Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Ulm
Ärztl. Direktor Prof. Dr. med. S. Stenger

Regulation von antimikrobiellen Peptiden bei der Tuberkulose

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Jürgen Benjamin Hagemann
aus Stuttgart
2011

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Steffen Stenger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Barth
Tag der Promotion:	Freitag, 10. Februar 2012

Und das Licht scheint in der Finsternis,
und die Finsternis hat’s nicht ergriffen.
(1. Joh.,5)

- Meinen Freunden gewidmet -

Abkürzungsverzeichnis **III**

1. Einleitung **1**

1.1. Das Erfolgsmodell *Mycobacterium tuberculosis* und seine epidemiologische Relevanz 1
1.2. Klinik, Diagnostik und Therapie der Tuberkulose 2
1.3. Die Immunabwehr bei der Tuberkulose 3
1.4. Fragestellung der Arbeit 11

2. Material und Methoden **13**

2.1. Materialliste
2.1.1. Arbeitsgeräte 13
2.1.2. Arbeitsmaterialien 13
2.1.3. Chemikalien 14
2.1.4. Medien und Puffer 16
2.1.5. Zytokine, Antikörper und Primer 17
2.1.6. Antigene 19
2.1.7. Zellen 19

2.2. Methoden
2.2.1. Generierung, Differenzierung und Kultivierung von Zellen 20
2.2.1.1. Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen aus Buffy Coats 20
2.2.1.2. Generierung von unreifen dendritischen Zellen und Makrophagen 21
2.2.1.3. Kultivierung und Charakterisierung von T-Zellklonen 22
2.2.1.4. Einfrieren von Zellen 23
2.2.1.5. Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen 24
2.2.1.6. Stimulation von CD1-restringierten T-Lymphozyten 24

2.2.2. Angewandte Analyse- und Messverfahren 25
2.2.2.1. Durchflusszytometrie 25

2.2.2.2. Präparation und Aufreinigung von mRNA und reverse Transkription 28
2.2.2.3. Quantitative real time PCR 29
2.2.2.4. IFNγ-ELISA 31
2.2.2.5. Statistische Auswertung 34

3. Ergebnisse 35

3.1. Regulation von antimikrobiellen Peptiden in Zellen des angeborenen Immunsystems 37
3.1.1. Purinozeptor $P2X_7$ 37
3.1.2. Toll-like Rezeptor 2 38
3.1.3. Cathelicidin 41
3.1.4. Cathepsin G 43

3.2. Regulation von antimikrobiellen Peptiden in Zellen des angeborenen Immunsystems 45
3.2.1. Charakterisierung von T-Zell-Klonen 45
3.2.2. Perforin 49
3.2.3. Granulysin 50

4. Diskussion 59

5. Zusammenfassung 66

6. Literaturverzeichnis 68

7. Danksagung

8. Curriculum vitae

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogen-carbonat
AIDS	„acquired immunodeficiency syn-drome“
AM	Alveolarmakrophage
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin, ein Fluorochrom
ATP	Adenosintriphosphat
β_2-MG	Beta-2-Mikroglobulin
BCG	*M. bovis bacillus Calmette-Guérin*
CathG	Cathepsin G
CCL	Chemokinligand
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	komplementäre DNA
CM	Zellkultur-Medium
ConA	Concanavalin A
Cp	„crossing point“
Cy 5	Cyanin 5
DZ	dendritische Zelle
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
ER	endoplasmatisches Retikulum
Ext.	Extrakt

FACS	Durchflusszytometrie
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	„forward scatter“
GA	Golgi-Apparat
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
H_2SO_4	Schwefelsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HS	Humanserum
IFNγ	gamma-Interferon
Ig	Immunglobulin
IGRA	Interferon-gamma-Release-Assay
IL	Interleukin
IL-2t6ÜS	Interleukin-2 Überstand aus einer Zell-linie
kDa	1000-faches Dalton
$KHCO_3$	Kaliumhydrogencarbonat
LAM	Lipoarabinomannan
ManLAM	Mannose-gecapptes Lipoarabino-mannan
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

mRNA	„messenger RNA“
M.tb.	*Mycobacterium tuberculosis*
M.tb.-Extrakt	Extrakt aus *Mycobacterium tuberculosis*
MΦ	Makrophage
Na_2EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat
Na-Pyruvat	Natrium-Pyruvat
NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
$P2X_7$	Purinozeptor
PAMP	„pathogen associated molecular pattern“
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PFA	Paraformaldehyd
PPD	„purified protein derivative“
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
rhu	rekombinant, human

RPMI 1640	„Roswell Park Memorial Institute“ (ein dort entwickeltes Zellmedium für verschiedene humane Zelltypen)
RTase	Reverse Transkriptase
SSC	„sideward scatter“
TDM	Trehalose-6,6-dimykolat
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
TLR-2	Toll-like Rezeptor 2
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vit.D_3	Vitamin D_3

1. Einleitung

1.1. Das Erfolgsmodell *Mycobacterium tuberculosis* und seine epidemiologische Relevanz

Der Erreger der Tuberkulose ist *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb.*). *M.tb.* ist ein säurefestes, unbewegliches sowie fakultativ intrazellulär langsam aerob wachsendes Stäbchenbakterium aus der Familie der *Mycobacteriaceae*. Es wurde erstmals von Robert Koch am 24. März 1882 vor der Berliner Physiologischen Gesellschaft als Erreger der Tuberkulose vorgestellt. Neben *M.tb.* kennt man heute noch weitere Vertreter der tuberkulösen Mykobakterien, von denen besonders in Entwicklungsländern *M. bovis* als Erreger der intestinalen Tuberkulose nach Konsum kontaminierter Milch von Bedeutung ist. In der industrialisierten westlichen Welt spielt diese Form der Transmission seit der Pasteurisierung der Milch und der strengen Kontrolle von Nutzviehbeständen aber keine wesentliche Rolle mehr [1].

Dass die Tuberkulose nicht erst seit der Domestikation von Nutzvieh von Bedeutung ist, zeigen fossile Funde eines Homo erectus aus dem Paläolithikum, an dessen Schädeldach sich Spuren einer Leptomeningitis tuberculosa fanden [42]. Obwohl sich in der Medizin ein beispielloser Fortschritt ergeben hat, ist die Tuberkulose heute präsenter denn je:

Neben HIV/AIDS und Malaria ist sie eine der größten Geißeln der Menschheit. Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist latent infiziert, 5 – 10% der Immunkompetenten entwickeln im Laufe ihres Lebens eine behandlungsbedürftige Tuberkulose. Etwa 60% davon sind pulmonale Tuberkulosen, 30% Urogenitaltuberkulosen, sowie 10% Manifestationen an Haut, Knochen und Gelenken, Meningen u.a. Manifestationsorte.

Im Jahr 2009 erkrankten laut WHO weltweit 9,4 Millionen Menschen, 1,7 Millionen Menschen starben. Damit ist die Tuberkulose die weltweit am häufigsten zum Tode führende behandelbare Infektionserkrankung und die Haupttodesursache bei AIDS-Patienten, insbesondere in Afrika [93]. Auf Europa entfielen mit einem deutlichen Ost-West-Gefälle etwa 5% der Tuberkuloseerkrankungen. Trotz der in Deutschland seit Jahren rückläufigen Zahlen an Tuberkuloseneuerkrankungen registrierte das Robert Koch Institut im Jahr 2009 noch immer 4432 Fälle. Dies entspricht einer jährlichen Inzidenz von 5,4/100.000 Einwohner [70].

Angesichts der genannten Zahlen wird das Ausmaß der epidemiologischen und gesundheitsökonomischen Relevanz der Tuberkulose deutlich. Um dringend erforderliche neue Wege der Prophylaxe und Therapie beschreiten zu können, bedarf es eines besseren Verständnisses der immunologischen Abwehrmechanismen bei der Tuberkulose.

1.2. Klinik, Diagnostik und Therapie der Tuberkulose

Die meist aerogene Infektion mit *M.tb.* bleibt bei den meisten Menschen zunächst ohne jede Konsequenz. Ihr Organismus beherbergt zwar die vom intakten Immunsystem in Schach gehaltenen Erreger bisweilen lebenslang, erkrankt aber nicht [92]. In diesem Fall spricht man von einer latenten Tuberkulose. Bei etwa 5 – 10% der Immunkompetenten kommt es zur Primärtuberkulose, also der Erkrankung in bis dato uninfizierten Personen. Ein Drittel der Betroffenen entwickelt diese innerhalb zweier Jahre post infectionem. Immunkompromittierende Zustände wie hohes Alter [24], Malnutrition, Diabetes mellitus, zytostatische oder immunsuppressive Therapie [15], chronischer Alkoholismus, Drogenabusus, Malignome, HIV-Infektion oder das Vorliegen von AIDS [18, 21] sowie seltenere Ursachen wie Silikosen begünstigen die frühe Manifestation einer klinisch apparenten Tuberkulose. Sie können auch jederzeit einer latenten Tuberkulose zum Ausbruch verhelfen. Man spricht von Sekundär- oder Reaktivierungstuberkulose. Ansteckungsgefahr besteht nur bei der offenen Tuberkulose, d.h. wenn virulente Erreger vom Menschen in die Umwelt ausgeschieden werden. Dies geschieht i.d.R. über infektiöses Sputum oder Aerosole bei der pulmonalen, aber auch durch Urin bei der Urogenitaltuberkulose. Komplikationen der Primärtuberkulose können eine Hiluslymphknoten-Tuberkulose, eine Pleuritis tuberculosa, eine Miliartuberkulose der Lunge oder Meningen als Meningitis tuberculosa sowie weiterer Organe und schließlich bei schwerst immunsupprimierten Menschen die prognostisch infauste Landouzy-Sepsis sein. Die klinischen Symptome zu Beginn einer Tuberkulose sind meist unspezifischer Natur wie Abgeschlagenheit, Appetitverlust, remittierende subfebrile oder febrile Temperaturen und trockener Husten. Es können sich aber auch schwerwiegende Krankheitszeichen mit klassischer B-Symptomatik (hohes Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust) einstellen.

Besteht der begründete Verdacht auf eine Tuberkulose, bestehen mehrere Möglichkeiten der Diagnostik. Sie schließt neben bildgebenden radiologischen Verfahren auch

molekulardiagnostische Verfahren wie den Erreger-DNA-Nachweis ein. Die Erregerkultur gilt als mikrobiologischer Goldstandard, der neben dem Erregernachweis auch dessen Resistenztestung erlaubt. Weiterhin stehen immunologische Verfahren wie der Tuberkulin-Intrakutantest nach Mendel-Mantoux oder der Interferon-gamma-Release-Assay (IGRA) zur Verfügung [22, 79]. Eine diagnostizierte klinisch apparente Tuberkulose ist immer behandlungsbedürftig, selbst wenn der Patient angibt, sich subjektiv wohl zu fühlen.

Neben Isolations- und Hygienemaßnahmen sowie der supportiven Behandlung von Komorbiditäten stehen heute fünf hochwirksame Standardantituberkulotika zur Verfügung. Dies sind Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Ethambutol und Streptomycin. Probleme bei der Therapie bereitet einerseits die konstitutionell durch hochmolekulare Mykolsäuren bedingte hydrophobe Zellwand der Mykobakterien [23], durch die manche Pharmaka nicht permeieren [57], andererseits aber auch zunehmend resistente Keime. Man unterscheidet „single drug resistent“ Mykobakterien, die nur gegen eines der Standardantituberkulotika resistent sind und bei adäquater Kombinationschemotherapie wenige Probleme bereiten von solchen, die „multidrug resistent“ (Isoniazid und Rifampicin) oder sogar „extensively drug resistent“ (auch gegen Reservemittel resistent) sind. In Deutschland sind etwa 10% der Stämme gegen eines der Standardantituberkulotika und knapp 2% gegen Isoniazid und Rifampicin resistent. Insgesamt ist die Prognose der unkomplizierten Tuberkulose gut, sofern sie früh erkannt und intensiv lege artis für mindestens sechs Monate behandelt wird.

1.3. Die Immunabwehr bei der Tuberkulose

1.3.1. Das komplexe Zusammenspiel von angeborenem und erworbenem Immunsystem

Nach Inhalation virulenter Mykobakterien gelangen diese über das tracheobronchiale System in die Alveolen der Lunge. Dort werden sie durch Alveolarmakrophagen (AM) phagozytiert [28]. Bei dieser Mannoserezeptor-abhängigen Phagozytose der Mykobakterien ist v.a. Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan (ManLAM), ein Vertreter mykobakterieller Lipoglykane, entscheidend beteiligt [9]. Es ist bei den virulenten *M.tb.*-Stämmen Erdmann und H37Rv sowie den avirulenten Stämmen H37Ra und BCG zu finden [12, 64]. Die AM sind allein jedoch nicht in der Lage, die phagozytierten Erreger zu eliminieren. Subtile Evasionsmechanismen über mykobakterielle Sulpholipide [34] oder

Trehalose-6,6-dimykolat (TDM) [84], die in die Reifung der Phagolysosomen der AM eingreifen und so das intrazelluläre Überleben von *M.tb.* verbessern, sind beschrieben [7, 35, 59]. Auch die Fähigkeit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) wird durch mykobakterielle Bestandteile wie das 19kDa-Protein beeinflusst [63].

Diesen Immunevasionsmechanismen zum Trotz kommt es im Immunkompetenten zur Rekrutierung spezifischer T-Lymphozyten durch von AM freigesetzte Chemokine wie Chemokinligand 2 (CCL-2 oder MCP-1), Chemokinligand 3 (CCL-3 oder MIP-1α) und Chemokinligand 5 (CCL-5 oder RANTES). Es werden v.a. $CD4^+$ T-Lymphozyten angelockt und umringen den Infektionsherd [47, 73]. Aktivierte $CD4^+$ T-Lymphozyten induzieren dann durch die Sekretion von TH1-Zytokinen wie gamma-Interferon (IFNγ) in den AM antibakterielle Effektormechanismen [32]. Auch spezifische $CD8^+$ T-Lymphozyten wirken an der Verteidigung gegen *M.tb.* mit, indem sie TH1-Zytokine sezernieren und so zur Aktivierung von Makrophagen (MΦ) beitragen [88].

Durch die Sekretion antimikrobieller Effektormoleküle wie Perforin und Granulysin wirken T-Lymphozyten darüberhinaus direkt antimikrobiell. Perforin bildet durch Einlagerung in die Zellmembran infizierter MΦ Poren, durch die Granulysin eindringt und intrazelluläre Erreger [91] wie z.B. Mykobakterien abtötet [58, 86]. Auch mykobakterielles ManLAM wirkt chemotaktisch auf $CD4^+$ aber auch $CD8^+$ T-Lymphozyten [6], schränkt allerdings deren Proliferation und Expression immunmodulatorischer Zytokine ein [13, 55].

Die rekrutierten T-Lymphozyten und die AM kapseln zusammen den Infektionsherd zum Schutz umliegenden gesunden Lungengewebes als Granulom ab [72, 75] (Abb.1).

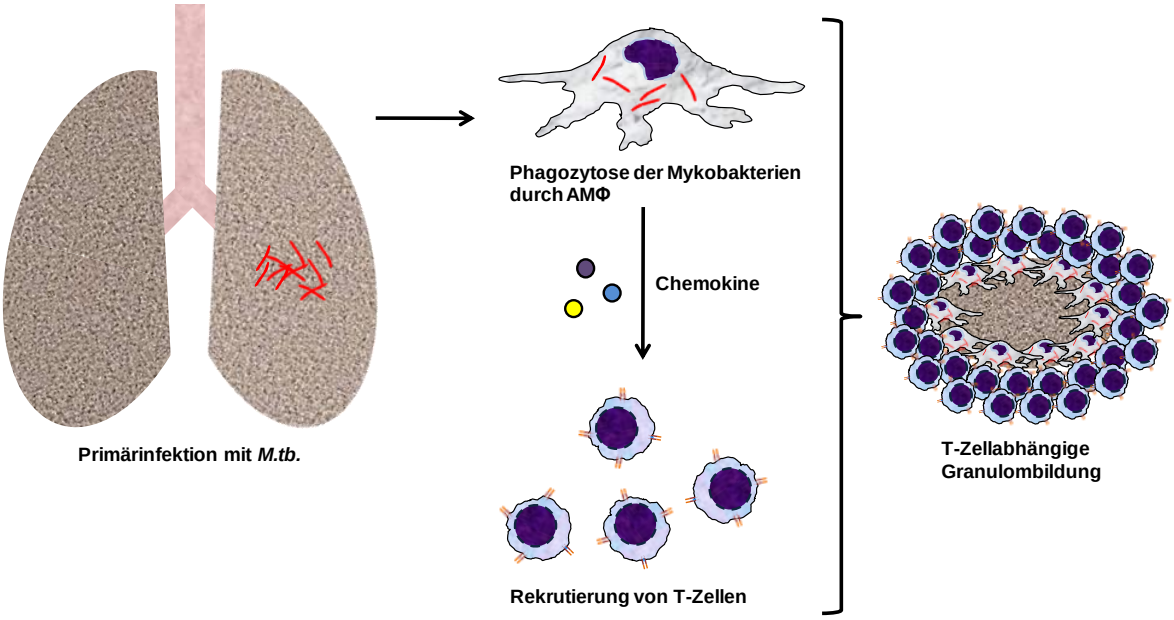


Abbildung 1 T-Zellabhängige Granulomformation nach Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*. Mykobakterien (rote Stäbchen) gelangen in den Respirationstrakt. Dort werden sie von Alveolarmakrophagen (oben) phagozytiert. Diese sezernieren verschiedene Chemokine, um T-Lymphozyten (unten) zu rekrutieren. Zusammen bilden Alveolarmakrophagen und T-Lymphozyten um den Infektionsherd (rechts) ein schützendes Granulom. Auf diese Weise kapseln sie die befallenen erregerhaltigen (rote Stäbchen) Areale gegenüber dem verbliebenen gesunden Gewebe ab und dämmen so die Infektion mit *M.tb.* ein. (Abkürzungen: *M.tb.* = *Mycobacterium tuberculosis*)

Durch diese T-Zellabhängige Bildung von Granulomen, in denen *M.tb.* bisweilen zeitlebens in Dormanz persistieren kann [92], entsteht die latente Tuberkulose. Umstände wie die unter 1.2. genannten können zur Auflösung des Granuloms und zur Reaktivierung der Tuberkulose führen. Auch wenn das Zusammenspiel zwischen MΦ als Zellen des angeborenen sowie T-Lymphozyten als Zellen des erworbenen Immunsystems noch nicht vollständig verstanden ist, so weiß man, dass gerade dieses entscheidend für den Schutz vor *M.tb.* ist [7].

1.3.2. Das angeborene Immunsystem

Die Aktivierung von MΦ und Monozyten und damit die Induktion antimikrobieller Mechanismen erfolgt zunächst auch über verschiedene Oberflächenrezeptoren.

Beispielsweise ist $P2X_7$ ein auf MΦ exprimierter Purinrezeptor [36, 65], der extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) bindet [48, 49, 50], wie es beispielsweise nach der Lyse von Zellen frei wird. Es mehren sich Hinweise, dass $P2X_7$ eine wichtige Rolle in der Immunabwehr der Tuberkulose spielt. Dessen Aktivierung führt zu Ca^{2+}-Influx, der über

die Induktion der Caspase-Kaskade zur Apoptose führt [31, 39, 94]. Ebenfalls zur Apoptose führt die $P2X_7$-vermittelte Poreninduktion [11]. Zusätzlich trägt er durch Aktivierung der Phospholipase D, welche die Fusion von Phago- und Lysosomen beschleunigt, zur Abtötung intrazellulärer Mykobakterien bei [26]. Nach Bindung von ATP ist er außerdem in der Lage, die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1β [43] und IL-18 zu steigern, Autophagie zu induzieren [30] sowie die Produktion von Sauerstoffradikalen in MΦ zu steigern [69]. Polymorphismen im HLA-Haplotyp sowie in den Genen für den Vitamin-D_3-Rezeptor, Interferon-γ-Promotor und anderen für die Pathogenese der Tuberkulose relevanten Genen erhöhen die Suszeptibilität für eine Tuberkulose [5]. Viele dieser Suszeptibilitätsallele reduzieren infolge eines Mangels an reaktiven Sauerstoff- und Nitroxidradikalen die antimikrobielle Funktion von MΦ, die weiterhin als Reservoir für den Erreger dienen [78]. Auch Polymorphismen im $P2X_7$-Gen erhöhen die Suszeptibilität für eine manifeste Tuberkulose [30].

Toll-like Rezeptoren (TLRs) spielen bei der Erkennung mykobakterieller Antigene durch MΦ und dendritische Zellen (DZ) eine wichtige Rolle. Dabei sind sie nicht nur in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems involviert, sondern auch bei der Induktion adaptiver Immunität von Bedeutung. TLRs regulieren immunmodulatorische Zytokine, die v.a. eine TH1-gestützte Immunantwort erzeugen und somit für die Infektionsabwehr von Mikroorganismen von Bedeutung sind. Das 19kDa Lipoprotein als ein Repräsentant lipidhaltiger mykobakterieller Antigene induziert IL-12 und bakterizides NO in humanen MΦ über einen TLR-2-abhängigen Weg [8] sowie auch die Apoptose in THP-1-Monozyten [14]. Die Erkennung von *M.tb.* über TLR-2 führt zur Transkription von proIL-1β, dem Vorläufer des proinflammatorischen Zytokins IL-1β [43]. Die Aktivierung von TLR-2 durch pathogenassoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular pattern“, PAMP) führt desweiteren zur Expression von Cathelicidin.

Antimikrobielle Effektormoleküle sind die entscheidenden Abwehrmechanismen von MΦ und Monozyten. Ein wichtiges Beispiel ist das antimykobakterielle Cathelicidin [67, 97], welches als inaktive Vorstufe in MΦ vorliegt und bei Bedarf durch Serinproteasen in die aktive Form LL-37 gespalten wird. Es wird durch Vitamin D_3 induziert [52] und induziert die Autophagie humaner MΦ, wodurch die Eliminierung intrazellulärer Mykobakterien unterstützt wird [97].

Cathepsin G (CathG) ist eine antimikrobielle Serinprotease, die in neutrophilen Granulozyten und azurophilen Granula von Monozyten und MΦ exprimiert wird. Bei der

Tuberkulose wird CathG nach der Infektion herunterreguliert, wodurch die Mykobakterien intrazellulär länger überleben [68]. Diese Tatsache lässt mutmaßen, dass CathG z.B. eine Rolle bei der Aktivierung antimikrobieller Peptide einzunehmen vermag [66].

Trotz der Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems ist für die Ausprägung einer suffizienten Immunität die Mithilfe aktivierter T-Lymphozyten erforderlich.

1.3.3. Das erworbene Immunsystem

Um antigenspezifische T-Lymphozyten zu aktivieren, müssen ihnen von Phagozyten mykobakterielle Antigene präsentiert werden. Dies geschieht je nach Restriktion der T-Lymphozyten und der Biochemie des Antigens in unterschiedlicher Weise über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHCI und MHCII), die sich in verschiedene humane Leukozytenantigene (HLA) untergliedern. Über die MHCI-Moleküle HLA-A, HLA-B und HLA-C, die auf jeder kernhaltigen Körperzelle exprimiert sind, werden zytosolische Peptide an $CD8^+$ T-Lymphozyten präsentiert. Diese vermitteln die Lyse infizierter Zellen, die körperfremde Peptide präsentieren. Dieser Weg der T-Zellvermittelten Zelllyse ist v.a bei viralen Infektionen von Bedeutung. Die MHC-II-Moleküle HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR werden nur auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) exprimiert, zu denen B-Lymphozyten, DZ und MΦ gehören. Sie präsentieren extrazelluläre Antigene, die von den APZ phagozytiert und in Peptid-Fragmente degradiert wurden. Solche Antigene sind z.B. Bakterien wie *M.tb.*. Es ist trotz seiner intrazellulären Lokalisation nicht den Proteasomen zugänglich, weil es sich in Vesikeln befindet. Über MHCII werden die Peptide an $CD4^+$ T-Lymphozyten präsentiert, die nun durch die Freisetzung von TH1-Zytokinen in der Lage sind, MΦ dazu zu aktivieren, phagozytierte im Phagolysosom befindliche Erreger abzutöten [32] (Abb.2).

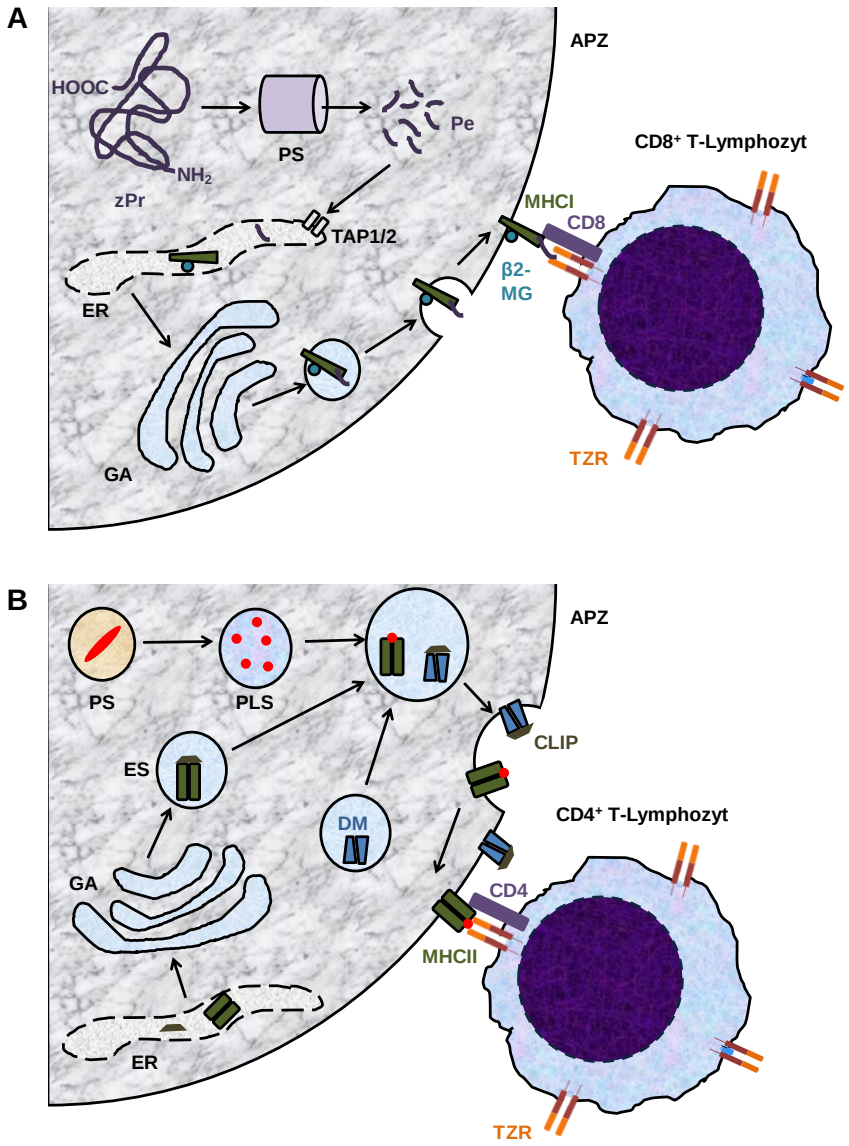


Abbildung 2 Antigenpräsentation über MHCI und MHCII – ein Vergleich Schematische Darstellung der Antigenpräsentation über MHCI an $CD8^+$ T-Lymphozyten (A) sowie Antigenpräsentation über MHCII an $CD4^+$ T-Lymphozyten (B). Zu (A): Zytosolische Proteine (zPro) werden nach Ubiquitinylierung im Proteasom (PS) in ihre einzelnen Peptid-Fragmente (Pep) degradiert. Diese werden über TAP1/2-Transporter in das endoplasmatische Reticulum (ER) der Zelle transportiert. Über mehrere Schritte wird dort MHCI mit dem nichtpolymorphen β_2-Mikroglobulin (β2-MG)assoziiert und mit dem Peptidantigen beladen und via Golgi-Apparat (GA) durch vesikulären Transport in die Zellmembran transferiert. $CD8^+$ T-Lymphozyten erkennen das endogene Peptidantigen über ihren spezifischen T-Zellrezeptor (TZR) und CD8. Zu (B): Phagozytierte Antigene wie Bakterien (rotes Stäbchen) befinden sich im Phagosom (PS). Nach dessen Ansäuerung (PLS) kommt es zur Aktivierung von Proteasen, die das Antigen in Peptidfragmente degradieren (rote Kreise). Vom endoplasmatischen Reticulum (ER) aus werden über den Golgiapparat (GA) Vesikel (ES) abgeschnürt, die CLIP-stabilisiertes MHCII enthalten. CLIP stabilisiert den aus α- und β-Kette bestehenden Komplex. Nach der Fusion peptidhaltiger Vesikel (PLS) und MHCII-haltiger (ES) sowie HLA-DM-haltiger (DM) Vesikel bindet MHCII sein Peptidantigen, nachdem HLA-DM (DM) dessen CLIP gebunden hat. Dieses Vesikel wird nun an die Zellmembran transferiert und der MHCII-Antigen-Komplex an $CD4^+$ T-Lymphozyten präsentiert. Sie erkennen das exogene Peptidantigen über ihren spezifischen T-Zellrezeptor (TZR) und CD4. (Abkürzungen: APZ = Antigen-präsentierende Zelle, β2-MG = β_2-Mikroglobulin, CLIP = „chain-associated peptide“, DM = HLA-DM, ER = endoplasmatisches Reticulum, ES = MHCII-haltiger Vesikel, GA = Golgi-Apparat, MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex, Pep = Peptidfragmente, PLS = angesäuertes Phagosom, PS = Phagosom, rote Kreise = Peptidfragmente des exogenen Antigens, rotes Stäbchen = exogenes, phagozytiertes Antigen, TAP1/2 = „transpoerter associated with antigen presentation“, TZR = T-Zellrezeptor, zPro = zytoplasmatisches Protein)

Im Falle von Lipidantigenen erfolgt die Antigenpräsentation durch APZ über CD1 an CD1-restringiere T-Lymphozyten [82]. Die Präsentation von Lipiden an spezifische T-Lymphozyten ist insbesondere im Zusammenhang mit solchen Erregern von Interesse, die einen hohen Anteil an lipidhaltigen Antigenen tragen, insbesondere *M.tb.* (Abb.3).

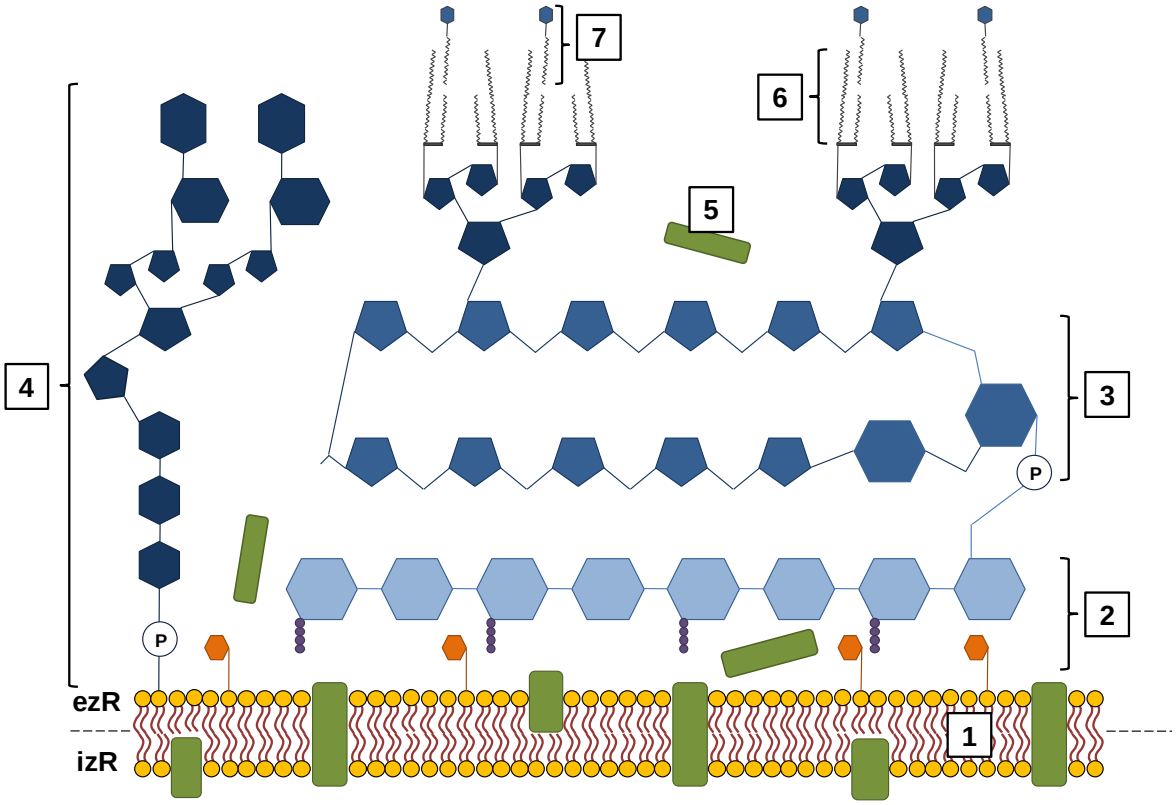


Abbildung 3 Ausschnitt aus der Zellwand von *Mycobacterium tuberculosis* (modifiziert nach Besra und Chatterjee, 1994; Brennan und Nikaido, 1995; Iseman 2000) Die Zellwand besteht aus der Plasmamembran (1), Peptidoglykanen (2), Arabinogalactan (3), ManLAM (4), Proteinen in der Plasmamembran und der Zellwand (5), Mykolsäuren (6) und Glykopeptiden (7). (Abkürzungen: ezR = extrazellulärer Raum, izR = intrazellulärer Raum, ManLAM = Mannose gecaptes Lipoarabinomannan)

Weil *M.tb.* ein sehr lipidreicher Organismus ist, liegt der Fokus im Zusammenhang mit dieser Arbeit auf der CD1-vermittelten Präsentation lipidhaltiger Antigene. CD1-Moleküle können mykobakterielle Membrankomponenten wie beispielsweise Mykolsäuren, Glucose-Monomykolat (GMM) und Lipoarabinomannan (LAM) präsentieren (Abb.4).

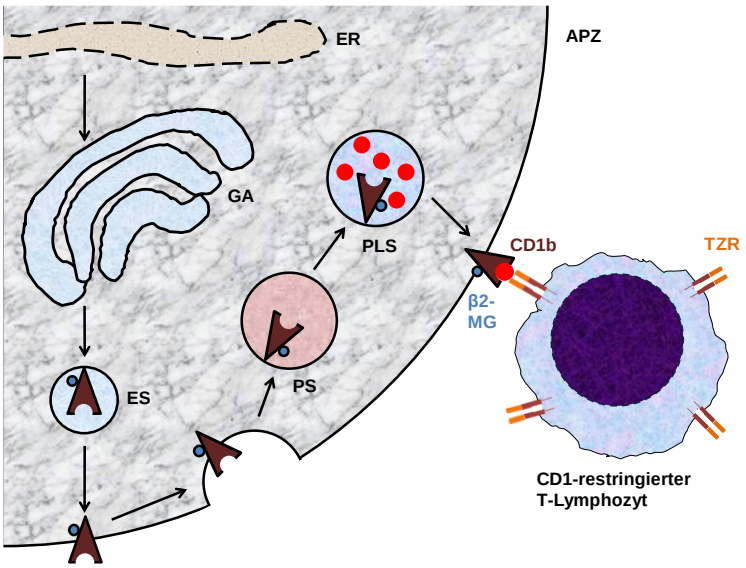


Abbildung 4 CD1-Trafficking am Beispiel von CD1b Vom Ort der Synthese, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), aus nehmen alle CD1-Isoformen außer CD1e den direkten Weg in die Zellmembran. Von dort aus werden sie über Clathrin-gecoatete Einschnürungen (PS) entweder endosomal recycelt, oder über lysosomale Kompartimente (PLS) mit Antigen beladen (rote Kreise). Schließlich erfolgt die erneute Integration der beladenen Moleküle in die Zellmembran. (Abkürzungen: APZ = Antigen-präsentierende Zelle, β2-MG = β_2-Mikroglobulin, ER = endoplasmatisches Reticulum, ES = CD1-haltiger Vesikel, GA = Golgi-Apparat, PLS = angesäuertes Phagosom, PS = Phagosom, rote Kreise = Lipopeptidfragmente eines exogenen Antigens, TZR = T-Zellrezeptor)

CD1-Moleküle sind eine Familie nicht-polymorpher β_2-Mikroglobulin-assoziierter Glykoproteine, die sich v.a. auf B-Zellen und DZ finden. Der Ort der Synthese der CD1-Moleküle ist analog MHCI und MHCII das endoplasmatische Retikulum. Trotz ihrer strukturellen Verwandtschaft zu MHCI-Molekülen, erfüllen sie ähnliche Aufgaben wie MHCII. Insgesamt sind auf dem menschlichen Genom fünf Isoformen kodiert, die sich in CD1a bis CD1e unterteilen und in zwei Gruppen einteilen lassen. Die zur Gruppe 2 gehörende Isoform CD1d und das aufgrund seiner Struktur keiner Gruppe zugewiesene CD1e werden auf vielen verschiedenen Körperzellen exprimiert und sind im Rahmen dieser Arbeit nicht von Interesse. Dagegen werden CD1-Isoformen der Gruppe 1, nämlich CD1a, CD1b und CD1c, auf den o.g. Zellen exprimiert [3]. Im Gegensatz zu MHC-I und MHC-II, die Peptidantigene präsentieren, sind CD1-Moleküle in der Lage, lipidreiche Antigene an Zellen des adaptiven Immunsystems zu präsentieren [10, 37].

Aus dem Gesagten erschließt sich auch die Bedeutung der CD1-Moleküle für die Pathogenese der Tuberkulose und das wachsende Interesse an CD1-restringierter Interaktion zwischen Zellen des Immunsystems.

Für den Menschen spielt v.a. CD1b eine wesentliche Rolle bei der Antigenpräsentation mykobakterieller Lipide. Es trifft im Lysosom mit seinem Lipidantigen zusammen. Um in diesem hydrophilen Milieu überhaupt mit Lipidantigen beladen werden zu können, bedarf es eines Bindegliedes, welches die physikalische Diskrepanz zwischen hydrophobem Lipid und hydrophiler Phase zu überbrücken vermag. Dieses Bindeglied sind Saposine (SAP), die im Rahmen der Degradation und des Transportes von lipophilen Antigenen im lysosomalen Kompartiment von Bedeutung sind. Insbesondere SAP-C spielt eine unentbehrliche Rolle in der Extraktion lipophiler Antigene aus Membrankomponenten und deren Bindung an CD1b. [95]. Ein beachtlicher Evasionsmechanismus von *M.tb.* ist es in diesem Zusammenhang, die CD1-Expression auf infizierten APZ zu vermindern und so die Antigenpräsentation an CD1-restringierte T-Lymphozyten komplett zu unterbinden [87].

CD1-restringierte T-Lymphozyten stellen eine Subpopulation von T-Zellen dar, welche Antigene über Gruppe 1 CD1-Moleküle erkennen [82]. Man nahm lange an, dass CD1-restringierte T-Zell-Klone negativ für CD4 und CD8 sind [3, 62, 81]. Mittlerweile wurde gezeigt, dass auch $CD4^+$ [2, 58] sowie $CD8^+$ T-Lymphozyten [71, 85, 86] Lipidantigene erkennen. Solche T-Zell-Klone, die durch Nicht-Protein-Antigene aktiviert werden, sind wahrscheinlich für eine protektive Immunantwort gegen die Tuberkulose von Bedeutung, weil sie TH1-Zytokine produzieren sowie *M.tb.*-infizierte Zellen lysieren [4]. Im peripheren Blut von Individuen, die schon einmal Kontakt mit *M.tb.* hatten (z.B. PPD^+ Spender), findet man ein Reservoir CD1-restringierter lipidreaktiver T-Lymphozyten [89].

All das rückt CD1-restringierte T-Lymphozyten im Bezug auf das Verständnis der Pathogenese der Tuberkulose zunehmend in den Fokus aktueller Forschungen.

1.4. Fragestellung der Arbeit

Um das Verständnis der Regulation antimikrobieller Peptide bei der Tuberkulose zu vertiefen, wurden Experimente mit CD1-restringierten, lipidspezifischen T-Lymphozyten durchgeführt. Ziel war es, die Regulation und Expression der antimikrobiellen Effektormoleküle Cathelicidin, CathG, TLR-2 und $P2X_7$ in humanen MΦ zu untersuchen.

Die CD1-restringierten T-Lymphozyten sollten zunächst phänotypisch charakterisiert und im Anschluss funktionell untersucht werden. Dabei lag der Fokus auf der Expression und

Regulation von IFNγ und der antimikrobiellen Peptide Perforin und Granulysin nach Aktivierung durch ManLAM.

2. Material und Methoden

2.1. Materialliste

2.1.1. Arbeitsgeräte

Bestrahlungsgerät	ND Nuclear Data Frankfurt
ELISA-Reader	ASYS
FACScalibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Inkubator 6000	Heraeus
Laminair-Werkbank	Heraeus
Lichtmikroskop	Olympus
Light Cycler	Roche
Neubauerzählkammer	Schubert & Weiss
Pipetus akku	Hirschmann
Ultraschallbad T310-H	Roth, Karslruhe
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	Köttermann
Zellkulturinkubator	Heraeus
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

2.1.2. Arbeitsmaterialien

15ml-Kulturflaschen	Becton Dickinson
ELISA-Platten, 96-Well Flachboden	Nunc
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson

Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR-Green I Kit	Roche
Filter zum Sterilfiltrieren	PALL
Gewebekulturplatten, 24-Well	Becton Dickinson
Gewebekulturplatten, 6-Well	Corning
Gewebekulturplatten, 96-Well Rundboden	Nunc
Pipettenspitzen 0,5 – 10µl	Brand
Pipettenspitzen 100 – 1000µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 2 – 200µl	Roth
Quiagen RNeasy Kit	Quiagen
Schraubröhrchen (15ml, 50ml)	Becton Dickinson
Serologische Kunststoffpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Costar

2.1.3. Chemikalien

Albumin	Sigma
Aqua dest.	B. Braun, Petzold GmbH
Buffy Coats	DRK Blutspendedienst BW-Hessen, Ulm
Concanavalin A	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
dNTP	Amersham
ELISA- Strept AB-Komplex	Invitrogen
ELISA-Substrat	Perbio
Ethylendiamintetraacetat	Sigma
Ficoll-Paques Plus	GE Healthcare Bio Sciences

Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich
H_2SO_4	Roth
Hepes	Roth
Humanserum AB	Cambrex
Isopropanol	Roth
$KHCO_3$	Roth
L-Glutamin	PAA
Methanol	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumpyruvat	Roth
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
PBS	PAA
PCR-H_2O	Roche
Penicillin	Biochrom
RPMI 1640	Gibco
Saponin	Sigma
Streptomycin	Sigma
SYBR-Green	Roche
Tris	Roth
Trypanblau	Biochrom AG
Tween 20	Sigma
Vitamin D_3	Biomol

2.1.4. Medien und Puffer

a) Medien:

Zellkulturmedium (CM): RPMI 1640
+ 10mM Hepes
+ 13mM $NaHCO_3$
+ 2mM L-Glutamin
+ 5% hitzeinaktiviertes (30min bei 56°C) oder nicht hitzeinaktiviertes Humanserum
(+ 60µg/ml Pencicillin und 100µg/ml Streptomycin), je nach Verwendungszweck mit oder ohne Zusatz von Antibiotika

T-Zell-Medium: 100ml CM mit Antibiotika
+ 1ml nicht-essenzielle Aminosäuren
+ 1ml ml Na-Pyruvat
+ 5% nicht hitzeinaktiviertes Humanserum

Waschmedium: 400ml PBS
+ 100ml CM
+ 20ml FCS

b) Puffer:

FACS-Puffer: 1000ml PBS
+ 10ml 10% Natriumazid
+ 10ml FCS

Permeabilisierungspuffer: 500ml PBS
+ 10ml FCS
+ 2,5g Saponin
+ 5ml 10% Natriumazid
} sterilfiltriert

ACK-Lysepuffer: 4,15g NH_4Cl
+ 0,5g $KHCO_3$
+ 18,6mg Na_2EDTA
} pH 7,2 – 7,4, sterilfiltriert

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

ELISA-Waschpuffer: 500ml PBS
+ 3g Tris (=50mM)
+ 500mg Albumin (=0,1%)
+ 1ml Tween 20 (=0,2%)

ELISA-Stopplösung (0,18M): 196ml H_2O
+ 3,7ml H_2SO_4

2.1.5. Zytokine, Antikörper und Primer

a) Zytokine

IL-2t6-Überstand	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Ulm
rhu GM-CSF	Berlex
rhu IFNγ	R&D Systems
rhu IL-2	Chiron
rhu IL-4	Strathmann
rhu IL-15	R&D Systems

b) Antikörper

Tabelle 1 FACS-Antikörper

Zielstruktur	Isotyp	Konjugation	Hersteller
CD1b	MausIgG1	FITC	Becton Dickinson
CD3	MausIgG2a	PE	Caltag
CD4	MausIgG2a	FITC	Caltag
CD4	MausIgG2a	biotin	Caltag
CD8	MausIgG2a	PE	Caltag
Granulysin	Kaninchenserum		Alan Kransky, Palo Alto, CA, USA
HLA-DR	MausIgG2a	PerCP	Becton Dickinson
LL-37	Kaninchenserum		Santa Cruz
TZRαβ	MausIgM	PE	Becton Dickinson
TLR2	MausIgG2a	APC	NatuTec
donkey anti rabbit		FITC	Jackson / Dianova
goat anti rabbit		biotin	Jackson / Dianova
Streptavidin		APC	Caltag
Streptavidin		PerCP	BD Pharmigen
Streptavidin		PE	Caltag

Tabelle 2 Sonstige Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-CD1b, neutralisierend	Dianova
anti-human-IFNγ	Endogen
anti-human-IFNγ biotinyliert	Endogen

c) Primer

Tabelle 3 Primer für PCR

Produkt	Primer (-paare)*		Sequenz	Hersteller
LL37	1	LL-37 for	5'-GGA CCC AGA CAC GCC AAA-3'	Thermo scientific
		LL-37 rev	5'-GCA CAC TGT CTC CTT CAC TGT GA-3'	
β-Actin	2	ß-Actin for	5'-GGC CAC GGC TGC TTC-3'	Thermo scientific
		ß-Actin rev	5'-GTT GGC GTA CAG GTC TTT GC-3'	
$P2X_7$	3	P2z for	5'-ATA CAG TTT CCG TCG CCT TG-3'	Thermo scientific
		P2z rev	5'-AAC GGA TCC CGA AGA CTT TT-3'	
CathG	4	Cath.G for	5'-GCC CTG GAT AAG GAC AAC AA-3'	Thermo scientific
		Cath.G rev	5'-TGT GTC CCC GAG AAG AAG AG-3'	
	5	Cath.G for2	5'-GGG GAA CAG ATA CAC TCC GA-3'	
		Cath.G rev2	5'-GTC GTA GGA ACC GAA GAT GC-3'	
	6			
		Cath.G rev3	5'-GGG TCG TAG GAA CCG AAG AT-3'	
IFNγ	7	IFNγ for	5'-AGC TCT GCA TCG TTT TGG GTT-3'	Metabion
		IFNγ rev	5'-GTT CCA TTA TCC GCT ACA TCT GAA-3'	
TLR-2	8	TLR2 for	5'-TGT CTT GTC ACC GCA ATG GTA-3'	Thermo scientific
		TLR2 rev	5'-GCT TGA ACC AGG AAG ACG AT-3'	
Granu	9	Granu for	5'-TGG GCC GTG ACT ACA GGA-3'	Thermo scientific
	10	Granu rev	5'-GGG TCG CAG CAT TGG AAA CAC-3'	
Perf	11	Perf for	5'-CCA CCA GGG CGG CAG AA-3'	Metabion
	12	Perf rev	5'-GAG CAC ATC CCC AAA ATC CAG-3'	

* Konzentration 200µM

2.1.6. Antigene

GMM: Glucosemonomykolat; CSU, Fort Collins, CO, USA

ManLAM: Mannose-gecapptes Lipoarabinomannan; CSU, Fort Collins, CO, USA

M.tb.-Extrakt: Vollextrakt aus *M.tb.*; Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Ulm

Totallipid: lipophile Antigenfraktion aus *M.tb.*; CNRS, Toulouse

2.1.7. Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten CD1-restringierten T-Lymphozyten wurden als lipidreaktive, CD1b-restringierte $CD4^+$, $TZR\alpha\beta^+$ T-Lymphozyten charakterisiert. Sie stammen aus einem ehemals an einer Tuberkulose erkrankten Spender.

Die T-Zell-Klone wurden mittels „limiting dilution“ hergestellt. Die zu klonierenden T-Lymphozyten wurden in T-Zell-Medium + 1µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) + 1:100 IL-2t6-Überstand in einer Ausgangskonzentration von $1x10^6$/ml aufgenommen. In sechs aufeinanderfolgenden Verdünnungsschritten wurden die Zellen sukzessive auf eine Konzentration von 10 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 50µl der letzten Verdünnung wurden pro Well einer 96-Well-Platte zusammen mit $3x10^3$ mit 30Gy bestrahlten frischen, heterologen PBMC („peripheral blood mononuclear cells“, periphere mononukleäre Blutzellen) aus drei unterschiedlichen Blutspenden pipettiert. Die Zellen wurden zwei Wochen bei 37°C unter 5% CO_2-Spannung inkubiert. Im Anschluss wurde der Inhalt jener Wells mit Zellwachstum in eine neue 96-Well-Platte transferiert und in 200µl T-Zell-Medium + 1:100 IL-2t6-Überstand aufgenommen. Nach vierwöchiger Ruhephase wurden die T-Lymphozyten erneut im Verhältnis 2:1 mit bestrahlten PBMC + 1µg/ml PHA + 1:100 IL-2t6-Überstand restimuliert. Je nach pH-Umschlag des Mediums wurde frisches T-Zell-Medium + 1:100 IL-2t6-Überstand zugesetzt.

$CD1^+$ APZ wurden wie folgend beschrieben aus den gewonnenen PBMC generiert.

2.2. Methoden

2.2.1. Generierung, Differenzierung und Kultivierung von Zellen

2.2.1.1. Generierung von peripheren mononukleären Zellen aus Buffy Coats

Als Ausgangszellen für unsere Experimente und zur Generierung von DZ oder MΦ dienten PBMC, zu denen die Lymphozyten (vorwiegend $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten, außerdem B-Lymphozyten und NK-Zellen) und Monozyten gehören.

Die PBMC wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation mithilfe eines hydrophilen Polysaccharides mit einer definierten Dichte von 1,077g/ml (Ficoll-Paque) aus Buffy Coats von Vollblut gesunder Spender gewonnen. Dabei wurde pro 50ml-Schraubröhrchen 15ml auf 37°C vorgewärmtes Ficoll vorgelegt und langsam eine Suspension aus Buffy Coat und PBS darüber geschichtet, sodass keine Durchmischung erfolgte (Abb.5).

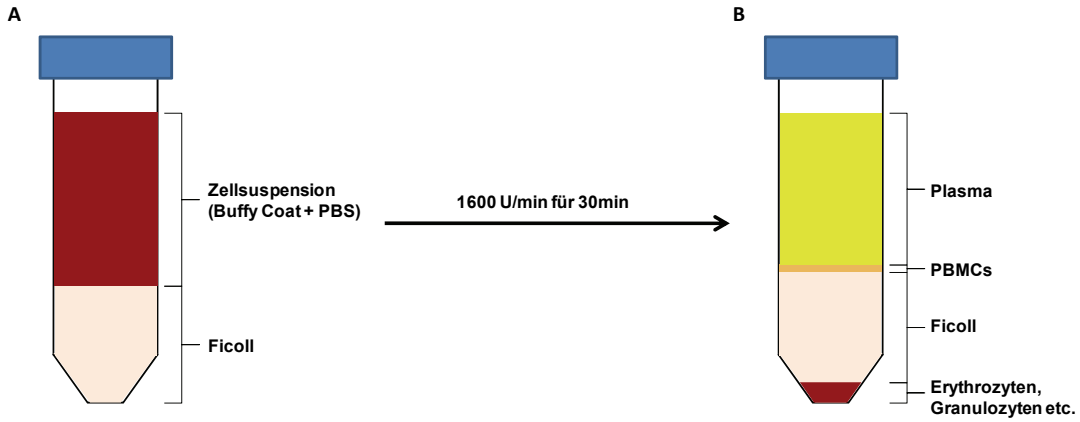


Abbildung 5 Gegenüberstellung zweier 50ml-Schraubröhrchen vor (A) und nach (B) dem ersten Waschschritt Nach der Zentrifugation bei 1600 U/min für 30min ohne Bremse scheiden sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte die Bestandteile aus dem Vollblut ab. (Abkürzungen: PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, PBS = Phosphatpuffer, U/min = Umdrehungen pro Minute)

Die flaumige Schicht aus auf dem Ficoll flottierenden Schollen, bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, wurde mittels serologischer Pipetten abgenommen und durch weitere standardisierte Waschvorgänge mit Waschmedium von den Thrombozyten befreit. Diese Zentrifugationsschritte erfolgten im Wechsel mit dem Absaugen des Überstandes und dem erneuten Resuspendieren des Zellpellets in Waschmedium in der Reihenfolge 1800 U/min für 10min, 1300 U/min für 10min, 1000 U/min für 10min und dreimal 800 U/min für 8min, alle jeweils mit Bremse. Sofern

erforderlich wurde dann eine Erythrozytenlyse mit ACK-Lysepuffer durchgeführt und nochmals mit 800 U/min für 8min gewaschen.

10µl der fertig aufgereinigten PBMC wurden mit 100µl 4% Trypanblau angefärbt, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die übrigen PBMC auf eine Endkonzentration von $100x10^6$ Zellen/ml Medium eingestellt. Bis zur Weiterverwertung wurden die PBMC auf Eis aufbewahrt.

2.2.1.2. Generierung von unreifen dendritischen Zellen und Makrophagen aus PBMC

Die aufgereinigten Zellen wurden entweder direkt in Experimente eingesetzt, oder weiter in $CD1^+$ Antigen-präsentierende Zellen ausdifferenziert. Im Speziellen wurden entweder unreife dendritische Zellen oder Typ2-Makrophagen generiert.

Beiden Vorgehensweisen war gemeinsam, dass zunächst $100x10^6$ der frisch gewonnenen PBMC auf 5ml Medium + 5% hitzeinaktiviertes Humanserum in Zellkulturflaschen überführt wurden. Sie wurden dann bei 37°C und 5% CO_2 im Inkubator für eine Stunde zur Adhärenz gebracht. Anschließend wurden die nicht adhärenten Zellen mitsamt Medium abgenommen und verworfen. Die Zellkulturflaschen wurden zweimal vorsichtig mit PBS gespült, um restliche nicht adhärente Zellen zu entfernen, und anschließend mit 5ml Medium + 5% hitzeinaktiviertem Humanserum versehen. Je nach gewünschter Differenzierung wurden die in den Flaschen befindlichen Zellen nun mit unterschiedlichen Zytokinen in den angegebenen Endkonzentrationen inkubiert (Abb.6).

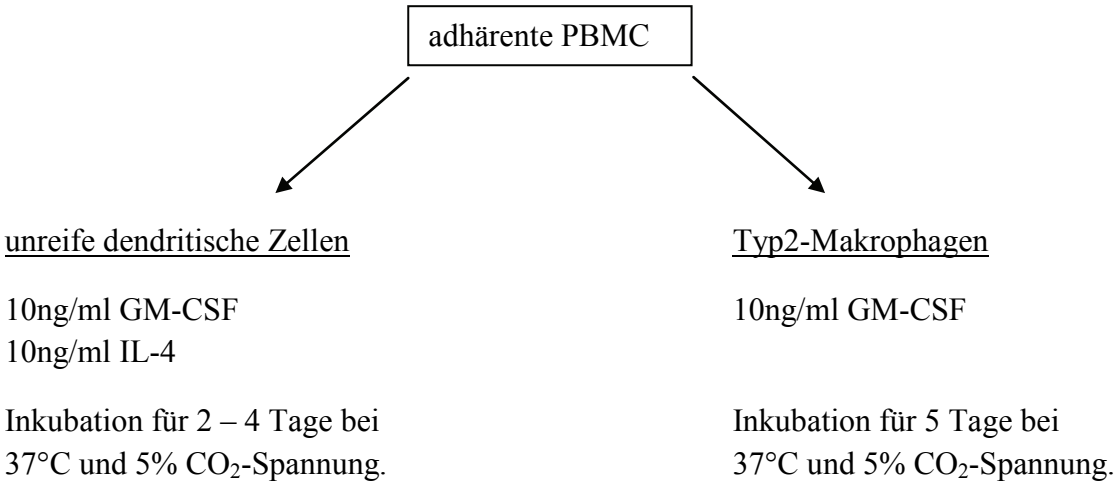


Abbildung 6 Herstellung von Antigen-präsentierenden Zellen aus adhärenten PBMC (Abkürzungen: GM-CSF = Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, IL-4 = Interleukin 4)

Das Ernten der Zellen erfolgte durch Überführung des Mediums in ein 50ml-Schraubröhrchen und einmaliger Spülung mit PBS, um verbliebenes Medium aus der Zellkulturflasche zu entfernen. Die noch adhärenten Zellen wurden jetzt für 10 – 20min mit 1mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) inkubiert. Ethylendiamintetraacetat ist als Tetraanion der Ethylendiamintetraessigsäure ein Chelator, welcher extrazellulär befindliches und für die Adhärenz der Zellen notwendiges Calcium komplexiert und so deren Loslösung vom Boden der Zellkulturflasche bewirkt. Da EDTA auch intrazelluläres Calcium depletiert und so auf Dauer die Zellen schädigt, war die Anwendungszeit stets auf den oben angegebenen Zeitraum beschränkt.

Unter sorgfältigem Resuspendieren wurden die Zellen geerntet, zu den übrigen in dasselbe 50ml-Schraubröhrchen gegeben und gezählt. Das Abzentrifugieren erfolgte bei 1300 U/min für 10min mit Bremse.

2.2.1.3. Kultivierung und Charakterisierung von T-Zell-Klonen

Für die Experimente mit T-Lymphozyten wurden aus einem Depot bereits vorhandener noch uncharakterisierter T-Zell-Klone Klone ausgewählt. Diese wurden bezüglich ihrer Expression von CD4 oder CD8, der Expression von αβ-TZR sowie der intrazellulären Expression von Granulysin und Perforin mittels Durchflusszytometrie und qRT-PCR charakterisiert.

Die Langzeitkultur von T-Zell-Klonen erfordert eine besonders aufwendige Kultur. Dafür wurden nach dem Auftauen $1x10^6$ T-Zellen mit $1x10^6$ mit 30Gy bestrahlten $CD1^+$ MΦ als Feeder-Zellen zusammen auf 2ml T-Zellmedium in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden nun mit beschalltem mykobakteriellem Totallipid in einer Endkonzentration von 10µg/ml stimuliert. Es erfolgte eine mehrmalige lichtmikroskopische Kontrolle zur Beurteilung der Aktivierung anhand morphologischer Kriterien wie Dynamik und Charakteristik der Proliferationsclusterbildung sowie der Viabilität der T-Lymphozyten. Dreitäglich wurde den Ansätzen IL-2t6-Überstand 1:100 beigegeben und bedarfsgerecht bei pH-Umschlag des Mediums verbrauchtes gegen frisches Medium ausgetauscht. Je nach Proliferationsaktivität erfolgte das Splitten der Zellen innerhalb der zweiten Woche sowie wöchentlich das erneute Feedern (Zugabe von $1x10^6$ mit 30Gy bestrahlten MΦ) und Restimulieren des Klons (Abb.7).

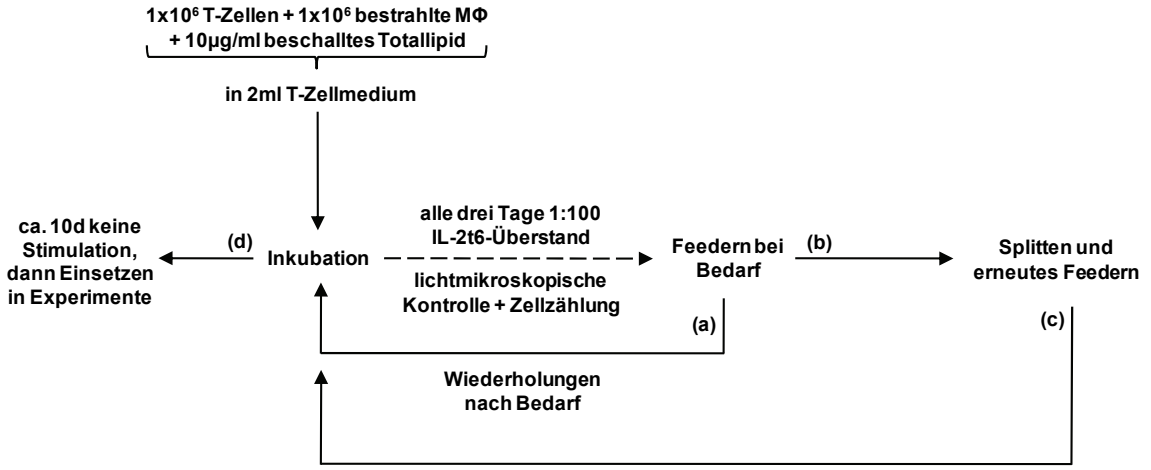


Abbildung 7 Schema Kultivierung von T-Zell-Klonen 1x10^6 T-Zellen werden mit 10µg/ml Totallipid im Verhältnis 1:1 mit CD1$^+$ MΦ inkubiert, die zuvor mit 30Gy Gesamtdosis bestrahlt wurden. Die Zellen werden in spezielles T-Zellmedium aufgenommen. Alle drei Tage erfolgt die Zugabe von IL-2t6-Überstand, um die Proliferation der Zellen zu begünstigen. Bei der lichtmikroskopischen Kontrolle wird auf Kriterien der Proliferation sowie die Morphologie der T-Lymphozyten geachtet. Bei Bedarf, spätestens nach einer Woche, wird mit 1x10^6 mit 30Gy bestrahlten MΦ erneut gefeedert und erneut inkubiert (a). Sind ausreichend Zellen im Well vorhanden, so kann gesplittet werden (b) und nach erneutem Feedern nochmals inkubiert werden (c). Wiederum erfolgt die regelmäßige Zugabe von IL-2t6-Überstand sowie die lichtmikroskopische Kontrolle. Sofern die Zellen in Experimente eingesetzt werden sollten, mussten diese mindestens 14d aufgetaut sein und durften für etwa 7 – 10d nicht mit Antigen restimuliert worden sein. (Abkürzungen: IL = Interleukin, MΦ = Makrophage)

2.2.1.4. Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung von CD1$^+$ Feederzellen oder T-Zell-Klonen wurde Dimethylsulfoxid (DMSO)-haltiges Medium verwendet. DMSO verhindert das Auskristallisieren des wässrigen Zytoplasmas der eingefrorenen Zellen. Weil es zwar unterhalb von 0°C kaum, oberhalb aber sehr wohl toxisch auf Zellen wirkt, wurden alle Schritte zur Vorbereitung und Durchführung des Einfrierens von Zellen mit eisgekühlten Reagenzien und Gefäßen durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von mindestens 5x10^6 Zellen/ml in einer Suspension aus 20% DMSO und 80% fötalem Kälberserum (FCS) aufgenommen und 1ml dieser Suspension in ein 2ml-Einfrierröhrchen gegeben. Dieses wurde mittels eines speziellen, von Ethanol umgebenen Behältnisses über 24 Stunden langsam auf eine Temperatur von -70°C gekühlt. Schließlich wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C bis zum weiteren Gebrauch konserviert.

2.2.1.5. Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen

Weil in den PBMC u.a. auch $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten enthalten sind und deren Reaktion auf mykobakterielle Antigene aus *M.tb.*-Extrakt in PPD^- versus PPD^+ Spendern untersucht werden sollte, wurden $7{,}5x10^5$ PBMC in 500µl CM + 5% nicht hitzeinaktiviertes Humanserum aufgenommen, mit 10µg/ml *M.tb.*-Extrakt stimuliert und für drei Tage unter Standardbedingungen (bei 37°C und 5% CO_2-Spannung) inkubiert (Abb.8).

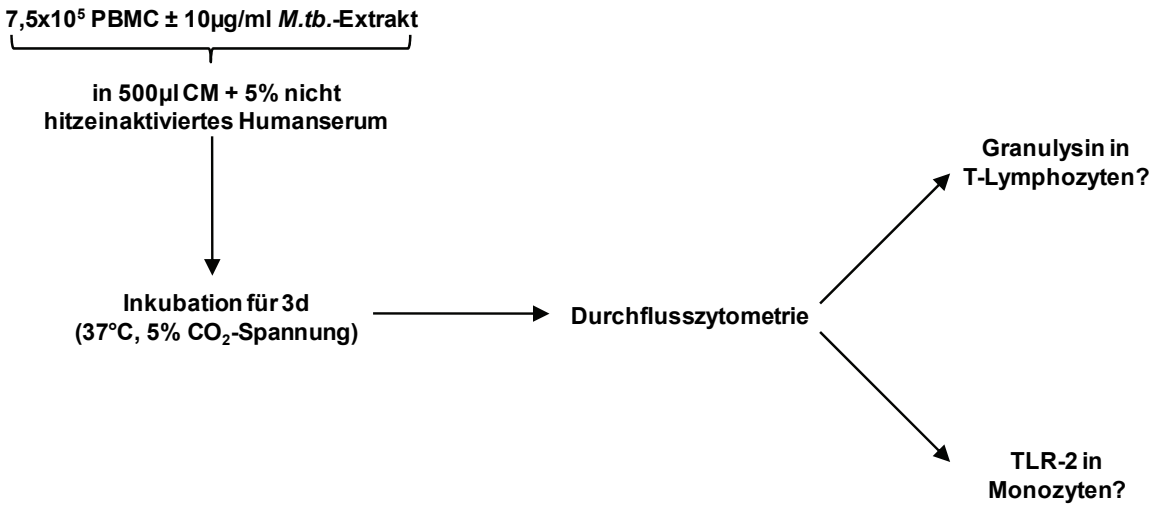


Abbildung 8 Schema der Experimente mit PBMC (Abkürzungen: CM = Zellkulturmedium, *M.tb.*-Extrakt = Antigenextrakt aus *Mycobacterium tuberculosis*, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen)

Anschließend wurde im Vergleich zum unstimulierten Ansatz durchflusszytometrisch auf die Expression von Granulysin in allen und in den $CD4^+$ unter den Lymphozyten untersucht. Zugleich wurde die TLR-2-Expression auf Monozyten unter den PBMC untersucht.

2.2.1.6. Stimulation von CD1-restringierten T-Lymphozyten und MΦ

In einer 24-Well-Platte wurden $2x10^5$ MΦ und $4x10^4$ T-Zellen in ein Endvolumen von 500µl CM + 5% nichthitzeinaktiviertes Humanserum eingesetzt, mit ManLAM (10µg/ml) stimuliert und bei Standardbedingungen für 18h inkubiert. Anschließend wurde die Regulation der im Einleitungsteil genannten Effektormoleküle durchflusszytometrisch oder

mittels qRT-PCR sowohl für die eingesetzten T-Lymphozyten als auch die MΦ gemessen (Abb.9).

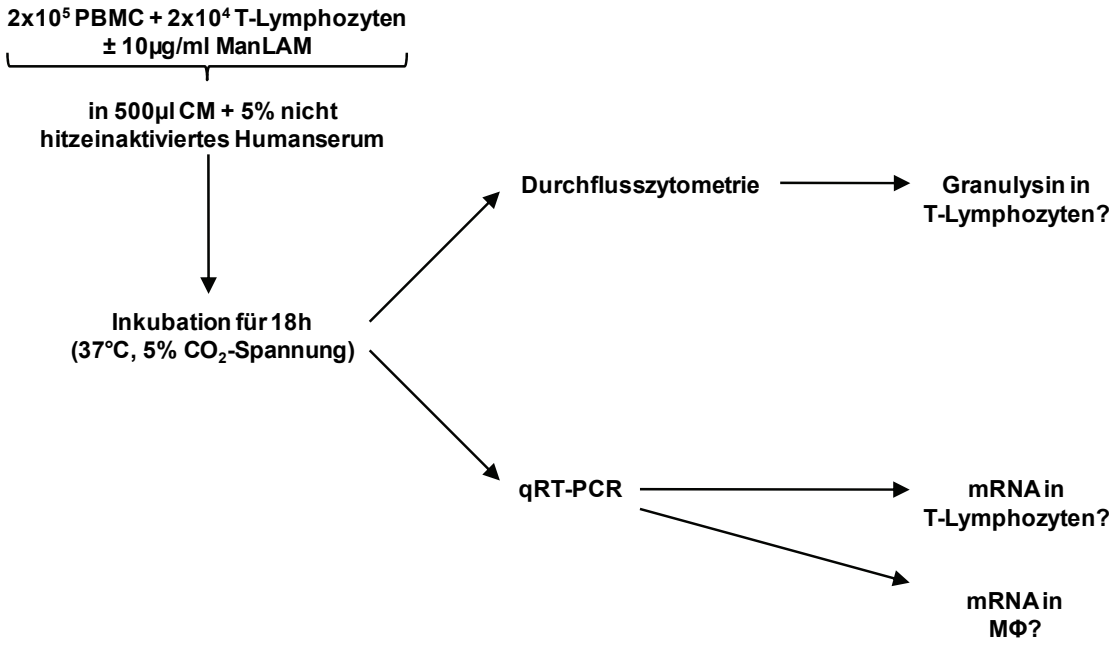


Abbildung 9 Schema der Experimente mit T-Lymphozyten und MΦ (Abkürzungen: CM = Zellkulturmediu, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, mRNA = „messenger RNA“, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, qRT-PCR = quantitative real time Polymerase-Kettenreaktion)

2.2.2. Angewandte Analyse- und Messverfahren

2.2.2.1. Extra- und intrazelluläre Durchflusszytometrie-Färbungen

Um Oberflächenantigene oder intrazelluläre Zielstrukturen wie z.B. Granulysin zu detektieren, wurde die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie („fluorescence activated cell sorting“ = FACS) eingesetzt.

Das Prinzip des FACS beruht darauf, dass suspendierte Zellen durch eine Kapillare gesaugt werden und einzeln einen Laserstrahl passieren. Ein Teil des auf die Zellen treffenden Laserlichtes wird gestreut und von Sensoren im Durchflusszytometer nach Verstärkung durch einen Photomultiplyer detektiert. Die Zellen streuen sowohl vor- als auch seitwärts („forward scatter“ = FSC und „sideward scatter“ = SSC) und können bereits

durch unterschiedliches Streuverhalten beruhend auf ihrer Größe und Binnenstruktur in verschiedene Populationen differenziert werden (Abb.10).

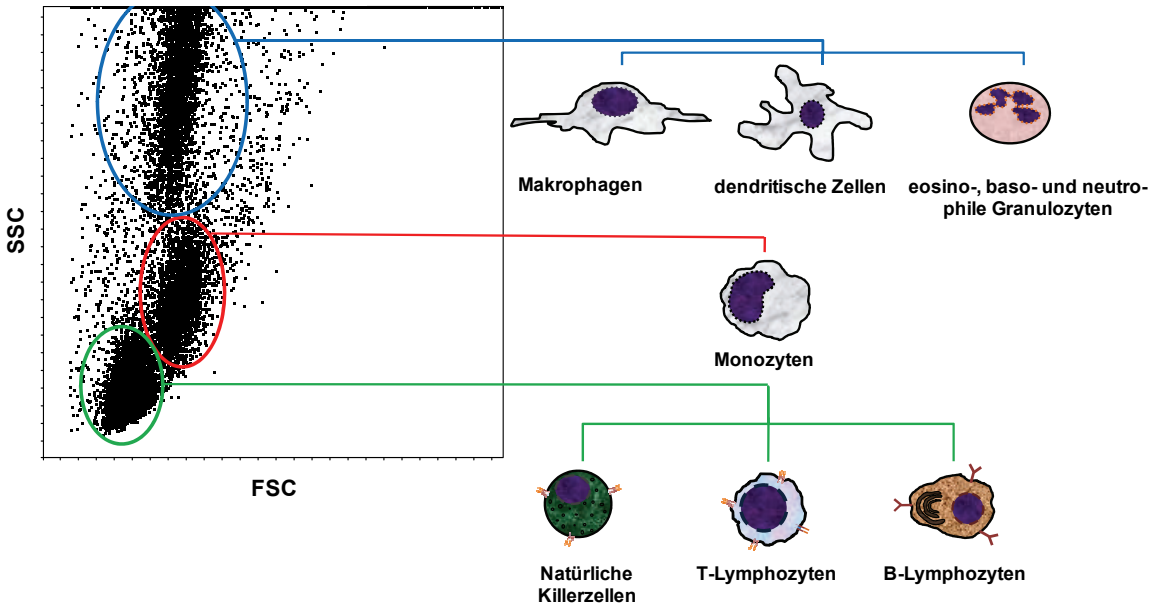


Abbildung 10 Differenzierung von Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie anhand von SSC und FSC Aufgrund des unterschiedlichen Streuverhaltens der aufgenommenen Zellen lassen sich bereits unterschiedliche Populationen erkennen. Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme aus PBMC und Makrophagen zur Veranschaulichung. Unter den im Labor generierten PBMC befanden sich Monozyten (rote Population) und Lymphozyten (grüne Population). (Abkürzungen: FSC = „forward scatter“, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, SSC = „sideward scatter“)

Der FSC ist ein Maß für die flache Beugung des Laserlichtes entlang der Strahlungsrichtung und korreliert mit der Zellgröße. Der SSC ist ein Maß für die Brechung des Lichtes orthogonal zur Ursprungsrichtung des Laserstrahls und korreliert mit der Komplexität einer Zelle (Granularität, Vesikel im Zytoplasma, Struktur des Nukleus etc.). Zusätzlich zur Unterscheidung auf der Basis von FSC und SSC können Oberflächenantigene oder intrazelluläre Zielstrukturen wie beispielsweise antibakterielle Effektormoleküle fluoreszenzmarkiert und damit detektiert werden.

Das Prinzip beruht darauf, dass spezifische mit einem Fluorochrom markierte Antikörper die gewünschte Zielstruktur binden und nach Anregung durch Laserlicht selbst fluoreszierendes Licht emittieren, welches vom Durchflusszytometer detektiert wird. Je nach Fluorochrom wird dieses Licht mit unterschiedlicher Wellenlänge λ emittiert und in verschiedenen Kanälen des Gerätes detektiert.

Oberflächenfärbungen

Zur Färbung verschiedener Oberflächenantigene wurde eine definierte Zahl an Zellen (für PBMC $7{,}5x10^5$, für T-Zell-Klone $2x10^5$) in ein FACS-Röhrchen pipettiert und mit 2ml FACS-Puffer bei 1300 U/min für 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100µl FACS-Puffer resuspendiert und mit dem gewünschten Oberflächenantikörper für 30min bei 4°C inkubiert.

Sofern es sich um einen direkt mit einem Fluorochrom konjugierten Erstantikörper handelte, wurde danach erneut gewaschen, in 300µl FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen am Durchflusszytometer aufgenommen.

Bei biotinyliertem Erstantikörper war die zusätzliche Zugabe von Streptavidin konjugiert mit einem Fluorochrom nötig. Dazu wurden Zellen mit dem biotinylierten Erstantikörper markiert und nach einem Waschschritt mit Streptavidin-Fluorochrom für weitere 30min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ein letztes Mal gewaschen, das Pellet in 300µl FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer aufgenommen.

Für diese Arbeit wurde auf Oberflächen CD1, CD3, CD4, CD8, TZRαβ, MHCII und TLR2 gefärbt. Zur Kontrolle wurden die jeweils zugehörigen Isotypen MausIgG1, MausIgG2a und MausIgM verwendet (s. auch Tab.1).

Intrazelluläre FACS-Färbungen

Um intrazelluläre Strukturen zu markieren, ist es notwendig, die Zellen zu permeabilisieren. Die Permeabilisierung erfolgt durch Saponin, einem starken Detergens aus höheren Pflanzen (im hiesigen Labor aus der Rinde der *Quillaja saponaria*), Seewalzen oder marinen Kleinstlebewesen. Damit die Zellen dadurch nicht zerstört werden, müssen diese zuvor fixiert werden.

Die Fixierung erfolgte für 20min mit 4% Paraformaldehyd (PFA), wonach die Zellen mit 2ml Permeabilisierungspuffer bei 1300 U/min für 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde nun für 30min bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit 1ml Permeabilisierungspuffer, danach die Inkubation für 30min bei 4°C mit dem Zweitantikörper (Esel-anti-Kaninchen^{FITC} oder Esel-anti-Kaninchen^{biotin}).

Sofern der Zweitantikörper direkt Fluorochrom-konjugiert war, wurde ein letztes Mal gewaschen, das Pellet in 300µl FACS-Puffer aufgenommen und die Suspension am Durchflusszytometer aufgenommen.

Bei Verwendung eines biotinylierten Zweitantikörpers wurden die Zellen analog zu obigem Vorgehen in 100µl Permeabilisierungspuffer mit Fluorochrom-konjugiertem Streptavidin für 30min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte der letzte Waschschritt, das Resuspendieren des Pellets in 300µl FACS-Puffer sowie die Aufnahme am Durchflusszytometer.

Analyse mittels Cell Quest Software

Es wurden jeweils mindestens $2x10^4$ Zellen pro Röhrchen am Durchflusszytometer aufgenommen. Aus diesen wurde die gewünschte Population mit einem Gate definiert und entsprechend der Fragestellung genauer untersucht. Dazu wurde entweder der prozentuale Anteil an für ein phänotypisches Merkmal positiven Zellen unter ihrer Gesamtpopulation erfasst, oder die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bzgl. des gewünschten Merkmals herangezogen.

2.2.2.2. Präparation und Aufreinigung von mRNA mit DNAse-Verdau und reverser Transkription

Der Umgang mit RNA erfordert ein hohes Maß an Sorgfalt und muss unter sterilen Kautelen erfolgen. Der Grund dafür ist, dass RNA-Moleküle wesentlich weniger stabil sind als beispielsweise DNA und dass sie rasch durch ubiquitäre RNAsen abgebaut werden. Weil alle Organismen RNAsen bilden und sie sich auch in menschlichem Schweiß und somit an den Händen befinden, wurden während des ganzen Aufreinigungsprozesses Einmalhandschuhe getragen, die die Kontamination und die Degradation der wertvollen Proben durch RNAsen verhindern sollten.

Das Aufreinigen von mRNA selbst erfolgte mittels RNeasy Mini Kit. Es wurden zunächst die Zellen mit dem im Kit enthaltenen Lysepuffer lysiert und anschließend das Lysat mit einem Volumenanteil 70% Ethanol gemischt. Das Volumen des Lysates und des Ethanols betrug jeweils 350µl. Das Gemisch wurde auf die RNA-Isolationssäule des 2ml-Sammelröhrchens überführt und 15sek bei 14000 U/min zentrifugiert. Die im

Sammelröhrchen befindliche Flüssigkeit wurde verworfen, weil sich die gewünschte RNA nach diesem Schritt in der Isolationssäule befindet, welche RNA spezifisch bindet. Um die Reinheit der RNA zu erhöhen wurde die Säule mit 700µl RW1-Puffer für 15sek bei 14000 U/min sowie mit 500µl RPE-Puffer für 15sek bei 14000 U/min gewaschen. Die nach den Zentrifugationsschritten im Sammelröhrchen befindliche Flüssigkeit wurde jeweils verworfen. Die RNA in der Säule wurde nun für 2min bei 14000 U/min zentrifugiert, um noch Restmengen an Puffer zu entfernen. Nun wurde die RNA-Isolationssäule auf ein neues 2ml-Sammelröhrchen aufgesetzt und die RNA mit 30µl RNAse freiem Wasser durch Zentrifugation für 1min bei 14000 U/min eluiert. Alle Schritte zur Isolierung der RNA erfolgten aufgrund der geringen Stabilität von RNA auf Eis.

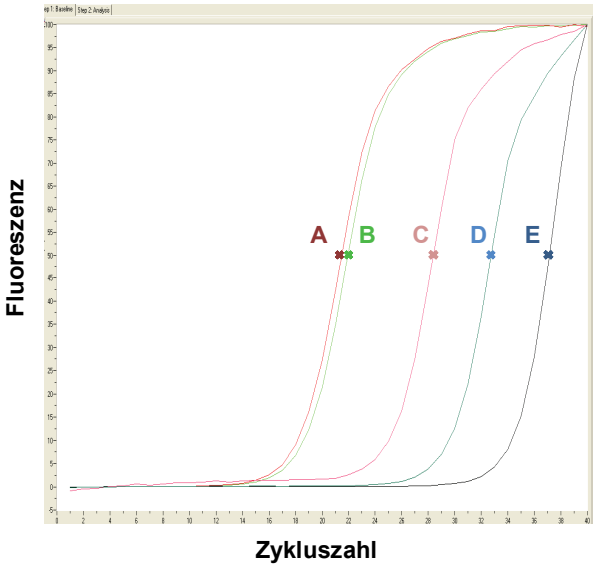
Die mRNA wurde anschließend einem DNAse-Verdau unterzogen. Dazu wurden 30µl RNA-Eluat 9µl 5xRT-Puffer sowie 1µl DNAse zugegeben. Nun wurde 30min bei 37°C im Thermocycler inkubiert, um der DNAse optimale Katalysebedingungen zu schaffen. Zur Denaturierung der DNAse schloss sich eine Inkubation bei 65°C für 10min im Thermocycler an. Das Volumen der DNA-freien mRNA-Präparation betrug am Ende 40µl.

Die mRNA-Probe wurde mit 2µl Oligo-dT-Primern versetzt und zum Annealing für 10min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden 2µl 20mM dNTPs sowie von 1µl H minus Reverse Transkriptase (RTase) zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte für 50min bei 42°C, die anschließende Denaturierung der RTase bei 70°C über 10min. Die auf diese Weise gewonnene cDNA wurde für die qRT-PCR mittels Light Cycler weiter verwendet.

2.2.2.3. Quantitative real time PCR zur Detektion von cDNA

Das Verfahren der quantitativen real time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) dient der quantitativen Bestimmung von cDNA. Dabei wird wie bei der Polymerase-Kettenreaktion die DNA amplifiziert, allerdings zusätzlich simultan anhand einer Fluoreszenzmessung quantifiziert. Die Zunahme der Fluoreszenz ist proportional zu der Menge an Amplifikationsprodukten. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR-Green verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit DNA interkaliert. Um eine möglichst fehlerfreie Quantifizierung zu erreichen, werden bei der qRT-PCR die Fluoreszenzsignale der Amplifikationsprodukte während der exponentiellen Phase der Kettenreaktion, also am

Ende der DNA-Elongation, registriert und ausgewertet. Zu diesem Zeitpunkt liegt ein Reaktionsäquilibrium zwischen allen Reaktanden und somit optimale Reaktionsbedingungen vor. Auf diese Weise nimmt die mit der Menge an zu untersuchender Target-DNA direkt korrelierende Fluoreszenz nach jedem weiteren Zyklus zu. Pro Zyklus erfolgt immer eine Verdoppelung der DNA. Weil zwischen den spezifischen DNA-Produkten und unspezifischen Primerdimeren qualitativ nicht unterschieden werden kann, wird am Ende jeder Analyse eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Aufgrund der spezifischen Schmelztemperatur des gewünschten DNA-Fragmentes kann beurteilt werden, ob die qRT-PCR erfolgreich die Target-DNA amplifiziert hatte. Man macht sich dabei zunutze, dass unspezifische Primerdimere eine wesentlich geringere Stabilität und somit einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen als die Doppelstrang-DNA spezifischer PCR-Produkte. Dadurch wird anhand der Schmelztemperatur zwischen den entstandenen Amplifikationsprodukten diskriminiert. Je höher der Gipfel einer solchen Schmelzkurve liegt, desto mehr Produkt ist während der qRT-PCR entstanden. Zur Quantifizierung der entstandenen DNA wurde ein Rechenmodell unter Zuhilfenahme des sogenannten „crossing point“-Werts (Cp) verwendet (Abb.11).



Crossing-Points:

A = β-Aktin stimuliert;	**Cp = 18.00**
B = β-Aktin unstimuliert;	**Cp = 18.54**
C = TLR-2 stimuliert;	**Cp = 25.01**
D = TLR-2 unstimuliert;	**Cp = 29.42**
E = Wasserkontrolle;	**Cp > 36.00**

Abbildung 11 Beispiel PCR-Kurven mit dazugehörigen Crossing-Points Auf der Ordinate dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz, auf der Abszisse die Zykluszzahl. (Abkürzungen: Cp = „crossing point“)

Der „crossing point“ beschreibt das Maximum der zweiten Ableitung einer Exponentialfunktion und gibt denjenigen Zyklus an, an dem die gemessene Fluoreszenz sich erstmalig signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Um die Menge an cDNA zweier Moleküle miteinander zu vergleichen, kam die folgende Formel zum Einsatz:

$$\frac{2^{(Cp\ unstimuliert\ -\ Cp\ stimuliert)\ untersuchtes\ Molekül}}{2^{(Cp\ unstimuliert\ -\ Cp\ stimuliert)\ \beta\text{-}Aktinkontrolle}}$$

Als Housekeeping-Gen, d.h. zur Quantifizierung der in den Proben befindlichen Menge an cDNA, wurde β-Aktin verwendet. Es ist ein ubiquitär in eukaryonten Zellen vorkommendes Strukturprotein, dessen Expression in den untersuchten Zellpopulationen nicht reguliert wird (Abb.10 Cp A und Cp B). Auf diese Weise kann entsprechend der verwendeten Formel die Menge der cDNA des untersuchten Moleküls ins Verhältnis zu der Menge an β-Aktin-cDNA als Bezugspunkt gesetzt werden.

Die Sequenz der verwendeten Primer für β-Aktin, LL-37, CathG, TLR-2, $P2X_7$, Perforin, Granulysin sowie IFNγ sind in Tab.3 aufgeführt. Pro Reaktionskapillare betrugen die verwendeten Volumina 11µl PCR-H_2O, 2µl des gewünschten Primers, 4µl Roche-Mastermix (im Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR-Green I Kit enthalten) sowie 3µl cDNA der zu untersuchenden Probe bzw. 3µl DNA-freies Wasser als Kontrolle.

2.2.2.4. IFNγ-ELISA zur Detektion von Zytokinen im Überstand

Zur Detektion von IFNγ im Überstand, einem von stimulierten T-Lymphozyten ausgeschütteten Zytokin, diente der „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA).

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf der enzymatischen Umsetzung eines fluorochromen Substrates beruht (Abb.12).

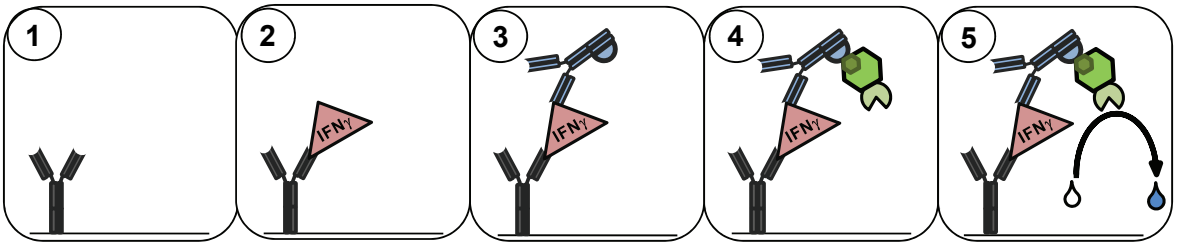


Abbildung 12 Schema des IFNγ-ELISA 1.) Der IFNγ Capture Antibody (grau) bindet im Well (schwarze Linie). 2.) Er bindet nach Zugabe der Probe spezifisch an das in der Probe enthaltene IFNγ (rotes Dreieck). 3.) Ein nun zugegebener biotinylierter anti-IFNγ-Antikörper (blau) bindet ebenfalls spezifisch an gecapturtes IFNγ im Probevolumen. 4.) An diesen bindet wiederum ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex (grün). 5.) Gibt man nun ein Substrat (weißer Tropfen) für diesen Komplex zu, so setzt dieser das Substrat mit der Folge eines Farbumschlags um (blauer Tropfen). Die optische Dichte lässt sich photometrisch ermitteln und korreliert mit der IFNγ-Konzentration. (Abkürzungen: IFNγ = gamma-Interferon)

Weil der für diese Arbeit verwendete ELISA IFNγ zwischen zwei Antikörpern einschließt, bezeichnet man diese Art des ELISA als „Sandwich-ELISA“. Die beiden verwendeten IFNγ-spezifischen Antikörper („coating“- und „detection“-Antikörper) binden an unterschiedliche Epitope des Zytokins, sodass keine Kompetition um die Bindungsstellen entsteht.

„Coating“ (Abb.11.1):

Die ELISA-Platte, eine speziell beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte, wurde über Nacht mit 1µg/ml des Capture-Antikörpers, der in dieser Zeit an die Platte bindet, und in einem Volumen von 100µl pro Well bei Raumtemperatur inkubiert („gecoatet“).

Probenzugabe (Abb.11.2):

Am folgenden Tag wurde die Platte ausgeschüttelt und für eine Stunde mit 100µl Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert, um anschließend dreimal mit 200µl Waschpuffer gründlich gewaschen zu werden. Nun wurde eine Standardreihe mit bekannten absteigenden Konzentrationen an IFNγ angefangen mit 4000pg als Referenzreihe pipettiert sowie der aus den Experimenten gewonnene Überstand in weiteren Reihen auf die Platte gegeben. Die Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Volumina betrugen jeweils 50µl pro Well.

Zweitantikörperzugabe (Abb.11.3):

Zu den im Well befindlichen 50µl Probevolumen wurden nach der Inkubationszeit 50µl eines biotinylierten Antikörpers in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml zugegeben.

Wiederum wurde eine Stunde wie zuvor inkubiert. Die Biotinylierung des zweiten Antikörpers dient als Bindungsstelle eines Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplexes, der am Ende des ELISA durch seine enzymatische Aktivität den Farbumschlag durch Umsetzung des zugegebenen Substrats bewirkt.

Zugabe des Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplexes (Abb.11.4):

Während der Inkubationszeit wurde dieser Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex vorbereitet und zeitlich parallel auf Eis inkubiert. Die Platte wurde nun erneut dreimal mit 200µl Waschpuffer gewaschen und anschließend 100µl einer 1:100-Verdünnung des Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplexes zugegeben, der für 20min bei Raumtemperatur in den Wells inkubiert wurde.

Substratzugabe (Abb.11.5):

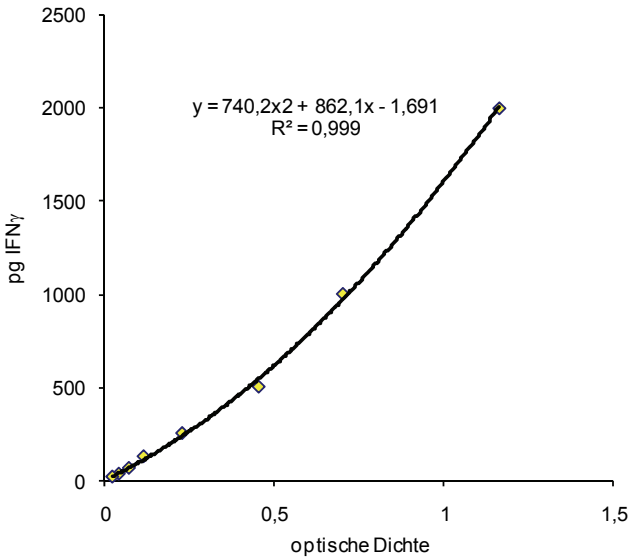
Jetzt wurden 50µl Substrat zugegeben und im minütlichen Takt die Blaufärbung des Well-Inhaltes nachvollzogen. Entsprechend der Entwicklung des Farbumschlages in der Standardreihe wurde mit 50µl 0,18M H_2SO_4 abgestoppt. Die blaue Färbung schlug um in eine gelbe, für die am ELISA-Reader eine höhere Sensitivität besteht.

Messung der optischen Dichte am ELISA-Reader:

Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei λ=450nm und 620nm-Filter. Jeder Zytokinkonzentration der Standardreihe mit absteigenden bekannten Konzentrationen, die als Referenz diente, wurde nach der photometrischen Messung der entsprechende OD-Wert zugewiesen.

Trägt man die sich so ergebenden Punkte in einem Koordinatenkreuz auf, so lässt sich für den linearen Bereich der Messung eine Trendlinie generieren, deren Geradengleichung die rechnerische Zuordnung jedes beliebigen in den untersuchten Proben gemessenen OD-Wertes zu der entsprechenden in den jeweiligen Proben befindlichen Konzentration an IFNγ erlaubt. Die Sensitivität des ELISA ist die letzte sicher messbare Konzentration im linearen Bereich und betrug bei allen durchgeführten ELISAs stets mindestens 62,5pg.

Im Folgenden ist zur Erläuterung exemplarisch ein solcher Graph mit der dazugehörigen Wertetabelle und Erläuterungen dargestellt (Abb.13).



Optische Dichte	pg IFNγ Standardreihe
1,584	4000
1,164	2000
0,703	1000
0,455	500
0,23	250
0,116	125
0,073	62,5
0,043	31,25
0,024	15,625
0,018	7,8125
0,012	3,90625

Abbildung 13 Graph einer IFNγ-Standardreihe (links) mit zugehöriger Wertetabelle (rechts) Im links gezeigten Graphen Trendlinie und dazugehörige Geradengleichung, wobei R^2 für den Determinationskoeffizienten steht, der Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. 1 repräsentiert einen perfekten linearen Zusammenhang. Rechts die dazugehörige Wertetabelle. Gelb unterlegt ist der lineare Bereich des ELISA, aus dem sich die Punkte für die Generierung der Trendlinie ergeben, die zur Berechnung der in den untersuchten Proben befindlichen Menge an IFNγ herangezogen werden kann. Die Sensitivität, also die letzte noch korrekt erkannte sich im linearen Funktionsbereich befindliche Konzentration, beträgt im gezeigten Beispiel 15,6pg. (Abkürzungen: IFNγ = gamma-Interferon)

2.2.2.5. Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse erhobener Daten wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Die statistische Signifikanz der gewonnenen Daten wurde mittels des „Student's t-Test" überprüft. Dabei wurde ein Konfidenzintervall von 95% angenommen, sodass alle Werte für $p<0,05$ als signifikant betrachtet wurden.

Bis auf als repräsentativ gekennzeichnete Rohdaten sind die gezeigten Daten als arithmetisches Mittel angegeben. Als Fehlerindikator wurde die Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experimentes herangezogen (SEM).

3. Ergebnisse

Um die Regulation antimikrobieller Effektormechanismen bei der Tuberkulose zu untersuchen, wurden zunächst Zellen der angeborenen Immunabwehr (MΦ und Monozyten) untersucht. Im Anschluss wurde die Regulation antimikrobieller Peptide durch das erworbene Immunsystem (T-Zell-Klone) betrachtet.

Seitens der angeborenen Immunabwehr wurden unter der Vorstellung, dass $P2X_7$ und TLR-2 in MΦ einen antimykobakteriellen Effektorweg induzieren, die mRNA-Expression mittels qRT-PCR untersucht. Die Expression von TLR-2 wurde zusätzlich in primären humanen Monozyten auf Proteinebene gemessen (Abb. 14).

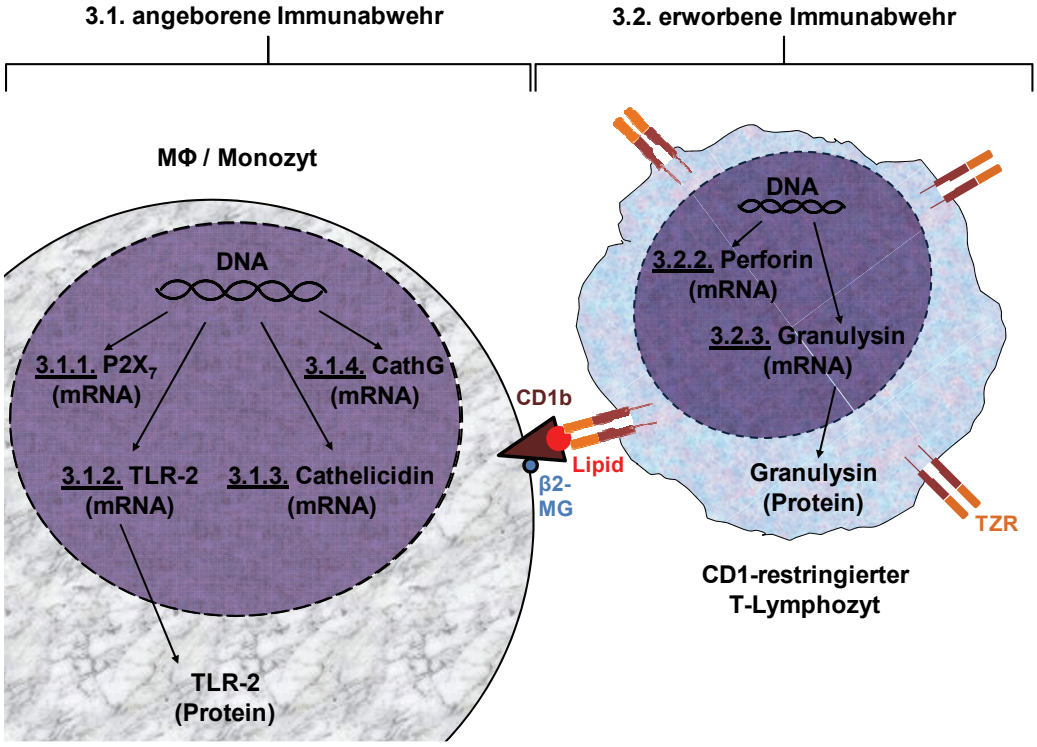


Abbildung 14 Übersicht über die untersuchten antimikrobiellen Effektormechanismen Gezeigt sind alle untersuchten Zielmoleküle inklusive der untersuchten Ebene der Regulation (in Klammern). Ebenfalls angegeben sind die Nummerierungen der jeweiligen Kapitel, in denen die gefundenen Ergebnisse dargestellt werden. (Abkürzungen: β2-MG = β_2-Mikroglobulin, CathG = Cathepsin G, CD = „cluster of differentiation“, MΦ = Makrophage, mRNA = „messenger RNA“, $P2X_7$ = Purinozeptor $P2X_7$, TLR-2 = Toll-like Rezeptor 2, TZR = T-Zell-Rezeptor)

Seitens der erworbenen Immunität wurden zunächst T-Zell-Klone charakterisiert und die Expression von IFNγ, Perforin und Granulysin auf der mRNA- und der Proteinebene untersucht. Die Expression von Granulysin wurde zusätzlich in primären humanen T-Lymphozyten bestimmt.

Für alle Experimente zur Regulation antimikrobieller Effektormechanismen in MΦ oder T-Zell-Klonen wurde das folgende Schema verwandt (Abb.15).

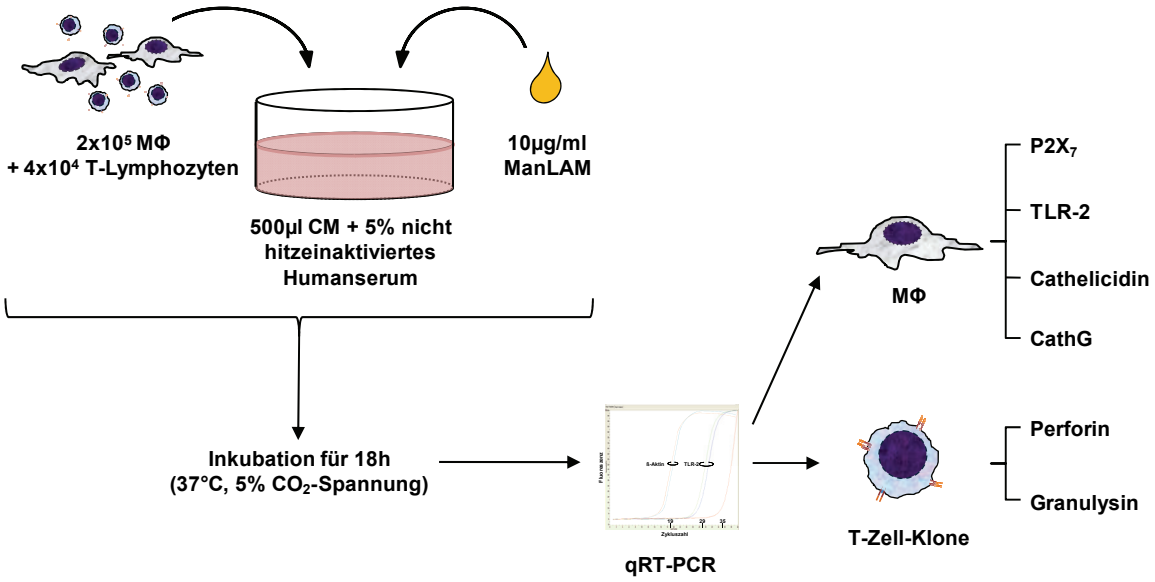


Abbildung 15 Schema Untersuchung von MΦ und T-Zell-Klonen (Abkürzungen: CathG = Cathepsin G, CM = Zellkulturmedium, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, $P2X_7$ = Purinozeptor $P2X_7$, qRT-PCR = quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion, TLR-2 = Toll-like Rezeptor 2)

3.1. Regulation von antimikrobiellen Peptiden in Zellen des angeborenen Immunsystems

3.1.1. Regulation des Purinozeptors $P2X_7$

Zuerst wurde der Purinozeptor $P2X_7$ untersucht, weil er den Anfang einer Kaskade zur Abwehr von *M.tb.* bildet. Es wurde die Hypothese geprüft, ob $P2X_7$ in MΦ durch mykobakterielle Lipidantigene reguliert wird.

Dazu wurden MΦ und lipidreaktive T-Lymphozyten mit dem mykobakteriellen Lipidantigen ManLAM (10µg/ml) für 18h unter Standardbedingungen inkubiert. Als Negativkontrolle diente CM ohne Antigen. Die mRNA der MΦ wurde extrahiert und quantitativ analysiert.

In allen sechs Experimenten nahm die mRNA-Menge für $P2X_7$ zu (Abb.16).

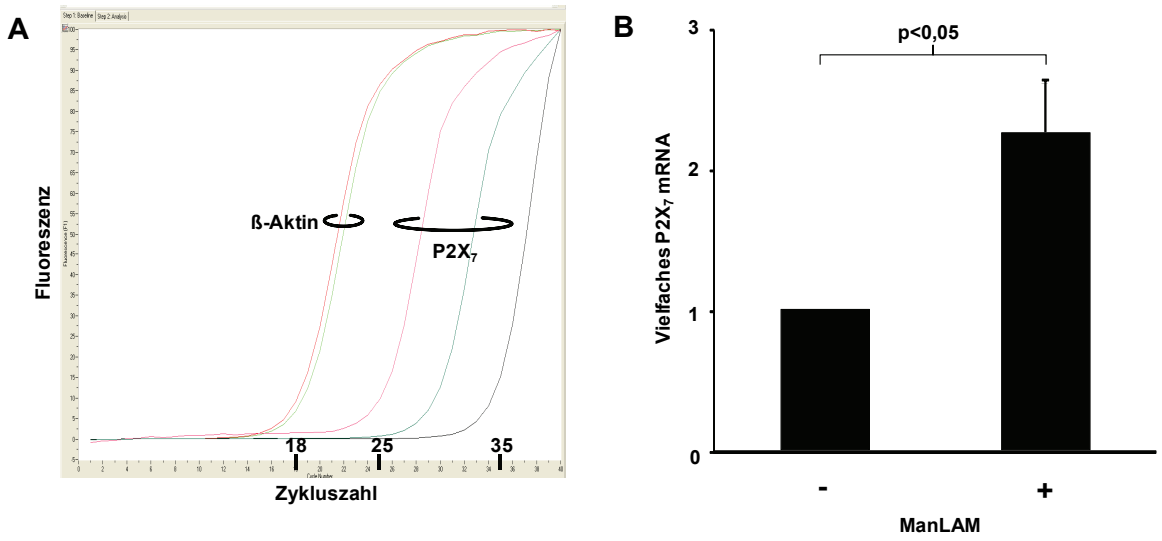


Abbildung 16 Regulation von $P2X_7$ auf mRNA-Ebene Nach der Stimulation von MΦ und T-Zell-Klonen mit ManLAM wurden die Zellen lysiert und die $P2X_7$-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels qRT-PCR gemessen. Dazu wurden die Cp-Werte nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle bestimmt. (A) Repräsentatives qRT-PCR-Ergebnis eines Experimentes aus sechs; Ansatz mit CM ohne ManLAM versus mit ManLAM jeweils mit β-Aktinkontrolle; H_2O-Kontrolle ca. 35,00 Zyklen. (B) Aus den in sechs Experimenten gemessenen Cp-Werten errechnete sich die vielfache Expression der mRNA von $P2X_7$ in MΦ, angegeben als Mittelwert ± SEM. Farben in (A): Mintgrün = β-Aktin unstimuliert, orangerot = β-Aktin stimuliert, hellblau = $P2X_7$ unstimuliert, rosa = $P2X_7$ stimuliert, graublau = H_2O-Kontrolle. (Abkürzungen: Cp = „crossing point“, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, mRNA = „messenger RNA“, $P2X_7$ = Purinozeptor $P2X_7$, qRT-PCR = quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments).

Die Stimulation mit ManLAM führte im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer signifikanten Hochregulation der $P2X_7$-mRNA um den Faktor 2,3 ± 0,37 (p = 0,01).

3.1.2. Regulation von Toll-like Rezeptor 2

Die Stimulation von TLR-2 induziert Vitamin-D-abhängig das antimikrobielle Peptid Cathelicidin. Wir wollten daher untersuchen, ob die TLR-2-mRNA reguliert wird.

In dem gleichen Versuchsaufbau wie für $P2X_7$ (Abb.15) wurde auch für TLR-2-mRNA eine Hochregulation gezeigt (Abb.17).

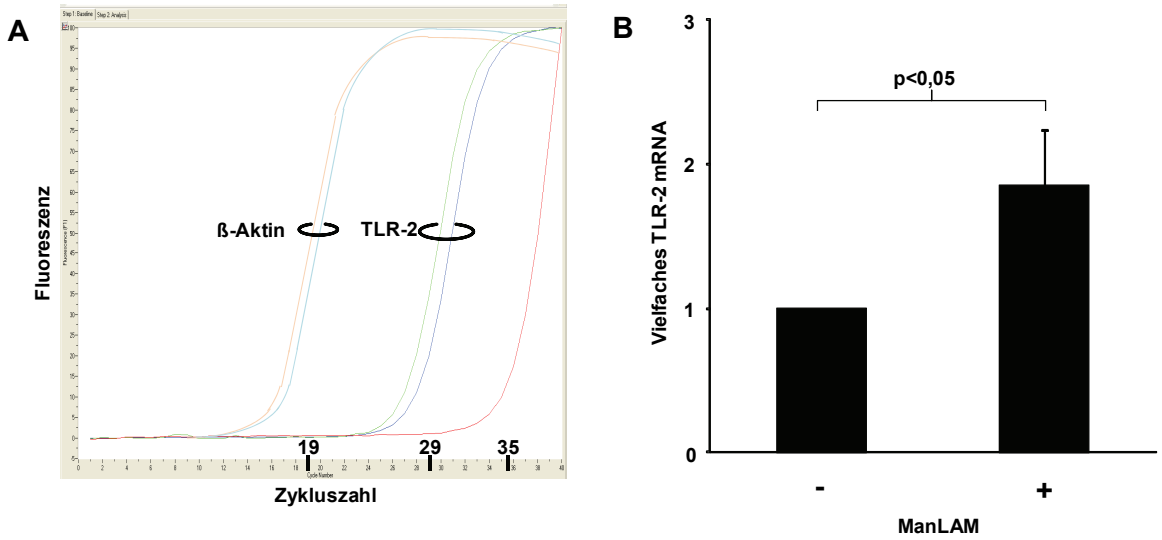


Abbildung 17 Regulation von TLR-2 auf mRNA-Ebene Nach der Stimulation von MΦ und T-Zell-Klonen mit ManLAM wurden die Zellen lysiert und die TLR-2-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels qRT-PCR gemessen. Dazu wurden die Cp-Werte nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle bestimmt. (A) Repräsentatives qRT-PCR-Ergebnis eines Experimentes aus sechs; Ansatz mit CM ohne ManLAM versus mit ManLAM jeweils mit β-Aktinkontrolle; H_2O-Kontrolle ca. 35,00 Zyklen. (B) Aus den in sechs Experimenten gemessenen Cp-Werten errechnete sich die vielfache Expression der mRNA von TLR-2 in MΦ, angegeben als Mittelwert ± SEM. Farben in (A): Hellblau = β-Aktin unstimuliert, rosa = β-Aktin stimuliert, royalblau = TLR-2 unstimuliert, mintgrün = TLR-2 stimuliert, rot = H_2O-Kontrolle. (Abkürzungen: Cp = „crossing point“, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, mRNA = „messenger RNA“, qRT-PCR = quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments, TLR-2 = Toll-like Rezeptor 2).

Insgesamt zeigte sich in fünf von sechs Proben eine Hochregulation der TLR-2-mRNA nach Stimulation mit ManLAM. Im Mittel nahm die mRNA-Menge um den Faktor 2,0 ± 0,38 (p = 0,04) zu.

Es war zu erwarten, dass die Hochregulation von TLR-2-mRNA auch zu einer Hochregulation des Rezeptors führt. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression von TLR-2 auf humanen Monozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Die Monozyten wurden aus frischen PBMC sowohl PPD^- als auch PPD^+ Spender isoliert. Nach Stimulation mit *M.tb.*-Extrakt als Quelle für Lipidantigene wurde die TLR-2-Expression durchflusszytometrisch untersucht (Abb.18).

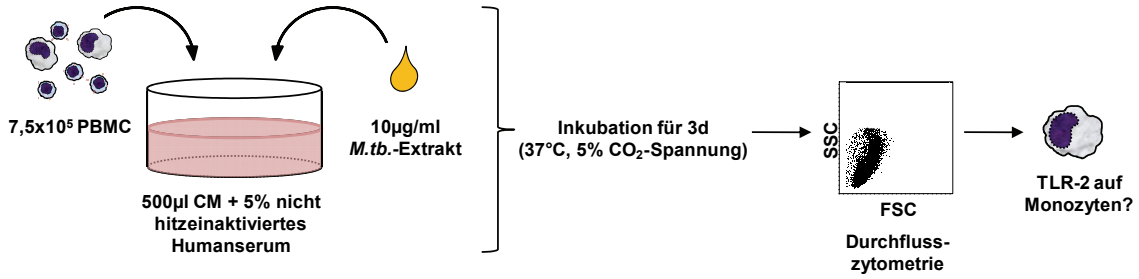


Abbildung 18 Schema für die Untersuchung der TLR-2-Expression auf humanen Monozyten (Abkürzungen: CM = Zellkulturmedium, FSC = „forward scatter", *M.tb.*-Extrakt = Antigenextrakt aus *Mycobacterium tuberculosis*, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, SSC = „sideward scatter", TLR-2 = Toll-like Rezeptor 2)

Alle Ansätze wurden als Duplikate durchgeführt, um je einen Ansatz mit anti-$TLR\text{-}2^{APC}$ und der Isotypenkontrolle $MausIgG2a^{APC}$ zu färben. Insgesamt wurden Monozyten von drei PPD^- und zwölf PPD^+ Spendern untersucht. Die MFI für TLR-2 änderte sich weder in Monozyten von PPD^- noch von PPD^+ Spendern durch die Zugabe von *M.tb.*-Extrakt (Abb.19, 20).

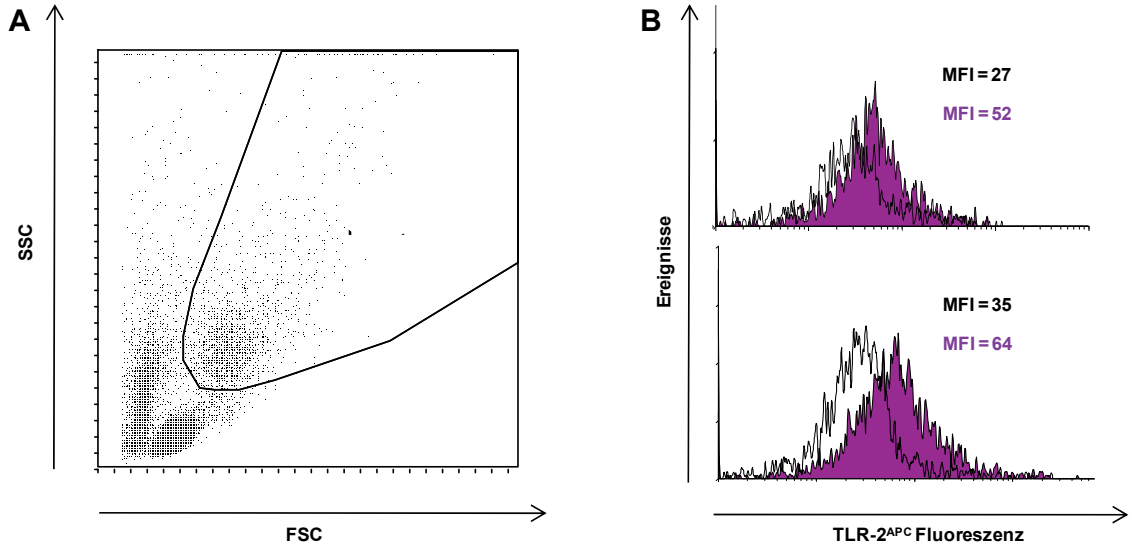


Abbildung 19 TLR-2-Expression auf Monozyten PBMC wurden nach Stimulation mit *M.tb.*-Extrakt durchflusszytometrisch auf die Expression von TLR-2 untersucht. (A) Im Dotblot befinden sich die Monozyten im dargestellten Gate. Gezeigt ist repräsentativ eines aus insgesamt 12 Experimenten mit Zellen eines PPD^+ Spenders. (B) Im selben Gate wurde die MFI von $TLR\text{-}2^{APC}$ (violett) und die des Isotyps $MausIgG2a^{APC}$ (keine Füllung) im unstimulierten (obere Grafik) und im stimulierten Ansatz (untere Grafik) gemessen. (Abkürzungen: APC = Allophycocyanin, FSC = „forward scatter", MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, *M.tb.*-Extrakt = Antigenextrakt aus *Mycobacterium tuberculosis*, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, PPD = „purified protein derivative", SSC = „sideward scatter", TLR-2 = Toll-like Rezeptor 2)

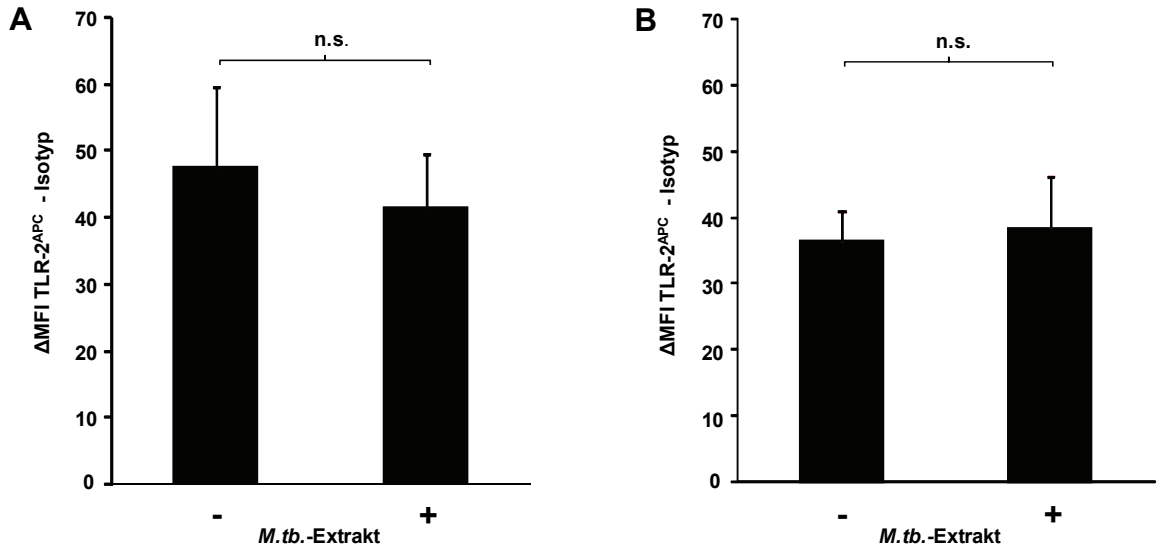


Abbildung 20 Regulation von TLR-2 auf Monozyten PBMC aus drei PPD^- und zwölf PPD^+ Spendern wurden nach Stimulation mit *M.tb.*-Extrakt durchflusszytometrisch auf die Expression von TLR-2 untersucht. Es wurden die Mittelwerte der ΔMFI von TLR-2 errechnet und für PPD^- (A) und PPD^+ Spender (B) aufgetragen. Die ΔMFI $TRL2^{APC}$ - Isotyp ist die Differenz zwischen gemessener MFI mit APC-konjugiertem anti-TLR-2-Antikörper und der gemessenen MFI mit APC-konjugiertem MausIgG2a-Isotyp als Hintergrund. (Abkürzungen: APC = Allophycocyanin, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, *M.tb.*-Extrakt = Antigenextrakt aus *Mycobacterium tuberculosis*, n.s. = nicht signifikant, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, PPD = „purified protein derivative", TLR-2 = Toll-like Rezeptor 2)

3.1.3. Regulation von Cathelicidin

Cathelicidin wird Vitamin-D-abhängig durch die Stimulation von TLR-2 induziert. Obwohl auf Proteinebene keine Regulation von TLR-2 erfolgt, besteht die Möglichkeit, dass konstitutiv exprimierter TLR-2 nach Stimulation die Cathelicidin-Expression steigert.

Daher wurde nun die Regulation von Cathelicidin-mRNA untersucht. Wiederum wurden MΦ und T-Zell-Klone mit ManLAM stimuliert, die mRNA extrahiert und mittels qRT-PCR quantitativ untersucht (S. 36, Abb.15).

Da 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Vit.D_3) Cathelicidin hochreguliert, wurde dies als Positivkontrolle verwendet. Wie erwartet steigerte Vit.D_3 die mRNA-Menge in allen sechs Experimenten auf das 100-fache (100 ± 31, $p = 0{,}02$) (Abb.21).

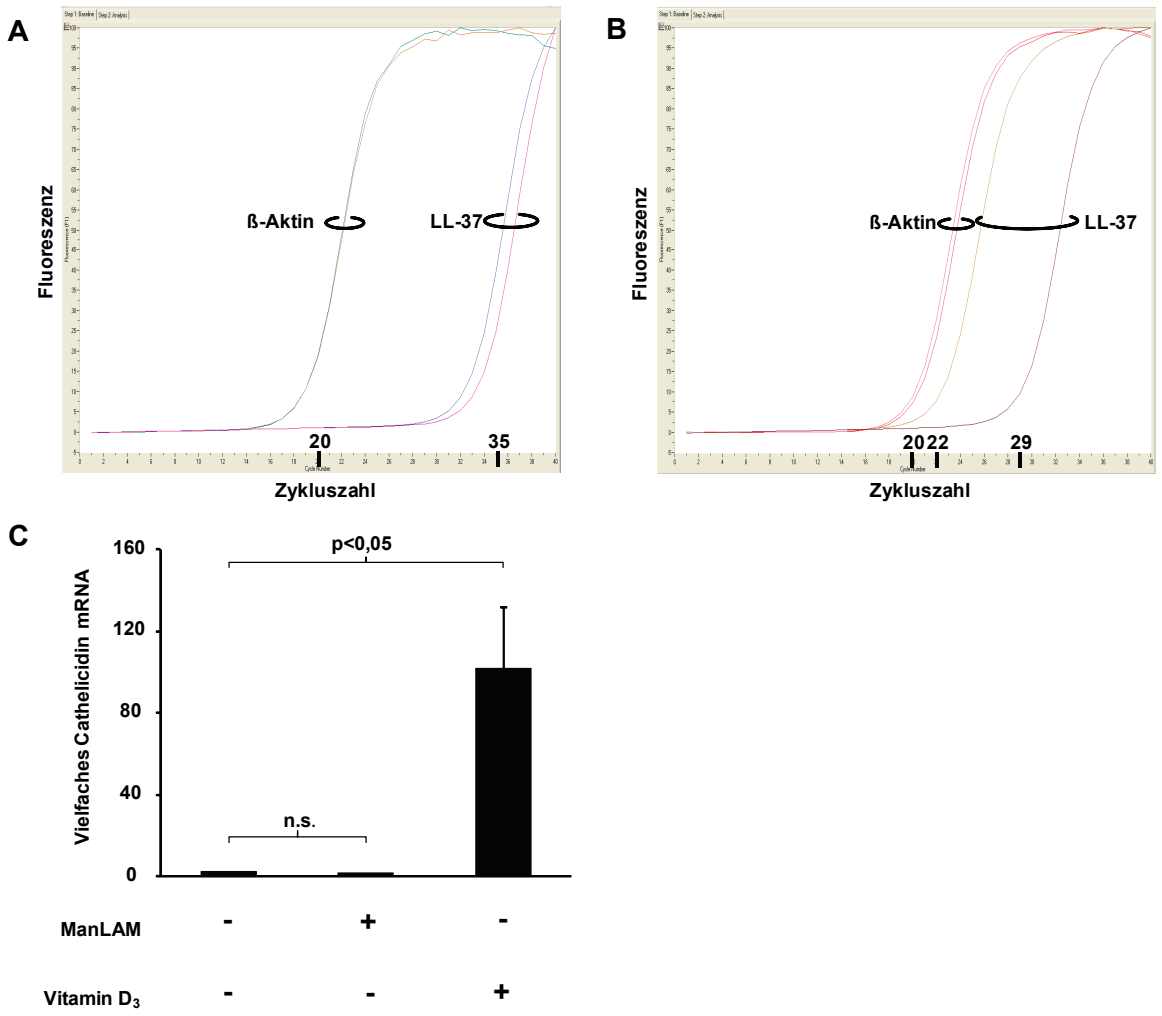


Abbildung 21 Regulation von Cathelicidin auf mRNA-Ebene Nach der Stimulation von MΦ und T-Zell-Klonen mit ManLAM wurden die Zellen lysiert und die Cathelicidin-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und zur Vit.D_3-Positivkontrolle mittels qRT-PCR gemessen. Dazu wurden die Cp-Werte nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle bestimmt. (A) Repräsentatives qRT-PCR-Ergebnis eines Experimentes aus sechs; Ansatz mit CM ohne ManLAM versus mit ManLAM jeweils mit β-Aktinkontrolle; H_2O-Kontrolle > 36,00 Zyklen. (B) Repräsentative qRT-PCR-Ergebnisse eines Experimentes aus sechs; Ansatz mit CM ohne Vit.D_3 versus mit Vit.D_3 jeweils mit β-Aktinkontrolle; H_2O-Kontrolle > 36,00 Zyklen. (C) Aus den in sechs Experimenten gemessenen Cp-Werten errechnete sich die vielfache Expression der mRNA von Cathelicidin in MΦ, angegeben als Mittelwert ± SEM. Farben in (A): Azurblau = β-Aktin unstimuliert, ocker = β-Aktin stimuliert; rosa = LL-37 unstimuliert, hellblau = LL-37 stimuliert. Farben in (B): hellrosa = β-Aktin unstimuliert, rosa = β-Aktin stimuliert, helles lila = Cathelicidin ohne Vitamin D_3, lila = Cathelicidin mit Vitamin D_3. (Abkürzungen: Cp = „crossing point“, LL-37 = Cathelicidin, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, mRNA = „messenger RNA“, n.s. = nicht signifikant, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments, Vitamin D_3 = 10µg/ml 1,25-Dihydroxycholecalciferol)

Die Zugabe von ManLAM hatte hingegen keinen Effekt auf die Expression von Cathelicidin.

3.1.4. Regulation von Cathepsin G

Weil auch CathG das intrazelluläre Überleben von *M.tb.* inhibiert, wurde jetzt die Regulation von diesem Molekül untersucht.

Als Positivkontrolle zum Nachweis von CathG diente cDNA von neutrophilen Granulozyten, weil diese CathG konstitutiv transkribieren und exprimieren.

Die gemessenen Cp-Werte der Granulozytenkontrolle lagen folgerichtig unterhalb denen, die in den Ansätzen mit MΦ gemessen wurden (n=6, Daten nicht gezeigt).

Im Mittel ließ sich zwischen den mit ManLAM stimulierten und den unstimulierten Ansätzen kein Unterschied in der Expression von CathG-mRNA nachweisen (Abb.22).

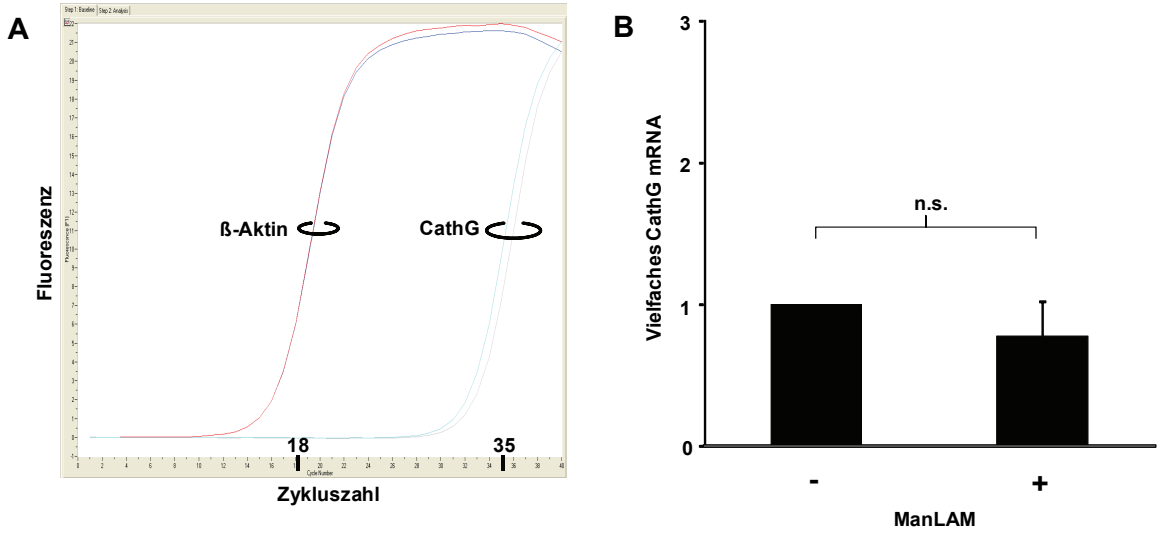


Abbildung 22 Regulation von CathG auf mRNA-Ebene Nach der Stimulation von MΦ und T-Zell-Klonen mit ManLAM wurden die Zellen lysiert und die CathG-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels qRT-PCR gemessen. Dazu wurden die Cp-Werte nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle bestimmt. (A) Repräsentatives qRT-PCR-Ergebnis eines Experimentes aus sechs; Ansatz mit CM ohne ManLAM versus mit ManLAM jeweils mit β-Aktinkontrolle; H_2O-Kontrolle > 36,00 Zyklen. (B) Aus den in sechs Experimenten gemessenen Cp-Werten errechnete sich die vielfache Expression der mRNA von CathG in MΦ, angegeben als Mittelwert ± SEM. Farben in (A): Royalblau = β-Aktin unstimuliert, orangerot = β-Aktin stimuliert, grau = CathG unstimuliert, türkis = CathG stimuliert. (Abkürzungen: CathG = Cathepsin G, Cp = „crossing point“, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, mRNA = „messenger RNA“, n.s. = nicht signifikant, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments)

Zusammenfassend ergab sich aus den bisherigen Experimenten:

1.) $P2X_7$ wird auf mRNA-Ebene durch ManLAM in MΦ hochreguliert
2.) TLR-2 wird auf mRNA-Ebene durch ManLAM in MΦ hochreguliert, nicht jedoch auf Proteinebene in Monozyten
3.) Alle weiteren untersuchten antimikrobiellen Effektormechanismen (Cathelicidin, CathG) in MΦ werden durch ManLAM nicht reguliert

3.2. Regulation von antimikrobiellen Peptiden in Zellen des erworbenen Immunsystems

3.2.1. Charakterisierung von T-Zell-Klonen

Da T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr der Tuberkulose einnehmen, wurde jetzt untersucht, ob von ihnen exprimierte antimikrobielle Peptide (insbesondere Perforin und Granulysin) reguliert werden. Dazu wurden ManLAM-spezifische T-Zell-Klone generiert. Um geeignete Klone zu identifizieren, wurden T-Zell-Klone, die mittels „limiting dilution“ aus einem an der Tuberkulose erkrankten Spender gewonnen wurden, genauer charakterisiert. Zuerst wurde die Oberflächenexpression von CD4, CD8 und TZRαβ durchflusszytometrisch untersucht.

Insgesamt wurden sechs T-Zell-Klone charakterisiert. Alle waren $CD4^+$ und exprimierten den TZRαβ (Abb.23).

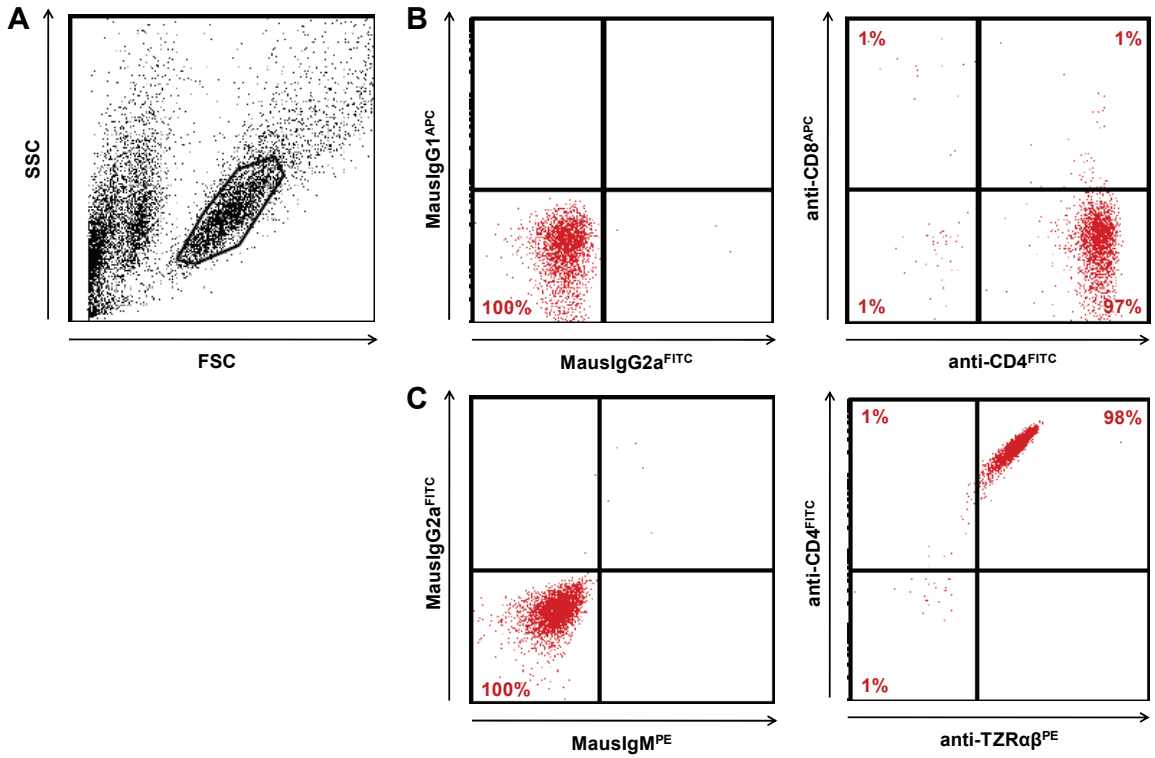


Abbildung 23 Oberflächenexpression von CD4, CD8 und TZRαβ T-Zell-Klone wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und TZRαβ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gemessen wurde der prozentuale Anteil der für CD4 bzw. CD8 sowie TZRαβ positiven Lymphozyten. Repräsentative Daten eines Klons aus sechs. (A) Darstellung des Lymphozytengates. (B) Prozentualer Anteil CD4 bzw. CD8 positiver Zellen (rechte Grafik) im Vergleich zur Isotypenkontrolle (linke Grafik). (C) Prozentualer Anteil TZRαβ positiver Zellen gemessen und im Vergleich zum Isotyp (linke Grafik) gegenüber CD4 aufgetragen (rechte Grafik). (Abkürzungen: APC = Allophycocyanin, CD = „cluster of differentiation“, FITC = Fluoreszeinisothiocyanat, FSC = „forward scatter“, Ig = Immunglobulin, SSC = „sideward scatter“, TZR = T-Zell-Rezeptor)

98% der Zellen des Klons exprimierten sowohl CD4 als auch TZRαβ auf ihrer Oberfläche. Der Klon wurde daher als $CD4^+$, $TZR\alpha\beta^+$ T-Zell-Klon charakterisiert. Die fünf weiteren Klone wurden ganz analog untersucht und beurteilt. Auch sie waren positiv für CD4 und TZRαβ.

Um die Antigenspezifität der T-Zell-Klone zu untersuchen, wurden die Regulation und die Freisetzung von IFNγ bestimmt.

Zunächst wurde die Expression der IFNγ-mRNA gemessen. Dazu wurden pro Ansatz $4x10^4$ Lymphozyten und $2x10^5$ MΦ mit ManLAM stimuliert. Es zeigte sich in allen Fällen (n=6) eine signifikante Zunahme der IFNγ-mRNA in den stimulierten Ansätzen (84-fach ± 26, p = 0,02) (Abb.24).

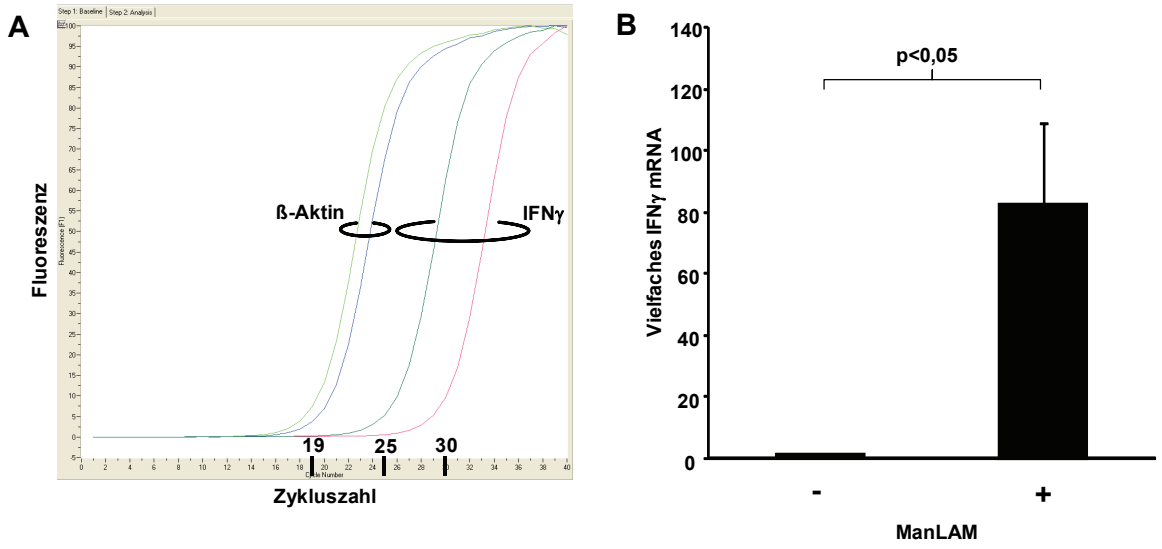


Abbildung 24 Regulation von IFNγ auf mRNA-Ebene Nach der Stimulation von MΦ und T-Zell-Klonen mit ManLAM wurden die Zellen lysiert und die IFNγ-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels qRT-PCR gemessen. Dazu wurden die Cp-Werte nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle bestimmt. (A) Repräsentatives qRT-PCR-Ergebnis eines Experimentes aus sechs; Ansatz mit CM ohne ManLAM versus mit ManLAM jeweils mit β-Aktinkontrolle; H_2O-Kontrolle > 36,00 Zyklen. (B) Aus den in sechs Experimenten gemessenen Cp-Werten errechnete sich die vielfache Expression der mRNA von IFNγ in T-Lymphozyten, angegeben als Mittelwert ± SEM. Farben in (A): Royalblau = β-Aktin unstimuliert, mintgrün = β-Aktin stimuliert, rosa = IFNγ unstimuliert, hellblau = IFNγ stimuliert. (Abkürzungen: Cp = „crossing point“, IFNγ = gamma-Interferon, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, mRNA = „messenger RNA“, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments)

Um diesen Befund auf Proteinebene zu verifizieren, wurden T-Lymphozyten mit ManLAM oder Concanavalin A (ConA) als Positivkontrolle stimuliert. Nach 4h wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA die IFNγ-Konzentration bestimmt.

In allen Experimenten (n=9) induzierte ConA die Freisetzung von IFNγ (im Mittel von 306pg/ml ± 163pg/ml auf 3636pg/ml ± 712pg/ml, p = 0,0005) (Abb.25).

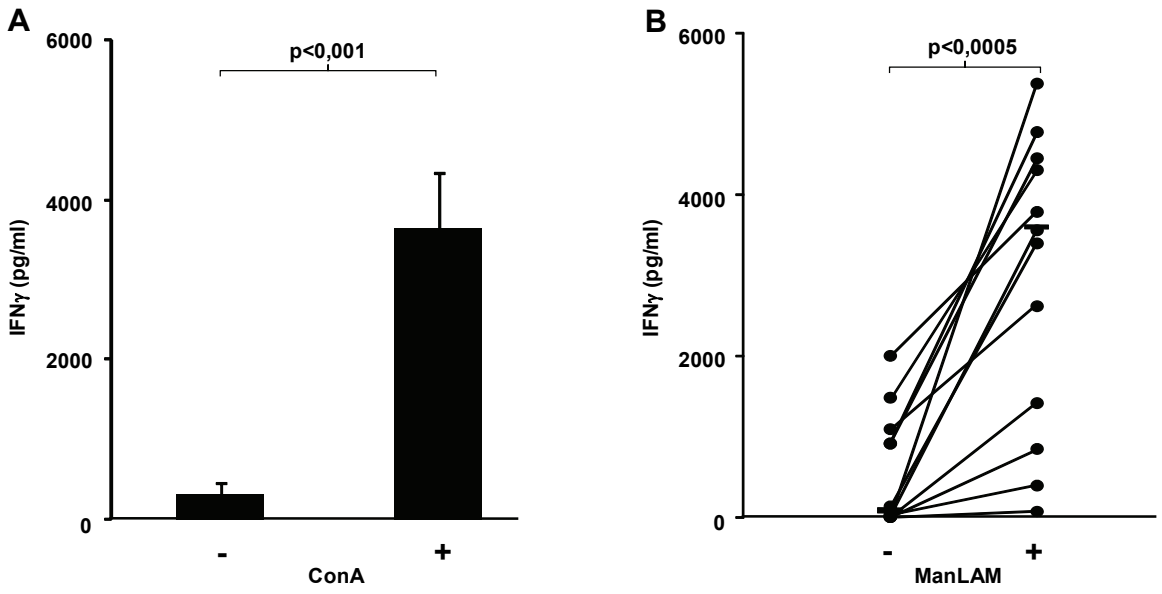


Abbildung 25 Sekretion von IFNγ aus T-Zell-Klonen Nach 4-stündiger Inkubation der T-Zell-Klone mit ConA als Positivkontrolle oder mykobakteriellem Antigen wurde der Überstand der Ansätze abgenommen und die darin enthaltene IFNγ-Konzentration (pg/ml) mittels ELISA im Vergleich zur Negativkontrolle (CM) bestimmt. Alle Ansätze wurden in Duplikaten durchgeführt. (A) Mittelwerte der Positivkontrolle mit ConA aus neun Messergebnissen. (B) Individuelle Daten nach Stimulation mit ManLAM. Die waagerechten Striche markieren den Median. (n=12) (Abkürzungen: CM = Zellkulturmedium, ConA = 10µg/ml Concanavalin A, ELISA = „enzyme linked immunosorbent assay", IFNγ = gamma-Interferon, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan)

Auch ManLAM steigerte die Konzentration von IFNγ von 550pg/ml ± 204pg/ml auf 2923pg/ml ± 525pg/ml, p = 0,0002, n=12.

Diese Daten zeigen, dass die generierten T-Zell-Klone ManLAM erkennen und IFNγ transkribieren sowie sezernieren.

Um zu klären, ob die T-Zell-Klone ManLAM CD1b-restringiert erkennen, wurde die Stimulation in ausgewählten Ansätzen in Anwesenheit neutralisierender anti-CD1b- oder

anti-CD1a-Antikörper durchgeführt. Anschließend wurde die IFNγ-Konzentration in den Überständen gemessen.

Die anti-CD1b-Antikörper reduzierten in allen Ansätzen (n=6) die IFNγ-Konzentration fast auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle (858pg/ml ± 116pg/ml, p = 0,0004). (Abb.26).

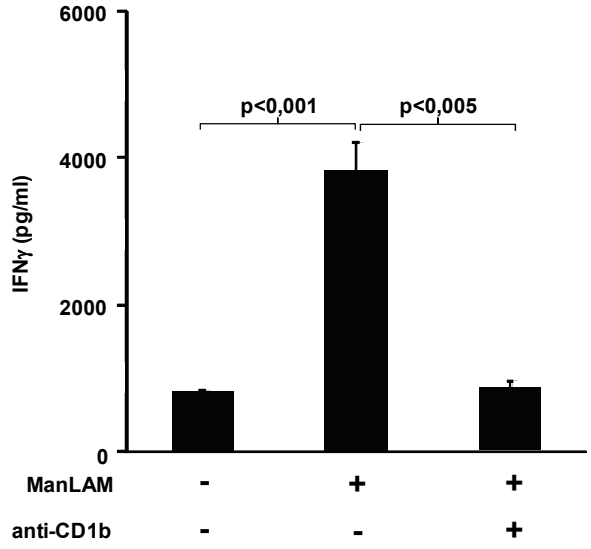


Abbildung 26 Einfluss von neutralisierenden anti-CD1b-Antikörpern auf die IFNγ-Freisetzung durch einen T-Zell-Klon T-Lymphozyten wurden mit MΦ und ManLAM inkubiert. Zu ausgewählten Ansätzen wurden neutralisierende anti-CD1a- (nicht gezeigt) oder anti-CD1b-Antikörper zugegeben. Nach 4h wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA die Konzentration von IFNγ gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte von insgesamt sechs unabhängigen Experimenten. (Abkürzungen: anti-CD1b = 10µg/ml neutralisierender anti-CD1b-Antikörper, CD = „cluster of differentiation", IFNγ = gamma-Interferon, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan)

Die Zugabe der neutralisierenden anti-CD1a-Antikörper hatte dagegen keinen Effekt auf die IFNγ-Freisetzung (Daten nicht gezeigt). Demzufolge handelt es sich um CD1b-restringierte T-Zell-Klone.

In diesen $CD4^+$, $TZR\alpha\beta^+$ CD1b-restringierten T-Zell-Klonen wurde im Folgenden die Regulation der antimikrobiellen Peptide Perforin und Granulysin durch ManLAM untersucht.

3.2.2. Regulation von Perforin

Zunächst wurde untersucht, ob die Perforin-mRNA durch ManLAM reguliert wird. In zwei von sechs Ansätzen wurde die Perforin-mRNA auf das 2,7-fache ± 0,35 hochreguliert, in allen anderen Ansätzen ließ sich keine (n=2) oder eine Herunterregulation (n=2) der mRNA beobachten. Insgesamt wird die Perforin-mRNA durch ManLAM nicht reguliert (Abb.27).

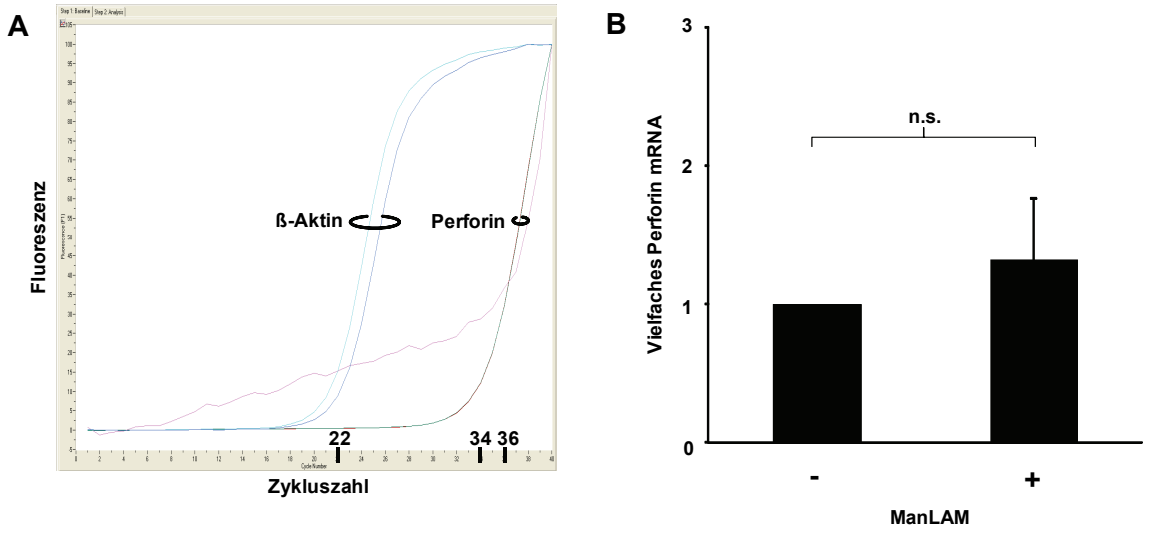


Abbildung 27 Regulation von Perforin-mRNA MΦ und T-Zell-Klone wurden mit ManLAM stimuliert, lysiert und die Perforin-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels qRT-PCR gemessen. Dazu wurden die Cp-Werte nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle bestimmt. (A) Repräsentatives qRT-PCR-Ergebnis eines Experimentes aus sechs; Ansatz mit CM ohne ManLAM versus mit ManLAM jeweils mit β-Aktinkontrolle; H_2O-Kontrolle ca. 35,00 Zyklen. (B) Aus den in sechs Experimenten gemessenen Cp-Werten errechnete sich die vielfache Expression der mRNA von Perforin in T-Lymphozyten, angegeben als Mittelwert ± SEM. Farben in (A): Hellblau = β-Aktin unstimuliert, türkis = β-Aktin stimuliert, dunkelblau = Perforin unstimuliert, rot = Perforin stimuliert, rosa = H_2O-Kontrolle etwa 36 Zyklen. (Abkürzungen: Cp = „crossing point“, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, mRNA = „messenger RNA“, n.s. = nicht signifikant, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments)

Der durch T-Lymphozyten direkt vermittelte antimikrobielle Effektorweg zur Lyse von *M.tb.* verläuft über Perforin, welches eine Pore in die Zielzelle bildet und Granulysin, welches dann die intrazellulären Bakterien abtötet. Es ist daher denkbar, dass nur Granulysin, die zweite Komponente dieses Mechanismus, reguliert wird. Deswegen wurde jetzt die Regulation von Granulysin in den T-Zell-Klonen untersucht.

3.2.3. Regulation von Granulysin

Auch für Granulysin ließ sich keine Regulation der mRNA nachweisen (Abb.28).

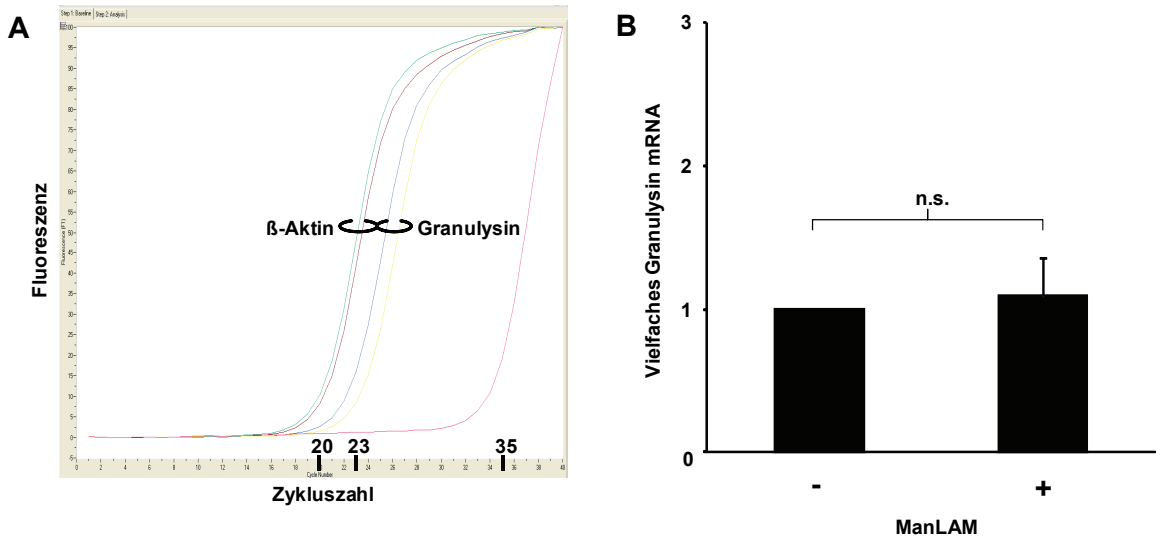


Abbildung 28 Regulation von Granulysin-mRNA MΦ und T-Zell-Klone wurden mit ManLAM stimuliert, lysiert und die Granulysin-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels qRT-PCR gemessen. Dazu wurden die Cp-Werte nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle bestimmt. (A) Repräsentative qRT-PCR-Ergebnisse eines Experimentes aus sechs; Ansatz mit CM ohne ManLAM versus mit ManLAM jeweils mit β-Aktinkontrolle; H_2O-Kontrolle ca. 35,00 Zyklen. (B) Aus den in sechs Experimenten gemessenen Cp-Werten errechnete sich die vielfache Expression der mRNA von Granulysin in T-Lymphozyten, angegeben als Mittelwert ± SEM. Farben in (A): Weinrot = β-Aktin unstimuliert, türkis = β-Aktin stimuliert, gelb = Granulysin unstimuliert, hellblau = Granulysin stimuliert, rosa = H_2O-Kontrolle etwa 35 Zyklen. (Abkürzungen: Cp = „crossing point“, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, mRNA = „messenger RNA“, n.s. = nicht signifikant, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments)

Weil Granulysin als inaktive Vorstufe in natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird, wurde die Regulation von aktivem Granulysin jetzt auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden die T-Zell-Klone mit ManLAM unter Standardbedingungen stimuliert und anschließend intrazelluläres Granulysin gefärbt.

Es zeigte sich in allen sechs Experimenten eine signifikante Zunahme der MFI für Granulysin durch ManLAM (von MFI 1524 ± 289 unstimuliert auf MFI 2199 ± 181 stimuliert, $p = 0,03$) (Abb.29).

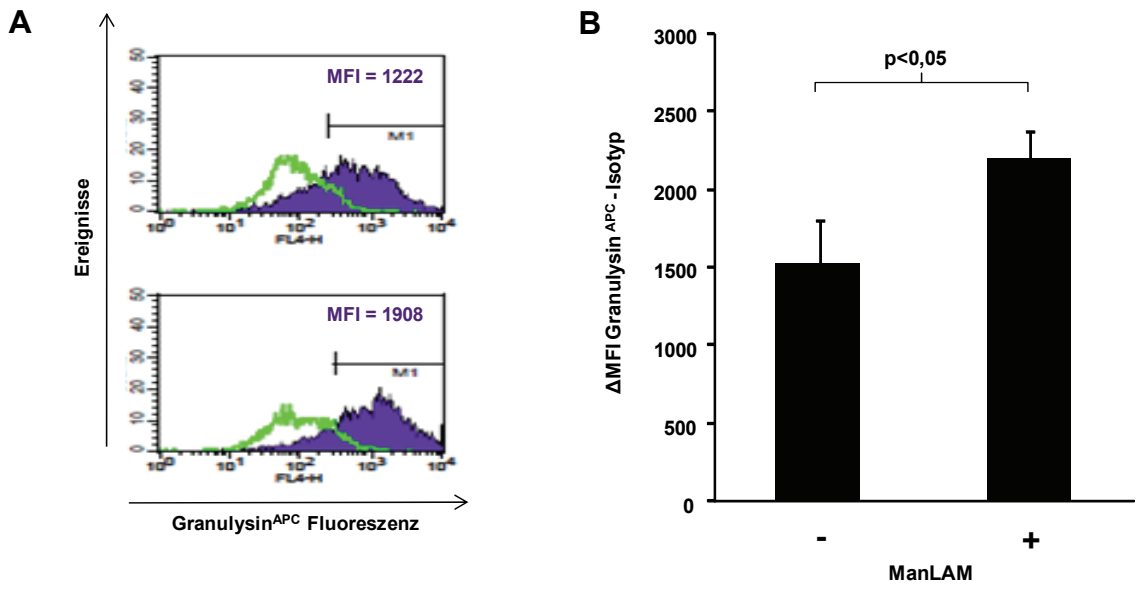


Abbildung 29 Regulation von Granulysin in T-Zell-Klonen T-Zell-Klone wurden mit MΦ inkubiert und mit ManLAM stimuliert. Dann wurde die Menge an Granulysin mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (A) Repräsentative Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse eines der insgesamt sechs Experimente. Der unstimulierte Ansatz (A, obere Grafik) und der mit mykobakteriellem Antigen stimulierte Ansatz (A, untere Grafik). Die grüne Linie kennzeichnet jeweils die Isotyp-Kontrolle, der violett unterlegte Teil die Färbung mit Streptavidin^{APC}. (B) Mittelwert der ΔMFI von Granulysin in allen sechs untersuchten Klonen angegeben als Mittelwert ± SEM. Die ΔMFI Granulysin^{APC} - Isotyp ist die Differenz zwischen gemessener MFI mit anti-Granulysin + APC-konjugiertem Streptavidin-Zweitantikörper und der gemessenen MFI mit Kaninchenserum + APC-konjugiertem Streptavidin-Zweitantikörper. (Abkürzungen: APC = Allophycocyanin, FL4-H = Fluoreszenz Kanal 4 durch APC, MΦ = Makrophage, ManLAM = Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments)

Um die biologische Bedeutung der gefundenen Hochregulation von Granulysin zu erhärten, wurde jetzt die Regulation von Granulysin in primären humanen T-Lymphozyten untersucht.

Als Ausgangszellen dienten PBMC, die von PPD$^-$ und PPD$^+$ Spendern isoliert und für drei Tage unter Standardbedingungen mit *M.tb.*-Extrakt oder IL-15 als Positivkontrolle inkubiert wurden. Mittels Durchflusszytometrie wurde sowohl die Anzahl Granulysin positiver Zellen als auch die Menge an intrazellulärem Granulysin auf Einzelzellebene anhand der MFI gemessen. Es wurden jeweils alle Lymphozyten sowie die CD4$^+$ Subpopulation untersucht.

IL-15 führte sowohl bei PPD$^-$ als auch bei PPD$^+$ Spendern zu einer signifikanten Hochregulation von Granulysin (Abb.30 und Abb.31).

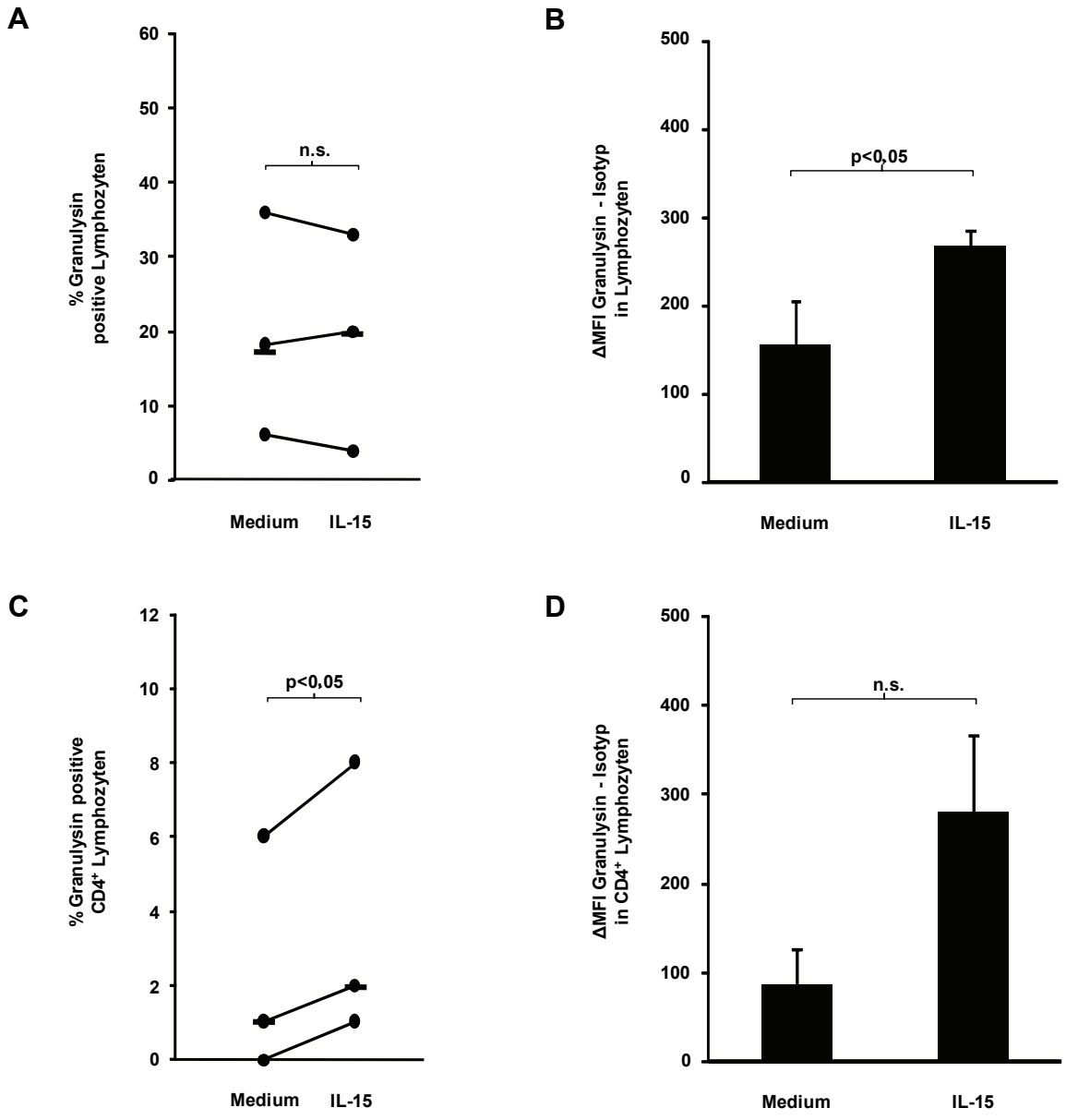


Abbildung 30 Regulation von Granulysin durch IL-15 Nach dreitägiger Inkubation von PBMC aus PPD^- Spendern mit IL-15 wurden die Zellen auf Granulysin gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gemessen wurde der prozentuale Anteil Granulysin positiver Lymphozyten sowie die MFI von Granulysin und dessen Isotyp im stimulierten sowie unstimulierten Ansatz. Die ΔMFI Granulysin - Isotyp ist die Differenz zwischen gemessener MFI mit anti-Granulysin + fluorocrhomer Zweitantikörper und der gemessenen MFI mit Kaninchenserum + fluorochromer Zweitantikörper. Gezeigt sind die Daten für Proliferation (A) und mittlere Fluoreszenzintensität (B) für alle Lymphozyten sowie die Proliferation (C) und mittlere Fluoreszenzintensität (D) für die $CD4^+$ Subpopulation. Die Bälkchen in (A) und (C) markieren jeweils den Median. Die Daten in (B) und (D) sind angegeben als Mittelwert ± SEM. (n=3) (Abkürzungen: CD = „cluster of differentiation“, IL = Interleukin, IL-15 = 10ng/ml rhu IL-15, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, n.s. = nicht signifikant, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, PPD = „purified protein derivative“, rhu = rekombinant, human, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments)

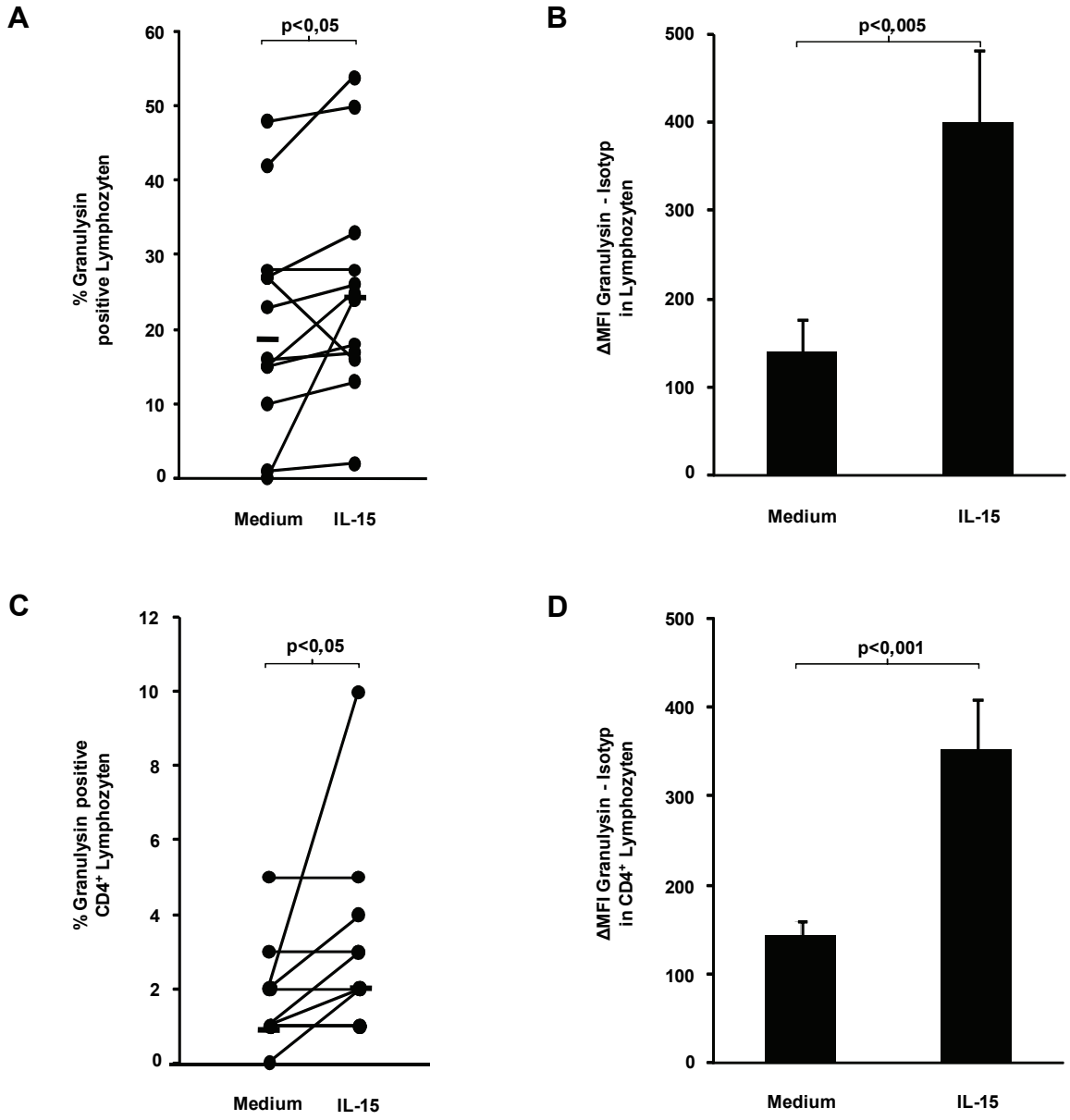


Abbildung 31 Regulation von Granulysin durch IL-15 Nach dreitägiger Inkubation von PBMC aus PPD^+ Spendern mit IL-15 wurden die Zellen auf Granulysin gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gemessen wurde der prozentuale Anteil Granulysin positiver Lymphozyten sowie die MFI von Granulysin und dessen Isotyp im stimulierten sowie unstimulierten Ansatz. Die ΔMFI Granulysin - Isotyp ist die Differenz zwischen gemessener MFI mit anti-Granulysin + fluorocrhomer Zweitantikörper und der gemessenen MFI mit Kaninchenserum + fluorochromer Zweitantikörper. Gezeigt sind die Daten für Proliferation (A) und mittlere Fluoreszenzintensität (B) für alle Lymphozyten sowie die Proliferation (C) und mittlere Fluoreszenzintensität (D) für die $CD4^+$ Subpopulation. Die Bälkchen in (A) und (C) markieren jeweils den Median. Die Daten in (B) und (D) sind angegeben als Mittelwert ± SEM. (n=12) (Abkürzungen: CD = „cluster of differentiation“, IL = Interleukin, IL-15 = 10ng/ml rhu IL-15, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, PPD = „purified protein derivative“, rhu = rekombinant, human, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments)

Bei den Gesamtlymphozyten PPD^- Spender wurde keine Zunahme Granulysin positiver Zellen gefunden. Allerdings wurde in allen drei Spendern eine Zunahme der MFI von

154 ± 50 auf 265 ± 21, p = 0,04 detektiert. Auch in den $CD4^+$ T-Zellen aller drei Spender war eine signifikante Zunahme Granulysin positiver Zellen nachweisbar (Granulysin positive Zellen 2% ± 2% ohne versus 4% ± 2% mit IL-15, p = 0,03), wohingegen ein Effekt auf Einzelzellebene ausblieb.

Bei den zwölf PPD^+ Spendern zeigte sich für die Gesamtheit der Lymphozyten im Gate eine Zunahme sowohl der Proliferation (von 21% ± 4% auf 26% ± 4%, p = 0,04) als auch der MFI (von 140 ± 37 auf 401 ± 81, p = 0,001). Darüberhinaus ergab sich auch für die $CD4^+$ Lymphozyten-Subpopulation eine Zunahme der Proliferation von 1,7% ± 0,4% auf 2,9% ± 0,7% (p = 0,04) und der MFI von 143 ± 17 auf 353 ± 55 (p = 0,0006). Damit war gezeigt, dass IL-15 eine geeignete Positivkontrolle für die Fragestellung der Granulysin-Expression in Lymphozyten ist (zusammenfassend Tab.4).

Tabelle 4 Übersicht Regulation von Granulysin in Lymphozyten PPD^- und PPD^+ Spender durch Interleukin-15
Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte (MW) sowie die Standardabweichung bezogen auf die Anzahl der durchgeführten Experimente (SEM). (Abkürzungen: CD = „cluster of differentiation“, IL = Interleukin, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, PPD = „purified protein derivative“)

PPD-Status		Δ% Granulysin pos. Lymphozyten				ΔMFI Granulysin pos. Lymphozyten			
		gesamt		$CD4^+$		gesamt		$CD4^+$	
		Medium	IL-15	Medium	IL-15	Medium	IL-15	Medium	IL-15
-	MW	20	19	2	4	154	265	86	280
	SEM	9	8	2	2	50	21	43	87
	t-test	p = 0.29		p = 0.03		p = 0.04		p = 0.14	
+	MW	21	26	1,7	2,9	140	401	143	353
	SEM	4	4	0,4	0,7	37	81	17	55
	t-test	p = 0,04		p = 0,04		p = 0,001		p = 0,0006	

Nach der Etablierung der Positivkontrolle erfolgte nun die Stimulation der PBMC mit der Lipidquelle *M.tb.*-Extrakt.

Die Stimulation von PBMC PPD^- Spender führte weder bei den gesamten Lymphozyten zu einer prozentualen Zunahme Granulysin positiver Zellen, noch zu einer Hochregulation intrazellulären Granulysins auf Einzelzellebene. Auch bei $CD4^+$ T-Lymphozyten hatte die Stimulation mit *M.tb.*-Extrakt keinen Effekt auf die Expression von Granulysin (Abb.32).

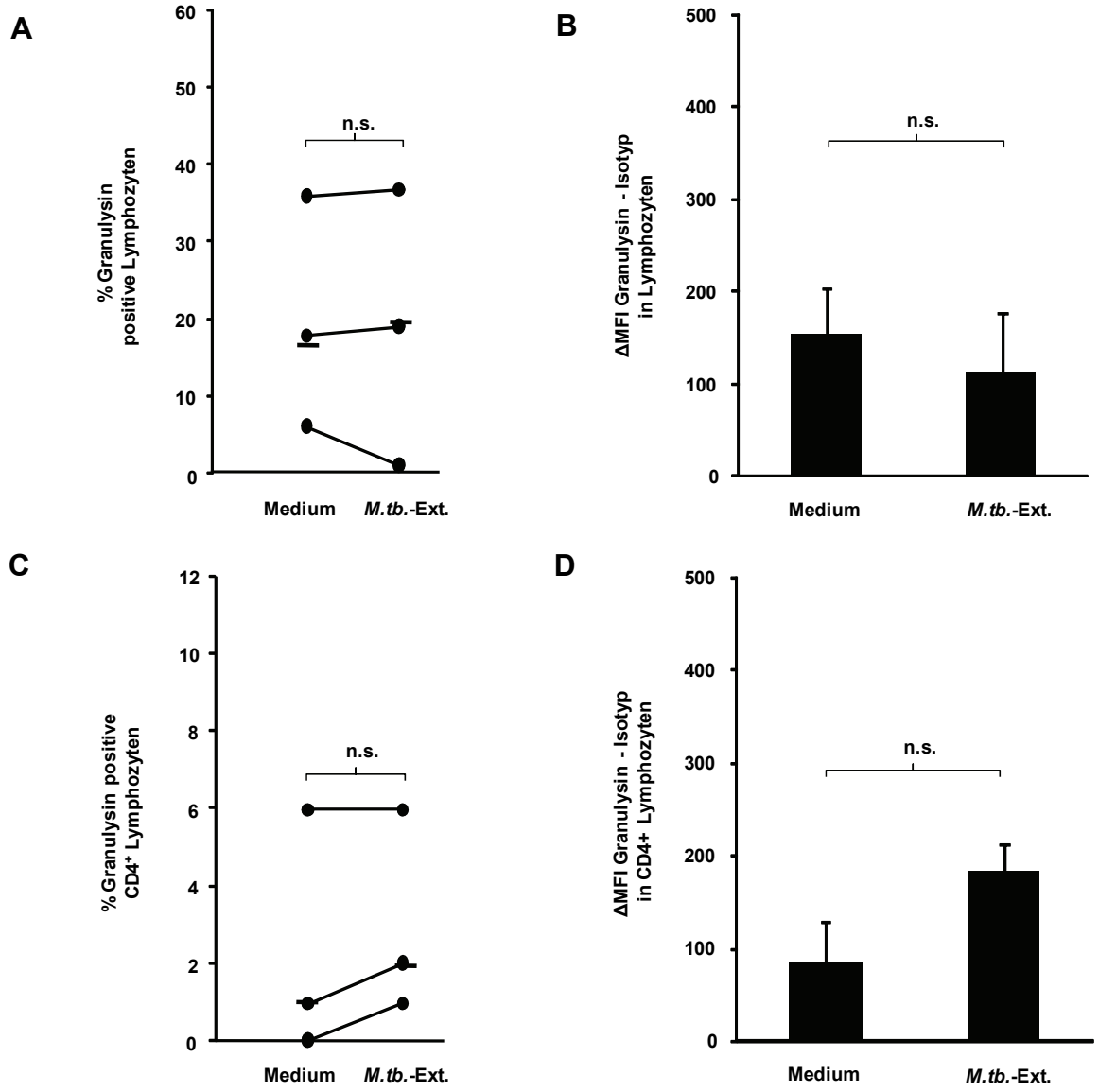


Abbildung 32 Regulation von Granulysin durch *M.tb.*-Extrakt Nach dreitägiger Inkubation von PBMC aus PPD^- Spendern mit *M.tb.*-Extrakt wurden die Zellen auf Granulysin gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gemessen wurde der prozentuale Anteil Granulysin positiver Lymphozyten sowie die MFI von Granulysin und dessen Isotyp im stimulierten sowie unstimulierten Ansatz. Die ΔMFI Granulysin - Isotyp ist die Differenz zwischen gemessener MFI mit anti-Granulysin + fluorocrhomer Zweitantikörper und der gemessenen MFI mit Kaninchenserum + fluorochromer Zweitantikörper. Gezeigt sind die Daten für Proliferation (A) und mittlere Fluoreszenzintensität (B) für alle Lymphozyten sowie die Proliferation (C) und mittlere Fluoreszenzintensität (D) für die $CD4^+$ Subpopulation. Die Bälkchen in (A) und (C) markieren jeweils den Median. Die Daten in (B) und (D) sind angegeben als Mittelwert ± SEM. (n=3) (Abkürzungen: CD = „cluster of differentiation“, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, *M.tb.*-Ext. = *M.tb.*-Extrakt, ein Antigenextrakt aus *Mycobacterium tuberculosis*, n.s. = nicht signifikant, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, PPD = „purified protein derivative“, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments)

Im Gegensatz dazu ließ sich in den Lymphozyten der zwölf PPD^+ Spender durch *M.tb.*-Extrakt im Mittel eine prozentuale Zunahme Granulysin positiver Lymphozyten von

21% ± 4% auf 25% ± 3%, p = 0,04 zeigen. Die Menge an exprimiertem Granulysin pro Zelle blieb aber in der Gesamtpopulation unverändert (Abb.33).

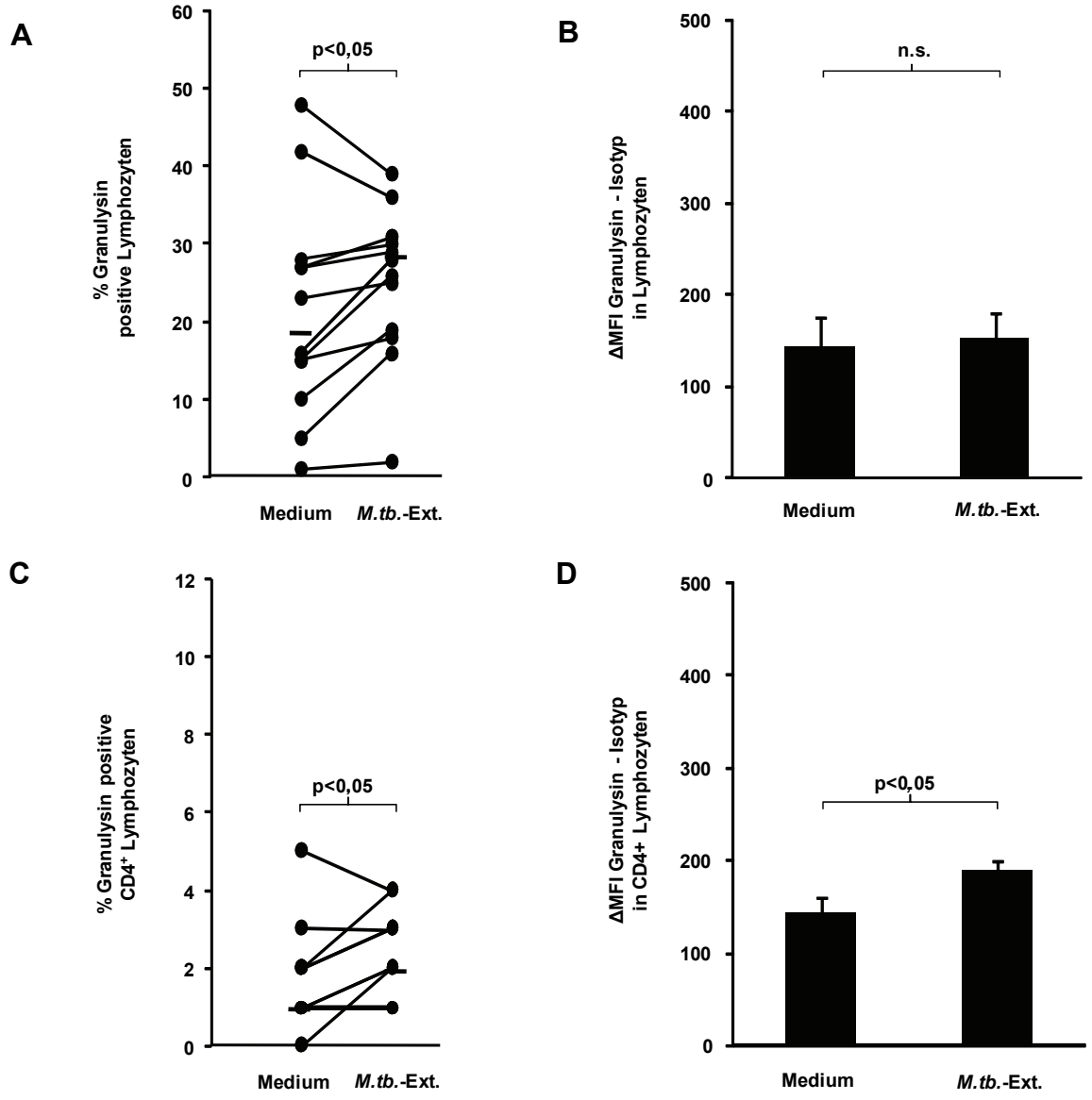


Abbildung 33 Regulation von Granulysin durch *M.tb.*-Extrakt Nach dreitägiger Inkubation von PBMC aus PPD^+ Spendern mit *M.tb.*-Extrakt wurden die Zellen auf Granulysin gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gemessen wurde der prozentuale Anteil Granulysin positiver Lymphozyten sowie die MFI von Granulysin und dessen Isotyp im stimulierten sowie unstimulierten Ansatz. Die ΔMFI Granulysin - Isotyp ist die Differenz zwischen gemessener MFI mit anti-Granulysin + fluorocrhomer Zweitantikörper und der gemessenen MFI mit Kaninchenserum + fluorochromer Zweitantikörper. Gezeigt sind die Daten für Proliferation (A) und mittlere Fluoreszenzintensität (B) für alle Lymphozyten sowie die Proliferation (C) und mittlere Fluoreszenzintensität (D) für die $CD4^+$ Subpopulation. Die Bälkchen in (A) und (C) markieren jeweils den Median. Die Daten in (B) und (D) sind angegeben als Mittelwert ± SEM. (n=12) (Abkürzungen: CD = „cluster of differentiation“, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, *M.tb.*-Ext. = *M.tb.*-Extrakt, ein Antigenextrakt aus *Mycobacterium tuberculosis*, n.s. = nicht signifikant, PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen, PPD = „purified protein derivative“, SEM = Standardabweichung bezogen auf die Gesamtzahl an Wiederholungen eines Experiments)

Bei den $CD4^+$ Lymphozyten war der prozentuale Anteil Granulysin exprimierender Zellen nach Stimulation ebenfalls signifikant höher als zuvor. Auch die Menge intrazellulären Granulysins pro Zelle war signifikant höher als in der Mediumkontrolle.

Zwischen der unveränderten ΔMFI der Gesamtlymphozyten und der erhöhten ΔMFI der $CD4^+$ Lymphozyten herrscht eine gewisse Diskrepanz. Es liegt nahe, dass der geringe Anteil $CD4^+$ Lymphozyten unter allen aufgenommenen Lymphozyten keinen statistisch nachweisbaren Einfluss auf die Messung der Granulysinmenge in der Gesamtpopulation hat. Dennoch ist die Hochregulation von Granulysin auf Einzelzellebene in $CD4^+$ Lymphozyten aller zwölf Spender durch *M.tb.*-Extrakt signifikant und damit von Relevanz (von MFI 143 ± 17 auf 189 ± 11, p = 0,02) (zusammenfassend Tab.5).

Tabelle 5 Übersicht Regulation von Granulysin in Lymphozyten PPD^- und PPD^+ Spender durch *M.tb.*-Extrakt
Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte (MW) sowie die Standardabweichung bezogen auf die Anzahl der durchgeführten Experimente (SEM). (Abkürzungen: CD = „cluster of differentiation, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, *M.tb.*-Ext. = *M.tb.*-Extrakt, ein Antigenextrakt aus *Mycobacterium tuberculosis*, PPD = „purified protein derivative“)

PPD-Status		Δ% Granulysin pos. Lymphozyten				ΔMFI Granulysin pos. Lymphozyten			
		gesamt		$CD4^+$		gesamt		$CD4^+$	
		Medium	*M.tb.*-Ext.	Medium	*M.tb.*-Ext.	Medium	*M.tb.*-Ext.	Medium	*M.tb.*-Ext.
-	MW	20	19	2	3	154	113	86	183
	SEM	9	10	2	2	50	66	43	30
	t-test	p = 0.33		p = 0.09		p = 0.23		p = 0.16	
+	MW	21	25	1,7	2,3	140	151	143	189
	SEM	4	3	0,4	0,3	36	29	17	11
	t-test	p = 0,04		p = 0,02		p = 0,42		p = 0,02	

Die an primären humanen Lymphozyten erhobenen Daten zeigen, dass sich Granulysin in diesen Zellen durch mykobakterielle Lipide induzieren lässt. Insbesondere die $CD4^+$ Subpopulation exprimiert nach der Stimulation mit *M.tb.*-Extrakt vermehrt Granulysin.

Diese Beobachtung legt nahe, dass genau diese Zellen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr der Tuberkulose einnehmen.

Zusammenfassend ergab sich aus den bisherigen Experimenten:

1.) Granulysin wird durch ManLAM in CD1b-restringierten, $CD4^+$ T-Zell-Klonen hochreguliert
2.) Granulysin wird auch in primären humanen Lymphozyten durch *M.tb.*-Extrakt hochreguliert, insbesondere in $CD4^+$ Lymphozyten
3.) Perforin wird durch ManLAM in CD1b-restringierten, $CD4^+$ T-Zell-Klonen nicht reguliert

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression der Rezeptoren $P2X_7$ und TLR-2 in MΦ sowie die Expression von Granulysin in T-Zellen durch mykobakterielle Lipidantigene hochreguliert wird (Tab.6).

Tabelle 6 Differentielle Regulation antimikrobieller Peptide in Makrophagen und T-Zellen durch mykobakterielle Lipidantigene (Abkürzungen: ↑ = Hochregulation, ± = keine Regulation)

Untersuchtes Molekül	Makrophagen	T-Lymphozyten
Purinozeptor $P2X_7$	↑	
Toll-like Rezeptor 2	↑	
Cathelicidin	±	
Cathepsin G	±	
Perforin		±
Granulysin		↑

4.1. Die antigenabhängige Regulation von $P2X_7$ in MΦ als Abwehrmechanismus der angeborenen Immunabwehr bei der Tuberkulose

Viele intrazelluläre bakterielle Pathogene des Menschen werden über $P2X_7$-abhängige Mechanismen eliminiert. So wird beispielsweise die Viabilität von *Porphyromonas gingivalis* [96] und *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) durch ATP $P2X_7$-abhängig reduziert [17]. Auch Mykobakterien vermehren sich intrazellulär. Folgerichtig haben Menschen mit Polymorphismen im $P2X_7$-Gen eine deutlich erhöhte Suszeptibilität insbesondere gegenüber der extrapulmonalen Tuberkulose [30]. Wie beim Menschen spielt auch bei anderen Säugern die $P2X_7$-abhängige Erregerabwehr eine wichtige Rolle. *C. muridarum*, das murine Pendant zu *C. trachomatis*, infiziert $P2X_7$-defiziente Mäuse effektiver als Kontrolltiere [19]. Auch *M. bovis* im Rind wird durch einen $P2X_7$-abhängigen Weg eliminiert [83].

Unsere Daten zeigen, dass die $P2X_7$-mRNA in MΦ nach Stimulation mit ManLAM im Vergleich zur Kontrolle vermehrt ist (Abb.16). Die hier vorgestellten Ergebnisse zur Hochregulation von $P2X_7$ betonen die physiologische Relevanz des Rezeptors: MΦ, die Wirtszellen von *M.tb.*, regulieren in Anwesenheit mykobakterieller Lipidantigene und lipidspezifischer T-Lymphozyten die Transkription der $P2X_7$-mRNA hoch. Dies unterstützt die effektive Abwehr von *M.tb.* durch die Produktion proinflammatorischer

Zytokine [43] und reaktiver Sauerstoffradikale [69]. Außerdem werden MΦ durch Autophagie [30] und $P2X_7$-abhängige Poreninduktion apoptotisch, wodurch intrazelluläre Erreger abgetötet und infizierte Wirtszellen als Erregerreservoir ausgeschaltet werden [11, 29]. All diese Befunde sprechen für eine Stärkung der Erregerabwehr durch die Hochregulation von $P2X_7$.

Da in pulmonalen Granulomen sowohl MΦ als auch T-Lymphozyten akkumulieren [77], bleibt zu klären, ob die Hochregulation der $P2X_7$-mRNA allein durch die Anwesenheit mykobakterieller Lipide bedingt ist, oder ob die aktive Mithilfe von T-Zellen notwendig ist. Denkbar wäre ein Mechanismus, bei dem IFNγ durch lipidreaktive T-Zellen sezerniert wird und die Hochregulation von $P2X_7$ in dadurch aktivierten MΦ [32] unterstützt.

4.2. Die vermehrte TLR-2-Expression in MΦ als Mechanismus zur Stärkung der „First Line Of Defense“

TLR-2 ist als „pathogen associated molecular pattern“-Rezeptor für die Erkennung mykobakterieller Antigene wichtig [54]. Eine Antigen-Bindung an TLR-2 führt über Vitamin-D-abhängige Mechanismen zu Autophagie sowie Apoptose in MΦ [14, 80] und Elimination von *M.tb.* über die Hochregulation des antimikrobiellen Peptides Cathelicidin. Desweiteren modulieren TLR-2-abhängige Mechanismen die Reifung von Monozyten und DZ [38], die Expression bakterizider Nitroxidradikale [8] sowie immunmodulatorischer Zytokine [43]. Damit sind TLRs nicht nur in die Aktivierung des angeborenen Immunsystems involviert, sondern indirekt auch für die Induktion adaptiver Immunität von Bedeutung.

Folgerichtig sind z.B. TLR-2-knockout-Mäuse suszeptibler gegenüber intrazellulären Pathogenen wie z.B. Mykoplasmen [53]. Auch beim Menschen unterstützen epidemiologische Daten die Bedeutung von TLR-2 bei der Abwehr der Tuberkulose: Genetische Variationen insbesondere von TLR-2 und TLR-9 erhöhen die Suszeptibilität für eine pulmonale und extrapulmonale Tuberkulose in Kaukasiern, Afroamerikanern und Westafrikanern [56, 90].

Unsere Daten zeigen, dass durch mykobakterielles ManLAM die TLR-2-mRNA in MΦ hochreguliert wird (Abb.17). Diese Ergebnisse lassen sich gut in bestehendes Wissen integrieren und untermauern Daten aus der Literatur. So wurde kürzlich gezeigt, dass die

Expression von TLR-2-mRNA durch mykobakterielle Antigene und *M.tb.*-DNA sowohl in AM als auch in Monozyten gesteigert wird [40]. Patienten mit einer aktiven Tuberkulose und latent infizierte Individuen exprimieren dabei signifikant mehr mRNA als uninfizierte Kontroll-Personen [16]. In Zusammenschau mit unseren Daten zeigt dies, dass TLR-2 eine wichtige Rolle bei der Abwehr der Tuberkulose des Menschen spielt.

Die simultane Antigen-spezifische Hochregulation von P2X7 und TLR-2 unterstreicht die Bedeutung synergistischer Effektormechanismen für die erfolgreiche Immunabwehr bei der Tuberkulose.

Auf diese Weise koordiniert ManLAM die Interaktion von MΦ mit Mykobakterien an zwei primär voneinander unabhängigen Schaltstellen.

4.3. Lipidreaktive CD4$^+$ T-Lymphozyten modulieren mittels Granulysin die Abwehr bei der Tuberkulose

CD4$^+$ T-Lymphozyten sind bei der Abwehr der Tuberkulose bei verschiedenen Säugern wie z.B. Mäusen involviert [25, 76]. Auch beim Menschen sind sie von großer Bedeutung. So findet sich im Blut von Individuen, die bereits Kontakt mit *M.tb.* hatten, ein Reservoir CD1-restringierter lipidreaktiver T-Lymphozyten [89]. Diese produzieren vornehmlich TH1-Zytokine wie IFNγ und lysieren durch Granulysin *M.tb.*-infizierte Zellen [4]. Insbesondere CD4$^+$ T-Lymphozyten produzieren IFNγ, welches in den Wirtszellen von *M.tb.* antimikrobielle Effektormechanismen induziert [32]. Auch in tuberkulösen Lungengranulomen finden sich CD4$^+$ T-Lymphozyten [76]. Diese T-Zellen können somit zum einen direkt am Ort der Entzündung durch Granulysin antimikrobiell wirken: Granulysin spielt bei der Abwehr verschiedener Pathogene eine wesentliche Rolle. Es ist dabei sowohl in der frühen Phase einer Infektion, als auch in der späten adaptiven Abwehr von Bedeutung. Zu Beginn einer Infektion wird es direkt von NK-Zellen sezerniert [33] und trägt so zur direkten Abtötung fremder Organismen bei [86]. Die Tatsache, dass auch T-Lymphozyten als Zellen des adaptiven Immunsystems Granulysin exprimieren und dieses in der späten Infektionsphase regulieren [60], spricht für die fundamentale Bedeutung dieses Abwehrmechanismus.

Granulysin wird posttranslational von 15kDa in aktive 9kDa-Einheiten gespalten [61]. Diese lysieren Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Pilze, Hefen, Parasiten und intrazelluläre Erreger [91] wie *M.tb.* [51, 58, 86]. Darüberhinaus wirkt Granulysin chemotaktisch auf T-Lymphozyten und Monozyten und spielt dabei eine Rolle bei der Anlockung proinflammatorischer Zellen an den Ort der Entzündung [44, 45, 46]. Eine nicht ausreichende Expression von Granulysin begünstigt das Entstehen einer Tuberkulose. Dies zeigt sich daran, dass Individuen mit einer klinisch manifesten Tuberkulose im Vergleich zu gesunden Personen deutlich erniedrigte Granulysin-Spiegel im Serum aufweisen [20, 74]. Die antimikrobielle Wirkung auf *M.tb.* sowie seine chemotaktische Wirkung auf Immunzellen, die bei der Tuberkulose von Bedeutung sind, unterstreicht die Wichtigkeit von Granulysin bei der protektiven Immunantwort bei der Tuberkulose.

Zum anderen rekrutieren und aktivieren o.g. T-Lymphozyten Zellen des angeborenen Immunsystems [32]. Dazu zählen auch Monozyten, die während der Infektion IL-15 freisetzen [41]. Dieses steigert wiederum die Granulysin-Expression in zytotoxischen Lymphozytenpopulationen. Somit werden zusätzlich Zellen zur Granulysin-Expression

stimuliert, die Lipidantigene nicht direkt erkennen. Bereits hier wird das enge Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr deutlich. Im Kontext der adaptiven Immunität ist in dieser Arbeit insbesondere die Rolle von Granulysin bei der Tuberkulose von Interesse.

Unsere Experimente zeigen, dass ManLAM in $CD4^+$ lipidspezifischen T-Zell-Klonen sowohl die Expression von Granulysin als auch die Expression von IFNγ steigert (Abb.24, Abb.25 und Abb.29). Dies deutet darauf hin, dass ein und dieselbe Zelle sowohl IFNγ als auch Granulysin exprimiert und damit *M.tb.* wirksam bekämpfen kann. Vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur, insbesondere dem Nachweis v.a. $CD4^+$ T-Zellen in Lungengranulomen, ist es somit wahrscheinlich, dass lipidreaktive $CD4^+$ T-Zellen an der Etablierung und Aufrechterhaltung einer protektiven Immunität gegen die Tuberkulose beteiligt sind. Sie könnten dies in dualer Weise zum einen durch die unterstützende T-Helferfunktion mittels IFNγ verwirklichen, zum anderen über direkte Mikroben-Elimination durch Granulysin. Die untersuchten Klone könnten also direkt am Ort der Entzündung durch Granulysin antimikrobiell wirken und zudem durch IFNγ weitere zytokinproduzierende Zellen aktivieren. Damit wären sie der Ausgangspunkt einer Aktivierungsschleife über IFNγ (aus T-Zellen) und IL-15 (aus Monozyten), die in weiteren (auch nicht lipidspezifischen) Lymphozyten die Granulysin-Expression steigert (Abb.30 und Abb.31) und die Erregerabwehr so verstärkt.

Die Ergebnisse zur Hochregulation von Granulysin in den untersuchten $CD4^+$ T-Zell-Klonen wurden durch weitere Experimente direkt auf frische T-Lymphozyten *ex vivo* extrapoliert. Unsere Daten zeigen, dass Granulysin in $CD4^+$ T-Lymphozyten von PPD^- Spendern nicht antigenabhängig reguliert wird (Abb.32). Dies war zu erwarten, da für eine spezifische Immunantwort ein Antigen-Priming erforderlich ist. $CD4^+$ Lymphozyten von PPD^+ Spendern regulieren jedoch Granulysin antigenspezifisch durch mykobakterielle Lipide hoch (Abb.33). Damit ist die Hochregulation von Granulysin durch mykobakterielle Lipide sowohl in $CD4^+$ T-Zell-Klonen als auch physiologisch in $CD4^+$ T-Zellen aus PBMC von Bedeutung. Beleg hierfür ist auch, dass z.B. AIDS-Patienten einem besonders hohen Tuberkulose-Risiko ausgesetzt sind. Durch das lymphotrope HI-Virus gehen insbesondere $CD4^+$ T-Lymphozyten zugrunde. Damit bricht sowohl die Helferfunktion dieser T-Zell-Subpopulation als auch deren Fähigkeit, Granulysin zur direkten Abtötung von *M.tb.* zu sezernieren, weg. Die Suszeptibilität gegenüber einer Tuberkulose steigt demnach an. Es ist daneben folglich durchaus denkbar, dass gerade

diese $CD4^+$ T-Zell-Population auch den im Vergleich zu Tuberkulosekranken bei klinisch Gesunden höheren Granulysin-Spiegel im Serum trägt und damit zur Verhinderung des Ausbruchs einer Tuberkulose beiträgt.

Insgesamt zeigen die erhobenen Daten, dass Lipide sowohl bei der angeborenen Immunität als auch im Rahmen der erworbenen Immunität eine wichtige Rolle spielen. Sie stimulieren sowohl MΦ als auch Effektor-T-Lymphozyten. Dadurch induzieren Lipide direkte Mechanismen zur Erreger-Elimination sowohl in den Wirtszellen von *M.tb.* als auch antimikrobielle Peptide in Zellen der adaptiven Immunität.

Die hier vorgestellten Daten eröffnen neue Perspektiven zum Einsatz von Lipiden zur Immunmodulation von Erkrankungen mit intrazellulären Bakterien. Erstens haben Lipide wegen der Stärkung antibakterieller Effektormechanismen das Potential, die konventionelle antimikrobielle Therapie immunologisch zu unterstützen.

Gerade wegen der zunehmenden Bedrohung durch multiresistente Mykobakterienstämme wird dieser Aspekt derzeit in unserer Arbeitsgruppe intensiv weiterverfolgt. Zweitens qualifiziert Lipide ihre Fähigkeit zur Induktion einer primären Immunantwort sie zu einem vielversprechenden Impfantigen. Eine Kombinationsimpfung aus Lipiden und mykobakteriellen Proteinen wird auf der Basis dieser Überlegungen in einer europaweiten tierexperimentellen Studie derzeit geprüft.

Die abschließende Abbildung fasst die zentralen Aspekte der Arbeit nochmals zusammen (Abb.34).

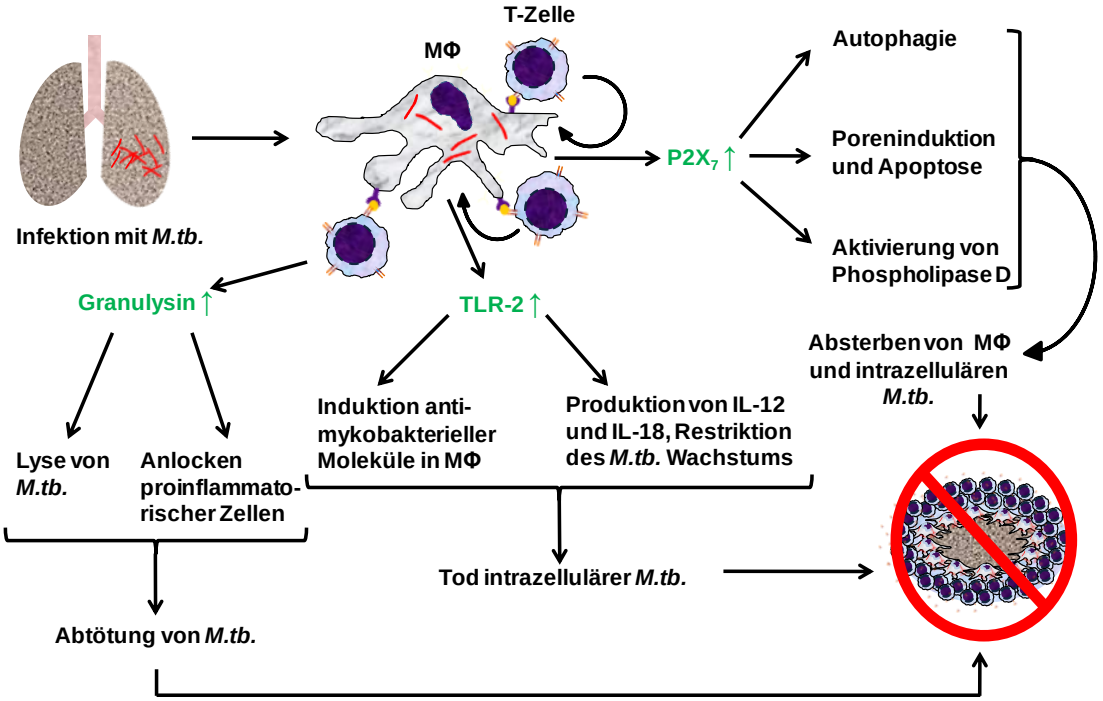


Abbildung 34 Zusammenfassung der gefundenen Ergebnisse vor dem Hintergrund bestehender Literatur Schematische Darstellung der herausgearbeiteten Leitbefunde dieser Arbeit im Kontext bestehender Modelle zur Elimination von *M.tb.* aus dem menschlichen Körper. (Abkürzungen: IL = Interleukin, MΦ = Makrophage, *M.tb.* = *Mycobacterium tuberculosis*, P2X$_7$ = Purinozeptor P2X$_7$, TLR-2 = Toll-like Rezeptor 2)

5. Zusammenfassung

Zur Untersuchung der Regulation antimikrobieller Peptide bei der Tuberkulose wurden humane T-Zell-Klone, Makrophagen (MΦ) und frisch generierte periphere mononukleäre Blutzellen verwendet. Die Expression eines selektiven Panels an immunologischen Molekülen wurde mittels quantitativer real time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR), dem „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) sowie der Durchflusszytometrie betrachtet. Insbesondere wurde die Regulation von Purinozeptor $P2X_7$ ($P2X_7$), Toll-like Rezeptor 2 (TLR-2), Cathelicidin, Cathepsin G (CathG), Perforin und Granulysin durch mykobakterielle Lipide gemessen.

Die Schlüsselbefunde der hier dargestellten Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Mykobakterielles Mannose-gecaptes Lipoarabinomannan reguliert

1.) in MΦ TLR-2 hoch

2.) in MΦ $P2X_7$ hoch

3.) in $CD4^+$ T-Zellen Granulysin und gamma-Interferon (IFNγ) hoch

Im Gegensatz dazu wurden Cathelicidin, CathG und Perforin nicht signifikant reguliert.

Insgesamt unterstützen die hier vorgestellten Daten ein Konzept, nach dem mykobakterielle Lipide erhebliches Potential zur Manipulation von protektiven Immunantworten besitzen. Unsere Befunde unterstützen die Entwicklung neuer Präventions- und Impfstrategien, die durch die gezielte Applikation von Lipidantigenen protektive Granulysin-exprimierende T-Zell-Populationen stimulieren und so vor der Entwicklung einer aktiven Tuberkulose schützen könnten.

Die hier erhobenen Daten legen nahe, Lipide als mögliche Impfstoffe zu verwenden oder in der Immunmodulation bei der Therapie einer Tuberkulose einzusetzen. Die Induktion von TLR-2 durch Lipide eröffnet darüberhinaus die Perspektive, die tuberkulostatische Standardtherapie additiv durch Vitamin D zu erweitern. Damit ließe sich vielleicht die Effektivität der Erreger-Elimination über TLR-2-initiierte Vitamin-D-abhängige antimikrobielle Effektorwege steigern und so z.B. die Therapiedauer verkürzen oder die

Therapieintensität reduzieren bei gleichzeitiger Verminderung der unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen. Auch eine kombinierte topische Applikation von TLR-Agonisten und Vitamin-D-haltiger Cremes auf Hautläsionen wie den durch Mykobakterien hervorgerufenen Lupus vulgaris wäre denkbar.

Die Hochregulation von $P2X_7$ auf der Oberfläche infizierter MΦ könnte eine lokale Instillation oder systemische Applikation von ATP oder ATP-Analoga vielleicht eines Tages als neue therapeutische Strategie eröffnen. Infizierte MΦ würden in Apoptose übergehen, intrazelluläre Mykobakterien würden lysiert.

Die simultane Aktivierung von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems durch mykobakterielle Lipide könnte somit insbesondere bei Infektionen mit multi- (MDR) oder gar extrem-resistenten (XDR) Tuberkulose-Stämmen konventionelle Therapiestrategien komplementieren und die Chance für das Überleben der betroffenen Patienten erhöhen.

6. Literaturverzeichnis

1. Addison N V: Abdominal tuberculosis--a disease revived. Ann.R.Coll.Surg.Engl., 65: 105-111 (1983)

2. Bastian M, Braun T, Bruns H, Rollinghoff M, Stenger S: Mycobacterial lipopeptides elicit CD4+ CTLs in Mycobacterium tuberculosis-infected humans. J.Immunol., 180: 3436-3446 (2008)

3. Beckman E M, Porcelli S A, Morita C T, Behar S M, Furlong S T, Brenner M B: Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. Nature, 372: 691-694 (1994)

4. Behar S M, Porcelli S A: CD1-restricted T cells in host defense to infectious diseases. Curr.Top.Microbiol.Immunol., 314: 215-250 (2007)

5. Bellamy R: Susceptibility to mycobacterial infections: The importance of host genetics. Genes Immun., 4: 4-11 (2003)

6. Berman J S, Blumenthal R L, Kornfeld H, Cook J A, Cruikshank W W, Vermeulen M W, Chatterjee D, Belisle J T, Fenton M J: Chemotactic activity of mycobacterial lipoarabinomannans for human blood T lymphocytes in vitro. J.Immunol., 156: 3828-3835 (1996)

7. Boom W H, Canaday D H, Fulton S A, Gehring A J, Rojas R E, Torres M: Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. Tuberculosis (Edinb), 83: 98-106 (2003)

8. Brennan P J: Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb), 83: 91-97 (2003)

9. Brightbill H D, Libraty D H, Krutzik S R, Yang R B, Belisle J T, Bleharski J R, Maitland M, Norgard M V, Plevy S E, Smale S T, Brennan P J, Bloom B R, Godowski P J, Modlin R L: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science, 285: 732-736 (1999)

10. Brigl M, Brenner M B: CD1: antigen presentation and T cell function. Annu.Rev.Immunol., 22: 817-890 (2004)

11. Britton W J, Fernando S L, Saunders B M, Sluyter R, Wiley J S: The genetic control of susceptibility to Mycobacterium tuberculosis. Novartis Found.Symp., 281: 79-92 (2007)

12. Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, McNeil M R, Brennan P J: Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. Capping with mannosyl residues in some strains. J.Biol.Chem., 267: 6234-6239 (1992)

13. Chujor C S, Kuhn B, Schwerer B, Bernheimer H, Levis W R, Bevec D: Specific inhibition of mRNA accumulation for lymphokines in human T cell line Jurkat by mycobacterial lipoarabinomannan antigen. Clin.Exp.Immunol., 87: 398-403 (1992)

14. Ciaramella A, Cavone A, Santucci M B, Garg S K, Sanarico N, Bocchino M, Galati D, Martino A, Auricchio G, D'Orazio M, Stewart G R, Neyrolles O, Young D B, Colizzi V, Fraziano M: Induction of apoptosis and release of interleukin-1 beta by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection. J.Infect.Dis., 190: 1167-1176 (2004)

15. Cisneros J R, Murray K M: Corticosteroids in tuberculosis. Ann.Pharmacother., 30: 1298-1303 (1996)

16. Constantoulakis P, Filiou E, Rovina N, Chras G, Hamhougia A, Karabela S, Sotiriou A, Roussos C, Poulakis N: In vivo expression of innate immunity markers in patients with Mycobacterium tuberculosis infection. BMC Infect.Dis., Vol. 10, Art.No. 243: 1-10 (2010)

17. Coutinho-Silva R, Stahl L, Raymond M N, Jungas T, Verbeke P, Burnstock G, Darville T, Ojcius D M: Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. Immunity, 19: 403-412 (2003)

18. Daley C L, Small P M, Schecter G F, Schoolnik G K, McAdam R A, Jacobs W R, Jr, Hopewell P C: An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. N.Engl.J.Med., 326: 231-235 (1992)

19. Darville T, Welter-Stahl L, Cruz C, Sater A A, Andrews C W, Jr, Ojcius D M: Effect of the purinergic receptor P2X7 on Chlamydia infection in cervical epithelial cells and vaginally infected mice. J.Immunol., 179: 3707-3714 (2007)

20. Di Liberto D, Buccheri S, Caccamo N, Meraviglia S, Romano A, Di Carlo P, Titone L, Dieli F, Krensky A M, Salerno A: Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which reverse after therapy. Tuberculosis (Edinb), 87: 322-328 (2007)

21. Di Perri G, Cruciani M, Danzi M C, Luzzati R, De Checchi G, Malena M, Pizzighella S, Mazzi R, Solbiati M, Concia E: Nosocomial epidemic of active tuberculosis among HIV-infected patients. Lancet, 2: 1502-1504 (1989)

22. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, Lange C, Losi M, Markova R, Migliori G B, Nienhaus A, Ruhwald M, Wagner D, Zellweger J P, Huitric E, Sandgren A, Manissero D: Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. Eur.Respir.J., 37: 88-99 (2011)

23. Draper P: The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. Front.Biosci., 3: 1253-1261 (1998)

24. Dutt A K, Stead W W: Tuberculosis in the elderly. Med.Clin.North Am., 77: 1353-1368 (1993)

25. Ehlers S, Benini J, Held H D, Roeck C, Alber G, Uhlig S: Alphabeta T cell receptor-positive cells and interferon-gamma, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology. J.Exp.Med., 194: 1847-1859 (2001)

26. el-Moatassim C, Dubyak G R: A novel pathway for the activation of phospholipase D by P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. J.Biol.Chem., 267: 23664-23673 (1992)

27. Endsley J J, Hogg A, Shell L J, McAulay M, Coffey T, Howard C, Capinos Scherer C F, Waters W R, Nonnecke B, Estes D M, Villarreal-Ramos B: Mycobacterium bovis BCG vaccination induces memory CD4+ T cells characterized by effector biomarker expression and anti-mycobacterial activity. Vaccine, 25: 8384-8394 (2007)

28. Engele M, Stossel E, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bolcskei P, Rollinghoff M, Stenger S: Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent Mycobacterium tuberculosis. J.Immunol., 168: 1328-1337 (2002)

29. Fairbairn I P, Stober C B, Kumararatne D S, Lammas D A: ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. J.Immunol., 167: 3300-3307 (2001)

30. Fernando S L, Saunders B M, Sluyter R, Skarratt K K, Goldberg H, Marks G B, Wiley J S, Britton W J: A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 175: 360-366 (2007)

31. Ferrari D, Los M, Bauer M K, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K: P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. FEBS Lett., 447: 71-75 (1999)

32. Flesch I E, Kaufmann S H: Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. Infect.Immun., 58: 2675-2677 (1990)

33. Gansert J L, Kiessler V, Engele M, Wittke F, Rollinghoff M, Krensky A M, Porcelli S A, Modlin R L, Stenger S: Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. J.Immunol., 170: 3154-3161 (2003)

34. Goren M B, Brokl O, Das B C: Sulfatides of Mycobacterium tuberculosis: The structure of the principal sulfatide (SL-I). Biochemistry, 15: 2728-2735 (1976)

35. Goren M B, Vatter A E, Fiscus J: Polyanionic agents as inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages: Evolution of an alternative interpretation. J.Leukoc.Biol., 41: 111-121 (1987)

36. Gu B J, Zhang W, Worthington R A, Sluyter R, Dao-Ung P, Petrou S, Barden J A, Wiley J S: A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. J.Biol.Chem., 276: 11135-11142 (2001)

37. Gumperz J E: The ins and outs of CD1 molecules: Bringing lipids under immunological surveillance. Traffic, 7: 2-13 (2006)

38. Hertz C J, Kiertscher S M, Godowski P J, Bouis D A, Norgard M V, Roth M D, Modlin R L: Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. J.Immunol., 166: 2444-2450 (2001)

39. Humphreys B D, Rice J, Kertesy S B, Dubyak G R: Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. J.Biol.Chem., 275: 26792-26798 (2000)

40. Juarez E, Nunez C, Sada E, Ellner J J, Schwander S K, Torres M: Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. Respir.Res., Vol. 11, Art.No. 2: 1-13 (2010)

41. Jullien D, Sieling P A, Uyemura K, Mar N D, Rea T H, Modlin R L: IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. J.Immunol., 158: 800-806 (1997)

42. Kappelman J, Alcicek M C, Kazanci N, Schultz M, Ozkul M, Sen S: First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. Am.J.Phys.Anthropol., 135: 110-116 (2008)

43. Kleinnijenhuis J, Joosten L A, van de Veerdonk F L, Savage N, van Crevel R, Kullberg B J, van der Ven A, Ottenhoff T H, Dinarello C A, van der Meer J W, Netea M G: Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1beta production by Mycobacterium tuberculosis. Eur.J.Immunol., 39: 1914-1922 (2009)

44. Krensky A M: Granulysin: A novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. Biochem.Pharmacol., 59: 317-320 (2000)

45. Krensky A M, Clayberger C: Biology and clinical relevance of granulysin. Tissue Antigens, 73: 193-198 (2009)

46. Kumar J, Okada S, Clayberger C, Krensky A M: Granulysin: A novel antimicrobial. Expert Opin.Investig.Drugs, 10: 321-329 (2001)

47. 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., 155: 1474-1477 (1997)

48. Kusner D J, Adams J: ATP-induced killing of virulent Mycobacterium tuberculosis within human macrophages requires phospholipase D. J.Immunol., 164: 379-388 (2000)

49. Kusner D J, Barton J A: ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent Mycobacterium tuberculosis via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion. J.Immunol., 167: 3308-3315 (2001)

50. Lammas D A, Stober C, Harvey C J, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne D S: ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. Immunity, 7: 433-444 (1997)

51. Latinovic-Golic S, Walch M, Sundstrom H, Dumrese C, Groscurth P, Ziegler U: Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes. BMC Immunol., Vol. 8, Art.No. 9: 1-12 (2007)

52. Liu P T, Stenger S, Tang D H, Modlin R L: Cutting edge: Vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin. J.Immunol., 179: 2060-2063 (2007)

53. Love W, Dobbs N, Tabor L, Simecka J W: Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a major role in innate resistance in the lung against murine Mycoplasma. PLoS One., Vol. 5, Art.No. 5: 1-8 (2010)

54. Mishra A K, Driessen N N, Appelmelk B J, Besra G S: Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: Structure, biogenesis and role in Mycobacterium tuberculosis physiology and host-pathogen interaction. FEMS Microbiol.Rev., 35: 1126-1157 (2011)

55. Moreno C, Mehlert A, Lamb J: The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. Clin.Exp.Immunol., 74: 206-210 (1988)

56. Motsinger-Reif A A, Antas P R, Oki N O, Levy S, Holland S M, Sterling T R: Polymorphisms in IL-1beta, vitamin D receptor Fok1, and Toll-like receptor 2 are associated with extrapulmonary tuberculosis. BMC Med.Genet., Vol. 11, Art.No. 37: 1-10 (2010)

57. Nikaido H: Preventing drug access to targets: Cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. Semin.Cell Dev.Biol., 12: 215-223 (2001)

58. Ochoa M T, Stenger S, Sieling P A, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S, Krensky A M, Rollinghoff M, Nunes Sarno E, Burdick A E, Rea T H, Modlin R L: T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. Nat.Med., 7: 174-179 (2001)

59. Pabst M J, Gross J M, Brozna J P, Goren M B: Inhibition of macrophage priming by sulfatide from Mycobacterium tuberculosis. J.Immunol., 140: 634-640 (1988)

60. Pena S V, Hanson D A, Carr B A, Goralski T J, Krensky A M: Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. J.Immunol., 158: 2680-2688 (1997)

61. Pena S V, Krensky A M: Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. Semin.Immunol., 9: 117-125 (1997)

62. Porcelli S, Morita C T, Brenner M B: CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. Nature, 360: 593-597 (1992)

63. Post F A, Manca C, Neyrolles O, Ryffel B, Young D B, Kaplan G: Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton lipoprotein inhibits Mycobacterium smegmatis-induced cytokine production by human macrophages in vitro. Infect.Immun., 69: 1433-1439 (2001)

64. Prinzis S, Chatterjee D, Brennan P J: Structure and antigenicity of lipoarabinomannan from Mycobacterium bovis BCG. J.Gen.Microbiol., 139: 2649-2658 (1993)

65. Rassendren F, Buell G N, Virginio C, Collo G, North R A, Surprenant A: The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. J.Biol.Chem., 272: 5482-5486 (1997)

66. Reece S T, Loddenkemper C, Askew D J, Zedler U, Schommer-Leitner S, Stein M, Mir F A, Dorhoi A, Mollenkopf H J, Silverman G A, Kaufmann S H: Serine protease activity contributes to control of Mycobacterium tuberculosis in hypoxic lung granulomas in mice. J.Clin.Invest., 120: 3365-3376 (2010)

67. Rivas-Santiago B, Hernandez-Pando R, Carranza C, Juarez E, Contreras J L, Aguilar-Leon D, Torres M, Sada E: Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. Infect.Immun., 76: 935-941 (2008)

68. Rivera-Marrero C A, Stewart J, Shafer W M, Roman J: The down-regulation of cathepsin G in THP-1 monocytes after infection with Mycobacterium tuberculosis is associated with increased intracellular survival of bacilli. Infect.Immun., 72: 5712-5721 (2004)

69. Rizzo R, Ferrari D, Melchiorri L, Stignani M, Gulinelli S, Baricordi O R, Di Virgilio F: Extracellular ATP acting at the P2X7 receptor inhibits secretion of soluble HLA-G from human monocytes. J.Immunol., 183: 4302-4311 (2009)

70. Robert Koch-Institut: Tuberkulose. Epidemiologisches Bulletin, 11: 93-96 (2010)

71. Rosat J P, Grant E P, Beckman E M, Dascher C C, Sieling P A, Frederique D, Modlin R L, Porcelli S A, Furlong S T, Brenner M B: CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ alpha beta T cell pool. J.Immunol., 162: 366-371 (1999)

72. Ryll R, Kumazawa Y, Yano I: Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids--a review. Microbiol.Immunol., 45: 801-811 (2001)

73. Sadek M I, Sada E, Toossi Z, Schwander S K, Rich E A: Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 19: 513-521 (1998)

74. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, Di Liberto D, de Boer T, Adnan I, van Crevel R, Klein M R, van Meijgaarden K E, Nelwan R H, van de Vosse E, Dieli F, Ottenhoff T H: Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. Tuberculosis (Edinb), 87: 312-321 (2007)

75. Saunders B M, Cooper A M: Restraining mycobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections. Immunol.Cell Biol., 78: 334-341 (2000)

76. Saunders B M, Frank A A, Orme I M, Cooper A M: CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. Cell.Immunol., 216: 65-72 (2002)

77. Saunders B M, Britton W J: Life and death in the granuloma: Immunopathology of tuberculosis. Immunol.Cell Biol., 85: 103-111 (2007)

78. Schaible U E, Collins H L, Kaufmann S H: Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. Adv.Immunol., 71: 267-377 (1999)

79. Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori G B, Bossink A, Dheda K, Diel R, Dominguez J, Lipman M, Nemeth J, Ravn P, Winkler S, Huitric E, Sandgren A, Manissero D: Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. Eur.Respir.J., 37: 100-111 (2011)

80. Shin D M, Yuk J M, Lee H M, Lee S H, Son J W, Harding C V, Kim J M, Modlin R L, Jo E K: Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. Cell.Microbiol., 12: 1648-1665 (2010)

81. Sieling P A, Chatterjee D, Porcelli S A, Prigozy T I, Mazzaccaro R J, Soriano T, Bloom B R, Brenner M B, Kronenberg M, Brennan P J: CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. Science, 269: 227-230 (1995)

82. Skold M, Behar S M: The role of group 1 and group 2 CD1-restricted T cells in microbial immunity. Microbes Infect., 7: 544-551 (2005)

83. Smith R A, Alvarez A J, Estes D M: The P2X7 purinergic receptor on bovine macrophages mediates mycobacterial death. Vet.Immunol.Immunopathol., 78: 249-262 (2001)

84. Spargo B J, Crowe L M, Ioneda T, Beaman B L, Crowe J H: Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 88: 737-740 (1991)

85. Stenger S, Mazzaccaro R J, Uyemura K, Cho S, Barnes P F, Rosat J P, Sette A, Brenner M B, Porcelli S A, Bloom B R, Modlin R L: Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. Science, 276: 1684-1687 (1997)

86. Stenger S, Hanson D A, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi K R, Froelich C J, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli S A, Bloom B R, Krensky A M, Modlin R L: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science, 282: 121-125 (1998)

87. Stenger S, Niazi K R, Modlin R L: Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis. J.Immunol., 161: 3582-3588 (1998)

88. Stenger S, Rosat J P, Bloom B R, Krensky A M, Modlin R L: Granulysin: A lethal weapon of cytolytic T cells. Immunol.Today, 20: 390-394 (1999)

89. Ulrichs T, Moody D B, Grant E, Kaufmann S H, Porcelli S A: T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with Mycobacterium tuberculosis infection. Infect.Immun., 71: 3076-3087 (2003)

90. Velez D R, Wejse C, Stryjewski M E, Abbate E, Hulme W F, Myers J L, Estevan R, Patillo S G, Olesen R, Tacconelli A, Sirugo G, Gilbert J R, Hamilton C D, Scott W K: Variants in toll-like receptors 2 and 9 influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Caucasians, African-Americans, and West Africans. Hum.Genet., 127: 65-73 (2010)

91. Walch M, Latinovic-Golic S, Velic A, Sundstrom H, Dumrese C, Wagner C A, Groscurth P, Ziegler U: Perforin enhances the granulysin-induced lysis of Listeria innocua in human dendritic cells. BMC Immunol., Vol. 8, Art.No. 14: 1-14 (2007)

92. Wayne L G: Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis., 13: 908-914 (1994)

93. WHO (World Health Organisation): Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing. WHO report: 12-15 (2008)

94. Wiley J S, Gargett C E, Zhang W, Snook M B, Jamieson G P: Partial agonists and antagonists reveal a second permeability state of human lymphocyte P2Z/P2X7 channel. Am.J.Physiol., 275: C1224-C1231 (1998)

95. Winau F, Schwierzeck V, Hurwitz R, Remmel N, Sieling P A, Modlin R L, Porcelli S A, Brinkmann V, Sugita M, Sandhoff K, Kaufmann S H, Schaible U E: Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. Nat.Immunol., 5: 169-174 (2004)

96. Yilmaz O, Yao L, Maeda K, Rose T M, Lewis E L, Duman M, Lamont R J, Ojcius D M: ATP scavenging by the intracellular pathogen Porphyromonas gingivalis inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis. Cell.Microbiol., 10: 863-875 (2008)

97. Yuk J M, Shin D M, Lee H M, Yang C S, Jin H S, Kim K K, Lee Z W, Lee S H, Kim J M, Jo E K: Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. Cell.Host Microbe, 6: 231-243 (2009)

7. Danksagung

Zu allererst meinen allerherzlichsten Dank an meinen Doktorvater Steffen Stenger für die engagierte und hervorragende Betreuung. Er hat mir durch die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen die Möglichkeit eröffnet, viele unterschiedliche spannende Methoden kennenlernen zu dürfen. Ausnahmslos alle Diskussionen waren konstruktiv und fruchtbar und haben mich viel gelehrt. Auch für sein menschliches Verständnis und das immer offene Ohr in schwierigen Situationen, derer sich viele stets genau dann zusammenrotten, wenn man sie am allerwenigsten gebrauchen kann, möchte ich mich bedanken. Sein doktorväterliches Verständnis und den steten Blick nach vorn weiß ich für alle Zeit zu schätzen.

Ein herzlicher Dank gilt auch Max Bastian, der mich am Anfang meiner Doktorarbeit immer fürsorglich betreut und begleitet hat und vom dem ich Vieles gelernt habe. Auch ihm gilt ein besonderer Dank für sein immer offenes Ohr. Ger van Zandbergen, der mir das Aufreinigen von neutrophilen Granulozyten in seinem Labor ermöglicht hat, sei an dieser Stelle gesagt: hartelijk bedankt!

Besten Dank an Michaela Hepperle, Anja Hofmann, Bettina Hussak, Valeska Knoll und Claudia Plinke sowie „die Jungs“ Heiko Bruns, Martin Busch, Daniel Mayer und Daniel Nickel, mit denen ich die Zeit im Labor immer sehr genossen habe – auch die Aktivitäten außerhalb. Ihre Hilfsbereitschaft und Freude, ihr Witz und ihre Freundschaftlichkeit waren ganz grundlegend für die immer gute Stimmung im Labor verantwortlich. Ich werde sie bestimmt nicht vergessen und wünsche ganz besonders den beiden jungen Familien unter den Genannten alles erdenklich Gute.

Auch vielen Dank an die Mitarbeiter der mikrobiologischen Diagnostik des Universitätsklinikums Ulm, die mir immer freundlich gesonnen und zuvorkommend begegnet sind, insbesondere bei der Terminvergabe für den Light Cycler.

Ich habe mich am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene von Anfang an wohl- und aufgenommen gefühlt. Dafür nochmals allen dort vielen Dank!

"Aus Gründen des Datenschutzes wurde in der Online-Version der Lebenslauf entfernt."