

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. E. Th. Rietschel

**Die Bedeutung der Zytokine IL-10 und IL-13
für die Immunabwehr gegen *Mycobacterium tuberculosis*
in der Maus**

Inauguraldissertation
zur Erlangung
der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät-

vorgelegt von
Tanja Schreiber

aus Freudenberg

2006

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die Bedeutung der Tuberkulose.....	1
1.2	Der Verlauf der humanen Tuberkulose.....	2
1.3	Die Immunologie der Tuberkulose.....	3
1.3.1	Das experimentelle Tiermodell.....	3
1.3.2	Die Induktion der zellulären Immunantwort	3
1.3.3	Die T-Zell-Immunantwort.....	6
1.3.4	Effektorfunktionen und Granulombildung.....	8
1.3.5	Die Bedeutung von antiinflammatorischen Zytokinen in der Tuberkulose.....	10
1.3.6	Die Wirkung von TH1- und TH2-Zytokinen auf die Makrophagendifferenzierung.....	13
	Fragestellung.....	16
2.	Material und Methoden.....	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Geräte.....	17
2.1.2	Sonstige Labormaterialien.....	17
2.1.3	Software.....	18
2.1.4	Reagenzien.....	18
2.1.5	Lösungen und Medien.....	22
2.1.5.1	Medien und Nährböden für Bakterienkulturen.....	22
2.1.5.2	Tierexperimentelles Arbeiten.....	22
2.1.5.3	Histologische und Immunhistologische Techniken.....	22
2.1.5.4	Zellkultur und Präparation primärer Zellen.....	22
2.1.5.5	Immunologische Techniken.....	23
2.1.5.6	Molekularbiologische Techniken.....	23
2.1.5.6.1	Primerpaare zur Genotypisierung.....	24
2.1.5.6.2	Primerpaare für die quantitative PCR.....	25

2.1.5.7	Antikörper.....	26
2.1.5.8	Aufreinigung und Stimulierung von Zellen.....	26
2.1.5.9	Immunologische Techniken.....	27
2.1.5.9.1	ELISA.....	27
2.1.5.9.2	Stimulierung von Zellen.....	27
2.1.5.9.3	Durchflusszytometrische Analysen.....	27
2.1.5.10	Infektion von Versuchstieren.....	28
2.1.5.11	Mausstämme.....	28
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Bakterienanzucht.....	30
2.2.2	Infektion von Versuchstieren via Aerosol.....	30
2.2.3	Bestimmung der Mortalität von Versuchstieren.....	31
2.2.4	Euthanasieren von Versuchstieren und Organentnahme.....	31
2.2.5	Mikrobiologische Untersuchungen zur Bestimmung der Keimlast in Lungenhomogenaten.....	32
2.2.6	Histologische Untersuchungen.....	32
2.2.6.1	Aufarbeitung von Organen für die Herstellung von Paraffinpräparaten.....	32
2.2.6.2	Histologische Färbungen.....	33
2.2.6.2.1	Hämatoxylin/Eosin (HE-) Färbung.....	33
2.2.6.2.2	Färbung „säurefester Stäbchen“ nach Ziehl-Neelsen (ZN).....	34
2.2.6.2.3	Trichromfärbung.....	34
2.2.6.3	Immunhistochemische Färbungen.....	35
2.2.6.3.1	Färbung der induzierbaren Sickoxidsynthase (NOS)2.....	35
2.2.6.3.2	Färbung der Arginase (Arg)-I.....	35
2.2.7	Molekularbiologische Untersuchungen.....	36
2.2.7.1	Gewinnung von Gesamtzell-RNA aus murinen Lungen.....	36
2.2.7.2	Reverse Transkription.....	37
2.2.7.3	Gewinnung von genomischer DNA zur Genotypisierung von Versuchstieren.....	37

2.2.7.4	Polymersekettreaktion (PCR).....	38
2.2.7.5	Quantitative PCR.....	38
2.2.8	Immunologische Untersuchungen.....	39
2.2.8.1	Herstellung von Einzelzellsuspensionen.....	39
2.2.8.1.1	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus murinen Lungen.....	39
2.2.8.1.2	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus den mediastinalen Lymphknoten.....	40
2.2.8.2	Restimulierung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	40
2.2.8.3	Phänotypische Analyse von Immunzellen in der Durchflusszytometrie.....	41
2.2.8.4	Intrazelluläre IFN γ -Färbung.....	42
2.2.8.5	Bestimmung der IFN γ -Konzentration im Zellkulturberstand und Lungenhomogenaten.....	43
2.2.8.6	Bestimmung der Nitratkonzentration im Serum.....	44
2.2.9	<i>In vitro</i> -Untersuchungen.....	44
2.2.9.1	Gewinnung und Differenzierung von Knochenmarksmakrophagen.....	44
2.2.9.2	Stimulierung von Knochenmarksmakrophagen.....	45
2.2.10	Statistik.....	45
3.	Ergebnisse.....	46
3.1	Modulation der Abwehrmechanismen durch Makrophagen-spezifisch überexprimiertes IL-10 nach <i>M. tuberculosis</i> -Infektion.....	46
3.1.1	Analyse der Suszeptibilität.....	46
3.1.2	Analyse der zellulären Immunantwort in den mediastinalen Lymphknoten.....	48
3.1.2.1	Expansion und Aktivierung von T-Zellen.....	48

3.1.2.2	IFN γ -Produktion von CD4 ⁺ T-Zellen.....	51
3.1.3	Untersuchungen der Expansion und Aktivierung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen der Lunge	52
3.1.3.1	Histopathologische Untersuchungen der Rekrutierung und Organisation von Immunzellen.....	52
3.1.3.2	Untersuchung aktivierter CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	54
3.1.3.3	Untersuchung der IFN γ -Produktion.....	55
3.1.4	Untersuchung der Induktion IFN γ -abhängiger Gene in der Lunge.....	57
3.1.4.1	Analyse der mRNA-Expression von <i>Irg-47</i> und <i>nos2</i>	57
3.1.4.2	Immunhistologischer Nachweis von NOS2 Im Lungengewebe.....	59
3.1.5	Untersuchung der Nitratkonzentration im Serum.....	61
3.1.6	Untersuchung der Makrophagenfunktionen in der Lunge.....	61
3.1.6.1	Untersuchung der <i>il-12p40</i> -mRNA-Expression.....	61
3.1.6.2	Untersuchung der Differenzierung unterschiedlicher Makrophagenpopulationen.....	62
3.1.6.2.1	Untersuchung der Differenzierung klassisch aktivierter Makrophagen.....	63
3.1.6.2.2	Untersuchung der IL-4R α - und Mannoserezeptor- Expression auf Makrophagen.....	64
3.1.6.2.3	Untersuchung der IL-10-abhängigen IL-4R α -Expression auf Makrophagen <i>in vitro</i>	65
3.1.6.2.4	Untersuchung der <i>arg-1</i> -mRNA-Expression in der Lunge.....	66
3.2	Untersuchung des Einflusses IL-4R α -vermittelter Mechanismen auf die Immunantwort in einer <i>M. tuberculosis</i> -Infektion.....	68
3.2.1	Keimlastbestimmung in IL-4R α -defizienten Mäusen.....	68

3.2.2	Keimlastbestimmung in den Lungen von IL-13tg Mäusen.....	69
3.2.3	Histopathologische Untersuchungen der Lunge.....	70
3.2.4	Analyse der mRNA-Expression von <i>ifnγ</i> und <i>nos2</i> in der Lunge.....	72
3.2.5	Immunhistologischer Nachweis von NOS2 im Lungengewebe.....	73
3.2.6	Untersuchung IL-13-induzierter Gene in der Lunge.....	75
3.2.7	Untersuchung der mRNA-Expression von <i>socs3</i> in der Lunge.....	76
3.2.8	Immunhistologischer Nachweis der Arg-I im Lungengewebe.....	77
3.2.9	Histologische Untersuchung der Kollagenablagerung in der Lunge.....	79
3.2.10	Untersuchung der Nitratkonzentration im Serum.....	79
4.	Diskussion.....	81
5.	Zusammenfassung.....	99
6.	Literatur.....	100
DANKSAGUNG.....		113
LEBENS LAUF.....		115
ERKLÄRUNG.....		118

Abkürzungsverzeichnis

aaMφ	alternativ aktivierte Makrophagen
Abb.	Abbildung
A. dest.	lateinisch: <i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
Arg-I	Arginase-I
bp	Basenpaare
BSL3	biologisches Sicherheitslabor 3
CCR	CC-Chemokinrezeptor (Chemokinrezeptoruntergruppe mit zwei Cysteinresten)
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
°C	Grad Celsius
cDNA	engl.: complementary DNA (komplementäre DNA)
Chr.	Christi
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dT	Desoxythymidin
EZM	extrazelluläre Matrix
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
et al.	lateinisch: <i>et alii</i> (und andere)
FAS	engl.: <i>fibroblast-associated antigen</i>
Fc	engl.: <i>fragmentary crystallizable</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FZB	Forschungszentrum Borstel
xg	-fache Erdbeschleunigung
GN	Granulomnekrone
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HIV	engl.: <i>human immunodeficiency virus</i> (Humanes Immundefizienz Virus)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
i.p.	intraperitoneal
kaMφ	klassisch aktivierte Makrophagen
KBE	Kolonien bildende Einheiten
KFH	Kubik Fuß pro Stunde
KMM	Knochenmarksmakrophagen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LC	„LightCycler“
Lrg-47	p47 GTPase
L-NIL	L-N ⁶ -(1-Imino-Ethyl)-Lysin
LOHA	N ^w -hydroxy-L-Arginin
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid

LT α	Lymphotoxin α
<i>Mav</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
min	Minuten
ml	Milliliter
M	Molar
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MyD88	Myeloides Differenzierungsprotein 88
nm	Nanometer
NOS2	engl.: <i>nitric oxide synthase</i> (induzierbare Stickoxid-Synthase)
p	Protein
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridiniumchlorophyll-Protein
pH	lateinisch: <i>pondus hydrogenii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNI	engl.: <i>reactive nitric oxide intermediates</i> (reaktive Stickstoffintermediate)
ROI	engl.: <i>reactive oxygen intermediates</i> (reaktive Sauerstoffintermediate)
s	Sekunde
STF	engl.: <i>soluble tuberculosis factor</i>
supM ϕ	suppressive Makrophagen
Tab.	Tabelle
TB	Tuberkulose
TH1-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	„Toll-like Rezeptor“
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFSF6	engl.: <i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	engl.: <i>unit</i> (Einheit)
v.	von
V	Volt
VLA	engl.: <i>very late activation antigen</i>
w	Wochen
(w/v)	engl.: <i>weight per volume</i>

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Tuberkulose

Die Tuberkulose (TB) ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die als solche mit jährlich 2,2 Millionen Todesfällen die meisten Opfer fordert [Ulrichs und Kaufmann 2003]. Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit dem Erreger der Krankheit, dem gram-positiven Bakterium *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* infiziert. TB ist seit dem Altertum bekannt und wurde bereits 460 v. Chr. durch Hippokrates als die weitverbreitetste Krankheit bezeichnet [Regal und Nanut 2005]. Schon vor der Einführung von Medikamenten gegen die TB konnte durch eine Verbesserung der Lebensbedingungen und Hygienestandards ein Rückgang der TB-Fälle erreicht werden. Durch die Entwicklung von Antibiotika ging die Zahl bis 1985 noch weiter zurück [Danneberg 1999, WHO 2003]. Aufgrund einer Vielzahl von Faktoren ist seitdem allerdings eine stetige Zunahme der Krankheitsfälle zu verzeichnen [Danneberg 1999, WHO 2003].

Aktuell sind etwa 20 Millionen Menschen an einer aktiven TB erkrankt, wobei jährlich nahezu 8 Millionen Neuerkrankungen hinzukommen [Ulrichs und Kaufmann 2003]. 80% dieser TB-Fälle kommen hauptsächlich in der „Dritten-Welt“, in den sog. „*high-burden*“-Ländern vor, in denen die Infektionsrate durch Krieg, Armut und Hungersnot erhöht ist. Außerdem spielen Koinfektionen mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) eine Rolle, die das Risiko einer TB-Erkrankung zusätzlich verstärken [Comstock 1994, Corbett et al. 2003, WHO 2005]. Zudem kommt es durch falsche Medikation zu einem vermehrten Auftreten resistenter und multiresistenter Bakterienstämme vor allem in den Staaten des ehemaligen Ostblocks [WHO 2003]. Durch zunehmende Mobilität der Bevölkerung aufgrund geöffneter Grenzen ist die Verbreitung dieser Stämme auch in den Industriestaaten zu befürchten [WHO 2003].

Die weltweite Zunahme der TB-Fälle und die wachsende Zahl schwer behandelbarer Bakterienstämme, erfordern die Entwicklung neuer Impfstoffe und Therapien. Hierzu ist ein näheres Verständnis der Schutz-vermittelnden Immunreaktion im Verlauf der TB dringend notwendig.

1.2 Der Verlauf der humanen Tuberkulose

Die Lungentuberkulose ist die häufigste und epidemiologisch am weitesten verbreitete Form der humanen TB. Die Übertragung des Erregers findet über Tröpfcheninfektion bei engem Kontakt mit erkrankten Personen statt [Ehlers 2003]. Hierbei gelangen die Bakterien in die Lunge, sofern sie nicht durch die Zilienbewegung in den Atemwegen wieder aus dem Organismus geschleust oder bereits in den Bronchien bzw. Alveolen unschädlich gemacht werden [Danneberg 1999, Flynn und Chan 2001a]. Gelangt der Erreger in die Lunge, so reicht die Kompetenz des Immunsystems -in Abhängigkeit von der genetischen Disposition und des Alters der Betroffenen- in 5-10% der Fälle nicht aus, um eine Erkrankung zu verhindern und es kommt zu einer sog. Primärtuberkulose [Danneberg 1999]. Auch wenn es nach Infektion zu keiner Erkrankung kommt, ist das Immunsystem meist nicht in der Lage den Erreger vollständig zu eliminieren. Die Bakterien persistieren lebenslang in der Lunge. In dieser Phase, die man auch als Latenz bezeichnet, findet keine Vermehrung des Bakteriums statt [Ulrichs und Kaufmann 2003]. Die Infektion ist zwar mit Hilfe des Tuberkulin-Hauttests nachweisbar, jedoch verläuft dieses Stadium klinisch inapparent. Nach überwundener Primärinfektion oder ausgeheilter TB kann es jederzeit durch eine Suppression des Immunstatus zu einer Reaktivierung der persistierenden Bakterien kommen. Man spricht in diesem Fall von einer Postprimärtuberkulose [Ehlers 2003, Flynn und Chan 2001b]. Während der Primär- bzw. Postprimärtuberkulose kann es durch lymphatische Streuung der Bakterien zu einem Befall der regionalen Lymphknoten kommen. Des Weiteren ist eine hämatogene Ausbreitung der Bakterien über die Gefäßsysteme der Lunge beschrieben, die zu einem Befall sämtlicher Organe, wie Leber, Milz und sogar dem Gehirn führen kann [Danneberg und Rook 1994, Ehlers und Hölscher 2005].

1.3 Die Immunologie der Tuberkulose

1.3.1 Das experimentelle Tiermodell

Dem experimentellen Studium der humanen TB sind aufgrund ethischer Grundsätze Grenzen gesetzt; darüber hinaus können immunologische Phänomene in Zellkultursystemen nur unabhängig von der Komplexität des Immunsystems betrachtet werden. Um die biologischen und immunologischen Vorgänge während einer Infektion genauer untersuchen zu können, greift man daher auf Tiermodelle zurück. Viele Erkenntnisse bezüglich der Abwehrmechanismen des Immunsystems und der Überlebensstrategien des Erregers wurden durch Infektionsstudien in der Maus erlangt [Flynn und Chan 2001a, North und Jung 2004]. Das Immunsystem der Maus ist dem des Menschen in vielerlei Hinsicht ähnlich und eignet sich daher besonders gut zum Studium immunologischer Vorgänge *in vivo*. So zeigte die Sequenzierung des humanen und murinen Genoms, dass beide Spezies jeweils nur etwa 300 einzigartige Gene besitzen [Mestas und Hughes 2004, Waterston et al. 2002]. Da die Maus leicht genetisch manipulierbar ist, sind gezielte Untersuchung der Bedeutung einzelner Zellen bzw. Mediatoren für die Abwehr der Infektion durch deren Deletion oder vermehrte Expression möglich. Man spricht hierbei von Gen-defizienten bzw. transgenen Tieren. Außerdem ist es möglich genetisch resistente und suszeptible Mausstämmen vergleichend zu untersuchen [North und Jung 2004]. Diese werden aufgrund ihrer Überlebensdauer nach einer Infektion mit *Mtb* als solche definiert.

1.3.2 Die Induktion der zellulären Immunantwort

Nach der Aerosolübertragung der Mykobakterien in die Lunge treffen diese zunächst auf Zellen des angeborenen Immunsystems, die erste Verteidigungslinie der Immunabwehr [van Crevel et al. 2002]. Makrophagen sind die Wirtszellen der Mykobakterien, die Erreger über phylogenetisch hoch konservierte Mustererkennungsrezeptoren auf ihrer Oberfläche erkennen. Die Phagozytose der Erreger wird über Rezeptoren wie dem Mannoserezeptor (MR), sowie Komplement- und Fc (*engl. fragment crystallizable*)-Rezeptoren vermittelt [van Crevel et al. 2002]. Hierbei ist der jeweils genutzte Rezeptor entscheidend für die

folgenden intrazellulären Prozesse, die zu einer Initiierung der Immunabwehr führen [Ernst 1998, Ulrichs und Kaufmann 2003, van Crevel et al. 2002]. Nach Bindung an den Mannoserezeptor (MR) kommt es zu einer Aktivierung der Immunabwehr, wohingegen eine Phagozytose komplementopsonisierter Bakterien den Erregern ein „verstecktes Eintreten“ in die Wirtszelle ermöglicht [Pieters 2001, van Crevel et al. 2002]. Auf die Phagozytose folgt die intrazelluläre Fusion von Phagosom und Lysosom, wobei die in den Lysosomen enthaltenen Hydrolasen und Proteasen in der Lage sind, die Erreger zu degradieren und zu prozessieren [Cohn 1963, Desjardins 1995, Vergne et al. 2004]. Mykobakterien haben allerdings Strategien entwickelt, dieser Degradierung teilweise zu entgehen. Es wurde gezeigt, dass mykobakterielle Sulfatide und multiacetylierte Threolase-2-Sulfate die Fusion von Phagosom und Lysosom inhibieren können [Goren et al. 1976a und b, Vergne et al. 2004]. Kommt es zu einer Degradierung der Bakterien, so erfolgt die Beladung von MHC (engl.: *major histocompatibility complex*)II-Molekülen mit mykobakteriellen Antigenen und die anschließende Präsentation auf der Zelloberfläche an Antigen-spezifische T-Zellen. Dieser Vorgang wird durch die Expression kostimulatorischer Moleküle unterstützt [Greenberg und Grinstein 2002, Harding et al. 2003, Honey und Rudensky 2003].

Toll-like Rezeptoren (TLR)2 und 4 auf Makrophagen und Dendritischen Zellen sind ebenfalls Mustererkennungsrezeptoren, die konservierte, bakterielle Strukturen wie Lipopeptide (LP) und Lipopolysaccharide (LPS) erkennen. Für *Mtb* sind z.B die TLR2-Agonisten STF (engl.: *soluble tuberculosis factor*) und das 19kDa-Protein bekannt [Brightbill et al. 1999, Doherty und Arditi 2005, Means et al. 1999]. Durch die Interaktion dieser Rezeptoren mit dem intrazellulären Myeloiden Differenzierungsprotein (MyD)88 kommt es zu einer intrazellulären Signalgebung, die zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 führt [Underhill 1999]. Somit tragen Toll-like Rezeptoren zur initialen Aktivierung infizierter Makrophagen bei [Means et al. 1999, Reiling et al. 2002].

Diese frühen Interaktionen führen zum Auslösen einer Immunantwort, bei der es zur Sekretion von Chemokinen und Zytokinen kommt. Chemokine vermitteln die Rekrutierung weiterer Immunzellen aus den peripheren Blutgefäßen in das infizierte Gewebe [Flynn und Chan 2001a, van Crevel et al. 2002]. Die Sekretion des Tumor Nekrose Faktor (TNF) unterstützt diesen Prozess, indem eine lokale Entzündungsreaktion stimuliert wird. Der Blutfluss wird infolge dessen durch eine

Gefäßweiterung verlangsamt und erleichtert somit die Migration von Immunzellen in das infizierte Gewebe. Dieser Vorgang wird zusätzlich durch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen begünstigt [Flynn und Chan 2001a]. Ortsansässige und neu rekrutierte Makrophagen sind vor der Entwicklung einer zellulären Immunantwort nicht adäquat aktiviert und somit nicht in der Lage, effektiv antimykobakterielle Effektorfunktionen auszubilden [Flynn Chan 2001a, Pieters 2001, van Crevel et al. 2002]. Sie vermitteln jedoch in Abhängigkeit der genetischen Disposition und des Immunstatus des Wirts zunächst eine gewisse Resistenz, die allerdings die Infektion nicht oder nur zeitweise eindämmen kann. In der Regel kommt es zu einem frühen, nahezu unbeeinträchtigten, exponentiellen Wachstum der Bakterien, was zum Untergang der Wirtszelle und zur Freisetzung der Erreger führt [Ehlers 2003]. Außerdem werden Vesikeln, die bakterielle Bestandteile enthalten abgeschnürt, welche durch neu rekrutierte Makrophagen und Dendritische Zellen phagozytiert werden [Flynn und Chan 2001a, Winau et al. 2004]. Unreife Dendritische Zellen sind spezialisierte Phagozyten, die eine zentrale Rolle in der Initiation der zellulären Immunantwort spielen. Sie sind in der Lage lösliche, bakterielle Komponenten aufzunehmen, zu prozessieren und im MHCII-Komplex auf der Zelloberfläche spezifischen T-Zellen zu präsentieren. Die so aktivierten Dendritischen Zellen exprimieren vermehrt den CC-Rezeptor (CCR)7 auf der Oberfläche, infolgedessen sie entlang eines Chemokingradienten über die afferenten Lymphgefäße in die regionalen Lymphknoten einwandern [Banherau und Steinmann 1998, Banherau et al. 2000, Bhatt et al. 2004]. Hier erfolgt die Initiation der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Durch Präsentation mykobakterieller Antigene mit Hilfe der kostimulatorischen Moleküle CD (engl.: *cluster of differentiation*)80 und CD86 an dort vorkommende, naive T-Zellen kommt es zur Aktivierung und klonalen Expansion der T-Zellen. Diese Interaktion und die gleichzeitige Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-18 durch Dendritische Zellen sind für eine sog. TH1-Polarisation der Immunantwort verantwortlich [Heath et al. 2002, Swain 2001].

Durch eine Änderung des Expressionsprofils von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche verlassen aktivierte T-Zellen den Lymphknoten und wandern über den Blutstrom entlang eines Chemokingradienten zum Infektionsort. Die Migration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in infiziertes Gewebe wird über Adhäsionsmoleküle wie

ICAM (engl.: *intracellular adhesion molecule*)-1 und VLA (engl.: *very late activation antigen*)-4 auf der Zelloberfläche ermöglicht [Flynn und Chan et al. 2001a, Lukacs et al. 1994]. Entgegen der vorherrschenden Meinung spielen E- und P-Selektinliganden, welche auf zirkulierenden Lymphozyten exprimiert werden, für die Rekrutierung vom Lymphozyten in die Lunge vermutlich eine untergeordnete Rolle [Schreiber et al. 2006]. Die Rekrutierung weiterer Immunzellen in das infizierte Gewebe wird durch die Sekretion von IFN γ und Lymphotoxin α (LT α) begünstigt, da hierdurch eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und die Migration weiterer Immunzellen erleichtert wird [Flynn und Chan 2001a, Roach et al. 2001].

1.3.3 Die T-Zell-Immunantwort

T-Zellen sind für die Abwehr von Infektionskrankheiten wie TB unabdingbar. Durch die Rekombination einzelner Gensegmente sind sie in der Lage eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche zu exprimieren. Dies erlaubt die Erkennung verschiedener Antigene. Man unterscheidet hierbei die Generierung von T Helfer (H)1- und TH2-Zellen. Die Dominanz einer dieser beiden Zelltypen hängt von den Bedingungen ab, die während der Initiation der T-Zell-Immunantwort im Lymphknoten herrschen [Kidd 2003]. In diesem Zusammenhang spielt vor allem die frühe Sekretion von Zytokinen während der Antigen-Präsentation durch Dendritische Zellen eine Rolle, die durch die Art des Erregers bestimmt wird [Kidd 2003, Moser und Murphy 2000]. Nach Infektion intrazellulärer Pathogene wie *Mtb* oder *Leishmania (L.) major* kommt es durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-12 zur Entwicklung einer TH1-polarisierten Immunantwort [Moser und Murphy 2000]. TH1-Zellen sind zum einen in der Lage durch eine autokrine Wirkung die eigene Differenzierung zu unterstützen, zum anderen bewirken sie die Abwehr und Eliminierung intrazellulärer Pathogene [Kidd 2003, MacMicking et al. 1997, MacMicking et al. 2003, Reiner und Locksley 1995].

Durch Nematoden wie *Schistosoma mansoni* wird hingegen eine TH2-Immunantwort ausgelöst [Dunne und Pearce 1999, Pearce et al. 2004]. Hierbei sind vor allem die Sekretion von IL-4 und IL-6 während der Antigen-Präsentation im Lymphknoten entscheidend [Kidd 2003, Moser und Murphy 2000]. IL-4

unterstützt durch seine autokrine Wirkung die Polarisation dieses T-Zelltyps, außerdem induziert es die Antikörperproduktion durch Aktivierung von B-Zellen [Kidd 2003].

Neben der spezifischen Abwehr von Pathogenen ist die gegenseitige Regulation eine wesentliche Eigenschaft der TH1- und TH2-Zellen. Durch die Sekretion von Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) sind TH1-Zellen beispielsweise in der Lage die TH2-Proliferation zu hemmen. Die vermehrte Produktion von IL-4 und IL-6 durch TH2-Zellen inhibiert hingegen die Generierung von TH1-Zellen [Kidd 2003].

In TB-Infektionen spielen vor allem CD4^+ T-Zellen für die Entwicklung antimykobakterieller Effektormechanismen eine tragende Rolle. Nach Aktivierung und Migration in das infizierte Lungengewebe sezernieren sie nach Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen $\text{IFN}\gamma$, welches synergistisch mit TNF zur Abtötung intrazellulärer Mykobakterien führt [Flesch und Kaufmann 1987, Flesch und Kaufmann 1990, Rook et al. 1986, Stenger und Modlin 1999].

Im Zuge der Initiierung der zellulären Immunantwort im Lymphknoten kommt es auch zur Aktivierung von CD8^+ T-Zellen, welche ihr zytotoxisches Potential nach Antigenpräsentation über MHC I entfalten. Dies setzt einen endogenen Antigen-Prozessierungs- und Präsentationsweg voraus, welcher vor allem in viralen Infektionen beschrieben ist und durch das Vorkommen extraendosomalen Antigens induziert wird [Flynn und Chan 2001a]. Welche Umstände in einer TB-Infektion zum Vorkommen extraendosomalen Antigens führen, ist noch nicht ausreichend erforscht. Es wurde beschrieben, dass Antigene durch eine Mykobakterien-induzierte Perforierung der Phagolysosomenmembranen ins Zytosol gelangen können [Flynn und Chan 2001a, Teitelbaum et al. 1999]. Spät in der Infektion kann es zudem durch die Aufnahme von bakteriellen Antigenen apoptotischer Makrophagen durch Dendritische Zellen zu einer MHC I-Präsentation kommen [Ulrichs und Kaufmann 2003]. Nach Erkennung dieses Komplexes entwickeln CD8^+ T-Zellen durch die Sekretion von Perforin, Granzym und Granulysin ihr zytotoxisches Potential. Perforin bildet in den Zielzellen Poren aus, wodurch Granzyme und Granulysin in die Zellen gelangen. Durch Granzyme wird der programmierte Zelltod, die Apoptose ausgelöst. Granulysin hingegen kann zur Zerstörung intrazellulärer Erreger wie *Mtb* führen [Flynn und Chan 2001a, Serbina et al. 2000, Stenger und Modlin 1999]. Da CD8^+ T-Zellen ebenfalls

IFN γ bilden, sind auch diese Zellen in der Lage, Makrophagen zu aktivieren [Tascon et al. 1998].

1.3.4 Effektorfunktionen und Granulombildung

Eine wesentliche Eigenschaft der Makrophagen ist die Ausbildung IFN γ -abhängiger Effektorfunktionen, die zum Abtöten intrazellulärer Pathogene essentiell sind, wie die Generierung von reaktiven Sauerstoff (ROI)- und Stickstoffintermediaten (RNI) [Chan et al. 1992, Cooper et al. 1993, Flesch und Kaufmann 1987, Walker und Lawrie 1981]. Die vermehrte Produktion von TNF trägt zur proapoptotischen Eigenschaft von aktivierten Makrophagen bei und geht mit einer Sekretion von FAS (engl.: *fibroblast-associated antigen*) und TNFSF (engl.: *tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member*)6 einher. Zudem kommt es zu einer Freisetzung proteolytischer Enzyme (z.B. Matrix Metalloproteinasen (MMP)2, 9, 12), die die extrazelluläre Matrix (EZM) degradieren [Gibbs et al. 1999a und b].

Da TNF ebenfalls zur erweiterten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen beiträgt, kommt es zur Akkumulation mononukleärer Zellen in der Lunge, die „knötchenartig“ (lateinisch: *tuberculum*) strukturiert sind [Ehlers 2003, Lukacs et al. 1994]. Durch die erweiterte Zellrekrutierung kommt es zu Ausbildung sog. „Granulome“ (Abb.1). Dieser Begriff beschreibt eine Anordnung von unterschiedlichen Immunzellen in Geweben aufgrund einer Entzündungsreaktion. Die Entstehung dieser Granulome ist ein typisches Merkmal der TB, das sowohl im Menschen als auch in der Maus beobachtet werden kann [Ehlers und Hölscher 2005]. In der humanen TB kommt es zu einer charakteristischen Organisation der infiltrierten Immunzellen, wobei sich im Zentrum epitheloidzellartige Makrophagen befinden, die teilweise zu Langhans-Riesenzellen verschmelzen. Diese sind von einem Lymphozytensaum umgeben, wobei sich CD4⁺ T-Zellen zentrumsnah und CD8⁺ T-Zellen zentrumsfern befinden [Gonzalez-Juarrero 2001]. Innerhalb des Granuloms ist daher eine enge Kooperation dieser Zellen gewährleistet [Ehlers und Hölscher 2005]. Im Verlauf der Infektion werden diese Granulome durch vermehrte Kollagenbildung der Fibroblasten abgegrenzt. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit einer weiteren Ausbreitung der Erreger minimiert [Boros 1978, Chiamonte et al. 1999]. Kann die Infektion in diesem Stadium eingedämmt

werden, so kommt es zu einer verminderten Rekrutierung von Immunzellen und die Größe des Granuloms verringert sich. Man spricht von einer sog. Verkalkung der Granulome. Kommt es im Zuge der Granulombildung nicht zu einer Eindämmung des Erregerwachstums, so „verkäsen“ diese im Zentrum. Dieser Vorgang wird als „Granulomnekrose“ (GN) bezeichnet. Durch freigesetzte Enzyme untergegangener Zellen können irreversible Schädigungen des Gewebes verursacht werden. Diese „Verkäsung“ wirkt zunächst bakteriostatisch [Danneberg und Rook 1994, Ehlers 2003].

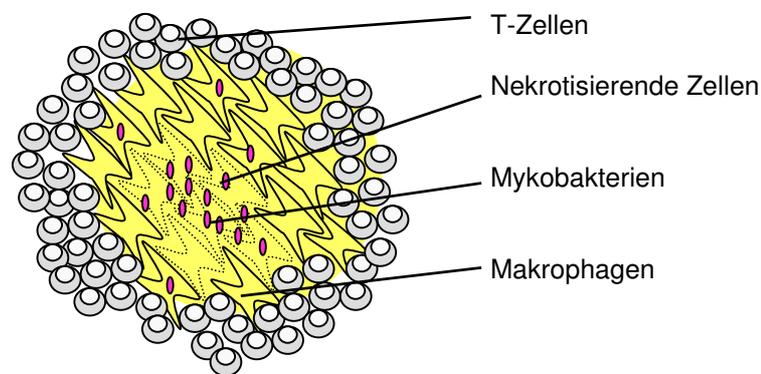


Abb. 1: Granulomnekrose in der Lunge

Im Verlauf der TB kommt es zu einer charakteristischen Organisation von Makrophagen und T-Zellen in der Lunge, dem sog. Granulom. Mit Fortschreiten der Erkrankung nekrotisieren infizierte Zellen im Zentrum des Granuloms und es bildet sich eine sog. Granulomnekrose aus. Hierdurch werden Mykobakterien freigesetzt.

Eine Beteiligung zytolytischer oder apoptotischer Vorgänge an der Ausbildung der Granulomnekrose konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf verflüssigen die verkästen Areale, die in diesem Stadium nicht mehr bakteriostatisch wirken, sondern erneut Bedingungen für eine weitere Erregervermehrung schaffen. Das Granulom wird infolgedessen instabil und es kommt zu einem Einbruch in die Bronchien. Erregerhaltiges Sputum kann in die Umgebung gelangen. In dieser Phase der Erkrankung sind die Betroffenen infektiös und leiden an einer „offenen TB“ [Ehlers 2003].

Das immunpathologische Phänomen der humanen GN konnte im Mausmodell nach Infektion mit *Mtb* bisher nicht gezeigt werden. Es werden zwar ebenfalls Makrophagen und Lymphozyten in das infizierte Lungengewebe rekrutiert, jedoch kann eine geordnete Organisation dieser Granulome beobachtet werden und es

kommt zu keiner Verkäsung [Ehlers 2003]. Nekrotisierende Granulome konnten nur im *Mtb*-Infektionsmodell mit Kaninchen oder Meerschweinchen, sowie nach Infektion von Mäusen mit *Mycobacterium avium* (*Mav*) beobachtet werden, in denen sich nach etwa 14 Wochen eine GN ausbildet [Benini et al. 1999]. Da das Immunsystem der Maus im Gegensatz zu dem des Kaninchens ausführlich beschrieben wurde, wird zur Untersuchung dieses immunpathologischen Phänomens das Infektionsmodell mit *Mav* bevorzugt. So konnte durch Infektion von gendefizienten Mäusen mit *Mav* festgestellt werden, dass IFN γ -produzierende $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor-tragende CD4⁺ T-Zellen für die Ausbildung einer GN verantwortlich sind [Ehlers et al. 2001].

1.3.5 Die Bedeutung von antiinflammatorischen Zytokinen in der Tuberkulose

Die Bedeutung von antiinflammatorischen Zytokinen vor allem im Zuge einer TH2-Immunantwort ist bis heute in der TB unzureichend erforscht. Patienten mit aktiver Tuberkulose zeigten in einigen Studien jedoch eine vermehrte TH2-Immunantwort [Lienhardt et al. 2002, Raja 2004, Sanchez et al. 1994, Sodhi et al. 1997], allerdings stehen diese Untersuchungen im Widerspruch zu der Beobachtung eines erhöhten IFN γ -Spiegels in Broncho-Alveolar-Lavagen von Patienten [Raja 2004, Robinson et al. 1994].

Für die Kontrolle intrazellulärer Pathogene wie *Mtb* oder *L. major* ist die Entwicklung einer funktionellen TH1-Antwort essentiell [Reiner und Locksley 1995], während eine TH2-Antwort der Abwehr intrazellulärer Pathogene eher entgegen wirkt [Matthews et al. 2000, Noben-Trauth et al. 1996].

IL-10 wird in Infektionen sowohl von T-Zellen als auch von Makrophagen sezerniert und wird allgemein als immunsupprimierendes Zytokin beschrieben [Bogdan et al. 1991, Fiorentino et al. 1991a und b, Fiorentino et al. 1998]. Während der IL-10-Rezeptor (R)2 auf den meisten Körperzellen vorkommt, wird der IL-10R1 ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen exprimiert und nach Aktivierung heraufreguliert [Moore 2001]. IL-10 ist in der Lage suppressiv auf Makrophagen zu wirken, indem es unter anderem die IL-12-Produktion dieser Zellen inhibiert. Dadurch kommt es zu einer geschwächten Aktivierung von TH1-

Zellen, die infolgedessen verminderte Mengen IFN γ produzieren. Daher antagonisiert IL-10 indirekt die Funktionen von IFN γ [Fiorentino et al. 1991 a und b, de Waal Malefyt et al. 1991]. In transgenen Mäusen konnte beispielsweise nach *Mtb*-Infektion gezeigt werden, dass eine T-Zell-spezifische Überexpression von IL-10 zu einer Hemmung der TH1-Immunantwort führt und somit zu einer stark erhöhten Suszeptibilität dieser Tiere gegenüber der Infektion [Turner et al. 2002]. Außerdem wird durch die vermehrte Sekretion von IL-10 die Generierung von regulatorischen T-Zellen vermittelt, welche sich durch die konstitutive Expression von CD25 auszeichnen. Sie sind in der Lage die Differenzierung von TH1 und TH2-Zellen zu beeinflussen und die Aktivierung und Proliferation autoreaktiver T-Zellen zu inhibieren [Kidd 2003]. Darüber hinaus sind regulatorische T-Zellen wahrscheinlich an der Suppression einer protektiven TH1-Immunantwort in Infektionen beteiligt [Belkaid et al. 2002]. In einigen Infektionsmodellen wurde ein Einfluss von IL-10 auf immunpathologische Phänomene beschrieben. So führte z.B eine Deletion des Zytokins in *Mav*-Infektionen zu einer verstärkten GN, die neben der Lunge auch in der Leber beobachtet werden konnte [Ehlers et al. 2001]. Dies zeigte, dass die Anwesenheit von IL-10 in *Mav*-Infektionen der GN entgegenwirkt.

Neben IL-10 sind auch die TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 in der Lage die Immunantwort zu modulieren [Barner et al. 1998, Kidd 2003]. Diese Zytokine werden vor allem von T-Zellen gebildet und können ihre Wirkung über verschiedene Rezeptoren auf unterschiedliche Zelltypen entfalten. IL-4 kann beispielsweise die Differenzierung von TH2-Zellen über das IL-4R α -IL-2R γ -Heterodimer auf T-Zellen initiieren. Über diesen Rezeptor kommt es ebenfalls zur Aktivierung von B-Zellen und der Produktion von Antikörpern [Howard et al 1982]. Des Weiteren induziert IL-4 den „Klassenswitch“ der Antikörper-Isotypen, so dass vor allem Immunglobulin (Ig)E sezerniert wird [Oettgen 2002]. Außerdem kann IL-4 aktiv die TH1-Differenzierung hemmen und somit die Immunantwort modulieren [Kidd 2003]. Durch die hohe Affinität zum IL-4R α -IL13R α -Heterodimer auf myeloiden Zellen beeinflusst IL-4 zudem Makrophagenfunktionen [Gordon 2003, Herbert et al. 2004]. Da IL-13 diesen Rezeptor ebenfalls mit hoher Affinität binden kann, haben IL-4 und IL-13 diese Funktion gemein. IL-13 wird außerdem als profibrotisches Zytokin beschrieben, welches über unterschiedliche Mechanismen

vor allem Fibroblasten zur Kollagenproduktion stimuliert. Dies trägt wesentlich zur Geweberekonstruktion nach Entzündungsprozessen bei [Doucet et al. 1998, Wynn 2004].

Ein wichtiges Merkmal beider Zytokine ist vor allem die hemmende Wirkung auf eine TH1-Immunantwort. Sowohl IL-4, als auch IL-13 sind in der Lage die Produktion proinflammatorischer Zytokine von Makrophagen zu inhibieren [Gordon 2003, Doherty et al. 1993]. Eine TH2-Antwort ist somit in der Lage sowohl die proinflammatorische Wirkung einer TH1-Antwort, als auch die daraus resultierende Gewebedestruktion zu antagonisieren. Die Rolle von TH2-Zellen bzw. TH2-Zytokinen in der humanen und experimentellen TB wird allerdings kontrovers diskutiert [Lienhardt et al. 2002, Raja 2004, Robinson et al. 1994, Sanchez et al. 1994, Sodhi et al. 1997]. Untersuchungen im Mausmodell zeigten, dass in der akuten Phase eine TH1-Antwort in den Versuchstieren stark dominiert [Flynn und Chan 2001a]. Erst in der chronischen Phase sind TH2-Zytokine in geringem Maße nachweisbar [Hernandez-Pando et al. 1996, Orme et al. 1995]. Patientenstudien legen allerdings nahe, dass TH2-Zellen in der humanen TB für den Ausgang der Erkrankung eine bedeutsame Rolle spielen [Lienhardt et al. 2002, Raja 2004]. Inwieweit diese zu einer Verminderung der Gewebedestruktion beitragen ist bisher unklar.

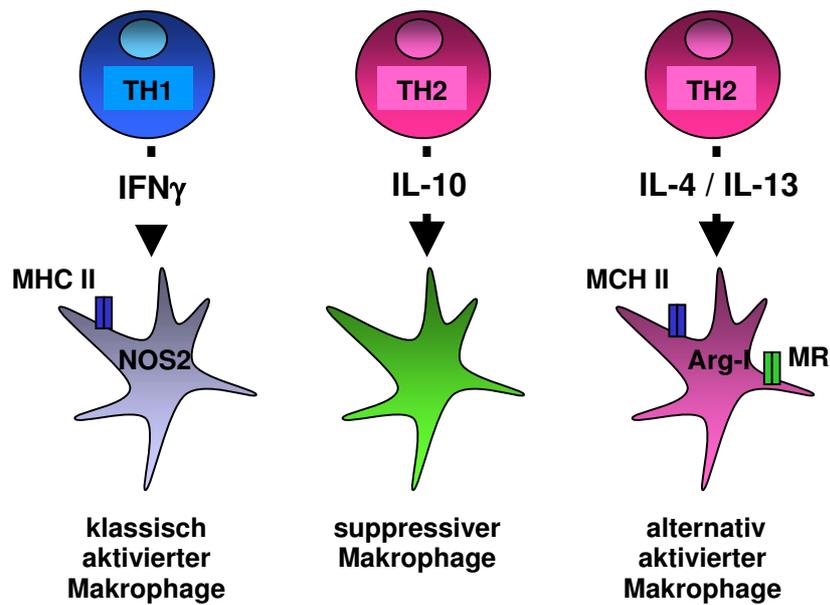
1.3.6 Die Wirkung von TH1- und TH2-Zytokinen auf die Makrophagendifferenzierung

Bevor über eine therapeutische Verwendung von TH2-Zytokinen zur Verhinderung der Mykobakterien-induzierten Gewebedestruktion nachgedacht werden kann, muss die immunmodulatorische Bedeutung dieser Zytokine in der *Mtb*-Infektion aufgeklärt werden. Vor allem der Einfluss auf Makrophagen als zentrale Effektorzellen in der TB und die immunregulatorischen Folgen sind unzureichend untersucht. Die Entwicklung einer funktionellen TH1-Antwort führt durch die Sekretion von IFN γ zusammen mit einem mikrobiellen Stimulus wie *Mtb* zu einer klassischen Aktivierung von Makrophagen (Abb. 2). Im Zuge dieser Aktivierung ändert sich die Zellmorphologie sowie das sekretorische Profil der Zelle [Gordon 2003, Luster 2002]. Es werden proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 und TNF sowie Chemokine sezerniert, die ihrerseits Einfluss auf rekrutierte Zellen ausüben [Luster 2002]. Unabdingbar für eine Bekämpfung intrazellulärer Erreger sind die Effektorleistungen klassisch aktivierter Makrophagen (kaM ϕ), welche vor allem durch die Induktion IFN γ -abhängiger Gene wie der Stickoxidsynthase *nos2* (engl.: *nitric oxide synthase2*) und der GTPase *Irg-47* entwickelt werden [Feng et al. 2004, Flesch und Kaufmann 1987, Flynn und Chan 2001a, MacMicking et al. 1997, MacMicking et al. 2003]. NOS2 generiert reaktive Stickstoffintermediate und ist essentiell für die intrazelluläre Eliminierung von Mykobakterien [Flynn und Chan 2001a]. LRG-47 ist für die Phagosomenreifung unabdingbar [Feng et al. 2004, MacMicking et al. 2003]. Morphologisch können die kaM ϕ durch die vermehrte Expression der Oberflächenmoleküle MHC II sowie dem kostimulatorischen Molekül CD86 charakterisiert werden [Mosser 2003].

Die Ausbildung einer TH2-Immunantwort kann die Aktivierung von Makrophagen durch die Sekretion von IL-4, IL-10 und IL-13 beeinflussen. So führt die Ausschüttung von IL-10 zur Differenzierung eines suppressiven Makrophagenphänotyps (supM ϕ), welcher durch die Herunterregulierung von MHC II und kostimulatorischer Molekülen charakterisiert ist [Bogdan et al. 1991; Ding et al. 1993, Gordon 2003] (Abb. 2). Makrophagen dieses Typs sind nicht in der Lage, antimikrobielle Effektorfunktionen auszubilden und wirken durch

die verringerte Expression von MHCII und die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine suppressiv auf andere Immunzellen [Gordon 2003].

Die Sekretion von IL-4 und IL-13 führt hingegen über die gemeinsame Rezeptorkette IL-4R α zur Differenzierung alternativ aktivierter Makrophagen (aaM ϕ) (Abb. 2) [Gordon 2003, Loke et al 2002, Mosser 2003]. Dieser Stimulus reicht zur Generierung eines alternativen Phänotyps aus und verlangt keinen zusätzlichen mikrobiellen Reiz wie bei der Generierung kaM ϕ [Gordon 2003, Mosser 2003]. Charakteristisch für diesen Zelltyp ist eine vermehrte Pinozytose und Phagozytose von Antigen, was durch die Heraufregulierung der MR-Expression unterstützt wird [Stein et al. 1992]. Allerdings sind diese Makrophagen nicht in der Lage RNI zu generieren und unterscheiden sich daher maßgeblich von kaM ϕ . Sie sezernieren hauptsächlich antiinflammatorische Mediatoren, wie IL-10 [Mosser 2003]. Da sie allerdings ebenfalls vermehrt MHC II auf der Zelloberfläche exprimieren, können diese Zellen im Gegensatz zu supM ϕ nicht als suppressiv bezeichnet werden. Ein weiteres Merkmal aaM ϕ ist die Hochregulierung des Enzyms Arginase (Arg)-I, welches durch die Metabolisierung von L-Arginin vermehrt Proline, eine Komponente des Kollagens, sowie Polyamine, welche essentielle Bestandteile der Zellproliferation sind, produziert [Gordon 2003, Gratchev et al. 2001, Hesse et al. 2001, Munder et al. 1998, Song et al. 2000]. Die Bedeutung der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen, vor allem der alternativ aktivierten und suppressiven Phänotypen, ist in *in vivo*-Modellen unzureichend untersucht und in der TB bisher nicht beschrieben. Da Makrophagen zentrale Effektorzellen der Abwehr von *Mtb* darstellen, ist es wichtig das Vorkommen und das modulatorische Potential dieser Makrophagenphänotypen im Rahmen der Immunantwort gegen TB zu ergründen.



	kaM ϕ	supM ϕ	aaM ϕ
TNF	↑	↓	↓
IL-12	↑	↓	↓
IL-10	↓	↑	↑
MHCII	↑	↓	↑
CD86	↑	↓	↑
MR	↓	↑/↓	↑
NOS2	↑	↓	↓
Arg-I	↓	↓	↑

Abb. 2: Interaktion zwischen T-Zellen und Makrophagen

Dargestellt sind Makrophagenphänotypen, die sich aufgrund unterschiedlicher Stimuli differenzieren. Charakteristisch für die jeweiligen Phänotypen ist das sekretorische Profil (türkis), die Expression unterschiedlicher Rezeptoren auf der Zelloberfläche (blau) und die Aktivität intrazellulärer Enzyme (gelb), die in diesen Zellen herauf- (↑) oder herunterreguliert (↓) werden.

1.4 Fragestellung

Die Entwicklung einer TH1-Immunantwort ist für die Abwehr und Kontrolle mykobakterieller Infektionen unabdingbar, verursacht jedoch auch die Ausbildung charakteristischer Granulomnekrosen. TH2-Zytokine können die Generierung einer TH1-Dominanz antagonisieren und stellen daher im Hinblick auf die Verhinderung dieser Immunpathologie geeignete Modulatoren dar. Da die Verwendung dieser Modulatoren jedoch auch die Gefahr einer verminderten Schutzfunktion durch die Hemmung der TH-1-Differenzierung mit sich bringt, muss zuvor der modulatorische Einfluss von TH2-Zytokinen auf die protektive Immunabwehr untersucht werden.

Bisher wurde in diesem Zusammenhang im Mausmodell gezeigt, dass T-Zell-spezifisch überexprimiertes IL-10 die Suszeptibilität gegenüber einer *Mtb*-Infektion erhöht, was mit einer Suppression der Entwicklung einer T-Zell-spezifischen TH1-Immunantwort einher ging. Untersuchungen des Einflusses auf Makrophagen und die damit verbundenen antimykobakteriellen Effektorfunktionen wurden in diesem Zusammenhang allerdings vernachlässigt. Um die Wirkung von TH2-Zytokinen vor allem im Hinblick auf die differenzielle Aktivierung von Makrophagen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Makrophagen-spezifisch IL-10-überexprimierende (macIL-10tg) und IL-13transgene (IL-13tg) Mäuse mit *Mtb* infiziert. Hierbei sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Kommt es durch die Überexpression von IL-10 und IL-13 zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit *Mtb*?
- Wird die Entwicklung einer T-Zell-spezifischen Immunantwort in macIL-10tg und IL-13tg Mäusen beeinträchtigt?
- In wieweit wird die differentielle Aktivierung und die damit verbundenen Effektorfunktionen von Makrophagen durch die Überexpression von IL-10 und IL-13 moduliert?
- Welchen Einfluss hat die Überexpression von IL-10 und IL-13 auf die Pathologie?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autotechnicon (Hypercenter XP; SHADON, Pittsburgh, USA)
Blotapparatur (BIORAD Laboratories, München)
Brutschränke (HERAEUS, Hanau)
Durchflusszytometer (FACS Calibur; BECTON DICKINSON (BD), Heidelberg)
Elektrophoreseapparatur (BIORAD)
Heizplatte (MEDAX, Kiel)
Homogenisator (PotterS; BRAUN, Melsungen)
Inhalationssystem (Modell 099C A4224; GLASCOL, Indiana, USA)
Infektioskäfige (MIT, Hamburg)
LightCycler (ROCHE, Mannheim)
Mikroskop (ZEISS, Oberkochen)
Paraffingießstation (LEICA EG1140C; LEICA, Nussloch)
Rotationsmikrotom (LEICA RM2155; LEICA)
Wasserbad (GFL1052; Gesellschaft für Labortechnik GmbH (GFL), Burgwedel)
Zentrifugen Biofuge pico (Heraeus)

2.1.2 Sonstige Labormaterialien

ELISA-Platten (NUNC)
Histogrid (SIMPORT, Bernard-Pilon, Kanada)
Kanülen und Spritzen (BD)
Knopfkanüle (ACUFIRM, Dreieich)
Mikrotiterplatten (24/96-*well* Rund- und Flachboden; NUNC, Wiesbaden)
Neubauer Zählkammer (BRAND, Wertheim)
Objektträger (SuperFrostPlus; LANGENBRINCK, Emmendingen)
Petrischalen (SARSTEDT, Nümbrecht)
Pipetten (EPPENDORF)

Pistillen (RETTBERG, Göttingen)
Reaktionsgefäße (1,5–2ml; EPPENDORF)
Reaktionsgefäße (15–50ml; SARSTEDT)
Röhrchen (5ml; BD)
Serumseparationsröhrchen (BD)
Skalpelle (SWANN MORTEN, Sheffield, UK)
Zellkulturschalen (SARSTEDT/NUNC)
Zellsiebe (100µm; BD)
Zellsiebe (200µm; SIGMA)

2.1.3 Software

„Cellquest Pro“ (BD)
„LightCycler“ Software (ROCHE)
„Magellan“ (TECAN)

2.1.4 Reagenzien

Accutase (PAA, Pasching, Österreich)
Aceton (MERCK, Darmstadt)
Agarose (INVITROGEN, Karlsruhe)
Ammoniumchlorid (MERCK)
Acrylamid/Bis (MERCK)
Anillin (FLUKA Buchs, Schweiz)
Anilinblau (FLUKA)
APS (Ammoniumpersulfat; SERVA, Heidelberg)
Aqua dest. (Deionisierungsanlage, Forschungszentrum Borstel)
Avidin-*horseradish*-Peroxidase (HRP; BD)
Avidin/Biotin-Blockierungskit (VECTOR LABORATORIES, Burlingham, CA)
Azocarmin G (FLUKA)
Borsäure (MERCK)
BCP (1-Bromo-3-Chloro-Propan; SIGMA)
Bromphenolblau (SERVA)

BSA (bovine serum albumin; SIGMA)
Buraton (S&M, Norderstedt)
Cytofix/Cytoperm Kit (BD) bestehend aus Golgi-Plug, Cytofix/Cytoperm-Puffer
und 10xPerm Wash
DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tabletten-Set; SIGMA)
DEPC (Diethyl-Pyrocbonat; AMBION, Huntingdon, England)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; PAA)
DMSO (Dimethylsulfoxid; SIGMA)
DTT (Dithiothreitol; INVITROGEN)
DNA-Längenstandard (100 bp; BIOLABS, Schwalbach)
DNase I (SIGMA)
dNTPs (Deoxynucleosid-triphosphate; AMERSHAM)
ECL (AMERSHAM)
ELISA "OptEIA" Verdünnungs-und Blockpuffer (BD)
EDTA (Ethylendiamin-NNN',N'-tetraessigsäure; ICN BIOMEDICALS, Eschwege)
Eisessig (MERCK)
Entellan (MERCK)
Eosin (MERCK)
Ethanol (für Molekularbiologie) (MERCK)
Ethidiumbromid (SIGMA)
FCS (Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert; BIOCHROM, Berlin)
First Strand Puffer (5x; INVITROGEN)
Formalin (37%; MERCK)
Goldorange G (FLUKA)
Glycerin (MERCK)
Glycin (MERCK)
Hämatoxylin (MERCK)
HBSS (PAA)
Heparin (RATIOPHARM, Ulm)
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; PAA)
Isopropanol (SIGMA)
Kaisers Glyceringelatine (MERCK)
Kaliumchlorid (MERCK)

Kaliumhydrogenphosphat (MERCK)
Karbolfuchsin (MERCK)
Ketamin (10%; Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen)
Kochsalzlösung (isotonisch; BRAUN)
Kollagenase A (ROCHE)
L-Glutamin (BIOCHROM)
Löfflers-Methylenblau (MERCK)
MACS Separations Kit (LS-Säule; MILTENYI BIOTEC)
Magnesiumchlorid (INVITROGEN)
Mausserum (PAA)
 β -Mercaptoethanol (SIGMA)
Methanol (Merck)
Middlebrook 7H9 Medium (DIFCO)
Middlebrook 7H10 Medium (DIFCO)
M.O.M Blockierungskit (bestehend aus M.O.M: Diluent (Proteinkonzentrat), Ig-Blockierungslösung, Anti-Maus IgG-Antikörper (biotinyliert), VECTOR)
Natriumazid (MERCK)
Natriumchlorid (MERCK)
Natriumcitratdihydrat (MERCK)
Natriumhydrogencarbonat (MERCK)
Natriumhydrogenphosphat (MERCK)
Natronlauge (MERCK)
Natriumpyruvat (PAA)
Nitrit/Nitrat Farbttest (bestehend aus FarbreagenzI (Sulfanilamid und Stabilisatoren), FarbreagenzII (N-(Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid und Stabilisatoren), NADPH 0,5mg, FAD 0,09mg-Tabletten, Nitratreduktase (4U), Kaliumphosphatpuffer (pH=7,5); ROCHE)
OADC (Oleinsäure, Albumin, Dextrose, Katalase, BD)
Oligo-dT-Nukleotide (12-18mer; AMERSHAM)
Paraffin (Paraplast Plus; SHERWOOD MEDICAL, St. Louis, USA)
PCR-Puffer (10x, für konventionelle PCR; NEB, Schwalbach)
PCR-Puffer (10x, für quantitative PCR; INVITROGEN)
Penicillin/Streptomycin (BIOCHROM)

PFA (Paraformaldehyd; MERCK)
Propidiumiodid (SIGMA)
Protease Inhibitor Cocktail (Complete Mini; Roche)
Proteinase K (ROCHE)
Pyruvat (SIGMA)
Rattenserum (DIANOVA, Hamburg)
Reverse Transkriptase (Superscript II RT; INVITROGEN)
RNasin (RNase-Inhibitor; PROMEGA, Mannheim)
Rompun (2%; BAYER, Leverkusen)
Rotihistol (ROTH, Karlsruhe)
RPMI-1640 (mit HEPES; PAA)
RPMI-1640 (ohne HEPES; PAA)
Saccharose (SIGMA)
Salzsäure (HCl; MERCK)
Sarkosyl (MERCK)
Saponin (SIGMA)
SDS (Sodiumdodecylsulfat; AMERSHAM)
ST-CF (*short term culture filtrate*; aus einer experimentellen *Mtb*-Kultur;
(STATENS SERUM INSTITUT, Kopenhagen, Dänemark)
Streptavidin-horseradish-Peroxidase(HRP; BD)
SYBR-Green (ROCHE)
Taq-DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*; INVITROGEN)
TCH (Thiophen-2-arbonsäure-hydrazid, SIGMA)
Trifast (proGOLD; PEQLAB, Erlangen)
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; SERVA)
Triton-x-100 (SERVA)
Trypanblau (SIGMA)
Tween-20 (SIGMA)
Tween-80 (SIGMA)
Vectasin ABC Reagenz (VEKTOR)
Wasser (steril, pyrogenfrei; BRAUN)
Wasserstoffperoxid (37%; MERCK)

2.1.5 Lösungen und Medien

2.1.5.1 Medien und Nährböden für Bakterienkulturen

- Herz-Hirn-Agar
- OADC-supplementiertes Middelbrook 7H9 Medium (10% OADC; 0,05% Tween-80; Middelbrook 7H9)
- OADC-supplementiertes Middelbrook 7H10 Agar (10% OADC; 0,05% Tween-80; Middelbrook 7H9)

2.1.5.2 Tierexperimentelles Arbeiten

- Heparin (25000U/ml PBS);
- Narkotikum (1,25% Ketamin; 0,025% Rompun; 8,625mM NaCl)
- PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung; 2,7mM KCl; 1,5mM KH_2PO_4 ; 137 mM NaCl; 9mM NaH_2PO_4 ; pH=7,4)

2.1.5.3 Histologische und immunhistologische Techniken

- Anilin-Alkohol (0,1% Anilin in 90% Ethanol)
- Anilinblau-Goldorange-Lösung (3-fach-Lösung: 0,5% Anilinblau; 2% Goldorange G in A.dest. (w/v); nach filtrieren Zusatz von 8% Eisessig)
- Azokarminlösung (0,1% Azokarmin in A.dest (w/v) 1% Essigsäure)
- Essigsäurealkohol (1% Eisessig in 96% Ethanol)
- TBS (Tris-gepufferte Salzlösung; 150mM NaCl; 10mM Tris; pH=7,4)
- Zitratpuffer (10mM Zitronensäure Monohydrat in A. dest.)

2.1.5.4 Zellkultur und Präparation primärer Zellen

- DMEM supplementiert mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2mM L-Glutamin
- EL-Puffer (Erythrozyten Lysierungs Puffer; 156mM NH_4Cl ; 0,13mM EDTA; 12mM NaHCO_3)

- IMDM supplementiert mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2mM L-Glutamin
- Lungenverdaumedium (RPMI-1640 [ohne HEPES] supplementiert mit 10% FCS, 1%Penicillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 0,7mg/ml Kollagenase A und 30µg/ml DnaseI)
- MACS-Puffer (2mM EDTA; 0,5% BSA in PBS)
- Makrophagen-Differenzierungsmedium (10% inaktiviertes FCS, 5% Pferdeserum, 30% L929- Medium, 1U/µg Penecillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 1mM Na-Pyruvat, 10⁻⁴M β2-Mercaptoethanol)
- Makrophagen-Kultivierungsmedium (10% inaktiviertes FCS, 5% Pferdeserum, 1U/µg Penecillin/Streptavidin, 2mM L-Glutamin, 1mM Na-Pyruvat, 10⁻⁴M β2-Mercaptoethanol)
- Mausserum (1:10 verdünnt in MACS-Puffer)
- RPMI-1640 [mit HEPES] supplementiert mit 10%FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2mM L-Glutamin
- ST-CF-Lösung (RPMI-1640 [mit HEPES] supplementiert mit 25µg/ml ST-CF)

2.1.5.5 Immunologische Techniken

- Anit-CD3/CD28-Antikörperlösung (25µg/ml in PBS)
- ELISA „Beschichtungspuffer“ (100mM NaHCO₃; 34mM Na₂CO₃; pH=9,5)
- ELISA Stopp-Lösung (1M H₃PO₄)
- ELISA-Waschpuffer (0,05% Tween-20 in PBS)
- FACS-Puffer (3% FCS; 0,1% NaN₃ in PBS)
- Fc-Blockierungslösung (FcγI/III 20µg/ml; Mausserum und Rattenserum 1:120)
- Inhibitorlösung (1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail in 10ml PBS)

2.1.5.6 Molekularbiologische Techniken

- Auftragspuffer (400mM Bromphenolblau; 5mM Tris; 60mM Glycerin; pH=7,6)

- kPCR-Reaktionsgemisch (10% 10x-Puffer, 7% (10mM) dNTPs, 4% *sense* sowie *antisense*-Primer (6,25µM), und 0,2% DNA-Polymerase in steriles Wasser (v/v))
- LC-PCR-Reaktionsgemisch (10% 10x-Puffer, 7% MgCL₂ [50mM], 6% BSA [100mM], 5% dNTP [10mM], 4% *sense* sowie *antisense*-Primer (6,25µM), 2% Syber-Green [1:1000 in DMSO], 2,5% Taq-DNA-Polymerase in sterilem Wasser (v/v))
- RT-Reaktionsgemisch (4µl 5x *First Strand* Puffer; 2µl 100 mM DTT; 2µl 10mM dNTPs; 1µl RNasin; 1µl SuperscriptII RT)
- Verdaulösung (5mM EDTA (pH=8), 200mM NaCL, 0,2%SDS, 100mM Tris/HCL (pH=8), 10µg/ml Proteinase K in A. dest.)

2.1.5.6.1 Primerpaare zur Genotypisierung

Name	Sequenz	Anlagerung [°C]	Elongation [s]	Zyklen	Produkt [bp]
maclL-10tg sense	5`-CAG-GAC-TAC-AAG-GAC-GAC-GAT-GAC -3`	59	30	35	150
maclL-10tg antisense	5`-GCT-GAA-GGC-AGT-CCG-CAG-CTC-3`	59	30		
IL4Rα-defizient sense	5`-GGC-TGC-CCT-GGA-ATA-ACC-3`	57	30	35	1300
IL4Rα-defizient antisense	5`-CCT-TTG-AGA-ACT-GCG-GGC-T-3`	57	30		
IL-13tg sense	5`-ATA-TCT-CAG-GAA-TGG-GAT-TGT-GAC-3`	60	30	35	200
IL-13tg antisense	5`-CTA-CTG-TAT-TTA-ACT-GAT-TTG-AAG-3`	60	30		

Tab. 1: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen für die konventionelle PCR

2.1.5.6.2 Primerpaare für die quantitative PCR

Name	Sequenz	Anlagerung [°C]	Elongation [°C/s]	Zyklen
Arginase-I sense	5`-CAG-AAG-AAT-GGA-AGA-GTC-AG-3`	58	20	40
Arginase-I antisense	5`-CAG-ATA-TGCAGG-GAG-TCA-CC-`3-			
HPRT sense	5`-GCA-GTA-CAG-CCC-CAA-AAT-GG-3`	60	20	35
HPRT antisense	5`-AAC-AAA-GTC-TGG-CCT-GTA-TCC-AA-3`			
IL-4 sense	5`-CAT-CGG-CAT-TTT-GAA-CGA-G-3`	63	20	45
IL-4 antisense	5`-ACG-TTT-GGC-ACA-TCC-ATC-TC-3`			
IL-4Rα sense	5`-AG-ACG-TAG-GGC-AAC-AAA-ACG	56	20	45
IL-4Rα antisense	5`-TGT-GAC-CTA-CAA-GGA-ACC-CA-3`			
IL-12p40 sense	5`-CTG-GCC-AGT-ACA-CCT-GCC-AC-3`	60	20	35
IL-12p40 antisense	5`-GTG-CTT-CCA-ACG-CCA-GTT-3`			
IL-13 sense	5`-CCT-CTG-ACC-CTT-AAG-GAG-CTT-AT-3`	57	20	45
IL-13 antisense	5`-CGT-TGC-ACA-GGG-GAG-TCT-3`			
LRG-47 sense	5`-CAG-GGG-AGC-ATA-ATG-GGT-CTC-TGC-3`	58	20	35
LRG-47 antisense	5`-AAA-GGT-CCA-CAG-ACA-GCG-TCA-CTC-G-3`			
NOS2 sense	5`-AGC TCC TCC CAG GAC CAC AC-3`	60	20	35
NOS2 antisense	5`-ACG CTG AGT ACC TCA TTG GC-3`			

Tab. 2: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen für die quantitative PCR im LightCycler

2.1.5.7 Antikörper

Für immunhistologische Färbungen wurden Antikörper in 10% FCS (in TBS) für den Western Blot in 3% PBS/Milch verdünnt. Die optimale Verdünnung aller verwendeten Antikörper wurde in Vorversuchen ermittelt.

Antikörper-Spezifität	Spezies	Markierung	Verdünnung	Firma
NOS2	Kaninchen IgG	---	1:800	DIANOVA
Kaninchen-Ig	Ziege IgG	Peroxidase	1:30	BD
Ziege-Ig	Kaninchen IgG	Peroxidase	1:50	BD
Arg-I	Maus IgG ₁	---	1:250 (Histologie)	BD
Anti-Maus IgG-Reagenz	---	Biotin	10µl Stock in 2,5ml „M.O.M-Diluent“	VECTOR

Tab.3 : Antikörper für immunhistologische Färbungen

2.1.5.8 Aufreinigung und Stimulierung von Zellen

Zur Aufreinigung von Zellen verwendeten Antikörper wurden in MACS-Puffer, zur Stimulierung verwendete Antikörper wurden in Medium aufgenommen.

Antikörper-Spezifität	Spezies	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
CD3	Ratte IgG ₁	145-2C11	---	1:20	BD
CD4	Ratte IgG _{2a}	RM 4-5	Magnetische Partikel	10µl/10 ⁷ Zellen	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach
CD28	Ratte IgG ₂	37.51	---	1:20	BD

Tab.4 : Antikörper für Aufreinigung und Stimulation von Zellen

2.1.5.9 Immunologische Techniken

2.1.5.9.1 ELISA

Für den ELISA verwendete Primärantikörper wurden in Beschichtungspuffer verdünnt. Sekundärantikörper wurden in Verdünnungspuffer angesetzt. Als interner Standard diente rekombinantes murines Zytokin (BD), welches in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt wurde. Die optimale Antikörperkonzentration wurde in Vorversuchen bestimmt.

Antikörper-Spezifität	Spezies/Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Verwendung	Firma
IFN- γ	Maus		---		Standard,	BD
IFN- γ	Ratte IgG ₁	AN-18	---	1:250	primärer AK,	BD
IFN- γ	Ratte IgG ₁	AN-18	biotinyliert	1:250	sekundärer AK	BD

Tab.5: Antikörper für „Sandwich- ELISA“

2.1.5.9.2 Stimulierung von Zellen

Zur Stimulierung von differenzierten Knochenmarksmakrophagen wurde rekombinantes IL-10 der Firma PEPROTECH Inc. (New Jersey, USA) aus der Maus in einer Endkonzentration von 10ng/ml verwendet.

2.1.5.9.3 Durchflusszytometrische Analysen

Die verwendeten Antikörper wurden für die durchflußzytometrischen Analysen in FACS-Puffer verdünnt.

Antikörper-Spezifität	Spezies	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
CD3	Ratte IgG _{2a}	CT-CD3	PerCP	1:320	BD
CD4	Ratte IgG _{2a}	RM 4-5	FITC, APC	1:320	BD
CD8	Ratte IgG _{2a}	53-6.7	PE	1:320	BD

CD44	Ratte IgG _{2b}	IM7	FITC, APC	1:320; 1:160	BD
CD62L	Ratte IgG _{2a}	MEL-14	PE	1:640	BD
CD80	Hamster IgG _{2a}	16-10A1	Biotin	1:160	BD
CD86	Ratte IgG ₂	GL1	Biotin	1:160	BD
IFNγ	Ratte IgG ₁	XMG1.2	PE	1:160	BD
IL-4Rα	Ratte IgG _{2a}	mIL-4R-M1	Biotin	1:100	BD
Mannoserezeptor		MR5D3	PE	1:40	SEROTEC
MHCII (FVB)	Maus IgG ₃	KH116	Biotin	1:320	BD
MHCII (C57BL/6)	Maus IgG _{2a}	KH74	Biotin	1:320	BD

Tab. 6: Antikörper für durchflußzytometrische Analysen

2.1.5.10 Infektion von Versuchstieren

Zur Untersuchung der Infektabwehr von Versuchstieren wurden die Mäuse mit dem Bakterienstamm *Mtb* H37Rv, welcher in der Abteilung Molekulare Infektiologie am Forschungszentrum Borstel angezogen wurde, infiziert.

2.1.5.11 Mausstämme

Zur Untersuchung der Rolle von immunmodulierenden Funktionen unterschiedlicher Zytokine in mykobakteriellen Infektion wurden 10 bis 12 Wochen alte, Gen-überexprimierende oder -defiziente Mäuse verwendet (Tab. 7). Als immunkompetente Kontrolltiere dienten Mäuse vom Stamm FVB (Roland Lang, Technische Universität (TU), München) oder C57BL/6 (Charles River, Sülzfeld), entsprechend dem genetischen Hintergrund des jeweiligen transgenen bzw. defizienten Mausstamms. Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung des Forschungszentrums Borstel (FZB) unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen gezüchtet. Infizierte Tiere wurden in separat belüfteten Käfigen mit speziellen Luftfiltern im BSL (Biologisches Sicherheits Labor)3-Bereich des FZB gehalten. Alle Mäuse waren frei von viralen, bakteriellen und parasitären Erkrankungen. Die Tierversuchsvorhaben zu den verschiedenen Experimenten wurden vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein unter den Nummern V743-72241.123-3 (25-4/03) und V743-72241.123-3 (33-5/04) genehmigt.

Stamm	genetischer Hintergrund	Herkunft	Zweck	Referenz
IL-10tg	FVB	TU, München	Untersuchung der immunmodulierenden Funktion von IL-10	[Lang et al. 2002]
IL-4R α -defizient	C57BL/6	FZB	Untersuchung der immunmodulierenden Funktion des IL-4R α	[Mohrs et al. 1999]
IL-13tg	C57BL/6	FZB	Untersuchung der immunmodulierenden Funktion von IL-13	[McKenzie et al. 1998]

Tab.7: Mausstämmen zur Untersuchung immunmodulatorischer Funktionen in *Mtb*-Infektionen

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienanzucht

M. tuberculosis wurde in OADC-supplementiertem Middlebrook 7H9 Medium bis zur mittleren, logarithmischen Phase angezüchtet. Durch Plattieren auf Herz-Hirn-Agar und Färbung nach Ziehl-Neelsen wurden die Bakterienkulturen auf evtl. kontaminierende Bakterienstämme hin untersucht. Die Bakteriensuspensionen wurden aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Um die Anzahl kolonienbildender Einheiten (KBE) in den Mykobakterienkulturen zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen der Bakteriensuspensionen in sterilem, destilliertem Wasser mit einem Zusatz von 0,05% Tween-80 angefertigt und auf OADC-supplementiertem 7H10 Agar ausplattiert. Nach einer Inkubation von drei Wochen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Anzahl der Kolonien auf den Agarplatten bestimmt und die KBE für jede Kultur berechnet.

2.2.2 Infektion von Versuchstieren via Aerosol

Zur aerogenen Infektion der Versuchstiere wurden die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse der Vernebelung einer Bakteriensuspension durch ein Inhalationssystem ausgesetzt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Mausgruppen in speziellen Infektionskäfigen separiert, die in die Aerosolkammer des Inhalationssystems gestellt wurden. Eine Erregerkonzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$, die nach Vernebelung durch das Inhalationssystem eine exakte Infektionsdosis von 100 KBE pro Tier und Lunge gewährleistete, wurde in einem Volumen von 6ml sterilem Wasser hergestellt. Um Aggregatbildung der Mykobakterien zu verhindern, wurde diese Suspension zehnmal mit einer 26G-Kanüle resuspendiert. Fünfhundert μl wurden abgenommen und in den Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-8} auf OADC-angereicherten Nährböden ausplattiert, um die tatsächliche Bakterienkonzentration zu ermitteln. Die übrigen 5,5ml der Suspension wurden in das Inhalationssystem überführt und das zuvor geschlossene System gestartet. Nach einer Aufwärmzeit von 15min erfolgte die Aerosolinfektion während einer 40-minütigen Vernebelung der Bakteriensuspension bei konstantem Vakuum (60 Kubik Fuß pro Stunde [KFH]) und Kompressionsluft (10 KFH). Nach Absaugen des

Aerosols und einer Dekontamination für 15min wurde die Aerosolkammer geöffnet und die Versuchstiere entnommen. Zur Überprüfung der tatsächlichen Infektionsdosis wurden am Folgetag der Infektion 4 Mäuse geopfert und die bakterielle Last in der Lunge bestimmt (siehe 2.2.5).

2.2.3 Bestimmung der Mortalität von Versuchstieren

Jeweils zehn Mäuse wurden nach Infektion mit *Mtb* zur Bestimmung der Mortalität verwendet. Die Tiere wurden nach Verlust von 25% ihres ursprünglichen Körpergewichts als moribund eingestuft und euthanasiert (siehe 2.2.4). Anhand dieser „Sterbedaten“ wurde eine Mortalitätskurve erstellt.

2.2.4 Euthanasieren von Versuchstieren und Organentnahme

Für mikrobiologische, histopathologische, molekularbiologische, und immunhistologische Untersuchungen wurden den Versuchstieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion Organe entnommen. Nach Euthanasieren der Maus durch die intraperitoneale (i.p.) Injektion von 800µl Narkotikum, wurde die Bauchdecke geöffnet und die Vena cava inferior freigelegt. Mit Hilfe einer Spritze und einer 25G-Kanüle wurden mindestens 500µl Blut abgenommen und in ein Serumseparationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1200xg für 10min wurde das separierte Serum bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Leber, Milz und Lunge wurden entnommen und für weitere Analysen nach Notierung des jeweiligen Gesamt- und Teilgewichts der Organe aufgeteilt. Zur Bestimmung der Keimlast (siehe 2.2.5) wurden Leber und Milz in 10ml sterilem 0,05% Tween-80 (in A. dest.) gegeben. Da das Lungenhomogenat zusätzlich zur Quantifizierung unterschiedlicher Zytokinspiegel diente (siehe 2.7.8.5), wurde der rechte Lungenflügel in 3ml Inhibitorlösung überführt.

Für histologische Untersuchungen (siehe 2.2.6) wurden der linke Lungenflügel, die halbe Milz und 2 Stücke Leber unterschiedlicher Leberlappen entnommen. Um eine Kompression des Lungengewebes zu verhindern, wurde 4% Formalin (in PBS) unter Zuhilfenahme einer Spritze und einer 26G-Kanüle in das Organ

injiziert. Nach Überführung der Organe in ein Histogrid erfolgte die Fixierung der Organe für mindestens 24 Stunden in 4% Formalin (in PBS).

Der rechte Lungenflügel einer weiteren Versuchstiergruppe wurde zur Gewinnung von Gesamtzell-RNA (siehe 2.2.7.1) entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Aufarbeitung der RNA wurde die Probe bei -80°C gelagert.

Die mediastinalen Lymphknoten wurden mit Hilfe einer gebogenen Pinzette präpariert, zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen (siehe 2.2.8.1.2) in 15ml DMEM überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.5 Mikrobiologische Untersuchungen zur Bestimmung der Keimlast in Lungenhomogenaten

Die entnommenen Organe (siehe 2.2.4) wurden mit Hilfe eines Homogenisators unter Verwendung gekühlter (-20°C) Pistillen mechanisch homogenisiert. Einhundert μl des Homogenats wurden unverdünnt und in seriellen 10er-Verdünnungsstufen bis 10^{-8} auf Middelbrook Nährboden ausplattiert und bei 37°C für 3 Wochen inkubiert. Die Bestimmung der KBE als ein Maß für die bakterielle Last erfolgte nach 3 Wochen und wurde unter Berücksichtigung des jeweiligen Teilgewichts und der Verdünnungsstufe für das gesamte Organ errechnet. Das restliche Lungenhomogenat wurde zur späteren Bestimmung der IFN γ -Konzentration (2.2.8.5) bei 6000xg für 10min zentrifugiert und der Überstand separat bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

2.2.6 Histologische Untersuchungen

2.2.6. Aufbereitung von Organen für die Herstellung von Paraffinpräparaten

Bereits entnommene und fixierte Organe (siehe 2.2.4) wurden in einem Autotechnicon über eine aufsteigende Alkoholreihe (45min 50% Ethanol; 45min 70% Ethanol; 45min 95% Ethanol; 2,25h 100% Ethanol; 2,25h Intermedium)

entwässert, in Paraffin für 2h bei 65°C inkubiert und mit Hilfe einer Paraffingießstation in eine Form eingebettet. Nach dem Aushärten wurden die Blöcke aus der Form gelöst und bis zur Herstellung der Schnitte bei 4°C gelagert. Die Anfertigung von Gewebsschnitten erfolgte nach 1-2-stündiger Kühlung der eingebetteten Organe auf Eis. Mit einem Rotationsmikrotom wurden die Blöcke in 10µm Schritten bis zum Erreichen der Organe angeschnitten und anschließend 2µm starke Gewebsschnitte angefertigt. Nach Überführung in ein kaltes Wasserbad wurden grobe Falten und Luftblasen entfernt. Um eine vollständige Glättung der Schnitte zu erreichen, wurden diese in ein 39°C warmes Wasserbad überführt. Das Trocknen der Präparate erfolgte nach dem Aufnehmen auf Objektträger auf einer 37°C warmen Heizplatte für mindestens 2h. Im Anschluss wurden die Schnitte für histopathologische und immunhistochemische Färbungen (siehe 2.2.6.2, 2.2.6.3) verwendet.

2.2.6.2 Histologische Färbungen

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Verdünnungen in A. dest. angesetzt.

2.2.6.2.1 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung von Paraffinschnitten erfolgte zur Visualisierung zellulärer Bestandteile (Kerne, Zytoplasma, Zellwände), um histopathologische Veränderungen in den Organen infizierter Mäuse analysieren zu können. Hierzu wurden die Schnitte in 3 Rotihistolbädern für jeweils 5min entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Rotihistol:Ethanol, 1:2 für 1min; Ethanol absolut für zwei mal 5min; kurz schwenken in Ethanol absolut, 96% Ethanol, 80% Ethanol und 40% Ethanol) bewässert. Nach 5-minütigem Spülen in A. dest. erfolgte die Kernanfärbung durch Hämatoxylin für 20min. Unter laufendem Leitungswasser wurden die Präparate anschliessend für 10min „gebläut“ und überschüssiges Hämatoxylin ausgewaschen. Eine Gegenfärbung erfolgte für 3min mit Eosin (1% in A. dest.), welches zu einer rötlichen Anfärbung des Zytoplasmas führt. Zur Fixierung der Färbung wurden die Präparate nach 3-minütigem Spülen in A. dest. durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (kurzes Schwenken in 70% Ethanol, 2 x 96% Ethanol, kurzes Schwenken in Ethanol absolut; 2min in

Ethanol absolut), 3 x 5min in Rotihistol inkubiert und mit Entellan eingedeckelt. Es folgte die mikroskopische Analyse, sowie die fotografische Dokumentation der Gewebsschnitte.

2.2.6.2.2 Färbung „säurefester Stäbchen“ nach Ziehl-Neelsen (ZN)

Zum Nachweis säurefester Stäbchen in histologischen Präparaten wurde eine ZN-Färbung durchgeführt. Rohschnitte wurden wie beschrieben (siehe 2.2.6.2.1) entparaffiniert und rehydriert. Die Färbung erfolgte im Anschluss durch Überschichten der Schnitte mit einer Karbolfuchsinlösung. Das Anlagern des Farbstoffes in die bakterielle Zellwand wurde durch Erhitzen der Lösung gewährleistet, wobei ein Überschreiten des Siedepunktes vermieden wurde. Nach Abspülen der überschüssigen Färbelösung mit A. dest. erfolgte die Entfärbung des Hintergrunds mit 0,5% Salzsäure in 70% Ethanol. Nach erneutem Spülen wurde das Gewebe mit Methylenblau gegengefärbt. Zur Fixierung der Färbung wurden die Präparate dehydriert, eingedeckelt und getrocknet (siehe 2.2.6.2.1).

2.2.6.2.3 Trichrom-Färbung

Das unspezifische Anfärben von Kollagen und retikulärem Bindegewebe erfolgte durch eine Trichrom-Färbung. Nach Entparaffinieren der Schnitte (siehe 2.2.6.2.1) erfolgte zunächst die Anfärbung des Chromatins durch eine Azokarminlösung für 1h bei 65°C, wodurch die Kerne eine rosa Färbung erhalten. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurde mit A. dest. gespült und anschließend einige Sekunden mit Anilinalkohol bis zum deutlichen Hervortreten der Kerne differenziert. Der Vorgang wurde mit 1% Eisessig (in 96% Ethanol) unterbrochen. Zum Entfärben und Beizen des Gewebes wurden die Präparate 1h inkubiert. Die Anfärbung von Kollagen und Bindegewebe erfolgte nach Spülen mit A. dest. durch eine Anilinblau-Goldorange-Lösung für 5min. Nach erneutem Spülen mit A. dest. wurde mit 96% Ethanol differenziert und die gefärbten Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe 2.2.6.2.1) entwässert und eingedeckelt.

2.2.6.3 Immunhistochemische Färbungen

Nach vorausgegangener Entparaffinierung mit Rotihistol erfolgte die Rehydrierung der Rohschnitte durch eine absteigende Acetonreihe (10min 100% Aceton, 10min 70% Aceton; 10min 40% Aceton). Nach dreimaligem Spülen der Schnitte mit Leitungswasser und TBS wurde das Gewebe durch 2-minütiges Kochen in Zitratpuffer für die Antikörperbindung zugänglich gemacht. Nach Spülen mit TBS erfolgte die Bleichung von Erythrozyten, sowie das Abblocken endogener Peroxidaseaktivität im Gewebe durch 20-minütige Inkubation in 1% H₂O₂ in TBS unter Lichtausschluss.

2.2.6.3.1 Färbung der induzierbaren Stickoxidsynthase (NOS)2

Nach Spülen mit TBS wurden die Schnitte mit 200µl des polyklonale Anti-Maus-NOS2-Primärantikörpers aus Kaninchen (siehe Tab. 3) in 10% FCS (in TBS) pro Objektträger inkubiert. Nach 45min und 3-maligem Waschen mit TBS erfolgte die Inkubation mit jeweils 200µl eines polyklonalen, Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpers aus der Ziege (2% Mausserum in FCS/TBS; siehe Tab. 3) für 45min. Anschließend wurde erneut 3x gewaschen und die Schnitte mit je 200µl eines polyklonalen, Peroxidase-gekoppelten Anti-Ziege-Antikörpers aus dem Kaninchen (siehe Tab. 3) für 45min inkubiert. Die Inkubationen der Antikörper erfolgten jeweils in einer feuchten Kammer. Zur Visualisierung wurden anschließend jeweils 200µl des umzusetzenden Substrats DAB aufgetragen. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop beobachtet und nach Erreichen einer ausreichenden Intensität mit TBS abgestoppt. Eine Gegenfärbung des Gewebes erfolgte für 10min mit Hämatoxylin. Zum Eindeckeln der Präparate wurde 37°C warmes Kaisers Glycerin verwendet.

2.2.6.3.2 Färbung der Arginase (Arg-I)

Da es sich bei dem Anti-Arg-I-Primärantikörper (siehe Tab. 3) um einen murinen Antikörper handelte, wurde die Bindung an endogene Immunglobuline mit Hilfe eines „M.O.M. Blockierungskits“ verhindert. Vorausgehend erfolgte die Absättigung von endogenem Biotin durch die Verwendung eines „Avidin/Biotin-

Blockierungskits“. Bis zur Färbung der Schnitte mit DAB erfolgten alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden mit jeweils 200µl Avidin D (Avidin/Biotin-Blockierungskits) für 15min inkubiert. Nach 3-maligem Spülen mit TBS wurden die verbleibenden freien Bindungsstellen des Avidins durch eine 15-minütige Inkubation mit je 200µl Biotin D (Avidin/Biotin-Blockierungskits) abgesättigt. Im Folgenden wurden nach Spülen mit TBS endogene Immunglobuline durch jeweils 200µl einer Immunglobulin-Blockierungslösung für 1h geblockt. Überschüssiges Reagenz wurde anschließend mit TBS abgespült. Der 45-minütigen Inkubation mit dem monoklonalen Anti-Maus-Arg-I-Primärantikörpers aus der Maus (siehe Tab. 3) in 10% FCS (in TBS) ging eine 5-minütige Equilibrierung mit der Verdünnungslösung „M.O.M.-Diluent“ („M.O.M. Blockierungskit“) voraus. Es folgte die Inkubation des biotinylierten, polyklonalen Anti-Maus-IgG-Antikörpers („M.O.M. Blockierungskit“; siehe Tab. 3) aus der Ziege für 10min. Nach Spülen mit TBS wurden jeweils 200µl des „Vectasin ABC-Reagenz“ aufgetragen. Das Prinzip dieses Reagenz` basiert auf der Vernetzung des biotinylierten Sekundärantikörpers (siehe Tab. 3) mit einem Gemisch aus Avidinmolekülen und biotinylierten Peroxidasen, welche kurz vor dem Auftragen gemischt werden. Dieses Verfahren gewährleistet eine spezifische Verstärkung der Visualisierung schwach exprimierter Proteine. Anschließend wurden die Präparate durch Behandlung mit DAB unter mikroskopischer Kontrolle und Lichtausschluss gefärbt. Es folgte die Gegengefärbung mit Hämatoxylin und das Eindeckeln der Schnitte mit Kaisers Glycerin.

2.2.7 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.7.1 Gewinnung von Gesamtzell-RNA aus murinen Lungen

Zur Gewinnung von Gesamtzell-RNA wurde der rechte Lungenflügel uninfizierter und infizierter Mäuse verwendet (siehe 2.2.4). Zunächst wurde das Organ mit Hilfe eines mechanischen Homogenisators und gekühlten Pistillen (-20°C) in 2ml Trifast homogenisiert und nach Zugabe eines Drittel des Volumens PBS über Nacht bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde ein Drittel des Volumens BCP zugegeben, durch kräftiges Schütteln gemischt und 15min bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach Zentrifugation für 45min bei 10000xg und 4°C wurde die obere Phase sorgfältig abgenommen, eine äquivalente Menge Isopropanol zugegeben und gemischt. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 10000xg und 4°C wurde die RNA präzipitiert und nach 2-maligem Waschen mit 75% Ethanol in DEPC-Wasser in 100µl DEPC-Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei –80°C.

2.2.7.2 Reverse Transkription

Um die Transkription unterschiedlicher Gene quantifizieren zu können wurde die mRNA (siehe 2.2.7.1) zunächst durch Reverse Transkription in c (engl.: *complementary*) DNA umgeschrieben. Hierzu wurden 8µl der gewonnenen RNA mit 2µl Oligo dT-Nukleotiden für 10min bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wurden 10µl eines RT-Reaktionsgemisches zugegeben und das Umschreiben der mRNA in cDNA bei 37°C für 90min durchgeführt. Abschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 95°C für 2min. Nach Zugabe von 180µl sterilem Wasser wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.7.3 Gewinnung von genomischer DNA zur Genotypisierung von Versuchstieren

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde von infizierten Mäusen oder Zuchttieren eine Stück Schwanzspitze abgetrennt und in 500µl einer Verdauungslösung überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 56°C unter Schütteln inkubiert wurde bei 1200xg für 10min zentrifugiert und der Überstand in 500µl Isopropanol überführt. Nach Mischen der Lösungen wurde ein DNA-Faden sichtbar, welcher mit Hilfe einer versiegelten Pasteurpipette der Lösung entnommen wurde. Nach Trocknen der DNA wurde diese in 100µl A. dest. gelöst und mittels konventioneller Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Zuhilfenahme spezifischer Primerpaare (siehe Tab. 1) genotypisiert (siehe 2.2.7.4).

2.2.7.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde im Anschluss an die Gewinnung genomischer DNA aus murinen Schwänzen (siehe 2.2.7.3) zur Ermittlung des Genotyps durchgeführt. Fünf μl genomische DNA wurden in 25 μl PCR-Reaktionsgemisch amplifiziert. Die Reaktion erfolgte entsprechend der eingesetzten Primer (siehe Tab. 1). Nach Abschluss des letzten Zyklus wurde ein weiterer Elongationsschritt bei 72°C angeschlossen um eine vollständige Amplifikation aller Produkte zu erreichen. Im Anschluss wurde das Produkt der Reaktion auf einem Agarosegel (1,2%) unter Verwendung eines DNA-Längenstandards aufgetrennt und analysiert.

2.2.7.5 Quantitative PCR

Die Quantifizierung der mRNA-Expression unterschiedlicher Gene erfolgte mit Hilfe spezifischer Primerpaare (siehe Tab. 2) unter Verwendung eines LightCyclers (LC). Hierbei wurde dem LC-PCR-Reaktionsgemisch die fluoreszierende Substanz „SYBR-Green“ beigefügt, welche sich in die DNA einlagert. Durch den Einbau der Moleküle in doppelsträngige DNA ändert sich die Wellenlänge der Lichtemission des „SYBR-Greens“ und ermöglicht somit eine spezifische Quantifizierung der Amplifikate durch den LightCycler. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist hierbei äquivalent zur Menge der cDNA. Als Standard wurde cDNA von Transkripten muriner, infizierter Lungen mit hohem Transkriptionsspiegel des betrachteten Gens verwendet und in den Verdünnungen 1:2, 1:8, 1:32 und 1:128 eingesetzt. Mit Hilfe der „LightCycler-Software“ wurde durch lineare Regression eine Standardgerade ermittelt, wobei den Verdünnungen Werte zwischen 100 (unverdünnt) und 0,781 (1:128) zugeordnet wurden.

Aus den jeweiligen exponentiellen Amplifikationsbereichen der cDNA der Proben und des Standards wurden anhand der Steigung Schnittpunkte mit der Basislinie ermittelt. Durch lineare Regression wurde mittels der zuvor festgelegten Standardwerte eine Standardkurve erstellt. Die Schnittpunkte der zu analysierenden Proben wurden relativ zu den Werten der Standardverdünnungen ermittelt. Um die ermittelten mRNA-Expression der einzelnen Gene zu normalisieren wurde das Verhältnis zur mRNA-Expression des konstitutiv

exprimierten Gens *hprt* (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase) jeder Probe errechnet und als Transkriptionsrate definiert.

2.2.8 Immunologische Untersuchungen

2.2.8.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

2.2.8.1.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus murinen Lungen

Die Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Lungengewebe infizierter und uninfizierter Mäuse diente zur quantitativen und phänotypischen Analyse von Immunzellen in der Durchflusszytometrie (siehe 2.2.8.3). Die Versuchstiere wurden durch i.p. Injektion von 800µl Narkotikum betäubt und die Blutgerinnung durch i.p. Injektion von 100µl Heparinlösung verzögert. Bei eintretender Narkosewirkung wurden Bauchdecke und Bauchfell geöffnet und die Vena cava inferior durchtrennt, um den Blutkreislauf zu unterbrechen und ein Abfließen des Blutes zu ermöglichen. Im Anschluss wurde der Brustkorb geöffnet, das Herz mit einer Pinzette fixiert und mit Hilfe einer 18G-Kanüle punktiert. Eine Knopfkanüle wurde über die Punktion in den linken Vorhof eingeführt und die Lunge mit 5ml 37°C warmen PBS perfundiert bis diese weiß erschien. Das Organ wurde entnommen und mit einem Skalpell in einer mit PBS gefüllten Petrischale zerkleinert. Der Verdau der Lunge erfolgte in 10ml Lungenverdaumedium für 2h bei 37°C unter Schütteln in einem 50ml-Reaktionsgefäß. Anschließend wurden die Gewebereste durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 100µm gerieben und nach Zentrifugation bei 320xg für 10min in 3ml EL-Puffer zur Lyse mitgeführter Erythrozyten resuspendiert und die Reaktion nach wenigen Sekunden durch Zugabe des 10-fachen Volumens DMEM gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation und Aufnahme der Zellen in einem geringen Volumen FACS-Puffer wurde die Zellzahl der Einzelzellsuspension bestimmt. Hierzu wurden 10µl der Zellsuspension verdünnt in 90µl Trypanblau in einer Neubauer- Zählkammer unter dem Mikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt.

2.2.8.1.2 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus den mediastinalen Lymphknoten

Um Einzelzellsuspensionen aus mediastinalen Lymphknoten herzustellen, wurde der Lymphknoten durch ein Metallsieb mit einer Maschengröße von 200µm gerieben. Nach Spülen mit DMEM und Zentrifugation bei 320xg und 4°C für 10min wurden die Zellen in einem geringen Volumen DMEM aufgenommen und die Zellzahl der Einzelzellsuspension bestimmt (siehe 2.2.8.1.1). Die Suspension wurde in durchflusszytometrischen Analysen und zur Restimulierung von CD4⁺ T-Lymphozyten verwendet.

2.2.8.2 Restimulierung von CD4⁺ T-Zellen

Aus den Lymphknoten von 4 Mäusen eines Genotyps wurde eine Einzelzellsuspension (siehe 2.2.8.1.2) hergestellt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 320xg und 4°C wurde das Präzipitat in 1ml MACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Im Anschluss wurden unspezifische Bindungen durch eine 20-minütige Inkubation bei 4°C mit Mausserum abgesättigt. Nach Zugabe von 3ml MACS-Puffer wurden die Zellen erneut präzipitiert und pro 1×10^7 Zellen 80µl MACS-Puffer zugegeben. 5×10^5 Zellen wurden für eine qualitative Analyse der Aufreinigung abgenommen und in ein 5ml-Röhrchen überführt. Zu den restlichen Zellen wurden pro 1×10^7 Zellen 10µl Anti-CD4-Microbeads (siehe Tab. 4) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4°C wurde das Volumen der Zellsuspension auf 15ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und die Zellen erneut durch Zentrifugation präzipitiert. Die Zellsuspension wurde in 500µl MACS-Puffer auf eine mit 9ml MACS-Puffer equilibrierte LS-Säule (MACS Separations Kit) in einer Magnetvorrichtung gegeben. Nach 3-maligem Waschen mit je 3ml MACS-Puffer wurde die Säule aus der Magnetvorrichtung entfernt und die gebundenen Zellen mit 5ml MACS-Puffer in ein 15ml-Reaktionsgefäß eluiert. Dieser Vorgang wurde unter Verwendung einer frischen LS-Säule wiederholt, wobei nach jeder Elution eine Zellzahlbestimmung und Abnahme von 5×10^5 Zellen zur qualitativen Analyse der Aufreinigung erfolgte. Die zur Qualitätskontrolle separierten Zellen wurden nach Färbung mit Anti-CD4-FITC und Anti-CD8-PE-Antikörpern (siehe Tab. 6) in der Durchflusszytometrie (siehe 2.2.8.3) bestimmt.

Nach der letzten Elution wurde die Suspension zur Antigen-spezifischen Restimulation auf eine Zellzahl von 2×10^6 /ml in DMEM eingestellt.

Peritonealmakrophagen nicht infizierter Mäuse wurden als Antigen-präsentierende Zellen zur Restimulation von $CD4^+$ T-Lymphozyten infizierter Versuchstiere gewonnen. Zur Isolierung dieser Zellen wurden die Mäuse euthanasiert (siehe 2.2.4) und das Bauchfell durch vorsichtiges Lösen der Haut grossflächig freigelegt. Nach Desinfektion mit 70% Ethanol in A. dest. wurden 8ml DMEM durch eine 26G-Kanüle in das Peritoneum injiziert und der Bauchraum durch Massieren gespült. Im Anschluss wurde die Suspension mit einer 20G-Kanüle abgesaugt und in ein 50ml-Reaktionsgefäss überführt. Nach Zentrifugation für 10min bei 320xg und 4°C folgte die Zellzahlbestimmung nach Aufnahme der Zellen in einem geringen Volumen DMEM. 5×10^5 Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-well-Mikrotiter-Flachbodenplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach dem Abwaschen nicht adhärenter Peritonealzellen wurden 2×10^5 angereicherte $CD4^+$ T- Zellen in 100µl DMEM pro Vertiefung zu den adhären Peritonealmakrophagen gegeben. Die Stimulierung erfolgte in jeweils 100µl ST-CF-Lösung oder Medium als Kontrolle. Nach 72-stündiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Überstände der stimulierten Zellen abgenommen und bei -20°C bis zur Bestimmung des $IFN\gamma$ -Spiegels (siehe 2.2.8.5) eingefroren.

2.2.8.3 Phänotypische Analyse von Immunzellen in der Durchflusszytometrie

Zur durchflusszytometrischen Analyse unterschiedlicher Immunzellen wurden Einzelzellsuspensionen aus mediastinalen Lymphknoten und Lungen verwendet (siehe 2.2.8.1). Für jede phänotypische Bestimmung wurden 5×10^5 Zellen in die Vertiefung einer 96-well-Mikrotiter-Rundboden-Platte ausgesät. Vor und nach jedem Färbeschritt wurden die Zellen durch Zugabe von 200µl FACS-Puffer und Zentrifugation für 10min bei 320xg und 4°C gewaschen. Nach Abkippen des Überstandes erfolgte die Antikörperfärbungen mit jeweils optimierter Konzentration in einem Volumen von 50µl für 20min bei 4°C unter Lichtausschluss. Zur Phänotypisierung von Makrophagen wurden vor der ersten Antikörperfärbung (siehe Tab. 6) unspezifische Bindungen an den $Fc\gamma$ -Rezeptor durch eine $Fc\gamma$ -Blockierungslösung abgesättigt. Im Anschluss wurden die markierten Zellen sofort

durchflusszytometrisch gemessen oder mit 300µl PFA (1% in PBS) fixiert und bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt. Die phänotypische Analyse der Zellen erfolgte aufgrund Ihrer unterschiedlichen Streuung im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht anhand ihrer Größe und Granularität. Die weiteren Analysen der Fluoreszenzmarkierungen erfolgten mit Hilfe der Software „CellQuest Pro“.

2.2.8.4 Intrazelluläre IFN γ -Färbung

Um intrazelluläres IFN γ in CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten zu bestimmen, wurden am Vortag des Versuchs 24-*well*-Mikrotiterplatten mit 300µl einer Anti-CD3/CD28-Antikörperlösung pro Vertiefung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Überstand abgesaugt und 2x10⁶ Zellen einer Einzelzellsuspension aus perfundierter Lungen in 1ml IMDM pro Vertiefung ausgesät. Nach Zugabe von 1µl GolgiPlug (Cytofix/Cytoperm Kit) wurden die Zellen 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Jeweils 1x10⁶ Zellen wurden in 5ml-Röhrchen überführt und nach Waschen mit FACS-Puffer und Zentrifugation für 8min bei 320xg und 4°C mit 50µl anti-CD4- bzw. anti- CD8-FITC Antikörpern (siehe Tab. 6) für 20min bei 4°C unter Lichtausschluss gefärbt. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und durch Inkubation mit 250µl Cytofix/Cytoperm für 20min bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Nach Waschen mit 1ml Perm Wash Puffer (Cytofix/Cytoperm Kit) wurden die Zellen mit 50µl eines Anti-IFN γ -PE-Antikörpers (siehe Tab. 6) für 30min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die so gefärbten Zellen wurden gewaschen und anschließend in 300µl PFA (1% in PBS) aufgenommen. Die phänotypische Analyse der Zellen erfolgte aufgrund Ihrer unterschiedlichen Streuung im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht anhand ihrer Größe und Granularität. Die quantitative Analyse IFN γ -produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgte ausschliesslich unter Betrachtung der Lymphozytenpopulation im Vorwärts-/Seitwärts-Streulicht mit Hilfe der Software „Cell Quest Pro“.

2.2.8.5 Bestimmung der IFN γ -Konzentration im Zellkulturüberstand und Lungenhomogenat

Die Quantifizierung unterschiedlicher Konzentrationen von IFN γ im Zellkulturüberstand nach Restimulation und im Lungenhomogenat erfolgte mit Hilfe eines ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*). Hierzu wurde eine ELISA-Platte mit einem unmarkierten Primärantikörper (in Beschichtungspuffer), welcher spezifisch gegen das nachzuweisende Zytokin gerichtet war, beschichtet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Durch 3-maliges Waschen mit 300 μ l ELISA-Waschpuffer wurde überschüssiger Antikörper entfernt und freie Bindungsstellen der Vertiefungen durch anschließende Inkubation mit je 200 μ l „Assay-Diluent“ (ELISA OptEIA) für 1h bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgte das Auftragen der zu untersuchenden Proben jeweils unverdünnt und in den Verdünnungen 1:3 und 1:9, sowie eines seriell verdünnten Zytokinstandards (siehe Tab. 5) in 50 μ l. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur und erneutem Waschen folgte bei der IFN γ -Messung in Lungenhomogenaten eine Behandlung mit einem „Avidin/Biotin Blockierungs Kit“ zur Absättigung von endogenem Biotin. Hierzu wurde zunächst freies Biotin durch die Zugabe von 50 μ l einer Avidin-Lösung pro Vertiefung blockiert. Um eine spätere Bindung Biotin-markierter Sekundärantikörper an freie Bindungsstellen des Avidins zu verhindern, folgte nach 3-maligem Waschen eine Inkubation mit 50 μ l einer Biotin-Lösung. Im Anschluss wurden nach 3-maligem Waschen 50 μ l eines Biotin-markierten Sekundärantikörpers (siehe Tab. 5) zugegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindung des Streptavidin-gekoppelten Enzyms HRP erfolgte nach 6-maligem Waschen für 1h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden nach erneutem Waschen 50 μ l Substratlösung zu den Proben gegeben und der Umsatz durch das Enzym HRP unter Lichtausschluss gewährleistet. Die Intensität der Reaktion wurde aufgrund des Farbumschlags kontrolliert und vor Auftreten unspezifischer Hintergrundfärbung mit jeweils 50 μ l einer ELISA-Stopp-Lösung abgestoppt. Die Absorption der Proben wurde mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 630nm gemessen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software „Magellan“.

2.2.8.6 Bestimmung der Nitratkonzentration im Serum

Zur Bestimmung des Nitratgehalts im Serum wurde ein NaNO_3 -Standard (2mM) seriell in A. dest verdünnt. Je 50 μl des Standards und der Serumproben wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte gegeben und mit 25 μl Nitratreduktase-Mix versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf einem Schüttler unter Lichtausschluss erfolgte die Zugabe von zunächst 25 μl FarbreagenzI und anschliessend 25 μl FarbreagenzII. Nach weiteren 10min bei RT wurde die Absorption bei 540nm gemessen.

2.2.9 In vitro-Untersuchungen

2.2.9.1 Gewinnung und Differenzierung von Knochenmarksmakrophagen

Nach Euthanasieren der Maus (siehe 2.2.4) wurden Haut und Fell mit 70% Ethanol in A. dest. desinfiziert. Ober- und Unterschenkel wurden freipräpariert und Muskelgewebe und Sehnen grob entfernt. Durch Schnitte unterhalb des Knies und oberhalb der Hüftgelenk-Kugel wurde der Oberschenkel präpariert und in eine Petrischale mit eiskaltem DMEM überführt. Die Präparation des Unterschenkels erfolgte durch Abtrennung unterhalb der Ferse. Das am Knochen verbliebene Muskelgewebe wurde sorgfältig entfernt und die Gelenkköpfe an beiden Enden der Knochen abgeschnitten. Mit 6ml kaltem DMEM wurde das Knochenmark unter Zuhilfenahme einer 26G-Kanüle aus dem Knochen in ein 50ml-Reaktionsgefäß gespült und für 10min bei 320xg und 4°C präzipitiert. Nach Aufnahme der Zellen in einem geringen Volumen DMEM wurde die Zellzahl nach Anfärbung mit Türk's Lösung bestimmt. Anschliessend wurden die Zellen in 10ml Differenzierungsmedium über Nacht auf einer Petrischale zur Adhärenz mitgeführter Fibroblasten kultiviert. Am folgenden Tag wurden die nicht adhärenen Zellen präzipitiert und 5×10^6 Zellen und nach Zellzahlbestimmung in 10ml Differenzierungsmedium auf Zellkulturschalen (Sarstedt) ausplattiert. Nach 6 Tagen Kultivierung bei 37°C und 5% CO_2 war die Differenzierung der Makrophagen abgeschlossen und die Zellen wurden für Stimulierungsversuche verwendet.

2.2.9.2 Stimulierung von Knochenmarksmakrophagen

Differenzierte Knochenmarksmakrophagen (siehe 2.2.9.1) wurden nach Abnahme des Mediums mit je 10ml warmem PBS gewaschen und im Anschluss mit 5ml Accutase von der Petrischale gelöst. Nach Präzipitation bei 320xg für 10min wurden 1×10^6 Zellen in eine 24-well-Mikrotiter-Flachbodenplatte ausgesät. Die Adhärenz der Zellen wurde durch Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht gewährleistet. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit rekombinantem murinem IL-10 in einer Konzentration von 10ng/ml für 24h stimuliert. Anschliessend wurden die Zellen mit jeweils 250µl Accutase vom Plattenboden gelöst, bei 320xg für 10min präzipitiert und anschließend zur durchflusszytometrischen Analyse (siehe 2.2.8.3) in FACS- Puffer aufgenommen.

2.2.10 Statistik

Die in dieser Arbeit dargestellten quantitativen Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen einer betrachteten Gruppe von Werten. Die Signifikanz von Werten aus zwei zu vergleichenden Gruppen wurde mit Hilfe des „Student`s t-Test“ errechnet (*two-tailed*, Konfidenz-Intervall 95%). Mortalitätskurven wurden unter Verwendung des „Logrank-Testes“ statistisch analysiert. Die Anzahl der durchgeführten Wiederholungsexperimente ist in der jeweiligen Abbildungslegende vermerkt.

3. Ergebnisse

3.1 Modulation der Abwehrmechanismen durch Makrophagen-spezifisch überexprimiertes IL-10 nach *M. tuberculosis*-Infektion

3.1.1 Analyse der Suszeptibilität

Um festzustellen, ob eine vermehrte Generierung von IL-10 durch Makrophagen während einer *Mtb*-Infektion Einfluss auf die Suszeptibilität dieser Tiere hat, wurde die Mortalität von FVB und maclL-10tg Mäusen nach einer Infektion mit 100 KBE *Mtb* bestimmt. Während die Wildtypmäuse der Infektion erst nach etwa 250 bis 300 Tagen erlagen, verstarben die maclL-10tg Tiere bereits nach 88 bis 126 Tagen signifikant früher (Abb. 3).

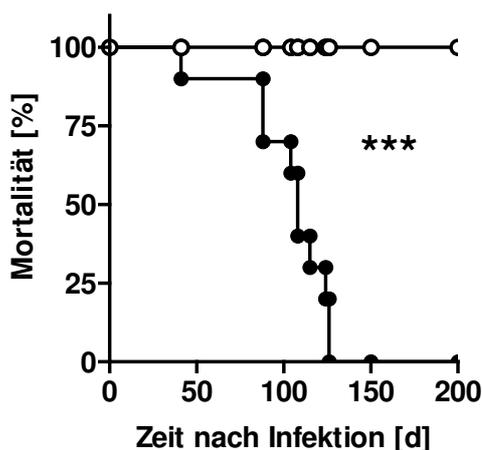


Abb. 3: Mortalität von *M. tuberculosis*-infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen

Jeweils zehn FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg Mäuse (schwarze Symbole) wurden nach Infektion mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol unter Beobachtung gestellt und nach Verlust von 25% ihres ursprünglichen Körpergewichts als moribund eingestuft und euthanasiert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente. Signifikanz: *, $p < 0,05$

Im Folgenden wurde untersucht, ob die erhöhte Sterblichkeit von *Mtb*-infizierten maclL-10tg Mäusen mit einer verstärkten Keimlast in Lunge, Leber und Milz einherging (Abb. 4). Drei Wochen nach Infektion konnte in den Lungen von FVB Mäusen eine starke Vermehrung der Keime auf etwa 10^7 KBE beobachtet werden (Abb. 4a). Diese Keimlast blieb im weiteren Verlauf der Infektion in etwa konstant. In den maclL-10tg Mäusen war die bakterielle Last bis sechs Wochen nach der Infektion mit der in den Lungen der Wildtypmäuse gemessenen Keimlast vergleichbar. Zwölf Wochen nach Infektion stieg das bakterielle Wachstum in den Lungen der maclL-10tg weiter und war mit circa 5×10^8 KBE signifikant ($p < 0,05$) um etwa das

Zehnfache gegenüber dem in FVB Mäusen erhöht. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion war es möglich, die Mykobakterien als „säurefeste Stäbchen“ mittels Ziehl-Neelsen-Färbung in den Makrophagen darzustellen (Abb. 5). Hierbei konnte deutlich beobachtet werden, dass die Anzahl von Erregern in den maclL-10tg Mäusen gegenüber den Wildtypmäusen erhöht war.

Die Keimlast in der Leber stieg sechs Wochen nach der Infektion in den FVB Mäusen auf etwa 5×10^4 KBE an (Abb. 4b). Im weiteren Verlauf der Infektion blieb die bakterielle Last in etwa konstant. In der Leber von maclL-10tg Mäusen war die Keimlast bis sechs Wochen nach Infektion mit den in den Wildtypmäusen beobachteten Keimzahlen vergleichbar. Zwölf Wochen nach Infektion stieg das Wachstum der Keime in den maclL-10tg Tieren auf ca. 10^6 KBE weiter an und war somit gegenüber den Kontrollmäusen signifikant ($p < 0,005$) erhöht.

In der Milz konnte in beiden Mausgruppen früh nach Infektion eine starke Vermehrung der Keime beobachtet werden (Abb. 4c). Diese stieg stetig bis zum Erreichen von 5×10^6 KBE zwölf Wochen nach Infektion an, wobei zu keinem Zeitpunkt der Infektion ein signifikanter Unterschied zwischen FVB und maclL-10tg Mäusen beobachtet werden konnte.

Es konnte somit gezeigt werden, dass maclL-10tg Mäuse gegenüber einer *Mtb*-Infektion mit 100 KBE suszeptibler als Wildtypmäuse sind.

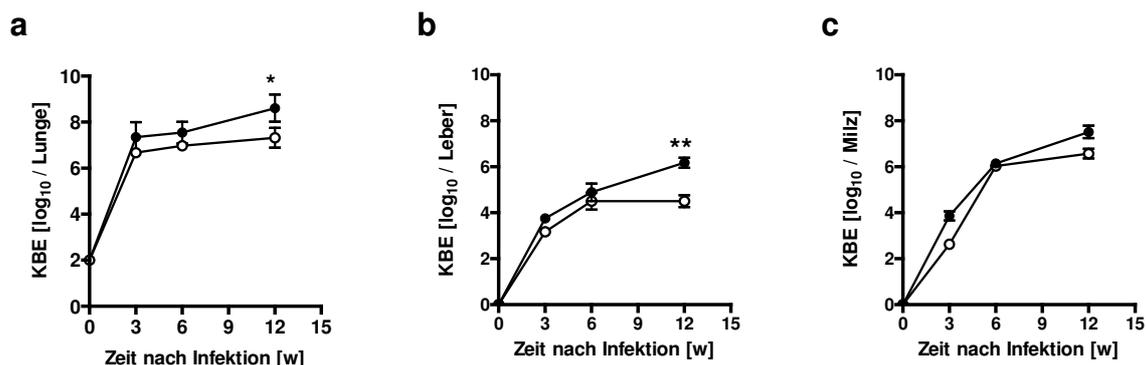


Abb. 4: Keimlast in den Organen von *Mtb*-infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen

FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg (schwarze Symbole) Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Die Keimlast wurde in Lunge (a), Leber (b) und Milz (c) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils vier Mäusen jedes Genotyps. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei durchgeführte Experimente. Signifikanz: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$

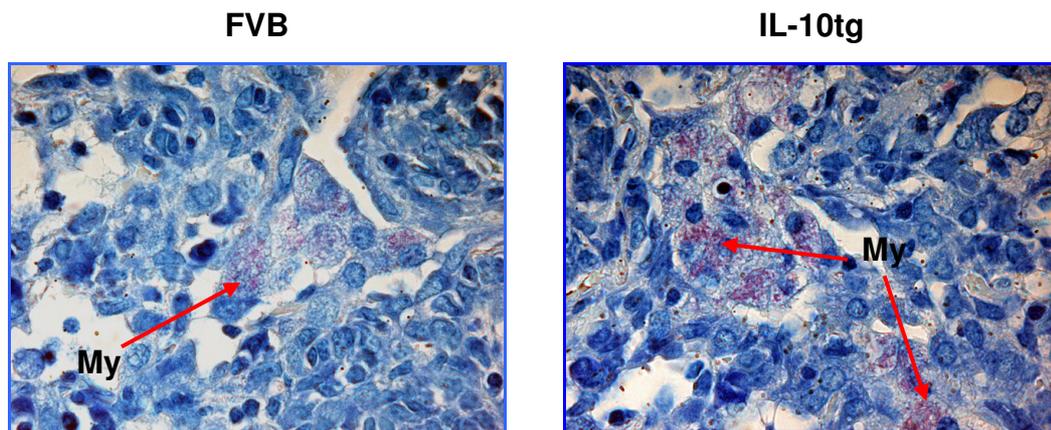


Abb. 5: Anfärbung „säurefester Stäbchen“ in den Lungen von FVB und maclL-10tg Mäusen

FVB und maclL-10tg Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Zwölf Wochen nach Infektion wurden von jeweils 4 Mäusen pro Gruppe 2µm starke Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen angefertigt und nach Ziehl-Neelsen angefärbt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente. Originalvergrößerung: 1000-fach. My: Mykobakterien

3.1.2 Analyse der zellulären Immunantwort in den mediastinalen Lymphknoten

Die Antigen-spezifische Aktivierung und klonale Expansion von T-Lymphozyten ist essentiell für die Bekämpfung von Mykobakterien [Flynn und Chan 2001a, Hommel 2004]. Um zu überprüfen, ob Makrophagen-spezifisch gebildetes IL-10 einen Einfluss auf die Entwicklung der T-Zell-Antwort hat, wurde in den folgenden Analysen die Expansion und Aktivierung der T-Lymphozyten in Lymphknoten und Lunge von infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen untersucht.

3.1.2.1 Expansion und Aktivierung von T-Zellen

Die initialen Prozesse der Ausbildung einer zellulären Immunantwort finden als sog. *priming* im Lymphknoten statt [Hommel 2004]. Im Folgenden wurde anhand durchflusszytometrischer Analysen die Expansion und Aktivierung von T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten von infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen untersucht (Abb. 6). In den FVB Mäusen konnte im Verlauf der Infektion eine stetige Zunahme der Zellzahl bis zum Erreichen von etwa $1,7 \times 10^7$ Zellen zwölf Wochen nach Infektion beobachtet werden. Die Zellzahlen in den Lymphknoten

aus *mac1L-10tg* Mäusen zeigten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach Infektion einen signifikanten Unterschied zu den FVB Mäusen (Abb. 6a).

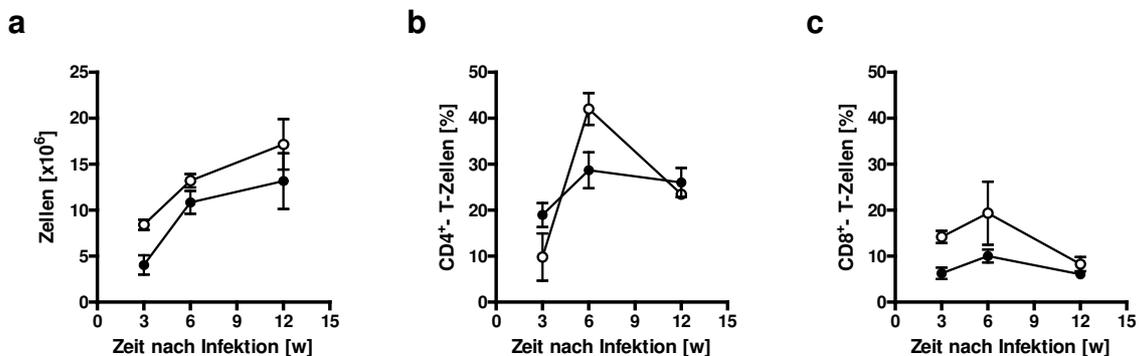


Abb. 6: Zell-Expansion in den mediastinalen Lymphknoten von FVB und *mac1L-10tg* Mäusen
 Zu den dargestellten Zeitpunkten nach Infektion mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol wurden Einzelzellsuspensionen aus den mediastinalen Lymphknoten von FVB (weiße Symbole) und *mac1L-10tg* Mäusen (schwarze Symbole) hergestellt. Durch mikroskopisches Auszählen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die absoluten Zellzahlen (a) bestimmt. Das Vorkommen von CD4⁺-(b) und CD8⁺-(c) T-Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Antikörpermarkierung quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass der Anteil an CD4⁺ T-Zellen in den FVB Mäusen sechs Wochen nach Infektion ein Maximum von circa 42% erreichte. Anschließend verringerte sich die Zahl an CD4⁺ T-Zellen erneut auf etwa 24%. In den *mac1L-10tg* Mäusen konnte drei Wochen nach Infektion mit 20% ein vergleichbarer Anteil CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten detektiert werden, der sechs Wochen nach Infektion mit 27% ein Maximum erreichte. Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil an CD4⁺ T-Zellen zwar niedriger als in den FVB Mäusen, allerdings nicht statistisch signifikant. Zum späten Zeitpunkt der Infektion war der Anteil der CD4⁺ T-Zellen in beiden Mausgruppen mit etwa 24% wieder vergleichbar. Zu keinem Zeitpunkt der Infektion waren signifikant unterschiedliche Anzahlen CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten beider Mausgruppen vorhanden (Abb. 6b.). Der prozentuale Anteil an CD8⁺ T-Lymphozyten in den mediastinalen Lymphknoten von FVB Mäusen betrug drei Wochen nach Infektion etwa 12%. Im weiteren Verlauf der Infektion stieg die Anzahl an CD8⁺ T-Lymphozyten, erreichte sechs Wochen nach Infektion ein Maximum von etwa 15% und verringerte sich schließlich auf etwa 5% zwölf Wochen nach der Infektion. Zu keinem Zeitpunkt der Infektion wurde eine signifikant unterschiedliche Anzahl an CD8⁺ T-Zellen in den Lymphknoten von *mac1L-10tg* Mäusen festgestellt (Abb. 6c). Somit konnte gezeigt

werden, dass die Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten von FVB und maclL-10tg Mäusen nicht signifikant verschieden war.

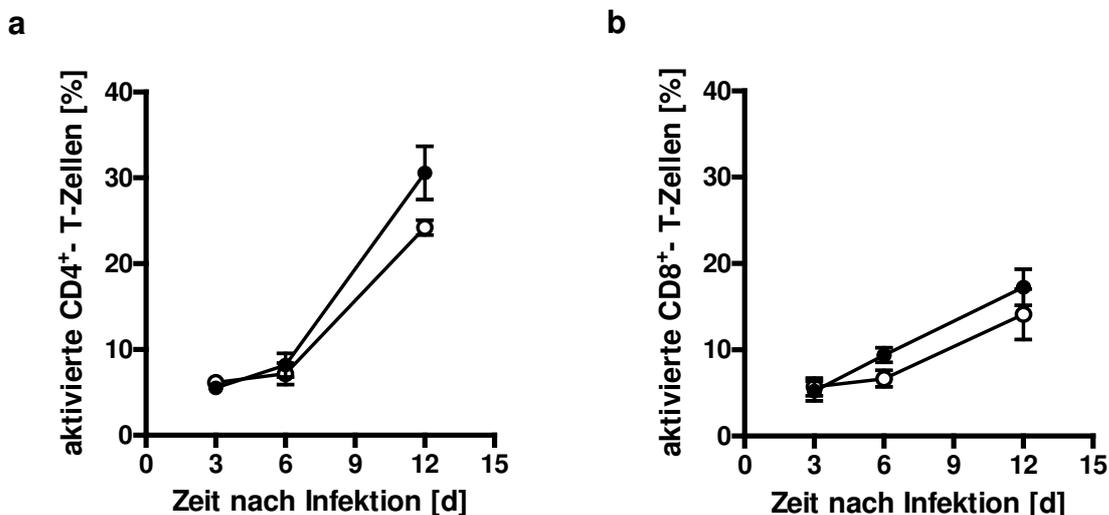


Abb. 7: Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten von *Mtb*-infizierten FVB und maclL-10tg Mäuse

Zu den dargestellten Zeitpunkten nach Infektion mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol wurden Einzelzellsuspensionen aus den mediastinalen Lymphknoten von FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg Mäusen (schwarze Symbole) hergestellt. Die Anzahl aktivierter CD4⁺ (a) und CD8⁺ T-Zellen (b) wurde durch das Expressionsprofil der Oberflächenmarker CD44 und CD62L durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

Der Anteil aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch über die Messung der Expression der Oberflächenproteine CD44 und CD62L quantifiziert (Abb. 7). T-Zellen mit hoher Expression von CD44 (CD44^{high}) und verminderter Expression von CD62L (CD62^{low}) wurden als aktivierte T-Zellen definiert. Drei Wochen nach Infektion zeigten etwa 6% der in den Lymphknoten von FVB Mäusen vorhandenen CD4⁺ T-Zellen einen aktivierten Phänotyp. Im weiteren Verlauf der Infektion stieg die Anzahl aktivierter CD4⁺ T-Zellen an und erreichte zwölf Wochen nach Infektion etwa 27%. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Anzahl aktivierter CD4⁺ T-Zellen in FVB und maclL-10tg Mäusen festgestellt werden (Abb. 7a).

Auch der Anteil aktivierter CD8⁺ T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten nahm im Verlauf der Infektion in beiden Mausgruppen vergleichbar zu und erreichte zwölf Wochen nach Infektion etwa 15% (Abb. 7b).

Hinsichtlich der im Lymphknoten stattfindenden initialen Prozesse der Entwicklung einer T-Zell-vermittelten Immunabwehr gegen eine Infektion mit *Mtb* konnte keine quantitative Beeinträchtigung durch die Makrophagen-spezifische Überexpression von IL-10 festgestellt werden.

3.1.2.2 IFN γ -Produktion von CD4⁺ T-Zellen

Um festzustellen, ob durch die Makrophagen-spezifische Überexpression von IL-10 das Antigen-spezifische *priming* von CD4⁺ T-Lymphozyten beeinträchtigt ist, wurden zunächst aus den mediastinalen Lymphknoten infizierter FVB und maclL-10tg Mäuse CD4⁺ T-Zellen aufgereinigt und mit Hilfe Antigen-präsentierender Peritonealmakrophagen aus naiven FVB Mäusen mit *Mtb*-spezifischen Antigenen restimuliert. Nach 72-stündiger Kultivierung wurde die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand gemessen (Abb. 8). Im Überstand unstimulierter CD4⁺ T-Zellen aus FVB Mäusen konnte nach 72h 1,4ng/ml IFN γ , im Überstand unstimulierter Zellen von maclL-10tg Mäusen etwa 4ng/ml IFN γ detektiert werden. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Nach spezifischer Restimulierung stieg die IFN γ -Produktion in beiden Mausgruppen stark an und erreichte im Überstand stimulierter CD4⁺ T-Zellen jeweils etwa 15ng/ml. Es konnte also auch nach Restimulierung kein signifikanter Unterschied in der IFN γ -Produktion von CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden.

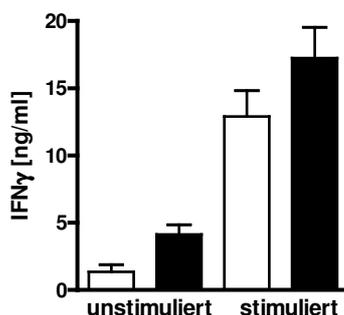


Abb.8: IFN γ -Produktion von CD4⁺ T-Zellen aus den mediastinalen Lymphknoten von FVB und maclL-10tg Mäusen

FVB (weiße Balken) und maclL-10tg (schwarze Balken) Mäusen wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Sechs Wochen nach Infektion wurden 10^6 aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen zu 5×10^5 adhären, ST-CF-stimulierten oder unstimulierten PEC aus naiven FVB Mäusen gegeben. Nach 72h wurde der IFN γ -Spiegel im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Stimulationsansätzen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

3.1.3 Untersuchungen der Expansion und Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Lunge

Nach der Infektion mit *Mtb* wandern T-Zellen, welche in den Lymphknoten aktiviert werden, in das infizierte Gewebe ein, wo sie ihre Effektorfunktionen ausbilden [Hommel 2004]. Um die Auswirkungen einer Makrophagen-spezifischen Überexpression von IL-10 auf die Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen in den Lungen infizierter Mäuse zu untersuchen, wurde die Infiltration der Zellen histologisch untersucht und die Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert.

3.1.3.1 Histologische Untersuchungen der Rekrutierung und Organisation von Immunzellen

Granulomatöse Veränderungen im Lungengewebe sind ein charakteristisches Phänomen mykobakterieller Infektionen in der Tuberkulose, und stellen eine massive Infiltration von Immunzellen dar [Ehlers 2003]. Um den Einfluss einer IL-10-Überexpression auf die Rekrutierung und Organisation von Immunzellen im infizierten Lungengewebe zu untersuchen, wurden H&E-Färbungen von Lungenpräparaten durchgeführt (Abb. 9). Drei Wochen nach Infektion zeigten sich in den Wildtypmäusen erste peribronchiale Zellinfiltrationen, die im weiteren Verlauf der Infektion zunahmten und zwölf Wochen nach Infektion etwa ein Viertel des Gewebes einnahmen, wobei es sich hauptsächlich um Lymphozyten und Makrophagen handelte (Abb. 9). In beiden Gruppen konnte in den granulomatösen Gewebsveränderungen hinsichtlich der Rekrutierung und Organisation der Immunzellen zu keinem Zeitpunkt nach Infektion ein Unterschied festgestellt werden.

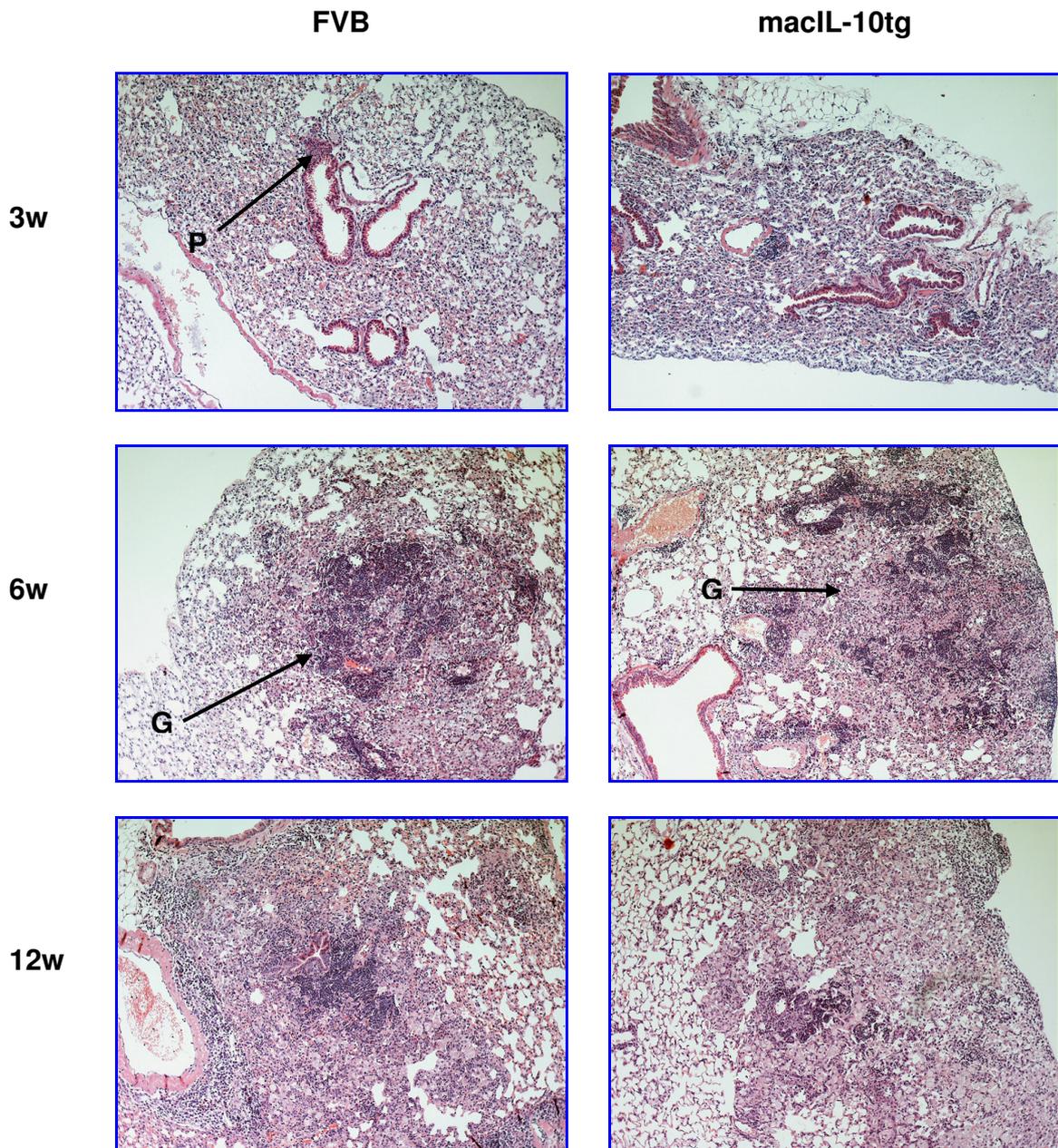


Abb. 9: Infiltration von Immunzellen in den Lungen von FVB und macIL-10tg Mäusen

FVB und macIL-10tg Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Drei, sechs und zwölf Wochen nach Infektion wurden von jeweils 4 Mäusen pro Gruppe 2µm starke Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen angefertigt und mit H&E angefärbt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente. Originalvergrößerung: 100-fach. G: Granulom; P: peribronchiale Infiltration

3.1.3.2 Untersuchung aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Zu den dargestellten Zeitpunkten vor und nach Infektion wurde der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Lunge durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 10). In den Lungen beider Mausgruppen konnten vor Infektion etwa 7% CD4⁺ T-Zellen

detektiert werden. Nach Infektion nahm der Anteil an CD4⁺ T- Zellen bis zum Erreichen von 17% sechs Wochen nach Infektion zu und reduzierte sich im weiteren Verlauf der Infektion auf etwa 14% in FVB und maclL-10tg Mäusen (Abb. 10a). Die Infiltration von CD8⁺ T-Lymphozyten beider Mausgruppen steigerte sich ausgehend von ca. 2% CD8⁺ T-Zellen vor Infektion bis auf etwa 10% sechs Wochen nach Infektion und verringerte sich im weiteren Verlauf bis auf etwa 6% zum späten Zeitpunkt der Infektion (Abb. 10b). Somit konnte zu keinem der dargestellten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied in der Rekrutierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in die Lungen von FVB und maclL-10tg Mäusen festgestellt werden.

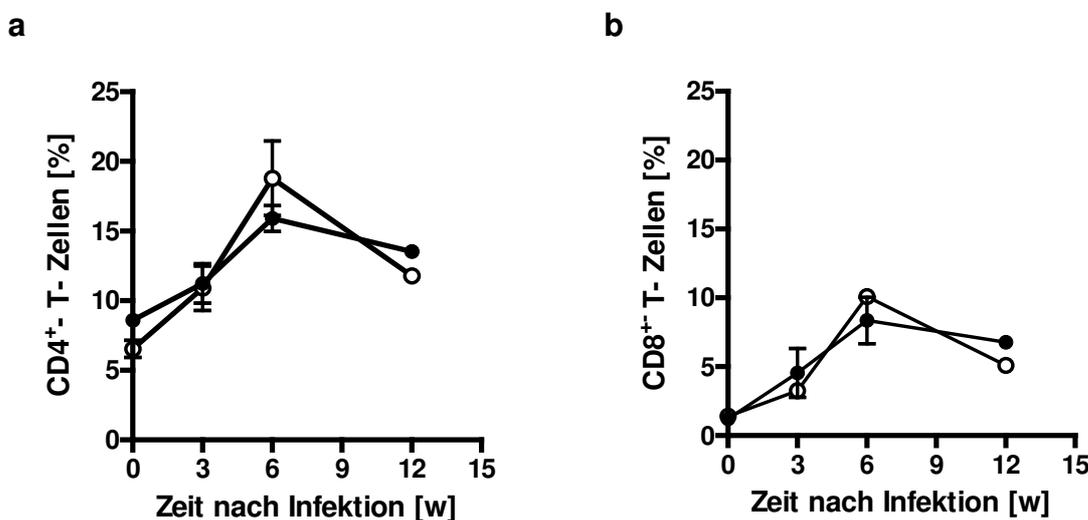


Abb. 10: T-Zell-Expansion in die Lunge von *Mtb*-infizierter FVB und maclL-10tg Mäusen

Zu den dargestellten Zeitpunkten nach Aerosolininfektion mit 100 Keimen *Mtb* wurden Einzelzellensuspensionen aus Lungen von FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg (schwarze Symbole) Mäusen hergestellt. Die Expansion von CD4⁺ (a) und CD8⁺ (b) T-Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Antikörpermarkierung quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

Der Aktivierungsstatus von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten wurde anhand der Expression der Oberflächenproteine CD44 und CD62L durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 11). Vor Infektion waren etwa 10% der CD4⁺ T-Zellen im Lungengewebe der Wildtypmäuse aktiviert. Drei Wochen nach Infektion stieg die Anzahl aktivierter CD4⁺ T-Zellen zunächst nur leicht an und erhöhte sich im weiteren Verlauf der Infektion deutlich bis auf etwa 45%, zwölf Wochen nach der Infektion. Die Anzahl aktivierter CD4⁺ T-Zellen in den Lungen maclL-10tg Mäuse zeigte bis drei Wochen nach der Infektion keinen Unterschied zu der in den FVB

Mäusen detektierten Anzahl. Sechs Wochen nach Infektion konnten allerdings mit ca. 55% signifikant mehr ($p < 0,05$) aktivierte $CD4^+$ T-Zellen als in den Wildtypmäusen nachgewiesen werden. Auch zwölf Wochen nach Infektion war der Anteil aktivierter $CD4^+$ T-Zellen in den transgenen Tieren noch leicht, jedoch nicht signifikant erhöht (Abb. 11a).

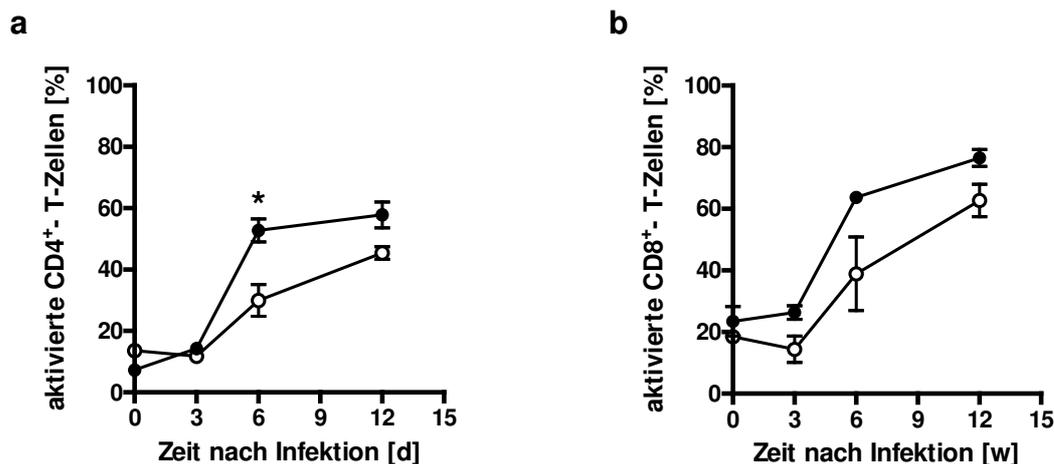


Abb.11: Aktivierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in den Lungen von *Mtb*-infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen

Zu den dargestellten Zeitpunkten nach Aerosolininfektion mit 100 Keimen *Mtb* wurden Einzelzellsuspensionen aus perfundierten Lungen von FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg Mäusen (schwarze Symbole) hergestellt. Die Anzahl aktivierter $CD4^+$ (a) und $CD8^+$ T-Zellen (b) wurde durch das Expressionsprofil der Oberflächenmarker CD62L / CD44 durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente. Signifikanz: *, $p < 0,05$

Vor der Infektion mit *Mtb* waren ca. 20% der $CD8^+$ T-Zellen in den Lungen der FVB Mäuse aktiviert (Abb. 11b). Erst sechs Wochen nach Infektion konnte mit ca. 35% eine vermehrte Rekrutierung von aktivierten $CD8^+$ T-Zellen bis zum Erreichen von etwa 60% zwölf Wochen nach Infektion beobachtet werden. Die Rekrutierung aktivierter $CD8^+$ T-Zellen in die Lungen maclL-10tg Mäuse war zu keinem Zeitpunkt vor oder nach Infektion signifikant von der in Wildtypmäusen verschieden.

3.1.3.3 Untersuchung der $IFN\gamma$ -Produktion

Anhand der vorangegangenen durchflusszytometrischen Analysen konnte keine Beeinträchtigung der Rekrutierung von T-Lymphozytenpopulationen in maclL-10tg Mäusen festgestellt werden. Inwieweit Effektorfunktionen von T-Zellen, wie die

Produktion von IFN γ , durch die Makrophagen-spezifische Überexpression von IL-10 beeinflusst werden, wurde im Folgenden untersucht.

Zunächst wurden T-Lymphozyten aus perfundierten Lungen infizierter FVB und maclL-10tg Mäuse auf ihr Potential zur IFN γ -Produktion hin untersucht. Nach vierstündiger *in vitro*-Stimulierung der Zellen durch an Platten gebundene Anti-CD3/-CD28 Antikörper und gleichzeitiger Fixierung intrazellulär gebildeter Proteine wurde der prozentuale Anteil IFN γ -produzierender Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 12a und b). Ohne Stimulus konnten in den Lungen von FVB Mäusen ca. 1% IFN γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen detektiert werden. In maclL-10tg Mäusen war der prozentuale Anteil IFN γ -produzierender CD4⁺ T-Zellen ohne Stimulus etwa um das Vierfache erhöht, wobei dieser Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 12a). Sechs Wochen nach Infektion konnten nach Restimulierung der Lungenzellen aus FVB Mäusen etwa 16% IFN γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen detektiert werden. In den Einzelzellsuspensionen von Lungen aus maclL-10tg Tieren war der Anteil IFN γ -produzierender CD4⁺ T-Zellen mit ca. 30% um fast das Zweifache signifikant erhöht ($p < 0,05$) (Abb. 12a). Ohne Stimulus konnten etwa 1-2% IFN γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen in den Lungen von FVB und maclL-10tg Mäusen detektiert werden (Abb. 12b). Nach Stimulierung betrug die Anzahl IFN γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen in beiden Mausgruppen etwa 10% (Abb. 12b).

Um die gesamte IFN γ -Produktion in den Lungen von FVB und maclL-10tg Mäusen bestimmen zu können, wurde das Zytokin zu den dargestellten Zeitpunkten mittels ELISA im Lungenhomogenat quantifiziert (Abb. 12b). Ausgehend von einer IFN γ -Konzentration von etwa 300pg/Lunge stieg diese nach Infektion in den FVB Mäusen bis auf etwa 1,3ng/Lunge sechs Wochen nach Infektion an. Anschließend verringerte sich die IFN γ -Konzentration erneut auf etwa 800pg/Lunge zwölf Wochen nach Infektion (Abb. 12c). Im Vergleich zu den FVB Mäusen ließen sich zu keinem Zeitpunkt der Infektion signifikant unterschiedliche IFN γ -Konzentration in den Lungen von FVB und maclL-10tg Mäusen nachweisen.

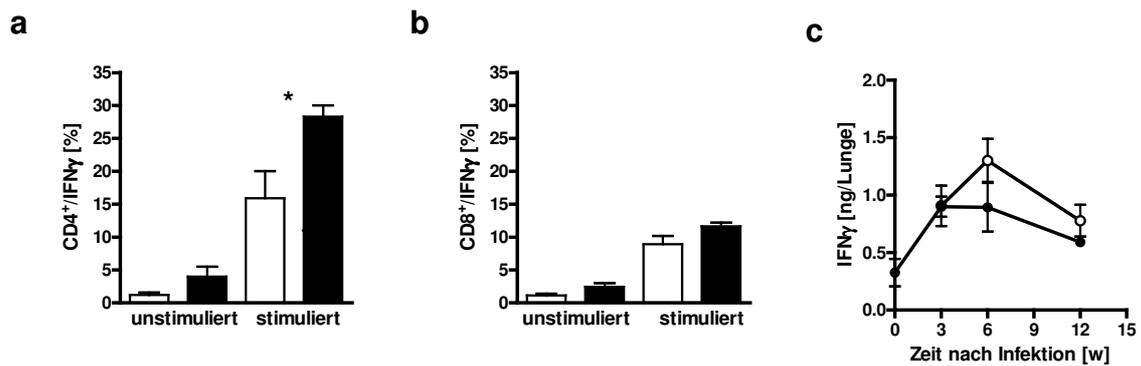


Abb. 12: IFN γ -Produktion in den Lungen von *Mtb*-infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen

Sechs Wochen nach Aerosolinfektion mit 100 Keimen *Mtb* wurden Einzelzellsuspensionen von perfundierten Lungen aus FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg (schwarze Symbole) Mäusen auf Anti-CD3/ α CD28 beschichtete oder unbeschichtete Platten ausplattiert. Nach 4h Inkubation und Fixierung intrazellulärer Proteine wurde die IFN γ -Produktion in CD4⁺ (a) und CD8⁺ T-Zellen (b), durchflusszytometrisch analysiert. Die IFN γ -Konzentration in Lungenhomogenaten von FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg Mäusen (schwarze Symbole) wurden zu den dargestellten Zeitpunkten nach Infektion und in nicht infizierten Kontrolltieren mittels ELISA quantifiziert (c). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei (a / b) bzw. drei (c) durchgeführte Experimente. Signifikanz: *; $p < 0,05$

3.1.4 Untersuchung der Induktion IFN γ -abhängiger Gene in der Lunge

3.1.4.1 Analyse der mRNA-Expression von *Irg-47* und *nos2*

Obwohl keine Beeinträchtigung der IFN γ -Produktion durch T-Zellen in Lymphknoten oder Lunge festgestellt wurde, sollten die folgenden Untersuchungen zeigen, ob die Induktion der IFN γ -abhängigen Gene *Irg-47* und *nos2*, welche für die Abwehr von Mykobakterien essentiell sind [Feng 2004, MacMicking 1997, MacMicking 2003], in *Mtb*-infizierten maclL-10tg Mäusen beeinträchtigt war. Hierzu wurden in den Lungen von FVB und maclL-10tg Mäuse zu den dargestellten Zeitpunkten die mRNA-Expression dieser Gene quantifiziert (Abb. 13). Nach einer geringen mRNA-Expression von *Irg-47* in nicht infizierten Mäusen stieg die Transkription in den FVB Mäusen nach Infektion stark an und erreichte drei Wochen nach Infektion einen maximalen Wert (Abb. 13a). Sechs Wochen nach Infektion verringerte sich die mRNA-Expression des Gens und blieb im weiteren Verlauf der Infektion konstant. Bis einschließlich sechs Wochen nach Infektion konnte in den maclL-10tg Mäusen keine signifikant unterschiedliche mRNA-Expression von *Irg-47* detektiert werden. Zwölf Wochen nach Infektion war

die mRNA-Expression im Vergleich zu den Wildtypmäusen reduziert, wobei dieser Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 13a).

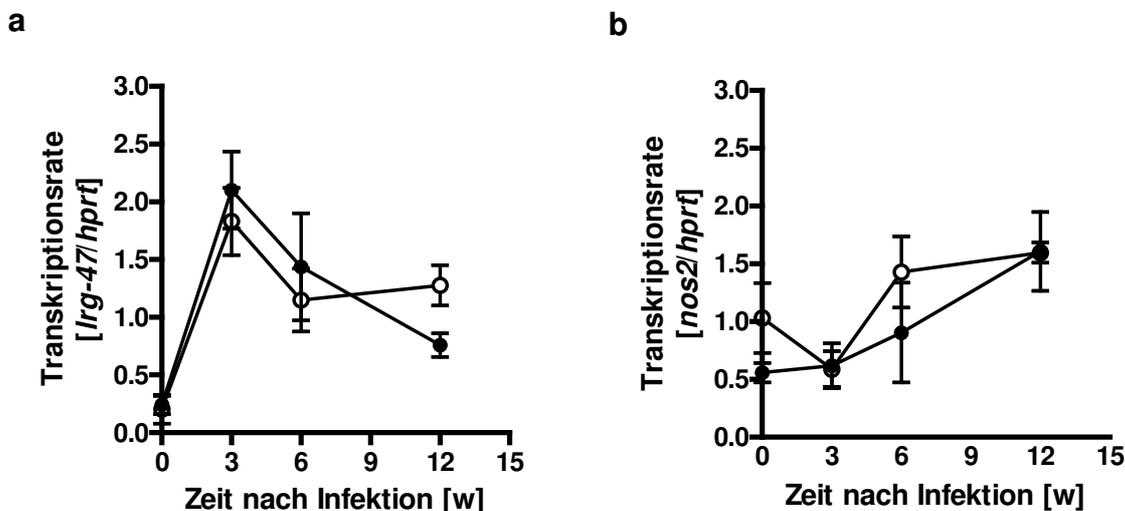


Abb. 13: Transkriptionsanalysen IFN γ -induzierter Gene in *Mtb* infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen

FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg (schwarze Symbole) Mäuse wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die mRNA-Expression der Gene *Irg-47* (a) und *nos2* (b) in den Lungen mit Hilfe von quantitativer PCR bestimmt und relativ zur Expression des auf konstantem Niveau exprimierten Gens *hprt* betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

Des Weiteren wurde zu den dargestellten Zeitpunkten die mRNA-Expression von *nos2* quantifiziert. Vor Infektion konnte bereits eine leicht erhöhte mRNA-Expression in den FVB Mäusen detektiert werden. Erst sechs Wochen nach Infektion mit *Mtb* konnte eine Induktion von *nos2* gegenüber den uninfizierten Mäusen beobachtet werden, die zwölf Wochen nach Infektion einen maximalen Wert erreichte. Die mRNA-Expression von *nos2* in den Lungen maclL-10tg Mäuse war zu allen dargestellten Zeitpunkten mit der mRNA-Expression in den Wildtypmäusen vergleichbar und zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb.13b).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Induktion IFN γ -abhängiger Gene in den maclL-10tg Mäusen zu keinem Zeitpunkt der Infektion mit *Mtb* beeinträchtigt war.

3.1.4.2 Immunhistologischer Nachweis von NOS2 im Lungengewebe

Die Expression von NOS2 wurde in den vorangegangenen Untersuchungen bereits auf Transkriptionsebene gezeigt. Um NOS2 auf Proteinebene nachzuweisen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion Paraffinschnitte von Formalin-fixierten Lungen aus FVB und maclL-10tg Mäusen angefertigt und immunhistologisch mit einem Anti-NOS2-Antikörper angefärbt. Drei Wochen nach Infektion war die Expression von NOS2 in beiden Mausgruppen vergleichbar (Abb. 14). Im weiteren Verlauf der Infektion konnte mit Zunahme der infiltrierten Zellen ins Gewebe auch eine vermehrte Expression von NOS2 in beiden Mausgruppen festgestellt werden, welche zwölf Wochen nach Infektion am deutlichsten in Erscheinung trat. Entsprechend der mRNA-Expressionsanalysen konnte hinsichtlich der NOS2-Expression auch auf Proteinebene kein Unterschied zwischen FVB und maclL-10tg Mäusen festgestellt werden (Abb. 14).

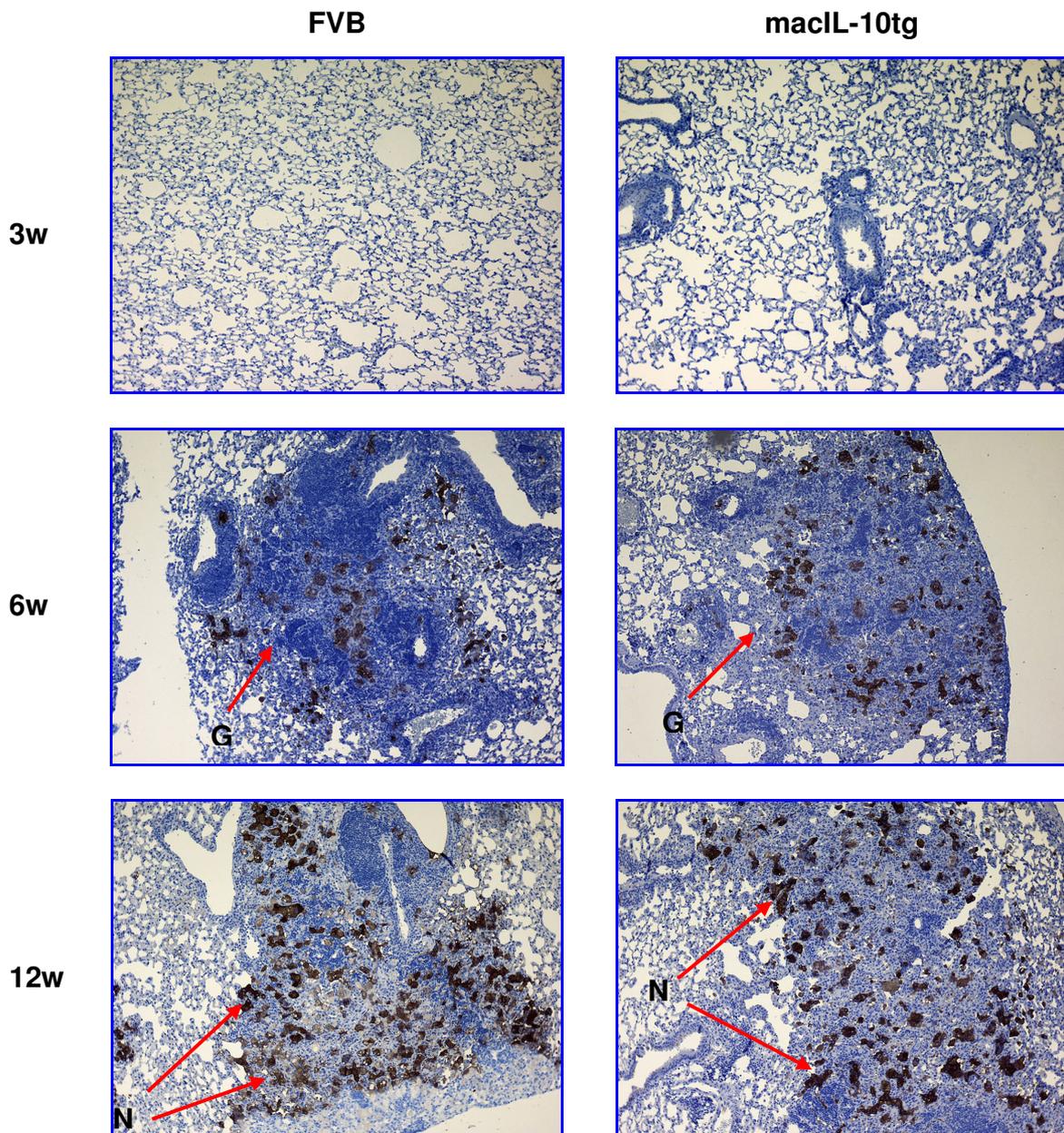


Abb. 14: Expression der NOS2 im Lungengewebe von FVB und mac1L-10tg Mäusen

FVB und mac1L-10tg Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen von jeweils vier Mäusen wurden drei, sechs und zwölf Wochen nach Infektion angefertigt und NOS2 immunhistologisch angefärbt. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente. Originalvergrößerung: 100-fach. N: NOS2-positive Zellen (braune Färbung); G: Granulom

3.1.5 Untersuchung der Nitratkonzentration im Serum

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Suszeptibilität von *mac1L-10tg* Mäusen trotz unbeeinträchtigter NOS2-Expression auf eine verminderte Generierung von RNI zurückzuführen war, wurde der Nitratspiegel im Serum als ein Maß für die NO-Synthese in FVB und *mac1L-10tg* Mäuse mittels Nitrit/Nitrat Farbttest gemessen (Abb. 15). In den FVB Mäusen konnte nach Infektion eine leichte Zunahme der Nitratkonzentration festgestellt werden, die zwölf Wochen nach Infektion einen maximalen Wert erreichte. In Gegensatz dazu stieg die Nitratkonzentration in den *mac1L-10tg* Tieren nach Infektion deutlich an und erreichte zwölf Wochen nach Infektion mit etwa 11 μ M eine ca. zweifache, signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung gegenüber den Wildtypmäusen.

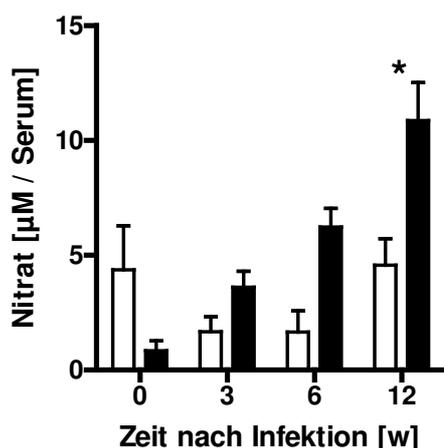


Abb. 15: Quantifizierung der Nitratkonzentration im Serum *Mtb*-infizierter FVB und *mac1L-10tg* Mäuse

FVB (weiße Symbole) und *mac1L-10tg* (schwarze Symbole) Mäuse wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Zu den dargestellten Zeitpunkten nach Infektion und in nicht infizierten Kontrolltieren wurde die Nitrat-Produktion nach Nitrat-Reduktion im Serum bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente. Signifikanz: *, $p < 0,05$

3.1.6 Untersuchung der Makrophagenfunktionen in der Lunge

3.1.6.1 Untersuchung der *il-12p40*-mRNA-Expression

Eine T-Zell-spezifische Überexpression von IL-10 führte nach einer mit dieser Arbeit vergleichbaren *Mtb*-Aerosolinfection zu einer Verringerung der IL-12-Expression [Turner et al. 2002].

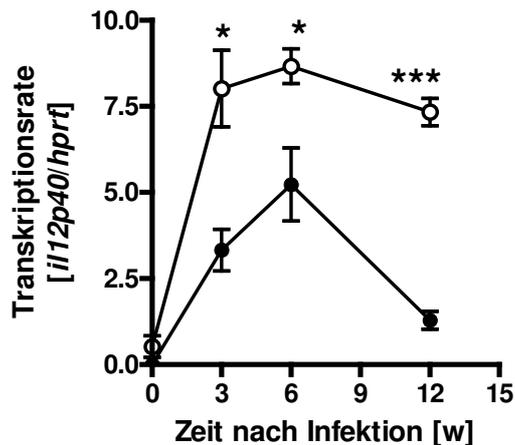


Abb.16: Quantifizierung der Transkription von *il-12p40* in den Lungen von *Mtb*-infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen

FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg (schwarze Symbole) Mäuse wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde in nicht infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen die mRNA-Transkription des Gens *il-12p40* in den Lungen mittels quantitativer PCR bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse wurden relativ zur Expression des konstant exprimierten Gens *hprt* betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen je Genotyp. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente. Signifikanz: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$

In der vorliegenden Untersuchung konnte drei Wochen nach Infektion mit *Mtb* in den FVB Mäusen eine starke Induktion der *il-12p40*-mRNA-Expression gegenüber nicht infizierten Tieren detektiert werden (Abb. 16). Sechs Wochen nach Infektion blieb die mRNA-Expression in etwa konstant und sank zwölf Wochen nach der Infektion erneut leicht ab. In den maclL-10tg Mäusen kam es nach Infektion ebenfalls zur Induktion von *il-12p40*, wobei die mRNA-Expression gegenüber den FVB Mäusen stets signifikant ($p < 0,05$ Woche 3 und 6; $p < 0,001$ Woche 12) erniedrigt war.

3.1.6.2 Untersuchung der Differenzierung unterschiedlicher Makrophagenpopulationen

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte keine Beeinträchtigung der T-Zell-vermittelten Immunantwort in Lymphknoten und Lungen von maclL-10tg Mäusen festgestellt werden. Auch die T-Zell-vermittelten Effektorfunktionen waren in diesen Tieren nicht beeinträchtigt. Da sich jedoch eine Reduktion der *il-12p40*-mRNA-Expression, welche hauptsächlich in Makrophagen stattfindet, feststellen ließ, wurde in den folgenden Studien der Einfluss von überexprimiertem IL-10 auf die Differenzierung der Makrophagenpopulationen in der Lunge nach *Mtb*-Infektion untersucht.

3.1.6.2.1 Untersuchung der Differenzierung klassisch aktivierter Makrophagen

In mehreren Studien ist die Differenzierung eines „supprimierenden“ Makrophagenphänotyps durch IL-10 beschrieben, welcher der klassischen Aktivierung von Makrophagen entgegen wirkt. Diese Makrophagen zeigen eine verminderte Expression des MHC-II-Komplexes, sowie kostimulatorischer Moleküle [de Waal Malefyt et al. 1991, Ding et al. 1993]. Um festzustellen, ob nach *Mtb*-Infektion durch die Überexpression von IL-10 eine vermehrte Differenzierung supprimierender Makrophagen in der Lunge stattfindet, wurden nach Perfusion Einzelzellsuspensionen durchflusszytometrisch analysiert.

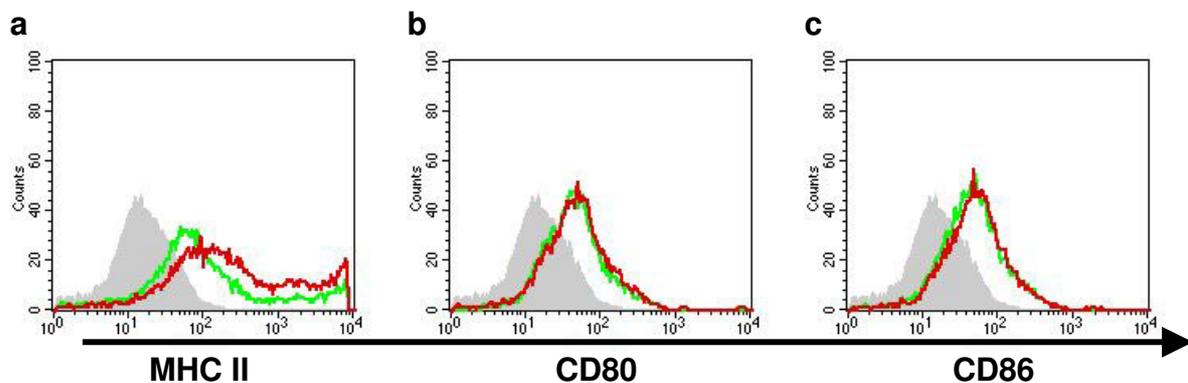


Abb. 17: Expression von MHC II, CD80 und CD86 auf Makrophagen von FVB und maclL-10tg Mäusen

FVB (grüne Linie) und maclL-10tg Mäuse (rote Linie) wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Einzelzellsuspensionen perfundierter Lungen wurden drei, sechs und zwölf Wochen nach Infektion hergestellt und die Expression der Oberflächenproteine MHC II (a), CD80 (b) und CD86 (c) nach Antikörpermarkierung durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle diente eine Isotypfärbung (grau schattiert). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für alle betrachteten Zeitpunkte. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Hierbei wurden die charakteristischen Oberflächenproteine MHC II, CD80 und CD86 mittels fluoreszierender Antikörper markiert. Um die dieser Marker Makrophagen-spezifisch zu betrachten, wurde zusätzlich ein Anti-MAC3-Antikörper verwendet. Zu allen betrachteten Zeitpunkten der Infektion konnte in den Lungen der FVB Mäuse eine deutliche MHC II- Expression detektiert werden (Abb.17a), wie sich im Vergleich mit der Isotypkontrolle zeigte. Die Expression des MHC-II in maclL-10tg Mäusen war zu allen untersuchten Zeitpunkten der Infektion

mit der Expression des MHC-II in FVB Mäusen vergleichbar. Auch die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 (Abb. 17b) und CD86 (Abb. 17c) auf Makrophagen zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine differentielle Regulierung in den IL-10- überexprimierenden Tieren.

3.1.6.2.2 Untersuchung der IL-4R α - und Mannoserezeptor-Expression auf Makrophagen

In vorangegangenen Studien konnte ein weiterer Effekt von IL-10 auf Makrophagen *in vitro* gezeigt werden [Lang et al. 2002]. In Abhängigkeit von IL-10 wurde eine Hochregulierung des IL-4R α auf Knochenmarksmakrophagen beobachtet. Da die alternative Aktivierung von Makrophagen über den IL-4R α vermittelt wird [Gordon 2003], wurde im Folgenden untersucht, ob es durch den Einfluss von IL-10 nach *Mtb*-Infektion zu einer vermehrten Generierung alternativ aktivierter Makrophagen kommt.

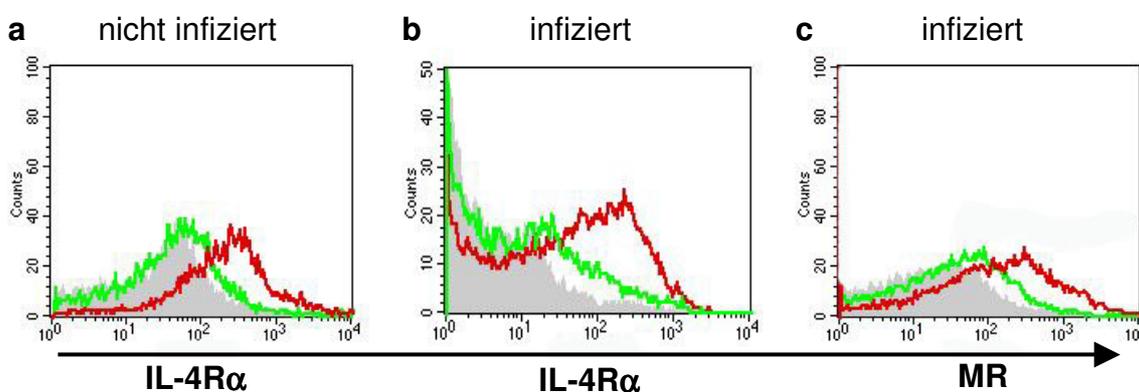


Abb. 18: Makrophagen-spezifische Expression des IL-4R α und des Mannosereptors in FVB und maclL-10tg Mäusen

Einzelzellsuspensionen wurden aus uninfizierten Mäusen (a) sowie FVB (grüne Linie) und maclL-10tg Mäusen (rote Linie) nach Aerosolininfektion mit 100 Keimen *Mtb* hergestellt (b/c). Die Expression des IL-4R α (a/b) und des MR (c), wurde nach Antikörpermarkierung durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle diente eine Isotypfärbung (grau schattiert). Dargestellt ist ein repräsentatives Expressionsprofile von drei Mäusen jedes Genotyps. Die Ergebnisse sind repräsentativ für alle betrachteten Zeitpunkte nach der Infektion. Das dargestellte Ergebnis wurde zweimal durchgeführt.

Um den Einfluss der Makrophagen-spezifischen Überexpression von IL-10 auf die IL-4R α -Expression auf Makrophagen *in vivo* zu untersuchen, wurden Einzelzellsuspensionen aus perfundierten Lungen von uninfizierten FVB und maclL-10tg Mäuse durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 18a). Hierzu wurden

die Zellen mit einem Makrophagen-spezifischen Anti-MAC3-Antikörper und einem Anti-IL-4R α -Antikörper markiert. Es zeigte sich, dass die Makrophagen aus uninfizierten FVB Mäusen (Abb. 18a) keinen IL-4R α exprimierten. Im Gegensatz dazu konnte eine konstitutive Expression des IL-4R α auf Makrophagen aus uninfizierten maclL-10tg Mäusen beobachtet werden. Nach Infektion mit *Mtb* wurde der IL-4R α auf Makrophagen aus FVB Mäusen hochreguliert (Abb. 18b), wobei die Expression des IL-4R α auf Makrophagen aus maclL-10tg Mäusen deutlich erhöht war (Abb. 18b).

Um zu bestätigen, dass die gezeigte Heraufregulierung des IL-4R α auf Makrophagen in maclL-10tg Mäusen mit einer vermehrten Differenzierung alternativ aktivierter Makrophagen korreliert, wurde auch die Expression des Mannoserezeptors auf Makrophagen durchflusszytometrisch analysiert. Es zeigte sich, dass Makrophagen in der Lunge aus FVB Mäusen (Abb. 18c) den Mannoserezeptor geringfügig exprimierten. In den Lungen von maclL-10tg Mäusen (Abb. 18c) hingegen konnte zu allen Zeitpunkten nach Infektion eine starke Expression des MR auf Makrophagen beobachtet werden.

3.1.6.2.3 Untersuchung der IL-10-abhängigen IL-4R α -Expression auf Knochenmarksmakrophagen *in vitro*

Im Folgenden sollte die in den maclL-10tg Mäusen beobachtete Abhängigkeit der IL-4R α -Expression von IL-10 auf Makrophagen unabhängig von der Komplexität immunologischer Vorgänge *in vivo* bestätigt werden.

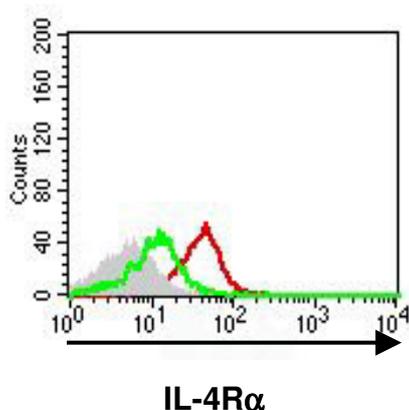


Abb. 19: IL-10-vermittelte Regulierung der IL-4R α -Expression auf Knochenmarks-makrophagen *in vitro*

Aus nicht infizierten FVB Mäusen wurden Knochenmarksmakrophagen generiert und für 24h mit murinem, rekombinatem IL-10 (rote Linie) stimuliert oder in Medium als Kontrolle (grau schattiert) parallel kultiviert. Die IL-4R α - Expression wurde nach Antikörpermarkierung durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle diente eine Isotypfärbung (grau schattiert). Dargestellt ist ein Expressionsprofil von drei Stimulationsansätzen. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

Hierzu wurden Knochenmarksmakrophagen von FVB Mäusen mit rekombinantem IL-10 für 24h inkubiert und im Anschluss die IL-4R α -Expression auf Makrophagen durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurde ein Anti-IL-4R α -Antikörper und ein Makrophagen-spezifischer Anti-F4/80-Antikörper verwendet. In den nicht stimulierten Kontroll-Makrophagen konnte eine geringe Anzahl IL-4R α -positiver Makrophagen detektiert werden. Nach 24-stündiger Inkubation mit IL-10 war die IL-4R α - Expression auf Makrophagen jedoch deutlich erhöht (Abb. 19).

3.1.6.2.4 Untersuchung der *arg-1*-mRNA-Expression in der Lunge

In bereits publizierten Studien konnte festgestellt werden, dass die Hochregulierung des IL-4R α durch IL-10 mit einer erhöhten Expression von *arg-1* einherging [Lang et al. 2002]. Um *arg-1* als weiteren Marker alternativ aktivierter Makrophagen in IL-10-überexprimierenden Mäusen nachzuweisen, folgten Analysen der mRNA-Expression dieses Gens.

a

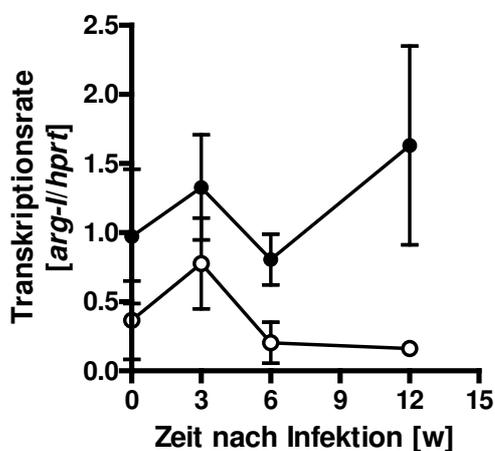


Abb. 20: Arginase-1-mRNA-Expression in *Mtb*-infizierten FVB und maclL-10tg Mäusen

FVB (weiße Symbole) und maclL-10tg (schwarze Symbole) Mäuse wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion und in nicht infizierten Kontrolltieren wurde in den Lungen infizierter und nicht infizierter Mäuse die mRNA-Expression des Gens *arg-1* mittels quantitativer PCR bestimmt und relativ zur Expression des konstant exprimierten Gens *hprt* betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

Ausgehend von einer mRNA-Expression in nicht infizierten FVB Mäusen konnte drei Wochen nach Infektion eine Induktion von *arg-1* detektiert werden, die jedoch im weiteren Verlauf der Infektion erneut sank (Abb. 20). In den Lungen von maclL-10tg Mäusen konnte bereits vor Infektion eine etwa um das zweifach erhöhte mRNA-Expression von *arg-1* gegenüber den Wildtypmäusen beobachtet werden. Diese stieg drei Wochen nach Infektion um ca. 30%, sank sechs Wochen jedoch

erneut auf den Ausgangswert. Zwölf Wochen nach Infektion konnte wieder ein Anstieg der mRNA-Expression auf den in Woche drei nach Infektion gemessenen Wert festgestellt werden (Abb. 20). Zu allen betrachteten Zeitpunkten war die mRNA-Expression in den maclL-10tg Mäusen gegenüber den Kontrolltieren erhöht, jedoch erreichte dieser Unterschied zu keinem der betrachteten Zeitpunkte statistische Signifikanz. Arg-I konnte auf Proteinebene nur spät in der Infektion ausschließlich in maclL-10tg Mäusen als schwaches Signal im Western Blot nachgewiesen werden [Daten nicht gezeigt].

3.2 Untersuchung des Einflusses IL-4R α -vermittelter Mechanismen auf die Immunabwehr in einer *M.tuberculosis* Infektion

3.2.1 Keimlastbestimmung in IL-4R α -defizienten Mäusen

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte in durchflusszytometrischen Analysen gezeigt werden, dass es durch IL-10-vermittelte Induktion der IL-4R α -Expression zu einer vermehrten alternativen Makrophagenaktivierung kam. Darüber hinaus waren diese Tiere gegenüber einer *Mtb*-Infektion erhöht empfänglich. Um nun zu ermitteln, inwieweit eine fehlende Differenzierung zu aaM ϕ einen Einfluss auf die Suszeptibilität gegenüber *Mtb* hat, wurden IL-4R α -defiziente Mäuse mit 100 KBE *Mtb* via Aerosol infiziert und die Keimlast in der Lunge zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 21).

In den Lungen von C57BL/6 Wildtypmäusen stieg die bakterielle Last drei Wochen nach Infektion auf circa 10^6 KBE und blieb im weiteren Verlauf der Infektion in etwa konstant. In den Lungen von IL-4R α -defizienten Mäusen konnten zu allen Zeitpunkten der Infektion mit den Wildtypmäusen vergleichbare Keimzahlen beobachtet werden.

Es konnte folglich kein Unterschied hinsichtlich des Wachstums von *Mtb* in den Lungen von infizierten IL-4R α -defizienten Mäusen gegenüber infizierten Wildtypmäusen beobachtet werden.

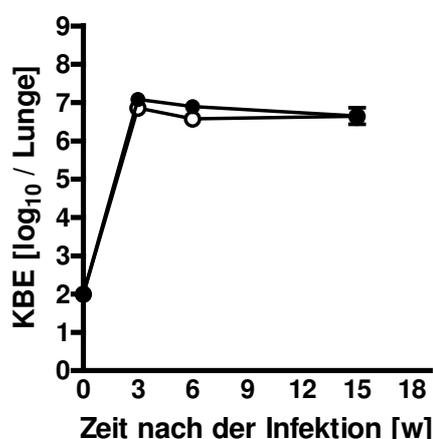


Abb. 21: Keimlast in den Organen *Mtb*-infizierter C57BL/6 und IL4R α -defizienter Mäuse

C57BL/6 (weiße Symbole) und IL-4R α -defiziente (schwarze Symbole) Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Die Keimlast wurde in (a) Lunge, (b) Leber und (c) Milz bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

3.2.2 Keimlastbestimmung in den Lungen von IL-13tg Mäusen

Um den Einfluss einer erhöhten Differenzierung zu aaM ϕ auf die Infektabwehr *in vivo* studieren zu können, wurden IL-13tg Mäuse mit 100 KBE via Aerosol infiziert und die Keimlast zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion in Lunge, Leber und Milz untersucht (Abb. 22).

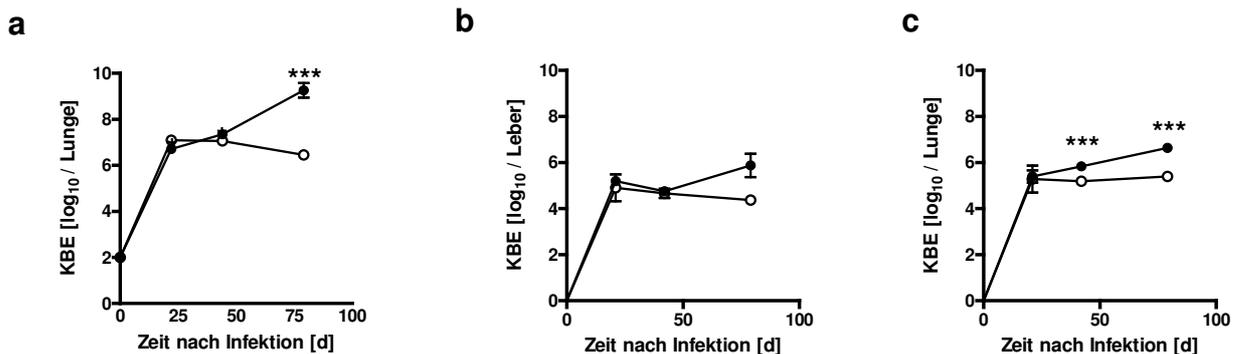


Abb. 22: Keimlast in den Organen von *Mtb*-infizierten C57BL/6 und IL-13tg Mäusen

C57BL/6 (weiße Symbole) und IL-13tg (schwarze Symbole) Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Die Keimlast von jeweils 4 Tieren pro Genotyp wurde in Lunge (a), Leber (b) und Milz (c) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Signifikanz: ***, $p < 0,001$

Nach Infektion konnte in beiden Mausgruppen eine starke Vermehrung der Keime in der Lunge beobachtet werden (Abb. 22a). Die Keimlast in den Wildtypmäusen erreichte sechs Wochen nach Infektion mit etwa 5×10^6 KBE ein Plateau, wohingegen die bakterielle Last in den Lungen von IL-13tg Tieren weiter anstieg und mit 5×10^8 KBE zwölf Wochen nach der Infektion gegenüber den C57BL/6 Mäusen signifikant ($p < 0,001$) erhöht war. Dieser Unterschied konnte ebenfalls in Lungenpräparaten nach Ziehl-Neelsen-Färbung beobachtet werden. Während in den Lungen von FVB Mäusen vereinzelt „säurefeste Stäbchen“ nachweisbar waren (Abb. 23a), waren die Mykobakterien im gesamten Lungengewebe der IL-13tg Mäuse zu erkennen und traten vermehrt in den nekrotischen Arealen der Granulome auf (Abb. 23b). Drei Wochen nach der Infektion konnte in der Leber beider Mausgruppen ein Anstieg der Keimlast auf etwa 10^5 KBE beobachtet werden, die während des weiteren Verlaufs der Infektion nahezu konstant blieb (Abb. 22b). Zum frühen Zeitpunkt der Infektion erreichten C57BL/6 Mäuse eine Keimlast von etwa 10^5 in der Milz (Abb. 22c). Diese KBE blieb im weiteren Verlauf der Infektion konstant. Die Keimlast in den IL-13tg Mäusen war bis sechs Wochen

nach Infektion mit der in den C57BL/6 Mäusen beobachteten Keimlast vergleichbar. Nach zwölf Wochen zeigten die IL-13tg Mäusen eine signifikant ($p < 0,001$) erhöhte Keimlast von etwa 10^6 KBE in der Milz.

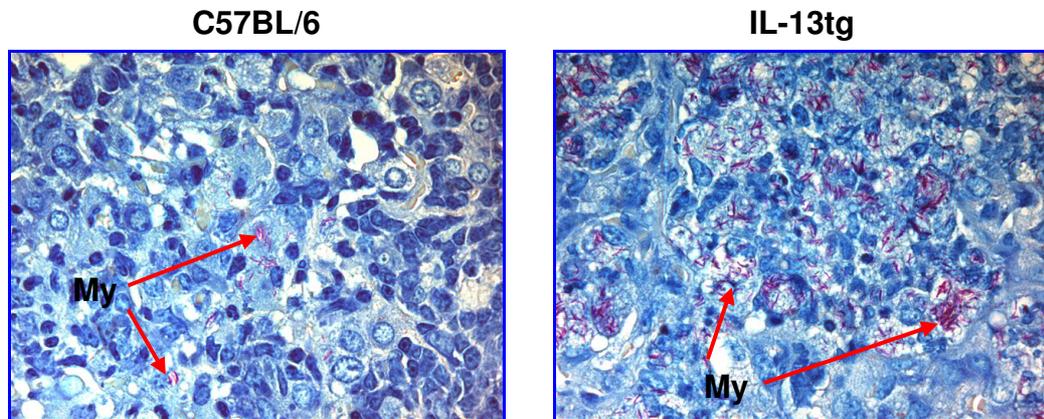


Abb. 23: Anfärbung von *Mtb* in den Lungen infizierter C57BL/6 und IL-13tg Mäuse

C57BL/6 und IL-13tg Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Zwölf Wochen nach Infektion wurden von jeweils 4 Mäusen pro Gruppe $2\mu\text{m}$ starke Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen angefertigt und nach Ziehl-Neelsen gefärbt. Das dargestellte Experiment wurde einmal durchgeführt. Originalvergrößerung: 1000-fach. My: Mykobakterien

3.2.3 Histopathologische Untersuchungen der Lungen

Um den Einfluss einer IL-13-Überexpression auf die Granulombildung im infizierten Gewebe zu untersuchen, wurden Lungenpräparate zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit 100 KBE *Mtb* nach einer H&E-Färbung mikroskopisch analysiert (Abb. 24). Drei Wochen nach Infektion zeigten sich in den Lungen aus C57BL/6 erste geringfügige Zellinfiltrationen, die sich im weiteren Verlauf der Infektion mäßig ausdehnten und zwölf Wochen nach Infektion etwa 40% des Gewebes einnahmen (Abb. 24). In den Lungen von IL-13tg Tieren konnte hingegen eine massive Zellinfiltration bereits sechs Wochen nach Infektion beobachtet werden, die zwölf Wochen nach Infektion über 90% des Lungengewebes betrafen (Abb. 24). Sowohl in den C57BL/6, als auch in den IL-13tg Mäusen setzten sich die Granulome hauptsächlich aus Lymphozyten und Makrophagen zusammen. Bei näherer Betrachtung konnten zu diesem Zeitpunkt in einer moribunden IL-13tg Maus nekrotisierende Granulome beobachtet werden (Abb. 25), die anhand von Zellkerndegradierung und verkäsender Areale zu

erkennen waren. Die Nekrotisierung der Granulome deutete sich auch in den übrigen IL-13tg Mäusen zwölf Wochen nach Infektion an (Abb. 24) und ging mit einer vermehrten Infiltration von Granulozyten einher.

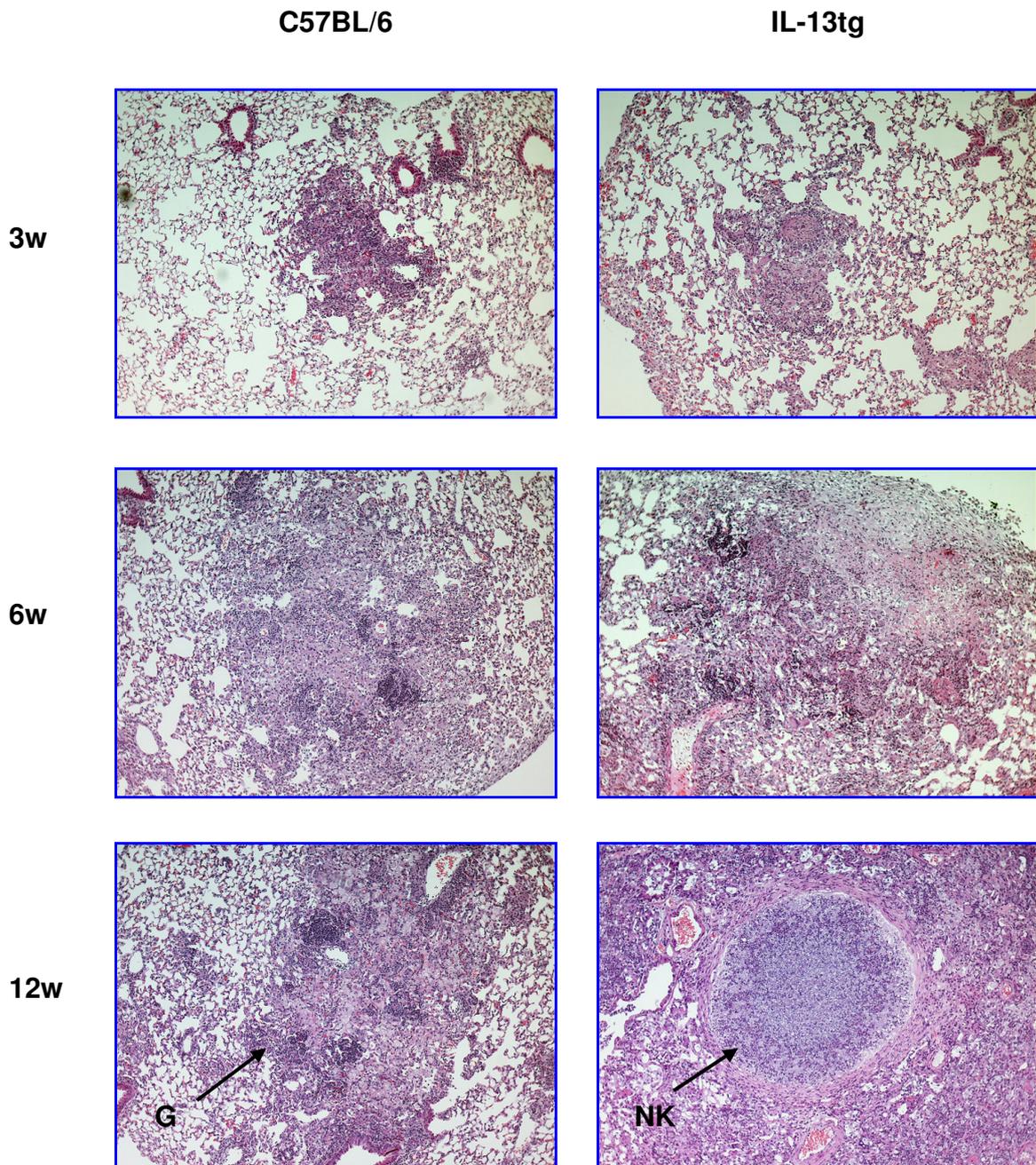


Abb. 24: Infiltration von Immunzellen in die Lungen von *Mtb*-infizierten C57BL/6 und IL-13tg Mäusen

C57BL/6 und IL-13tg Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Drei, sechs und zwölf Wochen nach Infektion wurden von jeweils 4 Mäusen pro Gruppe 2µm starke Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen angefertigt und mit H&E angefärbt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Originalvergrößerung: 100-fach. G: Granulom; NK: Nekrose

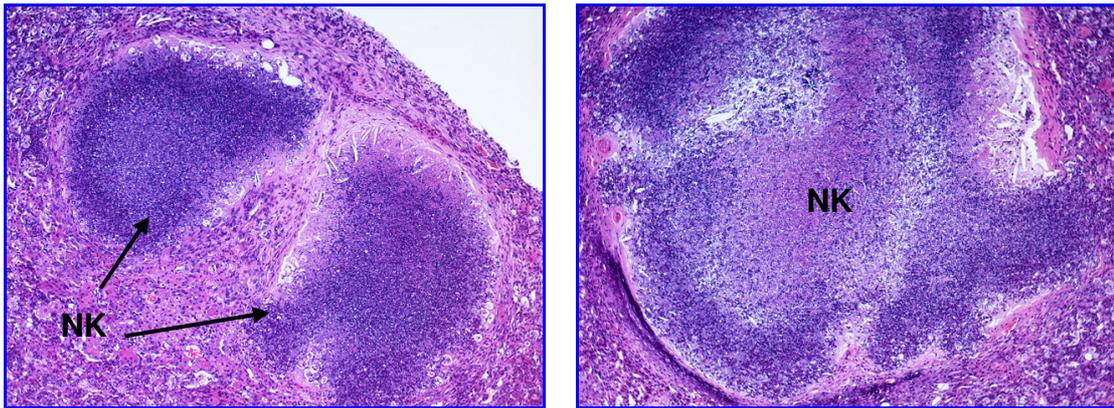


Abb. 25: Granulomnekrose in der Lunge einer moribunden, *Mtb*-infizierten IL-13tg Maus
 IL-13tg Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Zwölf Wochen nach Infektion wurden von jeweils 4 Mäusen pro Gruppe 2µm starke Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen angefertigt und mit H&E angefärbt. Das dargestellte Experiment wurde einmal durchgeführt und zeigt die Lunge einer moribunden IL-13tg Maus. Originalvergrößerung: 400-fach. NK: Nekrose

3.2.4 Analyse der mRNA-Expression von *ifn γ* und *nos2* in der Lunge

Um festzustellen, ob es nach Infektion mit *Mtb* durch die Überexpression von IL-13 zu einer Beeinträchtigung der IFN γ - und NOS2-Generierung kommt, wurden die mRNA-Expression dieser Gene mittels quantitativer PCR in infizierten Lungen gemessen. In den Lungen aus C57BL/6 Mäusen konnte eine Erhöhung der *ifn γ* -mRNA-Expression, welche ihr Maximum sechs Wochen nach Infektion erreichte, beobachtet werden (Abb. 26a). Zwölf Wochen nach Infektion sank die mRNA-Expression erneut um etwa 50%. Die Transkription von *ifn γ* war dagegen drei Wochen nach Infektion in den Lungen aus IL-13tg Mäusen nicht detektierbar. Im Anschluss erhöhte sich die mRNA-Expression und erreichte zwölf Wochen nach Infektion einen mit dem Wildtyp vergleichbaren Wert. Die *nos2*-mRNA-Expression erreichte in den Lungen aus C57BL/6 Mäusen drei Wochen nach Infektion ein Maximum und sank im weiteren Verlauf der Infektion auf etwa 30% dieses Werts (Abb. 26b). In den IL-13tg Mäusen konnte die Transkription von *nos2* drei Wochen nach Infektion nicht nachgewiesen werden und war gegenüber den Wildtypmäusen signifikant ($p < 0,05$) reduziert. Im weiteren Verlauf der Infektion erhöhte sich die mRNA-Expression und erreichte zwölf Wochen nach Infektion einen mit den C57BL/6 Mäusen vergleichbaren Wert. Sowohl die *ifn γ* , als auch die *nos2*-mRNA-Expression waren früh in der Infektion in den FVB Mäusen

signifikant ($p < 0,05$) höher als in den IL-13tg Mäusen, jedoch erreichte die mRNA-Expression in den IL-13tg Mäusen spät in der Infektion mit den Wildtypmäusen vergleichbare Werte.

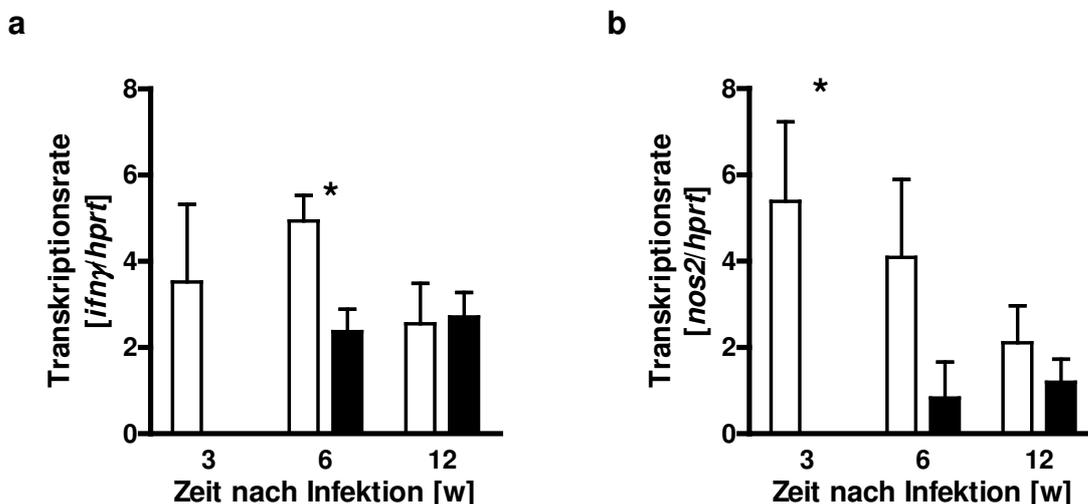


Abb. 26: Analyse der *ifny* und *nos2*-mRNA-Expression in *Mtb*-infizierten C57BL/6 und IL-13tg Mäusen

FVB (weiße Symbole) und IL-13tg (schwarze Symbole) Mäuse wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die mRNA-Expression der Gene *ifny* (a) und *nos2* (b) mit Hilfe von quantitativer PCR bestimmt und relativ zur Expression des konstant exprimierten Gens *hprt* betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Signifikanz: *, $p < 0,05$

3.2.5 Immunhistologischer Nachweis von NOS2 im Lungengewebe

Die Expression von NOS2 in *Mtb*-infizierten IL-13tg Mäusen wurde in den vorangegangenen Untersuchungen bereits auf Transkriptionsebene analysiert. Um die differentielle Expression auf Proteinebene im Gewebe zu verifizieren, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen aus C57BL/6 und IL-13tg Mäusen angefertigt. Diese wurden unter Verwendung eines Anti-NOS2-Antikörpers immunhistologisch gefärbt und mikroskopisch untersucht. In den Wildtypmäusen konnte im Zuge der Infektion, korrelierend mit der vermehrten Rekrutierung von Immunzellen, eine erhöhte NOS2-Expression beobachtet werden (Abb. 27). Die NOS2-Expression in den IL-13tg Mäusen war drei Wochen nach Infektion gegenüber den C57BL/6

Mäusen deutlich reduziert, wobei diese Reduktion ab sechs Wochen nach der Infektion nicht mehr offensichtlich war (Abb. 27).

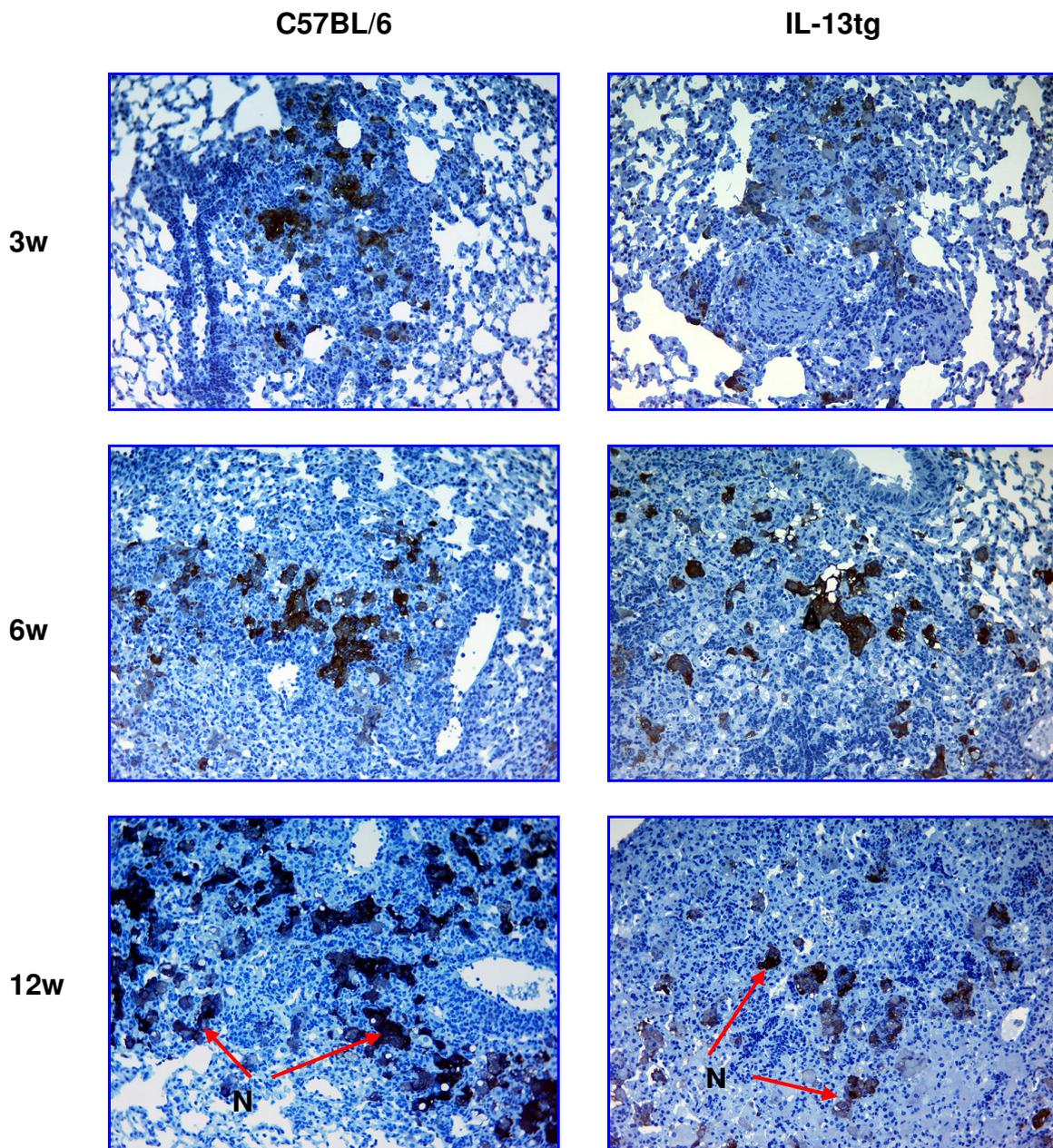


Abb. 27: NOS2-Expression im Lungengewebe von C57BL/6 und IL-13tg Mäuse nach *Mtb*-Infektion

C57BL/6 und IL-13tg Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen von jeweils vier Mäusen wurden drei, sechs und zwölf Wochen nach Infektion angefertigt und NOS2 immunhistologisch gefärbt. Das dargestellte Experiment wurde einmal durchgeführt. Originalvergrößerung: 200-fach. N: NOS2-positive Zellen (braune Färbung)

3.2.6 Untersuchung IL-13-induzierter Gene in der Lunge

Um festzustellen, ob in IL-13-überexprimierenden Tieren nach Infektion mit *Mtb* eine alternative Makrophagenaktivierung induziert wird, wurden Transkriptionsanalysen der Gene *il-13*, *il-4*, *il-4 α* , *arg-1* und *il-10* durchgeführt. Während des gesamten Verlaufs der Infektion konnte in den Lungen aus C57BL/6 Mäusen nur eine geringe Transkription von *il-13* gemessen werden (Abb. 28a). In den transgenen Tieren war die mRNA-Expression hingegen stets signifikant um ein Vielfaches erhöht ($p < 0,001$).

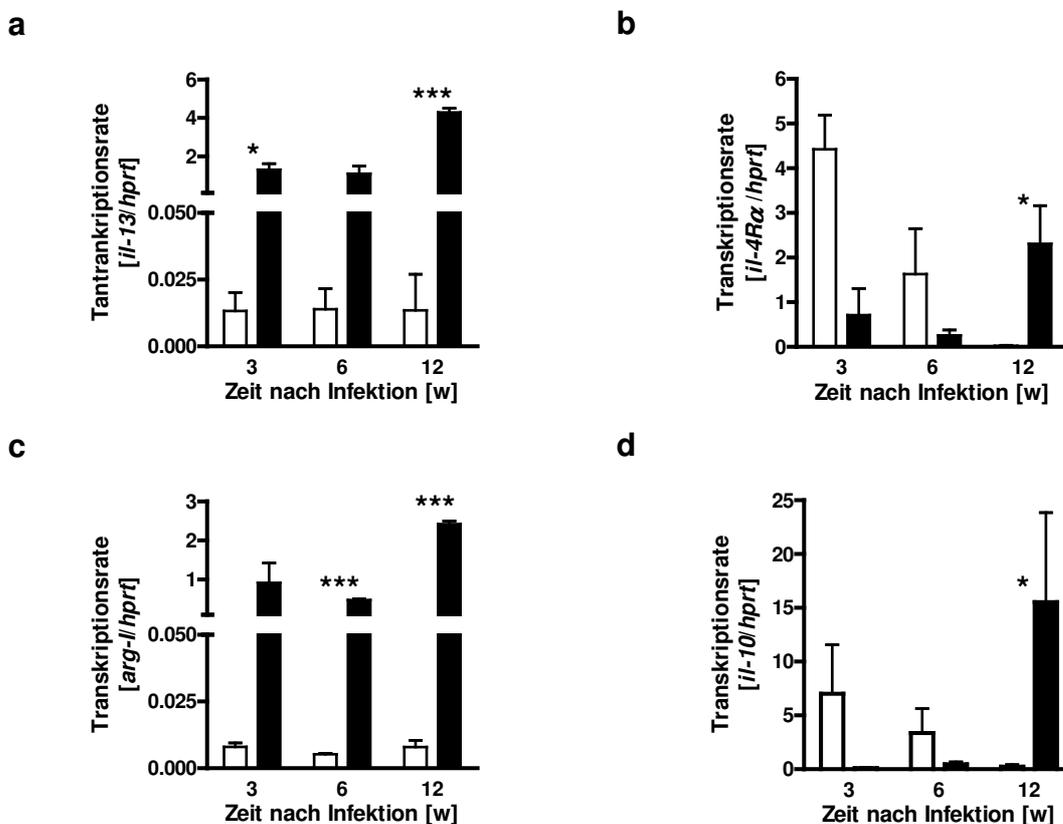


Abb. 28: Transkriptionsanalysen IL-13-induzierter Gene in C57BL/6 und IL-13tg Mäusen nach *Mtb*-Infektion

C57BL/6 (weiße Symbole) und IL-13tg (schwarze Symbole) Mäuse wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Transkriptionsraten der Gene *il-13* (a), *il-4 α* (b), *arg-1* (c) und *il-10* (d) mit Hilfe von quantitativer PCR bestimmt und relativ zur Expression des konstant exprimierten Gens *hprt* betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Signifikanz: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$

Die mRNA-Expression des *il-4R α* erreichte bereits drei Wochen nach Infektion ein Maximum in den Lungen der Wildtypmäuse und verringerte sich anschließend deutlich (Abb. 28b). Zwölf Wochen nach der Infektion konnte die Transkription kaum noch detektiert werden. In den IL-13tg Mäusen hingegen blieb die mRNA-Expression bis sechs Wochen nach Infektion konstant und war gegenüber den C57BL/6 Mäusen reduziert. Erst zwölf Wochen nach Infektion stieg die mRNA-Expression an und war gegenüber den Wildtypmäusen um ein Vielfaches signifikant ($p < 0,5$) erhöht.

Die *arg-1*-Transkription war in den Lungen aus C57BL/6 Mäusen während des gesamten Infektionsverlaufs kaum detektierbar (Abb. 28c). In den IL-13tg Mäusen hingegen war die mRNA-Expression stets um ein Vielfaches, zu späten Zeitpunkten der Infektion signifikant ($p < 0,001$) erhöht.

Drei Wochen nach Infektion konnte in den Lungen aus C57BL/6 Mäusen eine Induktion von *il-10* detektiert werden (Abb. 28d), die im weiteren Verlauf der Infektion konstant abnahm und zwölf Wochen nach Infektion kaum mehr detektierbar war. In den Lungen aus IL-13tg Mäusen hingegen war die *il-10*-mRNA-Expression erstmalig sechs Wochen nach Infektion nachweisbar. Zwölf Wochen nach Infektion steigerte sich die mRNA-Expression drastisch und war gegenüber den C57BL/6 Mäusen um ein Vielfaches signifikant erhöht.

3.2.7 Untersuchung der mRNA-Expression von *socs3* in der Lunge

Im Zuge der bereits erwähnten Genexpressionsanalysen [Lang et al. 2002] wurde eine IL-10-regulierte Transkription des Gens *socs3* festgestellt. Es kodiert für ein Protein, welches IFN γ -induzierte Gene supprimiert [Ding et al. 1993], die Expression von IFN γ an sich jedoch nicht moduliert. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen die Transkriptionsrate von *socs3* in den IL-13tg Mäusen nach Infektion mit *Mtb* untersucht.

Im gesamten Verlauf der Infektion konnte nur eine basale Transkription von *socs3* in den Lungen aus C57BL/6 Mäusen beobachtet werden (Abb. 29). Die Transkriptionsrate in den Lungen aus IL-13tg Mäusen unterschied sich drei und sechs Wochen nach Infektion nicht von den in den Wildtypmäusen gemessenen Werten. Erst spät in der Infektion konnte eine starke Induktion von *socs3* in den IL-

13tg Mäusen detektiert werden, die allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung der Einzelwerte nicht signifikant war (Abb. 29).

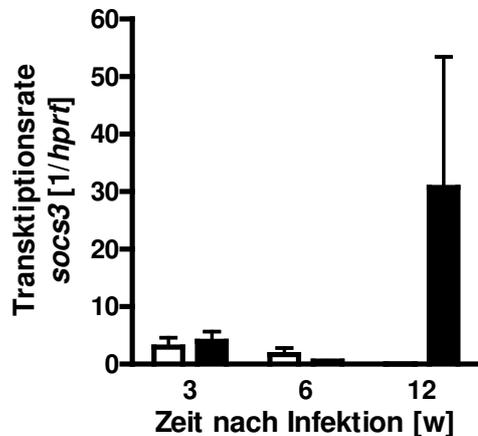


Abb. 29: Transkriptionsanalyse von *socs3* in C57BL/6 und IL-13tg Mäusen nach *Mtb*-Infektion

C57BL/6 (weiße Symbole) und IL-13tg (schwarze Symbole) Mäuse wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die mRNA-Expression von *socs3* mit Hilfe von quantitativer PCR bestimmt und relativ zur mRNA-Expression des konstant exprimierten Gens *hprt* betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

3.2.8 Immunhistologischer Nachweis der Arg-I im Lungengewebe

Die Expression von *arg-1* wurde in den vorangegangenen Untersuchungen von *Mtb*-infizierten IL-13tg Mäusen bereits auf Transkriptionsebene gezeigt. Um die differentielle IL-13-abhängige Expression der Arg-I auf Proteinebene im Gewebe infizierter Mäuse zu detektieren, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen aus C57BL/6 und IL-13tg Mäusen angefertigt. Diese wurden unter Verwendung eines Anti-Arg-I-Antikörpers immunhistologisch gefärbt und mikroskopisch untersucht. In den Wildtypmäusen konnte zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion eine Arg-I-Expression im Lungengewebe festgestellt werden (Abb. 30). In den IL-13tg Tieren war bereits drei Wochen nach Infektion eine geringe Expression in den Arealen erster Zellinfiltrationen zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Infektion verstärkte sich allerdings die Arg-I-Expression im Zuge einer vermehrten Zellrekrutierung deutlich (Abb. 30) und konnte zwölf Wochen nach der Infektion im gesamten Lungengewebe der transgenen Mäuse nachgewiesen werden (Abb. 30).

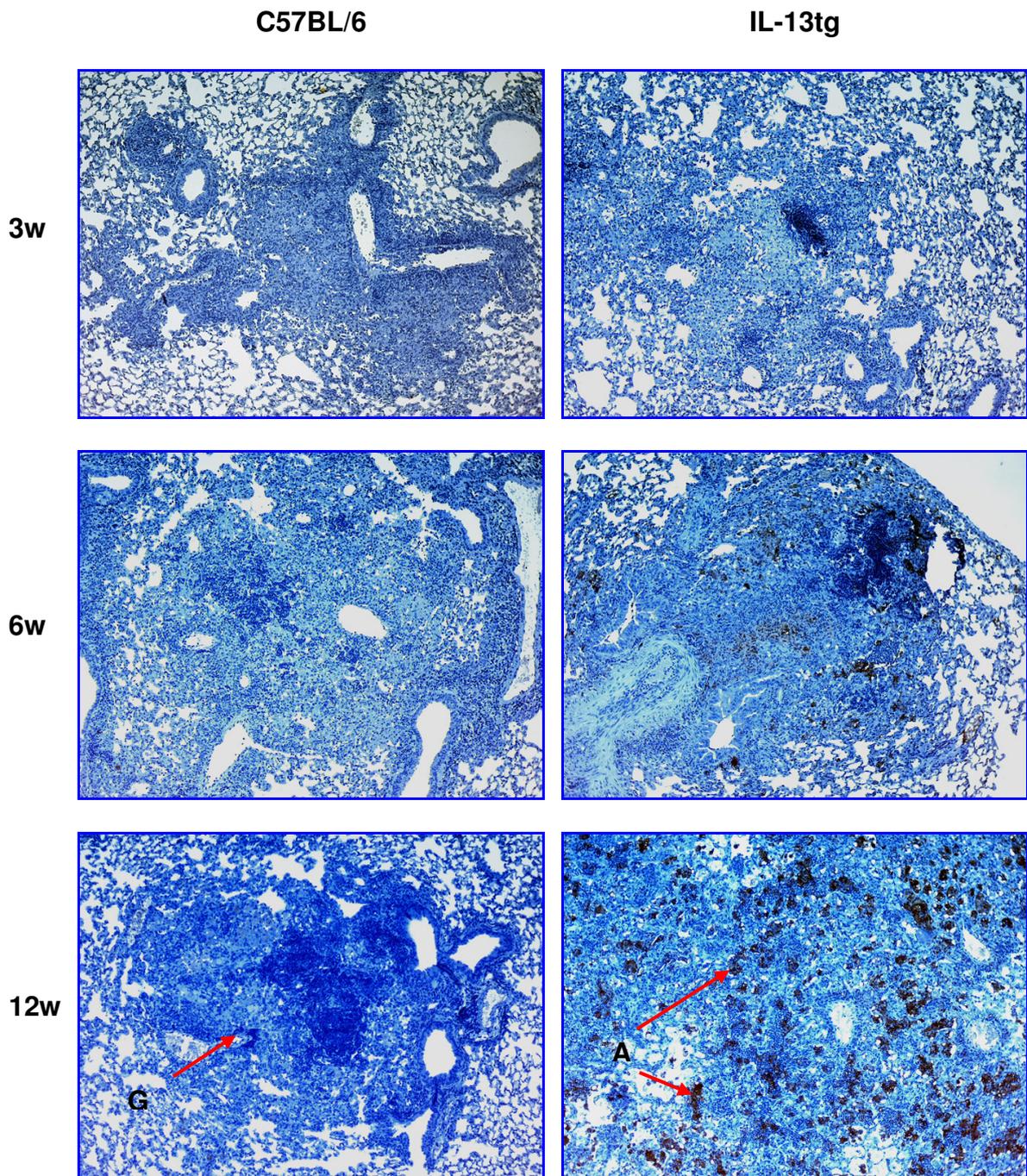


Abb. 30: Arg-I-Expression im Lungengewebe von C57BL/6 und IL-13tg Mäusen nach *Mtb*- Infektion

C57BL/6 und IL-13tg Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen von jeweils vier Mäusen wurden drei, sechs und zwölf Wochen nach Infektion angefertigt und die Arg-I immunhistologisch angefärbt. Das dargestellte Experiment wurde einmal durchgeführt. Originalvergrößerung: 1000-fach. G: Granulom, A: Arg-I-positive Zellen (braune Färbung)

3.2.9 Histologische Untersuchung der Kollagenablagerung im Lungengewebe

Im Zuge einer alternativen Aktivierung von Makrophagen kommt es durch die Aktivität der Arg-I zur Produktion von Prolin, einem Bestandteil des Kollagens [Gordon 2003]. Um festzustellen, ob es durch die erhöhte Expression der Arg-I zu einer vermehrten Kollagenablagerung im Lungengewebe kommt, wurden histologische Präparate von Lungen aus infizierten C57BL/6 und IL-13tg Mäusen einer Trichromfärbung unterzogen. Zwölf Wochen nach der Infektion war in beiden Mausgruppen eine deutliche Fibrosierung zu beobachten, wobei es im Lungengewebe IL-13tg Mäuse zu einer stärkeren Kollagenablagerung kam als in den C57BL/6 Mäusen (Abb. 31).

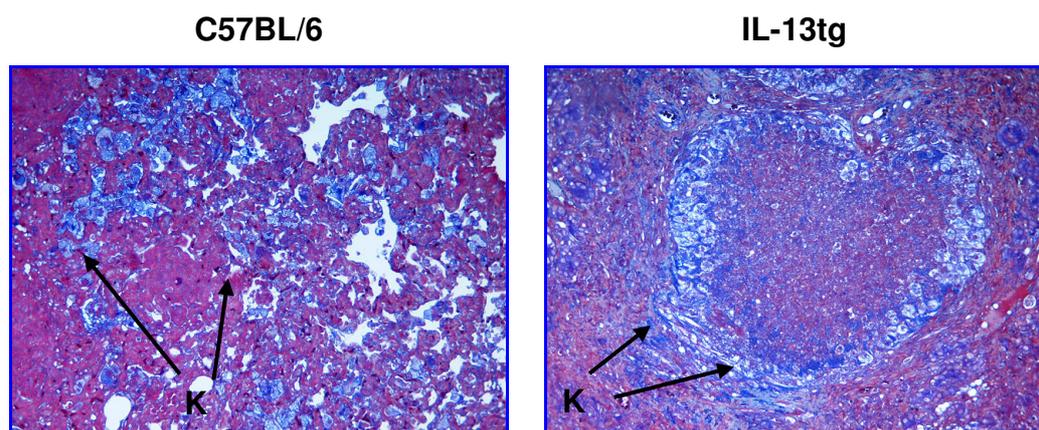


Abb. 31: Trichromfärbung des Lungengewebes aus C57BL/6 und IL-13tg Mäusen
C57BL/6 und IL-13tg Mäuse wurden via Aerosol mit 100 Keimen *Mtb* infiziert. Zwölf Wochen nach Infektion wurden Paraffinschnitte Formalin-fixierter Lungen angefertigt und eine Trichromfärbung durchgeführt. Der dargestellte Versuch wurde einmal durchgeführt. Originalvergrößerung: 1000-fach. K: Kollagen

3.2.5 Untersuchung der Nitratskonzentration im Serum

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Suszeptibilität IL-13tg Mäuse auf eine verminderte RNI-Generierung zurückzuführen war, wurden der Nitratspiegel im Serum als ein Maß für die NO-Synthese in C57BL/6 und IL-13tg Mäuse mittels Griess-Reaktion gemessen (Abb. 32). In den C57BL/6 Mäusen konnte drei

Wochen nach Infektion eine Nitratkonzentration von etwa $50\mu\text{M}$ festgestellt werden, die im weiteren Verlauf der Infektion in etwa konstant blieb. Im Gegensatz dazu war die Nitratkonzentration in den IL-13tg Tieren drei Wochen nach Infektion mit ca. $22\mu\text{M}$ um etwa 50% signifikant ($p < 0,5$) reduziert (Abb. 32). Im weiteren Verlauf der Infektion nahm die Nitratkonzentration in den IL-13tg Mäusen stetig zu und erreichte zwölf Wochen nach Infektion ca. $35\mu\text{M}$, also in etwa 80% des Nitratspiegels der Wildtypmäuse und war somit immer noch signifikant ($p < 0,5$) reduziert (Abb. 32). Es konnte also eine Reduktion der NO- Generierung in den IL-13tg Mäusen detektiert werden, der drei und zwölf Wochen nach Infektion statistisch signifikant war.

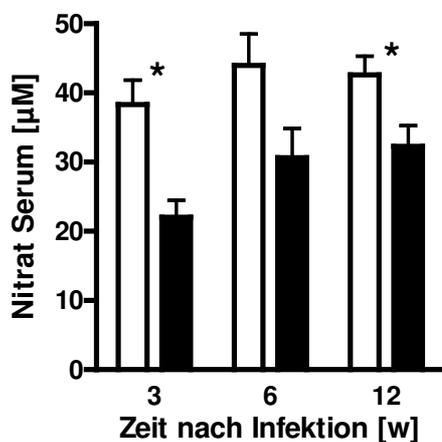


Abb. 32: Quantifizierung der Nitratkonzentration im Serum *Mtb*-infizierter C57BL/6 und IL-13tg Mäuse

C57BL/6 (weiße Symbole) und IL-13tg (schwarze Symbole) Mäuse wurden mit 100 Keimen *Mtb* via Aerosol infiziert. Zu den dargestellten Zeitpunkten nach Infektion wurde die Nitratkonzentration nach Nitratreduktion im Serum bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen jedes Genotyps. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Signifikanz: *, $p < 0,05$

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde in *macIL-10tg* und *IL-13tg* Mäusen eine starke Erhöhung der Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit *Mtb* beobachtet. Dies ging in beiden Mausstämmen mit einer veränderten Zusammensetzung der Makrophagenpopulationen in der Lunge einher. So konnte neben der Differenzierung von *kaMφ* eine vermehrte Generierung *aaMφ* beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass es aufgrund der Koexistenz dieser beiden Makrophagenphänotypen zu einer differenziellen Regulation der Abwehrmechanismen im Lungengranulom kam, die letztlich die Resistenz gegenüber der *Mtb*-Infektion verminderte.

IL-10 wurde in vielen Infektionsmodellen als suppressiver Mediator der Immunantwort beschrieben, der jedoch auch die Pathologie mancher Infektionskrankheiten verhindern kann. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von IL-10 in Infektionsmodellen wie der experimentellen Chagas Krankheit oder der Toxoplasmose zwar zu einer gesteigerten Produktion Schutz-induzierender Mediatoren wie $\text{IFN}\gamma$, TNF, IL-12 und RNI führt, dies jedoch auch mit einer vermehrten Immunpathologie in Leber oder Darm einher geht [Gazinelli et al. 1996, Hölscher et al. 2000, Neyer et al. 1997, Suzuki et al. 2000]. Auch nach Infektion mit *Mav* konnte in IL-10-defizienten Mäusen eine verstärkt ausgebildete GN beobachtet werden [Ehlers et al. 2001].

Eine T-Zell-spezifische Überexpression von IL-10 (*tIL-10tg*) nach *Mtb*-Infektion in Mäusen mit resistentem genetischen Stammhintergrund führte übereinstimmend mit den Beobachtungen in anderen Infektionsmodellen zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber der Infektion. Dies zeigte sich spät in der Infektion anhand einer signifikant erhöhten Keimlast in der Lunge, was auf eine massive Beeinträchtigung der TH1-Immunantwort zurückgeführt werden konnte. So waren die IL-12p40 und $\text{IFN}\gamma$ -Expression sowie die Rekrutierung von T-Effektorzellen in die Lunge in diesen Mäusen supprimiert [Turner et al. 2002]. Damit zeigten diese Tiere einen ähnlichen Phänotyp wie IL-12p40- oder $\text{IFN}\gamma$ -defiziente Mäuse, die der Infektion bei reduzierter $\text{IFN}\gamma$ -Produktion signifikant früher als Wildtypmäuse erliegen, da sie nicht in der Lage sind, eine intakte TH1-polarisierte T-Zell-Immunantwort sowie die davon abhängenden, antimykobakteriellen

Abwehrfunktionen auszubilden [Cooper et al. 1993, Cooper et al. 1997, Flynn und Chan 2001a]. Durch diese Studien konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle TH1-Immunantwort durch T-Zell-spezifisch überexprimiertes IL-10 beeinträchtigt wird. Der immunregulatorische Einfluss von Makrophagen-spezifisch generiertem IL-10 (macIL-10) *in vivo* ist hingegen kaum beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmalig die immunmodulatorische Rolle von macIL-10 in *Mtb*-Infektionen untersucht. Dafür wurden macIL-10tg Mäuse auf dem genetisch resistenten Stammhintergrund FVB [Lang et al. 2002] mit *Mtb* via Aerosol infiziert. Die hierbei verwendete Dosis war mit der in den Studien tIL-10transgener Mäuse vergleichbar [Turner et al. 2002]. Wie in den tIL-10tg Mäusen [Turner et al. 2002] führte auch die Makrophagen-spezifische Überexpression des IL-10 zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber der *Mtb*-Infektion. Völlig überraschend war hierbei, dass es zu keiner Beeinträchtigung der T-Zell-vermittelten Immunantwort kam.

Nach einer Infektion mit *Mtb* erfolgt zunächst die Aktivierung und Expansion von Antigen-spezifischen T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten [Banherau et al. 2000, Moser und Murphy 2000, Pulendran et al. 2001]. In den tIL-10tg Mäusen konnte bereits früh nach Infektion eine Beeinträchtigung der T-Zellentwicklung festgestellt werden [Turner et al. 2002]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die verwendeten macIL10tg Mäuse hingegen keine Beeinträchtigung der Expansion der im Lymphknoten befindlichen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Darüber hinaus war die Anzahl Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten aus macIL10tg Mäusen mit der Anzahl dieser Zellen in den Wildtypmäusen vergleichbar. Somit wurde die Initiation einer T-Zell-vermittelten Immunantwort bei Makrophagen-spezifischer Überexpression des IL-10 nicht moduliert. Das *priming* im Lymphknoten blieb daher unbeeinträchtigt.

Antigen-spezifische aktivierte T-Zellen verlassen unter anderem aufgrund einer Änderung des Expressionsprofils der Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche den Lymphknoten und zirkulieren im Blutstrom. Entlang eines Chemokingradienten gelangen sie zum Entzündungsort und migrieren in das infizierte Gewebe [de Fougères et al. 2000, Dustin und de Fougères 2001, Friedl et al. 1998, Kamohara et al. 2001]. Histologische Untersuchungen in den tIL-10tg Mäusen zeigten nach *Mtb*-Infektion eine verminderte Infiltration aktivierter T-Zellen in die Lungen [Turner et al. 2002]. Dies konnte in den hier untersuchten macIL-10tg

Mäusen nicht beobachtet werden. Durchflusszytometrische Analysen ergaben zudem, dass es zu keiner veränderten Rekrutierung unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen wie aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in die Lunge kam. Demnach war die Entwicklung der zellulären Immunantwort in maclL-10tg Mäusen im Gegensatz zu den tIL-10tg Mäusen sowohl im Lymphknoten als auch in der Lunge nicht beeinträchtigt [Turner et al. 2002].

Im infizierten Gewebe treffen aktivierte T-Zellen auf zunächst unzureichend aktivierte, infizierte Makrophagen, die erst über die Sekretion von IFN γ durch diese Effektor-T-Zellen adäquat aktiviert und zur Ausbildung antimykobakterieller Abwehrmechanismen befähigt werden [Feng et al. 2004, Flesch und Kaufmann 1987, MacMicking et al. 1997, MacMicking et al. 2003, Rook et al. 1986]. IL-10 ist in der Lage die T-Zell-spezifische IFN γ -Produktion durch eine indirekte Suppression von akzessorischen Zellen, insbesondere durch die Inhibierung der Produktion von IL-12 durch Makrophagen zu hemmen [Fiorentino et al. 1991a und b, de Waal Malefyt et al. 1991]. Eine direkte Hemmung aktivierter T-Zellen durch IL-10 ist hingegen nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Infektion mit *Mtb* gezeigt werden, dass die mRNA-Transkription von *il-12p40* in der Lunge maclL-10transgener Mäuse schon früh nach der Infektion erniedrigt war. Trotzdem waren CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Lymphknoten und Lunge in der Lage effizient IFN γ zu produzieren, so dass in den transgenen und Wildtypmäusen insgesamt vergleichbare Mengen des Zytokins nachweisbar waren. Die Tatsache, dass die verminderte IL-12p40-Expression in der Lunge die IFN γ -Produktion durch T-Zellen nicht supprimierte, kann durch die effiziente, unbeeinträchtigte Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen im Lymphknoten der maclL-10tg Mäusen erklärt werden. Da die erhöhte Empfänglichkeit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten maclL-10tg Mäuse gegenüber einer Infektion mit *Mtb* also nicht auf eine verminderte Induktion einer T-Zell-Immunantwort zurückzuführen ist, muss deren Ursache eine grundsätzlich andere sein als die in *Mtb*-infizierten tIL-10tg Mäusen beschriebene [Turner et al. 2002].

Makrophagen können in Abhängigkeit des Zytokinmilieus und des Pathogens klassisch oder alternativ aktiviert sowie zu einem suppressiven Phänotyp differenziert werden [Gordon 2003]: Es ist vorstellbar, dass eine unterschiedliche Differenzierung von Makrophagenpopulationen in einer *Mtb*-Infektion zu einer

Beeinträchtigung der Infektabwehr führt. In der vorliegenden Arbeit wies bereits die verminderte *il-12p40*-mRNA-Expression in den Lungen *Mtb*-infizierter *macIL-10tg* Mäuse auf eine Beeinflussung von Makrophagenfunktionen hin. Da in diesen Mäusen IL-10 Makrophagen-spezifisch überexprimiert wurde, war eine Inhibierung der klassisch aktivierten Makrophagen vorstellbar. Durchflusszytometrische Analysen der MHCII-, CD80- und CD86-Expression auf Makrophagen zeigten jedoch zu keinem Zeitpunkt der Infektion eine suppressive Wirkung auf die Differenzierung von $\text{kaM}\phi$. Auch die Ausbildung IFN γ -abhängiger Effektorfunktionen von $\text{kaM}\phi$ gemessen an der mRNA-Expression von *Irg-47* und *nos2* war in den *macIL-10tg* Mäusen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Infektion mit der Expression in den Wildtypmäusen vergleichbar. Diese Untersuchungen zeigten, dass es trotz der Überexpression von *macIL-10* nach *Mtb*-Infektion zu keiner Hemmung der klassischen Aktivierung von Makrophagen kam. Dies kann durch die unbeeinträchtigte Entwicklung der T-Zell-Effektorfunktionen in diesen Mäusen erklärt werden. Daher müssen andere Mechanismen für die erhöhte Suszeptibilität dieser Mäuse gegenüber einer *Mtb*-Infektion verantwortlich sein.

In bereits publizierten Studien wurde gezeigt, dass die Stimulierung von IL-10-defizienten Knochenmarksmakrophagen mit IL-10 und LPS die Expression des IL-4R α heraufregulierte, was nach weiterer Zugabe von IL-4 zu einer höheren Induktion der Arg-1 führte als allein mit IL-4 [Lang et al. 2002]. Diese Daten lassen vermuten, dass es durch die erhöhte Expression des IL-4R α auf Makrophagen nach Stimulierung mit IL-10 zu einer Sensitivierung dieser Zellen gegenüber IL-4 kommt, wodurch eine alternative Aktivierung verstärkt wird. Aufgrund dieser Studien wurde in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch untersucht, ob eine *macIL-10*-Überexpression auch *in vivo* eine vermehrte Generierung von $\text{aaM}\phi$ unterstützt. Tatsächlich zeigte sich, dass nach der Infektion mit *Mtb* sowohl in Wildtypmäusen, als auch in *macIL-10tg* Mäusen eine vermehrte Expression des IL-4R α auf Makrophagen stattfand, wobei diese in *macIL-10tg* Mäusen gegenüber den Wildtypmäusen deutlich verstärkt war und bereits konstitutiv auf Makrophagen nicht infizierter Tiere nachgewiesen werden konnte. Dies kann durch die konstitutive Expression des *macIL-10* in den transgenen Mäusen erklärt werden und unterstützt die Ergebnisse der oben erwähnten Untersuchungen [Lang et al.

2002]. Weitere Analysen der Expression von Markern alternativ aktivierter Makrophagen bekräftigten die Vermutung, dass dieser Makrophagenphänotyp in den maclL-10tg Mäusen vermehrt generiert wurde. So konnte während des gesamten Verlaufs der Infektion in den Lungen dieser Tiere eine vermehrte Makrophagen-spezifische Expression des MR festgestellt werden, die sich zu keinem Zeitpunkt der Infektion auf den Makrophagen aus Wildtypmäusen beobachten ließ. Auch die mRNA-Expression von *arg-1* war nach *Mtb*-Infektion in maclL-10tg Mäusen deutlich, wenn auch nicht signifikant, gegenüber den Wildtypmäusen erhöht.

Ob eine vermehrte Expression der Arg-I ausschließlich auf die Wirkung von IL-4 und IL-13 im Zuge einer alternativen Aktivierung von Makrophagen zurückzuführen ist, wird kontrovers diskutiert. So wurde eine direkte Induktion durch IL-10 in früheren Studien, meist synergistisch mit IL-4 oder auch IL-13, beschrieben [Gordon 2003, Hesse et al. 2001, Munder et al 1998]. Gegen einen direkten Einfluss von IL-10 auf die Arg-I-Expression sprechen allerdings Untersuchungen der Arg-I-abhängigen Prolinproduktion in Makrophagen, die *in vitro* durch Inkubation mit IL-4, nicht aber mit IL-10 induziert werden konnte [Hesse et al 2001]. In den maclL-10tg Mäusen dieser Arbeit lag die mRNA-Expression von *il-4* und *il-13* allerdings unter der Detektionsgrenze der verwendeten Methode. Es ist trotzdem vorstellbar, dass eine Sensitivierung der Makrophagen gegenüber dieser Zytokine durch die Heraufregulierung des IL-4R α trotz geringer IL-4 und IL-13-Expression zur vermehrten Expression der Arg-I und der Differenzierung alternativ aktivierter Makrophagen führte. Dies ist vor allem aufgrund der hohen Affinität dieser Zytokine zum IL-4R α vorstellbar [Nelms et al. 1999] und liefert eine Erklärung dafür, dass in den Wildtypmäusen keine detektierbare Population aaM ϕ nachweisbar war.

Diese Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass es nach *Mtb*-Infektion durch die Makrophagen-spezifische Überexpression von IL-10 parallel zur Differenzierung von sowohl klassisch, als auch alternativ aktivierten Makrophagen kommt. Alternativ aktivierte Makrophagen produzieren unter anderem IL-10 [Mosser 2003]. Eine modulatorische Wirkung aaM ϕ auf kaM ϕ wurde allerdings bisher nur *in vitro* beschrieben [Katakura et al. 2004]. Es ist jedoch vorstellbar, dass das *in vitro* gezeigte regulatorische Potential von aaM ϕ auch *in vivo* von Bedeutung ist und

somit Einfluss auf die Schutz-vermittelnden Abwehrmechanismen nehmen kann. Hierbei würden T-Lymphozyten nur eine indirekte Rolle spielen.

Ein bedeutendes Modell im Hinblick auf die Auswirkungen einer vermehrten Differenzierung aaM ϕ auf die Resistenz gegenüber Infektionen ist das Modell der experimentellen, kutanen Leishmaniose. Die Vermehrung von *L. major* findet ebenfalls in Makrophagen statt, wobei die Resistenz gegenüber der Infektion von einer polarisierten TH1-Immunabwehr abhängig ist [Belosovic et al. 1989, Heinzel et al. 1993, Mattner et al. 1996, Reiner und Locksley 1995, Scharton-Kersten et al. 1995, Swihart et al. 1995, Sypek et al. 1993, Wang et al. 1994]. Vergleichende Studien resistenter und suszeptibler Mausstämme konnten die erhöhte Empfänglichkeit gegenüber einer *L. major* Infektion auf eine vermehrte TH2-polarisierte Immunantwort und in diesem Zusammenhang auf die erhöhte Expression von IL-4 zurückführen [Kopf et al. 1996, Mohrs et al. 1999]. Des Weiteren zeigten Makrophagen-spezifisch maclL-4R α -defiziente Mäuse eines suszeptiblen Mausstamms eine erhöhte Resistenz gegenüber der Infektion, die auf eine fehlende Differenzierung von aaM ϕ zurückgeführt werden konnte [Hölscher et al. 2006]. Ob in den hier untersuchten maclL-10tg Mäusen ebenfalls aaM ϕ die Resistenz gegenüber der *Mtb*-Infektion beeinträchtigten oder IL-10 für die erhöhte Empfänglichkeit verantwortlich ist, kann an dieser Stelle nicht vollständig geklärt werden. Näheren Aufschluss über die Bedeutung dieser Zellen für die Empfänglichkeit gegenüber einer *Mtb*-Infektion ließe sich durch eine Untersuchung von maclL-10tg/maclL-4R α -doppelt-defizienten Mäusen nach Infektion zeigen. Sollte die erhöhte Suszeptibilität der maclL-10tg Mäuse der vorliegenden Arbeit mit der Generierung aaM ϕ zusammenhängen, so wäre eine Verminderung der Resistenz der maclL-10tg/maclL-4R α -defizienten Mäuse gegenüber einer *Mtb*-Infektion zu erwarten, da die Generierung von aaM ϕ durch die Zell-spezifische Deletion des IL-4R α verhindert würde. Liegt der erhöhten Suszeptibilität der hier verwendeten Mäuse ein IL-10-induzierter Mechanismus zugrunde, der unabhängig von der Generierung aaM ϕ ist, so würden diese Mäuse eine ähnliche Empfänglichkeit gegenüber der *Mtb*-Infektion zeigen wie die in dieser Arbeit untersuchten maclL-10tg Tiere.

Für die alternative Aktivierung von Makrophagen sind die TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 essentiell [Gordon 2003]. Aufgrund bisheriger Untersuchungen der

Bedeutung einer TH2-Immunantwort in experimentellen *Mtb*-Infektionen wurde angenommen, dass TH2-Zellen für die Empfänglichkeit gegenüber der Infektion keine Rolle spielen. So zeigten IL-4-, IL-13- und IL-4/IL-13-defiziente Mäuse mit dem resistenten Stammhintergrund C57BL/6 nach der Infektion mit *Mtb* keine erhöhte Immunität gegenüber der Infektion [Jung et al. 2002, North 1998]. In Infektionen IL-4-defizienter BALB/c Mäuse konnte allerdings anhand der verminderten Keimlast in der Lunge dieser Tiere eine deutlich erhöhte Immunität gegenüber der *Mtb*-Infektion festgestellt werden [Hernandez-Pando et al. 2004]. Auch in TB-Patienten mit klinisch apparent verlaufender Tuberkulose konnte vermehrt die Ausprägung einer TH2-Immunantwort beobachtet werden [Lienhardt et al. 2002, Raja 2004, Sodhi et al. 1997]. Daher kann angenommen werden, dass TH2-Zytokine sowohl in der experimentellen, als auch in der humanen TB die Infektabwehr beeinflussen können und aaM ϕ in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Um die Bedeutung aaM ϕ im Verlauf der experimentellen TB näher aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit IL-4R α -defiziente Mäuse auf dem genetisch resistenten Stammhintergrund C57BL/6 mit *Mtb* infiziert. Die Deletion der IL-4R α -Rezeptorkette sollte hierbei die Differenzierung zu aaM ϕ verhindern, da diese ausschließlich über diesen Rezeptor erfolgt [Gordon 2003]. Nach einer *Mtb*-Infektion zeigte die IL-4R α -Defizienz jedoch kein Einfluss auf die Resistenz dieser Tiere. Untersuchungen der Makrophagenpopulationen in diesen Mäusen zeigten keinen Unterschied des Aktivierungsphänotypen gegenüber den Wildtypmäusen [Daten nicht gezeigt]. Eine Erklärung für diese Resultate ist, dass die Relevanz von aaM ϕ in diesen Tieren nicht losgelöst von der Entwicklung einer funktionellen TH2-Antwort betrachtet werden kann, da diese ebenfalls durch die frühe Signalgebung über den IL-4R α auf T-Zellen generiert wird [Nelms et al. 1999]. Daher verhalten sich diese IL-4R α -defizienten Tiere nach Infektion mit *Mtb* wie IL-4/IL-13-defiziente Mäuse [Jung et al. 2002]. IL-4, IL-13 und IL-4/IL-13-defiziente Mäuse auf dem genetisch resistenten Stammhintergrund C57BL/6 zeigten bereits, dass eine Steigerung der Resistenz gegenüber einer *Mtb*-Infektion durch das Fehlen dieser TH2-Zytokinen nicht möglich ist. Obwohl in doppelt defizienten Mäusen nach *Mtb*-Infektion eine erhöhte Expression von IL-12 und IFN γ detektiert wurde, hatte diese vermehrte Expression proinflammatorischer Zytokine keinen Einfluss auf die bakterielle Last in den Lungen dieser Tiere [Jung

et al. 2002]. Es ist daher nicht erstaunlich, dass auch die IL-4R α -defizienten Mäuse der vorliegenden Arbeit keine erhöhte Resistenz gegenüber einer *Mtb*-Infektion zeigten. Somit konnte auch die Infektion dieser Tiere keinen näheren Aufschluss über die Relevanz aaM ϕ in *Mtb*-Infektionen geben. Um die Bedeutung dieser Zellen genau studieren zu können, wäre es erfolversprechender, Makrophagen-spezifische maclL-4R α -defiziente Mäuse eines suszeptiblen genetischen Mausstamms, wie z.B. CBA Mäuse, nach Infektion mit *Mtb* zu untersuchen [North 1998, Turner et al. 2002].

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses aaM ϕ auf die Empfänglichkeit gegenüber einer *Mtb*-Infektion wurden in der vorliegenden Arbeit IL-13tg Mäuse mit *Mtb* infiziert. Ziel war es hierbei, durch die vermehrte Expression von IL-13 eine noch stärkere Differenzierung dieses Makrophagenphänotyps als in den maclL-10tg Mäusen zu erreichen.

Im Infektionsmodell mit *L. major* konnte durch eine IL-13-Überexpression in resistenten C57BL/6 Mäusen eine von IL-4-unabhängige Beeinflussung der Resistenz gegenüber der Infektion gezeigt werden [Matthews et al. 2000]. Übereinstimmend damit zeigten suszeptible BALB/c Mäuse mit einer IL-13-Defizienz eine erhöhte Resistenz gegenüber der Infektion mit *L. major* [Matthews et al. 2000]. Vor dem Hintergrund weiterer publizierter Studien, welche die Relevanz von aaM ϕ im Zusammenhang mit der verminderten Suszeptibilität von maclL-4R α -defizienten BALB/c Mäusen gegenüber einer *L. major* Infektion zeigten [Hölscher et al. 2006], scheinen IL-13tg Mäuse ein vielversprechendes Modell für die Untersuchung der Bedeutung von aaM ϕ in *Mtb*-Infektionen zu sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine massive erhöhte Empfänglichkeit der IL-13tg Mäuse gegenüber der experimentellen TB beobachtet werden. Auffällig war hierbei, dass die Infiltration von Immunzellen in die Lunge stark erhöht war. In Infektionsmodellen mit *S. mansoni* konnte gezeigt werden, dass die hierdurch induzierte Dominanz der TH2-polarisierten Immunantwort für die massive Zellrekrutierung in der Leber verantwortlich ist [Hesse et al. 2001]. In mykobakteriellen Infektionen hingegen konnte das Ausmaß der Zellinfiltration in die Lunge bisher nie auf eine vermehrte TH2-Polarisation zurückgeführt werden und wird in dieser Arbeit erstmalig durch eine IL-13-Überexpression gezeigt. Die Organisation der Lungengranulome in den IL-13tg- und Wildtypmäusen erschien

zunächst vergleichbar zu sein. Spät in der Infektion kam es in den IL-13tg Mäusen allerdings überraschend zu einer Nekrotisierung der Granulome. Im Zuge dieser Gewebsdestruktion konnten vermehrt Granulozyten beobachtet werden [Daten nicht gezeigt], die Bestandteile untergegangener Zellen beseitigen [Weiss 1989]. In der vorliegenden Arbeit konnte die Entwicklung einer GN erstmalig nach einer *Mtb*-Infektion im Zuge einer TH2-Immunantwort nachgewiesen werden.

Dass es in den IL-13tg Mäusen tatsächlich zu einer starken TH2-Immunantwort kam, zeigte die gegenüber den Wildtypmäusen um ein Vielfaches erhöhte *il-13* und *il-10* mRNA-Expression. Da TH1- und TH2-Zellen in der Lage sind sich gegenseitig in ihrer Differenzierung zu inhibieren [Kidd 2003], wurde die Entwicklung der TH1-Immunantwort in IL-13tg Mäusen im Verlauf der Infektion untersucht. Aufgrund der Quantifizierung der mRNA-Expression von *ifn γ* konnte gezeigt werden, dass es zu einer verzögerten Ausbildung einer funktionellen TH1-Immunantwort kam. Auch die Effektorfunktionen klassisch aktivierter Makrophagen wurden, wie die Expression der NOS2 zeigte, korrelierend mit der *ifn γ* -mRNA-Expression verspätet induziert. Allerdings war sowohl die mRNA-Expression von *ifn γ* , als auch die Expression von NOS2 spät in der Infektion in den IL-13tg- und Wildtypmäusen vergleichbar. Die immunhistologische Färbung von NOS2 erschien in den IL-13tg Mäusen im Vergleich zum Wildtyp zwar auch spät in der Infektion schwächer, jedoch war die Expression durch die weiträumigere Verteilung im Gewebe insgesamt quantitativ vergleichbar. Auch die NOS2-vermittelte RNI-Produktion, die im Serum gemessen wurde, zeigte korrelierend mit der verzögerten TH1-Immunantwort zunächst eine starke Reduktion in den IL-13tg Mäusen. Jedoch näherte sich die RNI-Konzentration in diesen Tieren spät in der Infektion an den in den Wildtypmäusen gemessenen Wert an. Zusammengefasst konnten diese Untersuchungen zeigen, dass es durch die IL-13-Überexpression nach *Mtb*-Infektion zu einer verzögerten Induktion der TH1-Immunantwort sowie Ausbildung von Effektorfunktionen klassisch aktivierter Makrophagen kam, die spät in der Infektion jedoch mit dem Wildtyp vergleichbar waren.

Ob die erhöhte Empfänglichkeit dieser Tiere gegenüber der Infektion durch die verzögerte Induktion der TH-1-Immunantwort begründet war oder auf einer vermehrten Differenzierung aaM ϕ basiert, bleibt zu ergründen. Der immunhistologische Nachweis von Arg-I-im Lungengewebe der IL-13tg Mäuse

zeigte bereits früh in der Infektion eine deutliche Expression des Enzyms, die im Verlauf der Infektion stark zunahm. In den Wildtypmäusen hingegen war die Arg-I zu keinem Zeitpunkt der Infektion nachweisbar. Die verstärkte Arg-I-Expression deutete auf eine vermehrte alternative Aktivierung von Makrophagen hin. Arg-I metabolisiert L-Arginin unter anderem zu Prolin, einem Bestandteil des Kollagens [Hesse et al 2001]. In den IL-13tg Mäusen konnte daher korrelierend mit der stark erhöhten Arg-I-Expression spät in der Infektion eine gegenüber den Wildtypmäusen erhöhte Kollagenablagerung im Lungengewebe beobachtet werden. Es bleibt allerdings zu ergründen, ob hierbei die alternative Aktivierung von Makrophagen oder eher IL-13-stimulierte Fibroblasten [Gordon 2003, Wynn 2004] in der Lunge dazu beitragen.

Übereinstimmend mit den Untersuchungen der *macIL-10tg* Mäuse ließ sich in den IL-13tg Mäusen eine vermehrte Differenzierung *aaMφ* im Verlauf der Infektion nachweisen. Auffällig ist hierbei, dass es dadurch nicht etwa zu einer vollständigen Inhibierung *kaMφ* kam, sondern dass diese beiden Phänotypen vielmehr gleichzeitig generiert wurden. Es ist denkbar, dass die Koexistenz *aaMφ* in *Mtb*-Infektion die Effektorleistung der Immunantwort beeinflusste. In diesem Zusammenhang sind auch in anderen Infektionsmodellen die verantwortlichen Mechanismen noch nicht eindeutig beschrieben. In den IL-13tg Mäusen dieser Arbeit konnte spät in der Infektion jedoch eine gegenüber den Wildtypmäusen stark erhöhte *il-10*-mRNA-Expression detektiert werden, die mit der vermehrten mRNA-Expression des IL-4R α und der dramatisch erhöhten Keimlast in diesen Mäusen korreliert. Daraus kann geschlossen werden, dass es durch die erhöhte *il-4R\alpha*-Expression spät in der Infektion zu einer weiteren Unterstützung der Differenzierung *aaMφ* und somit zur IL-10-Produktion kommt, die im Gegenzug die Expression des IL-4R α auf Makrophagen induziert. Weitere Studien müssen diesen Rückkopplungsmechanismus allerdings noch eindeutig belegen.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass IL-10 selbst die Infektabwehr in den IL-13tg Mäusen moduliert. Da die T-Zell- und Makrophagen-Effektorfunktionen spät in der Infektion in diesen Mäusen nicht beeinträchtigt zu sein scheinen, muss es sich hierbei um bisher in *Mtb*-Infektionen unbeschriebene Mechanismen handeln. Ein Protein, das durch IL-10-induziert u.a. die Effektorleistung von T-Zell-sezerniertem IFN γ inhibieren kann, ist SOCS (engl.: *suppressor of cytokine*

signalling)³ [Kubo et al. 2003, Lang et al. 2002]. Die mRNA-Expression dieses Gens konnte zeitgleich mit der erhöhten Transkription von IL-10 in den IL-13tg Mäusen detektiert werden. SOCS3 ist in der Lage neben IL-6 auch die IFN γ -induzierte Signaltransduktion durch Bindung an gp130 zu supprimieren, ohne hierbei die Expression von IFN γ selbst zu hemmen [Kubo et al. 2003, Stoiber et al. 1999]. Es wird sowohl von TH2-Zellen als auch von Makrophagen gebildet [Egwuagu et al. 2002, Kubo et al. 2003, Seki et al. 2003]. Bisher wurden allerdings kaum Studien in *in vivo*-Modellen durchgeführt und die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen bezüglich der regulatorischen Wirkung von SOCS3 sind widersprüchlich. Es kann jedoch mit Sicherheit gesagt werden, dass SOCS3 ein spezifischer negativer Regulator von gp130-abhängigen Signalwegen ist [Kubo et al. 2003]. Zudem wurde gezeigt, dass die Expression von SOCS3 in Erkrankungen wie Asthma oder Dermatitis im Zuge einer TH2-polarisierten Immunantwort zu einer verstärkten Pathologie führt. Es ist daher vorstellbar, dass SOCS3, induziert durch IL-10, spät in der Infektion IFN γ -abhängige, antimykobakterielle Funktionen beeinträchtigt und daher den Ausgang der Infektion in den IL-13tg Mäusen der vorliegenden Arbeit beeinflusste, ohne dabei die Effektorfunktionen von T-Zellen zu beeinträchtigen [Lang et al. 2002, Seki et al. 2003]. Somit ist die nähere Untersuchung des inhibitorischen Potentials dieses Proteins in *Mtb*-Infektionen im Hinblick auf Schutz und Pathologie von großem Interesse.

Im Rahmen der Infektion von IL-13tg Mäusen konnte die in den maclL-10tg Mäusen festgestellte Korrelation von alternativer Makrophagenaktivierung und erhöhten Suszeptibilität, gemessen an der Arg-I-Expression sowie der Keimlast der in der Lunge, verstärkt beobachtet werden. Sowohl in maclL-10tg als auch in IL-13tg Mäusen ließ sich zu keinem Zeitpunkt der Infektion ein Hinweis auf die Differenzierung eines suppressiven Makrophagenphänotyps feststellen. Daher ist anzunehmen, dass diese Makrophagenpopulation für die beobachtete Empfindlichkeit beider Mausstämmen gegenüber der *Mtb*-Infektion keine Rolle spielte. Es konnte jedoch in maclL-10tg und IL-13tg Tieren eine Koexistenz von aaM ϕ und kaM ϕ beobachtet werden. Für die Hemmung einer funktionellen Abwehr durch aaM ϕ können mehrere Mechanismen postuliert werden.

Durch die vermehrte Expression der Arg-I in aaM ϕ kann es zu einer Konkurrenz mit NOS2 um das gemeinsame Substrat L- Arginin kommen [Chang et al. 1998]. Hierbei ist die Aktivität von NOS2 und Arg-I vom extrazellulären Angebot des Substrats abhängig, wobei Arg-I 90% und NOS2 10% konsumieren, NOS2 jedoch eine höhere Affinität zum Substrat hat [Hrabák et al. 1994]. *In vitro*-Modelle konnten zeigen, dass nach LPS-Stimulierung von Makrophagen und bei Hemmung der Arg-I eine starke Erhöhung der Produktion von RNI erreicht wird. Die gegenseitige Regulierung dieser Enzyme ist jedoch nur unter limitierenden Bedingungen des Substratangebots möglich (< 0,5mM), welche unter anderem in entzündlichen Geweben vorkommen. Senkt man das Substratangebot in dem oben beschriebenen Experiment weiter, so schaffen diese Bedingungen einen Vorteil für NOS2, was durch eine zunehmende Erhöhung der RNI-Produktion gezeigt wurde [Chang et al. 1998]. Diese *in vitro* nachgewiesenen regulatorischen Eigenschaften von NOS2 und Arg-I unter Substrat-limitierenden Bedingungen unterstützen die Annahme, dass aaM ϕ und kaM ϕ auch *in vivo* von immunregulatorischer Bedeutung sind. Demnach ist anzunehmen, dass eine vermehrte Arg-I-Expression zu einer verminderten RNI-Produktion, unabhängig von der Induktion von NOS2 führen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte in maclL-10tg Mäusen allerdings keine Verminderung der NO-Produktion gegenüber den Wildtypmäusen während des gesamten Verlaufs der Infektion detektiert werden. In den IL-13tg Mäusen hingegen war die RNI-Generierung früh in der Infektion stark reduziert, die sich jedoch spät in der Infektion der in den Wildtypmäusen gemessenen RNI-Konzentration annäherte. Da die Kinetik der RNI-Produktion in diesen Mäusen mit der Kinetik der NOS2-Expression korrelierte, kann angenommen werden, dass die Reduktion letztlich auf die verzögerte T-Zellentwicklung zurückzuführen ist und ihr nicht etwa eine Substratlimitierung durch die erhöhte Arg-I-Expression zugrunde liegt. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Messung der Nitratkonzentration im Serum durchgeführt wurde. Daher ist es möglich, dass die hier dargestellte Kinetik der RNI-Konzentration nicht repräsentativ für die in der Lunge herrschenden Bedingungen war. So kann es sowohl in maclL-10tg, als auch in IL-13tg Mäusen aufgrund der Koexistenz von kaM ϕ und aaM ϕ durch die lokale Organisation dieser Zellen im Lungengewebe zu unterschiedlichen NO-Konzentrationen gekommen

sein. Folglich könnte die Qualität der Abwehr von Mykobakterien in unterschiedlichen Arealen der Lunge durch lokal verminderte RNI-Konzentrationen variieren und somit insgesamt die Infektabwehr bzw. das Erregerwachstum beeinflusst haben. Allerdings geht aus der histologischen Anfärbung der Mykobakterien und der immunhistologischen Detektion der Arg-I keine lokale Anhäufung von Erregern, die mit der vermehrten Arg-I-Expression und somit aaM ϕ korreliert, hervor. Außerdem ist aufgrund der insgesamt zunehmenden RNI-Produktion im Verlauf der Infektion zweifelhaft, ob die insgesamt reduzierte RNI-Konzentration in den IL-13tg Mäusen für die erhöhte Keimlast in der Lunge verantwortlich sein kann. Eine genauere Untersuchung der Produktion reaktiver Stickstoffintermediate in der Lunge könnte hierüber Aufschluß geben. Im Hinblick auf die erhöhte Empfänglichkeit der IL-13tg Mäuse fällt auf, dass die Entwicklung von aaM ϕ , gemessen an der *il-4R α* -mRNA-Expression und der Arg-I-Expression mit der Kinetik der Keimlast in den Organen der IL-13tg Mäuse nach Infektion mit *Mtb* einher ging. Daher kann postuliert werden, dass diese Zellen tatsächlich durch bisher unerforschte Mechanismen die Resistenz von maclL-10tg und IL-13tg Mäuse beeinflussten.

Im Infektionsmodell mit *L. major* konnte, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in suszeptiblen Mausstämmen die erhöhte Empfänglichkeit gegenüber der Infektion mit einer erhöhten Arg-I-Aktivität korreliert [Iniesta et al. 2005]. Durch die Hemmung der Arg-I-Aktivität in Knochenmarksmakrophagen nach *L. major*-Infektion konnte das Erregerwachstum in suszeptiblen BALB/c Mäusen verringert werden, was jedoch nicht zu einer vollständigen Resistenz dieser Tiere führt [Iniesta et al. 2005]. Eine Verabreichung von L-Ornithin, einem Zwischenprodukt des L-Argininverstoffwechsels zu Polyaminen durch Arg-I, führte in resistenten C57BL/6 Mäusen zu einem Wachstumsvorteil der intrazellulären Erreger [Iniesta et al. 2001, Iniesta et al. 2002]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von *L. major* nach Infektion durch die Hemmung der Arg-I-Aktivität unter Verwendung des Inhibitors LOHA gehemmt werden konnte. Diese Hemmung war durch die Zugabe von L-Ornithin reversibel [Iniesta et al. 2001]. Anhand dieser Untersuchungen wurde postuliert, dass *L. major* in aaM ϕ einen Wachstumsvorteil hat. Diese Hypothese könnte auch eine Erklärung für die erhöhte Suszeptibilität der in dieser Arbeit untersuchten Mäusestämme im

Zusammenhang mit der vermehrten alternativen Aktivierung von Makrophagen sein, da Mykobakterien ebenfalls Genhomologe zu Enzymen dieses Stoffwechselweges besitzen [Cole et al. 1998]. Somit könnte es zu einer Nutzung zellulärer Stoffwechselprodukte des L-Arginins durch Mykobakterien kommen. Experimentell könnte diese Annahme durch Hemmung der Arg-I *in vitro* und *in vivo* unter Verwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Mausstämme bestätigt werden. Sollten Mykobakterien durch die vermehrte Aktivität der Arg-I in aaM ϕ tatsächlich einen Wachstumsvorteil haben, so würde die Inhibierung des Enzyms zu einer erhöhten Resistenz dieser Tiere führen. Es ist allerdings auch denkbar, dass allein die Tatsache, dass aaM ϕ nicht in der Lage sind RNI zu bilden, einen Wachstumsvorteil für intrazelluläre Erreger wie *Mtb* in diesen Zellen bedeutet. Die experimentelle Untersuchung dieser Hypothese gestaltet sich schwierig, da die Analyse der Expression oder Aktivität von Mediatoren nur im gesamten Gewebe möglich ist. Dadurch könnten lokale Unterschiede dieser Vorgänge, wie ein Wachstumsvorteil für die Bakterien in einzelnen Zellen, im Organ unbemerkt bleiben. Eine Betrachtung einzelner, unterschiedlich aktivierter Makrophagen im Hinblick auf die Umsetzung von L-Arginin könnte in diesem Modell Aufschluss über den Einfluss aaM ϕ auf die Wachstumsbedingungen in diesen Zellen geben. Dies könnte durch die Untersuchung einzelner Zellen oder Zellverbände nach Mikrodissektion realisiert werden [Hergenahn et al. 2003, Kalies et al. 2006].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nach einer *Mtb*-Infektion die Entwicklung einer Granulomnekrose in IL-13tg Mäusen beobachtet werden. Die Granulomnekrose ist ein charakteristisches Merkmal der humanen TB und konnte im murinen System bisher nur nach *Mav*-Infektion beobachtet werden [Benini et al. 1999]. Hierbei wurden gezeigt, dass IFN γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen die GN verursachen [Ehlers et al. 2001]. Untersuchungen in *Mtb*-Infektionen, die unter NOS2-inhibitorischen Bedingungen [L-Nil-behandelte Mäuse; persönliche Kommunikation C. Hölscher] durchgeführt wurden zeigten jedoch, dass sich auch in *Mtb*-Infektionen im murinen System eine GN ausbildet, wenn die RNI-Produktion verhindert, bzw. verringert wird. Die genauen Ursachen für dieses Phänomen sind noch unbekannt, jedoch kann dies auf den inhibitorischen Einfluss von RNI auf aktivierte T-Zellen zurückgeführt werden. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass NOS2-defiziente Tiere eine gesteigerte TH1-Antwort

mit vermehrter IFN γ -Expression entwickeln [Maclean et al. 1998]. Hierbei wurde festgestellt, dass RNI eine Suppression der IL-12-Expression bewirkt [Huang et al. 1998]. Somit ist vorstellbar, dass eine verminderte RNI-Generierung zu einer vermehrten IFN γ -Expression führt, was in *Mav*-Infektionen als die Ursache der GN beschrieben wurde [Ehlers et al. 2001].

In der vorliegenden Arbeit war die RNI-Produktion in den IL-13tg Mäusen zwar insgesamt reduziert, jedoch konnte im Verlauf der Infektion eine Zunahme der Generierung beobachtet werden, so dass spät in der Infektion in den transgenen Tieren eine nur noch geringfügige Reduktion gegenüber den Wildtypmäusen detektierbar war. Auch die IFN γ -Produktion war zwar früh in der Infektion gegenüber den Wildtypmäusen reduziert, nahm jedoch im Verlauf der Infektion zu und war beim Auftreten der GN mit den Wildtypmäusen vergleichbar. Davon ausgehend, dass eine vermehrte IFN γ -Produktion als Ursache einer GN diskutiert wird, ist es unwahrscheinlich, dass dies in den IL-13tg Mäusen die GN begründet. Daher müssen andere Mechanismen als die oben Beschriebenen für die Ausbildung einer GN in den *Mtb*-infizierten IL-13tg Mäusen verantwortlich sein, die wahrscheinlich TH2-vermittelt sind. Ob in diesem Zusammenhang aaM ϕ eine Rolle spielen, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Genaueren Aufschluss über die Beteiligung dieser Zellen könnte die Infektion *macIL-4R α* -defizienter/IL-13tg Tiere geben. Eine Generierung von aaM ϕ bei bestehendem Einfluss von IL-13 wäre in diesen Mäusen nicht mehr gewährleistet. Somit könnte die Infektion dieser Tiere zeigen, ob die Ausbildung einer GN auf aaM ϕ zurückzuführen ist. Außerdem könnte nach Infektion von *IL-4R α* -defizienten/IL-13tg Mäuse mit *Mtb* ebenfalls die Bedeutung von aaM ϕ für die Schutz-vermittelnde Abwehr untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt zum näheren Verständnis der Bedeutung von *macIL-10* und IL-13 als Immunmodulatoren in einer experimentellen *Mtb*-Infektion beitragen. So wurde gezeigt, dass die Überexpression von *macIL-10* und IL-13 in transgenen Mäusen zu einer stark erhöhten Empfindlichkeit gegenüber der Infektion führt. Dies korrelierte mit einer vermehrten Generierung alternativ aktivierter Makrophagen in beiden Mausstämmen (Abb. 33). In den *macIL-10*tg Mäusen lag dies vor allem einer

vermehrten Induktion des IL-4R α auf Makrophagen zugrunde, wodurch diese Zellen gegenüber einer alternativen Aktivierung durch IL-13 sensitiviert werden. Vermutlich spielt dieser Makrophagenphänotyp auch bei der Ausbildung einer GN eine Rolle (Abb. 33).

Das erneute Erregerwachstum nach der chronischen Infektionsphase sowie die Ausbildung der Granulomnekrose sind charakteristische Merkmale der Reaktivierung der humanen Tuberkulose. Eine Reaktivierung konnte im experimentell Infektionsmodell mit *Mtb* in suszeptiblen Mausstämmen wie in CBA, DBA, und in tIL-10tg Mäusen ebenfalls nachgestellt und auf eine Hemmung TH1-vermittelter Mechanismen zurückgeführt werden [Turner et al. 2002]. In diesen Modellen kam es jedoch nicht zur Ausbildung einer GN. In der vorliegenden Arbeit liegt diesem Phänomen jedoch keine Hemmung der TH1-Immunantwort zugrunde, sondern vielmehr der gleichzeitigen Entwicklung einer TH2-Immunantwort. Somit konnte zum ersten Mal in einem experimentellen Infektionsmodell gezeigt werden, dass es durch eine TH2-Immunantwort während der chronischen Phase einer *Mtb*-Infektion zu einer Reaktivierung kommen kann. Dies widerspricht der weitläufigen Meinung, dass die Supprimierung der TH1-Immunantwort während der Latenz zu einer Reaktivierung führt [Turner et al. 2002].

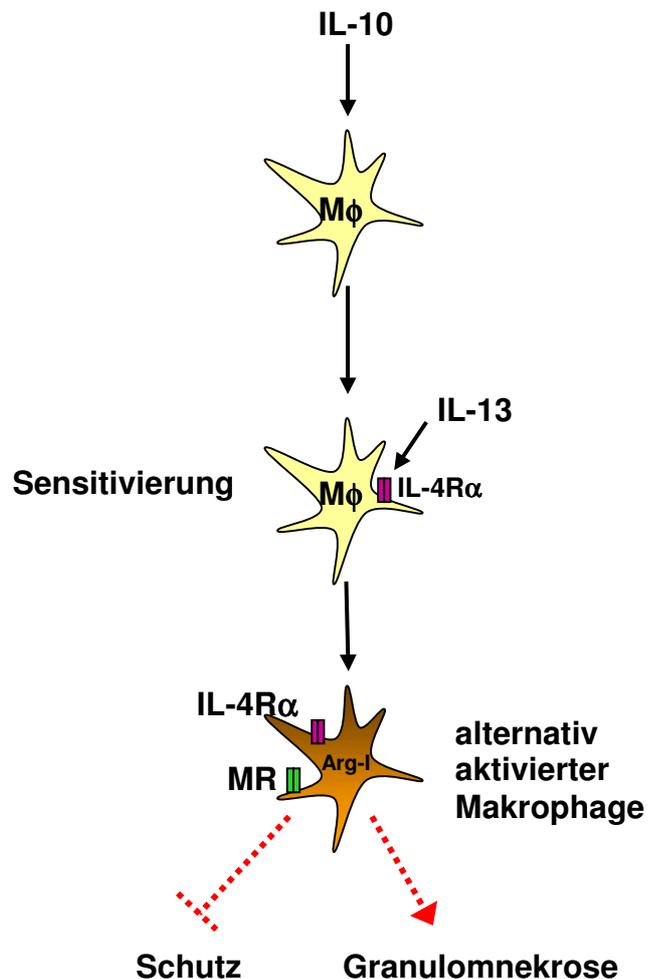


Abb. 33: Regulation der Makrophagenaktivierung durch IL-10 und IL-13

In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Einfluss von maclL-10 eine vermehrte alternative Aktivierung von Makrophagen beobachtet werden. Dies wurde auf eine Sensitivierung dieser Zellen gegenüber IL-4 und IL-13 aufgrund einer IL-10-induzierten Hochregulierung des IL-4R α zurückgeführt. Über die Bindung von IL-4 und IL-13 an den IL-4R α kam es vermehrt zu einer alternativen Aktivierung von Makrophagen. Hierbei wurde der MR auf der Zelloberfläche und das intrazelluläre Enzym Arg-I hochreguliert. Die vermehrte Differenzierung aaM ϕ korrelierte mit einer stark erhöhten Empfänglichkeit der Versuchstiere gegenüber der Infektion. Außerdem konnte die Ausbildung einer Granulomnekrone festgestellt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass aaM ϕ durch noch nicht eindeutig identifizierte Mechanismen wahrscheinlich die Schutz-vermittelnde Immunabwehr beeinträchtigen können (\perp). Außerdem scheinen sie zur Ausbildung der Granulomnekrone beizutragen (\downarrow).

Die hier beobachtete modulatorische Bedeutung einer TH2-polarisierten Immunantwort für die Reaktivierung einer TB wird durch Patientenstudien unterstützt in denen erkrankte Personen die vermehrte Ausbildung einer TH2-polarisierten Immunantwort zeigten [Lienhardt et al. 2002, Raja 2004]. Aufgrund

der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit läßt sich vermuten, dass in diesem Zusammenhang aaM ϕ eine immunmodulatorische Rolle spielen und somit die Reaktivierung einer TB begünstigen. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung der Tuberkulose als weltweites Gesundheitsrisiko ergeben sich aus diesen Erkenntnissen neue Ansatzmöglichkeiten. Die in dieser Arbeit diskutierten, genetisch veränderten Mausstämmen, wie maclL-10tg/maclL4R α -doppelt-defiziente oder IL-13tg/IL-4R α -defiziente Mäuse könnten hierbei wertvolle Studienobjekte sein. Auch die Phänotypisierung von Makrophagenpopulationen in den Lungen von TB-Patienten könnte zum näheren Verständnis der immunologischen Vorgänge, die zur Reaktivierung der Tuberkulose, bzw. zur erhöhten Empfänglichkeit gegenüber einer *Mtb*-Infektion führen, beitragen.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht letztlich, dass die im Verlauf einer TB auftretende Gewebsdestruktion nicht durch die vermehrte Expression von TH2-Zytokinen wie IL-13 verhindert werden kann und dass diese Beeinflussung der Immunabwehr zugunsten einer TH2-Polarisation eine dramatische Erhöhung der Empfänglichkeit gegenüber einer *Mtb*-Infektion zur Folge hat. Daher können TH2-Zytokine wie IL-13 auf keinen Fall Gegenstand zukünftiger Therapien zur Verhinderung der gewebserstörenden GN sein.

5. Zusammenfassung

Für die erfolgreiche Abwehr einer *Mycobacterium tuberculosis*-Infektion ist die Entwicklung einer funktionellen TH-1-Immunantwort essentiell. Der modulatorische Einfluss einer TH2-Immunantwort auf Schutz und Pathologie in der TB ist weitgehend unerforscht. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig der Einfluss von TH2-Zytokinen auf Makrophagen im experimentellen Mausmodell untersucht. Hierbei wurden folgende Erkenntnisse unter der Verwendung Makrophagen-spezifisch IL-10-überexprimierender (macIL-10) und IL-13 transgener (IL-13tg) Mäuse gewonnen:

- Eine erhöhte Produktion von macIL-10 und IL-13 ging mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer *Mtb*-Infektion einher.
- Die Makrophagen-spezifische Überexpression von IL-10 führte nach Infektion jedoch zu keiner Beeinträchtigung der T-Zell-spezifischen Immunantwort oder einer Suppression klassisch aktivierter Makrophagen.
- Durch die Überexpression von IL-10 wurde der IL-4R α auf Makrophagen hochreguliert.
- Eine vermehrte Expression von IL-10 und IL-13 in *Mtb*-Infektionen bewirkte eine vermehrte Differenzierung alternativ aktivierter Makrophagen. Es ließ sich eine Koexistenz klassisch und alternativ aktivierter Makrophagen nachweisen.
- IL-13tg Mäusen wiesen nach *Mtb*-Infektion Granulomnekrosen auf.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die vermehrte Expression von TH2-Zytokinen zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber einer *Mtb*-Infektion führt. Es läßt sich vermuten, dass die IL-10- und IL-13-vermittelte Generierung alternativ aktivierter Makrophagen hierbei eine entscheidende Rolle spielt.

6. Literatur

Banchereau J und Steinmann RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767

Barner M, Mohrs M, Brombacher F, Kopf M (1998) Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role of IL-13 in the regulation of TH2 response. *Curr Biol* 8: 669

Bhatt K, Hickman SP, Salgame P (2004) A new approach to modelling early lung immunity in murine tuberculosis. *Infect Immun* 69: 1127

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502

Belosevic M, Finbloom DS, van der Meide PH, Slayter MV, Nacy CA (1989) Administration of monoclonal anti-IFN- γ antibodies *in vivo* abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol* 143: 266

Benini J, Ehlers EM, Ehlers S (1999) Different types of pulmonary granuloma necrosis in immunocompetent vs. TNFRp55-gene-deficient mice aerogenically infected with highly virulent *Mycobacterium avium*. *J Pathol* 191: 127

Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C (1991) Macrophage deactivation by IL-10. *J Exp Med* 174: 1549

Boros DL (1978) Granulomatous inflammations. *Prog Allergy* 24: 183

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285: 732

Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR (1992) Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 175: 1111

Chang CI, Liao JC, Kuo L (1998) Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 274: H342

- Chiaramonte MG, Donaldson MG, Cheever AW, Wynn TA (1999)** An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 104: 777
- Cohn ZA (1963)** The fate of bacteria within phagocytic cells. *J Exp Med* 117: 27
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG (1998)** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537
- Comstock GW (1994)** Variability of tuberculosis in a time of resurgence. *Clin Infect Dis* 19: 1015
- Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM (1993)** Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178: 2243
- Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM (1997)** Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 186: 39
- Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C (2003)** The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with HIV epidemic. *Arch Intern Med* 163: 1009
- Dannenberrg (1999)** Pathogenesis of tuberculosis. In *Tuberculosis and Nontuberculous mycobacterial infection*. Schlossberg D, W.B. Saunders Company, Pennsylvania pp 17
- Danneberg AM und Rook GAW (1994)** Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue damaging and macrophage activating immune responses- dual mechanisms that control bacillary multiplication. In *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Bloom BR, editor *ASM Press*, Washington, DC., pp. 459
- Desjardins M (1995)** Biogenesis of phagolysosomes: the kiss and run hypothesis. *Trends Cell Biol* 5: 183

- de Fougerolles AR, Sprague AG, Nickerson-Nutter CL, Chi-Rosso G, Rennert PD, Gardner H, Gotwals PJ, Lobb RR, Kotliansky VE (2000)** Regulation of inflammation by collagen-binding integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ in models of hypersensitivity and arthritis. *J Clin Invest* 105: 721
- de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE (1991)** Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 915
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM (1993)** IL-10 inhibits costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 151: 1224
- Doherty TM, Kastelein R, Menon S, Andrade S, Coffman RL (1993)** Modulation of murine macrophage function by IL-13. *J Immunol* 151: 7151
- Doherty TM und Arditi M (2005)** TB, or not TB: that is the question -- does TLR signaling hold the answer? *J Clin Invest* 114: 1699
- Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B (1998)** Interleukin- (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 10: 2129
- Dunne und Pearce (1999)** Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes Infect* 1: 553
- Dustin ML und de Fougerolles AR (2001)** Reprogramming T cells: the role of extracellular matrix in coordination of T cell activation and migration. *Curr Opin Immunol* 13: 286
- Egwuagu CE, Yu CR, Zhang M, Mahdi RM, Kim SJ, Gery I (2002)** Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 168: 3181
- Ehlers S, Benini J, Held HD, Roeck C, Alber G, Uhlig S (2001)** $\alpha\beta$ T cell receptor-positive cells and IFN- γ , but not inducible nitric oxide synthase are crucial for granuloma necrosis in pulmonary immunopathology. *J Exp Med* 194: 1847
- Ehlers S (2003)** Formalpathogenese der tuberkulösen Gewebsveränderung. *Internist* 44: 1363

- Ehlers und Hölscher (2005)** DTH-associated pathology in *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Immunology* Kaufmann SH und Steward MW, ASM Press Kapitel 35
- Ernst JD (1998)** Macrophage receptors for *M. tuberculosis*. *Infect Immun* 66: 1277
- Feng CG, Collazo-Custodio CM, Eckhaus M, Hieny S, Belkaid Y, Elkins K, Jankovic D, Taylor GA, Sher A (2004)** Mice deficient in LRG-47 display increased susceptibility to mycobacterial infection associated with the induction of lymphopenia. *J Immunol* 172: 1163
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A (1991a)** IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by TH1 cells. *J Immunol* 146: 3444
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991b)** IL-10 inhibits cytokine production by macrophages. *J Immunol* 147: 3815
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1998)** Two types of mouse T helper cell. IV . TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 170: 2081
- Flesch I und Kaufmann S (1987)** Mycobacterial growth inhibition by interferon- γ activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 138: 4408
- Flesch I und Kaufmann S (1990)** Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4 and tumor necrosis factor. *Infect Immun* 58: 2675
- Flynn JL und Chan J (2001a)** Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19: 93
- Flynn JL und Chan J (2001b)** Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun* 69:4195
- Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B, Zanker KS (1998)** CD4⁺ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize β 1 integrin-independent strategies for polarisation, interactions with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol* 28: 2331
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kuhn R, Muller W, Trinchieri G, Sher A (1996)** In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response

dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 15: 798

Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J (1999a) Characterisation of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1136

Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ (1999b) Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1145

Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marietta P, Brooks JV, Orme IM (2001) Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 69:1722

Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23

Goren MB, D'Arcy Hart P, Young MR, Armstrong JA (1976a) Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* 73:2580

Goren MB, Brokl O, Das BC (1976b) Sulfatides of *mycobacterium tuberculosis*: the structure of the principal sulfatide (SL-I). *Biochemistry* 29: 2728

Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, Goerd S (2001) Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand J Immunol* 53: 386

Greenberg S und Grinstein S (2002) Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14(1): 136

Harding CV, Ramachandra L, Wick MJ (2003) Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity. *Curr Opin Immunol* 15(1): 112

Heath VL, Kurata H, Lee HJ, Arai N, O'Garra A (2002) Checkpoints in the regulation of T helper 1 responses. *Curr Top Microbiol Immunol* 266: 23

Heinzel FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK (1993) Recombinant IL-12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 177: 1505

- Herbert DR, Holscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Forster I, Brombacher F (2004)** Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downregulates T Helper 1 response and immunopathology. *Immunity* 20: 623
- Hergenbahn M, Kenzelmann M, Grone HJ (2003)** Laser-controlled microdissection of tissues opens a window of new opportunities. *Pathol Res Pract* 199: 419
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV (1996)** Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89: 26
- Hernandez-Pando R, Aguilar D, Hernandez ML, Orozco H, Rook G (2004)** Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and the regulation of fibrosis. *Eur J Immunol* 34: 174
- Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA (2001)** Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 167: 6533
- Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F (2000)** Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun* 68: 4075
- Hölscher C, Arendse B, Schwegmann A, Myburgh E, Brombacher F (2006)** Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol* 176:1115
- Honey K und Rudensky AY (2003)** Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3: 472
- Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE (1982)** Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 155: 914
- Hrabák A, Idei M, Temesi A (1994)** Arginine supply for nitric oxide synthesis and arginase is mainly exogenous in elicited murine and rat macrophages. *Life Sci* 55: 797

- Hommel M (2004)** On the dynamics of T-cell activation in lymph nodes. *Immunol Cell Biol* 82: 62
- Huang FP, Niedbala W, Wei XQ, Xu D, Feng GJ, Robinson JH, Lam C, Liew FY (1998)** Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur J Immunol* 28: 4062
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I (2001)** The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 193: 777
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Miron C, Alonso C, Corraliza I (2002)** Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasites Immunol* 24: 113
- Iniesta V, Carcelen J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, Parra P, Mangas M, Monroy I, Campo ML, Nieto CG, Corraliza I (2005)** Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun* 73: 6085
- Jung YJ, LaCourse R, Ryan L, North RJ (2002)** Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection in mice. *Infect Immun* 70: 6436
- Kalies K, Blessenohl M, Nietsch J, Westermann J (2006)** T cell zones of lymphoid organs constitutively express Th1 cytokine mRNA: specific changes during the early phase of an immune response. *J Immunol* 176: 741
- Kamohara H, Yamashiro S, Galligan C, Yoshimura T (2001)** Discoidin domain receptor-1 isoform-a (DDR1a) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices. *FASEB J* 15: 2724
- Katakura T, Miyazaki M, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F (2004)** CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages. *J Immunol* 172: 1407
- Kidd P (2003)** Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8: 223
- Kopf, M., F. Brombacher, G. Kohler, G. Kienzle, K. H. Widmann, K. Lefrang, C. Humborg, B. Ledermann, Solbach W (1996)** IL-4-deficient BALB/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 184: 1127

- Kubo M, Hanada T, Yoshimura A (2003)** Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 4: 1169
- Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ (2002)** Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* 169: 2253
- Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, Fielding K, Sillah J, Sow OY, Bah B, Benagiano M, Diallo A, Manetti R, Manneh K, Gustafson P, Bennett S, D'Elis MM, McAdam K, Del Prete G (2002)** Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo*. *Eur J Immunol* 32: 1605
- Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE (2002)** IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive *in vivo* gene expression phenotype. *BMC Immun* 3: 7
- Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Warmington K, Kunkel SL (1994)** Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 152: 5883
- Luster AD (2002)** The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14: 129
- MacLean A, Wei XQ, Huang FP, Al-Alem UA, Chan WL, Liew FY (1998)** Mice lacking inducible nitric oxide synthase are more susceptible to *herpes simplex virus* infection despite enhanced Th1 cell responses. *J Gen Virol* 79: 825
- MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF (1997)** Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5243
- MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD (2003)** Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 299: 654
- Matthews DJ, Emson CL, McKenzie GJ, Jolin HE, Blackwell JM, McKenzie AN (2000)** IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol* 164: 1458
- Mattner F, Magram J, Ferrante J, Launois P, Di Padova K, Behin R, Gately MK, Louis JA, Alber G (1996)** Genetically resistant mice lacking IL-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarised Th2 response. *Eur J Immunol* 26: 1553

- McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, Murray R, Grencis R, McKenzie AN (1998)** Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity* 9: 423
- Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ (1999)** Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 163: 3920
- Mestas J und Hughes CW (2004)** Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172: 2731
- Mohrs M, Ledermann B, Kohler G, Dorfmueller A, Gessner A, Brombacher F (1999)** Differences between IL-4 and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J Immunol* 162: 7302
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001)** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683
- Moser M und Murphy KM (2000)** Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1: 199
- Mosser DM (2003)** The many faces of macrophage activation. *J Leuk Biol* 73: 209
- Munder M, Eichmann K, Modolell M (1998)** Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 160:5347
- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE (1999)** The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17: 701
- Neyer LE, Grunig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA (1997)** Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 65: 1675
- Noben-Trauth N, Kropf P, Muller I (1996)** Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science* 271: 987
- North R (1998)** Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 113: 55
- North RJ und Jung YJ (2004)** Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 22:599

- Oettgen (2002)** Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of epsilon germline transcripts. *Curr Opin Immunol* 12: 618
- Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abram J (1995)** Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 151: 518
- Pearce EJ, M Kane C, Sun J, J Taylor J, McKee AS, Cervi L (2004)** Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol Rev* 201:117
- Pieters J (2001)** Entry and survival of mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 3: 249
- Pulendran B, Palucka K, Banchereau J (2001)** Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293: 253
- Raja A (2004)** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120: 213
- Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning CJ, Goyert S, Ehlers S (2002)** Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 169: 3480
- Reiner SL, Zheng S, Wang ZE, Stowring L, Locksley RM (1994)** Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) introduction by macrophages and stimulates a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 179: 499
- Reiner S und Locksley R (1995)** The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13: 151
- Regal und Nanut (2005)** Tuberkulose-die weiße Pest. *Ärzte Woche* 18
- Roach DR, Briscoe H, Saunders B, France MP, Riminton S, Britton WJ (2001)** Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med* 193: 239
- Robinson DS, Ying S, Taylor IK, Wangoo A, Mitchell DM, Kay AB, Hamid Q, Shaw RJ (1994)** Evidence for a Th1-like bronchoalveolar T-cell subset and predominance of interferon-gamma gene activation in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 989
- Rook GAW, Steele J, Ainsworth M, Champion BR (1986)** Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of

the effects of recombinant gamma interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunol.* 59: 333

Sanchez FO, Rodriguez JI, Agudelo G, Garcia LF (1994) Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect Immun* 62: 5673

Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P (1995) IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 154: 5320

Schreiber T, Ehlers S, Aly S, Hölscher A, Hartmann S, Lipp M, Lowe JB, Hölscher C (2006) Selectin ligand-independent priming and maintenance of T cell immunity during airborne tuberculosis. *J Immunol* 176:1131

Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, O'Garra A, Oshida T, Saito H, Johnston JA, Yoshimura A, Kubo M (2003) SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. 9: 1047

Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL (2000) CD8⁺ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin *in vivo* and lyse infected macrophages. *J Immunol* 165: 353

Sodhi A, Gong J, Silva C, Qian D, Barnes PF (1997) Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 25: 617

Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS (2000) Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 204: 19

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity. *J Exp Med* 176: 287

Stenger S und Modlin RL (1999) T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol* 2: 89

Stoiber D, Kovarik P, Cohn S, Johnston JA, Steinlein P, Decker T (1999) Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. *J Immunol* 163: 2640

Suzuki Y, Sher A, Yap G, Park D, Neyer LE, Liesenfeld O, Fort M, Kang H, Gufwoli E (2000) IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine

and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 164: 5375

Swain SL (2001) Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response. *J Exp Med* 194:F11

Swihart K, Fruth U, Messmer N, Hug K, Behin R, Huang S, Del Giudice G, Aguet M, Louis JA (1995) Mice from a genetically resistant background lacking the interferon γ receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarised T helper cell 1- type CD4⁺ T cell response. *J Exp Med* 181:961

Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG (1993) Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 177: 1797

Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ (1998) Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8⁺ T cells requires production of gamma interferon. *Infect Immun* 66: 830

Teitelbaum R, Cammer M, Maitland ML, Freitag NE, Condeelis J, Bloom BR (1999) Mycobacterial infection of macrophages results in membrane permeable phagosomes. *Proc Natl. Acad Sci USA* 96: 15190

Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM, Cooper AM (2002) In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol* 169: 6343

Ulrichs T und Kaufmann S (2002) Mycobacterial persistence and immunity. *Front Biosci* 1:458

Ulrichs T und Kaufmann S (2003) Immunologie der Tuberkulose. *Internist* 44: 1374

Underhill DM (1999) Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 33: 1767

van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW (2002) Innate immunity to *mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 15: 294

Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V (2004) Cell biology of *mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:367

Walker L und Lowrie DB (1981) Killing of *Mycobacterium microti* by immunologically activated macrophages. *Nature* 293: 69

Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM (1994) CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon γ -deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 179: 1367

Waterston RH et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520

Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365

Winau F, Kaufmann SH, Schaible UE (2004) Apoptosis paves the detous path for CD8 T cells against intracellular bacteria. *Cell Microbiol* 6: 599

WHO (2003) <http://www.who.int/gtb> (WHO report 2003, Global tuberculosis control)

WHO (2005) The world health organisation/international union against tuberculosis and lung disease global project on surveillance for anti-tuberculosis drug resistance in the world: a model for other infectious disease. *Clin Infect Dis* 41:258

Wynn TA (2004) Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nat Rev* 4: 583

DANKSAGUNG

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während meiner gesamten Promotionszeit auf die ein oder andere Art unterstützt haben.

Der medizinischen Fakultät der Universität Lübeck möchte ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Schwerpunktförderung „Körpereigene Infektabwehr“ (Projekt B2 und 3) danken.

Bei Prof. Dr. Christoph Hölscher möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Prof. Dr. Stefan Ehlers möchte ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, seine Unterstützung beim Verfassen der Arbeit und sein stets offenes Ohr danken. Ein ganz besonderes Dankeschön sende ich an alle Mollnfs, die zum guten Klima in dieser Arbeitsgruppe beigetragen haben.

Dr. Alexandra Rausch möchte ich für ihre praktische Unterstützung und stetige Bereitschaft zur Diskussion (fachlich oder auch nicht...) danken. *Mir hammet jezz beide jeschafft...*

Conny, Dr. Christine Keller, Manu, Rüdiger und Tobbe danke ich für den Spass bei der Arbeit und Sahar vor allem für ägyptische Weisheiten.

Norbet-Füge Dich!-Reiling danke ich für sein sonniges Gemüt, jeden (wirklich jeden) dummen, ehrlichen, doppeldeutigen Spruch und seine Hilfe bei der Beantwortung schwieriger philosophischer und fachlicher Fragen.

Herrn Richter drück ich ganz besonders und hoffe, dass er mir meine Schludrigkeit bei der Planung meines Plattenverbrauchs nicht krumm genommen hat!

Meinen Eltern möchte ich für Ihre nun fast 29-jährige Unterstützung danken.

Sweedy, Du hast immer dafür gesorgt, dass ich die Kurve gekriegt habe. Deine Unterstützung und Beratung waren immer Gold wert. Ich danke Dir ganz herzlich und wünsch Dir viel Glück, wohin Dich die Wissenschaft auch verschlägt.

Hase, Du willst eigentlich nicht erwähnt werden, aber Du hast den größten Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet, weil Du mir unendlich viel Kraft gegeben und dafür gesorgt hast, dass ich den Blick fürs Wesentliche nicht verliere...

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 18.02.1977
Geburtsort: Freudenberg
Nationalität: deutsch

AUSBILDUNGSDATEN

1983-1987: Grundschule (Freudenberg, Siegen-Wittgenstein)
1987-1996: „Städtisches Ganztagsgymnasium Siegen“
Mai 1996: Hochschulreife
Oktober 1996: Beginn des Biologiestudiums an der „Philipps-Universität“ Marburg“
Oktober 1998: Vordiplom
Oktober 2000: Diplomprüfung in den Fächern Genetik, Parasitologie und Virologie
2000 / 2001: Diplomarbeit mit dem Thema **Transkription und Translation eines nicht essentiellen Gens (ORF UL142) von wildtypischem Cytomegalievirus des Menschen**, am „Institut für Virologie“ (Marburg) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Radsak
September 2001: Diplom
seit Oktober 2002: Doktorarbeit mit dem Thema **Die Bedeutung der Zytokine IL-10 und IL-13 für die Immunabwehr gegen *Mycobacterium tuberculosis* in der Maus**, am „Forschungszentrum Borstel“ in der Arbeitsgruppe Juniorprofessur für Molekulare Infektiologie/Molekulare Infektiologie unter der Leitung von Prof. Dr. C. Hölscher und Prof. Dr. S. Ehlers

Publikationen

Schreiber T, Ehlers S, Aly S, Hölscher A, Hartmann S, Lipp M, Lowe J, Hölscher C (2006) **Selectin ligand-independent priming and maintenance of T cell immunity during airborne tuberculosis.** *Journal of Immunology* 176:1131

Rausch A, Heßmann M, Hölscher A, **Schreiber T**, Bulfone-Paus S, Ehlers S, and Hölscher C. **Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8+ T cells.** *Eur J Immunol (revised)*

Aktive Teilnahme an nationalen und internationalen wissenschaftlichen Kongressen (2003-2005)

8. Symposium „Infektion und Immunabwehr“; März 2003 (Leipzig)

The immunomodulatory Role of IL-10 in M. tuberculosis-infection (Vortrag)

34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie; September 2003 (Berlin)

The immunomodulatory Role of IL-10 in M. tuberculosis-infection (Posterpräsentation)

9. Symposium „Infektion und Immunabwehr“; März 2004 (Burg Rothemfels)

IL-10 modulates granuloma necrosis in murine tuberculosis (Vortrag)

26. Arbeitstagung der Norddeutsche Immunologen; November 2004 (Borstel)

IL-10 modulates granuloma necrosis in murine tuberculosis (Vortrag)

Keystone Symposium „Tuberculosis“ April 2005 (Kanada)

IL-10 affects anti-mycobacterial immune responses through the induction of alternatively activated Macrophages (Posterpräsentation); gefördert von der

Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) und dem Verein zur Erforschung
Infektiologischer und Allergologischer Prozesse (VEIAP)

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vor noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Hamburg, Januar 2006