Verbindung mit neuen, sicheren Adjuvantien werden die Entwicklung nadelfreier Grippe-Impfstoffe in den nächsten Dekaden weiter voranbringen (Amorij et al., 2010).

2.6 Transkutane Immunisierung mit Imiquimod und Dithranol

Die Methode der transkutanen Immunisierung mit dem TLR7-Liganden Imiquimod wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Radsak entwickelt. Ziel dieser Methode ist die Induktion antigenspezifischer Immunantworten durch die topische Verabreichung des MHC-Klasse-I restringierten Modellantigens SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) und des TLR7-Liganden Imiquimod auf die rasierte, murine Rückenhaut. Ursprünglich wurde diese Methode mit der kommerziell erhältlichen Imiquimod-haltigen Creme Aldara[®] durchgeführt. Eine Woche nach der Behandlung konnten im Blut OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifische CD8⁺T-Zellen nachgewiesen werden. Die Entstehung von MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) und regulatorischer T-Zellen führte jedoch zu Limitierungen hinsichtlich der Entstehung immunologischer Gedächtnisantworten (Rechtsteiner et al., 2005). Die T-Zell-Antwort wurde innerhalb von etwa zehn Tagen reduziert (Warger et al. 2007). Zur Überwindung der bestehenden Limitierungen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Langguth die Imiquimod-haltige gefriergetrocknete Nanoemulsion IMI-Sol entwickelt, die sich von der kommerziell erhältlichen Creme Aldara[®] in ihrer Formulierung unterscheidet. Der Anteil von Imiquimod ist in der neuen Nanoemulsion identisch (Hartmann et al., 2023).

Die Entstehung langanhaltender Immunantworten kann einerseits durch eine mehrfache Immunisierung erfolgen (Itoh und Celis, 2005), andererseits bietet die Kombination mit ergänzenden Adjuvantien einen interessanten Ansatz. In vorangegangenen Experimenten induzierte die intravenöse Applikation eines CD40-Liganden sowie die Vorbehandlung der Mäuse mit UV-Strahlung sowohl eine Gedächtniszellbildung als auch eine stärkere Immunantwort (Warger et al., 2007; Stein et al., 2011b). Allerdings wurde festgestellt, dass die Integrität der Hautbarriere gestört und somit das Infektionsrisiko erhöht wird. Zusätzlich traten vermehrt Nebenwirkungen auf. Auch Substanzen wie CD40-Liganden, die *i.v.* appliziert

werden müssen, stehen im Widerspruch zu einer angestrebten nadelfreien Immunisierung. Die Identifizierung von hautgängigen Adjuvantien im Rahmen der TCI mit IMI-Sol war daher von großem Interesse. Die zusätzliche topische Verabreichung des hautgängigen Antipsoriasis-Dithranol hatte die Imiquimod-basierte TCI deutlich optimiert (Dithranol/Imiquimod-basierte Vakzinierung (DIVA)). Durch DIVA konnte die für die Immunisierung benötigte Hautfläche um das Dreifache verringert werden. Weiterhin hat DIVA im Vergleich zur Immunisierungsstrategie mit Imiquimod allein die Erzeugung hochfunktionaler, systemischer T-Gedächtniszell-Antworten und die Entstehung gewebsresidenter T-Gedächtniszellen in der Haut ermöglicht (Sohl et al., 2022).

2.6.1 OVA₂₅₇₋₂₆₄

SIINFEKL (SIINF, OVA₂₅₇₋₂₆₄) ist ein Klasse-I-Peptid des Hühnereiweißes Ovalbumin (OVA), das von MHC-I, H-2Kb, präsentiert wird (Röttschke et al., 1991). Es wurde nachgewiesen, dass SIINF zum Nachweis einer starken zytolytischen CD8⁺T-Zellantwort verwendet werden kann (Lipford et al., 1993). SIINFEKL hat sich als geeignetes Modellantigen für die TCI bewährt (Klimuk et al., 2004; Kahlon et al., 2003). OVA₃₂₃₋₃₃₉ (OT-II) umfasst ein allergenes und antigenes Epitop des Ovalbumin-Proteins (McFarland et al., 1999). Das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ bindet an das I-A(d)-MHC-Klasse-II-Protein (Johnsen und Elsayed, 1990). OVA₃₂₃₋₃₃₉ wird ausgiebig zur Untersuchung der Art der Klasse-II-MHC-Peptidbindung und der T-Zell-Aktivierung verwendet (Bickert et al., 2007; Szymczak et al., 2009). Nach der Aufnahme durch die Haut kommt das Peptid mit dendritischen Zellen in Kontakt. Diese migrieren in die Lymphknoten, präsentieren das auf MHC-Komplexe geladene Epitop den zytotoxischen T-Zellen und initiieren durch ihre Aktivierung eine inflammatorische Primärantwort (Rechtsteiner et al., 2005; Palamara et al., 2004). Eine alleinige Peptidverabreichung kann allerdings keine Immunreaktion auslösen. Für Impfstoffe auf Peptidbasis oder basierend auf gereinigten Proteinen sind zusätzlich Adjuvantien erforderlich (Murphy et al., 2018).

2.6.2 Imiquimod

Imiquimod ist ein niedermolekularer Wirkstoff, der als TLR-7-Agonist wirkt (Murphy et al., 2018). TLR-7 wird v. a. in DCs stark exprimiert und ist dafür bekannt, Makrophagen und andere Immunzellen zu aktivieren (Itoh und Celis, 2005). Die Bindung an Liganden induziert die Dimerisierung der TLRs. Das führt zur Interaktion mit verschiedenen Adaptermolekülen im Zytoplasma der Zelle. Diese wiederum initiieren die intrazelluläre Signalübertragung. TLR-7 interagiert mit dem Adaptermolekül MyD88 (myeloischer Differenzierungsfaktor 88). Die MyD88-abhängige Signalkaskade aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dieser ist verantwortlich für die Expression von lokalen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α und IFN- α , die für die Reifung von APCs und das Auslösen einer inflammatorischen Reaktion eine entscheidende Rolle spielen (Murphy et al., 2018). Imiquimod hat sich als ein wirksames Adjuvant für TCI gezeigt. In Kombination mit Peptiden, die CTL-Epitopen entsprechen, löst

Imiquimod effektive CTL-Reaktionen aus. Die dadurch aktivierten CTLs sind in der Lage, eine umfassende Immunreaktion gegen das Zielepitop auszuführen, die durch Proliferation, zytolytische Aktivität und die Produktion von IFN- γ gekennzeichnet war. Die transkutane Peptidaufnahme war sehr effektiv. Es hat sich gezeigt, dass die topisch applizierten Antigene zu den drainierenden Lymphknoten transportiert werden, wo dann die CTL-Antwort initiiert wird (Rechtsteiner et al., 2005). Als Aldara[®] ist Imiquimod seit 1997 zur topischen Behandlung von Basalzellkarzinomen, Feigwarzen und aktinischer Keratose zugelassen (Navi und Huntley, 2004; Fleming et al., 2004; Di Lernia et al., 2004).

Um das Hindernis des Epithels zu durchbrechen war für eine TCI die Lösung der Wirkstoffe in einer fetthaltigen Creme essenziell (Alving et al., 2012). Der Vergleich verschiedener Imiquimod-haltiger Salben hatte gezeigt, dass der Vektor einen großen Einfluss auf den immunologischen Erfolg hat (Gogoll et al., 2012). Die Arbeitsgruppe Radsak hat eine gefriergetrocknete 5% Imiquimod-Nanoemulsion – IMI-Sol – entwickelt, die in ihrer zytotoxischen Potenz dem herkömmlichen Aldara[®] überlegen ist. Die TCI mit IMI-Sol zeigte im Vergleich zu Aldara[®] die gleiche Hautpenetration von Imiquimod, löste aber bessere CD8⁺ und CD4⁺T-Zell-Reaktionen aus. Die Induktion von T-Zell-Reaktionen durch IMI-Sol - TCI war abhängig vom TLR7/MyD88-Signalweg. IMI-Sol - TCI aktivierte die von der Haut stammenden DCs in den drainierenden Lymphknoten effizienter als Aldara[®], was zu einem verbesserten Schutz in einem Infektionsmodell führte (Lopez et al., 2017).

Das in IMI-Sol formulierte Imiquimod ist eine feste Nanoemulsion aus kristallinem Imiquimod mit schlechten physikalischen Eigenschaften und bröckeliger Konsistenz. Bei Einwirkung von Scherkräften wird die Formulierung zähflüssig und der Wirkstoff Imiquimod wird leicht freigesetzt. Diese Formulierung ist zudem nur begrenzt haltbar, da die lipophilen Komponenten zur Oxidation und zum Abbau neigen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Langguth wurde die nanokristalline IMI-Sol-Formulierung optimiert und zu der neuen Nanoemulsion IMI-Sol+ weiterentwickelt. Dies wurde durch Zugabe eines Oleogels aus Aerosil, Isopropylmyristat und mittelkettigen Triglyceriden erreicht. Die Formulierung IMI-Sol+ verbesserte die Haltbarkeit, erleichterte die Lagerung und Anwendung und führte zu vergleichbaren Immunreaktionen (Hartmann et al., 2023).

2.6.3 Dithranol

Die Kombination mit weiteren topischen Immunstimulatoren stellt einen vielversprechenden und praktikablen Forschungsansatz dar, der die Effektivität der TCI erhöhen könnte. Dithranol (Dithranol/1,8-dihydroxy-9-anthron) ist ein niedermolekularer Wirkstoff, der chemisch zur Gruppe der Hydroxyanthrone gehört und bekannt als Wirkstoff gegen Psoriasis ist. Die Kombination von Dithranol und Imiquimod wurde zum ersten Mal von Radsak et al. als effektive TCI-Methode identifiziert (Patentanmeldung Radsak et al., 2018; Sohl et al. 2022).

Die Wirksamkeit von TCI konnte auf zweierlei Weise verstärkt werden: Erstens wurde die Häufigkeit spezifischer CD8⁺ und CD4⁺T-Zellen im peripheren Blut erhöht. Das betrifft auch die Memory-Phase. Zweitens konnte die Kombination beider Adjuvantien die Größe der erforderlichen Hautoberfläche um das Dreifache verkleinern. Die topische Anwendung von Dithranol induzierte eine schnelle Entzündungsreaktion durch Auslösen von oxidativem Stress (Sohl et al., 2022). Die *in-vivo*-Oxidation von Dithranol unter physiologischen Bedingungen führt zur Radikalbildung. Freie Dithranol-Radikale zerstören die DNA von Zellen und aktivieren Enzyme, die mit Zellproliferation und Entzündungen in Verbindung stehen. Reaktive Sauerstoffintermediate wirken als Vermittler der Entzündungsreaktion, doch wird ihre Umsetzung in einer neuartigen entzündlichen Genexpression vermutet. Dithranol aktiviert möglicherweise eine prototypische Form des Transkriptionsfaktors NF-κB, eines zentralen Transkriptionsregulators von Entzündungen und Immunreaktionen (McGill et al., 2005; Schmidt et al., 1996). Dieses oxidationsabhängige Entzündungsmilieu fördert die Anlockung von Monozyten in die Haut. Die verstärkte Entzündungsreaktion führt zu einem überlegenen T-Zell-Priming und einer schützenden Immunität bei dem anschließenden Virusinfektionsmodell. Während die verbesserte pharmazeutische Formulierung von Imiquimod als IMI-Sol die Passage von Peptidantigenen durch die Haut ermöglichte, induziert die Zugabe von Dithranol sowohl systemische als auch hautresidente Gedächtnisantworten (Sohl et al., 2022). Die Auswirkungen von Dithranol in Kombination mit seiner geringen molekularen Größe und Hydrophobie machten es zu einem idealen Wirkstoff zur Anwendung als Adjuvans in der TCI.

2.6.4 Optimierung der Antigenendosis und Frequenz der Immunisierung nach Radsak et al.

Ein wichtiger Schritt der Arbeit von der AG Radsak bei der Etablierung von DIVA war die Optimierung in Bezug auf die Antigenendosis, die Immunisierungsfrequenz und das Anwendungsschema (Hartmann et al., 2023). Es wurden Mehrfach-Immunisierungen getestet (DIVA²) und der optimale Zeitpunkt für eine Booster-Immunisierung evaluiert. Vierundzwanzig Stunden vor jeder Immunisierung wurden beide Ohren mit Dithranol-Vaselin behandelt. Um eine übermäßige Hautreizung durch die wiederholte Anwendung von Dithranol und Imiquimod zu vermeiden, wurde Dithranol-Salbe mit einer zweifach geringeren Konzentration an Dithranol verwendet. Die Frequenz der antigenspezifischen T-Zell-Reaktionen wurde mittels Durchflusszytometrie und ihre Effektorfunktion mittels IFN-γ-ELISpot-Assay bestimmt (Hartmann et al., 2023).

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die gebildete Frequenz antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen abhängig von der eingesetzten Antigenendosis ist. Eine gesteigerte Peptidmenge führte zu einer gesteigerten Frequenz antigenspezifischer T-Zellen. Die Anwendung von DIVA eine oder zwei Wochen nach der ersten Immunisierung führte zu

einem massiven Anstieg der antigenspezifischen T-Zellen und zu einer bis zu zehnfachen Steigerung der Gedächtnisreaktion. Nach zweimaliger Immunisierung im Abstand von einer Woche wurde die stärkste Immunantwort beobachtet. Der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen zeigte, dass Tag 7 der optimale Zeitpunkt für die zweite Immunisierung war (Hartmann et al., 2023).

2.7 Zielsetzung

Die Transkutane Immunisierung mit den Adjuvantien Imiquimod und Dithranol (DIVA) stellt eine neuartige Immunisierungsstrategie dar, bei der durch lokale Behandlung starke primäre und Gedächtnis-T-Zellantworten hervorgerufen werden können. Basierend auf Vorarbeiten, in denen Ovalbumin-Peptide als Modell-Epitope eingesetzt wurden, soll im Rahmen dieser Doktorarbeit der transkutane Immunisierungsansatz DIVA im Hinblick auf die Etablierung einer Immunisierungsstrategie gegen Influenza-Peptide weiter optimiert werden. Dabei soll das Immunisierungsprotokoll angepasst und die Wirksamkeit in einem Tiermodell überprüft werden. Als Antigen wird ein Teil des viralen Nukleoproteins, das Peptid NP₃₆₆₋₃₇₄ (ASNENMETM, ASN), eingesetzt.

Unveröffentlichte Vorversuche zeigten, dass nach einmaliger Applikation keine ASN-spezifischen Immunantworten ausgelöst werden konnten. Neben einer Optimierung des Immunisierungsprotokolls zur Erhöhung der Effizienz und Reduktion von Nebenwirkungen, wurden in dieser Arbeit Peptid-Modifikationen zur Verbesserung der Hautdurchlässigkeit getestet. Die Anwendung zusätzlicher Influenza-Peptide der MHC-Klasse-II sollte die Wirkung der CD4⁺T-Zell-Hilfe verstärken. Die biologische Relevanz der optimierten Immunisierung wurde abschließend in einem Influenza-Pneumonie-Modell überprüft.

Die Etablierung einer adaptierten Immunisierungsmethode soll die klinische Übertragbarkeit auf den Menschen fördern.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Als Modell für die durchgeführten Experimente wurden C57B6/J-Mäuse verwendet. Sie wurden von „*Translational Animal Research Center*“ (TARC) der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt und nach aktuellen Tierschutzbedingungen gezüchtet und gehalten. Die Haltung erfolgte in Tierhaltungseinrichtungen des TARC, wo die Mäuse freien Zugang zu Nahrung und Wasser hatten. Die für die *in vivo* Experimente eingesetzten Tiere waren zwischen 8-14 Wochen alt.

3.1.2 Virus

Für die intranasale Infektion behandelter Tiere wurde das Influenza-Virus des Stamms H1N1, PR8/34, gezüchtet von der Firma „The Jackson Laboratory“, verwendet.

3.1.3 Medien

Testmedium (TM5% / TM10%)	5%FCS / 10% FCS 1% Glutamin 1% Na-Pyruvat 1% Penicillin / Streptomycin in Iscove´s Medium
---------------------------	---

3.1.4 Puffer

Acetat-Puffer	6 g Essigsäure 13,4 g Natriumacetat-Trihydrat in 1 L Wasser
ACK-Puffer	0,1 mM EDTA 150mM NH ₄ Cl 1mM KHCO ₃ in Wasser (pH 7,3)
Blockpuffer	1% BSA 1/1000 Tween20 in PBS
Citrat-Puffer	0,1M Citronensäure-Monohydrat 0,1M Trinatriumacetat-Dihydrat in Wasser
Coating-Puffer	0,1M NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O in Wasser (pH 9,3)
EDTA-Blutpuffer	30mM EDTA 0,01% Natrium-Acetat in PBS
FACS-Puffer	1% BSA 0,02% Natrium-Acetat 1mM EDTA in PBS

Gey's Lysepuffer	8,29 g NH ₄ Cl 1 g KHCO ₃ 0,037 g EDTA in 1 L Wasser (pH 7,29)
PBS (x10)	1,4M NaCl 0,1M NaH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O (pH 7,2)
Waschpuffer	0,05/ 0,1% TWEEN in PBS

3.1.5 Antikörper und Tetramere

Tabelle 1 Antikörper und Tetramere

Verwendung	Antigen	Klon	Markierung	Konzentration	Herkunft
FACS	ASNENMETM -H-2D ^b		APC	1:100	NIH
FACS	CD4	GK1.5 GK1.5	BV711 BV421	1:500 1:500	BioLegend BioLegend
FACS	CD44	IM7 IM7	APC BV605	1:400 1:400	BioLegend BioLegend
FACS	CD62L	MEL-14 104	FITC BV421	1:1000 1:1000	BioLegend BioLegend
FACS	CD8	53-6.7 53-6.7	BV421 BV711	1:500 1:500	BioLegend BioLegend
ELISA	Hämagglutinin	GG8-1F 3.3.1	HRP	1:1000	Miltenyi
ELISA	IgG1	KT91	HRP	1:1000	Abcam
ELISA	IgG2a	KT92	HRP	1:1000	Abcam
ELISA	IgM	KT95	HRP	1:1000	Abcam
FACS	PVSKMRMATP LLMQA-I-E ^d		PE	1:100	NIH
FACS	SFERFEIFPKE -I-E ^d		PE	1:100	NIH
FACS	SIINFEKL-K ^b		PE	1:125	Eigen- produktion
ELISpot	α-IFN-γ, murin	AN18	-	1:100	Mabtech
ELISpot	α-IFN-γ, murin	R4-6A2	biotinyliert	1:500	Mabtech

IFN- Restimulation	IFN- γ	XMG1.2	BV605	1:400	BioLegend
-----------------------	---------------	--------	-------	-------	-----------

3.1.6 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2 Reagenzien und Chemikalien

AEC-Tabletten	Sigma
Beads Ratte	BD Biosciences
Beads Kontrolle	BD Biosciences
BSA	Roth
ddH ₂ O	Eigenproduktion
Dithranol-Salbe 0,625 μ g/mg	Apotheke UM Mainz
Dithranol-Salbe 0,3125 μ g/mg	Apotheke UM Mainz
DMSO	Roth
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
FCS	Gibco
Gigasept	Schülke
H ₂ O ₂	Sigma
H ₂ SO ₄	Roth
Hydrophobe Basiscreme (DAC)	Fagron
Histofix	Roth
IMI-Sol++	Prof. Langguth (UM Mainz)
Influenza A HA ₁₂₇₋₁₃₇ (SFERFEIFPKE)	Proteogenix
Influenza A NP ₃₆₆₋₃₇₄ (ASNENMETM)	Proteogenix
Iscove's Medium (DMEM)	Invitromex
Ionomycin	Invitrogen
KHCO ₃	Roth
L-Glutamin	Roth
L ₃ -ASNENMETM	Proteogenix
Monensin	Invitrogen
NaCl	Roth
NaH ₂ PO ₄	Roth
Natrium-Acetat	Roth
Natriumpyruvat	Roth

NH ₄ Cl	Roth
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	peptides & elephants
OVA ₃₂₃₋₃₃₉	peptides & elephants
Penicillin/Streptomycin	Serva
PMA	Invitrogen
R ₇ -ASNENMETM	Proteogenix
Terralin	Schülke
TMB	Sigma
TWEEN	Roth

3.1.7 Kits

Vectastain ABC Kit

Vector Laboratorie

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platte (V-Boden)	Greiner
Abdeckplatten (steril)	Greiner
Alufolie	dm
Cell Strainer	Greiner
Einmal-Wägeschalen	Roth
Einweghandschuhe	Semperit, Carl Roth, VWR
Entsorgungsbeutel	Sarstedt
Eppendorfgefäße 1,5 ml	Greiner
FACS-Röhrchen 300 µl	Greiner
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt
Falcons (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Greiner
Gefäßständer	Scienceware, Miltenyi
Kanülen	Braun
Maus-Restrainer	Foer Medical Instruments
Nescofilm	Roth
MaxiSorp 96-Well-Platte (flacher Boden)	Nunc
Petrischalen	Greiner
Pinzette	Dumont
Pipettenspitzen	StarLab
Schiffchen	Corning incorporated

Serologische Glaspipetten	Roth
Skalpelle	Feather
Spritzen	Braun
Sterile, 96-Well MultiScreen _{HTS} Filterplatte	Merck
Schere	Hammacher

3.1.9 Laborgeräte

Tabelle 4 Laborgeräte

AID Fluorescent Lamp	Advanced Imaging Devices
Envair Eco Safe Plus	Envair
Analysenwaage	Sartorius
Animal blood counter	scil Vet abc
CO ₂ -Kammer	Nalgene
Tecan Reader	GENios
FACS Canto	BD Pharmingen
FACS LSR II	BD Pharmingen
Feinwaage	Sartorius
Infrarotlampe	Philips
Inkubator	Sanyo Electric
Mausschrank	Infralab
Mehrkanal-Pipette	Thermo Scientific, Eppendorf
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipetten	Eppendorf
Steribank	Hera safe
Timer	Roth
Tischzentrifuge	VWR
Vortex	Scientific Industries
Zentrifuge	Thermo Scientific

3.2 Methoden

3.2.1 Transkutane Immunisierung

Zur Transkutanen Immunisierung der Tiere wurden sie topisch auf den Ohren behandelt. Die Immunisierung erfolgte in zwei Schritten im Abstand von 24 h. Zunächst wurden die Tiere mit 25 mg/Ohr Dithranol-Vaseline in der Konzentration 0,625 µg/mg oder 0,3125 µg/mg behandelt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Applikation der Imiquimod-Formulierung IMI-Sol+ (50 mg pro Ohr, entspricht 2,5 mg Imiquimod) gefolgt von der Applikation der für die Immunisierung eingesetzten Peptide, welche in hydrophober Basiscreme emulgiert waren. Je nach Versuch wurden 30, 100 oder 200 µg ASN, L-ASN der R-ASN und/oder 3, 10, 30 oder 100 µg OVA₂₅₇₋₂₆₄ benötigt. OVA₂₅₇₋₂₆₄ wurde als interne Kontrolle verwendet. Um eine potente Memory-Antwort auszulösen, wurden die Tiere zweimal im wöchentlichen Abstand immunisiert. Mit dem Ziel, eine bestmögliche CD8⁺ T-Zell-Antwort zu erreichen, wurde das Immunisierungsprotokoll durch das weitere Influenza-Peptid HA₁₂₇₋₁₃₇ (SFERFEIFPKE) erweitert. Folgende Tabelle fasst die Peptide zur transkutanen Immunisierung und die entsprechende Menge an Peptid zusammen.

Tabelle 5 Peptide

Peptid	Dosierung [µg]
ASN	30/100/200
L-ASN	30/100/200
R-ASN	100
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	3/10/30/100
OVA ₃₂₃₋₃₃₉	100
HA ₁₂₇₋₁₃₇	200

3.2.2 Betäubung der Versuchstiere

Die Betäubung der Mäuse wurde vor der transkutanen Immunisierung und der intranasalen Infektion durchgeführt und wurde als Inhalationsnarkose durchgeführt. Als Betäubungsmittel wurde Isoflurangas (0,5 % O₂, 2,5 % Isofluran) mittels einer Inhalationsmaske zugeführt.

3.2.3 Blutentnahme

Den Tieren wurde jeweils eine Woche nach jeder Immunisierung und während der Memory-Phase Blut abgenommen. Die Blutentnahme erfolgte mittels Punktion der Schwanzvene. Je Untersuchung wurden 20 - 30 µl Blut in EDTA-Blutpuffer entnommen.

3.2.4 Intraperitoneale Infektion

In vorherigen Studien konnte beobachtet werden, dass die *i.p.* Infektion von Mäusen mit Influenzavirus eine Immunität auslöst. Die immunisierten Tiere überleben die intranasale (*i.n.*) Inokulation einer letalen Influenza-Dosis (Gautam et al., 2019). Die *i.p.* infizierten Tiere dienten als Positivkontrolle. Dafür wurden 50 TCID₅₀ Influenzavirus PR8 in 0,2 ml PBS gelöst und den Tieren mit einer Kanüle als *i.p.* Injektion gegeben.

3.2.5 Intranasale Infektion

Die *i.n.* Infektion fand unter Betäubung statt. Dafür wurden je nach Versuch 3 - 100 TCID₅₀ Influenzavirus PR8/34 in 20 µl PBS gelöst. Das Gemisch wurde mit einer Pipette tropfenweise auf die Nasenlöcher pipettiert und von dem Tier respiriert. Die intranasale Infektion diente als Challenge-Experiment zur Überprüfung der Effizienz der Immunisierung.

Nach der Infektion wurden die Tiere alle zwei Tage gewogen. Der Allgemeinzustand wurde nach bestimmten Kriterien anhand eines Punkteschemas überprüft (siehe Anhang). Eine Gewichtsreduktion von 10% beim Vorliegen von weiteren Krankheitszeichen bzw. eine Gewichtsreduktion von 20% führte zur Tötung der Tiere.

3.2.6 Serumgewinnung

Um die B-Zell-Antwort bei den überlebenden Tieren zu bestimmen, wurde der Antikörpertiter im Serum gemessen. Nach der Abtötung in einer CO₂-Kammer wurde der Augapfel mit einer Pinzette abgetragen. Das Blut, das aus dem retrobulbären Sinus floss, wurde in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Nach Ablauf der Koagulation (nach ca. 20 min) wurden die Proben für 15 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und ein weiteres Mal für 15 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde in ein neues Gefäß überführt.

3.2.7 Milzentnahme und Herstellung einer Splenozyten-Einzelzellsuspension

Die Milz wird als sekundäres lymphatisches Organ zur Gewinnung großer Mengen von Leukozyten benötigt. Nach der Abtötung in einer CO₂-Kammer wurde die linke Flanke für die Präparation mit Ethanol besprüht, Haut und Peritoneum mit einem Skalpell eröffnet und das Organ entnommen. Die Milz wurde über einem mit PBS angefeuchteten 70 µm Zellsieb zerrieben und dieses mit 5 ml PBS gespült. So wurde aus dem Organ eine Einzelzellsuspension hergestellt. Im nächsten Schritt wurde die Einzelzellsuspension zentrifugiert (1600 rpm, 3 min), abgekippt und 2 min mit 1 ml Gey's Lysepuffer behandelt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Proben wieder mit der gleichen Geschwindigkeit zentrifugiert, abgekippt und in 5 ml PBS gelöst. Die im Zellpellet verbleibenden Leukozyten wurden für das ELISpot-Assay oder für die FACS-Analyse verwendet. Je nach Zweck, wurden die Zellen aufgenommen und für die Weiterverarbeitung in einem anderen Falcon mit PBS

überführt. Kleine Mengen dieser Zellsuspension wurden nach der Färbung und dem Waschen mit FACS-Puffer für die FACS-Analyse verwendet.

3.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient zur Analyse von fluoreszenzmarkierten Zellen. Die Zellsuspension wird vom FACS (*fluorescence-activated cell sorter*)-Gerät angesaugt und die einzelnen Zellen dabei vereinzelt. Die Zellen wandern durch einen Laserstrahl und werden gezählt. Die Lichtstreuung liefert Informationen über die Größe und die Granularität der Zellen. Zur weiteren Unterteilung in Zelltypen wurden die Zellen durch spezifische monoklonale Antikörper gegen Oberflächenproteine markiert, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren. Beim Passieren durch den Laserstrahl werden die Farbstoffmoleküle zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenzmessung ermöglichte die Unterteilung der Zellen anhand der Expression bestimmter Oberflächenproteine. Die FACS-Analysen wurden mit dem Canto-/LSR II-Durchflusszytometer und der FACSDiva-Software (BD Pharmingen, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

3.2.9 Tetramer- und Antikörperfärbung

Verschiedene Zellpopulationen unterscheiden sich anhand der Expression verschiedener Oberflächenproteine. Um bestimmte Zellpopulationen am FACS-Gerät nachzuweisen, wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt, die spezifisch an bestimmte Oberflächenproteine binden. Das ermöglichte die Unterscheidung zwischen CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen und zwischen naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen. Die T-Gedächtniszellen stammten aus den T-Effektorzellen und setzten die Expression zahlreicher Marker der T-Effektorzellen fort, etwa die des phagozytotischen Glykoproteins 1 (CD44), während die Expression anderer Marker naiver T-Zellen wie etwa der L-Selektin (CD62L) ausbleibt. Daher erfolgte die Evaluierung vom Aktivierungszustand der spezifischen CD8⁺T-Zellen durch Antikörper gegen CD44 und CD62L. Die Anzahl zytotoxischer T-Zellen wurde die Expression des antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors durch Tetramer-Färbung nachgewiesen. Tetramere sind peptidbeladene MHC-I-Moleküle, die zusätzlich an einen Farbstoff gekoppelt sind. Es wurden Tetramere aus vier MHC-Molekülen verwendet, um die Affinität der Wechselwirkung zwischen dem Peptid:MHC-Komplex und dem T-Zell-Rezeptor zu erhöhen. Zum Nachweis der OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischen CD8⁺T-Zellen wurde das Tetramer H2-K^b verwendet, das mit dem Farbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppelt war. Zum Nachweis der ASN-spezifischen CD8⁺T-Zellen wurde das Tetramer H2-D^b verwendet, das mit dem Farbstoff Allophycocyanin (APC) markiert war.

Die Zellen wurden aus dem Blut gewonnen (siehe Blutentnahme). Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen in eine 96-Kavitätenplatte mit rundem Boden in FACS-Puffer aufgenommen, gewaschen und für 30 Minuten bei 4°C in 50 µl Färbelösung gefärbt. Die

Tabelle 1 zeigt die verschiedenen Antikörper und die Tetramere, die für die FACS-Färbung verwendet wurden. Sie wurden in FACS-Puffer in der jeweiligen Konzentration gelöst. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben zweimal in FACS-Puffer gewaschen und ebenfalls in 100 µl FACS-Puffer für die Messung aufgenommen.

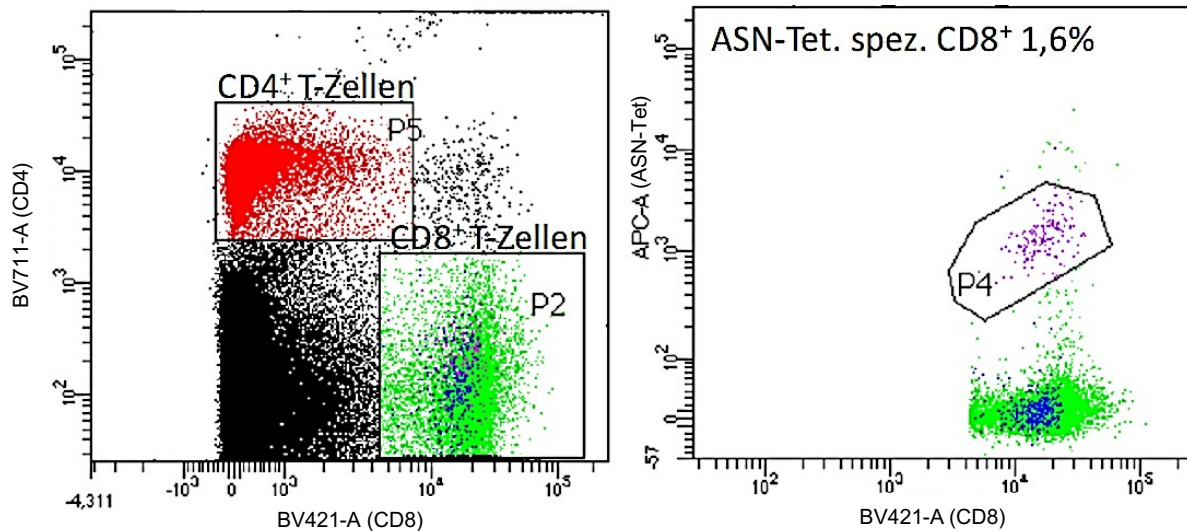


Abbildung 6. Durchflusszytometrische Auswertung der peptidspezifischen T-Zellen. Links: Die Bestimmung CD8⁺-T-Zellen geschieht in diesem Beispiel anhand einer Antikörperfärbung mit BV421-A. Dementsprechend sind die CD8⁺-T-Zellen BV421-A^{high}. Die Bestimmung CD4⁺-T-Zellen geschieht anhand einer Antikörperfärbung mit BV711-A. Dementsprechend sind die CD4⁺-T-Zellen BV711-A^{high}. Rechts: In diesem Fenster wird nur die Population der CD8⁺-T-Zellen angezeigt. Bei immunisierten Tieren können daraus durch eine Tetramerfärbung die Peptidspezifischen T-Zellen identifiziert werden (APC^{high}).

3.2.10 IFN- γ -ELISpot-Assay

Die ELISpot (*Enzyme Linked Immuno Spot*) - Analyse diente dem Nachweis sezernierter Zytokine von antigenspezifischen T-Zellen immunisierter Mäuse. Zu diesen Zytokinen gehört unter anderem IFN- γ , das von den cytotoxischen T-Effektorzellen freigesetzt wird, wenn sie mit dem Antigen stimuliert werden, gegen das sie gerichtet sind. Für den Nachweis von IFN- γ mittels ELISpot wurden 96-Well-Platten über Nacht bei 4 °C mit anti-IFN- γ -Antikörper beschichtet (Klon AN18, Mabtech). Nach einem Blockierungsschritt mit TM10% (10% FCS) für eine Stunde bei 37 °C wurden die gewonnenen Splenozyten (siehe Abschnitt 3.2.7) und das in TM 10% gelöste Peptid (1 µg/ml) hinzugefügt. Das durch die Restimulation freigesetzte IFN- γ wurde durch die Primärantikörper aufgefangen. Somit entsteht um jede aktivierte Zelle ein Hof (Spot) von gebundenem Zytokin. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein sekundärer biotinylierter IFN- γ -Antikörper verwendet. Zur Visualisierung der Spots wurde der Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) / AEC (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) -Komplex entsprechend den Angaben des Herstellers hinzugefügt. Die Anzahl an Spots wurde vom ELISpot-Lesegerät (AID AutoimmunDiagnostika, Straßberg, Deutschland) erfasst.

3.2.11 Nachweis der intrazellulären Produktion von IFN- γ

Zusätzlich zum Nachweis mittels ELISpot wurde die IFN- γ -Produktion durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer Färbung untersucht. Dafür wurden jeweils Milzzellsuspensionen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen / 100 μ l TM5 in einer Zellkulturplatte mit 96-Vertiefungen (96-Well U-Boden Platte) in An- und Abwesenheit von Peptiden (1 μ M), Ionomycin (2 μ g/ml) oder PMA (0,2 μ g/ml) für 3 Stunden restimuliert. Zur Blockierung des zellulären Proteintransports wurde für die letzten 3 Stunden der Restimulation Monensin in der Konzentration 1 μ M zugegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, in FACS-Puffer aufgenommen und zunächst extrazellulär gefärbt. Nach der Permeabilisierung mit 50 μ l FixPerm Lösung (20 min, 4°C) wurden die Zellen mit Perm-Puffer gewaschen und intrazellulär gegen IFN- γ gefärbt (30 min, 4°C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden sie in FACS-Puffer aufgenommen und am FACS-Gerät gemessen.

3.2.12 ELISA-Assay

ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) eignet sich zum Nachweis der Menge spezifischer Antikörper im Serum. Das Serum wurde auf eine antigenbeschichtete Oberfläche pipettiert. Nach Bindung an das Antigen wurden die Antikörper durch einen sekundären fluoreszenzmarkierten anti-Immunglobulin-Antikörper detektiert. Im ersten Schritt wurde eine 96-Well-ELISA-Platte mit dem Virus als Antigen beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Virus wurde in der Verdünnung 1:20 TCID₅₀/ μ l in Coating-Puffer gelöst. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte dreimal mit 200 μ l/Well Waschpuffer (PBS + 0,1% TWEEN20) gewaschen und danach für 30 min bei 37°C mit 100 μ l/Well Blockpuffer (PBS + 1% BSA + 1/1000 Tween20) geblockt. Das Serum wurde auf die Platte in verschiedenen Titrationsstufen mit Blockpuffer aufgetragen und anschließend für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ausgehend von einer Verdünnung im Verhältnis 1:20 wurden die Proben weiterhin 1:10 titriert. Als Negativkontrolle diente Blockpuffer und als Positivkontrolle HRP-markierte anti-Hämagglutinin-Antikörper. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte viermal mit 200 μ l/Well Waschpuffer gewaschen und es die Sekundärantikörper zugegeben. Die HRP-markierten Sekundärantikörper wurden ebenfalls in Blockpuffer gelöst. Nach einem weiteren Waschschrift (viermal mit 200 μ l/Well Waschpuffer) wurde die Platte zur Detektion für ca. 15 min bei RT mit 80 μ l/Well TMB entwickelt, bis eine Blaufärbung zu sehen war. Die Reaktion wurde mit 80 μ l/Well 2M H₂SO₄ gestoppt. Es kam zu einem Farbumschlag ins Gelbe, dessen Intensität bei 450 nm detektiert wurde.

3.2.13 Statistik

Die Daten wurden durch die FACS Diva Software von BD, das ELISpot-Lesegerät von AID und das Plattenlesegerät von Tecan Reader erfasst. Zunächst wurden die Rohdaten mit Microsoft Excel verarbeitet und anschließend erfolgte die statistische Auswertung und die

graphische Darstellung mit GraphPad Prism. Die graphische Darstellung als Box- und Whisker-Diagramm zeigt Einzelwerte mit den entsprechenden Medianen. Zur Signifikanzbestimmung wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest durchgeführt. Zur Signifikanzbestimmung bei Mehrfachvergleichen zwischen mehr als zwei Gruppen wurde der zweiseitige ANOVA-Test (Two-Way ANOVA-Test) durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde der t-Test angewandt. Die Abbildungen, die das Überleben darstellen, wurden mittels Mantel-Cox Test analysiert. Das Signifikanzniveau betrug ebenfalls $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung des Immunisierungsprotokolls

Die Arbeitsgruppe Radsak und Kollegen hatte in vorhergehenden Arbeiten eine eigene TCI-Methode etabliert bestehend aus Dithranol, dem TLR7-Agonist Imiquimod, und einem Peptid-Antigen (DIVA). Als Modellpeptid wurde in ihren Arbeiten das Ovalbumin-Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ verwendet. Nach einmaliger Behandlung wurden durchschnittlich etwa 3% OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifische CD8⁺T-Zellen gemessen (Patentanmeldung Radsak et al., 2018). DIVA steigert nicht nur die spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten, die bei vielen Virusinfektionen wichtig sind, sondern stimuliert auch spezifische CD4⁺T-Zellreaktionen. Zudem induziert die Zugabe von Dithranol sowohl systemische als auch hautresidente Gedächtnisantworten (Sohl et al., 2022).

Durch Anpassungen des Immunisierungsprotokolls könnte DIVA auch für Immunisierungen mit weniger immunogenen Peptiden oder für Peptide mit geringerer Hydrophobizität Anwendung finden. Die Titration der Wirkstoffdosis oder -konzentration und Änderungen in der Häufigkeit der Verabreichung einzelner Wirkstoffe, sowie die mehrfache Immunisierung könnten den Impferfolg steigern. Ebenso könnte potenziell die Aufnahme von anderen Peptiden ermöglicht werden. Die weitere Optimierung der Peptidaufnahme durch die Haut sowie die Verstärkung des immunologischen Gedächtnisses wurden in dieser Arbeit forciert.

Eine Nebenwirkung der topischen Verabreichung von Dithranol ist die Entstehung von Entzündungsreaktionen (Lawrence et al., 1984). Dithranol induziert innerhalb der ersten 24 Stunden eine Rötung und Schwellung des behandelten Hautgewebes. In der Vermutung, dass eine geringere Dithranol-Konzentration die Entzündungsreaktion abschwächen würde, wurde durch Variation der Konzentration und Applikationsfrequenz versucht, den hautreizenden Effekt zu minimieren. Zusätzlich wurde der Effekt dieser Maßnahmen auf die Immunantwort untersucht.

4.1.1 Minimierung von Nebenwirkungen durch einmalige Dithranol-Applikation im Rahmen des Immunisierungsprotokolls

Zur Optimierung des Immunisierungsprotokolls wurde untersucht, welche Auswirkungen eine einmalige Applikation von Dithranol bei DIVA² hat.

Die Immunisierung erfolgte mit 30 µg des etablierten OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptids nach dem in Abbildung 7a dargestellten Immunisierungsschema. Die Tiere waren in zwei Gruppen geteilt. Die erste Gruppe hatte die Standardbehandlung (DIVA²) bekommen. Bei den Tieren der zweiten Gruppe wurde im Unterschied zur Gruppe 1 vor der zweiten Immunisierung kein Dithranol appliziert (DIVA^{2opt}).

Die Bildung antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen wurde wöchentlich bis Tag 28 im Blut der Tiere durchflusszytometrisch untersucht. Abschließend wurde die Effektorfunktion der antigenspezifischen T-Zellen mittels ELISpot analysiert. Die höchste Frequenz OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8⁺T-Zellen konnte in der zweiten Gruppe beobachtet werden (Abb. 7b). Die medianen Werte waren in der Gruppe 2 etwa 1,6-fach höher im Vergleich zur Standardbehandlung. Beispielsweise wiesen die Tiere der Gruppe 1 nach 14 Tagen 32,7% OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifische CD8⁺T-Zellen auf, während Gruppe 2 51,8% entwickelten (Abb. 7b). Nach 21 Tagen konnte ein leichtes Absinken der Zellzahlen festgestellt werden, insbesondere in Gruppe 2 auf 47,7%. Gruppe 1 fiel um 0,7%. Der Unterschied war weiterhin signifikant. Dieser Trend blieb erhalten; nach 28 Tagen post-Immunsierung lag die spezifische T-Zellpopulation in Gruppe 1 im Median bei 20,5% und in der Gruppe 2 signifikant höher bei 34,9%.

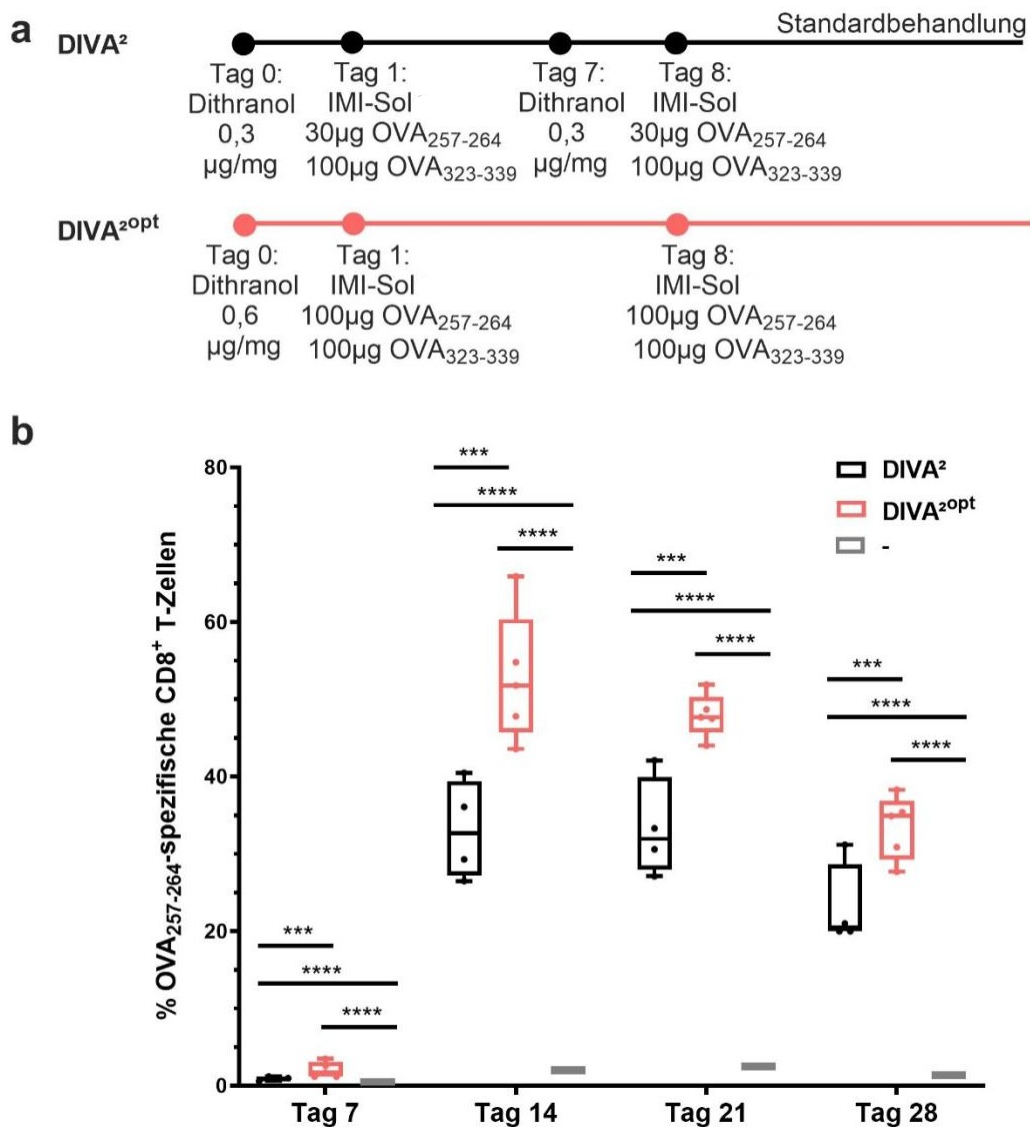


Abbildung 7. DIVA² Anpassung des Immunisierungsschemas. Die einmalige Dithranol-Applikation vor der ersten Immunisierung führte zu einem höheren Anteil peptidspezifischer CD8⁺T-Zellen im peripheren Blut. **a)** Behandlungsschemata mit DIVA² als Standardschema und DIVA^{2opt}. Die adaptierte Applikation ohne Dithranol am

Tag 7 und mit 100 µg OVA₂₅₇₋₂₆₄ **b**) Durchflusszytometrische Messung der Frequenz peptidspezifischer CTLs im peripheren Blut durch Tetramer-Färbung. Die Graphische Darstellung als Box- und Whisker-Diagramm zeigt die Einzelwerte mit dem Median und Standardabweichung (n = 4-5). Statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem ANOVA-Tests (***p<0,001, ****p<0,0001).

Im ELISpot-Assay wurden nach Restimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ im Median 1305 SFU in Gruppe 1 und 1133 SFU in Gruppe 2 gemessen (Abb. 8). Die Restimulation mit OVA₃₂₃₋₃₃₇ hatte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen induziert.

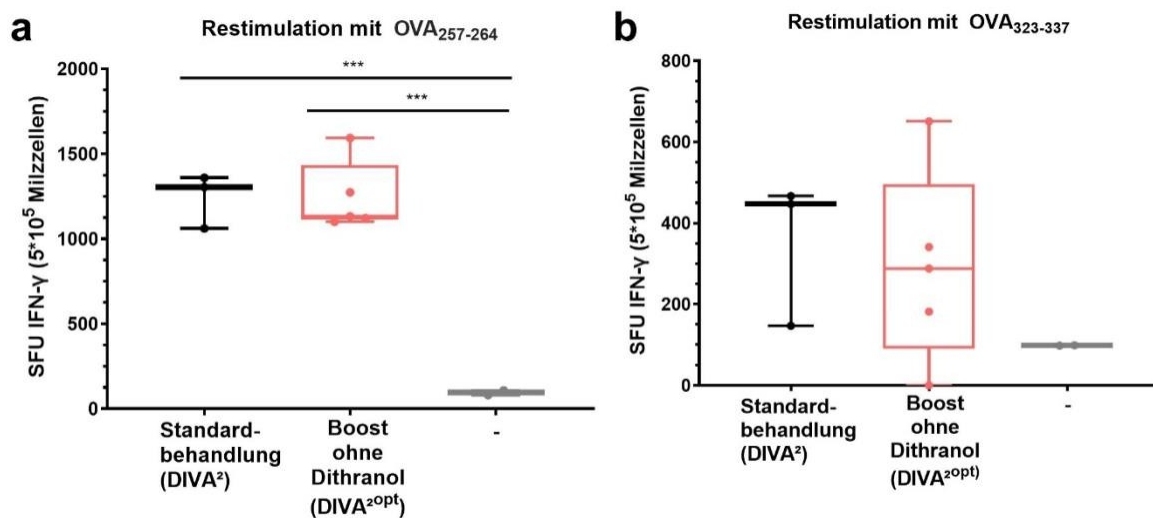


Abbildung 8. DIVA² bei einmaliger Dithranol-Applikation vor der ersten Immunisierung. **a**) Restimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄. **b**) Restimulation mit OVA₃₂₃₋₃₃₇. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Median und Standardabweichung (n = 3 - 5). Es konnte die Bildung funktionsfähiger OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8⁺T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest (***p<0,001).

Die oben genannten Ergebnisse ergaben, dass DIVA² bei einmaliger Dithranol-Applikation vor der ersten Immunisierung und eine höhere Peptidkonzentration den Anteil antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen im peripheren Blut verbesserte und führte zu der Frage, ob die verringerte Dithranol-Applikation auch eine Reduktion der Hautirritation beinhalten würde. Das optimierte Immunisierungsprotokoll (DIVA^{2opt}) wurde in den darauffolgenden Experimenten bei Tieren verwendet, die mit einem Influenza-Peptid immunisiert wurden.

4.2 TCI als Immunisierungsansatz gegen das Influenzavirus

In Studien mit Mäusen und anschließend in einer klinischen Studie mit älteren Patienten wurde nach einer Vorbehandlung mit Imiquimod ein trivalenter Influenza-Impfstoff verabreicht (Hung et al., 2014; Zhang et al., 2014). Die klinische Studie zeigte, dass eine Imiquimod-Vorbehandlung den Impferfolg erhöhte, ohne eine Zunahme der unerwünschten Ereignisse.

Ein weiteres neues Erkenntnis ist das Auftreten von kreuzprotektiven Immunreaktionen nach topischer Imiquimod-Vorbehandlung und intradermaler Grippeimpfung (Hung et al., 2015). Es wurden verstärkte Immunantworten nicht nur gegen die im Impfstoff enthaltenen Stämme, sondern auch gegen nicht im Impfstoff vorhandenen Stämme festgestellt (Hung et al., 2015; Stein und Radsak, 2016). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Behandlung mit Imiquimod vor der trivalenten Grippeimpfung sowohl bei jungen als auch bei älteren Menschen gut verträglich und sicher ist (Stein und Radsak, 2016) und implizieren, dass Imiquimod auch für topische Impfungen gegen Influenza ein vielversprechender Kandidat sein könnte.

Für die Immunisierung gegen Influenza wurde *bis dato* noch kein transkutaner Impfstoff zugelassen, der nadelfrei appliziert werden kann. Zunächst wurde in dieser Arbeit untersucht, wie der TCI-Ansatz mit Dithranol und IMI-Sol als Adjuvantien (DIVA) gegen ein Influenza-Peptid etabliert und weiter optimiert werden kann.

4.2.1 Die Verlängerung der Peptidkette am N-Terminus mit drei zusätzlichen Leucin-Resten ermöglicht die Induktion einer T-Zell-Antwort

In dem ersten Schritt der Immunisierung gegen dem Influenza-Virus wurde untersucht, wie das Durchdringen der Hautbarriere durch das von uns ausgewählte Peptid ermöglicht werden könnte. Zur Induktion einer starken CD8⁺T-Zell-Reaktion wurde das Peptid ASN (NP₃₆₆₋₃₇₄) aus dem internen Nukleoprotein verwendet, das durch H-2D^b präsentiert wird. Eine einfache DIVA mit ASN induzierte in Vorarbeiten keine detektierbaren Frequenzen an antigenspezifischen T-Zellen. Es bestand die Hypothese, dass die Hydrophobizität bzw. der Gravy-Index eine Herausforderung bei der transdermalen Anwendung des ASN-Peptids darstellt. Daher war es wichtig neue Strategien zur Überwindung der Hautbarriere zu untersuchen. Peptidmodifikationen werden zunehmend eingesetzt, um Peptide an verschiedene Zelltypen zu übertragen. Durch eine N-terminale Polyarginin-Verlängerung wurden Antigene in Vorarbeiten effizienter auf MHC-I und MHC-II präsentiert und eine bessere Immunantwort ausgelöst. Leucin ist eine hydrophobe Aminosäure. Die Verlängerung durch Leucin könnte daher die Hydrophobizität erhöhen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde das ASN-Peptid um sieben zusätzliche Arginin-Reste am N-Terminus und die zweite modifizierte Form um drei zusätzliche Leucin-Reste am N-Terminus modifiziert. Die Mäuse wurden nach der DIVA-Methode mit ASN oder den modifizierten Formen behandelt (Abb. 9a). Da die TCI mit SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) sich in unseren Arbeiten gut als Modellpeptid etabliert hatte, wurde das Peptid bei jeder Immunisierung als interne Kontrolle verwendet. Die Mäuse wurden am Tag vor der Immunisierung mit 25 mg Dithranol-Vaseline (0,6 µg/mg pro Ohr) behandelt. Am folgenden Tag

wurden die Tiere mit 50 mg IMI-Sol, 100 µg ASN/L-ASN/R-ASN und 100 µg SIINFEKL pro Ohr immunisiert.

Am Tag 7 wurde mit den Milzzellen ein IFN-γ-ELISpot-Assay zur Untersuchung der Effektorfunktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen durchgeführt (Abb. 9 a). Die Milzzellen der Tiere, die mit den modifizierten Peptiden behandelt wurden, erhielten nicht nur ASN, sondern auch das jeweilige modifizierte Peptid zur Restimulation. Die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen der Tiere, die mit L-ASN immunisiert wurden, zeigten eine signifikant höhere IFN-γ-Produktion im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abb. 9b). IFN-γ wurde von den L-ASN-spezifischen CD8⁺T-Zellen nur bei Restimulation mit L-ASN produziert (Abb. 9b, rechts). Bei Restimulation mit ASN blieb die IFN-γ-Produktion aus (Abb. 9b, Mitte).

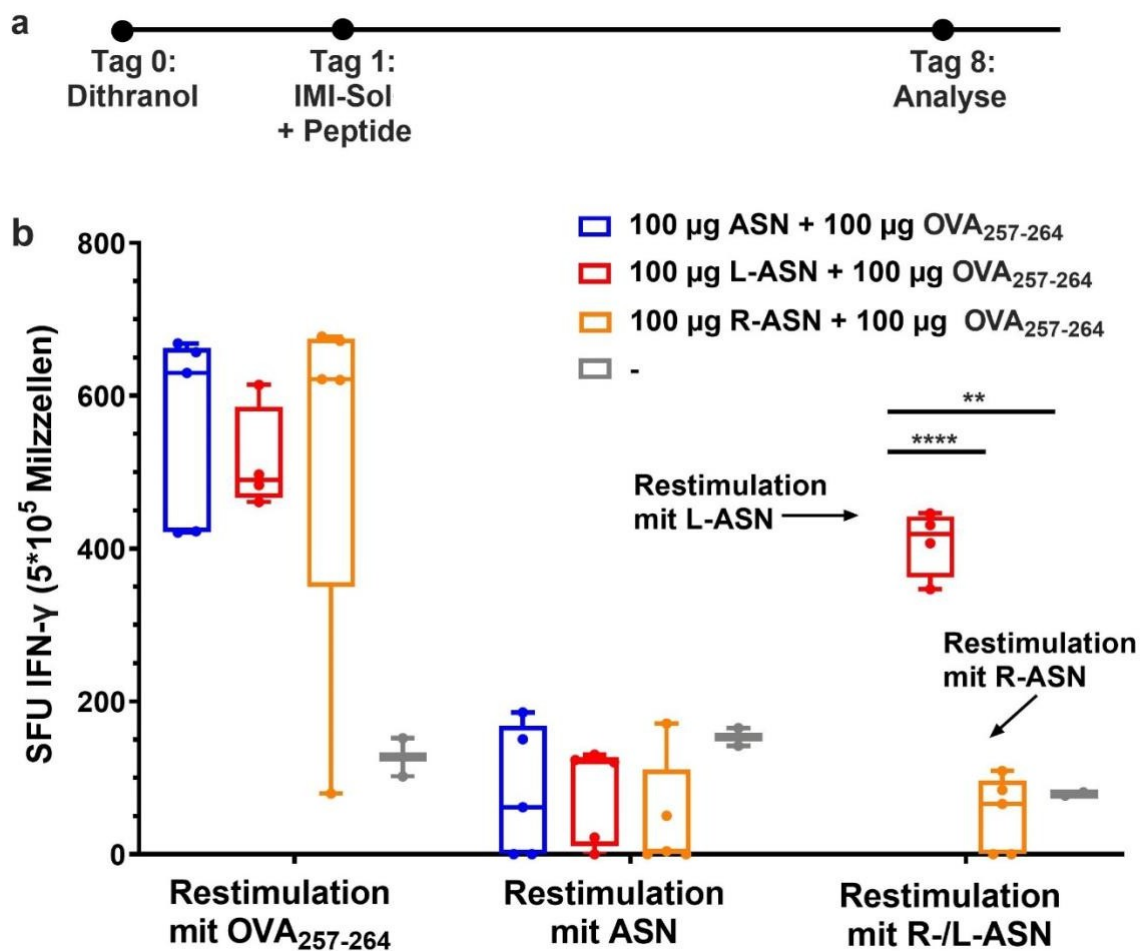


Abbildung 9. IFN-γ-Sekretion nach Immunisierung mit den modifizierten Peptiden. a) Behandlungsschema. C57BL/6 Mäuse wurden durch die Applikation von 25 mg Dithranol (0,6 µg/mg) und 50 mg IMI-Sol+ auf die Ohrhaut transkutan gegen ASN, L-ASN oder R-ASN immunisiert. b) Am Tag 7 wurden die Milzzellen von immunisierten Mäusen in IFN-γ-ELISpot mit den Antigenen ASN, L-ASN und R-ASN (1 µg/ml) restimuliert und die Anzahl IFN-γ-produzierender Einheiten mit einem ELISpot-Reader gemessen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Median und Standardabweichung (n = 5). Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest (**p<0,01, ****p<0,0001).

Die Verlängerung der Peptidkette am N-Terminus mit drei zusätzlichen Leucin-Resten ermöglichte somit die Bildung funktionsfähiger L-ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Immunisierung durch L-ASN einen Einfluss auf die Generierung peptidspezifischer CD8⁺T-Zellen und deren Effektorfunktion besitzt.

4.2.2 Die Immunisierung mit L-ASN führt zu einer IFN- γ -Produktion durch CD8⁺T-Zellen nach Restimulation mit L-ASN und ASN

Im folgenden Versuch wurde eine Immunisierung mit L-ASN zur Messung der Frequenz ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen und zur erneuten Untersuchung ihrer Funktion durchgeführt. So wie bei dem vorherigen Versuch (Abb. 9) wurden die Tiere am Vortag mit 25 mg Dithranol-Vaseline (0,6 μ g/mg) pro Ohr behandelt. Zur Immunisierung wurde 50 mg IMI-Sol, 100 μ g L-ASN und 100 μ g SIINF pro Ohr verwendet (Abb. 10a). An Tag 7 nach der Immunisierung mit L-ASN wurden die Frequenzen spezifischer CD8⁺T-Zellen durchflusszytometrisch und die Effektorfunktion der spezifischen T-Zellen, gemessen an einer IFN- γ -Produktion nach Restimulation, untersucht. Von Interesse war die Detektion ASN-spezifischer CD8⁺ T-Zellen und die IFN- γ -Produktion nach Restimulation mit ASN.

Mittels Durchflusszytometrie konnten nach einmaliger Behandlung mit 100 μ g L-ASN im Median 1% ASN-Tetramer-spezifische CD8⁺T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10b). Als interne Kontrolle wurden die Tiere zusätzlich mit dem Ovalbumin-Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisiert. Hier konnte eine deutliche Frequenz antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen ausgemacht werden (3,8%). Im Blut unbehandelter Tiere wurden keine antigenspezifische CD8⁺T-Zellen nachgewiesen.

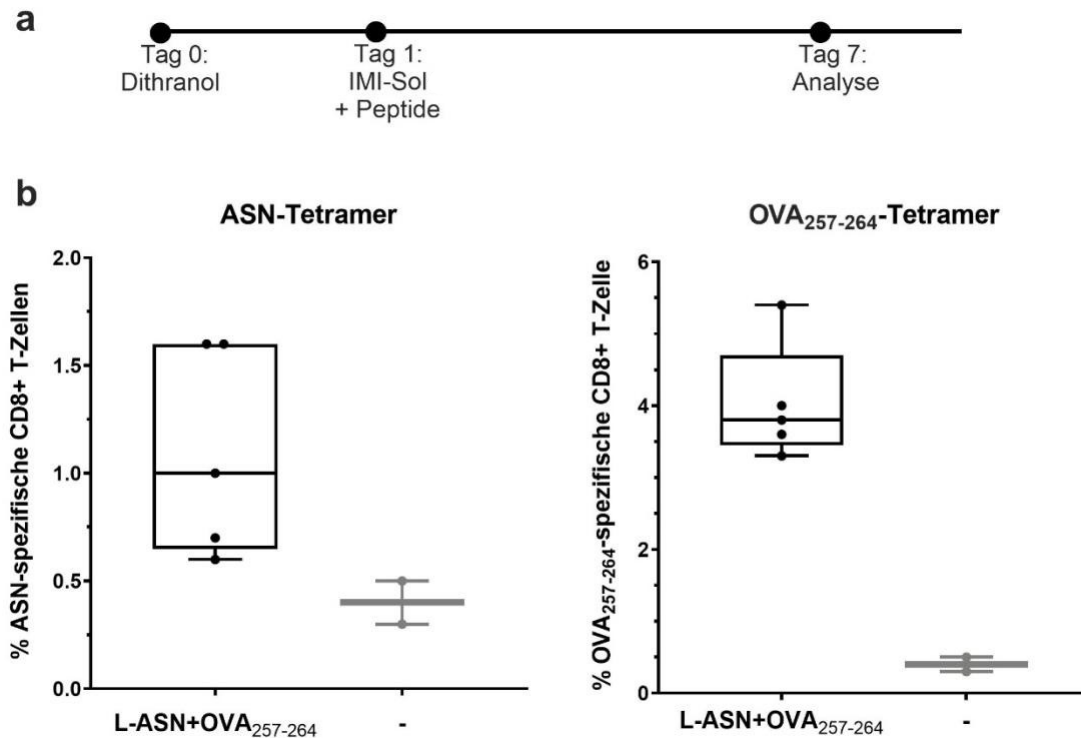


Abbildung 10. Die Behandlung mit L-ASN führt zur Produktion ASN-Tetramer-spezifischer CD8⁺-T-Zellen.
 a) Behandlungsschema. C57BL/6 Mäuse wurden durch die Applikation von 25 mg Dithranol (0,625 µg/mg) und 50 mg IMI-Sol auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) und L-ASN immunisiert. b) Durchflusszytometrische Messung der Frequenz peptidspezifischer CTLs im peripheren Blut am Tag 7. Die graphische Darstellung als Box- und Whisker-Diagramm zeigt die Einzelwerte mit Median und Standardabweichung (n = 5). Statistische Analyse mittels t-Test. Keine signifikanten Unterschiede messbar.

Die Analyse der Effektorfunktion erfolgte nach Restimulation von Splenozyten der immunisierten Tiere verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle mit ASN sowie L-ASN. In diesem Zusammenhang wurde die IFN- γ -Produktion nach 24 Stunden zuerst durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer Färbung untersucht (Ergebnisse werden bei dieser Arbeit nicht gezeigt). Hier konnten nach Restimulation mit ASN oder L-ASN IFN- γ -spezifische CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden (Median = 1,2 % bei Restimulation mit ASN, Median = 1,25 % bei Restimulation mit L-ASN). Bei den unbehandelten Tieren waren keine IFN- γ ⁺CD8⁺T-Zellen vorhanden.

In der ELISpot-Messung wurden von den CD8⁺T-Zellen etwa 300 SFU-Einheiten IFN- γ sowohl nach L-ASN- als auch nach ASN-Restimulation ausgeschüttet (Abb. 11).

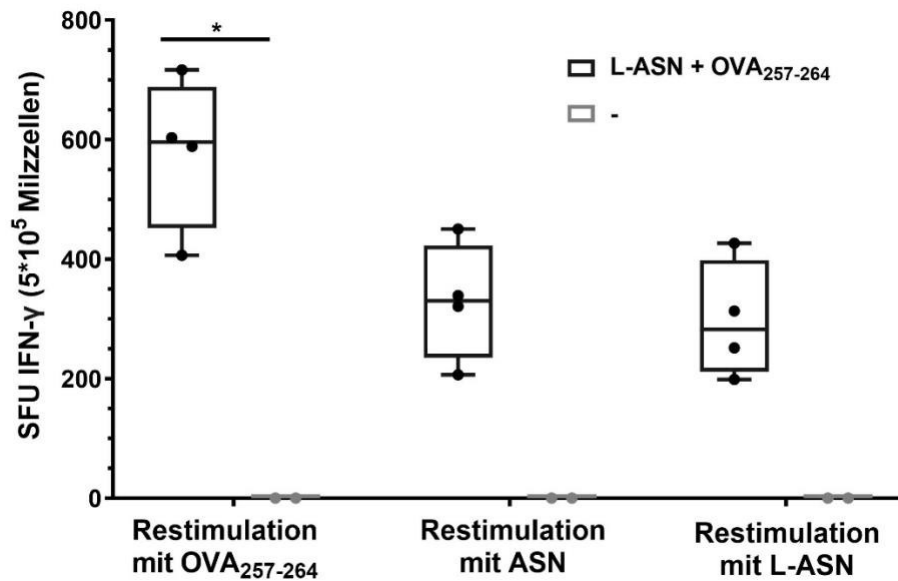


Abbildung 11. Produktion und Freisetzung von IFN- γ . Behandlungsschema. Die Tiere wurden durch die Applikation von 25 mg Dithranol (0,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$) und 50 mg IMI-Sol+ auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) und L-ASN immunisiert. Am Tag 7 wurden die Milzzellen von immunisierten Mäusen mit den Antigenen OVA₂₅₇₋₂₆₄, ASN und L-ASN (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) restimuliert und die Anzahl IFN- γ -produzierender Einheiten mit einem ELISpot-Reader gemessen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Median und Standardabweichung (n = 4) Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest (*p<0,05).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde bei den folgenden Experimenten das Immunisierungsprotokoll weiter optimiert, um die T-Zellantwort zu erhöhen.

4.2.3 DIVA² mit ASN oder L-ASN führt zur Bildung ASN-spezifischer CD8⁺-T-Zellen

Mit dem Ziel die CD8⁺-T-Zellantwort zu erhöhen, wurde in dem nächsten Versuch untersucht, ob eine zweifache Immunisierung mit ASN zu einer verstärkten CD8⁺-T-Zellantwort führt. Die Tiere wurden nach dem modifizierten Immunisierungsschema in der Abbildung 12a gegen ASN oder L-ASN immunisiert. Als interne Kontrolle wurden die Tiere zusätzlich mit dem Ovalbumin-Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisiert. Um die starke Hautreizung bei zweimaliger Applikation von Dithranol-Vaseline in der Konzentration 0,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ zu minimieren wurde Dithranol-Vaseline in einer niedrigeren Konzentration verwendet (0,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Zum Vergleich wurde eine dritte Gruppe durch eine *i.p.* Injektion von 50 TCID₅₀ Influenza PR8 immunisiert. Anschließend wurde die Anzahl an peptidspezifischen CD8⁺-T-Zellen im Blut der Tiere wöchentlich durchflusszytometrisch verfolgt. Sieben Tage nach der zweiten Immunisierung (Tag 14) wurden unabhängig von der eingesetzten Peptidvariante durchschnittlich 1,4% antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellen gemessen (Abb. 12b). Eine Woche später (Tag 21) verringerte sich die Anzahl ASN-Tet.-spez. CD8⁺-T-Zellen. In der L-ASN Gruppe wurden etwa 0,8% und in der ASN-Gruppe etwa 0,5% ASN-Tet.-spez. CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen (Abb.

12b). Die Tiere, die *i.p.* infiziert wurden, entwickelten zu beiden Zeitpunkten im Vergleich ca. 1% ASN-Tet.-spez. CD8⁺T-Zellen. In der Memory-Phase (Tag 41) wurde die Häufigkeit an ASN-Tet.-spez. CD8⁺T-Zellen erneut gemessen. Diese betrug 0,4% in der L-ASN-Gruppe und 0,3% in der ASN-Gruppe. *I.p.* infizierte Tiere wiesen 0,6% auf (Abb. 12b). Die Frequenz OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8⁺T-Zellen wird in der Abbildung 12c dargestellt. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine zweifache Behandlung mit ASN oder L-ASN eine Immunisierung mit Bildung ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen induziert.

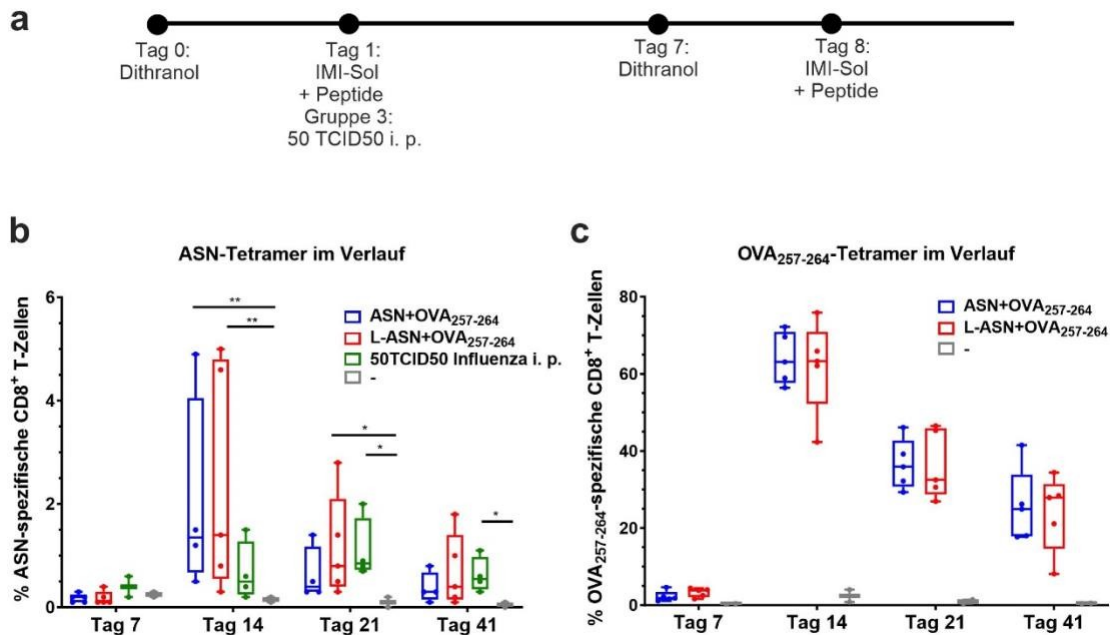


Abbildung 12. Zweifache Immunisierung mit ASN oder L-ASN führt zur Bildung peptidspezifischer CD8⁺T-Zellen. a) Behandlungsschema. C57BL/6 Mäuse wurden durch die Applikation von 25 mg Dithranol (0,3 µg/mg) und 50 mg IMI-Sol auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA₂₅₇₋₂₆₄ (100 µg) und ASN oder L-ASN (100 µg) immunisiert. b) Durchflusszytometrische Messung der Frequenz ASN-spezifischer CTLs im peripheren Blut durch Tetramer-Färbung 7, 14, 21 bzw. 41 Tage nach der ersten Behandlung. c) Durchflusszytometrische Messung der Frequenz OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CTLs im peripheren Blut nach 7, 14, 21 und 41 Tagen. OVA₂₅₇₋₂₆₄ diente als interne Kontrolle. Die graphische Darstellung als Box- und Whisker-Diagramm zeigt die Einzelwerte mit dem Median und Standardabweichung (n = 5). Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest (*p < 0,05, **p < 0,01).

Neben einer hohen Frequenz an Effektor- und Gedächtnis-T-Lymphozyten spielt ihre funktionelle Qualität eine entscheidende Rolle bei der Produktion effektiver Impfstoffe. Die Effizienz der CD8⁺T-Zell-Antwort hängt entscheidend von der TCR-Bindungsstärke an Peptid-MHC ab, d. h. von der TCR-Bindungsavidität (Carretero-Iglesia et al., 2020). In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass eine Erhöhung der funktionellen Avidität der T-Zellen eng mit einer effizienten Virusabwehr verbunden ist (Speiser et al., 1992; Alexander-Miller et al., 1996; Gallimore et al., 1998). Unter anderem hängt die funktionelle Avidität von T-Zellen auch mit der für die Impfung verwendeten Antigen- und Adjuvanz-Dosis zusammen, wobei

steigende Antigendosen mit einer geringeren T-Zell-Avidität korrelieren (Alexander-Miller et al., 1996; Carretero-Iglesia et al., 2020).

Um die biologische Relevanz der TCI gegen Influenza zu überprüfen, wurde nachfolgend ein Influenza-Pneumonie-Modell verwendet.

4.2.4 Die Immunisierung mit ASN oder L-ASN führt zur Erhöhung des Überlebens nach der Virus-Challenge

Im folgenden Experiment wurde der Effekt einer zweifachen Immunisierung (DIVA²) mit den Influenza-Antigenen ASN und L-ASN untersucht. Weiter wurde die Peptiddosis austitriert und die biologische Relevanz der Immunisierung in einem Influenza-Pneumonie-Modell untersucht. Mit dem Ziel, eine höhere Anzahl peptidspezifischer CD8⁺T-Zellen zu generieren, wurde vor der ersten Immunisierung eine Dithranol-Vaseline mit höherer Konzentration des Adjuvanz verwendet (0,6 µg/mg).

Die Tiere wurden mit ASN oder L-ASN nach dem in Abbildung 13a dargestellten Schema immunisiert. Als interne Kontrolle wurden sie zusätzlich mit dem Ovalbumin-Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisiert. Als Positivkontrolle wurde eine Gruppe durch die *i.p.* Applikation von 50 TCID₅₀ Influenzavirus PR8 immunisiert. Anschließend wurde die Anzahl an peptidspezifischen CD8⁺T-Zellen am Tag 7, 14, 21 und 32 nach Immunisierung analysiert. Um den Impferfolg zu überprüfen, wurden die Tiere in der Memory-Phase (am Tag 37) mit 100 TCID₅₀ Influenza PR8 *i.n.* infiziert und das Überleben der Tiere nach der Infektion beobachtet.

Eine Woche nach der zweiten Immunisierung (Tag 14) wurde die höchste Frequenz ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen gemessen (Abb. 13b). Eine Immunisierung mit 100 µg Peptid führte im Median zu einer 4-5-fachen Erhöhung antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen. Beispielsweise induzierten 30 µg ASN-Peptid 0,6% und 100 µg des Peptids 2,4% ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen. Die Applikation von 100 µg L-ASN Peptid induzierte mit 4,1% die stärkste Immunreaktion nach TCI. Ausschließlich die intraperitoneale Injektion von 50 TCID₅₀ erhöhte die Population auf 5%. In der Memory-Phase (Tag 32) wurden geringere Frequenzen an ASN-spezifischen CD8⁺T-Zellen gemessen (Abb. 13). Die Frequenz lag bei den mit 100 µg immunisierten Tieren bei 0,5% (ASN) und 1,5% (L-ASN). Nach *i.p.* Injektion belief sich die Zahl auf 1%. Grundsätzlich wurden bei den mit L-ASN immunisierten Tieren statistisch signifikant höhere Werte ASN-spezifischer T-Zellen beobachtet.

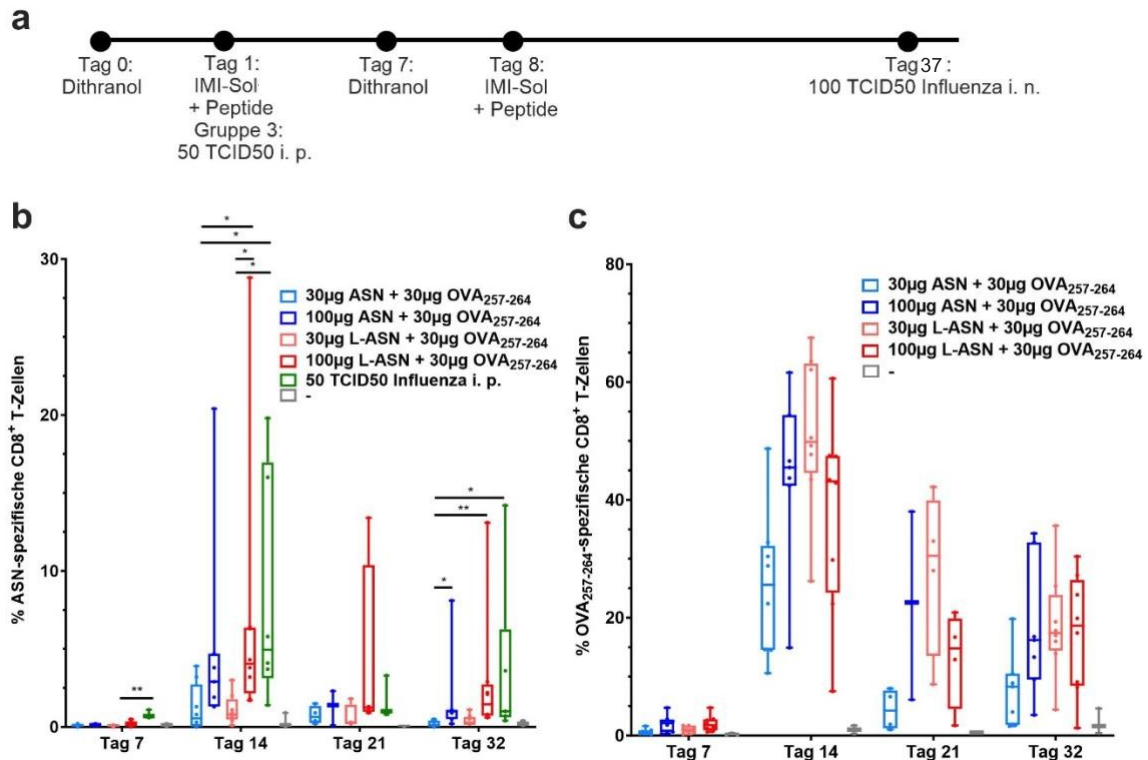


Abbildung 13. Die Applikation höherer Mengen an ASN oder L-ASN führt zu einer höheren CD8⁺T-Zellantwort. a) Behandlungsschema. C57BL/6 Mäuse wurden durch die Applikation von 25 mg Dithranol (Tag 0: 0,625 µg/mg, Tag 7: 0,3125 µg/mg) und 50 mg IMI-Sol auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) und ASN oder L-ASN immunisiert. b) Durchflusszytometrische Messung der Frequenz ASN-spezifischer CTLs im peripheren Blut durch Tetramer-Färbung. c) Durchflusszytometrische Messung der Frequenz SIINF-spezifischer CTLs im peripheren Blut. Die graphische Darstellung als Box- und Whisker-Diagramm zeigt die Einzelwerte mit dem Median und Standardabweichung (n = 6 - 8). Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest (*p<0,05). Die Daten entstammen von zwei unabhängigen Experimenten.

Am Tag 37 wurden die immunisierten Tiere *i.n.* mit einer letalen Dosis (100 TCID50) an Influenza PR8 infiziert. Zur Ermittlung der letalen Dosis wurden vorher unbehandelte Tiere mit verschiedenen Dosen von Influenza PR8 infiziert und das Überleben beobachtet (siehe Anhang). Infiziert wurden nur die Tiere, die mit 100 µg Peptid behandelt wurden. In Abbildung 14a ist die Gewichtsentwicklung nach Infektion dargestellt. Die Überlebenskurve (Abb. 14b) verdeutlichte ein längeres Überleben bei den Tieren, die mit ASN immunisiert wurden (42%) im Vergleich zu den Tieren, die mit L-ASN behandelt wurden (25%). Das Überleben betrug bei den *i.p.* immunisierten Tieren 100% und bei den unbehandelten Tieren 0%.

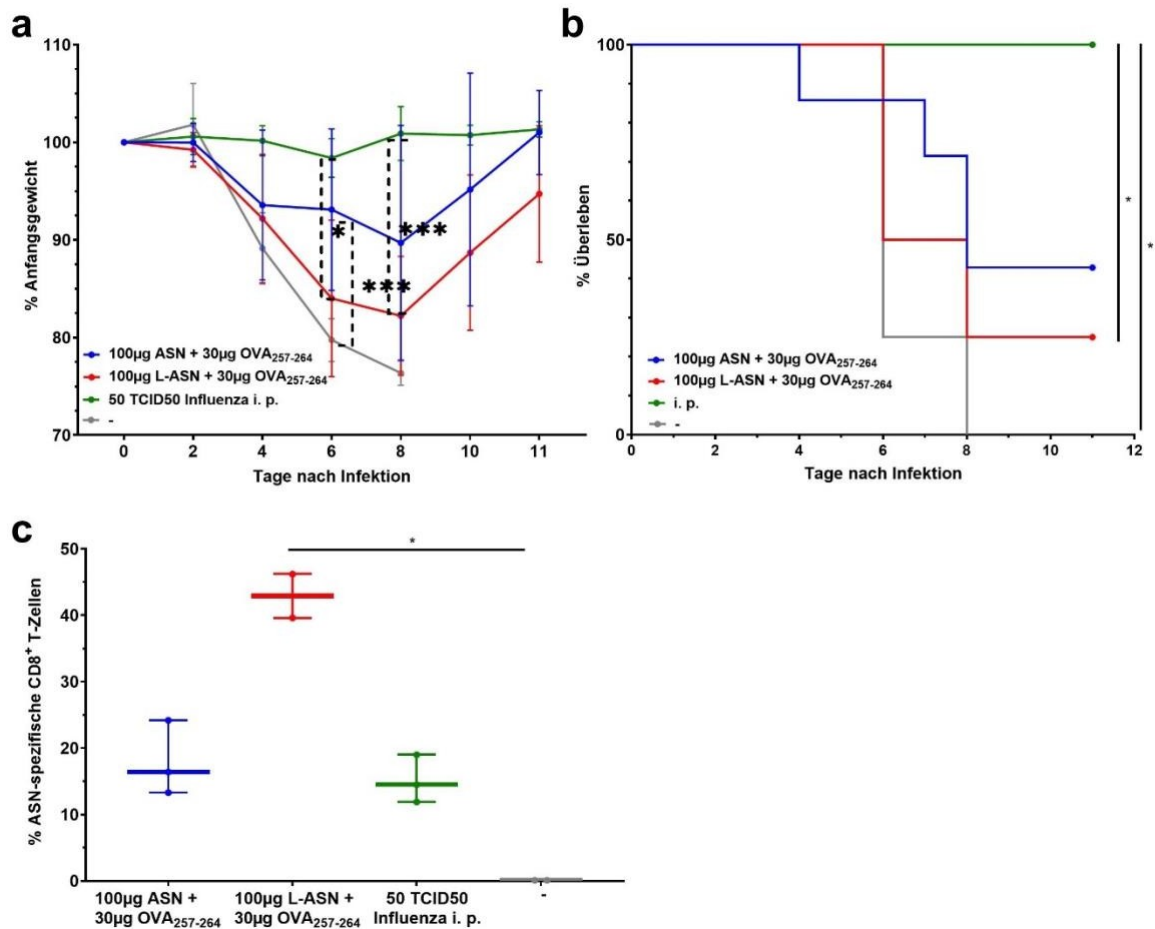


Abbildung 14. Überleben nach zweimaliger Immunisierung mit 100 µg ASN oder 100 µg L-ASN. C57BL/6 Mäuse wurden nach dem in der Abbildung 13 a dargestellten Behandlungsschema durch die Applikation von 25 mg Dithranol (Tag 0; 0,6 µg/mg, Tag 7: 0,3 µg/mg in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) und ASN oder L-ASN immunisiert. Am Tag 37 wurden die Tiere *i.n.* mit einer letalen Dosis Influenza PR8 infiziert. **a**) Gewichtsverlauf der Tiere nach der Infektion. Am Tag 6 und 8 konnte mittels t-Test-Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen L-ASN und Influenza festgestellt werden. Ebenfalls bestand eine Signifikanz nach 6 Tagen zwischen ASN-Immunisierung und Influenza. Im Vergleich zur Kontrolle wies eine ASN-Immunisierung nach 6 Tagen einen signifikanten Unterschied auf. **b**) Überlebenskurve nach der Infektion. **c**) Durchflusszytometrische Messung der Frequenz ASN-spezifischer CTLs im peripheren Blut. Die graphische Darstellung als Box- und Whisker-Diagramm zeigt die Einzelwerte mit dem Median und Standardabweichung (n = 6 - 8). Statistische Analyse des Überlebens mittels Mantel-Cox Test. (*<0,05; ***<0,001)

Die Analyse ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen ergab die höchste Frequenz an Zellen bei Tieren nach L-ASN Immunisierung (Abb. 14c). Dieses Ergebnis zeigt, dass die ASN-spezifischen CD8⁺T-Zellen funktionsfähig sind und zu einem erhöhten Überleben nach der Infektion mit einer letalen Dosis an Influenza PR8 führen.

Zur weiteren Verbesserung des Überlebens wurde im folgenden Experiment das optimierte Schema des Abschnittes 4.1.2 und eine zweifach höhere Antigenosis verwendet, um die Effizienz der Stimulation weiter zu erhöhen.

4.2.5 Die Optimierung des Immunisierungsprotokolls führt zur weiteren Erhöhung des Überlebens nach der Virus-Challenge

Mit dem Ziel, eine bestmögliche CD8⁺T-Zellantwort zu erreichen, wurden die Mäuse mit 200 µg ASN oder L-ASN nach dem optimierten DIVA-Protokoll immunisiert. Neben der Anwendung des optimierten Immunisierungsprotokolls und einer erhöhten Antigendosis von 200 µg wurde überlegt, ob zusätzliche Strategien die T-Zellantwort verstärken könnten. Die TCI mit Dithranol und IMI-Sol+ führt zur Bildung von CD8⁺T-Zellen. Die Population der CD4⁺T-Helferzellen tragen unter anderem zur Unterstützung und Verstärkung der CD8⁺T-Zellantwort bei. Deshalb wurde in diesem Versuch das Immunisierungsprotokoll durch das weitere Influenza-Peptid HA₁₂₇₋₁₃₇ (SFERFEIFPKE, KLII) erweitert. Das Peptid bindet an MHC-II und könnte entsprechend eine CD4⁺T-Zellantwort auslösen.

Die Abbildung 15a stellt das Immunisierungsschema dar. Die Tiere der zwei ersten Gruppen wurden nach DIVA^{2opt} mit 200 µg ASN oder L-ASN pro Ohr immunisiert. Die Tiere der dritten und vierten Gruppe wurden mit 200 µg ASN oder L-ASN und 200 µg HA₁₂₇₋₁₃₇ pro Ohr immunisiert. Als interne Kontrolle wurden sie zusätzlich mit dem Ovalbumin-Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ behandelt. Als Positivkontrolle wurde die fünfte Gruppe durch die *i.p.* Gabe von 50 TCID₅₀ Influenzavirus PR8 immunisiert. Anschließend wurde die Anzahl ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Applikation von 200 µg Peptid führte grundsätzlich zu einer etwa dreifach höheren Frequenz an ASN-spezifischen CD8⁺T-Zellen im Vergleich zu 100 µg (Abb. 15b). Am Tag 14 nach der Infektion konnten nach ASN- Behandlung 8,4% und nach L-ASN-Immunisierung 10,9% CD8⁺T-Zellen evaluiert werden (Abb. 15b). Die simultane Applikation von HA₁₂₇₋₁₃₇ erhöhte die Anzahl signifikant auf 52% bzw. 44%. Die *i.p.* Infektion mit 50TCID₅₀ induzierte 7,0% antigenspezifische CD8⁺T- Zellen.

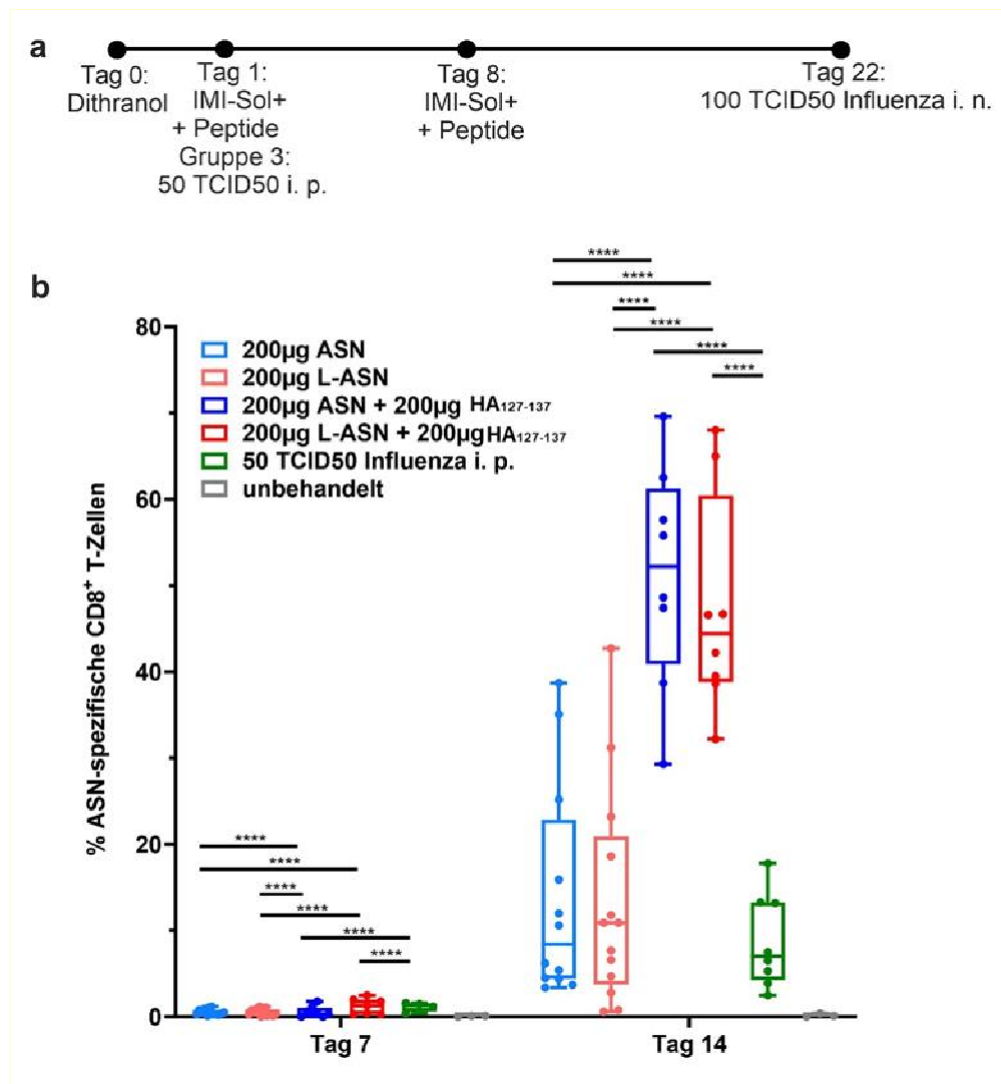


Abbildung 15. Die zusätzliche Gabe eines MHC-II-Peptids führt zu einer höheren CD8⁺T-Zellantwort. a) Behandlungsschema. C57BL/6 Mäuse wurden durch die Applikation von 25 mg Dithranol (0,6 µg/mg) und 50 mg IMI-Sol+ auf die Ohrhaut transkutan gegen ASN oder L-ASN und ggf. dem HA₁₂₇₋₁₃₇-Peptid immunisiert. **b)** Durchflusszytometrische Messung der Frequenz ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen im peripheren Blut. Die Daten entstammen drei unabhängigen Experimenten. Die graphische Darstellung als Box- und Whisker-Diagramm zeigt die Einzelwerte mit dem Median und Standardabweichung (n = 8 - 12). Statistische Analyse mittels zweiseitigen ANOVA-Tests und Bonferroni Posthoc Test(****p<0,0001).

Zur Überprüfung der biologischen Relevanz der Immunisierung, wurden die Tiere zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung (Tag 22) mit 100 TCID50 Influenza PR8 *i.n.* infiziert und das Überleben der Tiere nach der Infektion verfolgt. Anschließend wurde die Frequenz an ASN-spezifischen CD8⁺T-Zellen in der Durchflusszytometrie detektiert und die Effektorfunktion der T-Zellantwort durch ein ELISpot-Assay getestet.

Die Applikation von 200 µg ASN führte zu einer Überlebensrate von 33,3%, während L-ASN, trotz der starken Gewichtsreduktion, das Überleben auf 46% erhöhte (Abb. 16a, b). Die Kombination mit dem Peptid HA₁₂₇₋₁₃₇ erzeugte mit 80% die höchste Überlebensrate mit der simultanen Applikation von ASN. Die kombinierte Anwendung von L-ASN und HA₁₂₇₋₁₃₇

ermöglichten ein 50%iges Überleben. Bei den *i.p.* immunisierten Tieren betrug die Überlebensrate 100% und bei den unbehandelten Tieren 16,7%.

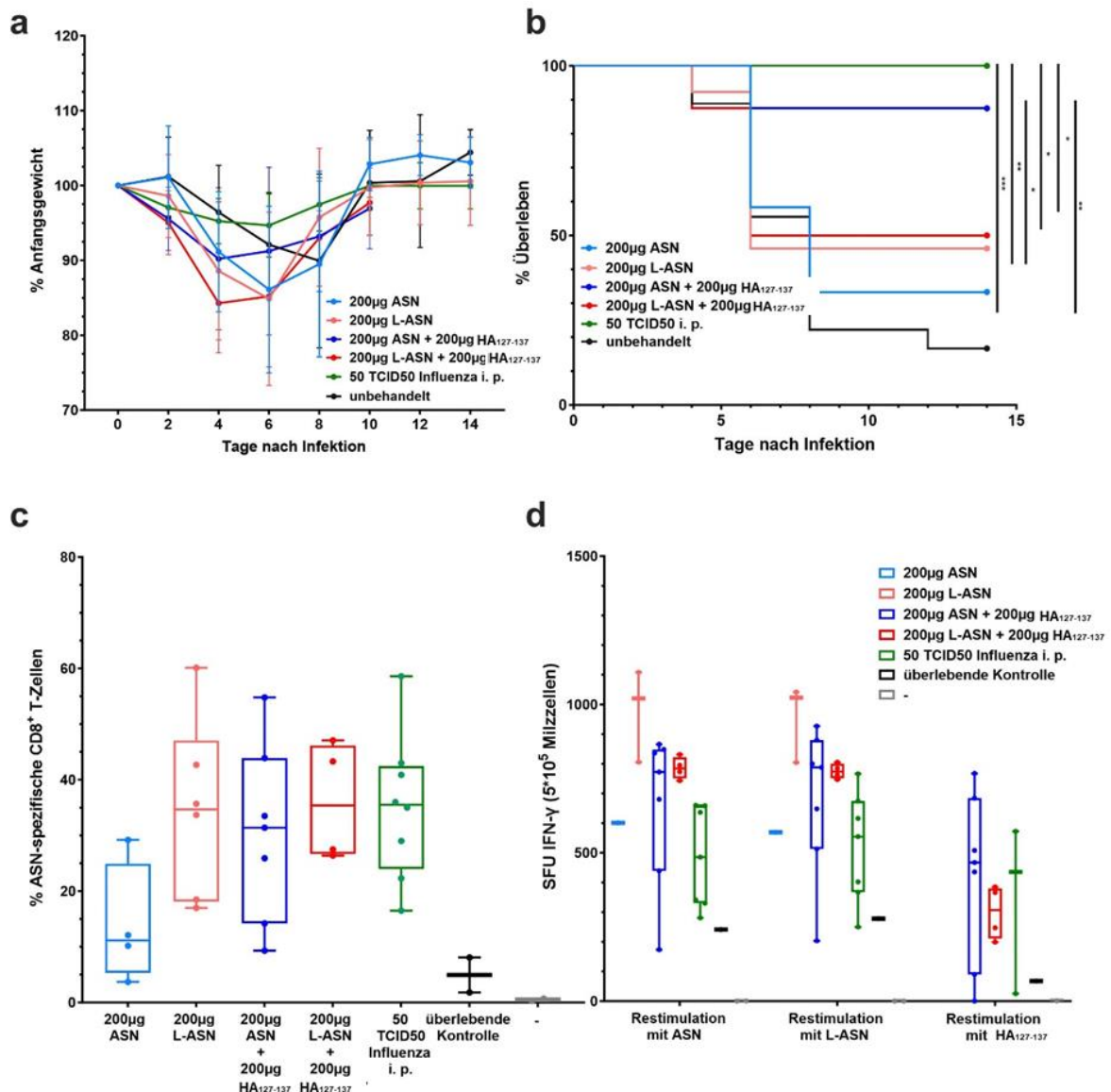


Abbildung 16. Erhöhtes Überleben bei zusätzlicher Gabe eines Influenza MHC-II-Peptids. Behandlungsschema: Applikation von 25 mg Dithranol (0,6 µg/mg) und 50 mg IMI-Sol+ auf die Ohrhaut transkutan gegen ASN oder L-ASN und ggf. dem HA₁₂₇₋₁₃₇-Peptid. Am Tag 22 wurden die Tiere *i.n.* mit einer letalen Dosis Influenza PR8 infiziert. **a)** Gewichtsverlauf der Tiere nach der Infektion. **b)** Überlebenskurve nach der Infektion. Statistische Analyse des Überlebens mittels Mantel-Cox Tests ($n = 8 - 12$). Ergebnisse sind statistisch signifikant (**) $p = 0,0031$. **c)** Durchflusszytometrische Messung der Frequenz ASN-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut. Die graphische Darstellung als Box- und Whisker-Diagramm zeigt die Einzelwerte mit dem Median und Standardabweichung. Es konnte kein signifikanter Unterschied evaluiert werden mittels Kruskal-Wallis-Test **d)** Am Tag 15 nach Infektion wurden die Milzzellen der überlebenden Mäuse in IFN-γ-ELISpot mit den Antigenen ASN, L-ASN und HA₁₂₇₋₁₃₇-Peptid (1 µg/ml) restimuliert und die Anzahl IFN-γ-produzierender Einheiten mit einem ELISpot-Reader gemessen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Median und Standardabweichung. Es konnte kein signifikanter Unterschied evaluiert werden mittels Kruskal-Wallis-Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die Daten entstammen drei unabhängigen Experimenten.

Fünfzehn Tage nach der *i.n.* Influenza-Gabe wurde bei den überlebenden Tieren die Frequenz ASN-spezifischer T-Zellen gemessen (Abb. 16c). Bei den überlebenden Tieren wurden, mit

Ausnahme ASN-immunisierter Tiere, vergleichbare Frequenzen an ASN-spezifischen CD8⁺T-Zellen gemessen. Die medianen Werte betragen nach L-ASN sowie L-ASN + HA₁₂₇₋₁₃₇ 35%. Die Kombination aus ASN und HA₁₂₇₋₁₃₇ induzierte 31% antigenspezifische T-Zellen. Eine Immunisierung mit ASN stimulierte mit 14% die geringste Anzahl ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen. Mit den Milzzellen überlebender Mäuse wurde ein ELISpot-Assay durchgeführt (Abb. 16d). Nach Restimulation mit ASN, L-ASN und HA₁₂₇₋₁₃₇ wurde die Produktion von IFN- γ induziert. Die höchsten Frequenzen wurden bei den mit ASN- und L-ASN-immunisierten und restimulierten Zellen erfasst. Die kombinierte Anwendung mit HA₁₂₇₋₁₃₇ reduzierte die Sekretion des Entzündungsmediators. Die geringste Konzentration wurde nach Immunisierung mit 50 TCID₅₀ Influenza *i.p.* detektiert.

MHC-Klasse-II reguliert die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen. Die Immunisierung mit MHC-Klasse-II Epitopen wie HA₁₂₇₋₁₃₇ kann potenziell ihre Aktivierung zu Plasmazellen und somit die Antikörperproduktion auslösen (Katakaneni und Jin, 2019). Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt die Antikörpertiter in einem ELISA-Assay gemessen.

4.2.6 Antikörperproduktion nach DIVA² mit ASN, L-ASN und HA₁₂₇₋₁₃₇

Die Antikörperbildung gegen das Influenzavirus von überlebenden Tieren aus 4.2.5 wurde in einem ELISA-Assay gemessen. Anti-Hämagglutinin-Antikörper wurden lediglich zur Überprüfung der Funktion des Assays verwendet. Analysiert wurde die Produktion der Antikörperklassen IgM, IgG1 und IgG2a (Abb. 17). Bei den *i.p.* immunisierten Tieren waren Antikörper der Klassen IgM, IgG1 und IgG2a nachweisbar. Bei den überlebenden Tieren, die durch DIVA^{2opt} immunisiert wurden, waren Antikörper der Klasse IgM und IgG1 nachweisbar. Der im Median mit $2 \cdot 10^1$ höchste IgM-Titer wurde nach L-ASN/100 TCID₅₀ *i.n.* und nach ASN/HA₁₂₇₋₁₃₇/100 TCID₅₀ *i.n.* induziert (Abb. 17a), während letzteres eine größere Schwankungsbreite aufwies. Die intraperitoneale Applikation von 50 TCID₅₀ Influenza führte zu dem höchsten IgG1-Antikörpertiter ($2 \cdot 10^2$) (Abb. 17 b), während die anderen Peptide bzw. Peptid-Kombinationen einen IgG1-Titer von im Median $1 \cdot 10^1$ induzierten. IgG2a wurde ausschließlich nach Immunisierung mit ASN und 50 TCID₅₀ *i.p.* gebildet (Abb. 17c). Nach Immunisierung mit ASN bzw. ASN + HA₁₂₇₋₁₃₇ wurden im ELISA keine der Antikörpersubtypen ohne Infektion detektiert. Die primäre Immunantwort konnte erfolgreich mit ASN und etwas effektiver mit L-ASN induziert werden. Es wurde keine B-Zellantwort induziert.

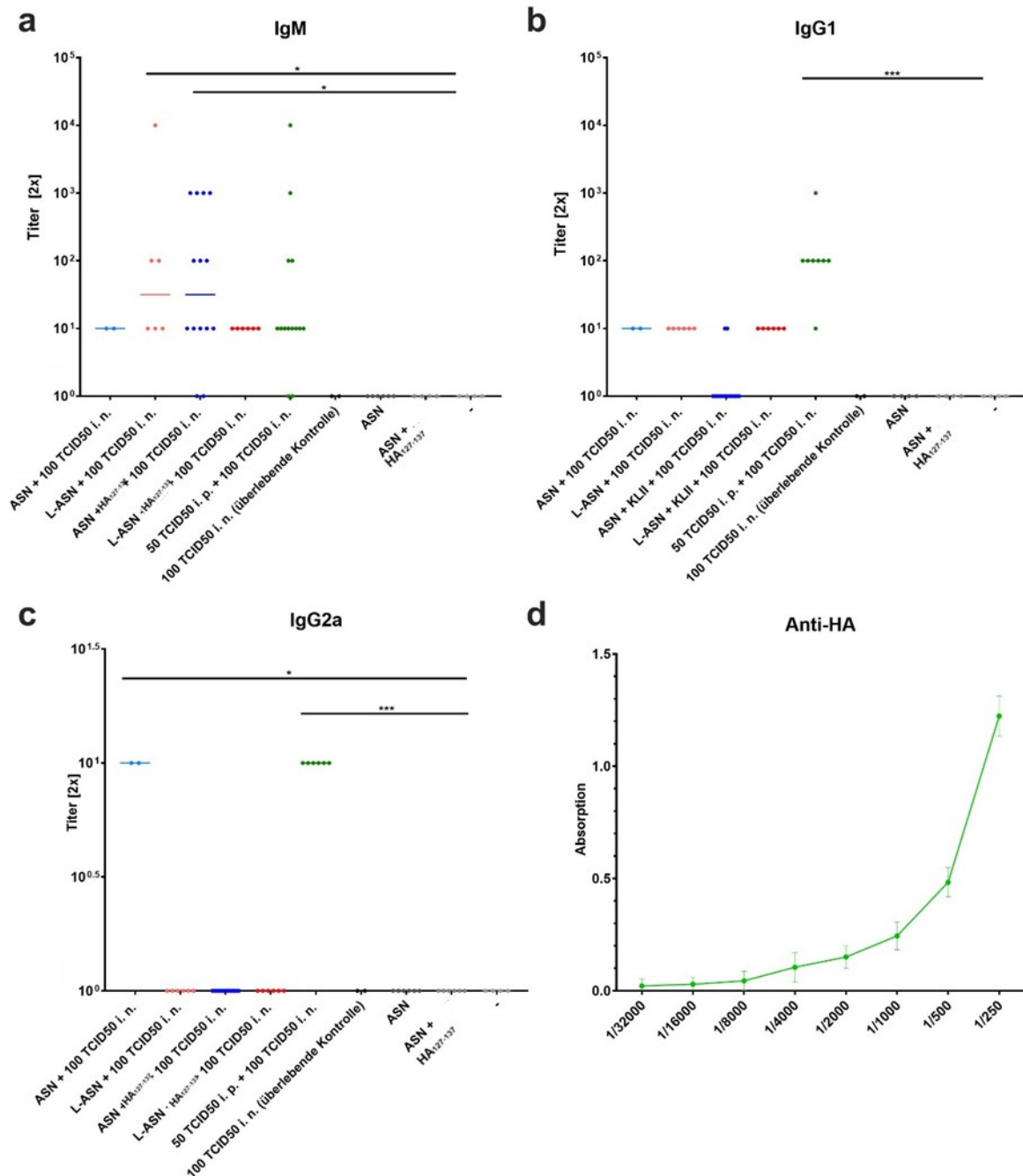


Abbildung 17. Antikörpernachweis. Immunisierung durch die Applikation von 25 mg Dithranol (1/16% in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol+ auf die Ohrhaut transkutan gegen ASN oder L-ASN und ggf. dem HA₁₂₇₋₁₃₇(KLII)-Peptid gelöst in Basiscreme. Am Tag 22 wurden die Tiere *i.n.* mit einer letalen Dosis Influenza PR8 infiziert. **a)** Nachweis von IgM in ELISA-Assay. **b)** Nachweis von IgG1 in ELISA-Assay. **c)** Nachweis von Ig2a in ELISA-Assay. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Median (n = 2 - 14). **d)** Überprüfung der Funktion des Assays mithilfe von anti- Hämagglutinin-Antikörpern. Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

5 Diskussion

Impfstoffe sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Immunität gegen eine bestimmte Krankheit verbessern. Sie gehören zu den wichtigsten Erfindungen der Medizin. Mehrere Krankheiten wie Masern, Röteln, Tetanus, Keuchhusten und Gelbfieber sind bis heute durch viele herkömmliche Impfstoffe unter Kontrolle (Li et al., 2011). Die meisten Impfstoffe, die per Injektion verabreicht werden, sind zwar wirksam, aber sie bergen nach wie vor Probleme wie Schmerzen, nadelbedingte Beschwerden oder Verletzungen, das Erfordernis von medizinisch geschultem Personal und Probleme bei der Lagerung oder dem Transport des Impfstoffes. Die Wiederverwendung von Nadeln in der Dritten Welt verursacht den Tod von mindestens 1,3 Millionen Menschen pro Jahr durch Hepatitis B und AIDS (Miller & Pisani 1999). Viele dieser Probleme könnten durch die Entwicklung nadelfreier Impfstoffe vermieden werden. In den letzten Jahren wurde die Haut als alternativer Ort für die Verabreichung von Impfstoffen untersucht, da die im Haut- und Muskelgewebe reichlich vorhandenen APCs Antigene übertragen und eine transkutane Immunisierung einleiten können (Glenn et al. 2003a). Die transkutane Immunisierung (TCI) ist eine neue Impfmethode, bei der ein Adjuvans und ein Impfstoffantigen lokal auf die intakte Haut aufgetragen werden, um eine Immunantwort auszulösen (Glenn et al. 1998). Diese Impfmethode könnte prinzipiell gegen jeden Krankheitserreger angewendet werden.

Die saisonale Grippe ist eine weit verbreitete und schwerwiegende jährliche Erkrankung, die in der gesamten Bevölkerung zu einer hohen Morbidität und wirtschaftlichen Beeinträchtigungen führt; ältere und immungeschwächte Menschen sind besonders anfällig für schwerwiegende Folgeerkrankungen und Todesfälle (Smetana et al. 2018). Die jährliche weltweite Belastung durch die Influenza wird auf fast 1 Milliarde Infizierte, 3 bis 5 Millionen Fälle von schwerer Krankheit und 250 000 bis 500 000 Todesfälle geschätzt. Die meisten grippebedingten Todesfälle in den Industrieländern ereignen sich bei älteren Menschen im Alter von 65 Jahren oder älter (WHO Factsheet 2003). Der demografische Wandel hin zu einer alternden Gesellschaft hat wichtige Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheitspolitik und pharmazeutische Innovationen. So kann beispielsweise die Primärprävention durch Impfung die Belastung durch Influenzaerkrankungen bei älteren Menschen wirksam verringern. Aufgrund der mit dem Altern einhergehenden Immunoseneszenz sind ältere Menschen jedoch möglicherweise nur unzureichend durch Impfungen geschützt. Darüber hinaus erhöht das Zögern der jüngeren Bevölkerung, sich impfen zu lassen, die Wahrscheinlichkeit von zirkulierenden Infektionskrankheiten und damit die Exposition. Damit ist die Entwicklung immunogener Impfstoffe eine notwendige Bestrebung zur Erhöhung der Wirksamkeit und zur Verringerung der Morbidität und Mortalität.

Aktuelle Impfstoffe gegen Influenza lösen eine humorale Immunität gegen die Oberflächen-Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase aus (Grebe et al. 2008). Doch aufgrund von der Antigendrift (Taubenberger et al. 2010) mutieren diese Oberflächen-Glykoproteine jedoch schnell, so dass eine humorale Immunität gegen einen Influenza-Stamm wahrscheinlich nicht vor nachfolgenden Infektionen mit anderen Influenza-Stämmen schützt (Grebe et al. 2008). Im Gegenteil erkennen CD8⁺T-Zellen typischerweise die konservierten internen Proteine von Influenza und haben daher das Potenzial, einen stammübergreifenden Schutz zu bieten (Grant et al. 2016). Influenza-spezifische CD8⁺T-Zellen spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Kontrolle und Genesung der Influenza-Erkrankung (McMichael et al. 1983, Sridhar et al. 2013, Wang et al. 2015). Einer der größten Nachteile der bestehenden Impfstoffe gegen Influenza ist, dass keine Stimulierung von CD8⁺T-Lymphozyten und damit auch keine zellvermittelte Immunität erfolgt (Dutta et al. 2016).

In ihrer bisherigen Arbeit wurde von der AG Radsak eine neue transkutane Impfmethode entwickelt, die aus der kombinierten Anwendung von Dithranol, Imiquimod und einem Peptid besteht (DIVA). Unter Verwendung von Ovalbumin-Peptiden als Modellantigene in Mäusen induzierte diese Immunisierungsmethode sowohl in der Priming- als auch in der Memory-Phase effiziente zytolytische CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen vom T_{H1}-Typ (Sohl et al. 2022).

Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Anwendung dieser TCI-Methode zur Immunisierung gegen das Influenza-Virus. In einem Mausmodell illustrierte diese Arbeit die Schutzwirkung der TCI mit Dithranol, Imiquimod und einem Influenza-Peptid. Von besonderem Interesse war die Untersuchung dieser neuartigen Impfmethode auf die Entstehung wirkungsvoller T-Zellantworten.

5.1 Optimierung des Immunisierungsschemas in dem Ovalbuminpeptid-Modell

Nach erfolgreicher Verbesserung der Aldara-Formulierung, gefolgt von der Entwicklung einer effizienteren IMQ-Nanoemulsion, wurde Letztere ausgehend von einer kristallinen Struktur zu einer soliden Form modifiziert, die eine optimierte Lagerung und Applikation ermöglichte. Hartmann und Kollegen veröffentlichten 2023 diese Strukturveränderung und forcierten die Adaptation der etablierten TCI nach DIVA mit der neuen Formulierung IMI-Sol+ hinsichtlich der Konzentration von Dithranol und Frequenz der DIVA (Hartmann et al., 2023). Sie stellten heraus, dass eine Wiederholung von DIVA (DIVA²) sowohl die Anzahl Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen als auch die Bildung von T-Gedächtniszellen induzierte und im Vergleich zu einer einmaligen Immunisierung deutlich erhöhte. Die Autoren betonten allerdings, dass die wiederholte Anwendung von Dithranol zu unangenehmen Hautirritationen bzw. Hyperinflammationen führen könnte, und dies der limitierende Faktor für eine mehr als 2-fache Wiederholung darstellt. Daher war der erste Schritt dieser Arbeit, die Dithranol-Applikation in

dem entwickelten Booster-Verfahren in dem OVA-Modell zu optimieren, indem bei dem DIVA²-Prozess auf eine zweite Dithranol-Anwendung verzichtet wurde. Im Gegenzug wurde die Peptid-Konzentration und die initiale Dithranol-Konzentration erhöht (DIVA^{2opt}). Tatsächlich konnte mit diesem Verfahren nicht nur das Auftreten von unangenehmen Hautirritationen/Entzündungen verhindert, sondern zusätzlich die Effizienz der Entwicklung OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8⁺T-Zellen erhöht werden (Abb. 9). Ebenfalls wurde das Resultat des publizierten DIVA²-Protokolls erfolgreich reproduziert. Der von Sohl et al. (2022) postulierte synergistische Effekt konnte entsprechend ebenfalls bei einmaliger Dithranol-Applikation verifiziert werden. Angesichts der Beobachtung, dass die Expression von TLR7 durch dendritische Zellen für die Induktion von T-Zell-Reaktionen nach der DIVA-Methode unerlässlich ist, erzeugen Monozyten, die durch Dithranol über die Sekretion chemotaktischer Faktoren in die Haut rekrutiert werden, ein einzigartiges pro-inflammatorisches Milieu, das durch IMQ verstärkt wird. Dies wiederum stellt den entscheidenden Faktor für die Differenzierung der dendritischen Zellen und ihre Migration in die drainierenden Lymphknoten dar, wo eine verstärkte Antigenpräsentation durch die dendritischen Zellen eine überlegene T-Zell-Reaktion hervorruft (Schetters et al., 2020; Sohl et al., 2022). Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass die Stimulation von Keratinozyten *in vitro* mit Dithranol die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen hervorruft (Gröne, 2002; Lange et al., 1998; Sun et al., 2017). Diese Interaktion ist in der Lage, in immunisiertem Hautgewebe ein entzündliches Milieu zu erzeugen, das die Differenzierung von DCs unterstützt. 24 Stunden nach der Applikation von Dithranol führt die Anwendung von IMQ zur Aktivierung entzündlicher DC-Populationen auf eine TLR7-abhängige Weise (Stein et al., 2011). Diese in vorherigen Arbeiten nachgewiesene Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine induziert durch Dithranol scheint in Form einer initialen Behandlung mit höherer Konzentration ausreichend zu sein.

5.2 Die TCI mit Dithranol, Imiquimod und ASN fördert die Entstehung hochqualitativer CD8⁺ T-Zellen

Nach erfolgreicher Optimierung des DIVA-Protokolls in dem Ovalbuminpeptid-Modell erfolgte im zentralen Teil dieser Arbeit die Etablierung eines Immunisierungsschemas für eine TCI mit dem Influenza-Peptid ASN. Das Peptid wurde sowohl in seiner ursprünglichen Form (ASN), als auch als modifizierte Form mit zusätzlichen Arginin- bzw. Leucin-Resten am N-Terminus (R-ASN, L-ASN) verwendet.

Der Einsatz verlängerter Peptid-Sequenzen geht u. a. auf die Arbeit von Mo und Kollegen aus dem Jahr 1999 zurück (Mo et al., 1999). Sie beschreiben einen Vorteil bei der cytosolischen

Synthese von MHC-I-Peptiden durch Proteasome und dessen erfolgreiche Präsentation auf den APCs. Die meisten Peptide der MHC-Klasse-I, die dem Immunsystem präsentiert werden, entstehen während des Proteinabbaus durch das Proteasom. Der Einsatz von Plasmid-Minigenkonstrukten, die für Oligopeptide unterschiedlicher Länge kodieren, führte nicht zu einer Verringerung der Präsentation von cytosolisch exprimiertem ASN oder von N-terminal verlängerten Versionen, was darauf schließen lässt, dass Aminopeptidase(n) an der Verkürzung dieser N-verlängerten Varianten beteiligt sind. Wenn die N-Termini dieser Peptide, die um das Dreifache verlängert sind, durch Acetylierung blockiert wurden, zeigten sie eine Resistenz gegen die Hydrolyse durch zelluläre Aminopeptidasen. Die Verlängerung schützt vor der endogenen Degeneration des Peptids. Die verschiedenen Aminopeptidasen können dementsprechend vor einer Acetylierung schützen und die N-Termini dieser präsentierten Peptide auf ihre korrekte Größe zuschneiden (Mo et al., 1999).

Eine Phase 2b/3 Studie von Hung et al. (2015) beschreibt bereits die topische Applikation von Imiquimod vor der intradermalen Verabreichung eines trivalenten Influenza-Impfstoffs. Dies führte zu einer signifikanten Verbesserung der Immunogenität gegenüber den geimpften Influenzastämmen bei jungen, gesunden Individuen. Darüber hinaus wurde die Immunogenität gegenüber nicht geimpften Stämmen erhöht (Kreuzprotektion), insbesondere gegenüber dem antigenisch abgedrifteten H3N2-Stamm des Jahres 2015, der nicht im empfohlenen Impfstoff 2013/14 enthalten war (Hung et al., 2014).

Die Durchführung der TCI mit den Influenza-Nukleopeptiden erfolgte zunächst mit einer einfachen DIVA mit 0,6 µg Dithranol und 100 µg Peptid. Dieses Immunisierungsschema induziert mit ASN und L-ASN die Produktion ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen und einer INF-γ-Sekretion, allerdings in einem unzureichenden Umfang, so dass das Prozedere basierend auf vorherigen Ergebnissen mit SIINFEKL erneut optimiert wurde. Es bestand dabei die Hypothese, dass die transdermale Anwendung vom ASN-Peptid bedingt durch seinen negativen GRAVY-Index (-1,10) und seiner geringen Hydrophobie (10,49) im Vergleich zum etablierten Ovalbumin-Peptid SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) GRAVY Index 0,49, Hydrophobizität 31,29) die Effektivität einer einfachen DIVA reduziert.

Es folgte der Ansatz mit einer 2-fachen DIVA mit zwei Dithranol-Applikationen in einer Konzentration von 0,3 µg/mg zur besseren Überwindung der Hautbarriere aufgrund der geringen Lipophilie. In einem zweiten experimentellen Ansatz von DIVA² enthielt die erste Anwendung die höhere Dithranol-Konzentration von 0,6 µg, während nachfolgend 0,3 µg eingesetzt wurde. Zusätzlich wurde die Peptid-Menge von 30 µg auf 100 µg titriert. Die effizienteste TCI erfolgt mit einer Konzentration von 100 µg Peptid und 0,6 µg/ml Dithranol (Abb. 12, 13). Die höhere Konzentration der Dithranol-Salbe vor der ersten Immunisierung

hatte einen positiven Einfluss auf die Frequenz der ASN-spezifischen CD8⁺T-Zellen. Dieser Effekt hielt in der Memory-Phase auch am Tag 32 bei Immunisierung mit 100 µg L-ASN im Vergleich zu den anderen experimentellen Ansätzen an, obwohl sich grundsätzlich die Anzahl von Effektorzellen im Laufe der Zeit reduzierte (Abb. 13). Diese grundlegende Reduktion ist allerdings immunologisch betrachtet im Rahmen der Immunreaktion physiologisch „normal“.

Die T-Zell-Reaktion auf eine akute Infektion kann üblicherweise in drei Phasen eingeteilt werden: Priming und Expansion, Auflösung und Kontraktion sowie Gedächtnis. Während der ersten Phase teilen sich naive CD8⁺T-Zellen und differenzieren sich zu Effektorzellen, die die Fähigkeit erlangen, IFN-γ, TNF-α und zytotoxische Proteine wie Granzyme und Perforin zu produzieren (Kaech & Ahmed, 2001; Kaech & Cui, 2012; Laidlaw et al., 2016). Nach der viralen Clearance erfolgt eine Kontraktion und Auflösung, bei der die Mehrheit der CD8⁺ T-Effektorzellen absterben und nur etwa 5–10% überleben. Diese überlebenden Zellen treten in die dritte Phase – die "Gedächtnisphase" – ein und werden durch Signale wie IL-7 und IL-15 langfristig aufrechterhalten. Obwohl es eine erhebliche Heterogenität unter den langlebigen CD8⁺T-Zellen gibt, werden sie typischerweise in residente (TRM), Effektor- (TEM) und zentrale (TCM) Gedächtniszellen unterteilt. Unterschiede in ihrer Lokalisierung, ihrer Erinnerungsfähigkeit und ihren Effektor-Funktionen ermöglichen es ihnen, überlappende Schutzschichten gegen eine mögliche Reinfektion zu bilden (Laidlaw et al., 2016; Stary et al., 2015). Daher würde sich eine detaillierte Charakterisierung der Population der T-Zellen in weiterführenden Studien anbieten.

Die mit 100 µg Peptid immunisierten Tiere wurden *i.n.* mit einer letalen Influenza-Dosis infiziert. Interessanterweise war die Überlebensrate der Mäuse nach TCI mit ASN deutlich höher im Vergleich zu L-ASN, obwohl Letztere eine höhere Frequenz ASN-spezifischer CD8⁺T-Zellen aufwies (Abb. 14). Im Median war die Population nach ASN- Immunisierung im gleichen Bereich wie nach intraperitonealer Injektion von 50 TCID₅₀ Influenza und diese Tiere überlebten zu 100%. Es scheint, dass die reine Anzahl Antigen-spezifischer CD8⁺T-Zellen nicht unbedingt gleichbedeutend mit der Schutzqualität ist. Dieses Phänomen wird im nächsten Kapitel weiter diskutiert, in dem die transkutane Immunisierung um ein weiteres Peptid ergänzt wurde, das die MHC-II-Klasse repräsentiert und entsprechend die CD4⁺T- Zellpopulation anspricht.

5.3 Erhöhung der Effizienz der Immunisierung durch die kombinierte Anwendung mit einem MHC-II-Peptid

Im folgenden Schritt dieser Studie sollte die Effizienz der TCI mit Blick auf das Überleben der Mäuse nach intranasaler Infektion mit Influenza PR8 weiter optimiert werden. Eine

Kombination mit einem weiteren Peptid (HA₁₂₇₋₁₃₇) der MHC-II-Klasse zielte auf die Induktion von CD8⁺ und CD4⁺T-Zellen ab (Abb. 15). Die Immunisierung erfolgte mit dem optimierten DIVA² Protokoll, bei dem die zweite Dithranol-Applikation entfiel. Die Peptid-Menge wurde dabei auf 200 µg ASN bzw. L-ASN erhöht. HA₁₂₇₋₁₃₇ wurde lediglich in einer Konzentration von 1 µg ergänzt. Beide Peptid-Varianten profitierten von der Verwendung des zusätzlichen MHC-II-Peptids, denn sie wiesen eine signifikant höhere Anzahl an ASN-spezifischen CD8⁺T-Zellen auf (Abb. 15). Erstaunlicherweise führte die kombinierte Variante mit ASN zu einer deutlich höheren Überlebensrate im Vergleich zu der Verwendung von L-ASN, die zu dem drittbesten Ergebnis führte (Abb. 16). Die Anzahl ASN-spezifischer CD8⁺Effektorzellen bei den überlebenden Tieren waren im Median etwa gleichauf, die IFN-γ-Sekretion in der kombinierten Variante ebenfalls. Die dahintersteckenden immunologischen und molekularen Mechanismen sollen nachfolgend diskutiert werden und könnten in der Zukunft ein interessanter Gegenstand der Forschung sein. Bekannterweise induzieren MHC-II-Peptide die Bildung von CD4⁺T-Zellen. Die Induktion systemischer CD8⁺T-Gedächtniszell-Antworten nach der TCI mit Dithranol und Imiquimod konnte in den Ergebnissen der Arbeit von Sohl (Sohl, Dissertation 2020) mit dem Auftreten einer verstärkten CD4⁺T-Helferzell-Antwort verknüpft werden. Die Mechanismen, die die Rolle von CD4⁺T-Helferzellen bei der Entstehung antigenspezifischer CD8⁺T-Gedächtniszellen beschreiben, sind vielfältig (Ahrends et al. 2017; Laidlaw et al. 2016; Phares et al. 2012). Einer der diskutierten Hilfsmechanismen durch CD4⁺T-Helferzellen ist die „APC-Lizensierung“ (Smith et al. 2004). Durch die Interaktion mit CD4⁺T-Helferzellen wird bei den APCs die Antigenpräsentation stimuliert und die Expression kostimulatorischer Moleküle hochreguliert. Lizensierte APCs rekrutieren naive CTLs und primen diese durch die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle effizienter. Die Sezernierung verschiedener Zytokine durch lizensierte APCs ist darüber hinaus mit der Expansion antigenspezifischer T-Zellen, der Differenzierung in T-Gedächtniszellen und deren Funktionalität assoziiert (Carreno et al. 2013; Waldmann et al. 2020). Darüber hinaus konnte auch eine direkte Wechselwirkung von CD4⁺T-Helferzellen und naiven CD8⁺T-Zellen durch CD40-CD40L verdeutlicht werden (Ballesteros-Tato et al. 2013).

Eine Amplifikation der Frequenz antigenspezifischer CD8⁺T-Effektorzellen erscheint auf Grundlage dieser Ergebnisse als notwendig. Die zweimalige Verabreichung der Kombi-TCI bei nur einmaliger Applikation von Dithranol vor der ersten Immunisierung bewirkte in der vorliegenden Arbeit eine Vervielfachung der Frequenz antigenspezifischer T-Effektorzellen in der Primärantwort (Abb. 15). Grundsätzlich konnte allerdings evaluiert werden, dass die Erhöhung der Peptiddosis das Ergebnis der Primärantwort bereits deutlich verbesserte. Carretero-Iglesia und Kollegen wiesen 2020 ebenfalls eine erhöhte Produktion Melan-A-spezifischer Effektorzellen nach Applikation hoher Peptid-Konzentrationen. Sie beschreiben, dass eine hohe Peptid-Menge die *in vivo* Expansion der Effektorzellen in der frühen Phase

nach der Immunisierung forciert und deren funktionelle Kompetenz und T-Zell-Bindungsavidität erhöht (Carretero-Iglesia et al., 2020).

Die Anwendung von Dithranol erhöht zwar die Frequenz Antigen-spezifischer Zellen, wäre für eine erfolgreiche TCI nicht unerlässlich, aufgrund der neuen Formulierung von IMI-Sol (Hartmann et al., 2023). Zur Weiterentwicklung einer All-in-One-Formulierung wurde diese neuartige nanokristalline IMQ-Formulierung entwickelt, welche mit Isopropylmyristat (IPM) und dem Gelbildner Aerosil in einem mittelkettigen Triglycerid (MCT)-Basis dispergiert ist. IPM als Adjuvanz fungiert zudem als chemischer Penetrationsverstärker, welcher die Arzneimittel- sowie die Proteinabgabe durch das Stratum corneum über die intakte Haut fördern soll (Dandekar et al., 2023; Shrestha & Banga, 2023). Die genauen Mechanismen, durch welche IPM die Penetration begünstigt, sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch wurde berichtet, dass IPM die Mikrostruktur des Stratum corneum, der äußersten Hautschicht, beeinflusst, indem es mittels seiner hydrophoben Eigenschaften mit den Lipidstrukturen interagiert (Eichner et al., 2017; Hartmann et al., 2023).

Die Auswirkungen von diesem Immunisierungsprotokoll auf das zelluläre Gedächtnis wären ein weiterer interessanter Forschungsansatz. Mittels ELISA konnte in einem ersten Setting bereits nachgewiesen werden, dass die adaptive Immunantwort in Form der Produktion und Sekretion von Immunglobulinen durch die Anwendung des DIVA² Protokolls aktiviert wurde (Abb. 17). Dabei fiel insbesondere die Ausschüttung von IgM Antikörper nach TCI mit ASN / HA₁₂₇₋₁₃₇ / 100 TCID₅₀ *i.n.* bei überlebenden Mäusen auf. Diese Kombination wies die höchste Überlebensrate auf. Ebenfalls wurden IgG-Antikörper, speziell IgG1, als „Gedächtnis“ des Immunsystems nachgewiesen.

5.4 Bestehende Limitierungen und Möglichkeiten für den Übergang der TCI mit Dithranol und IMI-Sol+ in die klinische Phase

Die hier verwendete Immunisierungsmethode hat ein großes Potenzial für die klinische Entwicklung. Sowohl Dithranol als auch Imiquimod sind beim Menschen bereits zugelassen. Als Immunisierungsmethode wurde die TCI mit Dithranol und Imiquimod bisher nur bei Mäusen getestet. Obwohl DIVA ein vielversprechendes Potenzial für die klinische Entwicklung aufweist, da alle Bestandteile leicht herstellbar und entweder nicht toxisch sind oder seit einigen Jahren als Arzneimittel für den Menschen zugelassen sind, sind unsere Erkenntnisse derzeit auf Mausmodelle beschränkt (Sohl et al. 2022). Dies lässt darauf schließen, dass ihre Wirksamkeit beim Menschen nicht endgültig vorhergesagt werden kann. Allerdings publizierten bereits im Jahr 2002 Kemeny und Kollegen die Applikation von Dithranol in Dosen von 0,25 bis 5 µg/mg und induzierten anschließend eine Dermatitis mit Crotonöl oder DNFB (1-Fluor-2,4-dinitrobenzol). Ihre Ergebnisse zeigten, dass niedrige Dithranol-Dosen keine

weiteren Hautreizungen verursachen (Kemeny et al., 2002; Sohl et al., 2022). Unsere Ergebnisse stimmen mit der Verwendung geringer Dithranolmengen (0,625 µg/mg) bei DIVA überein, was deutlich unter der typischen Anfangsdosis von Dithranol bei Psoriasis (>5 µg/mg) liegt. Jedoch ist es von essenzieller Bedeutung, die Unterschiede in der Hautstruktur und -Empfindlichkeit zwischen Mäusen und Menschen zu berücksichtigen und eingehend zu untersuchen. Die simultane Applikation von Dithranol und IMQ beim Menschen ist bisher von geringer Häufigkeit und erfordert eine sorgfältige Anpassung der Dosierung sowie eine Validierung der Wirksamkeit von DIVA beim Menschen. Gegenwärtig werden verschiedene, separate Formulierungen verwendet, welche die unterschiedlichen Wirk- und Hilfsstoffe separat enthalten. Um unsere Immunisierungsmethode beim Menschen anzuwenden, sollte die Formulierung verfeinert/ggf. fusioniert und entsprechend das Immunisierungsprotokoll getestet werden, um einen umfassenden transkutanen Immunisierungsansatz zu etablieren.

6 Zusammenfassung

Die transkutane Immunisierung ist eine neue Impfmethode, bei der ein Adjuvans und ein Impfstoffantigen auf die intakte Haut aufgetragen werden, um eine Immunreaktion zu induzieren. Als topische Applikationsmethode bietet TCI die Vorteile einer nadelfreien Immunisierung mit einer einfachen Handhabung und Vermeidung unnötiger Infektionsgeschehen. Durch die gezielte Aktivierung von APCs in der Haut, wird eine effiziente CD8⁺T-Zellantwort ausgelöst.

Eine nadelfreie Impfmethode wie die von der bisherigen Arbeit der AG Radsak mit Dithranol, IMI-Sol+ und ein Modell-Antigen entwickelte TCI-Methode wäre ein vielversprechender Immunisierungsansatz im Kampf gegen Influenza. Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Optimierung der Durchführung der TCI, ausgehend von der etablierten DIVA-Methode. Das Protokoll wurde hinsichtlich Art des Influenza-Peptids ASN (modifiziert/unmodifiziert), dessen Konzentration, die Frequenz der DIVA (einfach/zweifach) und die Applikationsfrequenz von Dithranol und dessen Konzentration optimiert. Nach einigen Verbesserungen im Immunisierungsprotokoll hatte die TCI mit Dithranol, Imiquimod und dem Influenza-Peptid NP₃₆₆₋₃₇₄ zur Entstehung hochqualitativer CD8⁺T-Zellen geführt, die in der Lage waren, in einem Influenza-Pneumonie-Modell das Überleben der behandelten Tiere zu erhöhen. Es konnte schließlich verifiziert werden, dass eine zweifache DIVA mit einer einmaligen, initialen Dithranol-Applikation in einer Konzentration von 0,6 µg/mg, ein hervorragendes Ergebnis erzielte. Mit Blick auf die Überlebensrate wurde das beste Resultat mit DIVA^{2opt} unter Applikation von 200 µg/mg nicht modifiziertem ASN-Peptid in Kombination mit einem dritten MHC-II Peptid erzeugt.

Zusammenfassend wird in der vorliegenden Arbeit ein neuartiger transkutaner Impfstoff gegen Influenza vorgestellt, bestehend aus Dithranol, IMI-Sol+ und dem Influenza-Peptid NP₃₆₆₋₃₇₄, welcher die Entstehung systemischer T-Zell-Antworten ermöglicht. Während die prophylaktische Wirksamkeit in der Phase der Primären Immunantwort in einem Mausmodell bereits nachgewiesen wurde, soll zukünftig ebenfalls die Gedächtnisantwort untersucht werden. Insgesamt stellt diese TCI-Methode einen einfachen und vielversprechenden Immunisierungsansatz dar, der sich für die klinische Entwicklung von nicht invasiven Impfansätzen zur Prävention der Influenza-Erkrankung eignet.

7 Literaturverzeichnis

Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8), 675–680. <https://doi.org/10.1038/90609>

Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbała, N., Bovens, A., Xiao, Y., Jacobs, H., & Borst, J. (2017). CD4+ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity*, 47(5), 848-861.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.009>

Alarcon, J. B., Hartley, A. W., Harvey, N. G., & Mikszta, J. A. (2007). Preclinical evaluation of microneedle technology for intradermal delivery of influenza vaccines. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 14(4), 375–381. <https://doi.org/10.1128/CVI.00387-06>

Alexander-Miller, M. A., Leggatt, G. R., & Berzofsky, J. A. (1996). Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 4102–4107. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4102>

Allison, J. P., McIntyre, B. W., & Bloch, D. (1982). Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 129(5), 2293–2300.

Alsharifi, M., Furuya, Y., Bowden, T. R., Lobigs, M., Koskinen, A., Regner, M., Trinidad, L., Boyle, D. B., & Müllbacher, A. (2009). Intranasal flu vaccine protective against seasonal and H5N1 avian influenza infections. *PloS one*, 4(4), e5336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005336>

Alving, C. R., Rao, M., Steers, N. J., Matyas, G. R., & Mayorov, A. V. (2012). Liposomes containing lipid A: an effective, safe, generic adjuvant system for synthetic vaccines. *Expert review of vaccines*, 11(6), 733–744. <https://doi.org/10.1586/erv.12.35>

Amorij, J. P., Hinrichs, W. L., Frijlink, H. W., Wilschut, J. C., & Huckriede, A. (2010). Needle-free influenza vaccination. *The Lancet. Infectious diseases*, 10(10), 699–711. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70157-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70157-2)

Amorij, J. P., Huckriede, A., Wilschut, J., Frijlink, H. W., & Hinrichs, W. L. (2008). Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. *Pharmaceutical research*, 25(6), 1256–1273. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9559-6>

Asahi-Ozaki, Y., Yoshikawa, T., Iwakura, Y., Suzuki, Y., Tamura, S., Kurata, T., & Sata, T. (2004). Secretory IgA antibodies provide cross-protection against infection with different strains of influenza B virus. *Journal of medical virology*, 74(2), 328–335. <https://doi.org/10.1002/jmv.20173>

Ashton, R. E., Andre, P., Lowe, N. J., & Whitefield, M. (1983). Anthralin: historical and current perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 9(2), 173–192. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(83\)70125-8](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(83)70125-8)

Aylward, B., Lloyd, J., Zaffran, M., McNair-Scott, R., & Evans, P. (1995). Reducing the risk of unsafe injections in immunization programmes: financial and operational implications of various injection technologies. *Bulletin of the World Health Organization*, 73(4), 531–540.

Ballesteros-Tato, A., León, B., Lund, F. E., & Randall, T. D. (2013). CD4+ T helper cells use CD154-CD40 interactions to counteract T reg cell-mediated suppression of CD8+ T cell responses to influenza. *Journal of Experimental Medicine*, 210(8), 1591–1601. <https://doi.org/10.1084/jem.20130097>

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>

Bachmann, M. F., Kopf, M., & Marsland, B. J. (2006). Chemokines: more than just road signs. *Nature reviews. Immunology*, 6(2), 159–164. <https://doi.org/10.1038/nri1776>

Bacon, C. M., Petricoin, E. F., 3rd, Ortaldo, J. R., Rees, R. C., Larner, A. C., Johnston, J. A., & O'Shea, J. J. (1995). Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7307–7311. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7307>

Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., & Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine*, 195(12), 1541–1548. <https://doi.org/10.1084/jem.20020369>

Bell, M. J., Burrows, J. M., Brennan, R., Miles, J. J., Tellam, J., McCluskey, J., Rossjohn, J., Khanna, R., & Burrows, S. R. (2009). The peptide length specificity of some HLA class I alleles is very broad and includes peptides of up to 25 amino acids in length. *Molecular immunology*, 46(8-9), 1911–1917. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.12.003>

Baxter, J., & Mitragotri, S. (2006). Needle-free liquid jet injections: mechanisms and applications. *Expert review of medical devices*, 3(5), 565–574. <https://doi.org/10.1586/17434440.3.5.565>

Belz, G. T., Stevenson, P. G., & Doherty, P. C. (2000). Contemporary analysis of MHC-related immunodominance hierarchies in the CD8+ T cell response to influenza A viruses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(5), 2404–2409. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2404>

Bernardi, D. S., Bitencourt, C., da Silveira, D. S., da Cruz, E. L., Pereira-da-Silva, M. A., Faccioli, L. H., & Lopez, R. F. (2016). Effective transcutaneous immunization using a combination of iontophoresis and nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 12(8), 2439–2448. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.07.001>

Beyer, W. E., Palache, A. M., de Jong, J. C., & Osterhaus, A. D. (2002). Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy. A meta-analysis. *Vaccine*, 20(9-10), 1340–1353. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00471-6](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00471-6)

Bickert, T., Wohlleben, G., Brinkman, M., Trujillo-Vargas, C. M., Ruehland, C., Reiser, C. O., Hess, J., & Erb, K. J. (2007). Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone

marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells. *Medical microbiology and immunology*, 196(1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/s00430-006-0026-x>

Bonanni, P. & Santos, J. L. (2011). Vaccine evolution. *Perspectives in vaccinology*, 1(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.001>

Bos, J. D., & Meinardi, M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental dermatology*, 9(3), 165–169. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>

Bray B. L. (2003). Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(7), 587–593. <https://doi.org/10.1038/nrd1133>

Carreno, B. M., Becker-hapak, M., & Linette, G. P. (2013). *CD40 regulates human dendritic cell-derived IL-7 production that, in turn, contributes to CD8+ T-cell antigen-specific expansion*. 87(2), 167–177. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.80.CD40>

Carretero-Iglesia, L., Couturaud, B., Baumgaertner, P., Schmidt, J., Maby-El Hajjami, H., Speiser, D. E., Hebeisen, M., & Rufer, N. (2020). High Peptide Dose Vaccination Promotes the Early Selection of Tumor Antigen-Specific CD8 T-Cells of Enhanced Functional Competence. *Frontiers in Immunology*, 10, 3016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03016>

Cassini, A., Colzani, E., Pini, A., Mangen, M. J., Plass, D., McDonald, S. A., Maringhini, G., van Lier, A., Haagsma, J. A., Havelaar, A. H., Kramarz, P., Kretzschmar, M. E., & BCoDE consortium (2018). Impact of infectious diseases on population health using incidence-based disability-adjusted life years (DALYs): results from the Burden of Communicable Diseases in Europe study, European Union and European Economic Area countries, 2009 to 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 23(16), 17-00454. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.16.17-00454>

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., & Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature medicine*, 5(8), 919–923. <https://doi.org/10.1038/11360>

Chen, D., Endres, R. L., Erickson, C. A., Weis, K. F., McGregor, M. W., Kawaoka, Y., & Payne, L. G. (2000). Epidermal immunization by a needle-free powder delivery technology: immunogenicity of influenza vaccine and protection in mice. *Nature medicine*, 6(10), 1187–1190. <https://doi.org/10.1038/80538>

Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology*, 13(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>

Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., & Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5176), 1237–1240. <https://doi.org/10.1126/science.7520605>

Combadière, B., Vogt, A., Mahé, B., Costagliola, D., Hadam, S., Bonduelle, O., Sterry, W., Staszewski, S., Schaefer, H., van der Werf, S., Katlama, C., Autran, B., & Blume-Peytavi, U. (2010). Preferential amplification of CD8 effector-T cells after transcutaneous application of an

inactivated influenza vaccine: a randomized phase I trial. *PloS one*, 5(5), e10818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010818>

Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. (1999). *Nature*, 401(6756), 921–923. <https://doi.org/10.1038/44853>

Cox, R. J., Brokstad, K. A., & Ogra, P. (2004). Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scandinavian journal of immunology*, 59(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01382.x>

Dandekar, A. A., Vora, D., Yeh, J. S., Srivastava, R. K., Athar, M., & Banga, A. K. (2023). Enhanced transdermal delivery of N-acetylcysteine and 4-phenylbutyric acid for potential use as antidotes to lewisite. *AAPS PharmSciTech*, 24(3), 71.

Dean, H. J., & Chen, D. (2004). Epidermal powder immunization against influenza. *Vaccine*, 23(5), 681–686. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.06.041>

Dembić, Z., Haas, W., Weiss, S., McCubrey, J., Kiefer, H., von Boehmer, H., & Steinmetz, M. (1986). Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature*, 320(6059), 232–238. <https://doi.org/10.1038/320232a0>

destatis.de: <https://www.destatis.de/Europa/DE/Thema/Bevoelkerung-Arbeit-Soziales/Gesundheit/Influenza-2.html>

Di Lernia, V., Ricci, C., & Albertini, G. (2004). Spontaneous regression of keratoacanthoma can be promoted by topical treatment with imiquimod cream. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 18(5), 626–629. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.01025.x>

Doyle, C., & Strominger, J. L. (1987). Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*, 330(6145), 256–259. <https://doi.org/10.1038/330256a0>

Drake, L. A., & Drake, J. R. (2016). A triad of molecular regions contribute to the formation of two distinct MHC class II conformers. *Molecular immunology*, 74, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.04.010>

Dugan, H. L., Henry, C., & Wilson, P. C. (2020). Aging and influenza vaccine-induced immunity. *Cellular immunology*, 348, 103998. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.103998>

Dutta, A., Huang, C. T., Lin, C. Y., Chen, T. C., Lin, Y. C., Chang, C. S., & He, Y. C. (2016). Sterilizing immunity to influenza virus infection requires local antigen-specific T cell response in the lungs. *Scientific reports*, 6, 32973. <https://doi.org/10.1038/srep32973>

Eckart, W. U. & Jütte, R. (2007). *Medizingeschichte: eine Einführung*.

Edwards, D., Prausnitz, M. R., Langer, R. & Weaver, J. C. (1995). Analysis of enhanced transdermal transport by skin electroporation. *Journal of Controlled Release*, 34(3), 211–221. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)00132-e](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)00132-e)

Eichner, A., Stahlberg, S., Sonnenberger, S., Lange, S., Dobner, B., Ostermann, A., Schrader, T. E., Hauß, T., Schroeter, A., Huster, D., & Neubert, R. H. H. (2017). Influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on stratum corneum lipid model membranes revealed by neutron diffraction and ²H NMR experiments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(5), 745–755. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.029>

- Ekwueme, D. U., Weniger, B. G., & Chen, R. T. (2002). Model-based estimates of risks of disease transmission and economic costs of seven injection devices in sub-Saharan Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(11), 859–870.
- EMA 2010. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). <http://www.ema.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/intanza/intanza.htm>, 2010 (accessed July 1, 2010).
- Engelke, L., Winter, G., Hook, S., & Engert, J. (2015). Recent insights into cutaneous immunization: How to vaccinate via the skin. *Vaccine*, 33(37), 4663–4674. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.012>
- Fernando, G. J., Chen, X., Prow, T. W., Crichton, M. L., Fairmaid, E. J., Roberts, M. S., Frazer, I. H., Brown, L. E., & Kendall, M. A. (2010). Potent immunity to low doses of influenza vaccine by probabilistic guided micro-targeted skin delivery in a mouse model. *PloS one*, 5(4), e10266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010266>
- Finnen, M. J., Lawrence, C. M., & Shuster, S. (1984). Inhibition of dithranol inflammation by free-radical scavengers. *Lancet (London, England)*, 2(8412), 1129–1130. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91559-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91559-9)
- Fleming, C. J., Bryden, A. M., Evans, A., Dawe, R. S., & Ibbotson, S. H. (2004). A pilot study of treatment of lentigo maligna with 5% imiquimod cream. *The British journal of dermatology*, 151(2), 485–488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.05983.x>
- Flynn, K. J., Belz, G. T., Altman, J. D., Ahmed, R., Woodland, D. L., & Doherty, P. C. (1998). Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia. *Immunity*, 8(6), 683–691. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80573-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80573-7)
- Fremont, D. H., Stura, E. A., Matsumura, M., Peterson, P. A., & Wilson, I. A. (1995). Crystal structure of an H-2Kb-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2479–2483. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2479>
- Gallimore, A., Hombach, J., Dumrese, T., Rammensee, H. G., Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H. (1998). A protective cytotoxic T cell response to a subdominant epitope is influenced by the stability of the MHC class I/peptide complex and the overall spectrum of viral peptides generated within infected cells. *European journal of immunology*, 28(10), 3301–3311. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<3301::AID-IMMU3301>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3301::AID-IMMU3301>3.0.CO;2-Q)
- Garcia, P. A., Davalos, R. V., & Miklavcic, D. (2014). A numerical investigation of the electric and thermal cell kill distributions in electroporation-based therapies in tissue. *PloS one*, 9(8), e103083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103083>
- Garg, S., Hoelscher, M., Belser, J. A., Wang, C., Jayashankar, L., Guo, Z., Durland, R. H., Katz, J. M., & Sambhara, S. (2007). Needle-free skin patch delivery of a vaccine for a potentially pandemic influenza virus provides protection against lethal challenge in mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 14(7), 926–928. <https://doi.org/10.1128/CVI.00450-06>
- Gasparini, R., Amicizia, D., Lai, P. L., & Panatto, D. (2012). Clinical and socioeconomic impact of seasonal and pandemic influenza in adults and the elderly. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 8(1), 21–28. <https://doi.org/10.4161/hv.8.1.17622>

- Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U., & Presky, D. H. (1998). The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual review of immunology*, *16*, 495–521. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.495>
- Gautam, A., Park, B. K., Kim, T. H., Akauliya, M., Kim, D., Maharjan, S., Park, J., Kim, J., Lee, H., Park, M. S., Lee, Y., & Kwon, H. J. (2019). Peritoneal Cells Mediate Immune Responses and Cross-Protection Against Influenza A Virus. *Frontiers in immunology*, *10*, 1160. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01160>
- GBD 2017 Influenza Collaborators (2019). Mortality, morbidity, and hospitalisations due to influenza lower respiratory tract infections, 2017: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet. Respiratory medicine*, *7*(1), 69–89. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30496-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30496-X)
- Giudice, E. L., & Campbell, J. D. (2006). Needle-free vaccine delivery. *Advanced drug delivery reviews*, *58*(1), 68–89. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.12.003>
- Glenn, G.M., Rao, M., Matyas, G. R., & Alving, C. R. (1998). Hautimmunisierung durch Cholera-toxin ermöglicht. *Nature*, *391*(6670), 851–852. <http://doi.org/10.1038/36014>
- Glenn, G. M., Schar-ton-Kersten, T., Vassell, R., Matyas, G. R., & Alving, C. R. (1999). Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants. *Infection and immunity*, *67*(3), 1100–1106. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.3.1100-1106.1999>
- Glenn, G. M., Taylor, D. N., Li, X., Frankel, S., Montemarano, A., & Alving, C. R. (2000). Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nature medicine*, *6*(12), 1403–1406. <https://doi.org/10.1038/82225>
- Glenn, G. M., Kenney, R. T., Hammond, S. A., & Ellingsworth, L. R. (2003). Transcutaneous immunization and immunostimulant strategies. *Immunology and allergy clinics of North America*, *23*(4), 787–813. [https://doi.org/10.1016/s0889-8561\(03\)00094-8](https://doi.org/10.1016/s0889-8561(03)00094-8)
- Glenn, G. M., Kenney, R. T., Ellingsworth, L. R., Frech, S. A., Hammond, S. A., & Zoetewij, J. P. (2003a). Transcutaneous immunization and immunostimulant strategies: capitalizing on the immunocompetence of the skin. *Expert review of vaccines*, *2*(2), 253–267. <https://doi.org/10.1586/14760584.2.2.253>
- Glenn, G. M., Flyer, D. C., Ellingsworth, L. R., Frech, S. A., Frerichs, D. M., Seid, R. C., & Yu, J. (2007). Transcutaneous immunization with heat-labile enterotoxin: development of a needle-free vaccine patch. *Expert review of vaccines*, *6*(5), 809–819. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.5.809>
- Glenn, G. M., & Kenney, R. T. (2006). Mass vaccination: solutions in the skin. *Current topics in microbiology and immunology*, *304*, 247–268. https://doi.org/10.1007/3-540-36583-4_14
- Gogoll, K., Stein, P., Wei, H., Schild, H., Radsak, M., & Langguth, P. (2012). Comparative transcutaneous immunization with imiquimod-containing ointments and potential of in vitro methods to predict effects. *Biopharmaceutics & drug disposition*, *33*(4), 218–228. <https://doi.org/10.1002/bdd.1787>
- Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2019). Mechanisms underlying T cell ageing. *Nature reviews. Immunology*, *19*(9), 573–583. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0180-1>

- Grant, E. J., Quiñones-Parra, S. M., Clemens, E. B., & Kedzierska, K. (2016). Human influenza viruses and CD8(+) T cell responses. *Current opinion in virology*, *16*, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.016>
- Grebe, K. M., Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (2008). Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand?. *Microbes and infection*, *10*(9), 1024–1029. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.002>
- Groneberg, D. A., Paul, H., & Welte, T. (2006). Novel strategies of aerosolic pharmacotherapy. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, *57 Suppl 2*, 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2006.02.007>
- Gröne, A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*, *88*(1–2), 1–12.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*, *20*, 621–667. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., & Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, *425*(6956), 397–402. <https://doi.org/10.1038/nature01911>
- Hartmann, A. K., Aranda Lopez, P., Zajac, M., Freichel, M., Schild, H., Radsak, M. P., & Stassen, M. (2017). 9-Phenanthrol enhances the generation of an CD8⁺ T cell response following transcutaneous immunization with imiquimod in mice. *Journal of dermatological science*, *87*(3), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.07.018>
- Hartmann, A. K., Bartneck, J., Pielenhofer, J., Meiser, S. L., Arnold-Schild, D., Klein, M., Stassen, M., Schild, H., Muth, S., Probst, H. C., Langguth, P., Grabbe, S., & Radsak, M. P. (2023). Optimized dithranol-imiquimod-based transcutaneous immunization enables tumor rejection. *Frontiers in immunology*, *14*, 1238861.
- Hasegawa, H., Ichinohe, T., Tamura, S., & Kurata, T. (2007). Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert review of vaccines*, *6*(2), 193–201. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.2.193>
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., & Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological reviews*, *199*, 9–26. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00142.x>
- Hemmerich, W. (2018). StatistikGuru: Normalverteilung online prüfen. Retrieved from <https://statistikguru.de/rechner/normalverteilung-rechner.html>
- Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., Yamane, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Ryoike, K., Inaba, K., Hayashi, S., & Kunisada, T. (2001). Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *International immunology*, *13*(5), 695–704. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.5.695>
- Henkart P. A. (1985). Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*, *3*, 31–58. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.03.040185.000335>

- Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H., & Ley, T. J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell*, *76*(6), 977–987. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90376-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90376-x)
- Herold, G. (2021). *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung*.
- Hewitt E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, *110*(2), 163–169. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x>
- Hiltbold, E. M., & Roche, P. A. (2002). Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Current opinion in immunology*, *14*(1), 30–35. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(01\)00295-3](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(01)00295-3)
- Hof, H., & Schlüter, D. (2019). *Medizinische Mikrobiologie*.
- Holmgren, J., & Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*, *11*(4 Suppl), S45–S53. <https://doi.org/10.1038/nm1213>
- Hung, I. F., Zhang, A. J., To, K. K., Chan, J. F., Li, C., Zhu, H. S., Li, P., Li, C., Chan, T. C., Cheng, V. C., Chan, K. H., & Yuen, K. Y. (2014). Immunogenicity of intradermal trivalent influenza vaccine with topical imiquimod: a double blind randomized controlled trial. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *59*(9), 1246–1255. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu582>
- Hung, I. F., Zhang, A. J., To, K. K., Chan, J. F., Li, P., Wong, T. L., Zhang, R., Chan, T. C., Chan, B. C., Wai, H. H., Chan, L. W., Fong, H. P., Hui, R. K., Kong, K. L., Leung, A. C., Ngan, A. H., Tsang, L. W., Yeung, A. P., Yiu, G. C., Yung, W., ... Yuen, K. Y. (2016). Topical imiquimod before intradermal trivalent influenza vaccine for protection against heterologous non-vaccine and antigenically drifted viruses: a single-centre, double-blind, randomised, controlled phase 2b/3 trial. *The Lancet. Infectious diseases*, *16*(2), 209–218. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00354-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00354-0)
- Hunsaker, B. D., & Perino, L. J. (2001). Efficacy of intradermal vaccination. *Veterinary immunology and immunopathology*, *79*(1-2), 1–13. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(01\)00244-6](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(01)00244-6)
- Ichinohe, T., Tamura, S., Kawaguchi, A., Ninomiya, A., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Mitchell, W. M., Strayer, D. R., Carter, W. A., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., & Hasegawa, H. (2007). Cross-protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent inactivated influenza vaccine. *The Journal of infectious diseases*, *196*(9), 1313–1320. <https://doi.org/10.1086/521304>
- Itoh, T., & Celis, E. (2005). Transcutaneous immunization with cytotoxic T-cell peptide epitopes provides effective antitumor immunity in mice. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, *28*(5), 430–437. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000171289.78495.b0>
- Iuliano, A. D., Roguski, K. M., Chang, H. H., Muscatello, D. J., Palekar, R., Tempia, S., Cohen, C., Gran, J. M., Schanzer, D., Cowling, B. J., Wu, P., Kyncl, J., Ang, L. W., Park, M., Redlberger-Fritz, M., Yu, H., Espenhain, L., Krishnan, A., Emukule, G., van Asten, L., ... Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network (2018). Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet (London, England)*, *391*(10127), 1285–1300. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2)

Jackson, L. A., Austin, G., Chen, R. T., Stout, R., DeStefano, F., Gorse, G. J., Newman, F. K., Yu, O., Weniger, B. G., & Vaccine Safety Datalink Study Group (2001). Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle-free jet injectors. *Vaccine*, *19*(32), 4703–4709. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00225-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00225-0)

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. New York: Garland Science; 2001.

Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Chi, Y. I., Stauffacher, C., Strominger, J. L., & Wiley, D. C. (1994). Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*, *368*(6473), 711–718. <https://doi.org/10.1038/368711a0>

Jefferson, T., Rivetti, A., Di Pietrantonj, C., Demicheli, V., & Ferroni, E. (2012). Vaccines for preventing influenza in healthy children. *The Cochrane database of systematic reviews*, *2012*(8), CD004879. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004879.pub4>

Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews. Immunology*, *12*(8), 557–569. <https://doi.org/10.1038/nri3254>

Johnsen, G., & Elsayed, S. (1990). Antigenic and allergenic determinants of ovalbumin--III. MHC Ia-binding peptide (OA 323-339) interacts with human and rabbit specific antibodies. *Molecular immunology*, *27*(9), 821–827. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(90\)90147-r](https://doi.org/10.1016/0161-5890(90)90147-r)

Robert Johnson. Interferon as a mucosal adjuvant for influenza vaccine given intranasally (NCT00436046). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00436046?sect=X501> (accessed July 1, 2010).

Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D., & Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature immunology*, *4*(12), 1191–1198. <https://doi.org/10.1038/ni1009>

Kahlon, R., Hu, Y., Orteu, C. H., Kifayet, A., Trudeau, J. D., Tan, R., & Dutz, J. P. (2003). Optimization of epicutaneous immunization for the induction of CTL. *Vaccine*, *21*(21-22), 2890–2899. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00141-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00141-5)

Kambayashi, T., & Laufer, T. M. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?. *Nature reviews. Immunology*, *14*(11), 719–730. <https://doi.org/10.1038/nri3754>

Katikaneni, D. S., & Jin, L. (2019). B cell MHC class II signaling: A story of life and death. *Human immunology*, *80*(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.04.013>

Kappler, J., Kubo, R., Haskins, K., White, J., & Marrack, P. (1983). The mouse T cell receptor: comparison of MHC-restricted receptors on two T cell hybridomas. *Cell*, *34*(3), 727–737. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90529-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90529-9)

Kemeny, L. K., Farkas, A. & Dobozy, A. Low-dose dithranol treatment and tape stripping induce tolerance to dithranol in a mouse ear oedema model. *Br. J. Dermatol.* *146*, 764–769 (2002).

- Kersten, G., & Hirschberg, H. (2007). Needle-free vaccine delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 4(5), 459–474. <https://doi.org/10.1517/17425247.4.5.459>
- Kersten, G., & Hirschberg, H. (2004). Antigen delivery systems. *Expert review of vaccines*, 3(4), 453–462. <https://doi.org/10.1586/14760584.3.4.453>
- Keshavarz, M., Mirzaei, H., Salemi, M., Momeni, F., Mousavi, M. J., Sadeghalvad, M., Arjeini, Y., Solaymani-Mohammadi, F., Sadri Nahand, J., Namdari, H., Mokhtari-Azad, T., & Rezaei, F. (2019). Influenza vaccine: Where are we and where do we go?. *Reviews in medical virology*, 29(1), e2014. <https://doi.org/10.1002/rmv.2014>
- Klasse P. J. (2014). Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Advances in biology*, 2014, 157895. <https://doi.org/10.1155/2014/157895>
- Klimuk, S. K., Najar, H. M., Semple, S. C., Aslanian, S., & Dutz, J. P. (2004). Epicutaneous application of CpG oligodeoxynucleotides with peptide or protein antigen promotes the generation of CTL. *The Journal of investigative dermatology*, 122(4), 1042–1049. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22411.x>
- Kaech, S. M., & Ahmed, R. (2001). Memory CD8+ T cell differentiation: Initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nature immunology*, 2(5), 415–422.
- Kaech, S. M., & Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 12(11), 749–761.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, 27, 485–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>
- Kreslavsky, T., Gleimer, M., Garbe, A. I., & von Boehmer, H. (2010). $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ fate choice: counting the T-cell lineages at the branch point. *Immunological reviews*, 238(1), 169–181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00947.x>
- Kunisaki, K. M., & Janoff, E. N. (2009). Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *The Lancet. Infectious diseases*, 9(8), 493–504. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70175-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70175-6)
- Kurd, N., & Robey, E. A. (2016). T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunological reviews*, 271(1), 114–126. <https://doi.org/10.1111/imr.12398>
- Laidlaw, B. J., Craft, J. E., & Kaech, S. M. (2016). The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), 102–111. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.10>
- Lambach, P., Alvarez, A. M., Hirve, S., Ortiz, J. R., Hombach, J., Verweij, M., Hendriks, J., Palkonyay, L., & Pfeleiderer, M. (2015). Considerations of strategies to provide influenza vaccine year round. *Vaccine*, 33(47), 6493–6498. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.037>
- Lange, R. W., Hayden, P. J., Chignell, C. F., & Luster, M. I. (1998). Anthralin stimulates keratinocyte-derived proinflammatory cytokines via generation of reactive oxygen species. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 47(4), 174–181. <https://doi.org/10.1007/s000110050313>

- Lawrence, C. M., Howel, D., & Shuster, S. (1984). The inflammatory response to anthralin. *Clinical and experimental dermatology*, 9(4), 336–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1984.tb00813.x>
- Li, N., Peng, L. H., Chen, X., Nakagawa, S., & Gao, J. Q. (2011). Transcutaneous vaccines: novel advances in technology and delivery for overcoming the barriers. *Vaccine*, 29(37), 6179–6190. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.086>
- Lillie, P. J., Berthoud, T. K., Powell, T. J., Lambe, T., Mullarkey, C., Spencer, A. J., Hamill, M., Peng, Y., Blais, M. E., Duncan, C. J., Sheehy, S. H., Havelock, T., Faust, S. N., Williams, R. L., Gilbert, A., Oxford, J., Dong, T., Hill, A. V., & Gilbert, S. C. (2012). Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55(1), 19–25. <https://doi.org/10.1093/cid/cis327>
- Lipford, G. B., Hoffman, M., Wagner, H., & Heeg, K. (1993). Primary in vivo responses to ovalbumin. Probing the predictive value of the Kb binding motif. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(4), 1212–1222.
- Lopez, P. A., Denny, M., Hartmann, A. K., Alflen, A., Probst, H. C., von Stebut, E., Tenzer, S., Schild, H., Stassen, M., Langguth, P., & Radsak, M. P. (2017). Transcutaneous immunization with a novel imiquimod nanoemulsion induces superior T cell responses and virus protection. *Journal of dermatological science*, 87(3), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.06.012>
- Lu, D., & Hickey, A. J. (2007). Pulmonary vaccine delivery. *Expert review of vaccines*, 6(2), 213–226. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.2.213>
- Madden D. R. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annual review of immunology*, 13, 587–622. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.003103>
- Martin, M. D., & Badovinac, V. P. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Frontiers in immunology*, 9, 2692. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02692>
- Marzo, A. L., Klonowski, K. D., Le Bon, A., Borrow, P., Tough, D. F., & Lefrançois, L. (2005). Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nature immunology*, 6(8), 793–799. <https://doi.org/10.1038/ni1227>
- Matsuo, K., Hirobe, S., Okada, N., & Nakagawa, S. (2013). Frontiers of transcutaneous vaccination systems: novel technologies and devices for vaccine delivery. *Vaccine*, 31(19), 2403–2415. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.022>
- McAllister, D. V., Wang, P. M., Davis, S. P., Park, J. H., Canatella, P. J., Allen, M. G., & Prausnitz, M. R. (2003). Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication methods and transport studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 13755–13760. <https://doi.org/10.1073/pnas.2331316100>
- McElhaney, J. E., Verschoor, C. P., Andrew, M. K., Haynes, L., Kuchel, G. A., & Pawelec, G. (2020). The immune response to influenza in older humans: beyond immune senescence. *Immunity & ageing : I & A*, 17, 10. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-00181-1>

- McFarland, B. J., Sant, A. J., Lybrand, T. P., & Beeson, C. (1999). Ovalbumin(323-339) peptide binds to the major histocompatibility complex class II I-A(d) protein using two functionally distinct registers. *Biochemistry*, 38(50), 16663–16670. <https://doi.org/10.1021/bi991393l>
- McGill, A., Frank, A., Emmett, N., Turnbull, D. M., Birch-Machin, M. A., & Reynolds, N. J. (2005). The anti-psoriatic drug Dithranol accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(8), 1012–1014. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2664fje>
- McLenon, J., & Rogers, M. A.M. (2018). The Fear of Needles: A Systematic Review and Meta-Analysis. - PubMed - NCBI. *Journal of Advanced Nursing*. <http://doi.org/10.1111/jan.13818>
- McMichael, A. J., Gotch, F. M., Noble, G. R., & Beare, P. A. (1983). Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *The New England journal of medicine*, 309(1), 13–17. <https://doi.org/10.1056/NEJM198307073090103>
- Michaelis K, Scholz S, Buda S, Garbe E, Harder T, Ledig T, Terhardt M, Wichmann O, Wicker S, Zepp F, Mertens T: Beschluss und Wissenschaftliche Begründung der Ständigen Impfkommision (STIKO) für die Aktualisierung der Influenza-Impfempfehlung für Personen im Alter von ≥ 60 Jahren *Epid Bull* 2021;1:3 -25 | DOI 10.25646/7655
- Mikszta, J. A., Alarcon, J. B., Brittingham, J. M., Sutter, D. E., Pettis, R. J., & Harvey, N. G. (2002). Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery. *Nature medicine*, 8(4), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nm0402-415>
- Miller, M. A., & Pisani, E. (1999). The cost of unsafe injections. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(10), 808–811.
- Minne, A., Louahed, J., Mehouden, S., Baras, B., Renauld, J. C., & Vanbever, R. (2007). The delivery site of a monovalent influenza vaccine within the respiratory tract impacts on the immune response. *Immunology*, 122(3), 316–325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02641.x>
- Mitragotri S. (2005). Immunization without needles. *Nature reviews. Immunology*, 5(12), 905–916. <https://doi.org/10.1038/nri1728>
- Mitragotri S. (2006). Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(7), 543–548. <https://doi.org/10.1038/nrd2076>
- Mitsui, H., Inozume, T., Kitamura, R., Shibagaki, N., & Shimada, S. (2006). Polyarginine-mediated protein delivery to dendritic cells presents antigen more efficiently onto MHC class I and class II and elicits superior antitumor immunity. *The Journal of investigative dermatology*, 126(8), 1804–1812. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700335>
- Mo, X. Y., Cascio, P., Lemerise, K., Goldberg, A. L., & Rock, K. (1999). Distinct Proteolytic Processes Generate the C and N Termini of MHC Class I-Binding Peptides1. *The Journal of Immunology*, 163(11), 5851–5859. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.11.5851>
- Mohn, K. G., & Zhou, F. (2018). Clinical Expectations for Better Influenza Virus Vaccines- Perspectives from the Young Investigators' Point of View. *Vaccines*, 6(2), 32. <https://doi.org/10.3390/vaccines6020032>

- Molinari, N. A., Ortega-Sanchez, I. R., Messonnier, M. L., Thompson, W. W., Wortley, P. M., Weintraub, E., & Bridges, C. B. (2007). The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine*, 25(27), 5086–5096. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.03.046>
- Müller, K., & Kappus, H. (1988). Hydroxyl radical formation by dithranol. *Biochemical pharmacology*, 37(22), 4277–4280. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90607-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90607-7)
- Müller K. (1997). Antipsoriatic and proinflammatory action of anthralin. Implications for the role of oxygen radicals. *Biochemical pharmacology*, 53(9), 1215–1221. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(96\)00732-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(96)00732-0)
- Müller, K., Wiegrebe, W., & Younes, M. (1987). Formation of active oxygen species by dithranol, III. Dithranol, active oxygen species and lipid peroxidation in vivo. *Archiv der Pharmazie*, 320(1), 59–66. <https://doi.org/10.1002/ardp.19873200110>
- Muñoz-Fernández, M. A., Fernández, M. A., & Fresno, M. (1992). Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *European journal of immunology*, 22(2), 301–307. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220203>
- Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2018). Janeway Immunologie. In *Springer eBooks*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>
- Nair, H., Brooks, W. A., Katz, M., Roca, A., Berkley, J. A., Madhi, S. A., Simmerman, J. M., Gordon, A., Sato, M., Howie, S., Krishnan, A., Ope, M., Lindblade, K. A., Carosone-Link, P., Lucero, M., Ochieng, W., Kamimoto, L., Dueger, E., Bhat, N., Vong, S., ... Campbell, H. (2011). Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, 378(9807), 1917–1930. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61051-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61051-9)
- Navi, D., & Huntley, A. (2004). Imiquimod 5 percent cream and the treatment of cutaneous malignancy. *Dermatology online journal*, 10(1), 4.
- Nikolich-Žugich J. (2018). The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nature immunology*, 19(1), 10–19. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0006-x>
- Norment, A. M., Salter, R. D., Parham, P., Engelhard, V. H., & Littman, D. R. (1988). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*, 336(6194), 79–81. <https://doi.org/10.1038/336079a0>
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., & Förster, R. (2004). CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21(2), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.014>
- Ortiz, J. R., Perut, M., Dumolard, L., Wijesinghe, P. R., Jorgensen, P., Ropero, A. M., Danovaro-Holliday, M. C., Heffelfinger, J. D., Tevi-Benissan, C., Tebeb, N. A., Lambach, P., & Hombach, J. (2016). A global review of national influenza immunization policies: Analysis of the 2014 WHO/UNICEF Joint Reporting Form on immunization. *Vaccine*, 34(45), 5400–5405. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.07.045>
- Ott, J. J., Klein Breteler, J., Tam, J. S., Hutubessy, R. C., Jit, M., & de Boer, M. R. (2013). Influenza vaccines in low and middle income countries: a systematic review of economic

evaluations. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 9(7), 1500–1511. <https://doi.org/10.4161/hv.24704>

Palache, A., Abelin, A., Hollingsworth, R., Cracknell, W., Jacobs, C., Tsai, T., Barbosa, P., & IFPMA Influenza Vaccine Supply (IFPMA IVS) task force (2017). Survey of distribution of seasonal influenza vaccine doses in 201 countries (2004-2015): The 2003 World Health Assembly resolution on seasonal influenza vaccination coverage and the 2009 influenza pandemic have had very little impact on improving influenza control and pandemic preparedness. *Vaccine*, 35(36), 4681–4686. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.053>

Palache, A., Oriol-Mathieu, V., Abelin, A., Music, T., & Influenza Vaccine Supply task force (IFPMA IVS) (2014). Seasonal influenza vaccine dose distribution in 157 countries (2004-2011). *Vaccine*, 32(48), 6369–6376. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.012>

Palamara, F., Meindl, S., Holcman, M., Lührs, P., Stingl, G., & Sibilja, M. (2004). Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(5), 3051–3061. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3051>

Palese, P., & Young, J. F. (1982). Variation of influenza A, B, and C viruses. *Science (New York, N.Y.)*, 215(4539), 1468–1474. <https://doi.org/10.1126/science.7038875>

Phares, T. W., Stohlman, S. A., Hwang, M., Min, B., Hinton, D. R., & Bergmann, C. C. (2012). CD4 T Cells Promote CD8 T Cell Immunity at the Priming and Effector Site during Viral Encephalitis. *Journal of Virology*, 86(5), 2416–2427. <https://doi.org/10.1128/jvi.06797-11>

Pielenhofer, J., Sohl, J., Windbergs, M., Langguth, P., & Radsak, M. P. (2020). Current Progress in Particle-Based Systems for Transdermal Vaccine Delivery. *Frontiers in immunology*, 11, 266. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00266>

Radsak, M. P., Sohl, J., Stassen, M. Hartmann, A.-K. (2018). Pharmazeutische Zusammensetzungen, Impfstoffe und deren Verwendung bei der Prävention oder Behandlung einer anhaltenden Infektion oder von Krebs. (EP 18204287.9)

Rechtsteiner, G., Warger, T., Osterloh, P., Schild, H., & Radsak, M. P. (2005). Cutting edge: priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(5), 2476–2480. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2476>

RKI.de Link 1: https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Influenza/FAQ_Uebersicht.html

RKI (2015) Infektionsschutz und Infektionsepidemiologie. Fachwörter – Definitionen – Interpretationen. (PDF; 1,1 MB) Robert Koch-Institut, Berlin 2015, ISBN 978-3-89606-258-1, S. 99.

RKI Epid Bull 2018. AG Influenza der Ständigen Impfkommision (STIKO): Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung des quadrivalenten saisonalen Influenza-impfstoffs. *Epid Bull* 2018;2:19 – 28 | DOI 10.17886/EpiBull-2018-002

Roberts M. S. (1997). Targeted drug delivery to the skin and deeper tissues: role of physiology, solute structure and disease. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 24(11), 874–879. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1997.tb02708.x>

- Röttschke, O., Falk, K., Stevanović, S., Jung, G., Walden, P., & Rammensee, H. G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *European journal of immunology*, 21(11), 2891–2894. <https://doi.org/10.1002/eji.1830211136>
- Romani, N., Koide, S., Crowley, M., Witmer-Pack, M., Livingstone, A. M., Fathman, C. G., Inaba, K., & Steinman, R. M. (1989). Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine*, 169(3), 1169–1178. <https://doi.org/10.1084/jem.169.3.1169>
- Rosenblum, M. D., Remedios, K. A., & Abbas, A. K. (2015). Mechanisms of human autoimmunity. *The Journal of clinical investigation*, 125(6), 2228–2233. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>
- Rouvier, E., Luciani, M. F., & Golstein, P. (1993). Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine*, 177(1), 195–200. <https://doi.org/10.1084/jem.177.1.195>
- Ryan, S. O., & Cobb, B. A. (2012). Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. *Seminars in immunopathology*, 34(3), 425–441. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0309-9>
- Sakaguchi S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*, 22, 531–562. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122>
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), 389–400. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.389>
- Sarphie DF, Johnson B, Cormier M, Burkoth TL, Bellhouse BL. Bioavailability following transdermal powdered delivery (TDP) of radiolabeled insulin to hairless guinea pigs. *J Control Release* 1997; **47**: 61–69.
- Saunders-Hastings, P. R., & Krewski, D. (2016). Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 5(4), 66. <https://doi.org/10.3390/pathogens5040066>
- Schenkel, J. M., & Masopust, D. (2014). Tissue-resident memory T cells. *Immunity*, 41(6), 886–897. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.007>
- Schetters, S. T., Kruijssen, L. J., Crommentuijn, M. H., Kalay, H., den Haan, J. M., & van Kooyk, Y. (2020). Immunological dynamics after subcutaneous immunization with a squalene- based oil-in-water adjuvant. *The FASEB Journal*, 34(9), 12406.
- Schild, Hansjörg, Prof. Dr.; Warger, Tobias; Radsak, Markus, Dr.; Rechtsteiner, Gerd. Zubereitung zum Impfen, Impfverfahren und Verwendung einer Impf-Zubereitung DE 10 2004 049 223 A1 2006.04.20

- Schmidt, K. N., Podda, M., Packer, L., & Baeuerle, P. A. (1996). Anti-psoriatic drug Dithranol activates transcription factor NF-kappa B in murine keratinocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *156*(11), 4514–4519.
- Seder, R. A., Darrah, P. A., & Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature reviews. Immunology*, *8*(4), 247–258. <https://doi.org/10.1038/nri2274>
- Seder, R. A., & Paul, W. E. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annual review of immunology*, *12*, 635–673. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.003223>
- Sendi, P., Locher, R., Bucheli, B., & Battegay, M. (2004). Intranasal influenza vaccine in a working population. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *38*(7), 974–980. <https://doi.org/10.1086/386330>
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., & Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5421), 1835–1837. <https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1835>
- Simpson, C. R., Lone, N. I., Kavanagh, K., Ritchie, L. D., Robertson, C., Sheikh, A., & McMenamin, J. (2015). Trivalent inactivated seasonal influenza vaccine effectiveness for the prevention of laboratory-confirmed influenza in a Scottish population 2000 to 2009. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, *20*(8), 21043. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.8.21043>
- Skountzou, I., & Compans, R. W. (2015). Skin immunization with influenza vaccines. *Current topics in microbiology and immunology*, *386*, 343–369. https://doi.org/10.1007/82_2014_407
- Skountzou, I., Quan, F. S., Jacob, J., Compans, R. W., & Kang, S. M. (2006). Transcutaneous immunization with inactivated influenza virus induces protective immune responses. *Vaccine*, *24*(35-36), 6110–6119. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.014>
- Smetana, J., Chlibek, R., Shaw, J., Splino, M., & Prymula, R. (2018). Influenza vaccination in the elderly. *Human vaccines & immunotherapeutics*, *14*(3), 540–549. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1343226>
- Smith, D. J., Bot, S., Dellamary, L., & Bot, A. (2003). Evaluation of novel aerosol formulations designed for mucosal vaccination against influenza virus. *Vaccine*, *21*(21-22), 2805–2812. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00224-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00224-x)
- Smith, C. M., Wilson, N. S., Waithman, J., Villadangos, J. A., Carbone, F. R., Heath, W. R., & Belz, G. T. (2004). Cognate CD4+ T cell licensing of dendritic cells in CD8+ T cell immunity. *Nature Immunology*, *5*(11), 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/ni1129>
- Snapper, C. M., & Paul, W. E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science (New York, N.Y.)*, *236*(4804), 944–947. <https://doi.org/10.1126/science.3107127>
- Soema, P. C., van Riet, E., Kersten, G., & Amorij, J. P. (2015a). Development of cross-protective influenza a vaccines based on cellular responses. *Frontiers in immunology*, *6*, 237. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00237>

- Soema, P. C., Kompier, R., Amorij, J. P., & Kersten, G. F. (2015b). Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 94, 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.023>
- Sohl, J. Dissertation. Dithranol als neues Adjuvans in der transkutanen Immunisierung. 2020
- Sohl, J., Hartmann, A. K., Hahlbrock, J., Bartneck, J., Stassen, M., Klein, M., Bros, M., Grabbe, S., Marini, F., Woods, K., Guezguez, B., Mack, M., Schild, H., Muth, S., Melchior, F., Probst, H. C., Langguth, P., & Radsak, M. P. (2022). Dithranol as novel co-adjuvant for non-invasive dermal vaccination. *NPJ vaccines*, 7(1), 112. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00530-9>
- Speiser, D. E., Kyburz, D., Stübi, U., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1992). Discrepancy between in vitro measurable and in vivo virus neutralizing cytotoxic T cell reactivities. Low T cell receptor specificity and avidity sufficient for in vitro proliferation or cytotoxicity to peptide-coated target cells but not for in vivo protection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 149(3), 972–980.
- Sridhar, S., Begom, S., Bermingham, A., Hoschler, K., Adamson, W., Carman, W., Bean, T., Barclay, W., Deeks, J. J., & Lalvani, A. (2013). Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nature medicine*, 19(10), 1305–1312. <https://doi.org/10.1038/nm.3350>
- Strydom, G., Olive, A., Radovic-Moreno, A. F., Gondek, D., Alvarez, D., Basto, P. A., Perro, M., Vrbancic, V. D., Tager, A. M., & Shi, J. (2015). A mucosal vaccine against Chlamydia trachomatis generates two waves of protective memory T cells. *Science*, 348(6241), aaa8205.
- Stein, P., Weber, M., Prüfer, S., Schmid, B., Schmitt, E., Probst, H. C., Waisman, A., Langguth, P., Schild, H., & Radsak, M. P. (2011a). Regulatory T cells and IL-10 independently counterregulate cytotoxic T lymphocyte responses induced by transcutaneous immunization. *PLoS one*, 6(11), e27911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027911>
- Stein, P., Rechtsteiner, G., Warger, T., Bopp, T., Fuhr, T., Prüfer, S., Probst, H. C., Stassen, M., Langguth, P., Schild, H., & Radsak, M. P. (2011b). UV exposure boosts transcutaneous immunization and improves tumor immunity: cytotoxic T-cell priming through the skin. *The Journal of investigative dermatology*, 131(1), 211–219. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.254>
- Stein, P., & Radsak, M. P. (2016). The skin as an orchestrator of influenza immunity. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(2), 139–140. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00413-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00413-2)
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, 137(5), 1142–1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- Steinman, R. M., Witmer, M. D., Nussenzweig, M. C., Chen, L. L., Schlesinger, S., & Cohn, Z. A. (1980). Dendritic cells of the mouse: identification and characterization. *The Journal of investigative dermatology*, 75(1), 14–16. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12521052>
- Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L., & Wiley, D. C. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368(6468), 215–221. <https://doi.org/10.1038/368215a0>

- Stout, R. D., & Bottomly, K. (1989). Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 142(3), 760–765.
- Sun, Y., Zhang, J., Zhai, T., Li, H., Li, H., Huo, R., ... & Teng, J. (2017). CCN1 promotes IL-1 β production in keratinocytes by activating p38 MAPK signaling in psoriasis. *Scientific reports*, 7(1), 43310.
- Szymczak-Workman, A. L., Workman, C. J., & Vignali, D. A. (2009). Cutting edge: regulatory T cells do not require stimulation through their TCR to suppress. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(9), 5188–5192. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803123>
- Takaba, H., & Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends in immunology*, 38(11), 805–816. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.010>
- Taneichi, M., Tanaka, Y., Kakiuchi, T., & Uchida, T. (2010). Liposome-coupled peptides induce long-lived memory CD8 T cells without CD4 T cells. *PloS one*, 5(11), e15091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015091>
- Taubenberger, J. K., & Kash, J. C. (2010). Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe*, 7(6), 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>
- Tay, S. S., Roediger, B., Tong, P. L., Tikoo, S., & Weninger, W. (2013). The Skin-Resident Immune Network. *Current dermatology reports*, 3(1), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s13671-013-0063-9>
- Thomsen, L. L., Topley, P., Daly, M. G., Brett, S. J., & Tite, J. P. (2004). Imiquimod and resiquimod in a mouse model: adjuvants for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery. *Vaccine*, 22(13-14), 1799–1809. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.09.052>
- Thompson, W. W., Shay, D. K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L. J., & Fukuda, K. (2003). Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*, 289(2), 179–186. <https://doi.org/10.1001/jama.289.2.179>
- Thompson, W. W., Shay, D. K., Weintraub, E., Brammer, L., Bridges, C. B., Cox, N. J., & Fukuda, K. (2004). Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA*, 292(11), 1333–1340. <https://doi.org/10.1001/jama.292.11.1333>
- Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A., & Shevach, E. M. (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(11), 6519–6523. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6519>
- Tumer, G., Simpson, B., & Roberts, T. K. (2023). Genetics, Human Major Histocompatibility Complex (MHC). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Van Damme, P., Oosterhuis-Kafeja, F., Van der Wielen, M., Almagor, Y., Sharon, O., & Levin, Y. (2009). Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. *Vaccine*, 27(3), 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.077>

- Vandervoort, J., & Ludwig, A. (2008). Microneedles for transdermal drug delivery: a minireview. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 1711–1715. <https://doi.org/10.2741/2794>
- Viganò, S., Utschneider, D. T., Perreau, M., Pantaleo, G., Zehn, D., & Harari, A. (2012). Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells?. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 153863. <https://doi.org/10.1155/2012/153863>
- Vignali D. A. (1994). The interaction between CD4 and MHC class II molecules and its effect on T cell function. *Behring Institute Mitteilungen*, (94), 133–147.
- Vogt, A., Mahé, B., Costagliola, D., Bonduelle, O., Hadam, S., Schaefer, G., Schaefer, H., Katlama, C., Sterry, W., Autran, B., Blume-Peytavi, U., & Combadiere, B. (2008). Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(3), 1482–1489. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1482>
- von Essen, M. R., Kongsbak, M., Schjerling, P., Olgaard, K., Odum, N., & Geisler, C. (2010). Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nature immunology*, 11(4), 344–349. <https://doi.org/10.1038/ni.1851>
- Waldmann, T. A., Dubois, S., Miljkovic, M. D., & Conlon, K. C. (2020). IL-15 in the Combination Immunotherapy of Cancer. *Frontiers in Immunology*, 11(May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00868>
- Walker, J. A., & McKenzie, A. N. J. (2018). T_H2 cell development and function. *Nature reviews. Immunology*, 18(2), 121–133. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.118>
- Wang, Z., Wan, Y., Qiu, C., Quiñones-Parra, S., Zhu, Z., Loh, L., Tian, D., Ren, Y., Hu, Y., Zhang, X., Thomas, P. G., Inouye, M., Doherty, P. C., Kedzierska, K., & Xu, J. (2015). Recovery from severe H7N9 disease is associated with diverse response mechanisms dominated by CD8⁺ T cells. *Nature communications*, 6, 6833. <https://doi.org/10.1038/ncomms7833>
- Warger, T., Rechtsteiner, G., Schmid, B., Osterloh, P., Schild, H., & Radsak, M. P. (2007). Transcutaneous immunization with imiquimod is amplified by CD40 ligation and results in sustained cytotoxic T-lymphocyte activation and tumor protection. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 32(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/BF02686082>
- Wee, J. L., Scheerlinck, J. P., Snibson, K. J., Edwards, S., Pearse, M., Quinn, C., & Sutton, P. (2008). Pulmonary delivery of ISCOMATRIX influenza vaccine induces both systemic and mucosal immunity with antigen dose sparing. *Mucosal immunology*, 1(6), 489–496. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.59>
- WHO (2018) *Fact Sheet Influenza (Seasonal)* [Internet]. URL: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- WHO (2019) World Health Organization. Ten threats to global health in 2019.
- World Health Organization Influenza Factsheet 2003. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en>

WHO (2020) Global Health Estimates 2019: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Geneva, World Health Organization; 2020.

WHO News 21 May 2021 - Preventing the next human influenza pandemic: Celebrating 10 years of the Pandemic Influenza Preparedness Framework

WHO Weekly epidemiological Record No 19 13.05.2022 Vaccines against influenza: WHO position paper

Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C. (2017). Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in immunology*, 8, 292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292>

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5899), 271–275. <https://doi.org/10.1126/science.1160062>

Wu, L., & Liu, Y. J. (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*, 26(6), 741–750. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.06.006>

Zhang, A. J., Li, C., To, K. K., Zhu, H. S., Lee, A. C., Li, C. G., Chan, J. F., Hung, I. F., & Yuen, K. Y. (2014). Toll-like receptor 7 agonist imiquimod in combination with influenza vaccine expedites and augments humoral immune responses against influenza A(H1N1)pdm09 virus infection in BALB/c mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 21(4), 570–579. <https://doi.org/10.1128/CVI.00816-13>

8 Anhang

Bestimmung des LD50-Wertes für Influenza PR8

In einem separaten Experiment wurde der LD50-Wert des in unserem Labor vorhandenen Influenzavirus-Stammes (H1N1, PR8/34) festgestellt. Dieser Wert wird benötigt, um zu bestimmen, wie viel Virus die Tiere als Challenge nach einer Immunisierung bekommen sollen. Die Tiere waren in vier Gruppen geteilt, die jeweils 3/10/30/100 TCID50 Influenza-Einheiten bekommen haben. Jede Gruppe bestand aus 4 Tieren. Die Infektion erfolgte intranasal. Die verschiedenen Virus-Verdünnungen wurden in PBS gelöst. Nach der Infektion wurde das Gewicht der Tiere alle zwei Tage kontrolliert. Die Tiere wurden ab einer Gewichtsreduktion von 20% abgetötet oder ab einer Gewichtsreduktion von 10% beim Vorliegen von anderen Krankheitszeichen. Zu den Krankheitszeichen, die bei einer schweren Infektion vorkommen können, gehören neben Gewichtsverlust auch die Reduktion des Allgemeinzustands und das Fehlen des Sozial- und Spontanverhaltens.

Der aus der Überlebensgrafik herausgekommene LD50-Wert beträgt 30 TCID50 (*i.n.*).

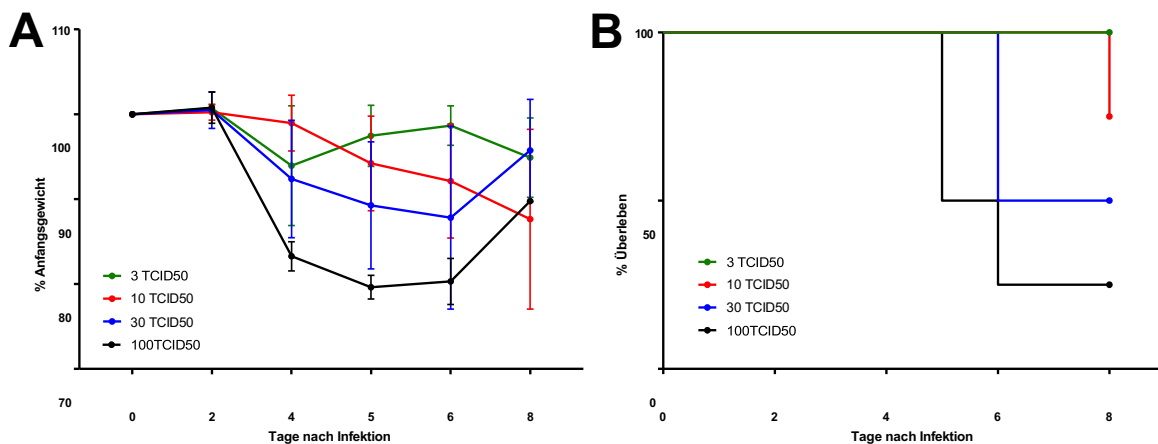


Abbildung 20: Der LD50-Wert beträgt nach intranasaler Gabe von Influenza A H1N1 PR8/32 30 TCID50

C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 3, 10, 30 oder 100 TCID50 Influenzavirus PR8 *i.n.* infiziert. **A:** Gewichtsverlauf der Tiere nach der Infektion. **B:** Überlebenskurve nach der Infektion.

Tabelle 2: Klinisches Scoring-System des Allgemeinzustands der Tiere nach intranasaler Gabe von Influenza A H1N1 PR8/34

1. Körpergewicht , bezogen auf das Gewicht der unbehandelten Kontrollgruppe	Score
Unbeeinflusst oder Anstieg:	0
Reduktion > 10%	10
Reduktion > 20%	20
2. Allgemeinzustand	
- Fell glatt, glänzend und anliegend, Augen glänzend, Körperöffnungen sauber	0
- Fell matt, Augen trüb	5
- Fell stumpf, Augen eingesunken trüb, verklebte oder feuchte Körperöffnungen	10
- Fell gestäubt, Tier fühlt sich kalt an, Augen geschlossen, Krämpfe, Lähmungen, Atemgeräusche, verschärftes Atmen, bläuliche Schleimhäute	20
3. Spontanverhalten	
- aufmerksam, neugierig, Aufrichten, flinke Bewegungen	0
- ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte oder reduzierte Bewegung oder Überaktivität, reduziertes Explorationsverhalten	5
- Isolation, Apathie, Koordinationsstörungen, ausgeprägte Stereotypen oder Hyperkinetik	10
- Automutilation, Nekrosen, Rektumvorfall	20
4. Versuchsspezifische Kriterien (spezifische Kriterien, zusätzlich zu den Punkten 1-3)	
4.a Tumorversuche	
Bei einer Tumorgröße > 1.5 cm im längsten Durchmesser oder einem Tumolvolumen von gleich oder größer 600 mm ³	20
Tumorulzeration	20
4.b Charakterisierung der Hautreaktionen bei Immunisierungen	
Rötung	5
Rötung mit Verschorfung	10

Offene, blutende Stellen	20
4.c Virusversuche /Pneumonie	
verschärftes Atmen (Schnappatmung)	20
Abbruchkriterien: Gesamtscore von 20 Punkten oder mehr: sofortige Tötung des betroffenen Einzeltieres Einzelscore von 20 Punkten: sofortige Tötung des betroffenen Einzeltieres; Tötungsmethode: CO ₂ und zervikale Dislokation	

9 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater für die Ermöglichung dieser Dissertation und die sehr gute Unterstützung bei jedem Schritt meiner Arbeit. Weiterhin möchte ich mich für den regelmäßigen Austausch, die fachlich-kompetenten Ratschläge und die Bereitschaft, jederzeit als Ansprechpartner erreichbar zu sein, bedanken!

Ein weiterer Dank gilt allen weiteren Mitarbeitern der AG. Hierbei möchte ich ganz besonders meine Betreuerin erwähnen, die bei der Umsetzung meiner Experimente eine sehr große Hilfe war. Die Arbeitsatmosphäre im Labor war immer sehr kollegial und ich habe mich von Anfang an im Team als sehr willkommen gefühlt.

Zum Schluss möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meinen Eltern für die uneingeschränkte Liebe und Unterstützung während des gesamten Studiums bedanken.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Joana Çule
Geburtsdatum	02.04.1998
Geburtsort	Korçë, Albanien

Ausbildung

11/2024	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2023-10/2024	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Mainz, Wahlfach Allgemeinmedizin
10/2023	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2021-09/2021	Freisemester für Labortätigkeit im Rahmen der Dissertation
03/2021-10/2024	Mitarbeit in der AG Radsak, III. Med. Klinik
08/2019	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2017-11/2024	Medizinstudium, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
02/2017-06/2017	Studienkolleg (M-Kurs) an der ISSK Mainz, Abschluss: Zeugnis
2014-2016	Abitur an Preca College, Korçë, Albanien
2013-2014	Raqi-Qirinxhi-Gymnasium, Korçë, Albanien

Praktika/Arbeitsverhältnisse

11/2022-11/2023	Aushilfe Innere Medizin, GPR-Klinikum Rüsselsheim
09/2022-10/2022	1 Monat Famulatur in der Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universitätsmedizin Mainz
03/2021-09/2021	Teamleiterin in der Impfstoff-Verarbeitung, Impfzentrum Offenbach
09/2020	1 Monat Famulatur in der Allgemein- und Viszeralchirurgie, St. Josefs-Hospital Wiesbaden
05/2020-10/2020	Mitarbeiterin in der Corona-Hotline Rheinland-Pfalz
05/2020-12/2024	Aushilfe Chirurgie, St. Josefs-Hospital Wiesbaden
02/2020-04/2020	2 Monate Hausarztfamulatur, Praxis Dr. Emmermann, Mainz

Sprachkenntnisse

Albanisch: Muttersprache

Deutsch: sehr gut (Niveau C1)

Englisch: fließend

Griechisch: Grundkenntnisse