

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Ulm

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

Liposomen als Vehikel für Antigene
zur Immunisierung gegen die Tuberkulose

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Alexander Bückle
aus Ulm
2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Anja Böckers

Tag der Promotion: 19.04.2018

Für Mama, Aga und meine
Brüder, Chris und Andi.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Tuberkulose	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Pathologie	2
1.1.3. Immunabwehr	4
1.1.4. Therapie	6
1.2. Liposomen	7
1.3. Vorarbeiten im Institut	9
1.4. Ziel dieser Arbeit	10
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.2. Methoden	20
2.2.1. Gewinnung und Stimulation von Zellen	20
2.2.2. Herstellungs-, Analyse- und Messmethoden	24
3. Ergebnisse	34
3.1. Eigenschaften der Liposomen	34
3.1.1. Größe und Homogenität	35
3.1.2. Einbau von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Extrakt	41
3.1.3. Toxizität von Liposomen	45
3.2. Interaktion zwischen Liposomen und Immunzellen	50
3.2.1. Phagozytose	51
3.2.2. TNF- α Freisetzung	61
3.2.3. IFN- γ Freisetzung durch Kurzzeit-T-Zelllinien	62
4. Diskussion	65
4.1. Stärken und Schwächen dieser Arbeit	65
4.2. Eingliederung dieser Arbeit in das Schrifttum	67

4.2.1 Identifikation von Impfantigenen gegen die Tuberkulose	67
4.2.2 Biomarker zur Messung der <i>in vitro</i> Immunogenität	69
4.2.3 Die Rolle von Adjuvantien in der Vakzinherstellung	72
4.2.4 Liposomen als Transportvehikel für Medikamente	74
4.2.5 Aufbau von Liposomen zum Transport von mykobakteriellen Antigenen	75
4.2.6 Impfstoffkandidaten gegen Tuberkulose in klinischen Testphasen	77
4.3. Spezifischer Mehrwert der Arbeit im Kontext der Gesamtproblematik	79
5. Zusammenfassung	81
6. Literaturverzeichnis	83
7. Danksagung	95
8. Lebenslauf	97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APC	antigen-präsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AU	arbitrary units
BCA	bicinchoninic acid
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	bovines Serumalbumin
CAF01	cationic adjuvant formulation
CD	cluster of differentiation
CM	Zellkulturkomplettmedium
ConA	Concanavalin A
DDA	Dimethyldioctadecylammonium
DiIC	Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat
DLS	dynamic light scattering
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc-Fragment	fragment crystallisable; konstante Region eines Antikörpers
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	forward scatter
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
Hepes	2-Ethansulfonsäure

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozytenantigen-System
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
LAM	Lipoarabinomannan
Lipo	leere Liposomen
M Φ	Makrophage
MDR-TB	multiresistente Tuberkulose
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Mio	Millionen
MLip	<i>Mtb</i> -Liposomen
M20	Liposomen mit 20 μ g inkorporiertem <i>Mtb</i> -Extrakt
M40	Liposomen mit 40 μ g inkorporiertem <i>Mtb</i> -Extrakt
M80	Liposomen mit 80 μ g inkorporiertem <i>Mtb</i> -Extrakt
NTA	nanoparticle tracking analysis
OD	optische Dichte
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
RD1	region of differences 1
RNS	reactive nitrogen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B
SSC	sideward scatter
Stearyl.-R8	stearyliertes Octaarginin
TB	Tuberkulose

TBS	Tris-haltiger Phosphatpuffer
TCR	T-Zellrezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
U/min	Umdrehungen pro Minute
v _v	Vorverdünnung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XDR-TB	extrem arzneimittelresistente Tuberkulose

1. Einleitung

1.1. Tuberkulose

1.1.1. Epidemiologie

Im Jahr 2014 lag die Inzidenz der Tuberkulose nach WHO-Zahlen weltweit bei 9,6 Millionen, wobei es regionale Häufungen im Sub-Sahara- und südostasiatischem Raum gibt [105]. Unter Bundesbürgern betrug die Inzidenz 2,6 pro 100.000 Einwohnern, während sie unter Ausländern, die in Deutschland lebten, um ein 13-faches höher lag (33,6 pro 100.000 Einwohner) – ein Vergleich, der vor allem im Angesicht der aktuellen Flüchtlingskrise an Bedeutung gewinnt [110]. Es besteht somit die Gefahr, dass die Inzidenz in Zuwanderungsländern steigt. Latent infizierte Individuen werden dadurch zum potentiellen Überträger und haben ein lebenslanges Risiko eine aktive Tuberkulose zu entwickeln. Auch wenn nur jeder zehnte Infizierte eine aktive Tuberkulose entwickelt, so ist jeder dritte Mensch auf unserer Erde latent mit *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* infiziert. Die Tuberkulose ist mit 1,5 Millionen Todesfällen im Jahr 2014 eine der führenden Todesursachen weltweit. Für eine heilbare Erkrankung sind diese hohen Raten und Zahlen inakzeptabel [105].

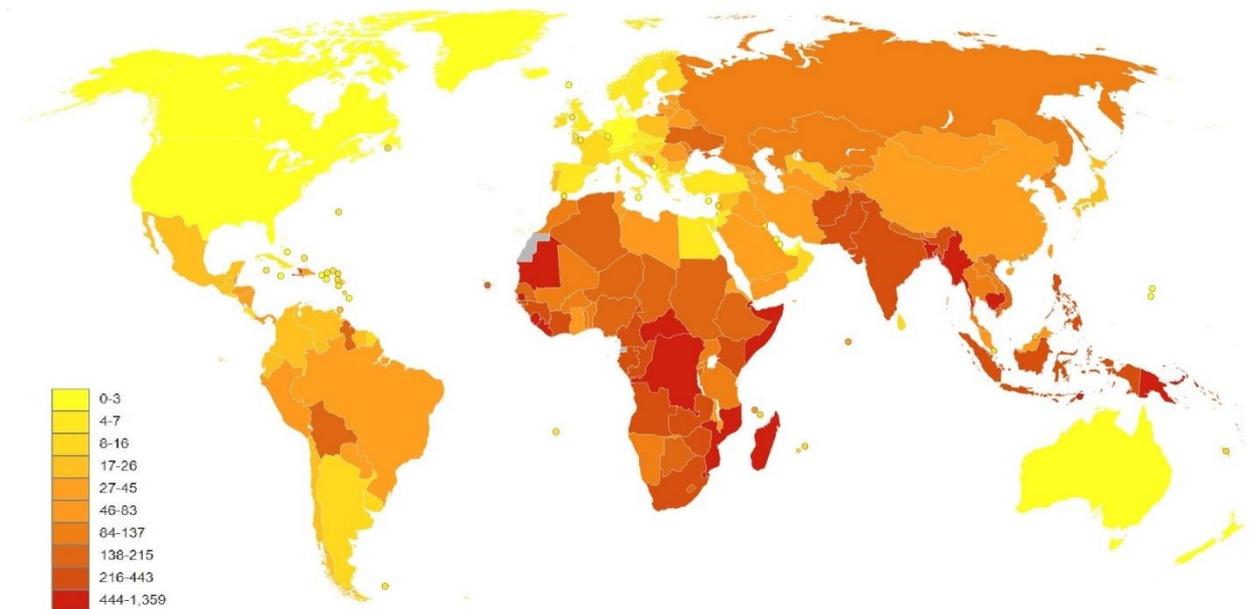


Abbildung 1: Weltweite Todesfälle pro 1 Million Einwohner durch Tuberkulose laut Weltgesundheitsorganisation im Jahr 2012 [106, 107].

1.1.2. Pathologie

Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes verursachen beim Menschen das Krankheitsbild der Tuberkulose. Zu diesen Bakterien zählen neben *Mycobacterium tuberculosis* auch *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* und *Mycobacterium microti* [33, 39]. Es handelt sich um säurefeste Stäbchen, welche über Aerosole inhaliert werden und in der Lunge zum klassischen Bild einer Lungentuberkulose führen können. Dabei bilden Mykobakterien keine Toxine. Vielmehr sind zusätzliche Glykolipide und Lipide in der äußeren Zellwand der Mykobakterien, beispielsweise langkettige Mycolsäuren, für die besonderen Eigenschaften dieser Bakterien verantwortlich. Zu diesen Eigenschaften zählen [39]:

- schlechte Anfärbarkeit
- langsames Wachstum
- hohe Resistenz gegen chemische und physikalische Noxen
- geringe Permeabilität von Antibiotika

1. Einleitung

Nach Inhalation kommt es in der Lunge zum extra- und intrazellulären Wachstum der Mykobakterien. Ein intrazelluläres Abtöten in Alveolarmakrophagen verhindern die Mykobakterien durch spezielle Immunevasionsmechanismen, welche im folgenden Kapitel beschrieben werden. Zusätzlich werden hiläre Lymphknoten infiziert. Der Infizierte leidet an einer Primärtuberkulose, welche meist asymptomatisch oder mit milden Grippe-ähnlichen Symptomen abläuft. [33, 39, 51].

Dieser Wettlauf aus Abtötung und Vermehrung der Tuberkuloseerreger bestimmt die Klinik einer Primärtuberkulose. Bei immunkompetenten Patienten führt dies zur Ausbildung von Tuberkeln: einem aus infizierten Makrophagen, Epitheloidzellen, Lymphozyten und Plasmazellen bestehenden Konglomerat. Da das Zentrum dieses Granuloms an keiner Blutversorgung angeschlossen ist, kommt es dort zur verkäsenden Nekrose und Kalziumablagerungen, welche röntgenologisch nachweisbar sind. In diesem Zustand können die Mykobakterien lebenslang verweilen. Bei geschwächter Immunlage oder immundefizienten Patienten breiten sich die Erreger über Blut- und Lymphwege im ganzen Körper aus. Es kommt durch endogene Reaktivierung zur Sekundär-, beziehungsweise Miliartuberkulose. Auch eine exogene Reaktivierung durch erneute Infektion von außen ist möglich [33, 39, 51].

1.1.3. Immunabwehr

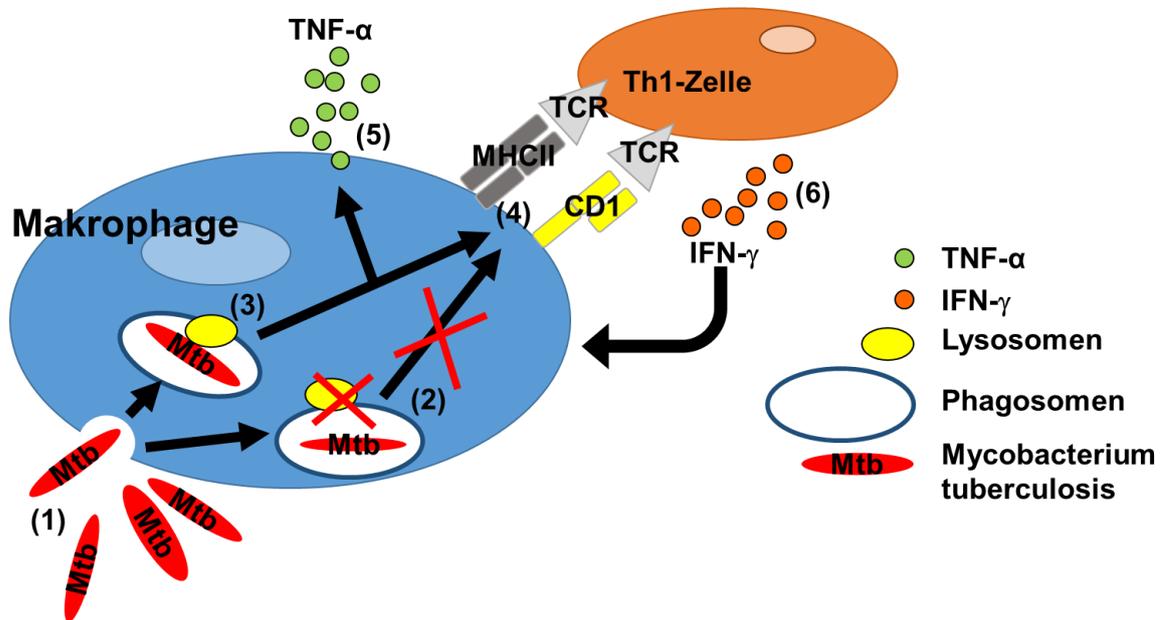


Abbildung 2: Immunabwehr gegen *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Phagozytose von *Mtb* durch Alveolarmakrophagen (1), Immunevasionsmechanismen (2), Abtöten von Mykobakterien durch Phagosomenmaturation und Fusion mit sauren Lysosomen (3), Präsentation über Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) und cluster of differentiation 1 (CD1) an T-Zellrezeptor (TCR) einer T-Helfer-Zelle 1 (Th1) (4), Freisetzung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (5) und Interferon- γ (IFN- γ) (6).

Mtb-haltige Aerosole gelangen tief ins Bronchialsystem, wo die Bakterien von Alveolarmakrophagen phagozytiert werden. Dem Immunsystem stehen mehrere Abwehrmechanismen zur Verfügung, unter anderem Autophagie von Makrophagen [35], Sekretion von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden [63] oder intrazelluläre Lyse der phagozytierten Mykobakterien. Dabei maturieren und fusionieren Phagosomen mit sauren Lysosomen – *Mtb* unterbindet diese Abwehrprozesse durch Evasionsmechanismen wie dem Hemmen der Produktion des Mediators Prostaglandin E₂, wodurch die Apoptoserate der Makrophagen reduziert wird und die Bakterien intrazellulär überleben können [9, 80]. Die intrazelluläre Replikationsrate der Mykobakterien steht unter multiplen Einflüssen, wie der Transferrin- oder der Eisenkonzentration [24]. Dennoch werden manche

1. Einleitung

Mykobakterien abgetötet und Peptide und Proteine der lysierten Bakterien über den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC Klasse II) an T-Zellen präsentiert. Lipidantigene, welche ein wesentlicher Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand sind, werden von cluster of differentiation 1-Molekülen (CD1) an T-Zellen präsentiert – um sowohl die Präsentation von Protein- als auch Lipidantigenen untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit CD1-positive Makrophagen verwendet. Makrophagen sezernieren zusätzlich Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und verstärken damit sowohl die Abwehrmechanismen von Makrophagen, als auch von T-Zellen. TNF- α führt zur Rekrutierung von cluster of differentiation 4-positiven (CD4) Th1-Zellen an den Ort der Infektion [53, 84]. Die Bedeutung von TNF- α zeigt sich bei Menschen unter TNF- α supprimierender Therapie: Der anti-TNF- α -Antikörper Infliximab erhöht das Risiko einer endogenen Reaktivierung der Tuberkulose [46] und vermindert die CD8⁺ T-Zell-vermittelte antimikrobielle Aktivität gegen *Mtb* [12]. Die durch Makrophagen und TNF- α aktivierten T-Zellen sezernieren bei Erkennung des mykobakteriellen Antigens Interferon γ (IFN- γ) aus, um die intrazelluläre Abtötung und Präsentation mikrobieller Antigene an T-Zellen zu verbessern [14, 26] (Abb. 2). Im Speziellen hat IFN- γ folgende Hauptfunktionen:

- Induktion NO-abhängiger Apoptose der Makrophagen
- Steigerung der Autophagie von Makrophagen
- Verstärkung der Phagosomenmaturation
- Rekrutierung von T-Zellen
- Aktivierung zytotoxischer T-Zellen
- Induktion von T-Gedächtniszellen

Als Ergebnis dieses Entzündungsprozesses bilden T-Zellen und Makrophagen Granulome. Dadurch wird die Infektion lokal begrenzt. Diese Granulome und die darin persistierenden Mykobakterien sind das pathophysiologische Korrelat für eine erfolgreiche zelluläre Immunantwort. *Mtb* kann sich in einem Granulom zwar nicht vermehren, persistiert aber in einem metabolisch nur wenig aktiven Stadium. Wird das Wirtsimmunsystem geschwächt, z.B. durch eine HIV-Koinfektion [18], Diabetes mellitus [87] oder Unterernährung [52], kann es zu einem Zerfall des Granuloms und einer Reaktivierung der Infektion kommen. Phagozytierte Mykobakterien können selbst den nekrotischen Untergang von Makrophagen überleben [66].

1.1.4. Therapie

Die Antibiotikatherapie der Tuberkulose ist wegen des Aufbaus der mykobakteriellen Wand und der Immunevasionsmechanismen langwieriger und schwieriger als bei vielen anderen Bakterien. Die Erstlinientherapie der Tuberkulose verläuft nach folgendem Schema [111]:

- 1. – 2. Monat: Isoniazid + Rifampicin + Pyrazinamid + Ethambutol
- 3. – 6. Monat: Isoniazid + Rifampicin

Eine regelrechte Therapie führt zu einer Heilung des Patienten. Aufgrund der sich häufenden Resistenzen gegen Standard-Antibiotika, werden Capreomycin, Kanamycin oder Amikacin als Zweitlinien-Tuberkulostatika eingesetzt [111].

Es gibt zwei Hauptprobleme dieser Standardtherapie. Erstens dauert die Therapie sehr lang. Zweitens führt eine rasche Symptombesserung oft zu nachlassender Compliance des Patienten, insbesondere zu frühzeitiger Behandlungsabbrüche. Diese sorgen für eine Selektion von Antibiotika-resistenten Mutanten. Die zunehmende Anzahl an Infektionen mit resistenten Stämmen von *Mtb* stellt ein immer größeres Problem dar. Das betrifft vor allem Regionen mit hoher Tuberkulose Last: Südostasien, westpazifische Länder und Afrika [105]. Treten Resistenzen auf gegen Isoniazid und Rifampicin auf, spricht man von multidrug resistant Tuberkulose (MDR-TB). Stämme mit Resistenzen gegen alle Erstlinien-Tuberkulostatika und gegen mindestens zwei Zweitlinien-Tuberkulostatika werden als extensively drug resistant Tuberkulose (XDR-TB) bezeichnet. MDR-TB und XDR-TB erfordern eine Therapie mit weniger effektiven Antibiotika als eine Tuberkulose ohne Resistenzen. Das bedeutet eine therapeutische Machtlosigkeit für ärmere Regionen. In Deutschland sind ca. 3% der Fälle eine MDR-TB. Insgesamt gab es im Jahr 2014 9 Fälle einer XDR-TB – 8 davon waren Erkrankte, die aus Nachfolgerstaaten der ehemaligen Sowjetunion stammten [110].

Aus finanzieller Sicht entsteht ein zunehmendes Problem, vor allem für ärmere Regionen: die Behandlung einer nicht-resistenten Tuberkulose kostete im Jahr 2014 zwischen 100 - 500 US\$. Die Behandlung einer MDR-TB hingegen belief sich bereits auf Kosten von 5000 - 10000 US\$. Gerade ärmere Länder, welche eine höhere Last an MDR-TB und XDR-TB aufweisen, geraten aufgrund der

1. Einleitung

Resistenzentwicklungen und der damit einhergehenden, steigenden finanziellen Belastung in Not. Aus Daten über Gesundheitsausgaben reicher Länder lassen sich 2 Richtwerte festlegen, welche erreicht werden müssen, um eine ausreichende medizinische Versorgung für Tuberkulosekranke sicherzustellen: Die Gesundheitsausgaben müssen mindestens 6% des Bruttoinlandsproduktes betragen und weniger als 15% aus Spesen gedeckt werden. Die meisten Länder, allen voran die 22 Länder mit der höchsten Tuberkuloselast und Niedriglohn-Länder, erreichen diese beiden Richtwerte nicht. Von den 22 Ländern mit der höchsten Tuberkuloselast sind Brasilien, Thailand und Südafrika am nächsten dran, diese Richtwerte zu erreichen [105].

Diese Entwicklungen erfordern ein Umdenken im Kampf gegen Tuberkulose. Der kosteneffizienteste und langfristig erfolgversprechendste Weg stellt dabei ein wirksamer Impfstoff gegen Tuberkulose dar. Damit könnte man Resistenzentwicklungen, Therapieproblemen und der hohen Tuberkulose Last weltweit entgegenwirken. Ein effektiver Impfstoff würde die Anzahl der Tuberkulose Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit senken. Als Konsequenz sinkt das Risiko der Weltbevölkerung gegenüber *Mtb* exponiert zu werden. Die Lipidantigene der mykobakteriellen Wand stellen vielversprechende, neue Antigene im Vergleich zu den konventionellen Proteinantigenen dar, aus welchen bis dato kein hinreichend wirksamer Impfstoff gewonnen werden konnte. Um diese Lipidantigene in menschliche Makrophagen zu transportieren und somit T-Zellen zu präsentieren, werden neue Transportvehikel benötigt. Liposomen sind aufgrund ihres Lipidaufbaus ideal für diesen Einsatzzweck geeignet [37].

1.2. Liposomen

Liposomen sind 100 nm bis 2 µm große, Vesikel-artige Partikel aus einer Doppellipidschicht, die eine wässrige Phase umschließen. Sie können dadurch ein breites Spektrum an Antigenen inkorporieren. Im Jahr 1968 entdeckt, wurden kurze Zeit später deren Eigenschaften als Transporter von Wirkstoffen weiter erforscht [32]. Seitdem werden Liposomen in der Forschung eingesetzt und sind bereits heute Bestandteil zugelassener Medikamente wie das Amphotericin B enthaltende

1. Einleitung

AmBisome [58] und in klinischen Testphasen befindlichen Impfstoffen [37]. Liposomen besitzen Eigenschaften, die sie als Grundbaustein eines Impfstoffes attraktiv machen [37]:

- sie besitzen eine Adjuvansfunktion für das angeborene Immunsystem
- sie können durch inkorporierte Liganden Wirkstoffe zu definierten Zellen des Immunsystems transportieren (z.B. Lipopolysaccharid (LPS) als Ligand für den toll-like receptor 4)
- sie schützen während des Transports die inkorporierten Wirkstoffe vor enzymatischen Abbau
- sie führen zu einem Depoteffekt an der Injektionsstelle
- sie ermöglichen durch die hydrophobe Hülle den Transport von Lipiden

Auch durch Modifikation der Zusammensetzung kann die Wirkung der Liposomen modifiziert werden:

- der Einbau von stearyliertem Octaarginin fördert die Phagozytose durch Makrophagen [44] und zeigt im Vergleich zu kationischen Liposomen einen geringeren schädlichen Einfluss auf die Zellstoffwechselaktivität [90]
- größere Liposomen (0.5–2 μm) verbleiben länger am Injektionsort und werden von dendritischen Zellen aufgenommen, während kleine Liposomen (<200 nm) über Lymphe in die Lymphknoten abtransportiert werden [37, 60]
- über den Einbau von Cholesterol kann die Membranfluidität verändert werden [8, 37]
- eine positive Ladung induziert eine stärkere Antigen-spezifische Immunantwort als eine neutrale/negative Ladung [37]

Durch die Modifikation der Zusammensetzung von Liposomen kann die Effektivität eines Impfstoffes optimiert werden. Liposomen bieten dadurch die Möglichkeit spezifische Signalwege des menschlichen Immunsystem zu aktivieren. Dies ist insbesondere bei der Tuberkulose ein Vorteil, da so gezielt CD4-positive T-Zellen aktiviert werden können [73]. Die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen hatten einen Durchmesser von 100 nm, damit sie im humanen Organismus schnellstmöglich über Lymphwege abtransportiert und dem Immunsystem zugeführt werden können.

1.3. Vorarbeiten im Institut

Mycobacterium tuberculosis und die Abundanz von Lipidantigenen in dessen äußerer Zellwand rückten vor mehreren Jahren in den Fokus vieler Forschergruppen weltweit [13, 49]. Dies geschah ebenfalls im MyTb Lab in Ulm mit der Hoffnung, ein potentes Antigen zur Immunisierung gegen die Tuberkulose zu identifizieren und zu etablieren [43]. Die Idee war, dies auf Basis von Liposomen zu erreichen. Liposomen, welche aus Phosphatidylcholin, Cholesterol, und stearyliertem Octaarginin bestanden, boten die Möglichkeit, die mykobakteriellen Lipidantigene der äußeren Zellwand als Antigene zu verwenden und dem humanen Immunsystem zuzuführen. Die Hypothese war, T-Zellen durch diesen liposomalen Transportmechanismus zu aktivieren und so eine suffiziente Immunität gegen Tuberkulose zu induzieren [44]. Neben zellulärer Aufnahme leerer Liposomen wurden auch grundlegende Kriterien wie Sterilität des Herstellungsprozesses untersucht. Lipoarabinomannan (LAM), eine Hauptkomponente der mykobakteriellen Zellwand, wurde als Modelantigen verwendet [43]. LAM-spezifische T-Lymphozyten zeigten durch Sekretion von IFN- γ antimikrobielle Aktivität gegen *Mtb*, nachdem diese über Nacht mit LAM inkubiert wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inkorporation von LAM in Liposomen und die anschließende Inkubation mit menschlichen Immunzellen zu einer verminderten Expression von Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren gamma – PPAR γ – in diesen Zellen führt. Die T-Zell-Immunantwort auf mit LAM beladene Liposomen war 2-16x größer als auf reines LAM [43]. Dies zeigte, dass der Transport von mykobakteriellen Glykolipid- und Lipidantigenen mit Hilfe von Liposomen ein vielversprechender Ansatz ist, eine *Mtb*-spezifische T-Zell-Immunantwort zu induzieren.

Aufgrund dieses neuen Wissens rückte der Fokus von der Inkorporation eines spezifischen Antigens auf die Inkorporation multipler Antigene aus der mykobakteriellen Zellwand, um dann in einem zweiten Schritt weitere potente Antigene aus dieser Antigenkombination zu identifizieren. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Inkorporation besagter Antigenkombination – *Mtb*-Extrakt – , deren Eigenschaften in Kombination mit Liposomen, sowie deren Interaktionen mit dem humanen Immunsystem.

1.4. Ziel dieser Arbeit

Die Tuberkulose stellt immer noch eine große Herausforderung für die Gesundheitssysteme in aller Welt dar. Hauptprobleme sind die Zunahme multiresistenter Stämme sowie das Fehlen eines wirksamen Impfstoffes. Der derzeit einzig zugelassene Impfstoff Bacillus Calmette-Guérin (BCG) führt vor allem bei Immunsupprimierten zu Nebenwirkungen und schützt nicht vor der ansteckenden Lungentuberkulose bei Erwachsenen. Auf der Suche nach neuen Impfstoffen sind daher vor allem Totimpfstoffe in den Blickpunkt gerückt. Hier besteht eine wesentliche Herausforderung darin, die Impfantigene in die richtigen Zielzellen - Makrophagen und dendritische Zellen - zu transportieren. Arbeiten aus unserem Labor haben dazu beigetragen Liposomen als geeignete Transportvehikel von mykobakteriellen Antigenen in humane Immunzellen zu etablieren. Dabei wurden Effekte unterschiedlicher Liposomenkompositionen, sowie diverser Antigene untersucht. Auf dieser Basis wurden im ersten Teil dieser Arbeit liposomale Eigenschaften wie

1. Größe und Homogenität,
2. die Menge und Art an inkorporiertem Antigen,
3. Toxizität

als Zielvariablen definiert. Die dazu formulierten einseitigen Hypothesen waren, dass

1. ad 1.
 - die Größe während der Herstellung sukzessive abnimmt,
 - die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen einen Durchmesser von 100 nm besitzen,
 - Liposomen in homogener Suspension vorliegen,
 - das während der Herstellung notwendige Extrudieren zu einem Verlust von Liposomen führt,
2. ad 2.
 - in leeren und Antigen-beladenen Liposomen verschiedene Mengen an *Mtb*-Extrakt inkorporiert sind,
3. ad 3.

1. Einleitung

- Liposomen ab einer definierten Verdünnung für humane Zellen toxisch sind,
- die *Mtb*-Extrakt Menge der Liposomen keinen Einfluss auf deren Toxizität für humane Zellen hat.

Mit diesem neuen Wissen wurden im zweiten Teil liposomale Interaktionen mit dem menschlichen Immunsystem analysiert. Dabei wurden Experimente zu den Zielvariablen

1. Phagozytose von Liposomen durch Makrophagen,
2. TNF- α Freisetzung, und
3. IFN- γ Freisetzung durch T-Zellen

durchgeführt. Zu den oben genannten Zielvariablen wurden zu Beginn einseitige Hypothesen formuliert:

1. ad 1.
 - Liposomen werden von humanen Immunzellen phagozytiert;
 - Die Phagozytose von Liposomen durch humane Immunzellen ist unabhängig vom *Mtb*-Extrakt Gehalt der Liposomen.
 - Die Phagozytose von Liposomen durch humane Immunzellen nimmt mit steigender Liposomenkonzentration zu.
 - Zellen mit Haupthistokompatibilitätskomplex II phagozytieren Liposomen.
2. ad 2.
 - Zellen produzieren nach Inkubation mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen TNF- α .
3. ad 3.
 - *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien generieren nach Inkubation mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen eine *Mtb*-Extrakt-spezifische Freisetzung von IFN- γ .

Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Experimente wurde im Verlauf eine zusätzliche Hypothese formuliert:

- ad 1. Liposomen haften an der Oberfläche von cluster of differentiation 3-positiven Zellen

1. Einleitung

Hauptziel dieser Arbeit war es Liposomen als Trägermolekül für mykobakterielle Antigene zu etablieren. Unsere Vision ist es, Liposomen als Vehikel für Lipid-basierte Impfstoffe gegen die Tuberkulose zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Arbeitsgeräte:

Gerät	Hersteller
3016 (Schüttler)	GFL
Axiovert 40 CF (Auflichtmikroskop)	Zeiss
CH-BI45-2 (Lichtmikroskop)	Olympus
Curix 60 (Entwickler)	AGFA
Dynamic Light Scattering	Malvern Industries
ELISA-Reader	ASYS
FACSCalibur (Durchflusszytometer)	Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop Axioskop-2	Zeiss
Gelkammer Western Blot	Whatman
Heizblock 5320	Eppendorf
Inkubator 6000	Heraeus
Infinite M200	Tecan
Mini-Extruder	Avanti Polar Lipids
Neubauer-Zählkammer	Schubert & Weiss
Nanoparticle Tracking Analysis	Nano-Sight
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe	Eppendorf
Rotavapor RII (Rotationsverdampfer)	Büchi Labortechnik AG
Sicherheitswerkbank 1	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank 2	Heraeus
TE 77 PWR (Blotting-Apparat)	Amersham Biosciences
Ultraschallbad T310-H	Roth, Karlsruhe
Vortex	Heidolph
Wasserbad	Köttermann
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

2. Material und Methoden

Arbeitsmaterialien:

Material	Hersteller
100nm Extruder-Filter	Avanti Polar Lipids
15ml-Kulturflaschen	Becton Dickinson/Falcon
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson/Falcon
Gewebekulturplatten, 24-Well	Becton Dickinson/Falcon
Gewebekulturplatten, 96-Well Flachboden	Nunc
Gewebekulturplatten, 96-Well Rundboden	Nunc
Gewebekulturplatten, 96-Well ELISA	Nunc
Immobilon-P Transfer Membrane	Millipore
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pipettenspitzen 0,5 – 10µl	Brand
Pipettenspitzen 100 – 1000µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 2 – 200µl	Roth
Rundkolben	VWR
Röhrchen (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Schraubröhrchen „Bluecaps“ (15ml, 50ml)	Becton Dickinson/Falcon
Stripetten (5ml, 10ml, 25ml)	Costar
Support-Filter	Avanti Polar Lipids

Chemikalien:

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol, 14,3 mol/l in H ₂ O	Sigma
Acrylamide-Bis, 30% w/v	Serva
Albumin (bovine), fest, rein	Sigma
Aqua dest. „Ampuwa“, flüssig, rein	B. Braun, Petzold GmbH
BCA Protein Assay	Pierce
Bromphenolblau, 0,2 mg/ml in Methanol	Sigma
Buffy Coats	DRK Blutspendedienst BW-Hessen, Ulm

2. Material und Methoden

CDP-Star Substrat	Roche
Chloroform, flüssig, rein	VWR
Cholesterol, fest, rein	Sigma
Diocetadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiIC), 5 µmol/l in DMSO	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO), flüssig, rein	Sigma
ELISA- Strept AB-Komplex, 10 mg/ml in H ₂ O	Invitrogen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 0,05% w/v	Thermo Scientific
Ficoll-Paques Plus	GE Healthcare Bio Sciences
Fetales Kälberserum	Sigma
Glycerol, flüssig, rein	Roth
Glycin, fest, rein	Merck
H ₂ SO ₄ , 0,18 mol/l in H ₂ O	Roth
HCl, 37%ig in H ₂ O	Roth
Hepes	Roth
Humanserum AB	Cambrex
Isopropanol, 70%ig	Roth
L-Glutamin, fest, rein	Thermo Scientific
Methanol, flüssig, rein	Roth
Milchpulver, fest, rein	Roth
MgCl, 1 mol/l in H ₂ O	Roth
NaOH, 2,5 mol/l in H ₂ O	Merck
Natriumazid, fest, rein	Roth
Natriumchlorid, fest, rein	Roth
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
Paraformaldehyd, 4%ig in PBS	Sigma
PBS	Thermo Scientific
Penicillin, 10000 U/ml in H ₂ O	Biochrom
PermWash	Becton Dickinson
Phosphatidylcholin (egg, chicken), fest, rein	Avanti Polar Lipids
RPMI 1640	Thermo Scientific
Stearylirtes Octaarginin, fest, rein	Avanti Polar Lipids
Streptomycin, 10 mg/ml in H ₂ O	Sigma

2. Material und Methoden

TMB Substrate Solution	Thermo Scientific
Tris, fest, rein	Roth
Trypanblau, 0,5%ig in H ₂ O	Biochrom AG
Tween 20	Sigma

Medien und Puffer

Medien:

Zellkulturmedium (CM)	RPMI 1640 + 10 mM HEPES + 2 mM L-Glutamin + 5% hitzeinaktiviertes (30 min bei 56 °C) Humanserum + 60 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
Waschmedium	400 ml PBS + 100 ml CM + 20 ml FCS

Puffer:

Durchflusszytometrie:

FACS-Puffer:	1000 ml PBS + 10 ml 10% Natriumazid + 10 ml FCS
PermWash (10x):	1:10 verdünnt in PBS
4% Paraformaldehyd:	4% Paraformaldehyd in PBS
Bindepuffer:	Annexin-V-FITC Apoptose Kit (Becton Dickinson)

ELISA:

Assay-Puffer:	500 ml PBS + 10 g Albumin
---------------	------------------------------

2. Material und Methoden

Waschpuffer:	500 ml PBS + 3 g Tris (=50 mM) + 500 mg Albumin (= 0,1%) + 1 ml Tween 20 (= 0,2%)
Stopplösung (0,18M):	196 ml H ₂ O + 3,7 ml 9,7 M H ₂ SO ₄

Western Blot:

10x TBS:	1000 ml destilliertes Wasser + 8 g NaCl (= 8%) + 1,21 g Tris pH mit H ₂ SO ₄ auf 7,3
TBS-T:	TBS 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt + 1 ml Tween 20
Alkalische Phosphatase-Puffer:	995 ml destilliertes Wasser + 12,11 g Tris + 5,84 g Natriumchlorid + 5 ml 1 M Magnesiumchlorid
Ladepuffer:	125 mM Tris/HCl +20% Glycerol +4% SDS +Mercaptoethanol +100 mM DTT +0.2 mg/ml Bromphenolblau
10x Laufpuffer:	1000ml Aqua dest. +250 mM Tris +1.9 M Glycin +17 mM SDS pH 8.3

2. Material und Methoden

1x Laufpuffer:	10x Laufpuffer auf 1/10 mit Aqua dest. verdünnt
Trenngelpuffer:	1.5 M Tris/HCl +0.4% SDS pH 8.8
Trenngel (12%):	2.5 ml Aqua dest. +1.9 ml Trenngelpuffer +3.0 ml 30% Polyacrylamid-Lösung +75 µl 10% APS +3 µl TEMED
Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris/HCl 0.4% SDS pH 6.8
Sammelgel (5%):	1.75 ml Aqua dest. +0.3 ml Sammelgelpuffer +0.4 ml 30% Polyacrylamid-Lösung +25 µl 10% APS +2.5 µl TEMED
Transferpuffer:	1000 ml Aqua dest. +25 mM Na ₂ HPO ₄
Blockierungspuffer:	5% Milchpulver in TBS-T

Zytokine:

Zytokin	Hersteller
rhu GM-CSF, 10 ng/ml	Berlex
rhu IFN- γ , \geq 63 pg/ml	R&D Systems

2. Material und Methoden

rhu IL-4, 10 ng/ml	Strathmann
rhu TNF- α , \geq 63 pg/ml	Endogen

Antikörper:

FACS-Antikörper	Hersteller
APC CD3	Becton Dickinson
APC IgG2a	Becton Dickinson
Biotin MHC Klasse II	Becton Dickinson
FITC Annexin V	Becton Dickinson
FITC IgG1	Invitrogen
FITC Streptavidin	Caltag
FITC TNF- α	eBioscience
PE Propidiumiodid	Becton Dickinson
PerCP IgG2a	Becton Dickinson
PerCP MHC Klasse II	Becton Dickinson

Sonstige Antikörper	Hersteller
anti-human-IFN- γ , 1 μ g/ml	Thermo Scientific
anti-human-IFN- γ biotinyliert, 0,5 μ g/ml	Thermo Scientific
anti-human-TNF- α , 2 μ g/ml	Thermo Scientific
anti-human-TNF- α biotinyliert, 0,5 μ g/ml	Thermo Scientific
donkey anti-rabbit	Jackson, ImmunoResearch Laboratories
rabbit anti-H37Rv	BEI Resources

Antigene:

Antigen	Hersteller
Lipopolysaccharid, 3 ng/ml	Sigma
<i>Mtb</i> -Extrakt, 1 mg/ml in H ₂ O	Extrakt aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv; Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Ulm

2.2. Methoden

Folgende in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden nach in-house Standards, abgeleitet von Standards der ASTM, durchgeführt:

- Generierung von PBMC, Makrophagen und Kuzzeit-T-Zelllinien aus Buffy Coats
- Stimulation von PBMC und Makrophagen
- Herstellung von Liposomen
- Durchflusszytometrie
- ELISA
- Fluoreszenzmikroskopie
- Bradford Protein Assay
- NTA
- DLS
- Western Blot

Keine angewandte Methode war eine vom Labor entwickelte Methode.

2.2.1. Gewinnung und Stimulation von Zellen

Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen aus Buffy Coats

Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) wurden aus Buffy Coats mittels Ficoll, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und mehreren Zentrifugationsschritten aufgereinigt. Dabei wurden 25 ml frisches Blut mit Heparin versetzt und vorsichtig auf 15 ml Ficoll gegeben. Dieses Polysaccharid mit einer definierten Dichte von 1,077 g/ml besitzt die Eigenschaft die unterschiedlichen Zellfraktionen des Blutes mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aufzutrennen. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt (1600 U/min für 30 min) werden aus der Interphase die gewünschten Lymphozyten und Monozyten abgenommen. Durch mehrere, darauffolgende Zentrifugationsschritte und Lyse von Erythrozyten mit Aqua dest. erhält man aufgereinigte PBMCs. Die PBMC wurden mit Trypanblau gefärbt, in der

2. Material und Methoden

Neubauer Zählkammer gezählt und mit Zellkulturkomplettmedium (CM) auf die gewünschte Konzentration eingestellt (Abb. 3).

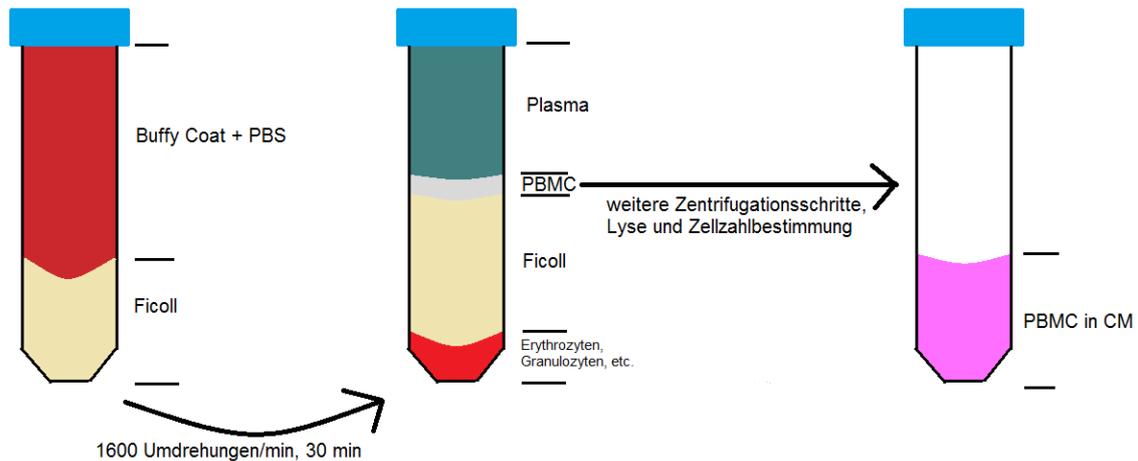


Abbildung 3: Aufreinigung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). Frisches Blut wurde mittels phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), Ficoll und mehrerer Zentrifugationsschritte nach Zellfraktionen aufgetrennt. Die übrig gebliebenen PBMC wurden in Zellkulturkomplettmedium (CM) gelöst.

Generierung von Makrophagen

Makrophagen wurden aus PBMC wie folgt generiert (Abb. 4):

- **Makrophagen:** 80×10^6 PBMC wurden für 1 h in einer Kulturflasche inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit nicht-adhärenenten Zellen abgenommen und verworfen. Die adhärenenten Monozyten differenzierten sich durch Zugabe von GM-CSF nach 4-6 d Inkubationszeit bei 37 °C zu Makrophagen. Danach wurden die Makrophagen mit Hilfe von 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in PBS geerntet (nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur). Die gelösten Zellen wurden gezählt und in CM auf die gewünschte Konzentration eingestellt.
- **CD1-positive Makrophagen:** Zusätzlich zum oben beschriebenen Procedere wurde Interleukin-4 (IL-4) zur Stimulation verwendet. Nach 3 - 4 Tagen wurden die ausdifferenzierten CD1-positiven Makrophagen geerntet.

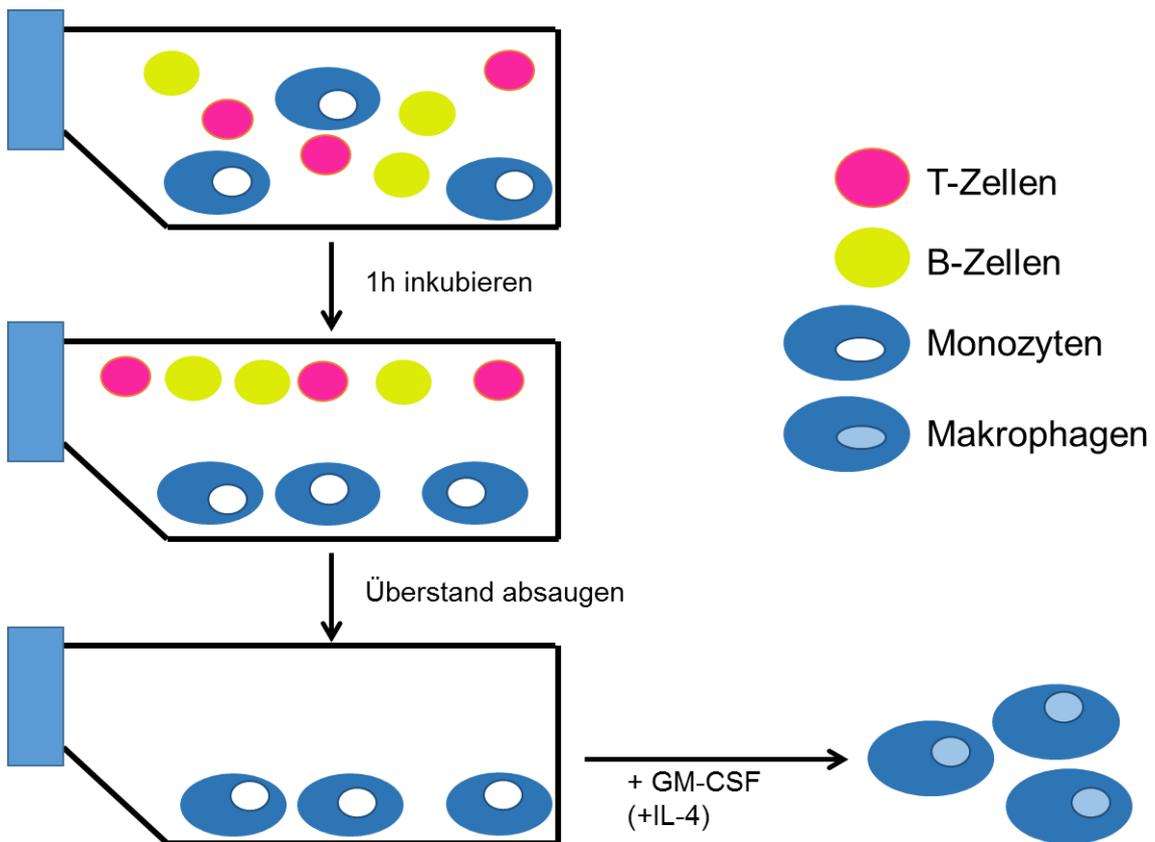


Abbildung 4: Generierung von Makrophagen. Nach 1 h Inkubationszeit adhärten die Monozyten am Boden der Kulturflasche. Der Überstand wurde verworfen. Um Makrophagen aus den adhärennten Monozyten zu generieren, wurden diese mit Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) für 3 - 4 Tage inkubiert. Zur Generierung von cluster of differentiation 1-positiven Makrophagen wurde zusätzlich mit Interleukin-4 (IL-4) inkubiert.

Stimulation von PBMC und Makrophagen

1×10^6 PBMC für Enzyme Linke Immunosorbent Assay (ELISA) bzw. 2×10^6 PBMC für Durchflusszytometer (FACS) wurden mit verschiedenen Reagenzien für 16-18 h in einer 24 well-Platte inkubiert (Endvolumen 300 μ l). Anschließend wurden die Zytokinkonzentrationen im Überstand bestimmt oder die stimulierten Zellen im FACS analysiert. Die Stimulation von Makrophagen geschah mit $0,2 \times 10^6$ M Φ auf einer 96-Well-Platte mit denselben Konzentrationen der Reagenzien (Endvolumen 200 μ l).

Generierung von Kurzzeit-T-Zelllinien

Um spezifische T-Zellen zu generieren, wurden 16×10^6 PBMC mit Interleukin-2T6 (IL-2T6) für 3 Tage in CM inkubiert und anschließend in einem 1:1 Verhältnis mit CD1-positiven Makrophagen desselben Spenders und *Mtb*-Extrakt zusammengegeben und nochmals inkubiert (Abb. 5). Nach dem Ernten wurde die Spezifität der T-Zellen auf *Mtb*-Extrakt im IFN- γ ELISA gemessen.

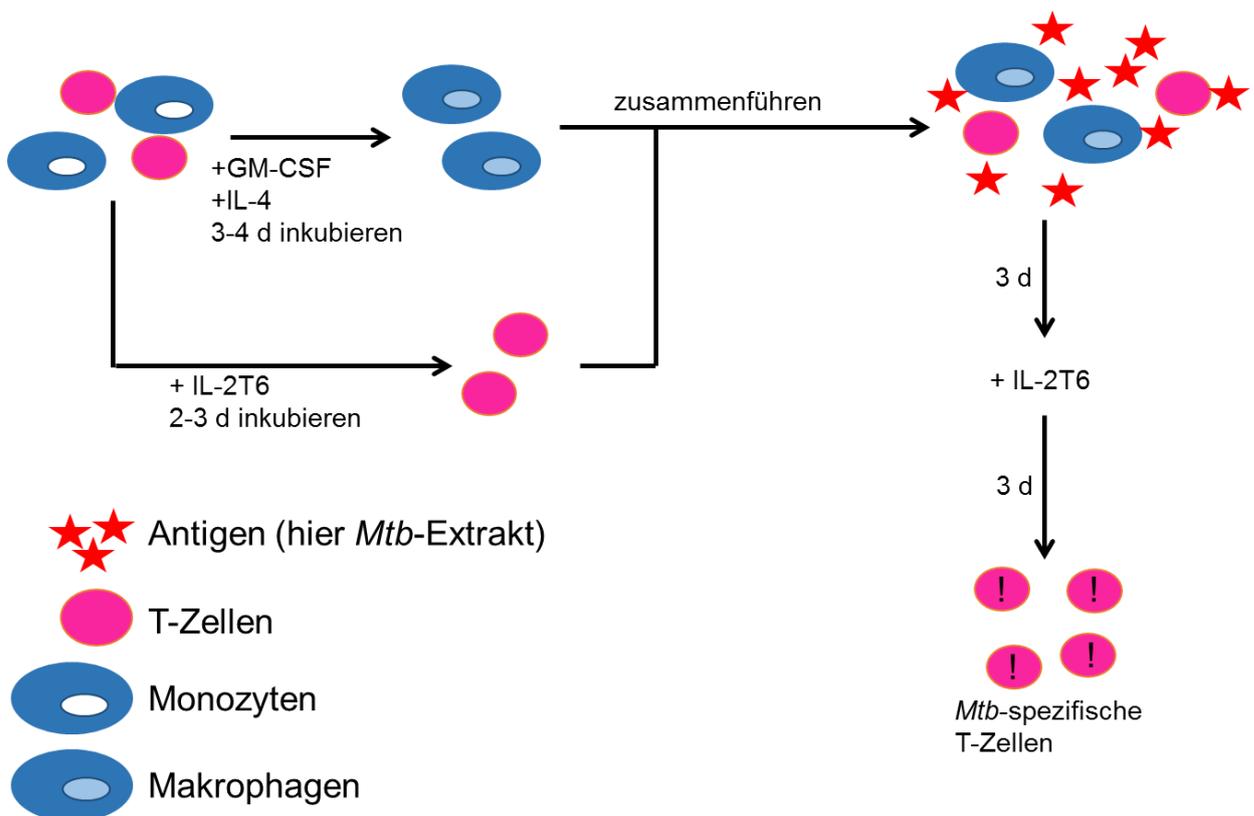


Abbildung 5: Generierung von Kurzzeit-T-Zelllinien. Monozyten wurden mit Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) für 3 - 4 Tage inkubiert. T-Zellen desselben Spenders wurden für 2 - 3 Tage mit Interleukin-2T6 (IL-2T6) inkubiert. Die Zellfraktionen wurden anschließend zusammengeführt und mit *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt (*Mtb*-Extrakt) für 3 Tage inkubiert. Um *Mtb*-spezifische T-Zellen zu generieren, wurden die Zellen weitere 3 Tagen mit IL-2T6 inkubiert.

2.2.2. Herstellungs-, Analyse- und Messmethoden

Herstellung von Liposomen

Folgende Reagenzien wurden in einen Rundkolben gegeben:

- 5 mg Phosphatidylcholin (in 2 ml einer 1:1 Chloroform-Methanol-Mischung gelöst)
- 1 mg Cholesterol (10 mg/ml in Chloroform gelöst)
- 800 µg Stearyl.-R8 (20 mg/ml in DMSO gelöst)
- +/- 20/40/80 µg *Mtb*-Extrakt (c = 1 mg/ml)
- +/- 18,3 µl DiIC (0,2 mol%)

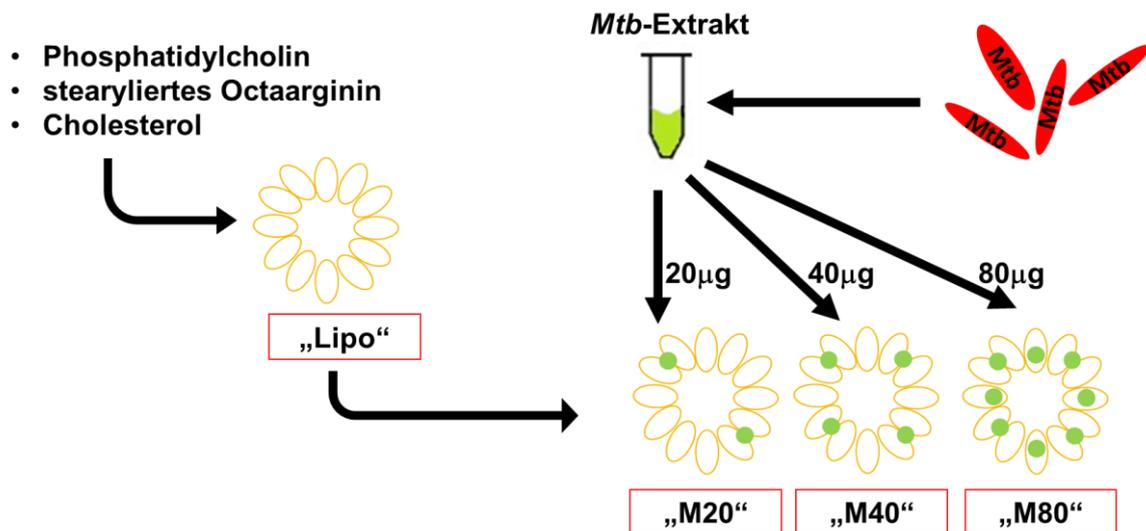


Abbildung 6: Zusammensetzung von Liposomen. Leere Liposomen (Lipo) bestanden aus 5 mg Phosphatidylcholin, 1 mg Cholesterol und 800 µg stearyliertem Octaarginin. Zur Herstellung von Liposomen mit 20/40/80 µg inkorporiertem *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt (M20/M40/M80) wurden zusätzlich die jeweiligen Mengen an *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt (*Mtb*-Extrakt) hinzugegeben.

Das Gemisch wurde mit Aluminium-Folie und Parafilm luftdicht abgedichtet, im Ultraschallbad für 10 min beschallt und anschließend mittels Rotationsverdampfer stufenweise komplett verdampft (Tabelle 1).

2. Material und Methoden

Tabelle 1: Schritte beim Rotationsverdampfen

Druck (mbar)	Hysterese (mbar)	Zeit (min)
700	50	2
600	50	2
500	50	2
400	50	2
350	25	10
250	25	20
100	10	20
0	10	20

Es folgten weitere Schritte:

1. Nach Verdampfen des kompletten Lösungsmittels Resuspension des entstandenen Lipidfilms in 2 ml PBS
2. 1 h Inkubation bei Raumtemperatur
3. Beschallung im Ultraschallbad für 15 min
4. 1 h Inkubation bei Raumtemperatur
5. Suspension in Eppendorf-Gefäß überführen
6. Zentrifugation (30 min bei 14000 U/min)
7. Überstand verwerfen und Pellet in 200 – 300 µl PBS lösen
8. Vortex
9. Einfrieren & Auftauen (freeze & thaw) (Suspension 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff tauchen und anschließend 2 min im Wasserbad (37 °C) auftauen, Vorgang 10x wiederholen)
10. Liposomen 11x extrudieren (Suspension wird mehrmals durch eine Membran mit 100 nm Porengröße gepresst)
11. Liposomen in Eppendorf-Gefäß bei 4 °C lagern.

Das Verfahren ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

2. Material und Methoden

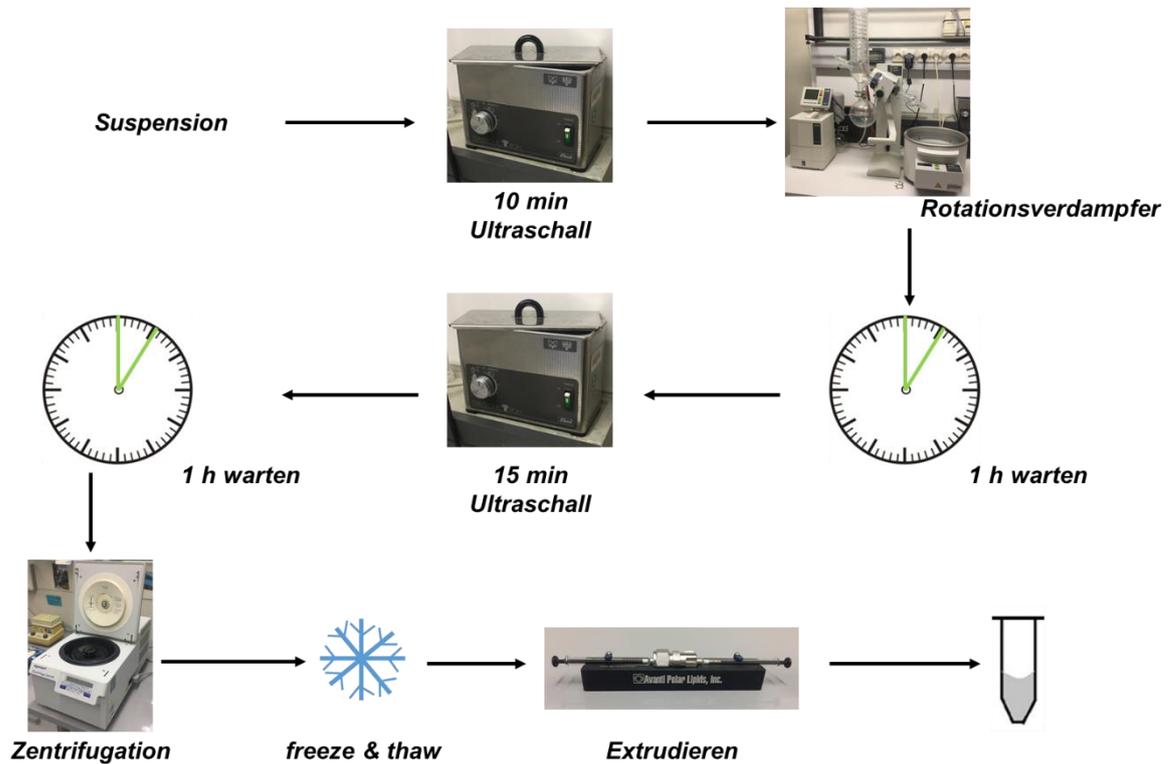


Abbildung 7: Schritte der Liposomenherstellung. Die Suspension aus 5 mg Phosphatidylcholin, 1 mg Cholesterol und 800 μ g stearyliertem Octaarginin durchlief Schritte während der Herstellung: Rotationsverdampfer, Ultraschallbad, Zentrifugation, Einfrieren & Auftauen (freeze & thaw), und Extrudieren.

Durchflusszytometrie

Über Nacht stimulierte PBMC (18 h) wurden nach folgendem Schema für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) gefärbt (Abb. 8):

1. Ernten, Waschen mit FACS-Puffer und Zentrifugation (10 min bei 1300 U/min)
2. Resuspension des Pellets in 200 μ l FACS-Puffer (Überstand verwerfen)
3. Zugabe der Oberflächenantikörper
4. Inkubation (30 min bei 4 °C)

Für eine intrazelluläre Färbung wurden zusätzlich folgende Schritte unternommen (Abb. 8):

5. Waschen der Zellen mit 4% PFA
6. Inkubation (20 min bei Dunkelheit auf Eis)

2. Material und Methoden

7. Waschen der Zellen mit PermWash
8. Zugabe der intrazellulären Antikörper
9. Inkubation (30 min bei 4°)
10. Waschen mit PermWash
11. Waschen mit FACS-Puffer

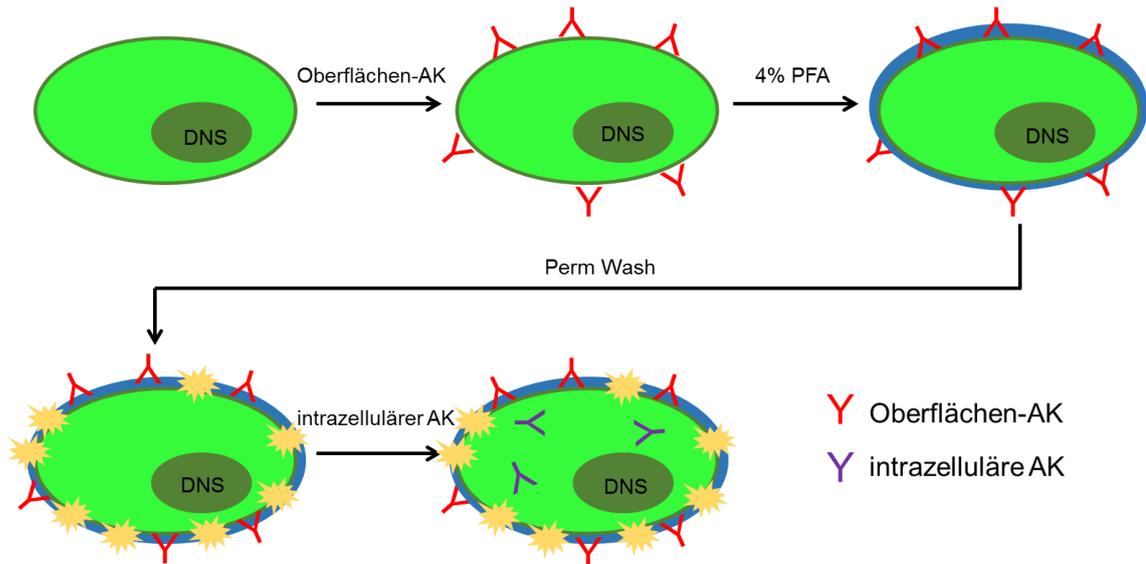


Abbildung 8: Intrazelluläre Durchflusszytometrie-Färbung. Über Nacht inkubierte Zellen wurden mit einem Oberflächenantikörper (Oberflächen-AK) markiert. Nach Zugabe von 4% Paraformaldehyd (PFA) und PermWash wurden die Zellen mit intrazellulären Antikörpern (intrazelluläre AK) gefärbt. Im Zellkern ist die Desoxyribonukleinsäure (DNS) dargestellt.

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurden die Zellen in Bindepuffer gegeben und mit Annexin-V-FITC sowie Propidiumiodid-PE gefärbt. Annexin-V bindet negativ geladene Phospholipide. Bei vitalen Zellen befindet sich das negativ geladene Phosphatidylserin auf der Zellmembraninnenseite. Wird eine Zelle apoptotisch, verlagert sich das Phosphatidylcholin nach außen und kann von Annexin-V-FITC gebunden werden. Wird eine Zelle nekrotisch, kann Propidiumiodid-PE die DNA im Zellkern binden. Nach 15 min Inkubationszeit wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 9).

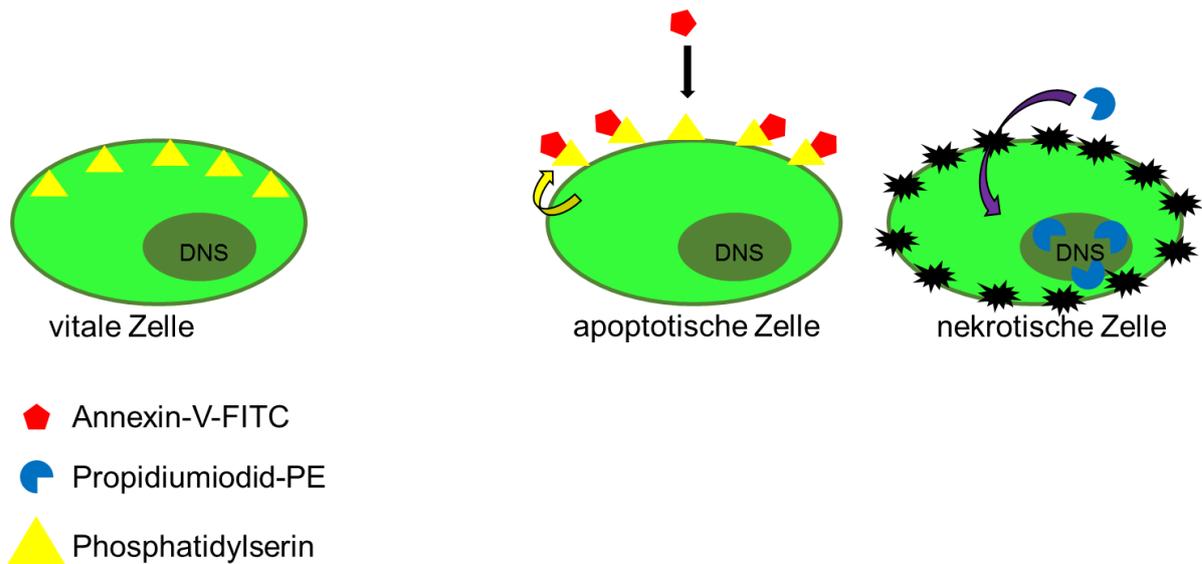


Abbildung 9: Annexin-V-FITC Apoptosefärbung. Apoptotische Zellen werden von Annexin-V-FITC an Phosphatidylserin gebunden, welches bei der Apoptose an der Zelloberfläche exprimiert wird. Bei nekrotischen Zellen wird die Zellmembran durchlässig (schwarze Sterne). Dies ermöglicht Propidiumiodid-PE, Desoxyribonukleinsäure (DNS) im Zellkern nekrotischer Zellen zu binden.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Zytokinkonzentration wurde mittels Sandwich-ELISA bestimmt (Abb. 10):

1. Zugabe des „coating“ Antikörpers ins Well
2. Inkubation (bei Raumtemperatur über Nacht)
3. Blockieren mit Assay-Puffer (1 h)
4. Zugabe der Proben und des Standards
5. Inkubation (1 h)
6. Zugabe des zweiten, biotinylierten Antikörpers
7. Inkubation (1 h)
8. Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer,
9. Zugabe des Streptavidin/Biotin-Peroxidase-Komplex
10. Inkubation (20 min)
11. Waschen mit Waschpuffer
12. Zugabe von TMB Substrat

2. Material und Methoden

13. Stoppen der Farbreaktion mit 0,18-molarer H₂SO₄

14. Messen der optischen Dichte mittels ELISA-Reader (Wellenlänge 450 nm)

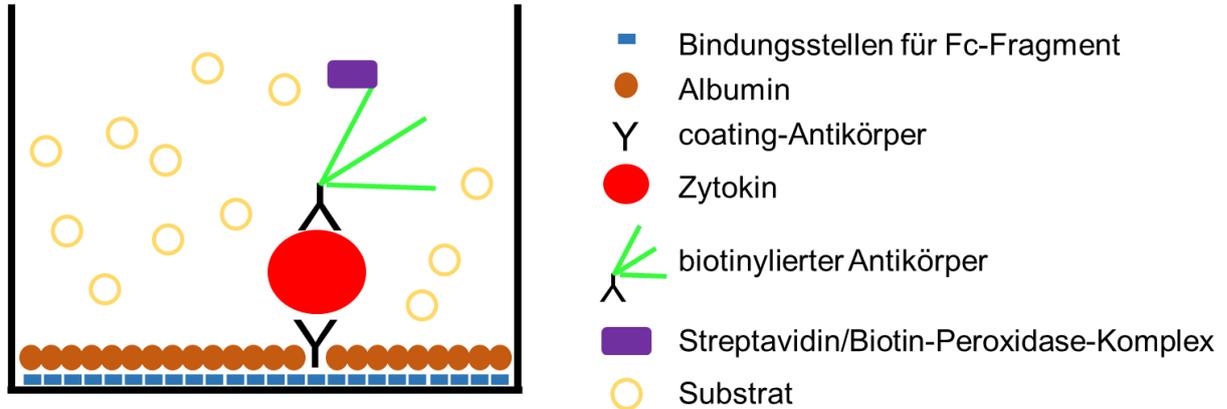


Abbildung 10: Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Um ein Zytokin quantitativ nachzuweisen wurde ein spezifischer Antikörper ins Well eingbracht, der unspezifisch an seiner konstanten Region (Fc-Fragment) an der Well-Wand gebunden wurde. Die restlichen unspezifischen Bindungsstellen wurden mit Albumin blockiert. Die Probe mit dem nachzuweisenden Zytokin wurde aufgetragen und anschließend ein biotinylierter Antikörper hinzugegeben. An den biotinylierten Antikörper band ein Streptavidin/Biotin-Peroxidase-Komplex, der die Farbreaktion eines Substrats katalysierte. Die Reaktion wurde nach einiger Zeit mit niedrigmolarer Schwefelsäure abgebrochen. Die optische Dichte dieser Farbreaktion wurde im ELISA-Reader gemessen.

Um den ELISA auszuwerten zu können, wurde das Statistikprogramm Excel verwendet. Die optischen Dichte- Werte (OD) der Standardreihe wurden in ein kartesisches Koordinatensystem eingetragen und eine Trendgerade hindurchgelegt. Der kleinstmögliche, plausible Wert der Standardreihe, der nahe bei der Trendgerade lag, wurde als Sensitivitätsgrenze benutzt. Dieser Wert lag meistens bei 63 pg/ml. Mit dieser Trendgerade wurden die OD Werte der Proben in Zytokinkonzentrationen umgerechnet.

Fluoreszenzmikroskopie

2×10^6 PBMC wurden über Nacht mit Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat-gefärbten (DiIC) Liposomen in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet und in CM gelöst. Die Zellen wurden anschließend auf einen Objektträger pipettiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer 20x Vergrößerung betrachtet. Die Wellenlänge betrug ca. 550 nm. Als Kontrolle wurden unstimulierte PBMC verwendet.

Proteinbestimmung mittels Bradford Assay

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde das „BCA protein assay kit“ verwendet. Als Standard wurde bovines Serumalbumin (BSA) in absteigenden Konzentrationen verwendet (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.03125 mg/ml und 0 mg/ml). 10 μ l der Proben/des Standards wurden auf eine 96-Well-Flachbodenplatte gegeben und 90 μ l des BCA Reagenz hinzugefügt. Dieses Reagenz besteht aus einer 50:1 Mischung der BCA Lösung A und der BCA Lösung B. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 45 min bei 37 °C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Die OD aller Proben wurden analog zur statistischen Methode der ELISA-Auswertung in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Die NTA nutzt die Brown'sche Bewegung von Molekülen und Nanopartikeln aus, anhand derer eine Berechnung des Durchmessers bzw. der Größe der Partikel möglich ist. Dabei wurden Liposomen mit einem Mikroskop beobachtet, während diese mit einem Laser sichtbar gemacht wurden. Das Licht der Liposomen wurde mit einer Kamera über mehrere, eng aufeinanderfolgende Bilder aufgenommen. Auf diesen Bildern erfasste ein Computer einzelne Liposomen und deren Bewegungsradius. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung wurde der Durchmesser der Liposomen durch den Computer berechnet.

Dynamic Light Scattering (DLS)

Liposomen wurden mit kohärentem, monochromatischem Laserlicht bestrahlt. Dies führte dazu, dass sich an den Liposomenpartikeln Streulicht bildete. Dieses Streulicht bildeten Interferenzmuster. Da Liposomen nicht still im Raum verweilen, sondern ihre Position permanent aufgrund der Brown'schen Molekülbewegungen verändern, wiesen diese Interferenzmuster Schwankungen auf, welche mit mehreren Kameras detektiert wurden. Die Interferenzmuster ändern sich in kürzeren Zeitintervallen, je schneller sich ein Liposom bewegt. Ein Liposom bewegt sich schneller, je kleiner sein Durchmesser ist. Diese Zeitintervalle wurden gemessen und somit die Partikelgeschwindigkeit der Liposomen ermittelt. Diese ließ wiederum analog zur NTA mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung die Berechnung des liposomalen Durchmessers zu.

Western Blot

Die Antigenmenge einer Probe wurde mittels Western Blot bestimmt (Abb. 11):

1. Tags zuvor: Vorbereitung des Polyacrylamid-Gels (unten Trenngel mit höherer Dichte, darüber Sammelgel mit niedrigerer Dichte)
2. Kochen der Proben mit Ladepuffer
3. Aufladen der Proben auf das Polyacrylamid-Gel
4. Gelelektrophorese (1)
 - a. währenddessen Aktivierung einer Immobilon-P Transfer Membran von Millipore mit Methanol
5. Blotten des Gels auf Transfermembran (2)
 - a. Abdecken der Transfermembran mit Filterpapier (oben und unten aufgelegt, Filterpapiere zuvor in Transferpuffer getränkt)
6. mehrmaliges Waschen der Membran mit verdünntem, Tris-haltigem Phosphatpuffer (TBS-T)
7. Zugabe des Primärantikörper (H37Rv anti-rabbit) (3)
8. Zugabe des Sekundärantikörper (donkey anti-rabbit)
9. Zugabe des Substrats CDP Star
10. Auflegen des Röntgenfilms (4)

2. Material und Methoden

11. Entwicklung des Röntgenfilms und Auswertung mittels des Computerprogramms Image J (5)

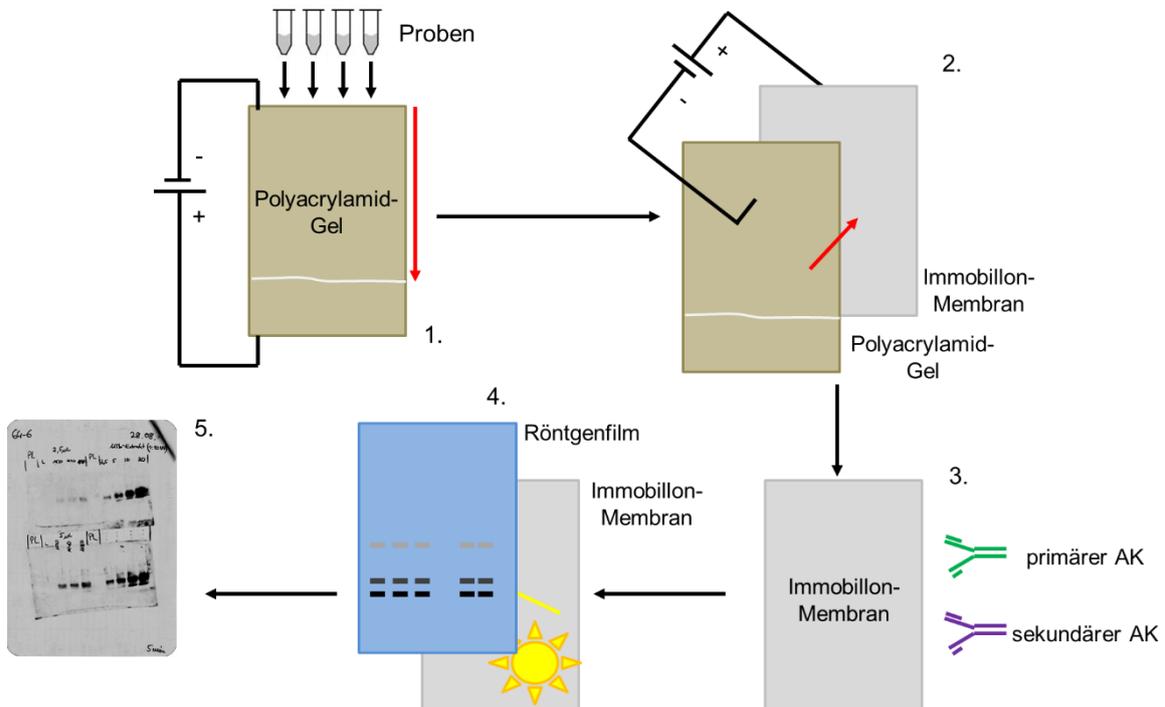


Abbildung 11: Western Blot. Proben wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Von außen wurde Strom angelegt: die ersten 20 min 20 mA, die nächste Stunde 40 mA (1). Das Gel wurde auf eine Immobilon-Membran aufgelegt, worauf für 2,5 h eine Stromstärke von 90 mA angelegt wurde (2). Es wurde ein Primärantikörper (primärer AK; hier: H37Rv anti-rabbit) und ein Sekundärantikörper (sekundärer AK; mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert) hinzugegeben (3). Die Membran wurde mit dem Substrat CDP Star befeuchtet und in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm abgedeckt (4). Nach 5 bis 60 min Belichtungszeit wurde der Röntgenfilm entwickelt und im Computer mittels Image J analysiert (5).

Methodik und Statistik

Die in dieser Arbeit durchgeführten Laborexperimente hatten ein experimentelles Design. Nach Manipulation einer unabhängigen Variable (*Mtb*-Extrakt Gehalt der Liposomen, Verdünnung der Liposomen) wurden der Effekt der Manipulation auf eine abhängige Variable (Toxizität, Phagozytoseverhalten, TNF- α Freisetzung, IFN- γ Freisetzung) untersucht. Als Methodik zur Erfassung dieser Zielvariablen kamen die oben genannten Analyse- und Messmethoden zum Einsatz. Um Störvariablen

2. Material und Methoden

auszuschalten, wurden die aus einem Buffy Coat gewonnenen Zellen in mehrere identische Zellpopulationen aufgeteilt. Die Aufteilung erfolgte randomisiert. Dabei gab es stets eine Zellpopulation, bei der die unabhängige Variable nicht manipuliert wurde, weshalb diese als Kontrollgruppe diente. Bei den anderen Zellpopulationen wurde die unabhängige Variable manipuliert und der Effekt auf die abhängige Variable untersucht. Durch diese konstanten Versuchsbedingungen konnte der Einfluss von Störvariablen minimal gehalten werden. Eine adäquate Stichprobengröße war mit 6-10 Buffy Coats pro experimenteller Fragestellung gegeben. Zu jedem Versuch wurde eine Hypothese formuliert und bei der Auswertung ein einseitiger Hypothesentest durchgeführt.

Die Messergebnisse sind verhältnisskaliert, stetig und normalverteilt. Die in Diagrammen angegebenen Werte beziehen sich auf das arithmetische Mittel von n Messungen. Die Standardabweichung wurde als Fehlerindikator eingezeichnet. Sind einzelne Rohdaten aufgeführt, so handelt es sich um repräsentative Daten. Da eine intrinsische Verbindung zwischen den arithmetischen Mitteln der Messergebnisse der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe bestand, erfolgte die statistische Signifikanztestung mittels gepaartem, einseitigem „student's t-test“. Werte mit $p < 0,05$ (Konfidenzintervall 95%) wurden als signifikant definiert und in die Diagramme eingezeichnet.

Die nachfolgende Tabelle 2 zeigt die Programme, die zur Statistik verwendeten wurden.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Computerprogramme

Programm	Hersteller	Nutzen
Word	Microsoft	Textbearbeitung
Excel	Microsoft	Rechnerische Auswertung
PowerPoint	Microsoft	Erstellen von Grafiken
FlowJo	Tree Star Inc.	FACS-Auswertung
Image J	Wayne Rasband, NIH	Densitometrische Bestimmung von Western Blot-Banden

3. Ergebnisse

3.1. Eigenschaften der Liposomen

Durch Vorarbeiten im Labor gelang es, Liposomen als probates Mittel zum Transport mykobakterieller Antigene in humane Immunzellen zu etablieren. Auf Basis dieser Kenntnisse wurden im ersten Teil dieser Arbeit liposomale Eigenschaften als Zielvariablen und die dazugehörigen Hypothesen definiert:

1. Größe und Homogenität:

- Die Größe nimmt während der Herstellung sukzessive ab.
- Die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen besitzen einen Durchmesser von 100 nm.
- Liposomen liegen in homogener Suspension vor.
- Das während der Herstellung notwendige Extrudieren führt zu einem Verlust von Liposomen.

2. Menge und Art an inkorporiertem Antigen:

- In leeren und Antigen-beladenen Liposomen sind verschiedene Mengen an *Mtb*-Extrakt inkorporiert.

3. Toxizität:

- Liposomen sind ab einer definierten Verdünnung für humane Zellen toxisch.
- Die *Mtb*-Extrakt Menge der Liposomen hat keinen Einfluss auf deren Toxizität für humane Zellen.

Die formulierten Hypothesen wurden durch die folgenden Experimente überprüft.

3.1.1. Größe und Homogenität

Um die Hypothesen zu überprüfen, dass die Größe der Liposomen während der Herstellung sukzessive abnimmt und einen Endwert von 100 nm erreicht, wurde die Liposomengröße jeweils nach Zentrifugation, Einfrieren und Auftauen, und Extrudieren im DLS bestimmt.

Nachdem sich aufgrund des Rotationsverdampfens Lipidmembranen am Rundkolben gebildet haben, setzen sich diese durch Lösen in PBS vereinzelt zu Liposomen zusammen. Da viele der geformten Konstrukte nicht stabil oder nicht vollständig geschlossene Kugeln sind, werden diese im Ultraschallbad wieder zerlegt und können sich bei der darauffolgenden einstündigen Inkubation erneut formen. Nach der 30-minütigen Zentrifugation enthält das Pellet am Boden des Eppendorf-Gefäßes vollständig geformte Liposomen, während der Überstand diejenigen Lipide enthält, die sich nicht zu Liposomen zusammengesetzt haben. Zu diesem Zeitpunkt sind erstmals Liposomen messbar, da vor diesem Schritt entweder zu wenige Liposomen oder zu viele nicht-liposomale Partikel die Messung verfälscht hätten. Aus diesem Grund wird von dieser Größe als Ausgangsgröße ausgegangen. Die Liposomen durchlaufen vor ihrer Fertigstellung besagten Zentrifugationsschritt, 10 Zyklen alternierendes Einfrieren und Auftauen, und das Extrudieren. Nach jedem dieser drei Schritte wurde die Liposomengröße im DLS untersucht (Abb. 12).

3. Ergebnisse

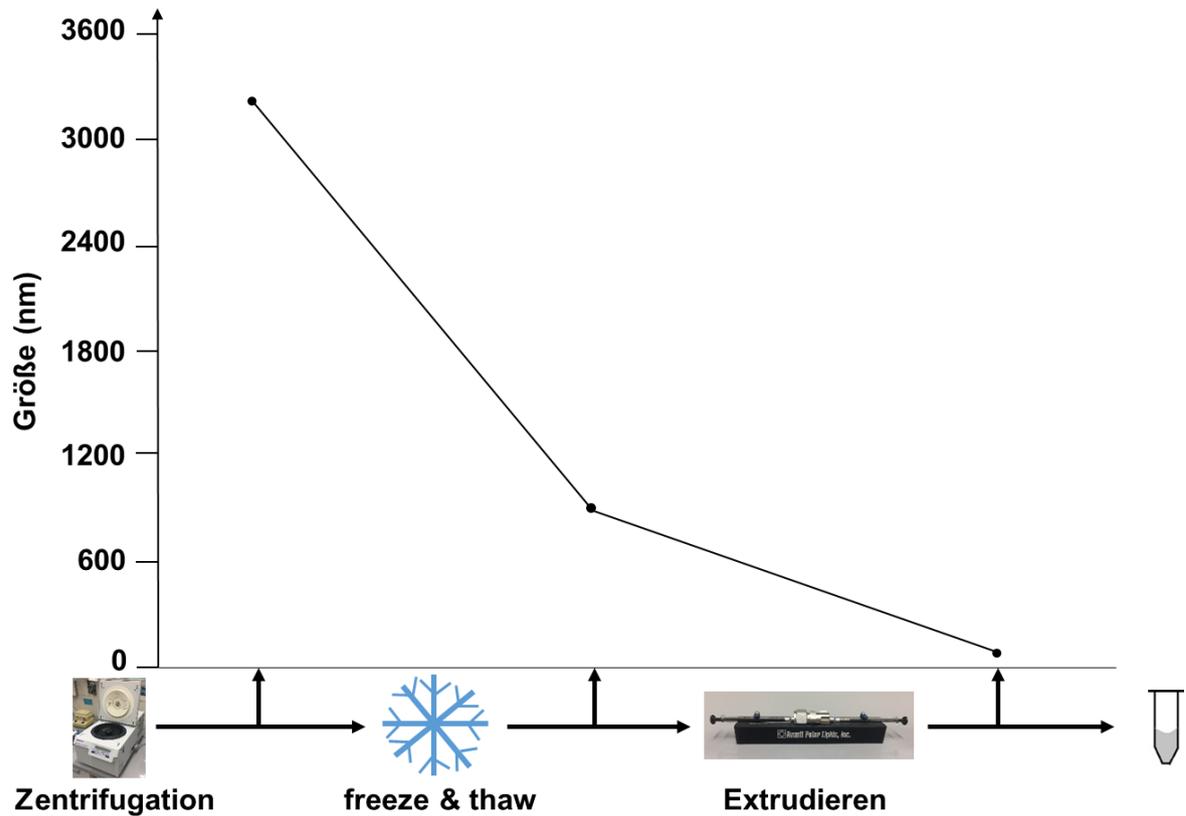


Abbildung 12: Abnahme der Liposomengröße während der Herstellung. Die zeigt die Liposomengröße in nm jeweils nach den letzten drei Herstellungsschritte Zentrifugation, Einfrieren & Auftauen (freeze & thaw), und Extrudieren. (n=1)

Es zeigte sich, dass die Größe der Liposomen Schritt für Schritt abnahm. Das Einfrieren und Auftauen reduzierte die Größe deutlich von einer Ausgangsgröße von 3298 nm auf 996 nm. Nach dem Extrudieren hatten die Liposomen eine Größe von 129 nm. Diese DLS-Daten zur Liposomengröße zeigten,

1. dass die Größe während der Herstellung abnimmt und
2. der gewünschte Durchmesser von 100 nm knapp erreicht wird.

Um die Homogenität der Liposomenchargen zu untersuchen, wurden Lipo mittels DLS (Abb. 13) und mittels NTA analysiert (Abb. 14 und 15). Zusätzlich ermöglicht die NTA-Messung, die Konzentration, sowie den Durchmesser der Liposomen zu bestimmen.

3. Ergebnisse

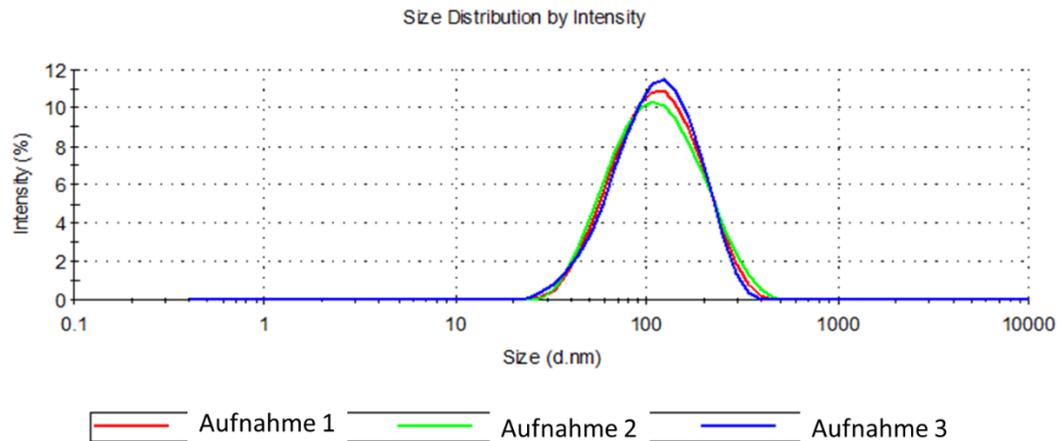


Abbildung 13: Größe von Liposomen im Dynamic Light Scattering (DLS). Liposomen wurde dreimal mittels DLS analysiert und die Partikelgröße in nm gegen die Intensität des Streulichts aufgetragen. Die Intensität ist dabei in Prozent der insgesamt detektierten Streulichtintensität angegeben. Je mehr Partikel einer bestimmten Größe vorhanden sind, desto mehr Streulicht geht von diesen aus. Die Homogenität der Liposomen spiegelt sich in der geringen Breite der Graphen wider. Verschiedene Liposomengrößen hätten die Kurven verbreitert oder gar mehrgipflig hätten werden lassen. (n=3)

Das Experiment bestätigte die Hypothese, dass die Liposomen in homogener Suspension vorlagen. Der durchschnittliche Liposomendurchmesser betrug 99,24 nm und entspricht somit dem Erwartungswert von 100 nm.

Um den Durchmesser, welcher mittels DLS bestimmt wurde, zu bestätigen, wurden die Liposomen ebenfalls mittels NTA auf ihre Größe untersucht.

3. Ergebnisse

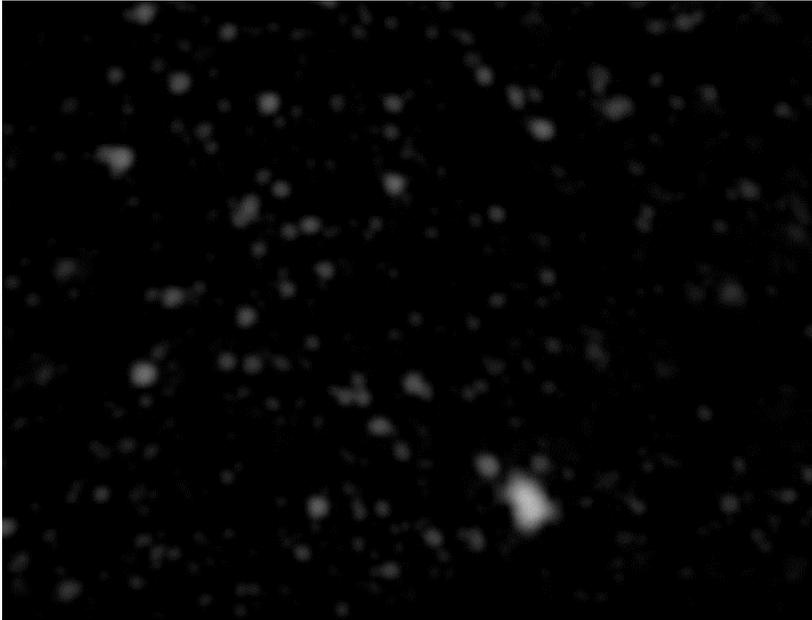


Abbildung 14: Nanoparticle Tracking Analysis-Filmaufnahme (NTA). Repräsentativer Bildausschnitt des NTA-Filmes, welcher die Brown'schen Bewegungen der Liposomen zeigte. (n=4)

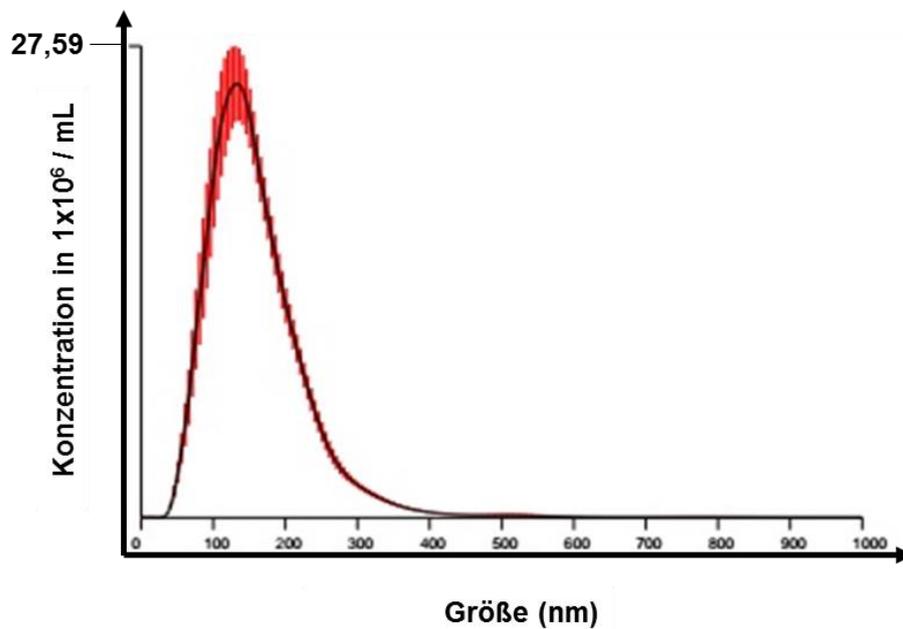


Abbildung 15: Größe von Liposomen im Nanoparticle Tracking Analysis. Dieselbe Probe wurde vier Mal in Folge gemessen. Die roten Balken stellen die Standardabweichungen dar. (n=4)

3. Ergebnisse

Das Experiment zeigte, dass die Größe der einzelnen Liposomen eine homogene Verteilung aufweisen. Die durchschnittliche Liposomengröße lag bei 160 nm mit einer Standardabweichung von +/- 3,5 nm. Die Konzentration der Liposomen betrug in der NTA-Messung $33,61 \pm 3,49 \times 10^8$ Partikel/ml. Zusammenfassend bestätigten diese Experimente die Hypothesen, dass

1. die Liposomen in homogener Suspension vorliegen und
2. einen Durchmesser von 100 nm haben.

Die oben gezeigten Ergebnisse bewiesen, dass es möglich war, Liposomen standardisiert und in gewünschter Konzentration herzustellen. Da während des Extrudierens eine Abnahme der Trübung der Liposomensuspension auftrat, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Extrudieren zu einem Partikelverlust führt. Um zu prüfen, ob das Extrudieren zu einem unverträglich hohen Partikelverlust führt, wurde der Proteingehalt vor und nach dem Extrudieren bestimmt. Hierzu wurden M40 hergestellt (unextrudiert und extrudiert) und der Proteingehalt vor und nach dem Extrudieren mittels Western Blot und Protein Assay bestimmt (Abb. 16).

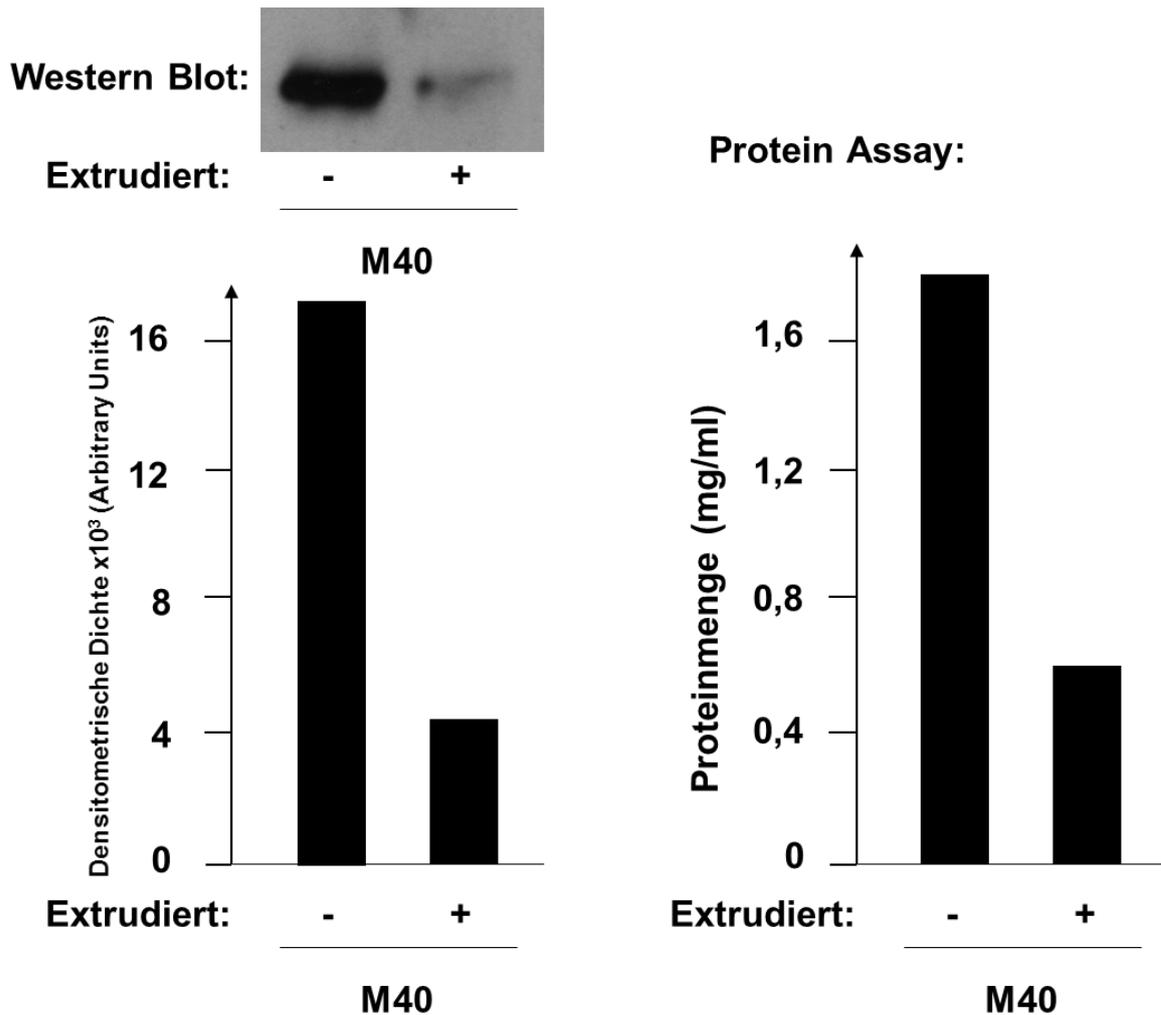


Abbildung 16: Vergleich unextrudierter und extrudierter Liposomen im Western Blot (linkes Diagramm) und Protein Assay (rechtes Diagramm). Der oben abgebildete Western Blot zeigt unextrudierte (linker Streifen) und extrudierte (rechter Streifen) Liposomen mit 40µg inkorporiertem *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt (M40). Die densitometrische Dichte dieses abgebildeten Western Blots ist im linken Diagramm eingetragen. Der rechts abgebildete Protein Assay zeigt die Proteinmengen derselben Proben. (1 repräsentativer Western Blot von 4, Protein Assay: n=1)

In der densitometrischen Auswertung der Western Blots zeigte sich ein Verlust von 76%. Diese Messung wurde in einem zweiten unabhängigen Verfahren, der Bestimmung der Konzentration an Gesamtprotein, bestätigt: im Protein Assay wurde ein Verlust von 65% gemessen. Die durchgeführten Experimente bestätigten die Hypothese, dass es durch Extrudieren zum Verlust von Liposomen kommt.

3. Ergebnisse

3.1.2. Einbau von *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt

Bei der Herstellung der Liposomen wurden verschiedene Mengen *Mtb*-Extrakt hinzugegeben (Tabelle 3). Dies geschah unter der Annahme, dass Liposomen verschiedene Mengen an *Mtb*-Extrakt aufnehmen können und dies im Nachhinein nachweisbar ist.

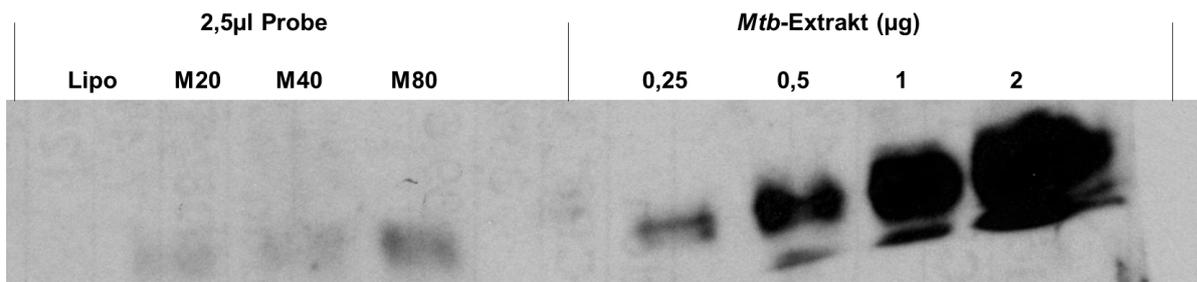
Tabelle 3: Beim Herstellungsprozess hinzugegebene *Mtb*-Extrakt-Mengen

Nomenklatur der Liposomen	<i>Mtb</i> -Extrakt Menge (μg)
Lipo	0
M20	20
M40	40
M80	80

Um die Menge an inkorporiertem *Mtb*-Extrakt zu messen, wurden die Liposomenpräparationen im Western Blot auf den *Mtb*-Extrakt Gehalt hin untersucht und mittels Image J ausgewertet (Abb. 17). Als Primärantikörper wurde ein polyklonales Kaninchen anti-H37Rv Serum „rabbit anti-H37Rv“ verwendet, da das verwendete *Mtb*-Extrakt aus dem Mykobakterienstamm H37Rv gewonnen wurde. Reines *Mtb*-Extrakt wurde als Referenz titriert.

3. Ergebnisse

A



B

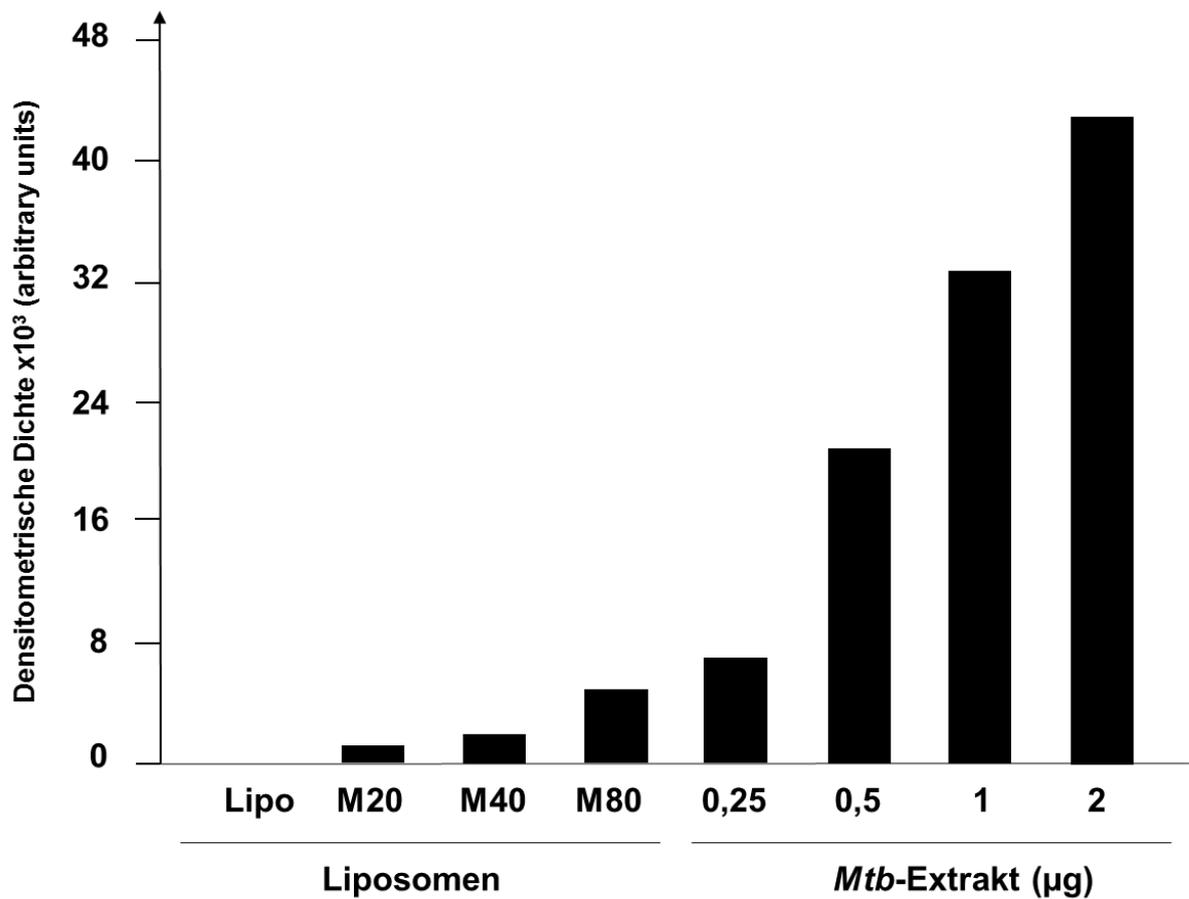


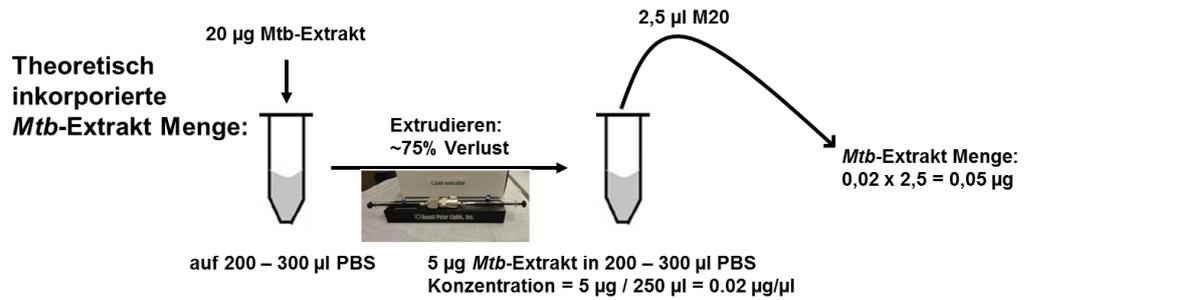
Abbildung 17: *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)-Extrakt-Inkorporation in Liposomen. **A:** 2,5 µl leere und mit *Mtb*-Extrakt beladene Liposomen wurden mittels Western Blot auf *Mtb*-Extrakt Gehalt analysiert. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler anti-H37Rv-Antikörper verwendet. Zusätzlich wurde reines *Mtb*-Extrakt titriert, was eine Berechnung der *Mtb*-Extrakt Menge in den Liposomen erlaubte. Der Versuch wurde für größere Liposomenmengen wiederholt. Die Abbildung zeigt 1 repräsentativen Western Blot von 5. **B:** Die Bandenintensitäten des in A abgebildeten Western Blots wurden mit dem Computerprogramm Image J densitometrisch gemessen und in dieses Diagramm eingefügt. Die Abbildung zeigt die Auswertung von 1 repräsentativen Western Blot von 5.

3. Ergebnisse

Die Western Blots zeigten, dass unterschiedliche Mengen an *Mtb*-Extrakt inkorporiert war: Die Menge titrierte sich von 0 AU bei Lipo bis 7 AU bei M80. Die oben genannten Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass in Lipo, M20, M40 und M80 verschiedene Mengen an *Mtb*-Extrakt inkorporiert worden war.

Da die M20-Bande im Western Blot die homogenste Schwärzung zeigte, wurde die theoretisch in den Liposomen vorhandene Menge an *Mtb*-Extrakt hier beispielhaft für M20 berechnet und mit der aus der densitometrischen Dichte berechneten *Mtb*-Extrakt Menge verglichen (Abb. 18).

3. Ergebnisse



Im Western Blot gemessen:

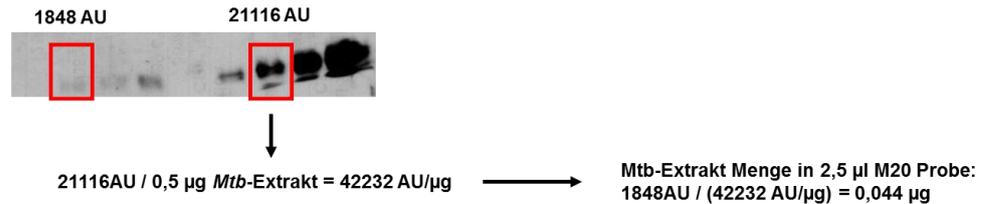


Abbildung 18: Berechnung der *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)-Extrakt Menge in Liposomen mit 20µg inkorporiertem Mtb-Extrakt (M20). Theoretisch inkorporierte Mtb-Extrakt Menge: Da die genaue Menge an phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) zum Lösen der Liposomen nach Zentrifugation nicht exakt eingestellt werden kann, gehen wir von durchschnittlich 250 µl PBS aus. Zu Beginn wurden 20 µg Mtb-Extrakt zu den noch leeren Liposomen hinzugegeben. Durch Extrudieren gehen 75% der Liposomen verloren, da diese am Filter hängen bleiben. Die verbleibenden Liposomen enthalten nach Extrudieren aufgrund des Verlusts 5 µg/ml Mtb-Extrakt. In 2,5 µl dieser Lösung sind rechnerisch 0,05 µg Mtb-Extrakt enthalten. **Im Western Blot gemessen:** Die densitometrische Dichte der Bande von 0,5 µg Mtb-Extrakt wurde zur Berechnung verwendet, da dessen Schwärzung am besten geeignet war. Erst wurde die Schwärzung pro µg Mtb-Extrakt berechnet, was 42232 arbitrary units/µg (AU/µg) entspricht. Teilt man die Schwärzung der M20-Bande, 1848 AU, durch die Schwärzung pro µg Mtb-Extrakt, 42232 AU/µg, lässt sich die in der M20-Probe inkorporierte Mtb-Extrakt Menge berechnen. In dem gezeigten Western Blot beträgt diese 0,044 µg Mtb-Extrakt.

Der Vergleich der densitometrischen Dichte ergab eine Mtb-Extrakt Menge von 0,044 µg in 2,5 µl M20, was einer theoretisch inkorporierten Menge von 0,05 µg entspricht. Die theoretisch inkorporierte Menge an Mtb-Extrakt ist somit 14% größer als die densitometrisch gemessene Mtb-Extrakt Menge. Für M40 lässt sich ein Unterschied von 14%, für M80 ein Unterschied von 25% zwischen theoretisch inkorporierter und densitometrisch gemessener Mtb-Extrakt Menge berechnen. Dennoch zeigen diese theoretischen Überlegungen, dass bei der hier verwendeten

3. Ergebnisse

Herstellungsmethode beinahe die gesamte hinzugegebene *Mtb*-Extrakt Menge in Liposomen inkorporiert wird.

3.1.3. Toxizität von Liposomen

Die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen wurden aus Phosphatidylcholin, stearyliertem Octaarginin und Cholesterol hergestellt. Um die Toxizität dieser Liposomen zu untersuchen und die Hypothese zu überprüfen, dass Liposomen ab einer definierten Verdünnung für humane Zellen toxisch sind, wurden PBMC mit Lipo (1:25/1:50/1:100) inkubiert. Die Anzahl toter Zellen wurde durch Zellzählung nach Trypanblaufärbung bestimmt (Abb. 19).

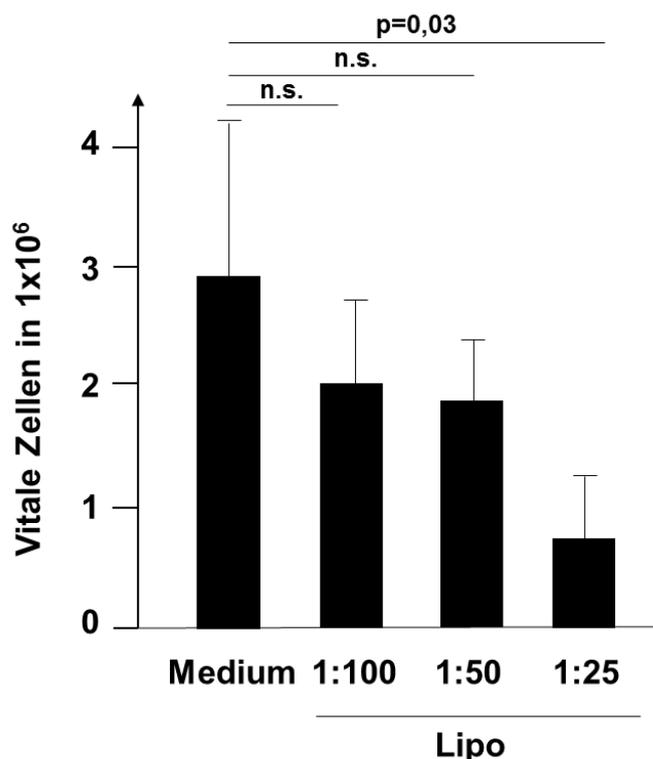


Abbildung 19: Toxizität von Liposomen auf peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). 4×10^6 PBMC wurden über Nacht (18 h) mit Zellkulturkomplettmedium und verschiedenen Verdünnungen von leeren Liposomen (Lipo; 1:25, 1:50, 1:100) inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und anschließend in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. (n=3)

3. Ergebnisse

Das Experiment zeigte, dass 75% der PBMC bei einer Liposomen-Verdünnung von 1:25 Trypanblau aufgenommen hatten und demzufolge nicht mehr vital waren ($p = 0,03$). Ab einer Verdünnung von 1:50 war kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (25% tote Zellen) festzustellen. Die Ergebnisse bestätigten die eingangs formulierte Hypothese, dass Liposomen ab einer definierten Verdünnung für humane Zellen toxisch sind. Daher wurde in den folgenden Experimenten mindestens mit einer 1:50 Verdünnung gearbeitet.

Das vorangegangene Experiment wurde mit leeren Liposomen durchgeführt, um Störvariablen wie inkorporiertes Antigen auszuschalten. Da in den folgenden Experimenten *Mtb*-Extrakt-beladene Liposomen verwendet wurden, musste die Toxizität von *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen ebenfalls überprüft werden. Um folglich die Hypothese zu überprüfen, dass *Mtb*-Extrakt keinen Einfluss auf die Toxizität von Liposomen hat, wurden PBMC mit Lipo, M20, M40 und M80 (jeweils 1:100) über Nacht inkubiert. Die Zahl vitaler Zellen wurde am nächsten Tag mittels Trypanblaufärbung bestimmt (Abb. 20).

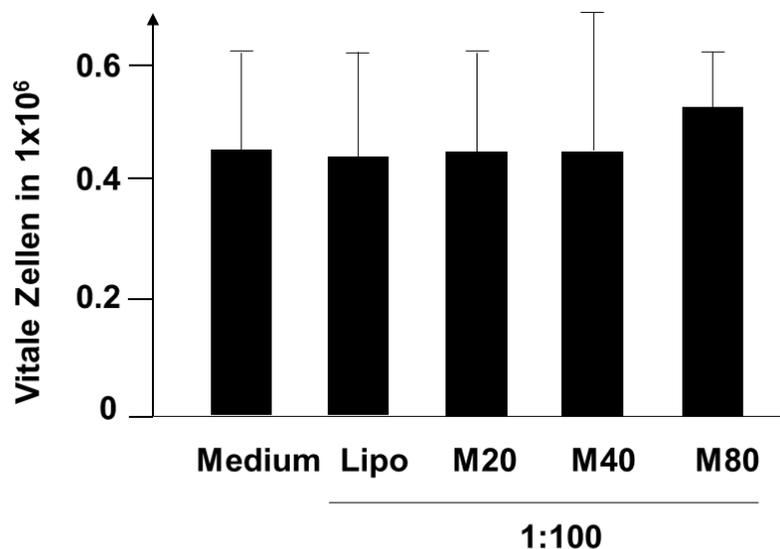


Abbildung 20: Toxizität von Liposomen auf peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). 1×10^6 PBMC wurden über Nacht (18 h) mit leeren Liposomen (Lipo) und *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-Extrakt beladenen Liposomen (jeweils 20/40/80 μg *Mtb*-Extrakt in M20/M40/M80; jeweils in 1:100 Verdünnung) inkubiert und die vitalen Zellen nach Trypanblaufärbung in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. ($n=4$)

3. Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die Toxizität von Lipo, M20, M40 und M80 bei einer Verdünnung von 1:100 keine signifikanten Unterschiede aufwies.

Eine spezifischere und sensitivere Möglichkeit die Toxizität der Liposomen zu untersuchen, ist die Detektion apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-FITC und nekrotischer Zellen mittels Propidiumiodid-PE. PBMC wurden mit Lipo, M20, M40 und M80 (jeweils in einer 1:100 Verdünnung) über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurden PBMC mit LPS und *Mtb*-Extrakt stimuliert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Annexin-V-FITC (Abb. 21) und Propidiumiodid-PE (Abb. 22) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

3. Ergebnisse

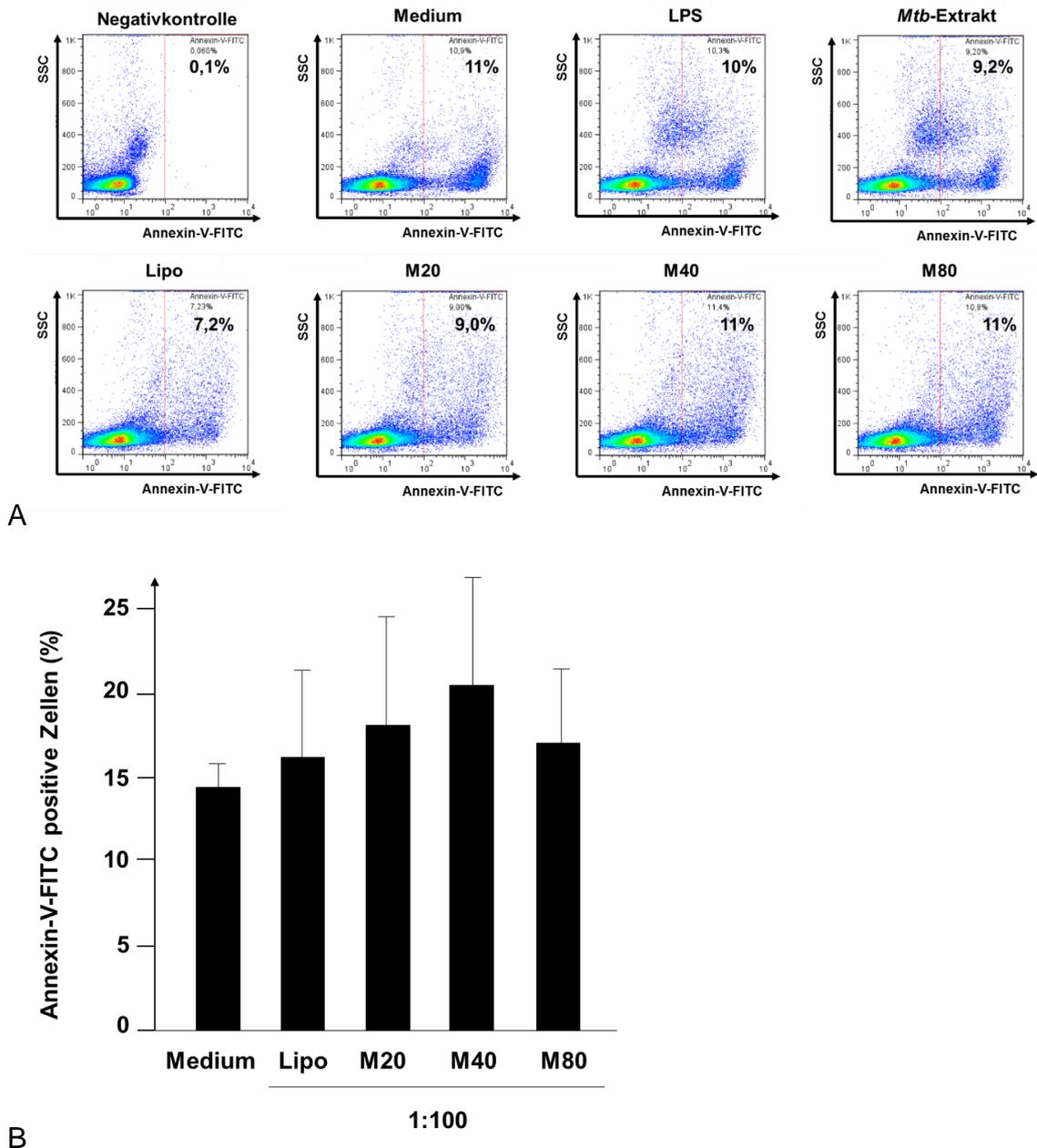
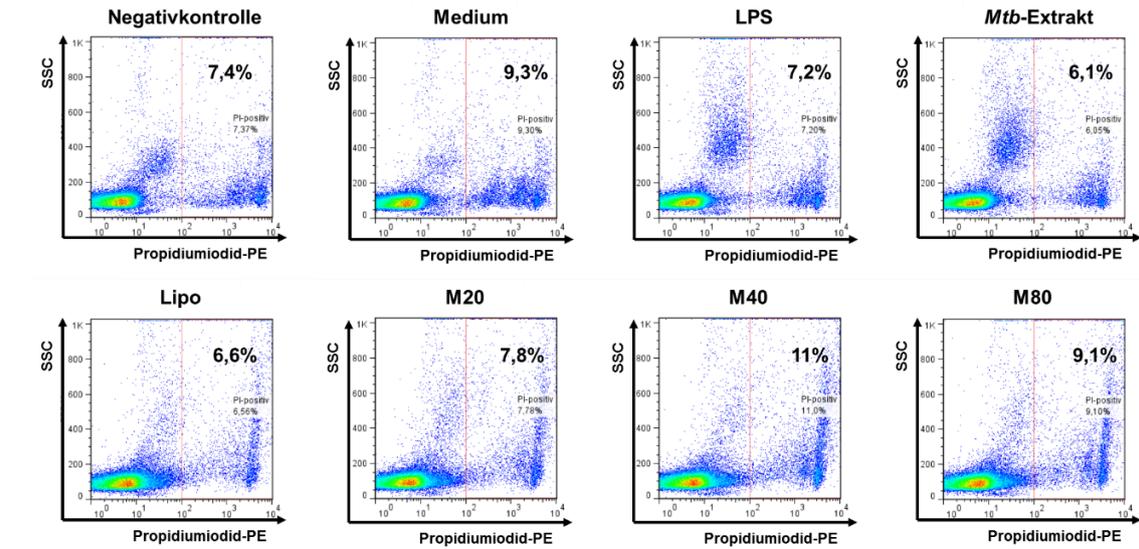
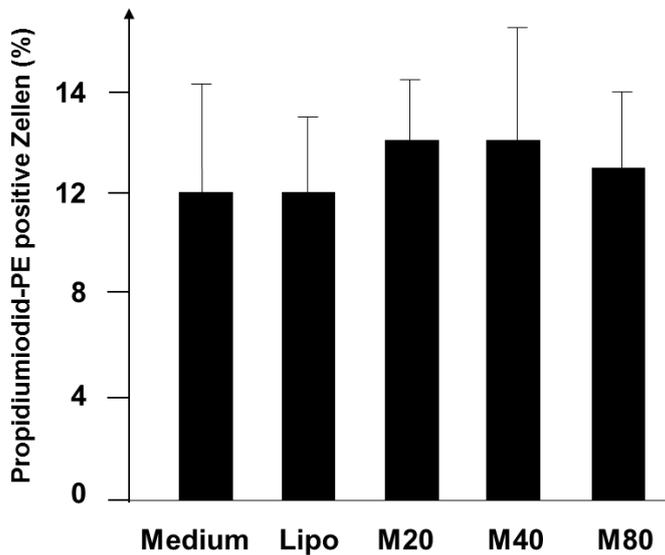


Abbildung 21: Färbung apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-FITC. 2×10^6 periphere mononukleäre Blutzellen wurden über Nacht (18 h) mit leeren Liposomen (Lipo) und *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-Extrakt beladenen Liposomen (jeweils 20/40/80 μg *Mtb*-Extrakt in M20/M40/M80; jeweils in 1:100 Verdünnung), Medium, Lipopolysaccharid (LPS; 3 ng/ml), und reinem *Mtb*-Extrakt (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde Ca^{2+} freie, phosphatgepufferte Salzlösung anstatt Bindepuffer während der Färbung verwendet. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-V-FITC gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. **A:** Die Abbildung zeigt die Durchflusszytometer-Rohdaten von 1 repräsentativen Spender von 4. **B:** Mittelwerte und Standardabweichungen aller 4 Spender. (n=4)

3. Ergebnisse



A



B

Abbildung 22: Färbung nekrotischer Zellen mittels Propidiumiodid-PE. 2×10^6 periphere mononukleäre Blutzellen wurden über Nacht (18 h) mit leeren Liposomen (Lipo) und *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-Extrakt beladenen Liposomen (jeweils 20/40/80 μg *Mtb*-Extrakt in M20/M40/M80; jeweils in 1:100 Verdünnung), Medium, Lipopolysaccharid (LPS; 3 ng/ml), und reinem *Mtb*-Extrakt (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde Ca^{2+} freie, phosphatgepufferte Salzlösung anstatt Bindepuffer während der Färbung verwendet. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet, mit Propidiumiodid-PE gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. **A:** Die Abbildung zeigt die Durchflusszytometer-Rohdaten von 1 repräsentativen Spender von 4. **B:** Mittelwerte und Standardabweichungen aller 4 Spender. (n=4)

3. Ergebnisse

Es zeigte sich, dass 15 - 20% der Zellen apoptotisch und 12 - 14% der Zellen nekrotisch waren. Diese Anzahl waren bei den Zellen der Kontrollgruppe und den mit Liposomen inkubierten Zellen vergleichbar. Die Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass die liposomale Toxizität unabhängig von der inkorporierten *Mtb*-Extrakt Menge ist.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass Liposomen ab einer Verdünnung von 1:50 und kleiner und unabhängig von der *Mtb*-Extrakt Menge atoxisch für PBMC sind.

3.2. Interaktion zwischen Liposomen und Immunzellen

Nach der Charakterisierung der aus Phosphatidylcholin, Cholesterol und stearyliertem Octaarginin bestehenden Liposomen wurden jetzt drei biologische Funktionen der zellulären Immunantwort als Zielvariablen definiert:

1. Eine erste, wichtige Funktion ist die Aufnahme der Liposomen durch Immunzellen, weswegen die Phagozytose von Liposomen analysiert wurde.
2. Nach Phagozytose durch primäre humane Makrophagen werden Faktoren wie TNF- α sezerniert. Diese Funktion wurde als Zweites in diesem Abschnitt untersucht.
3. Wurden die durch Makrophagen präsentierten Antigene von T-Zellen erkannt, sezernieren diese IFN- γ . Aus diesem Grund wurde im finalen Schritt die IFN- γ Freisetzung aus T-Zellen nach Inkubation mit Liposomen untersucht.

Zu den oben genannten Zielvariablen wurden zu Beginn einseitige Hypothesen formuliert:

1. Phagozytose:
 - Liposomen werden von humanen Immunzellen phagozytiert.
 - die Phagozytose von Liposomen durch humane Immunzellen ist unabhängig vom *Mtb*-Extrakt Gehalt der Liposomen.
 - die Phagozytose von Liposomen durch humane Immunzellen nimmt mit steigender Liposomenkonzentration zu.

3. Ergebnisse

- Zellen mit MHC Klasse II phagozytieren Liposomen.
2. TNF- α Freisetzung:
- Zellen produzieren nach Inkubation mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen TNF- α .
3. IFN- γ Freisetzung:
- *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien generieren nach Inkubation mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen eine *Mtb*-Extrakt-spezifische Freisetzung von IFN- γ .

Die formulierten Hypothesen wurden im Folgenden durch Experimente überprüft. Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Experimente wurde im Verlauf eine zusätzliche Hypothese formuliert:

- Phagozytose: Liposomen haften an der Oberfläche von CD3-positiven Zellen.

3.2.1. Phagozytose

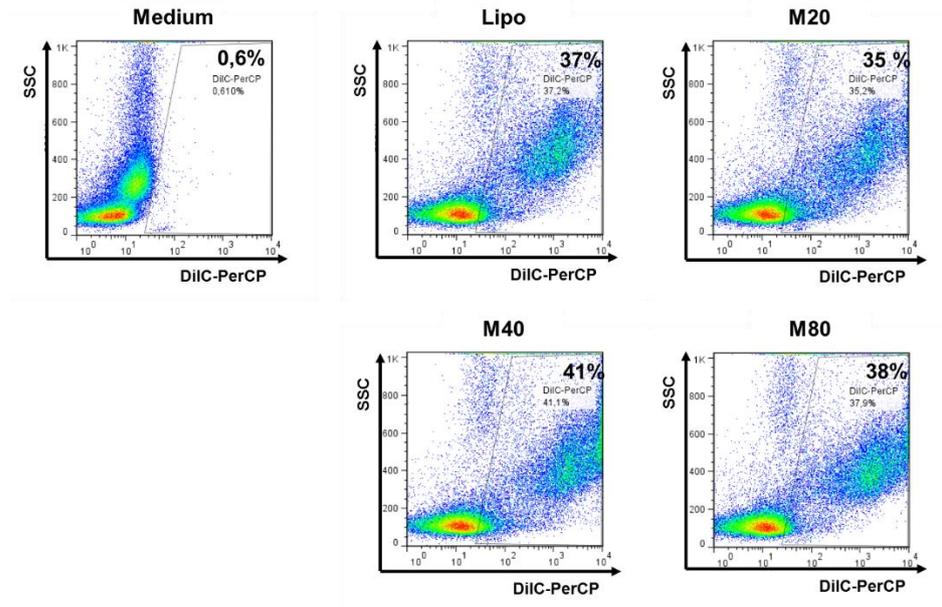
3.2.1.1. Effekt der *Mtb*-Extrakt-Konzentration auf die Phagozytose

Um die Hypothesen zu überprüfen, dass

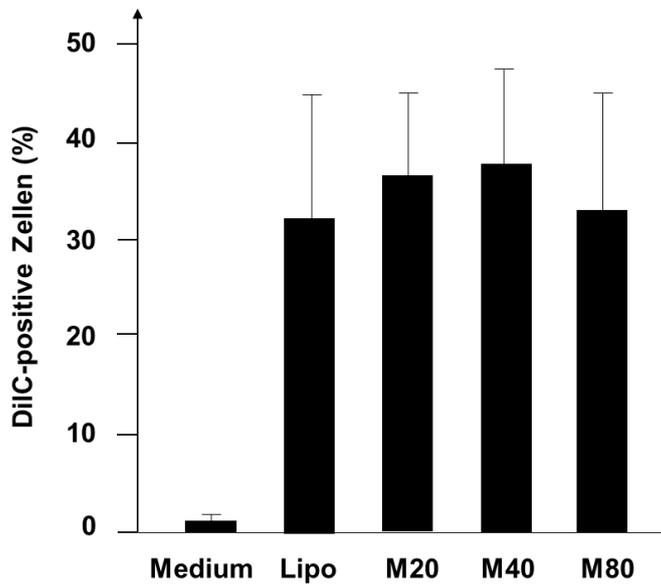
1. Liposomen von humanen Immunzellen phagozytiert werden und
2. diese unabhängig von deren *Mtb*-Extrakt Gehalt ist,

wurden zunächst fluoreszierende Liposomen mit dem Fluorochrom DilC hergestellt. Anschließend wurden PBMC über Nacht mit Lipo, M20, M40 und M80 (jeweils 1:100) inkubiert. Nach 18 h wurden die Zellen im FACS analysiert (Abb. 23).

3. Ergebnisse



A



B

Abbildung 23: Einfluss der inkorporierten *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-Extrakt Menge auf die Phagozytose. Periphere mononukleäre Blutzellen wurden über Nacht (18 h) mit Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiIC)-gefärbten Liposomen in einer 1:100 Verdünnung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer gemessen. **A:** Die Durchflusszytometer-Rohdaten zeigen 1 repräsentativen Spender von 5. **B:** Die Balken zeigen den mittleren, prozentualen Anteil gefärbter Zellen an. Die Standardabweichungen wurden als Striche eingetragen. (n=5)

3. Ergebnisse

Das Experiment zeigte, dass Zellen im Mittel 35% DiIC-positiv waren – unabhängig davon, ob diese mit Lipo, M20, M40 und M80 inkubiert wurden. Die Ergebnisse bestätigten die zu Beginn formulierten Hypothesen.

Im nächsten Schritt wurden die 35% DiIC-positiven Zellen auf deren Zelltypus hin untersucht. Da nur phagozytosebegabte Zellen Liposomen aufnehmen können, wurde die Hypothese formuliert, dass Makrophagen mit Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC Klasse II) Liposomen phagozytieren.

Hierzu wurden die mit fluoreszierenden Liposomen inkubierten PBMC mit Makrophagen- (MHC Klasse II) und T-Lymphozyten-spezifischen (CD3) Antikörpern gefärbt. Zuerst wurden die DiIC-positiven Zellen in einem Gate erfasst (Abb. 24) und die Expression von MHC Klasse II und CD3 überprüft (Abb. 25).

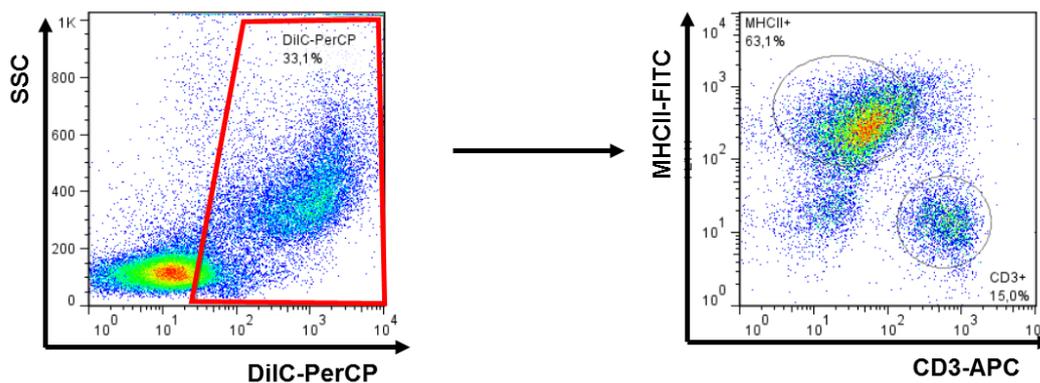


Abbildung 24: Expression cluster of differentiation 3 (CD3) und Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC Klasse II) von Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiIC)-positiven Zellen. DiIC-positive Zellen wurden in einem Gate erfasst. Die Zellen in diesem Gate wurden nach CD3- bzw. MHC Klasse II-Positivität getrennt. Die Abbildung zeigt das Vorgehen exemplarisch für leere Liposomen.

3. Ergebnisse

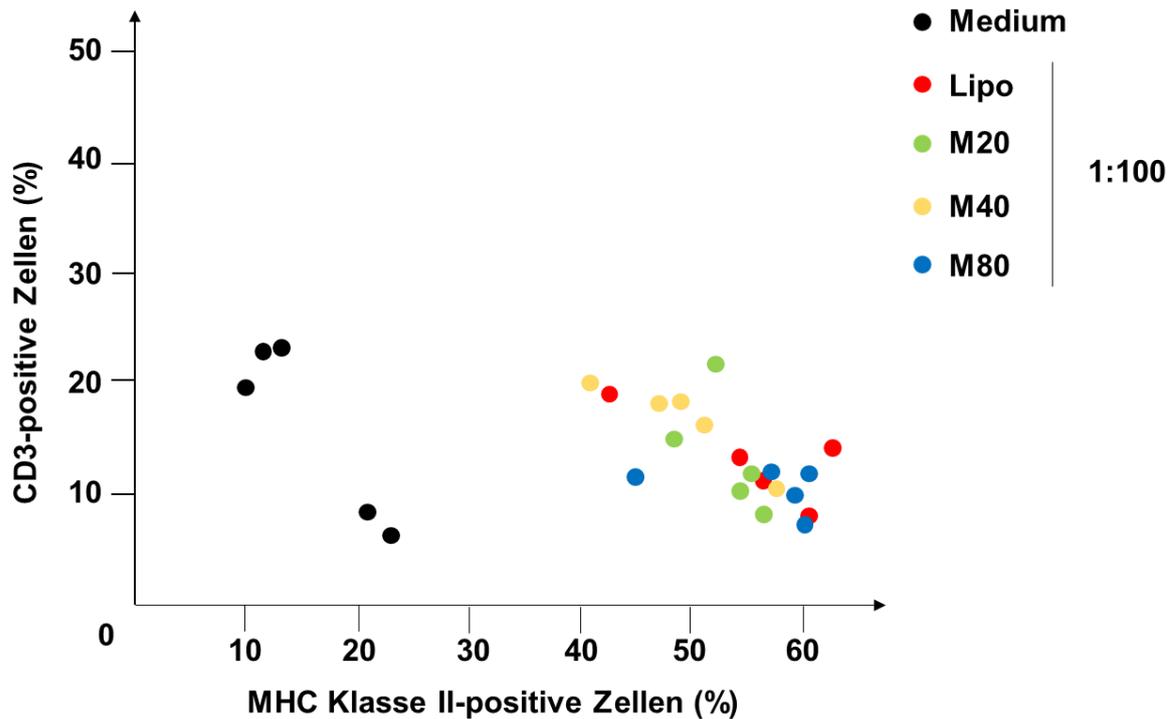


Abbildung 25: Expression cluster of differentiation 3 (CD3) und Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC Klasse II) von Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiIC)-positiven Zellen. Periphere mononukleäre Blutzellen wurden mit DiIC-gefärbten Liposomen über Nacht (18 h) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und mit CD3-APC und MHC Klasse II-FITC gefärbt. DiIC-positive Zellen wurden in einem Gate erfasst. Die Zellen innerhalb dieses Gate wurden auf den Anteil an CD3- und MHC Klasse II-positiven Zellen untersucht. Die unterschiedlichen Liposomen mit unterschiedlichen Konzentrationen an mykobakteriellem Antigen sind farblich codiert. (n=5)

Es zeigte sich, dass die CD3- und MHC Klasse II-Expression für Lipo, M20, M40 und M80 in einer 1:100 Verdünnung etwa dieselbe war. 60-80% der DiIC-positiven Zellen waren MHC Klasse II-positiv, während 10-25% der Zellen CD3-positiv waren. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Lipo, M20, M40 und M80. Die Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass MHC Klasse II-positiv Makrophagen Liposomen aufnehmen. Zusätzlich zeigte das Experiment, dass die Konzentration von mykobakteriellem Antigen keinen Einfluss auf die Phagozytose durch MHC Klasse II-positiv Zellen hat. Da CD3-positiv T-Zellen nicht phagozytosebegabt sind, blieb abzuklären, warum dennoch 10-25% der DiIC-positiven Zellen ebenfalls CD3-positiv waren. Aufgrund dieser Daten wurde zusätzlich die Hypothese, dass

3. Ergebnisse

Liposomen an der Oberfläche der CD3-positiven Zellen haften, formuliert und im weiteren Verlauf überprüft.

3.2.1.2. Effekt der Liposomenkonzentration auf die Phagozytose

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Phagozytose von Liposomen durch humane Immunzellen mit steigender Liposomenkonzentration zunimmt, wurden PBMC mit DiIC-gefärbten Liposomen inkubiert und die Anzahl DiIC-positiver Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. (1:50, 1:100, 1:200 und 1:400) (Abb. 26).

3. Ergebnisse

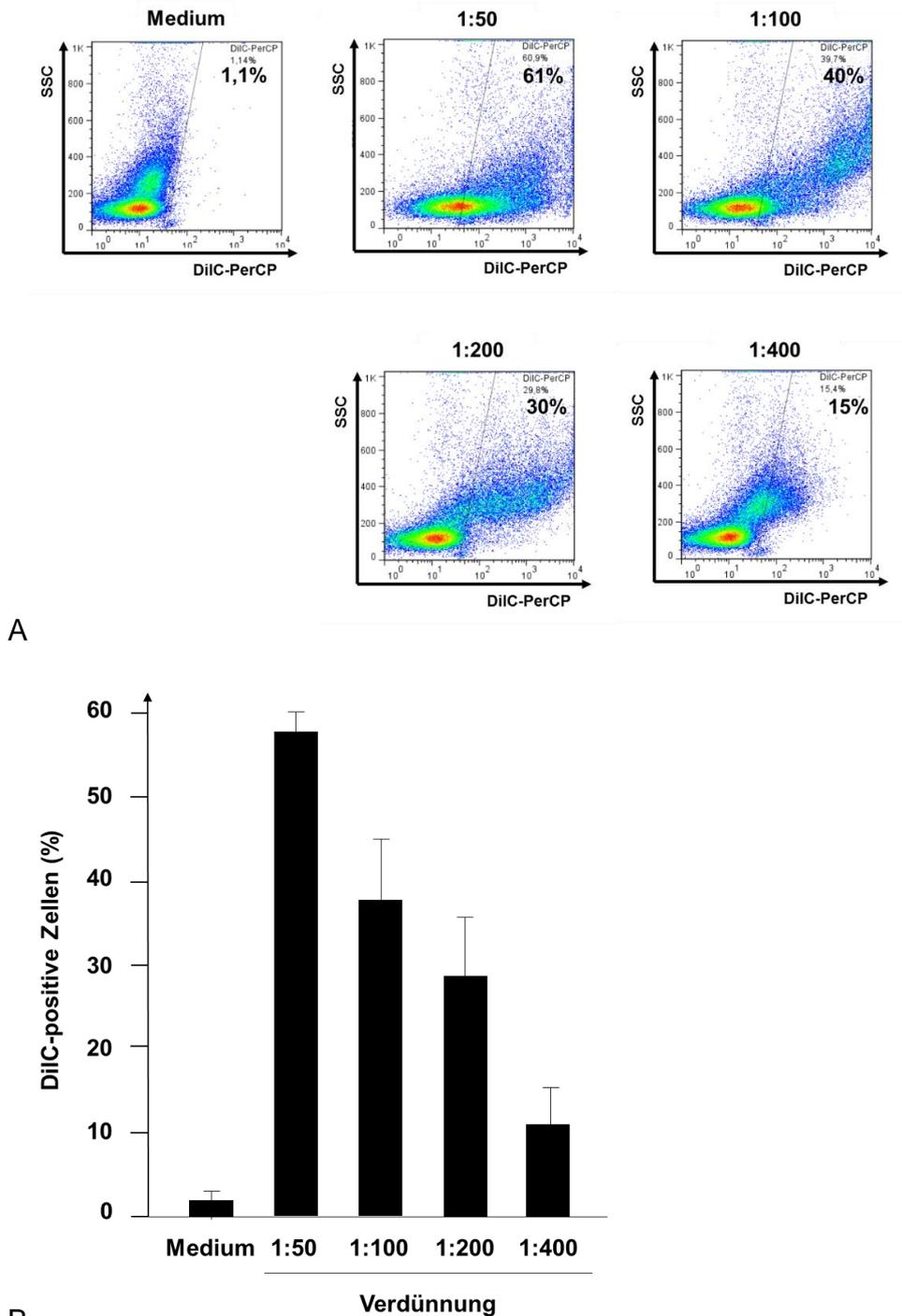


Abbildung 26: Einfluss der Liposomenkonzentration auf die Phagozytose. Periphere mononukleäre Blutzellen wurden über Nacht (18 h) mit Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiIC)-gefärbten Liposomen in absteigenden Verdünnungsstufen (1:50, 1:100, 1:200 und 1:400) inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer auf DiIC-Positivität untersucht. Die Liposomen enthielten 40 μg *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt. **A:** Die Durchflusszytometer-Rohdaten zeigen 1 repräsentativen Spender von 4. **B:** Die Balken zeigen den mittleren, prozentualen Anteil gefärbter Zellen an. Die Standardabweichungen wurden als Striche eingetragen. (n=4)

3. Ergebnisse

Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Liposomenmenge und der Anzahl DilC-positiver Zellen. Die Ergebnisse stützten die Hypothese, dass die Phagozytoserate humaner Immunzellen mit steigender Liposomenkonzentration zunimmt.

Im nächsten Schritt wurden die DilC-positiven Zellen analog zum vorherigen Experiment auf deren Zelltypus hin untersucht. Es wurden die Hypothese, dass

1. Makrophagen mit MHC Klasse II Liposomen phagozytieren
2. Liposomen an der Oberfläche der CD3-positiven Zellen haften,

überprüft. Dazu wurde ebenfalls die CD3- und MHC Klasse II-Expression der DilC-positiven Zellen untersucht. PBMC wurden mit DilC-gefärbten M40 in verschiedenen Verdünnungen (1:50, 1:100, 1:200 und 1:400) für 18 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit CD3-APC und MHC Klasse II-FITC gefärbt, und im FACS analysiert. Die DilC-positiven Zellen wurden zuerst in einem Gate erfasst und anschließend auf die Expression von MHC Klasse II und CD3 untersucht (Abb. 27).

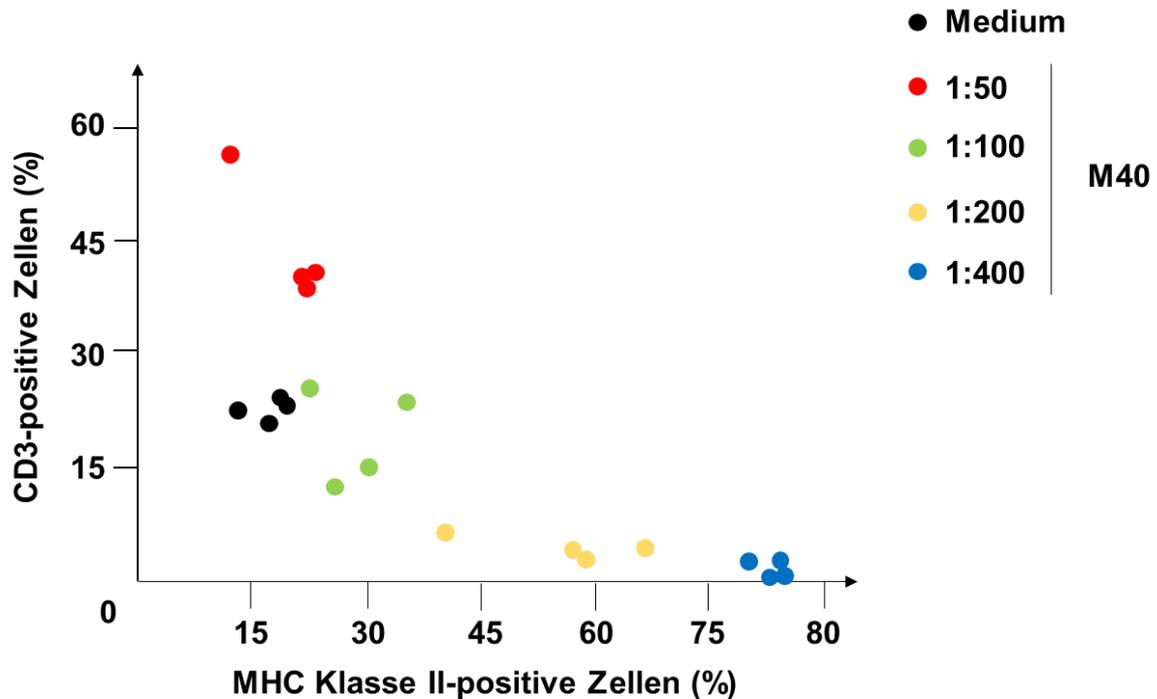


Abbildung 27: Expression cluster of differentiation 3 (CD3) und Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC Klasse II) von DiIc-positiven Zellen. Die DiIc-gefärbten Zellen wurden auf ihren CD3- und MHC Klasse II-Anteil untersucht. Die verwendeten Liposomen enthielten neben DiIc auch 40 µg *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt (M40) und wurden in verschiedenen Verdünnungen verwendet. Die unterschiedlichen Verdünnungen von M40 sind farblich codiert. (n=4)

Es zeigte sich, dass bei einer geringen Konzentration an Liposomen der Anteil an MHC Klasse II-positiven Zellen größer war als bei höheren Konzentrationen. Umgekehrt zeigte sich, dass der CD3-Anteil unter den DiIc-positiven Zellen bei hohen Konzentrationen ansteigt. Bei geringen Verdünnungen lag der Anteil der CD3-positiven Zellen bei 40-60% und der Anteil der MHC Klasse II-positiven Zellen bei lediglich 15%. Bei 1:400 waren nur 5% CD3- und 77% MHC Klasse II-positiv. Die Ergebnisse legten – wie in vorherigen Experimenten gezeigt – nahe, dass die erste Hypothese als wahrscheinlich anzunehmen war: MHC Klasse II-positiv Makrophagen phagozytieren Liposomen. Die positive Korrelation der Liposomenkonzentration mit dem prozentualen Anteil der CD3-positiven Zellen an den DiIc-positiven Zellen stärkte zudem die zweite Hypothese, dass Liposomen an der Oberfläche von CD3-positiven Zellen haften.

3. Ergebnisse

3.2.1.3. Effekt des Zelltyps auf die Phagozytose

Um die Hypothesen zu überprüfen, dass

1. Makrophagen mit MHC Klasse II Liposomen phagozytieren
2. Liposomen an der Oberfläche der CD3-positiven Zellen haften,

wurden PBMC mit DiIC-gefärbten Lipo, M20, M40 und M80 inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen auf verschiedene Färbemuster untersucht (Abb. 28 und 29).

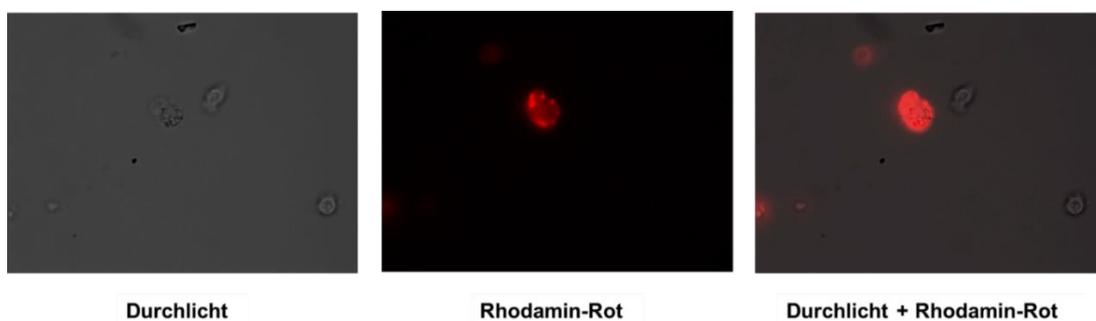
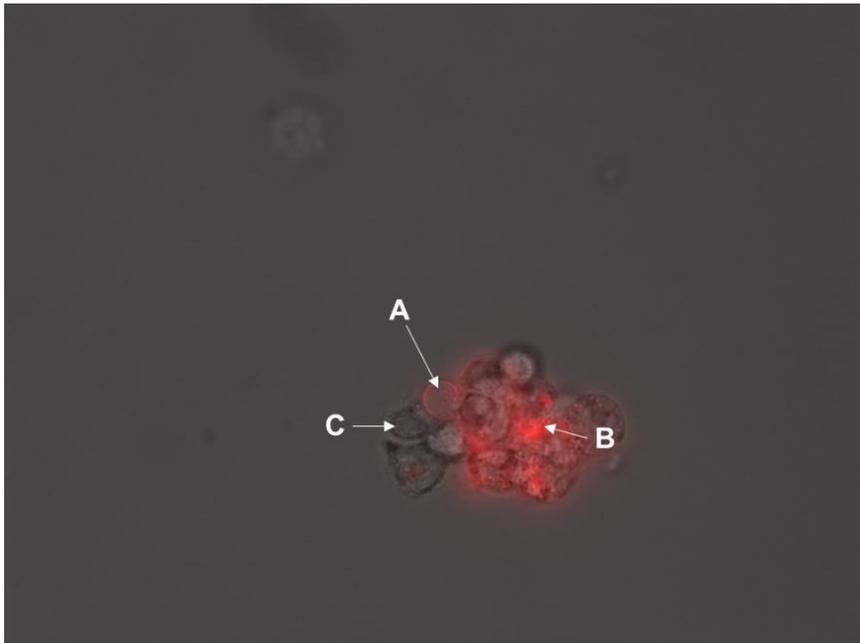


Abbildung 28: Liposomenaufnahme durch periphere mononukleäre Zellen (PBMC). Die verwendeten Liposomen enthielten 40 µg *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt (M40). Zusätzlich enthielten diese den fluoreszierenden Farbstoff Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiIC). PBMC wurden mit DiIC-gefärbten M40 in einer Verdünnung von 1:100 für 18 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (500x Vergrößerung). Das linke Bild zeigt die Zellen im Durchlicht, das mittlere Bild die DiIC-gefärbten Liposomen im Rhodamin-Rotlicht. Rechts sind beide Bilder übereinandergelegt, sodass man die DiIC-positiven und -negativen Zellen erkennen kann. Es wurden 100 Zellen ausgewertet. (n=1)



Durchlicht + Rhodamin-Rot

Abbildung 29: Unterschiedliche Färbemuster von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). Die verwendeten Liposomen enthielten 20 μg *Mycobacterium tuberculosis*-Extrakt (M20). Zusätzlich enthielten diese den fluoreszierenden Farbstoff Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiIC). PBMC wurden mit M20 in einer Verdünnung von 1:50 stimuliert. Die Abbildung zeigt das Übereinanderlegen des Durchlicht- und des Rhodamin-Rot-Bildes. Man erkennt mehrere, unterschiedliche Färbemuster (A, B, und C). (n=1)

Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte Zellen mit unterschiedlichem Färbemuster. Dabei waren

1. Zellen mit homogenem, Rand-betontem Färbemuster (A),
2. Zellen mit intrazellulären Akkumulationen (B) und
3. farbfreie Zellen (C)

sichtbar. Das Vorhandensein von Zellen mit Färbemuster B (Abb. 29) sprach für die erste Hypothese, dass MHC Klasse II-positive Zellen Liposomen phagozytieren. Die Existenz von Zellen mit Färbemuster A (Abb. 29) sprach für die zweite Hypothese, dass Liposomen an der Oberfläche von CD3-positiven Zellen haften.

3. Ergebnisse

In Zusammenschau mit den vorangegangenen Experimenten zur Phagozytose bestätigten die Ergebnisse die Hypothesen, dass

1. Liposomen werden von humanen Immunzellen phagozytiert werden,
2. die Phagozytose von Liposomen durch humane Immunzellen unabhängig vom *Mtb*-Extrakt Gehalt der Liposomen ist,
3. die Phagozytose von Liposomen durch humane Immunzellen mit steigender Liposomenkonzentration zunimmt,
4. Zellen mit MHC Klasse II Liposomen phagozytieren, und
5. Liposomen an der Oberfläche von CD3-positiven Zellen haften.

3.2.2. TNF- α Freisetzung

Aktivierte Makrophagen (M Φ) produzieren Zytokine wie TNF- α . Durch Messen der TNF- α Freisetzung im ELISA lässt sich die Aktivierung der Zellen nachweisen. Um die Hypothese zu überprüfen, dass Zellen nach Inkubation mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen TNF- α produzieren, wurden M Φ und CD1-positive M Φ über Nacht mit Lipo und M20, M40 und M80 inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Konzentration an TNF- α in den Überständen mittels ELISA gemessen. Neben Proteinantigen wurde auch Lipidantigen von *Mycobacterium tuberculosis* in Liposomen inkorporiert. Da die inkorporierten Lipidantigene mit Hilfe von CD1 durch Makrophagen an T-Zellen präsentiert werden, wurden in diesem Experiment ebenfalls die TNF- α Freisetzung von CD1-positiven M Φ nach Inkubation mit Lipo und *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen untersucht (Abb. 30).

3. Ergebnisse

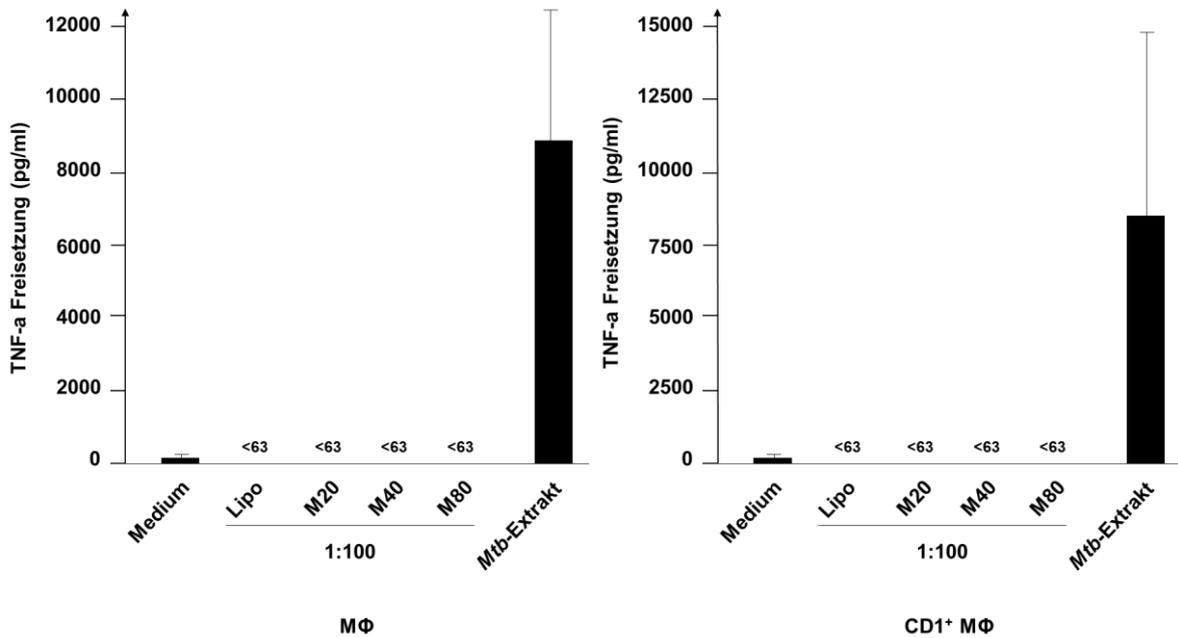


Abbildung 30: Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) Freisetzung von Makrophagen (M Φ) und cluster of differentiation 1-positive Makrophagen (CD1⁺ M Φ). 1×10^6 Zellen wurden 18 h mit leeren Liposomen (Lipo) und Liposomen, welche 20/40/80 μg *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-Extrakt inkorporiert hatten, (M20/M40/M80) in einer 1:100 Verdünnung inkubiert. Die Überstände wurden am nächsten Tag geerntet und auf TNF- α Gehalt mittels ELISA untersucht. Die Zellen wurden zum Vergleich zusätzlich mit reinem *Mtb*-Extrakt (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. (n=6)

Es zeigte sich, dass M Φ weder nach Inkubation mit Lipo, noch mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen TNF- α sezernierten. Auch CD1-positive M Φ zeigten weder unter Lipo, noch unter *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen eine Freisetzung von TNF- α . Die Ergebnisse widersprachen somit der Hypothese, dass Zellen nach Inkubation mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen TNF- α produzieren.

3.2.3. IFN- γ Freisetzung durch Kurzzeit-T-Zelllinien

Um die Hypothese zu überprüfen, dass *Mtb*-spezifische Kurzzeit-T-Zelllinien nach Inkubation mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen eine *Mtb*-Extrakt-spezifische Freisetzung von IFN- γ generieren, wurden nach Übernachtinkubation von Kurzzeit-

3. Ergebnisse

T-Zelllinien, autologen CD1-positiven M Φ , sowie leeren und *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen die Konzentration an IFN- γ mittels ELISA analysiert. (Abb. 31).

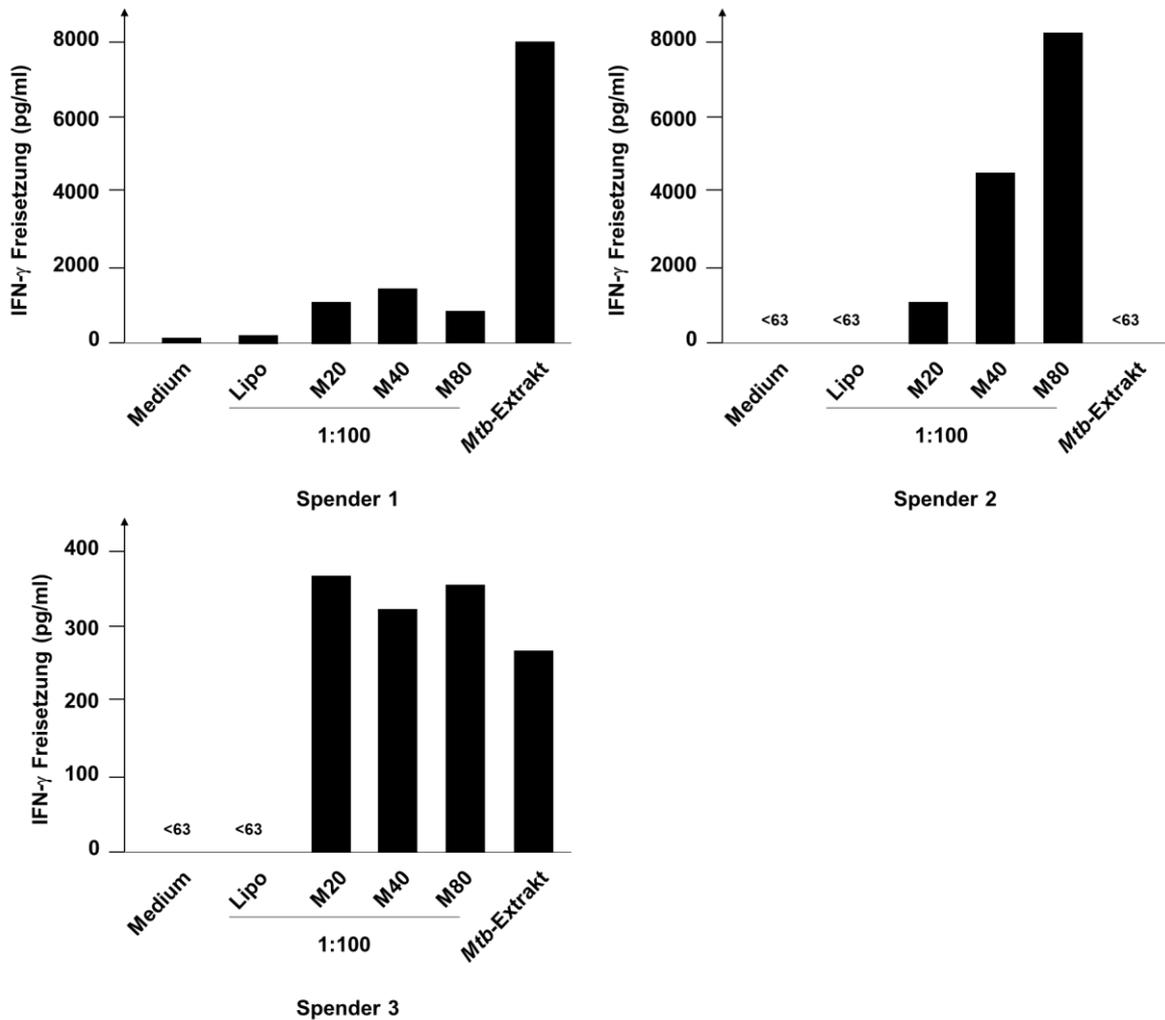


Abbildung 31: Interferon- γ (IFN- γ) Freisetzung von Kurzzeit-T-Zelllinien und cluster of differentiation 1-positive Makrophagen (CD1⁺ M Φ). *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-spezifische T-Zellen wurden mit CD1⁺ M Φ desselben Spenders in einem 1:1 Verhältnis zusammengegeben. Die Zellen wurden anschließend für 18 h mit leeren Liposomen (Lipo) und Liposomen, welche 40 μ g *Mtb*-Extrakt inkorporiert hatten, (M40) in einer 1:100 Verdünnung inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und mittels ELISA auf IFN- γ Gehalt untersucht. Von 5 Spendern reagierten 3, 1 hatte einen zu hohen Hintergrund und 1 reagierte überhaupt nicht. (n=5)

3. Ergebnisse

Die Experimente zeigten, dass T-Zellen *Mtb*-Extrakt in Liposomen erkennen und antigenspezifisch IFN- γ freisetzen. Die Zytokinfreisetzung nach Inkubation mit reinem *Mtb*-Extrakt war bei 1 der 3 Spender um ein Vielfaches höher wie nach Inkubation mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen, bei 1 war überhaupt keine IFN- γ Freisetzung nach Inkubation mit reinem *Mtb*-Extrakt nachweisbar. Die Zellen des 3. Spenders reagierten auf *Mtb*-Extrakt-haltige Liposomen und reines *Mtb*-Extrakt mit der Sekretion von IFN- γ in etwa derselben Größenordnung. Dabei war bei 2 von 3 Spendern kein Unterschied der IFN- γ Sekretion zwischen den mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen inkubierten Zellen messbar. Lediglich 1 Spender zeigte eine ansteigende IFN- γ Sekretion, in Relation zur Antigenmenge der Liposomen. Die Ergebnisse des Experiments geben Anlass die Eingangshypothese als wahr anzunehmen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sprechen für das Potential, Liposomen als Vehikel für Impfantigene zu verwenden, und bringt uns einen Schritt näher an unsere Vision, Liposomen als Vehikel für Impfstoffe gegen die Tuberkulose zu verwenden.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Liposomen entwickelt, die mykobakterielle Antigene effektiv in primäre humane Makrophagen transportieren. Die 100 nm großen Liposomen bestanden aus Phosphatidylcholin, Cholesterol, und stearyliertem Octaarginin. In diese wurden definierte Mengen von mykobakteriellen Antigenen erfolgreich inkorporiert. Es wurden Liposomen mit Humanzellen über Nacht inkubiert, um Prozesse wie Toxizität zu untersuchen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Liposomen atoxisch sind, den gewollten Durchmesser von 100 nm und die angestrebte Menge an inkorporiertem *Mtb*-Extrakt besaßen, wurden die Interaktionen zwischen Liposomen und dem menschlichen Immunsystem untersucht. Dabei wurden wichtige Schritte im Zusammenspiel von Liposomen und Immunsystem wie Phagozytose, TNF- α und IFN- γ Freisetzung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Liposomen erfolgreich phagozytiert wurden, Makrophagen und CD1-positive Makrophagen als Reaktion darauf aber kein TNF- α produzieren. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass nach Inkubation von Liposomen mit CD1-positiven Makrophagen und autologen *Mtb*-Extrakt-spezifischen T-Zellen IFN- γ produziert wird. Somit stellt diese Arbeit einen wichtigen Schritt dar, Liposomen als Vehikel für Impfantigene zur Prophylaxe der Tuberkulose einzusetzen.

4.1. Stärken und Schwächen dieser Arbeit

Methoden

Durchflusszytometrie, ELISA, Western Blot, Protein Assay und Fluoreszenzmikroskopie stellen etablierte Standardverfahren in Forschungsarbeiten zur Analyse von Liposomen und deren Interaktionen mit dem menschlichen Immunsystem dar [3, 12, 43, 44, 94]. Die vorliegende Arbeit verwendet dieselben Analyseverfahren und greift somit auf eine etablierte Basis an Methoden zurück.

Die Liposomengröße wurde mittels DLS bestimmt, wie auch in anderen Publikationen verfahren wurde [76]. Um die im DLS gemessene Liposomengröße zu verifizieren, wurde die Größe der hergestellten Liposomen in dieser Arbeit ebenfalls mittels NTA bestimmt. NTA stellt ein in der Liposomen-bezogenen Fachliteratur nicht angewandtes Verfahren dar, weswegen die Aussagekraft dieses Verfahrens kritischer zu hinterfragen ist als die des DLS. Dennoch gibt es Studien, die NTA als gute Ergänzung des DLS zur Größen- und Dispersitätsbestimmung von Nanopartikeln beschreiben [25].

Liposomenkomposition

Die hier verwendeten Liposomen bestanden aus Phosphatidylcholin, Cholesterol, und stearyliertem Octaarginin und besaßen einen Durchmesser von etwa 100 nm. Von dieser Komposition wurde in dieser Arbeit nicht abgewichen. Dies ermöglichte es, grundlegende Eigenschaften der Liposomen zu untersuchen und in Relation zum inkorporierten Antigen und dessen Menge zu bringen. Dennoch lässt diese Herangehensweise viele Einflussfaktoren durch deren Konstanzhaltung unerforscht. So wird es in den hier dargelegten Experimenten unter anderem versäumt, die Membranfluidität durch Mehreinbau von Cholesterol zu steigern [8, 37], den Effekt von größeren Liposomen auf menschliche Immunzellen zu untersuchen [37, 60] oder Liposomen unterschiedlicher Ladung zu analysieren [37]. Mit der vorliegenden Arbeit ist grundlegendes Wissen erforscht, von welchem nun weitere Fragestellungen ausgehen können. Die Manipulation der oben genannten Faktoren offenbart neue Möglichkeiten, Liposomen zu optimieren und ihr volles Potential als Vakzinadjuvans auszuschöpfen.

Antigene

Neben dem liposomalen Grundgerüst beeinflusst die Wahl des Antigens maßgeblich den Effekt der Liposomen auf das menschliche Immunsystem. Der meist verwendete Ansatz geht dabei von der Testung eines einzelnen oder einer Kombination von 2 bis 3 definierten Antigenen aus [1, 2, 5, 37]. Der Einbau multipler Antigene wie durch die Inkorporation von *Mtb*-Extrakt deckt viele potentielle Antigene der mykobakteriellen Zellwand ab. Die Ergebnisse der hier beschriebenen

Experimente sind folglich als Immunreaktionen auf multiple Antigene zu interpretieren. Es ist daher nicht möglich, die hier gemessenen Reaktionen einem einzelnen Antigen oder einer Antigenkombination zuzuschreiben. Es bleibt abzuklären, welche in *Mtb*-Extrakt enthaltene Antigene oder Antigenkombinationen maßgeblich an der hier beschriebenen Immunreaktionen beteiligt sind. Aktuelle Forschungen des MyTb Lab befassen sich mit der Erforschung eines Antigens, welches in *Mtb*-Extrakt enthalten ist: Phosphatidylinositolmannosid, ein Glykolipid der mykobakteriellen Zellwand und Vorläufermolekül von Lipoarabinomannan.

4.2. Eingliederung dieser Arbeit in das Schrifttum

4.2.1. Identifikation von Impfantigenen gegen die Tuberkulose

Kritische Parameter bei der Entwicklung neuer Impfstrategien sind insbesondere die Auswahl des Antigens, der Einsatz eines optimalen Adjuvans, sowie im weiteren Verlauf die Applikationsdosis, -weg und -häufigkeit. Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung eines optimalen Adjuvans (Liposomen), beinhaltete aber auch erste Schritte zur Identifikation eines geeigneten Antigens.

Die Aktivität von *Mtb* kann in verschiedene Phasen unterteilt werden, in denen unterschiedliche Antigene exprimiert werden. Bei einer aktiven Infektion mit Replikation der Bakterien werden Mtb10.4 (Rv0288), Mtb8.4 (Rv1174c), ESAT-6 (Rv3875), Ag85B (Rv1886c) exprimiert. Während der Latenzphase findet sich HspX (Rv2031c) und während der Reaktivierung RpfE (Rv2450c) auf der mykobakteriellen Oberfläche [103]. In aktuellen Studien wird versucht durch den Einsatz dieser verschiedenen Antigene eine Immunität gegen *Mtb* zu induzieren [1, 2, 5, 23, 36]. In dieser Arbeit wurde als Modell-Antigen „*Mtb*-Extrakt“ verwendet, ein Gemisch aus Proteinen, Lipoproteinen und Lipiden aus der mykobakterielle Zellwand [43]. Auf der Basis der hier demonstrierten Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen durch *Mtb*-Extrakt-haltige Liposomen ist es jetzt möglich, die hierfür entscheidenden Antigene zu identifizieren. Mögliche Kandidaten für die Weiterentwicklung als Impfstoffkandidaten, die in dem von uns verwendeten *Mtb*-

4. Diskussion

Extrakt in hoher Konzentration vorliegen, sind Ag85B, ESAT-6, Lipoarabinomannan und Cord Faktor.

Ag85B ist ein 30 kDa Protein, welches von *Mtb* sezerniert wird [104]. Es ist Teil des Antigen 85 Komplexes, welchem drei von Mykobakterien sezernierte Proteine angehören: Ag85A, Ag85B, und Ag85C [16, 104]. Diese Proteine exprimieren Mycolyltransferase und tragen damit während einer aktiven Infektion zur Synthese der mykobakteriellen Zellwand bei [7, 104]. In Folge dessen können Antikörper gegen den Ag85 Komplex in Blut und Sputum von Tuberkulosepatienten detektiert werden [59].

Das ‚early secreted antigenic target protein 6‘ (ESAT-6) ist ein 6 kDa schweres Protein und wird in der ‚regions of differences 1‘ Region (RD1) kodiert. Es gilt als T-Zellaktivator und inhibiert nach seiner Bindung an Toll-Like Rezeptor 2 (TLR2) die Signaltransduktion im Makrophagen und dendritischen Zellen [27, 77]. BCG Stämme mit inkorporierter RD1 Region besitzen eine höhere Virulenz, während *Mycobacterium bovis* Stämme mit Deletion der RD1 Region weniger virulent sind [34].

Erst seit kurzem ist bekannt, dass neben Proteinantigenen auch Glykolipide und Lipide – eine biochemisch völlig unabhängige Substanzklasse – Mykobakterien-spezifische T-Zellen aktivieren und so neue Impfstoffkandidaten darstellen. Der Vorteil von Lipidantigenen besteht darin, dass sie nicht über polymorphe MHC-Moleküle, sondern über hochkonservierte CD1-Moleküle [20, 95] präsentiert werden. Zusätzlich aktivieren sie auch CD8-positive zytotoxische T-Zellen ohne CD4-T-Zellhilfe [20, 79]. Dies ist gerade bei der Hauptzielgruppe für eine Tuberkuloseimpfung, HIV-positiven Impflingen, ein entscheidender Vorteil. Bisher sind nur wenige mykobakterielle Glykolipidantigene beschrieben, von denen insbesondere Lipoarabinomannan und der Cord Faktor T-Zellen stimulieren. Lipoarabinomannan ist ein Glykolipid in der mykobakteriellen Zellwand und wichtiger Virulenzfaktor von *Mtb* und *Mycobacterium leprae*. Es kann Makrophagen in ihren Funktionen beeinflussen, indem es freie Sauerstoffradikale aufnimmt, die Transkription IFN- γ aktivierter Gene blockiert und die Proteinkinase C Aktivität senkt [13, 49]. Studien zeigen, dass Lipoarabinomannan naive CD4-positive T-Zellen zur Th1 Differenzierung anregt [41]. Der amphiphile Charakter dieses Glykolipids bringt den Vorteil mit sich, dass es mit seinem hydrophoben Anteil in der

Lipiddoppelschicht von Liposomen gebunden werden kann, während der hydrophile Teil immer von Rezeptoren gebunden werden kann [44].

Cord Faktor, oder Trehalose-6,6-dimycolat, ist ein Glykolipid und Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand. Cord Faktor ist in der Lage die Ca^{2+} -abhängige Fusion von Phospholipidvesikeln zu unterbinden. *Mtb* ist dadurch in der Lage die Fusion von Phagosomen und den sauren Lysosomen zu stoppen und damit intrazellulär zu überleben [86]. Studien haben gezeigt, dass Cord Faktor maßgeblich an der Bildung von verkäsenden Granulomen beteiligt ist. Cord Faktor-defiziente Mykobakterien riefen in Mäusen lediglich eine lokale Entzündungsreaktion hervor, während hingegen virulente Stämme verkäsende Granulome hervorriefen. Die Nekrosen entstanden nur um kleine Öl Tröpfchen oder in Fettgewebe, weshalb Lipiden vermutlich eine essentielle Rolle in diesem Pathomechanismus zukommt [40].

Der klinische Einsatz von Impfstoffen *in vivo* erfordert einen standardisierten und reproduzierbaren Aufbau und Herstellungsprozess. Mit standardisierten Liposomen kann die Wirkung von Antigenen oder Antigenkombinationen auf Makrophagen und T-Zellaktivierung verglichen werden. Somit stellen die hier untersuchten Liposomen eine aussagekräftige Plattform für die Evaluierung von Impfkandidaten dar. Die oben beschriebene Potenz der in *Mtb*-Extrakt vorhandenen Antigene – Ag85B [104], ESAT-6 [27], und Cord Faktor [40] – konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Es bleibt nun abzuklären, welches spezifische Antigen oder spezifischen Antigene für die in dieser Arbeit festgestellten Ergebnisse verantwortlich sind. In Zukunft könnten die einzelnen Antigene in die hier vorgestellten Liposomen separat inkorporiert werden. Auf diese Art würden sich diejenigen Antigene identifizieren lassen, welche in dieser Arbeit zu einer Aktivierung des Immunsystems geführt haben. Zudem würde es Vergleiche zwischen der hier untersuchten und weiteren, von anderen Forschungsgruppen untersuchten Liposomenkompositionen bei identischem Antigen erlauben [37, 94].

4.2.2. Biomarker zur Messung der *in vitro* Immunogenität

Eine der wesentlichen Herausforderungen bei der Entwicklung neuer Impfstoffe gegen Tuberkulose besteht in der rechtzeitigen Erkennung des Impferfolges durch

Biomarker. Aufgrund der langen Inkubationszeit, der häufigen – oft jahrelangen – Latenz, sowie der niedrigen Inzidenz in vielen Ländern ist eine Evaluation des Impferfolges durch Bestimmung der Anzahl der Neuerkrankungen nicht sinnvoll [105]. Als möglicher Biomarker wird vor allem die Antigen-spezifische Zytokinfreisetzung, sowie die Induktion einer T-Gedächtniszellimmunantwort wenige Wochen nach der letzten Impfdosis eingesetzt. Diese beinhaltet die Induktion von CD4-positiven T-Zellen, die ein charakteristisches Muster an immunmodulatorischen Zytokinen freisetzen [98]. Die Effektivität vieler neuer, in klinischen Testphasen befindlichen Impfstoffkandidaten wurde anhand von Tiermodellen oder durch T-Zellzahl und Zytokinspiegel evaluiert. Weitere Ansatzpunkte sind die Detektion von polyfunktionale T-Zellen, die *in vitro* nach Restimulation mit dem Impfantigen die Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α freisetzen [26, 42]. Auch die Konzentration von antimikrobiellen Effektormolekülen durch zytotoxische T-Zellen korrelierte in einigen Studien mit der erfolgreichen Immunantwort bei der Tuberkulose [88, 99]. Ob die Konzentrationsbestimmung von Granulysin im Serum auch in der Lage ist den Impferfolg vorherzusagen, ist jedoch noch nicht geklärt [21, 22]. Des Weiteren ist die Detektion von zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen eine Möglichkeit den Impferfolg zu messen [17, 62]. Andererseits haben Studien gezeigt, dass mit BCG geimpfte Kinder unabhängig ihrer Immunität gegenüber *Mtb* keine Unterschiede in CD4⁺/CD8⁺ Zellzahlen oder Zytokinprofil aufweisen [42, 98].

Neuere Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Tuberkulose haben zur Identifikation zusätzlicher Biomarker geführt. Es wurde gezeigt, dass T-Zellen im infizierten Organismus einen progressiven Verlust ihrer Zellfunktion aufweisen („exhausted t-cells“) [101]. Diese T-Zellen exprimieren Oberflächenmoleküle wie „programmed cell death protein 1“ (PD-1) oder „T-cell immunoglobulin and mucin-containing molecule 3“ (TIM-3) [81, 92]. TIM-3-positive T-Zellen weisen eine stärkere Effektorfunktion, Th1 und Th22 Zytokinprofile, zytotoxische Aktivität und reduzierte, intrazelluläre *Mtb* Replikation auf [81]. Auf Oberflächen von *Mtb*-spezifischen T-Zellen befindet sich außerdem vermehrt „suppressor of cytokine signalling 3“ (SOCS3). Dies gilt vor allem für IL-17-exprimierende T-Zellen und CD161-positiven Th17-Zellen. SOCS3 beeinflusst die T-Zellentwicklung, die Zytokinsignalübertragung und führt zur vermehrten IL-17 Sekretion. Da es bei Patienten mit insuffizienter Immunantwort erhöht ist, kann die Bestimmung dieses

Markers im Serum möglicherweise einen negativen Impferfolg vorhersagen [48]. Des Weiteren wurde in Mukosa-assoziierten invarianten T-Zellen (MAIT) antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. Diese T-Zellen befinden sich im Lungengewebe und detektieren infizierte Zellen. Sie exprimieren den invarianten Rezeptor ‚Va7.2 T cell receptor‘ (TCR α), und erkennen HLA-Ib-assoziierte Antigene auf der Oberfläche von Makrophagen. Es wird vermutet, dass diese invarianten T-Zellen eine tragende Rolle im Entzündungsgeschehen intrazellulär lebender Bakterien spielen [29, 54, 92]. Die Fortschritte in der immunologischen Grundlagenforschung stellen somit eine ständige Quelle für mögliche, neue Biomarker dar, um das Potential von Impfstoffkandidaten so frühzeitig wie möglich zu erkennen.

Im Rahmen dieses Projektes haben wir uns auf die *Mtb*-spezifische Freisetzung von IFN- γ als Parameter zur Bestimmung der T-Zellaktivierung fokussiert. Dieser simplistische Ansatz wurde gewählt, um den Fokus der experimentellen Arbeit auf die Zusammensetzung und Eigenschaften der Liposomen, der wesentlichen experimentellen Fragestellung, zu konzentrieren. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass IFN- γ Spiegel nicht mit Immunität korrelieren [42], so hat es doch durch seine tuberkulostatischen Effekte auf Makrophagen eine dominierende Rolle im Entzündungsgeschehen [26]. Höhere IFN- γ Spiegel aktivieren Makrophagen und gehen mit einer höheren Apoptoserate von Makrophagen einher [38]. Induzieren Vakzine in *Mtb*-spezifischen T-Zellen die Freisetzung von IFN- γ , so bewirken sie damit auch ein effektiveres Abtöten von *Mtb*. Im Umkehrschluss wurde gezeigt, dass IFN- γ -defiziente Mäuse anfälliger gegenüber *Mtb* sind [62]. Die Bedeutung von IFN- γ auf eine mykobakterielle Infektion zeigt sich bei Patienten, die aufgrund eines Gendefektes eine BCG-Infektion erlitten. Deren Makrophagen, welche nicht in der Lage sind die intrazelluläre Proliferation der Mykobakterien zu kontrollieren, können *in vitro* diesen Defekt nach IFN- γ Gabe ausgleichen [47]. Zudem verwenden klinische Studien an menschlichen Probanden zu Liposomen-basierten [94], sowie nicht-Liposomen-basierten Tuberkuloseimpfstoffen [2] ebenfalls IFN- γ als Surrogatmarker. Um in zukünftigen *in vivo* Experimenten mehrere Biomarker zur Kontrolle des Impferfolges zur Verfügung zu haben, sollte die Wirkung von *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen auf weitere Biomarker überprüft werden.

4.2.3. Die Rolle von Adjuvantien in der Vakzinherstellung

Proteinantigene alleine induzieren nach Injektion *in vivo* aufgrund der schnellen Degradation und unzureichender Aktivierung des angeborenen Immunsystems in aller Regel keine durch T-Gedächtniszellen vermittelte, dauerhafte Immunität. Eine der wesentlichen Herausforderung bei der Entwicklung von Impfstoffen ist daher die Kombination des immunogenen Antigens mit Hilfsstoffen – Adjuvantien –, die diese beiden Hürden überwinden [65].

Seit über 80 Jahren werden Aluminiumphosphate und Aluminiumhydroxide erfolgreich als Adjuvantien eingesetzt und eine der gängigsten Adjuvantien in der Impfstoffforschung. Bekannteste Beispiele sind Vakzine gegen Hepatitis A, Hepatitis B, Diphtherie, Tetanus, Haemophilus influenzae Typ b, und Pneumokokken. Bis zur Einführung der Influenzaimpfung „FLUAD“ im Jahr 1999 enthielten alle zugelassenen Impfstoffe entweder mit Aluminium kombinierte Adjuvantien oder Aluminiumsalze als Adjuvans allein [11, 65]. Aluminiumsalze sind per se schwach immunogen, verlängern aber die Interaktionszeit zwischen Immunzellen und Antigen, indem sie das Antigen verlangsamt am Injektionsort freisetzen. Dadurch verstärken sie die humorale Immunantwort [56, 65]. Sie können auch mit einem weiteren Adjuvans wie Glukopyranosyllipid-Adjuvans, einem synthetischen TLR4-Agonist, kombiniert werden [4, 75].

Ein Adjuvans der neueren Generation ist das IC31, welches sich aus dem kationischen Vehikelpепtid KLKL₅KLK und dem Oligodeoxynukleotid ODN1a als Immunmodulator zusammensetzt. Diese werden über TLR9 gebunden und induzieren Th1-Zellantworten [1, 2]. Ein Fusionsprotein aus den beiden mykobakteriellen Antigenen Ag85B und ESAT-6 induzierte in Abhängigkeit von IC31 Adjuvans eine signifikante IFN- γ -Produktion und CD4-T-Zellaktivierung in Mäusen. Vor allem aber bestand nach Immunisierung ein signifikanter Schutz gegenüber einer Infektion mit *Mtb*. Dieser wegweisende Impferfolg wurde wenig später in dem aussagekräftigeren Meerschweinchen-Modell bestätigt. Eine Weiterentwicklung befindet sich auf der Basis dieser erfolgreichen Vorversuche in der klinischen Testphase [2]. Ein entscheidender Nachteil von ESAT-6 ist allerdings, dass es zur immunologischen Diagnostik der latenten Tuberkulose eingesetzt wird (IFN- γ -Freisetzungstest). Dieses wertvolle diagnostische Verfahren würde bei mit

ESAT-6-geimpften Probanden entfallen, sodass die Weiterentwicklung dieses Impfstoffes derzeit kritisch diskutiert wird. Eine mögliche Alternative ist TB10.4 (Rv0288), welches als Fusionsprotein mit Ag85B und IC31 polyfunktionale CD4-positive T-Zellen aktiviert [1, 23].

Ein weiterer, unabhängiger Ansatz für die Verbesserung der Immunogenität von Impfantigenen ist die Verpackung in Liposomen. Liposomen können durch in ihre Membran eingebrachte Liganden Wirkstoffe zu designierten Regionen oder Rezeptoren des Körpers transportieren. Dabei schützen sie die eingearbeiteten Wirkstoffe während des Transports vor zu schneller Degradation [37, 85]. Sie fungieren als Adjuvans auf das angeborene Immunsystem, was die Immunogenität erhöht und für hochgradig aufgereinigte Antigene von Vorteil ist. Je nach Größe besitzen sie einen Depoteffekt an der Injektionsstelle oder werden schnell in verschiedene Regionen des Körpers abtransportiert [37].

AS01 besteht aus einem Liposom, Monophosphoryllipid A (TLR4 Agonist) und QS21. QS21 ist ein Saponin, welches über Aufreinigungsschritte aus dem südamerikanischen Baum *Quillaja saponaria* gewonnen wird. Es senkt die Oberflächenspannung zwischen zwei Phasen und kann so Proteinen das Penetrieren der Zellwand erleichtern, worauf eine Immunreaktion auf intrazelluläre Antigene erfolgt [28, 69, 74]. Diese Stoffe werden schon seit Jahren in der Kosmetikindustrie als Emulgator eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass QS21 die Antigenpräsentation an antigenpräsentierende Zellen verbessert. In Versuchen QS21 als Adjuvans gegen HIV-Oberflächenproteinen einzusetzen, wurden vorwiegend zytotoxische T-Zellen induziert [71], was besonders im Falle der Tuberkulose ein entscheidender Vorteil wäre. Durch die Wirkung von zytotoxischen und antimikrobiellen Effektorproteinen wie Granulysin, Perforin, und Granzym B spielen CD8-positive zytotoxische T-Zellen bei der Bekämpfung der Tuberkulose eine besondere Rolle [88].

Diese Befunde weisen auf ein großes Potential von Liposomen als Transportvehikel für Impfantigene zum Schutz vor der Tuberkulose hin. In dieser Arbeit wurden Möglichkeiten geprüft, die Zusammensetzung von Liposomen zu optimieren und so die Voraussetzungen für einen Impferfolg *in vivo* zu verbessern. Die hier durchgeführten Experimente bestätigen den mehrfach beschriebenen immunogenen Effekt von Liposomen auf Teile des angeborenen Immunsystem [37,

43, 94] und, dass die eingearbeiteten Antigene zu designierten Zellen des Immunsystems – in dieser Arbeit waren es T-Zellen über CD1-positive Makrophagen – transportiert werden [37, 43]. Des Weiteren deuten die vorgelegten Ergebnisse darauf hin, dass Liposomen wichtige Charakteristika eines Adjuvans, wie Selektion spezifischer Signalwege im adaptiven Immunsystem oder Verstärkung der Immunantwort im Vergleich zum nicht-adjuvantierten Antigen, besitzen [15].

4.2.4. Liposomen als Transportvehikel für Medikamente

Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1964 durch Bangham et al. waren Liposomen Gegenstand intensiver Forschung. Eigenschaften wie der intraluminale Einschluss von Substanzen, die Stabilität der Lipid-Doppelschicht und der Transport an definierte Wirkorte im menschlichen Körper wurden fortwährend optimiert. Das Potential der Liposomen als versatiles Konstrukt zum Transport von Pharmaka wurde seitdem stetig weiterentwickelt [58, 93, 97]. Wesentliche Vorteile von Liposomen sind der Schutz des eingeschlossenen Pharmakons vor zu schneller Degradation und einer Reduktion der Nebenwirkungen des enthaltenen Pharmakons [37]. Durch Verändern von Variablen wie Lipidkonzentrationen, Größe oder Ladung verändern sich auch Pharmakodynamik und Pharmakokinetik der Liposomen [85]. Zum heutigen Zeitpunkt stehen bereits mehrere, in Liposomen verpackte Pharmaka zur Verfügung. Beispiele hierfür sind AmBisome – Liposomen, welche das Antimykotikum Amphotericin B enthalten [64] –, oder Myocet – nicht pegylierte Liposomen mit dem Zytostatikum Doxorubicin [91]. Es gibt Bestrebungen, Tumore mit Zytostatika-haltigen, thermosensitiven Liposomen spezifischer zu therapieren und radiologisch darstellbar zu machen [78]. Zudem werden mit Liposomen neue Methoden in der Analytik [30], der Radiologie [10] und der Regenerativmedizin [67] entwickelt. Auch um die Immunogenität und Wirksamkeit von Impfstoffen gegen die Tuberkulose zu steigern, werden Liposomen – auch schon in klinischen Studien – eingesetzt. Auf der Basis dieser Studien wurde in dieser Arbeit Möglichkeiten geprüft die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen *in vitro* weiter zu optimieren. Durch Verwendung von Phosphatidylcholin, Cholesterol sowie dem Einbau von stearyliertem Octaarginin ist es gelungen die

Aufnahme mykobakterieller Antigene durch Makrophagen und insbesondere die T-Zellvermittelte Zytokinfreisetzung zu steigern. Somit wird in dieser Arbeit gezeigt, dass Liposomen ein vielversprechendes Vehikel für mikrobielle Antigene in humanen Makrophagen darstellen. Zukünftige Experimente müssen allerdings noch prüfen, ob diese Form der Verabreichung der konventionellen Applikation von löslichen Antigenen – insbesondere *in vivo* – überlegen ist.

4.2.5. Aufbau von Liposomen zum Transport von mykobakteriellen Antigenen

Der biochemische Aufbau von Liposomen bietet eine versatile Möglichkeit, um die molekularen und immunologischen Interaktionen mit den Zielzellen zu manipulieren. Insbesondere lässt sich durch intelligente Formulierungen die gerichtete Bewegung, die Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren, und die Freisetzung der Impfantigene im Inneren der Zelle optimieren. Am meisten Erfahrung wurde bisher mit dem Lipid Dimethyldioctadecylammonium (DDA), Cord Faktor (Trehalose-6'6-dibehenat), Monophosphoryllipid A, Phosphatidylcholin, und Cholesterol gesammelt. Wir verwendeten eine definierte Komposition aus Phosphatidylcholin und Cholesterol. Dieses vergleichsweise inerte Grundgerüst ermöglichte es, grundlegende Funktionen der Liposomen wie Toxizität und Phagozytose zu untersuchen, sodass wir bewusst auf den Einsatz von zusätzlichen Aktivatoren des angeborenen Immunsystems verzichteten. Durch den Einsatz von stearyliertem Octaarginin, welches die Transfektion von Antigen in Zellen ohne kovalente Bindung aufgrund seiner lipophilen Polypeptid-Struktur in Zellen ermöglicht [90], wurde die Aufnahme von Liposomen in humane Makrophagen signifikant gesteigert. Diese Strategie erweist sich unabhängig von dem eingebauten Antigen als probates Mittel, um den Transport in Zielzellen zu verbessern [44, 50]. Das Potential dieser Strategie wird durch die antigenspezifische Freisetzung von IFN- γ – unser Surrogatmarker für die erfolgreiche Aktivierung von T-Gedächtniszellen – dokumentiert.

CAF01 Liposomen bestehen aus dem Lipid DDA als Transportvehikel und synthetisch hergestelltem Cord-Faktor, Trehalose-6'6-dibehenat, zur

Immunmodulation [3]. Diese Liposomen besitzen eine Vesikelgröße von 500 nm und eine Ladung von 50 mV [37]. CAF01-basierte Liposomen mit Ag85B-ESAT-6-Fusionsprotein induzierten in klinischen Studien in Menschen langandauernde, *Mtb*-spezifische T-Zellimmunantworten und eine starke IFN- γ Freisetzung. Probanden, welche mit nicht-adjuvantiertem Fusionsprotein geimpft wurden, zeigten eine wesentlich schwächere Immunreaktion auf die Impfantigene Ag85B und ESAT-6 [94].

Es gelang auch bereits Liposomen aus DDA und Monophosphoryllipid A in Kombination mit Ag85B-ESAT-6-Fusionsprotein in Mäusen als Aerosol zu verabreichen und dadurch einen Schutz vor nachfolgender Infektion mit virulenten Mykobakterien zu erzielen. Wurden die mit-Liposomen-geimpften Mäuse und mit BCG geimpften Mäuse mit *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) über Aerosole infiziert, so zeigten die mit Liposomen geimpften Mäuse im Vergleich zu BCG eine gleichstarke, je nach Impfdosis sogar länger andauernde Immunität im Lungengewebe [100]. Die Applikationsform als Aerosol ist insbesondere für die Induktion einer lokalen Immunantwort in den Atemwegen sinnvoll und im Kontext der Prävention von Lungeninfektionen wie der Tuberkulose ein entscheidender Fortschritt.

Eine weitere Entwicklungsmöglichkeit zur Verbesserung der Immunogenität von liposomal gebundenen Impfantigenen ist der Einbau von Liganden der TLR. TLR binden vor allem Lipide und Glykolipide und induzieren einen Vitamin D-abhängigen antimikrobiellen Effektormechanismus, der als Endstrecke die Cathelicidin-abhängige Abtötung von intrazellulären Mykobakterien zur Folge hat [57]. Dieses Konzept wurde erfolgreich im Mausmodell geprüft, indem Liposomen mit Monomycolylglycerol und Ag85B-ESAT-6-Fusionsprotein eingesetzt wurden [37, 72]. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Wirksamkeit von Liposomen mit weiteren synthetischen Lipiden zu verstärken [5, 6, 72].

In der Summe zeigen unsere und die bereits publizierten Arbeiten, dass Liposomen eine versatile Plattform darstellen, um die Aufnahme und Immunogenität von *Mtb* Antigenen in Maus und Mensch zu verbessern und sich dadurch zu einer wertvollen Alternative für die Nebenwirkungs-behafteteren Lebendimpfstoffe (zum Beispiel BCG) entwickeln können. Die Vielseitigkeit von Liposomen zeigt sich durch die große Zahl möglicher Komponenten, welche in diesen inkorporiert werden können.

Auf dieser Basis ist es jetzt möglich, komplexere Liposomen zu entwickeln, die nicht nur den Antigentransport verbessern, sondern auch durch Aktivierung angeborener Immunmechanismen eine Adjuvansfunktion und somit Potenzierung der T-Zellfunktion ausüben [15, 94]. Modifikation bestehender Komponenten oder Addition neuer Komponenten, wie Phosphatidylserin oder Monomycolylglycerol, käme für die hier verwendeten Liposomen in Frage: Inkorporation von Phosphatidylserin bewirkt, dass sich Liposomen wie Apoptosekörperchen verhalten, wodurch deren Phagozytose durch Makrophagen stimuliert wird [31]. Der Einbau von Monomycolylglycerol würde zu einer Stimulation dendritischer Zellen führen [6]. Diese beiden Mechanismen wären erste Möglichkeiten, die in den Experimenten festgestellte Wirkung der Liposomen zu verstärken und deren Aufbau für den zukünftigen Einsatz in klinischen Studien zu optimieren.

4.2.6. Impfstoffkandidaten gegen Tuberkulose in klinischen Testphasen

Zum heutigen Zeitpunkt steht lediglich BCG als Impfstoff gegen *Mtb* zur Verfügung. Dennoch gibt es bereits 14 Impfstoffkandidaten in klinischen Testphasen. Diese Kandidaten verfolgen unterschiedliche Strategien [83]. Es gibt therapeutische Vakzine mit dem Zweck die lange, kostenintensive Medikamententherapie zu verkürzen. Lebendvakzine sollen BCG in Zukunft ersetzen. Impfungen, die aus Proteinen bestehen (Subunit-Vakzin), sollen die Immunität von BCG-geimpften Patienten augmentieren, auch ‚booster‘ genannt [62]. 2 dieser Impfkandidaten bestehen aus Liposomen.

RUTI ist eine therapeutische Impfung zur Therapie der latenten Tuberkulose, welches von Grundlagenwissenschaftlern entwickelt wurde und mittlerweile industriell von Archivel Farma weiterentwickelt wird. Es besteht aus *Mtb* Zellfragmenten, welche in Liposomen verpackt wurden. In einer doppelblinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Phase I Studie konnte die Sicherheit und Wirksamkeit gezeigt werden [96]. Eine doppelblinde, randomisierte, Placebo-kontrollierte Phase II Studie wurde mit HIV-negativen und HIV-positiven, latent infizierte Probanden durchgeführt, welche zuvor 1 Monat lang mit Isoniazid behandelt wurden. Der Impfstoff induzierte Langzeit-memory-T-Zellen gegen

mehrere mykobakterielle Antigene [70]. In einer Phase III Studie soll nun gezeigt werden, ob die therapeutische Impfung mit RUTI nach 6-monatiger Therapie mit Isoniazid die Inzidenz der Tuberkulose bei HIV-Patienten mit latenter Tuberkulose-Koinfektion senken kann [109].

M72/AS01 ist ein Subunit-Vakzin, das ein 72 kDa schweres Polyprotein enthält, welches aus den *Mtb* Antigenen 32A und 39A besteht. Dieses Fusionsprotein ist zusätzlich an die Adjuvantien AS01 oder AS02 gebunden. In *Cynomolgus* Makaken, einem Primaten-basiertem Tiermodell, das derzeit der menschlichen Tuberkuloseerkrankung am nächsten kommt, schützte dieser Impfstoff vor schweren Krankheitsverläufen und dem Tod durch Tuberkulose [82]. Erste Versuche mit naiven und *Mtb*-infizierten Erwachsenen in Südafrika zeigten eine gute Verträglichkeit und induzierten eine starke humorale und zellvermittelte Immunantwort [19, 55, 82]. In Phase II Studien konnte die Sicherheit und Immunogenität von M72/AS01 in PPD-positiven Erwachsenen gezeigt werden [68].

Ein modifizierter Vaccinia Virus Ankara in Kombination mit dem *Mtb* Antigen 85A (MVA85A) war der erste Tuberkulose Impfstoffkandidat in einer klinischen Phase IIb Studie seit BCG [61, 62]. MVA85A wird aktuell als Booster für bereits mit BCG geimpfte Menschen erprobt. In einer randomisierten, Placebo-kontrollierte Studie in über 2500 BCG-geimpften Kindern traten keine signifikanten Nebenwirkungen auf [89, 108]. Wie aus den Experimenten mit Primaten erhofft, induzierte der Impfstoff eine signifikante Immunantwort und die Induktion von T-Gedächtniszellen [102]. Der entscheidende Endpunkt für den Impferfolg – die Verhinderung von Tuberkulose-Neuerkrankungen – wurde allerdings nicht erreicht. In der ungeimpften Kontrollgruppe und der Impfkohorte erkrankten statistisch gesehen die gleiche Anzahl an Studienteilnehmern [89]. In der Aufarbeitung dieser enttäuschenden Ergebnisse wurde in einer Meta-Analyse von 8 MVA85A Tierexperiment-Studien die Effizienz des Impfstoffkandidaten in Frage gestellt. Die Meta-Analyse kritisierte die Qualität und Interpretation der Tierexperimente, deren Ergebnisse die Basis für die nachfolgenden Phase IIb Studien in Kindern bildeten. Laut Meta-Analyse hätten mit MVA85A geimpfte Makaken die höchste Mortalität aller Tiergruppen (Mäuse, Meerschweinchen, Makaken und Kälber) gezeigt. Dies sei erst nach Beginn der Phase IIb Studien in Kindern publik geworden. Es wurde der Appell an mehr

Datentransparenz vor Beginn der Austestung von Impfstoffkandidaten bei Menschen gestellt [45].

Der in dieser Arbeit eingesetzte Impfstoffkandidat, ein liposomal verpacktes Gemisch mykobakterieller Antigene, ist noch weit davon entfernt, in klinischen Studien getestet zu werden. Nichtsdestotrotz zeigen die oben geschilderten Studien, dass noch erheblicher Bedarf an grundlagenwissenschaftlichen Arbeiten besteht, um erfolgreichere Impfstrategien zu entwickeln. Unser Kandidat wird auf der Basis der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse derzeit in einem Meerschweinchenmodell untersucht. Der erste Schritt ist die Überprüfung der Immunogenität *in vivo*, um dann – bei positivem Ausgang der Experimente – auf Effektivität gegen eine nachfolgende Infektion von *Mtb* erprobt zu werden.

4.3. Spezifischer Mehrwert der Arbeit im Kontext der Gesamtproblematik

Diese Arbeit reiht sich in die Bemühungen des MyTb Lab aus Ulm ein, ein geeignetes Vakzin gegen die Tuberkulose zu entdecken und zu erforschen. Darum ist diese Arbeit auch im Gesamtkontext der vom MyTb Lab publizierten Arbeit zu sehen. Die hier vorgelegten Experimente erforschen grundlegendes Wissen für nicht-komplexe Liposomen. Dies ermöglicht von diesem grundlegenden Wissen aus, neue Wege einzuschlagen und zu erforschen. Darum wirft Arbeit Fragen auf, welche in zukünftigen Publikationen des MyTb Lab erörtert werden sollen: Warum haften Liposomen auf CD3-positiven Zellen? Warum produzieren Makrophagen und CD1-positive Makrophagen nach Inkubation mit *Mtb*-Extrakt-haltigen Liposomen kein TNF- α ? Welche potentiellen Impfantigene sind in *Mtb*-Extrakt enthalten? Ausgehend von dem Grundstein, der durch diese Arbeit gelegt wurde, kann diesen Fragen in Zukunft nachgegangen werden.

Mtb-Extrakt stellt eine Kombination multipler potentieller Impfantigene der mykobakteriellen Zellwand dar. Anstatt die Immunreaktion auf einzelne Antigene zu erforschen, wird in dieser Arbeit versucht, grundlegende Aspekte der Abwehr des menschlichen Immunsystems auf liposomal verpackte, mykobakterielle Antigene zu untersuchen. Auf dieser Basis kann in zukünftigen Arbeiten auf die einzelnen Antigene eingegangen und mit den in dieser Arbeit gemessenen Immunreaktionen

verglichen werden. Auf diese Weise lässt sich das komplexe Zusammenspiel menschlicher Immunzellen bei Kontakt mit mykobakteriellen Antigenen erforschen und verstehen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen besaßen mit Phosphatidylcholin und Cholesterol ein vergleichsweise inertes Grundgerüst. Dies geschah in der Absicht, die Reaktion humaner Immunzellen auf die inkorporierten Antigene unter Konstanthaltung möglichst vieler Variablen zu untersuchen. Auf diese Weise war es möglich, diese Immunreaktion in der simpelsten Form zu untersuchen. In zukünftigen Experimenten kann nun untersucht werden, wie sich diese Immunreaktion unter veränderten Variablen verhält. Dabei reichen die Möglichkeiten von geänderten Mengen an Cholesterol, über den Einbau von Liganden des angeborenen Immunsystems bis hin zum Einsatz zusätzlicher Aktivatoren des angeborenen Immunsystems.

Die in der Diskussion besprochenen Forschungsergebnisse zeigen zudem, dass Impfstoffe auf Liposomenbasis und die Verwendung von mykobakteriellen Lipidantigenen ein neues Forschungsfeld ist, welches noch Grundlagenforschung benötigt bevor ein Liposomen-basiertes Vakzin entwickelt werden kann. Die vorliegende Arbeit versucht einen Teil dieser notwendigen Grundlagenforschung zu leisten.

5. Zusammenfassung

Aufgrund der speziellen Pathophysiologie der Tuberkulose und mykobakterieller Immunevasionsmechanismen konnte seit der Entdeckung von Bacillus Calmette-Guérin kein neuer Impfstoff gegen Tuberkulose entwickelt werden. In dieser Arbeit wird der Ansatz analysiert mit Hilfe von Liposomen den Transport mykobakterieller Antigene in humane Immunzellen zu optimieren. Die hier verwendeten Liposomen wurden aus Cholesterol, Phosphatidylcholin und stearyliertem Octaarginin hergestellt und enthielten *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-Extrakt, ein Antigengemisch aus einem virulenten, abgetöteten *Mycobacterium tuberculosis* Stamm. Im ersten Schritt wurden die Liposomen auf Größe, Antigeninkorporation, und Toxizität untersucht. Im zweiten Schritt wurden die funktionellen Eigenschaften von Liposomen mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es wurden folgende Leitbefunde erhoben:

1. Die Größe der Liposomen betrug ca. 100 nm.
2. Das mykobakterielle Antigen wurde mittels Rotationsverdampfung effektiv in die Liposomen inkorporiert.
3. Antigenhaltige Liposomen waren nicht toxisch für primäre humane Makrophagen und T-Zellen.
4. Liposomen wurden effektiv von Makrophagen phagozytiert.
5. Die Aufnahme von Liposomen führte in der Anwesenheit von primären Makrophagen oder CD1-positiven Makrophagen zu keiner Freisetzung von Tumornekrosefaktor α .
6. *Mtb*-Extrakt haltige Liposomen führen zu einer Antigen-spezifischen Freisetzung von Interferon γ .

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Liposomen ein probates Transportvehikel für mykobakterielle Antigene in humane Makrophagen sind. Unsere Experimente deuten darauf hin, dass vor allem Lipidantigene in die Liposomenmembran integriert wurden. Die Immunogenität dieser Liposomen wird derzeit *in vivo* in Meerschweinchen untersucht. Das nächste Ziel ist die Identifikation

5. Zusammenfassung

von definierten mykobakteriellen Antigenen aus dem *Mtb*-Extrakt, welche für die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen verantwortlich sind.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Aagaard C, Hoang TT, Izzo A, Billeskov R, Troudt J, Arnett K, Keyser A, Elvang T, Andersen P, Dietrich J: Protection and polyfunctional T cells induced by Ag85B-TB10.4/IC31 against *Mycobacterium tuberculosis* is highly dependent on the antigen dose. *PLoS One*. 2009; 4:e5930.
- [2] Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, Lingnau K, von Gabain A, Andersen CS, Korsholm KS, Andersen P: Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine*. 2006; 24:5452–60.
- [3] Agger EM, Rosenkrands I, Hansen J, Brahimi K, Vandahl BS, Aagaard C, Werninghaus K, Kirschning C, Lang R, Christensen D, Theisen M, Follmann F, Andersen P: Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): a versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements. *PLoS One*. 2008; 3:e3116.
- [4] Agger EM: Novel adjuvant formulations for delivery of anti-tuberculosis vaccine candidates. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016; 102:73–82.
- [5] Andersen CA, Rosenkrands I, Olsen AW, Nordly P, Christensen D, Lang R, Kirschning C, Gomes JM, Bhowruth V, Minnikin DE, Besra GS, Follmann F, Andersen P, Agger EM: Novel generation mycobacterial adjuvant based on liposome-encapsulated monomycoloyl glycerol from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol*. 2009; 183:2294–302.
- [6] Andersen CS, Agger EM, Rosenkrands I, Gomes JM, Bhowruth V, Gibson KJ, Petersen RV, Minnikin DE, Besra GS, Andersen P: A simple mycobacterial monomycolated glycerol lipid has potent immunostimulatory activity. *J Immunol*. 2009; 182:424–32.
- [7] Anderson DH, Harth G, Horwitz MA, Eisenberg D: An interfacial mechanism and a class of inhibitors inferred from two crystal structures of the *Mycobacterium tuberculosis* 30 kDa major secretory protein (Antigen 85B), a mycolyl transferase. *J Mol Biol*. 2001; 307:671–81.

- [8] Bakouche O, Gerlier D: Enhancement of immunogenicity of tumour virus antigen by liposomes: the effect of lipid composition. *Immunology*. 1986; 58:507–13.
- [9] Behar SM, Divangahi M, Remold HG: Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8:668–74.
- [10] Boerman OC, Laverman P, Oyen WJ, Corstens FH, Storm G.: Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Prog Lipid Res*. 2000; 39:461–75.
- [11] Boraschi D, Italiani P: From Antigen Delivery System to Adjuvanticy: The Board Application of Nanoparticles in Vaccinology. *Vaccines (Basel)*. 2015; 3:930–9.
- [12] Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Harter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S: Anti-tnf immunotherapy reduces cd8+ t cell-mediated antimicrobial activity against *mycobacterium tuberculosis* in humans. *J Clin Invest*. 2009; 119:1167–77.
- [13] Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR: Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun*. 1991; 59:1755–61.
- [14] Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR: Killing of virulent *mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med*. 1992; 175:1111–22.
- [15] Coffman RL, Sher A, Seder RA: Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*. 2010; 33: 492–503.
- [16] Content J, de la Cuvellerie A, De Wit L, Vincent-Levy-Fr ebault V, Ooms J, De Bruyn J: The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. *Infect Immun*. 1991; 59:3205–12.
- [17] Cooper AM: Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:393–422.

- [18] Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C: The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the hiv epidemic. *Arch Intern Med.* 2003; 163:1009–21.
- [19] Day CL, Tameris M, Mansoor N, van Rooyen M, de Kock M, Geldenhuys H, Erasmus M, Makhethhe L, Hughes EJ, Gelderbloem S, Bollaerts A, Bourguignon P, Cohen J, Demoitié MA, Mettens P, Moris P, Sadoff JC, Hawkrigde A, Hussey GD, Mahomed H, Ofori-Anyinam O, Hanekom WA: Induction and regulation of T-cell immunity by the novel tuberculosis vaccine M72/AS01 in South African adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 188:492–502.
- [20] De Libero G, Mori L: The T-Cell Response to Lipid Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol.* 2014; 5:219.
- [21] Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Krensky AM, Bonneville M, Peyrat MA, Caccamo N, Sireci G, Salerno A: Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis.* 2001; 184:1082–5.
- [22] Dieli F, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, Titone L, Romano A, Di Carlo P, Barera A, Accardo-Palumbo A, Krensky AM, Salerno A: Selective depression of interferon-gamma and granulysin production with increase of proliferative response by Vgamma9/Vdelta2 T cells in children with tuberculosis. *J Infect Dis.* 2002; 186:1835–9.
- [23] Dietrich J, Aagaard C, Leah R, Olsen AW, Stryhn A, Doherty TM, Andersen P: Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol.* 2005; 174:6332–9.
- [24] Douvas GS, May MH, Crowle AJ: Transferrin, iron, and serum lipids enhance or inhibit *mycobacterium avium* replication in human macrophages. *J Infect Dis.* 1993; 167:857–64.
- [25] Filipe V, Hawe A, Jiskoot W: Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm Res.* 2010; 27(5): 796–810.

- [26] Flesch IE, Kaufmann SH: Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun.* 1990; 58:2675–7.
- [27] Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P: Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis (Edinb).* 2008; 88:510–7.
- [28] Garçon N, Leroux-Roels G, Cheng W-F: Vaccine adjuvants. *Perspectives in Vaccinology.* 2011; 1:89–113.
- [29] Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, Cansler ME, Vogt TM, Delepine J, Winata E, Swarbrick GM, Chua WJ, Yu YY, Lantz O, Cook MS, Null MD, Jacoby DB, Harriff MJ, Lewinsohn DA, Hansen TH, Lewinsohn DM: Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol.* 2010; 8:e1000407.
- [30] Gómez-Hens A, Fernández-Romero JM: The role of liposomes in analytical processes. *Pharmaceutics.* 2016; 8:25.
- [31] Greco E, Quintiliani G, Santucci MB, Serafino A, Ciccaglione AR, Marcantonio C, Papi M, Maulucci G, Delogu G, Martino A, Goletti D, Sarmati L, Andreoni M, Altieri A, Alma M, Caccamo N, Di Liberto D, De Spirito M, Savage ND, Nisini R, Dieli F, Ottenhoff TH, Fraziano M: Janus-faced liposomes enhance antimicrobial innate immune response in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:E1360-8.
- [32] Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE: Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.* 1971; 14:95–9.
- [33] Groß U: *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Georg Thieme, Stuttgart New York, 2. Auflage (2009). S. 259–262.
- [34] Guo S, Xue R, Li Y, Wang SM, Ren L, Xu JJ: The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection. *Med Hypotheses.* 2012; 78:389–92.
- [35] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V: Autophagy is a defense mechanism inhibiting bcg and mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell.* 2004; 119:753–66.

- [36] Hattori Y, Matsunaga I, Komori T, Urakawa T, Nakamura T, Fujiwara N, Hiromatsu K, Harashima H, Sugita M: Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 409:304-7.
- [37] Henriksen-Lacey M, Smith Korsholm K, Andersen P, Perrie Y, Christensen D: Liposomal vaccine delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011; 8:505–19.
- [38] Herbst S, Schaible UE, Schneider BE: Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS One.* 2011; 6:e19105.
- [39] Hof H, Dörris R: *Duale Reihe – Medizinische Mikrobiologie.* Georg Thieme, Stuttgart New York, 4. Auflage (2009). S. 358–361.
- [40] Hunter RL, Olsen M, Jagannath C, Actor JK: Trehalose 6,6'-Dimycolate and Lipid in the Pathogenesis of Caseating Granulomas of Tuberculosis in Mice. *Am J Pathol.* 2006; 168:1249–61.
- [41] Ito T, Hasegawa A, Hosokawa H, Yamashita M, Motohashi S, Naka T, Okamoto Y, Fujita Y, Ishii Y, Taniguchi M, Yano I, Nakayama T: Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172. *Int Immunol.* 2008; 20:849–60.
- [42] Kagina BM, Abel B, Scriba TJ, Hughes EJ, Keyser A, Soares A, Gamielien H, Sidibana M, Hatherill M, Gelderbloem S, Mahomed H, Hawkridge A, Hussey G, Kaplan G, Hanekom WA, other members of the South African Tuberculosis Vaccine Initiative: Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis, following BCG vaccination of newborns. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182:1073–9.
- [43] Kallert S: Design and evaluation of strategies to optimize lipid specific T-cell responses against *Mycobacterium tuberculosis*. Dissertation, Universität Ulm (2015).
- [44] Kallert S, Zenk S, Walther P, Grieshaber M, Weil T, Stenger S: Liposomal delivery of lipoarabinomannan triggers *Mycobacterium tuberculosis* specific T-cells. *Tuberculosis (Edinb).* 2015; 95:452–62.

- [45] Kashangura R, Sena ES, Young T, Garner P: Effects of MVA85A vaccine on tuberculosis challenge in animals: systematic review. *Int J Epidemiol.* 2015; 44:1970–81.
- [46] Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM: Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med.* 2001; 345:1098–104.
- [47] Khan TA, Schimke LF, Amaral EP, Ishfaq M, Barbosa Bonfim CC, Rahman H, Iqbal A, D'Império Lima MR, Costa Carvalho BT, Cabral-Marques O, Condino-Neto A: Interferon-gamma reduces the proliferation of *M. tuberculosis* within macrophages from a patient with a novel hypomorphic NEMO mutation. *Pediatr Blood Cancer.* 2016; 63:1863–6.
- [48] Kleinsteinuber K, Heesch K, Schattling S, Sander-Juelch C, Mock U, Riecken K, Fehse B, Fleischer B, Jacobsen M: SOCS3 promotes interleukin-17 expression of human T cells. *Blood.* 2012; 120:4374–82.
- [49] Knutson KL, Hmama Z, Herrera-Velit P, Rochford R, Reiner NE: Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 1998; 273:645–52.
- [50] Komori T, Nakamura T, Matsunaga I, Morita D, Hattori Y, Kuwata H, Fujiwara N, Hiromatsu K, Harashima H, Sugita M: A microbial glycolipid functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity. *J Biol Chem.* 2011; 286:16800–6.
- [51] Kumar V, Abbas AK, Aster JC: Robbins basic pathology. Elsevier Saunders, Philadelphia, 9. Auflage (2013). S.493–496.
- [52] Kumari P, Meena LS: Factors affecting susceptibility to mycobacterium tuberculosis: a close view of immunological defence mechanism. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014; 174:2663–73.
- [53] Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T, Matsushima K: Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155:1474–7.

- [54] Le Bourhis L, Martin E, Péguillet I, Guihot A, Froux N, Coré M, Lévy E, Dusseaux M, Meyssonier V, Premel V, Ngo C, Riteau B, Duban L, Robert D, Huang S, Rottman M, Soudais C, Lantz O: Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol.* 2010; 11:701–8.
- [55] Leroux-Roels I, Forgas S, De Boever F, Clement F, Demoitié MA, Mettens P, Moris P, Ledent E, Leroux-Roels G, Ofori-Anyinam O, M72 Study Group: Improved CD4⁺ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* in PPD-negative adults by M72/AS01 as compared to the M72/AS02 and Mtb72F/AS02 tuberculosis candidate vaccine formulations: a randomized trial. *Vaccine.* 2013; 31:2196–206.
- [56] Lindblad EB: Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82:497–505.
- [57] Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL: Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol.* 2007; 179:2060–3.
- [58] Madni A, Sarfraz M, Rehman M, Ahmad M, Akhtar N, Ahmad S, Tahir N, Ijaz S, Al-Kassas R, Löbenberg R: Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications. *J Pharm Pharm Sci.* 2014; 17:401–26.
- [59] Målen H, Søfteland T, Wiker HG: Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins. *Scand J Immunol.* 2008; 67:245–52.
- [60] Mann JF, Shakir E, Carter KC, Mullen AB, Alexander J, Ferro VA: Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine.* 2009; 27:3643–9.
- [61] McShane H, Pathan A, Sander C, Goonetilleke NP, Fletcher HA, Hill AV: Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis* 2005; 85:47–52.
- [62] Méndez-Samperio P: Global efforts in the development of vaccines for tuberculosis: Requirements for improved vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 2016; 84:204–10.
- [63] Miyakawa Y, Ratnakar P, Rao AG, Costello ML, Mathieu-Costello O, Lehrer RI, Catanzaro A: In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit

defensins and porcine leukocyte protegrin against mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 1996; 64:926–32.

[64] Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ: Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs.* 2009; 69:361–92.

[65] Mohan T, Verma P, Rao DN: Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J Med Res.* 2013; 138:779–95.

[66] Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G: Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus calmetteguerin. *J Exp Med.* 1994; 180:1499–509.

[67] Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM: Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface.* 2014; 11:20140459.

[68] Montoya J, Solon JA, Cunanan SR, Acosta L, Bollaerts A, Moris P, Janssens M, Jongert E, Demoitie MA, Mettens P, Gatchalian S, Vinals C, Cohen J, Ofori-Anyinam O: A randomized, controlled dose-finding phase II study of the M72/AS01 candidate tuberculosis vaccine in healthy PPD positive adults. *J Clin Immunol.* 2013; 33:1360–75.

[69] Moreno-Mendieta SA, Rocha-Zavaleta L, Rodriguez-Sanoja R: Adjuvants in tuberculosis vaccine development. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 58:75–84.

[70] Nell A, D'lom E, Bouic P, Sabaté M, Bosser R, Picas J, Amat M, Churchyard G, Cardona PJ: Safety, tolerability, and immunogenicity of the novel antituberculous vaccine RUTI: randomized, placebo-controlled phase II clinical trial in patients with latent tuberculosis infection. *PLoS One.* 2014; 9:e89612.

[71] Newman MJ, Wu JY, Gardner BH: Induction of cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte responses specific for HIV-1 gp120 using saponin adjuvant (QS-21) supplemented subunit vaccine formulations. *Vaccine.* 1997; 15:1001–7.

[72] Nordly P, Korsholm KS, Pedersen EA, Khilji TS, Franzyk H, Jorgensen L, Nielsen HM, Agger EM, Foged C: Incorporation of a synthetic mycobacterial monomycoloyl glycerol analogue stabilizes dimethyldioctadecylammonium liposomes and potentiates their adjuvant effect in vivo. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 77:89–98.

- [73] O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP: The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31:475–527.
- [74] Oleszek W, Hamed A. Saponin-Based Surfactants. In: Kjellin M, Johansson I (Hrsg.) *Surfactants from Renewable Resources*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester (UK), 2010; S. 239–49.
- [75] Orr MT, Fox CB, Baldwin SL, Sivananthan SJ, Lucas E, Lin S, Phan T, Moon JJ, Vedvick TS, Reed SG, Coler RN: Adjuvant formulation structure and composition are critical for the development of an effective vaccine against tuberculosis. *J Control Release.* 2013; 172:190–200.
- [76] Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJA, Sorm G: Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1328:261–72.
- [77] Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Kaisho T, Kundu M, Basu J: Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol.* 2007; 8:610–8.
- [78] Peller M, Willerding L, Limmer S, Hossann M, Dietrich O, Ingrisich M, Sroka R, Lindner LH: Surrogate MRI markers for hyperthermia-induced release of doxorubicin from thermosensitive liposomes in tumors. *J Control Release.* 2016; 237:138–46.
- [79] Porcelli S, Morita CT, Brenner MB: CD1b restricts the response of human CD4-8-T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature.* 1992; 360:593–7.
- [80] Post FA, Manca C, Neyrolles O, Ryffel B, Young DB, Kaplan G: *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits *mycobacterium smegmatis*-induced cytokine production by human macrophages in vitro. *Infect Immun.* 2001; 69:1433–9.
- [81] Qiu Y, Chen J, Liao H, Zhang Y, Wang H, Li S, Luo Y, Fang D, Li G, Zhou B, Shen L, Chen CY, Huang D, Cai J, Cao K, Jiang L, Zeng G, Chen ZW: Tim-3-expressing CD4+ and CD8+ T cells in human tuberculosis (TB) exhibit polarized effector memory phenotypes and stronger anti-TB effector functions. *PLoS Pathog.* 2012; 8:e1002984.

- [82] Reed SG, Coler RN, Dalemans W, Tan EV, DeLa Cruz EC, Basaraba RJ, Orme IM, Skeiky YA, Alderson MR, Cowgill KD, Prieels JP, Abalos RM, Dubois MC, Cohen J, Mettens P, Lobet Y: Defined tuberculosis vaccine, Mtb72F/AS02A, evidence of protection in cynomolgus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:2301–6.
- [83] Rowland R, McShane H: Tuberculosis vaccines in clinical trials. *Expert Rev Vaccines.* 2011; 10:645–58.
- [84] Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA: Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 19:513–21.
- [85] Schwendener RA: Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines.* 2014; 2:159–82.
- [86] Spargo BJ, Crowe LM, Itoneda T, Beaman BL, Crowe JH: Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:737–40.
- [87] Stalenhoef JE, Alisjahbana B, Nelwan EJ, van der Ven-Jongekrijg J, Ottenhoff TH, van der Meer JW, Nelwan RH, Netea MG, van Crevel R: The role of interferon-gamma in the increased tuberculosis risk in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27:97–103.
- [88] Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 1998; 282:121–5.
- [89] Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, Shea JE, McClain JB, Hussey GD, Hanekom WA, Mahomed H, McShane H, MVA85A 020 Trial Study Team: Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet.* 2013; 381:1021–8.
- [90] Tönges L, Lingor P, Egle R: Stearylated octaarginine and artificial virus-like particles for transfection of siRNA into primary rat neurons. *RNA.* 2006; 12:1431–8.
- [91] Torchilin VP: Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13: 813–27.

- [92] Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP: Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006; 12:1198–202.
- [93] Ulbrich W, Lamprecht A: Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. *J R Soc Interface.* 2010; 7 Suppl 1:55–66.
- [94] van Dissel JT, Joosten SA, Hoff ST, Soonawala D, Prins C, Hokey DA, O'Dee DM, Graves A, Thierry-Carstensen B, Andreasen LV, Ruhwald M, de Visser AW, Agger EM, Ottenhoff TH, Kromann I, Andersen P: A novel liposomal adjuvant system, CAF01, promotes long-lived *Mycobacterium tuberculosis*-specific T-cell responses in humans. *Vaccine.* 2014; 32:7098–107.
- [95] Vartabedian VF, Savage PB, Teyton L: The processing and presentation of lipids and glycolipids to the immune system. *Immunol Rev.* 2016; 272:109–19.
- [96] Vilaplana C, Montané E, Pinto S, Barriocanal AM, Domenech G, Torres F, Cardona PJ, Costa J: Double-blind, randomized, placebo-controlled phase I clinical trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI. *Vaccine.* 2010; 28:1106–16.
- [97] Voinea M, Simionescu M: Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. *J Cell Mol Med.* 2002; 6:465–74.
- [98] Wallis RS, Kim P, Cole S, Hanna D, Andrade BB, Maeurer M, Schito M, Zumla A: Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13:362–72.
- [99] Wargnier A, Sasportes M, Lagrange PH: Granulysin: antimicrobial molecule of innate and acquired immunity in human tuberculosis. *Pathol Biol (Paris).* 2005; 53:516–21.
- [100] Weinrich Olsen A, van Pinxteren LA, Meng Okkels L, Birk Rasmussen P, Andersen P: Protection of Mice with a Tuberculosis Subunit Vaccine Based on a Fusion Protein of Antigen 85B and ESAT-6. *Infect Immun.* 2001; 69:2773–8.
- [101] Wherry EJ: T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011; 12:492–9.

[102] White AD, Sibley L, Dennis MJ, Gooch K, Betts G, Edwards N, Reyes-Sandoval A, Carroll MW, Williams A, Marsh PD, McShane H, Sharpe SA: Evaluation of the safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccine, MVA85A, delivered by aerosol to the lungs of macaques. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20:663–72.

[103] Xin Q, Niu H, Li Z, Zhang G, Hu L, Wang B, Li J, Yu H, Liu W, Wang Y, Da Z, Li R, Xian Q, Wang Y, Zhang Y, Jing T, Ma X, Zhu B: Subunit vaccine consisting of multi-stage antigens has high protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *PLoS One.* 2013; 8:e72745.

[104] Yuk JM, Jo EK: Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014; 3:155–67.

[105] http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf (abgerufen am 03.03.2017)

[106] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tuberculosis_world_map-Deaths_per_million_persons-WHO2012.svg (abgerufen am 26.09.2017); Abbildung erschienen unter der Attribution-ShareAlike 4.0 International (CC BY-SA 4.0); <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>

[107] http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/tb/cases/atlas.html (abgerufen am 26.09.2017)

[108] <http://www.stoptb.org/wg/mdrtb/resources/TAG/TBVaccines%20Pipeline.pdf> (abgerufen am 03.03.2017)

[109] <http://www.pipelinereport.org/TOC/tuberculosis-vaccine> (abgerufen am 03.03.2017)

[110] http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Download/TB2014.pdf;jsessionid=2CD5CB906418162DD307630BB26BAB42.2_cid290?__blob=publicationFile (abgerufen am 03.03.2017)

[111] https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html#doc2374486bodyText10 (abgerufen am 26.09.2017)

7. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater, Betreuer und Mentor, Prof. Dr. med. Steffen Stenger, für sein stetiges Engagement und seine Hilfsbereitschaft bedanken. Seine Betreuung, seine positive Art und seine unglaubliche Geduld mit mir haben einen erheblichen Teil dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit schreiben konnte. Wir haben uns auch viel über meine Ziele im Leben, meine berufliche Zukunft als Arzt und alltägliche Dinge unterhalten – auch dafür möchte ich ihm an dieser Stelle herzlich danken. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Kollegen vom MyTb Lab bedanken. Allen voran Dr. rer. nat. Stephanie Wehrstedt, Mark Grieshofer und Daniel Mayer, die mir mit ihrem Wissen, ihrer Hilfsbereitschaft und ihrer freundlichen Art eine so lehrreiche, schöne und unvergessliche Zeit bereitet haben. Danke!

Mein weiterer Dank gilt Dr. med. Sebastian Zenk, Dr. med. Benjamin Hagemann, Michaela Hepperle, Kathrin Kennerknecht, Andreas Zimmermann, Esra Schercher, Jan Kubis, Sebastian Hauck und Stefanie Hauk. All diese Menschen haben ein so tolles Arbeitsumfeld erschaffen, in dem ich mich von Anfang an sehr wohlfühlt habe. Genau deswegen verging meine Zeit im MyTb Lab wie im Flug. Euch auch ein Danke von Herzen.

Zudem geht mein Dank an die AG Streptokokken, die AG Chlamydien und die mikrobiologische Diagnostik der Uniklinik Ulm für ihre Bereitschaft mich in ihren Räumlichkeiten forschen zu lassen und ihre Hilfe, wenn es bei mir wieder Mal nicht so recht klappen wollte.

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene habe ich sehr viel gelernt. Danke für diese glückliche Zeit, die viel zu schnell vorbeiging. Ich werde sie nie vergessen und in bester Erinnerung behalten!

Zu guter Letzt möchte ich an dieser Stelle noch ein paar besondere Menschen erwähnen, die ihre Unterstützung im Hintergrund geleistet haben: meine Freunde

7. Danksagung

aus der WG/zuhause/unterwegs/am Ende der Welt, meine Mutter, meine Tante Aga, meine zwei Brüder Chris und Andi, und meine Kommilitonen der GTU. Danke, dass ihr stets an meiner Seite wart. Ihr seid unbezahlbar wertvoll.

8. Lebenslauf

Name: Alexander Michael Bückle

Geburtsdatum, -ort: 1989, Ulm

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Akademische Ausbildung

- 1999 – 2008 **Helfensteingymnasium** – Geislingen/Steige
Abitur (Abschlussnote: 1,5)
- 2008 – 2009 **Eberhardt-Karls-Universität** – Tübingen *Studium der Chemie*
(Diplom, 1 Semester)
- 2009 **Test für medizinische Studiengänge** - Ulm
Note 1,0 (100%)
- 2009 – 2017 **Universität Ulm** – Ulm
Studium der Humanmedizin (Staatsexamen, Gesamtnote: 2,5)
- 2015 – heute **Universität Ulm** – Ulm
Promotion bei Prof. Dr. med. Steffen Stenger
Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
„Liposomen als Vehikel für Antigene zur Verbesserung der
zellulären Immunantwort bei der Tuberkulose“,
Verteidigung ausstehend

Medizinische Praktika und Famulaturen

- 2009 **Krankenpflegepraktikum – Kardiologie**
Kreiskrankenhaus Geislingen, Geislingen/Steige
- 2010 **Krankenpflegepraktikum – Gastroenterologie**
Kreisklinikum Esslingen, Esslingen
- 2010 **Krankenpflegepraktikum – Hämatologie/Onkologie**
Universitätsklinikum Ulm, Ulm
- 2012 **Famulatur – Plastische Chirurgie**
Vivantes Friedrichshain, Berlin
- 2013 **Famulatur – Allgemeinmedizin**
Dres. Pröhl/Eckebrecht, Wunstorf/Steinhude
- 2013 **Famulatur – Radiologie**
Universitätsklinikum Ulm, Ulm
- 2014 **Famulatur – Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie**
Bundeswehrkrankenhaus Ulm, Ulm
- 2014 **Famulatur – Neurochirurgie**
Universitätsklinikum Ulm, Ulm
- 2015/2016 **Praktisches Jahr (1. Tertial) – Anästhesie**
Sanaklinikum Biberach, Biberach a.d.R.
- 2016 **Praktisches Jahr (2. Tertial) – Innere Medizin**
Spital Bülach, Bülach (CH)

8. Lebenslauf

- 2016 **Praktisches Jahr (3. Tertial) – Chirurgie**
Sanaklinikum Biberach, Biberach a.d.R.
- 2018 – 2019 **Assistenzarzt für Allgemeinchirurgie und**
Traumatologie
Spital Bülach, Bülach (CH)

Zukünftige Assistenzarztstellen

- 2019 – 2021 **Assistenzarzt für Innere Medizin**
Spital Bülach, Bülach (CH)