Abwehrmechanismen von humanen Alveolarmakrophagen bei der Tuberkulose

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Universität Konstanz (Fachbereich für Biologie)
vorgelegt von

Matthias Engele

Konstanz, im Juli 2003

Diese Doktorarbeit wurde am Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Fakultät für Medizin, im Rahmen des SFB 263 erstellt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med Steffen Stenger, der durch die hervorragende Betreuung, seine unbegrenzte Unterstützung, den konstruktiven Diskussionen und mit seinem Wissen mir mit Rat und Tat zur Seite stand, und somit wesentlich zum Erfolg der Doktorarbeit beigetragen hat.

Prof. Dr. med Martin Röllinghoff danke ich, dass er es mir ermöglichte meine Doktorarbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen und er mit Interesse und hilfreichen Diskussionen den Fortschritt der Arbeit begleitete.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Albrecht Wendel, dass er trotz der großen Distanz mit Interesse den Fortgang der Doktorarbeit begleitete und sich als Betreuer zu Verfügung stellte.

Dr. med Manfred Wagner und seinem Team in der Pulmologie des Klinikums Nord in Nürnberg danke ich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Es war stets eine große Freude nach Nürnberg zu kommen und freundliche und gut gelaunte Menschen zu treffen. Ohne diese Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Kiki und Nina gelten mein ganz spezieller Dank. Mit ihrer stets gut gelaunten Art haben sie für die gute Laune im Labor und für einen reibungslosen Laborablauf gesorgt. Sie haben mich tatkräftig im Labor unterstützt und hatten auch in privaten Angelegenheiten immer ein offenes Ohr.

Natürlich danke ich auch allen Mitgliedern aus der Arbeitsgruppe, Maike, Carola, Kay, Vivi, Frank, Christoph, Rauf, Valentina und Gabi, die mit Rat und Tat zur Seite standen, für eine gute Atmosphäre im Labor sorgten und mit denen es eine Freude war, zusammenzuarbeiten.

Danke allen anderen Mitgliedern des Instituts für ihre hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Ein ganz herzlicher Dank geht nach Gambia. Die Mitarbeiter des MRC Fajara, Prof. Keith McAdam, Dr. Roger Brooks, Dr. Philipp Hill, Dr. Dolly Jackson-Sillah, Dr. Annette Fox, Simon Donkar, Abdulrahman Hammond, Patrick Owiafe, Moses Lugos, Adama Bojang, Momodou Darboe, Sophie Gomez, Rohey Jallow haben mich sehr herzlich aufgenommen und mir eine wunderschöne Zeit mit vielen einmalig neuen und aufregenden Erlebnissen geschenkt. Es war das Highlight meiner Doktorarbeit und es hat sehr viel Spaß gemacht dort zu arbeiten und zu leben. Auch hier noch einmal, danke Steffen. Er hat mir die Möglichkeit und die Chance gegeben diese Erfahrung machen zu dürfen und er hat viel Arbeit und Mühe investiert dies zu organisieren. Großen Dank geht an die Marohn Stiftung, die diesen Aufenthalt bezahlte.

Ich danke auch meinen Eltern, ohne sie wäre die Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind veröffentlicht in:

Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, **M. Engele**, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Röllinghoff, P. L. Bölcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors, Science 291:1544-7.

Engele, M., E. Stößel, K. Castiglione, N. Schwerdtner, M. Wagner, P. Bölcskei, M. Röllinghoff, and S. Stenger. 2002. Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*, J Immunol 168:1328-37.

Stenger, S., **M. Engele**, P. L. Bölcskei, M. Röllinghoff, and M. Wagner. 2002. [Induction of Direct Antimicrobial Activity through Mammalian Toll-like Receptors], Pneumologie 56:103-7.

Weitere Veröffentlichungen:

Rauter, C., R. Oehme, I. Diterich**, M. Engele**, and T. Hartung. 2002. Distribution of clinically relevant Borrelia genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR, J Clin Microbiol 40:36-43.

Gansert, J. L., V. Kiessler, **M. Engele**, F. Wittke, M. Rollinghoff, A. M. Krensky, S. A. Porcelli, R. L. Modlin, and S. Stenger. 2003. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. J Immunol 170:3154-61.

Engele M. und S. Stenger. 2003. TNF bei der pulmonalen Immunantwort gegen *Mycobacterium tuberculosis* beim Menschen, Modern Aspects of Immunology eingereicht.

Abkürzungen

AM	Alveolarmakrophage
APC	Allophycocyanin
BAL	bronchoalveoläre Lavage
CD	cluster of differentiation
cpm	Ereignisse pro Minute
DN	doppelt- (CD4- und CD8-) negative T-Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESAT	early secreted antigenic target
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
IFNγ	Interferonγ
IL	Interleukin
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monozyten chemoattraktives Protein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
MOI	Mykobakterien pro zu infizierender Zelle
M. tuberculosis od. M.Tb.	*Mycobacterium tuberculosis*
NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
PBS	Phophat gepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PPD	purified protein derivative
RANTES	reguliert nach Aktivierung, von normalen T-Zellen exprimiert und sezerniert
PTx	Pertussis Toxin
Th	T-Helfer
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UpM	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung **1**

1.1. Die Geschichte der Tuberkulose **1**

1.2. Die Epidemiologie der Tuberkulose **1**

1.3. Die Manifestationsformen einer Tuberkulose **3**

1.4. Der Erreger der Tuberkulose: *Mycobacterium tuberculosis* **3**

1.5. Übertragung der Tuberkulose **4**

1.6. Die angeborene Immunabwehr gegen *M. tuberculosis* **5**

1.6.1. Die erste Abwehrlinie: Die Alveolarmakrophagen 5

1.6.2. Abwehrmechanismen der AM gegen *M. tuberculosis* 6

1.6.3. Der Tumor Nekrose Faktor und seine Rolle bei der Tuberkulose 7

1.6.4. Die Rolle von Chemokinen bei der Tuberkulose 8

1.6.5. Die Rolle von NK Zellen bei der Tuberkulose 9

1.6.6. Das antibakterielle Effektormolekül Granulysin 9

1.6.7. Die Erkennung mykobakterieller Liganden über Toll-like Rezeptoren (TLR) 10

1.7. Zielsetzung **13**

2. Material und Methoden **14**

2.1. Material **14**

2.1.1. Arbeitsgeräte 14

2.1.2. Arbeitsmaterial 15

2.1.3. Chemikalien 15

2.1.4. Medien und Puffer 18

2.1.4.1. Durchflusszytometrie 18

2.1.4.2. ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) 18

2.1.4.3. Zellmedien 18

2.1.4.4. Gelelektrophorese 18

2.1.5. Zytokine und Antikörper 18

2.2. Methoden **20**

2.2.1. Isolation von Zellen aus menschlichem Venenblut 20

2.2.1.1. Reagenzien für die Zellkultur 20
2.2.1.2. Isolation von AM 21
2.2.1.3. Isolation von peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMC) und Monozyten 21
2.2.2. Wachstum von *M. tuberculosis* 22
2.2.3. Infektion von AM und Monozyten mit *M. tuberculosis* 22
2.2.4. Messung der Zytokinfreisetzung 23
2.2.4.1. ELISA 23
2.2.4.2. Nachweis der biologischen Aktivität von TNF 23
2.2.5. Durchflusszytometrie 24
2.2.5.1. Färbung von Oberflächenmolekülen für die Durchflusszytometrie 24
2.2.5.2. Färbung von *M. tuberculosis* für die Durchflusszytometrie 24
2.2.5.3. Intrazelluläre Färbung von Zytokinen für die Durchflusszytometrie 24
2.2.6. Quantifizierung des mykobakteriellen Wachstums 25
2.2.7. Experimente in einem Zweikammersystem mit einer semipermeablen Membran 26
2.2.8. Chemotaxis-Experimente 26
2.2.9. Messung der Apoptose 27
2.2.10. Relative Quantifizierung der transkribierten RNS 27
2.2.10.1. Isolierung von RNS 27
2.2.10.2. Die Reverse Transkription 28
2.2.10.3. Die „Real-Time“ PCR 28
2.2.11. Statistische Analysen 29

3. Ergebnisse 30
3.1. Induktion von TNF in AM und dessen Einfluss auf das Wachstum von *M. tuberculosis* 30
3.1.1. Infektion von AM mit *M. tuberculosis* 30
3.1.2. TNF-Produktion nach Infektion mit *M. tuberculosis* 31
3.1.3. Sekretion von biologisch aktivem TNF 31
3.1.4. Analyse TNF produzierender Zellen auf Einzelzellebene 32
3.1.4.1. Intrazelluläre TNF-Färbung 32
3.1.4.2. Intrazelluläre Detektion von gefärbten *M. tuberculosis* 33
3.1.4.3. Intrazelluläre Doppelfärbung von *M. tuberculosis* und TNF 35
3.1.5. Mechanismus der TNF-Produktion in uninfizierten AM 36
3.1.6. Abhängigkeit der TNF-Produktion von der Virulenz

des Mykobakterienstammes 36
3.1.7. Zeitliche Korrelation zwischen der TNF-Produktion und dem mykobakteriellen Wachstum 39
3.1.8. Einfluss von TNF auf das Wachstum von Mykobakterien 39
3.1.9. Induktion von Apoptose durch Infektion mit *M. tuberculosis* 42

3.2. Migration von Zellen auf Überstände von *M. tuberculosis* infizierten AM 44
3.2.1. Anlockung von Leukozyten durch Überstände von infizierten AM 44
3.2.2. Migrationsverhalten von NK Zellen 45
3.2.3. Beteiligung von Chemokinrezeptoren an der Wanderung von Lymphozyten 46
3.2.4. Anlockung von NK Zellen aus der bronchoalveolären Lavage 46
3.2.5. Anlockung Granulysin-exprimierender Zellen 47
3.2.6. Migration Granulysin-exprimierender NK Zellen 48
3.2.7. Vergleich der Migration von Zellen aus Tuberkulose-Patienten und gesunden Spendern 49

3.3. Induktion antibakterieller Aktivität gegen *M. tuberculosis* durch Toll-like-Rezeptoren 54
3.3.1. Einfluss des Wachstums von *M. tuberculosis* in humanen AM durch bakterielle Lipoproteine 54
3.3.2. Identifikation des Effektormoleküls der 19 kDa Lipoprotein vermittelten antimykobakteriellen Aktivität 56
3.3.3. Regulation von TLR 2 nach Infektion von AM mit *M. tuberculosis* 57

4. Diskussion 61
4.1. Induktion von TNF in AM und dessen Einfluss auf das Wachstum von *M. tuberculosis* 61
4.1.1. Infektion von AM mit *M. tuberculosis* 61
4.1.2. TNF-Produktion durch infizierte und uninfizierte AM 61
4.1.3. Höhere TNF-Produktion durch virulente Mykobakterien als durch avirulente Bakterien 62
4.1.4. Die Rolle von TNF bei der Tuberkulose 63

4.2. Migration von Zellen auf Überstände von *M. tuberculosis* infizierten AM 65
4.2.1. Migration von humanen Zellen auf Überstände von AM 65
4.2.2. Die Bedeutung von NK Zellen bei der Tuberkulose 66

4.2.3. Vergleich der Migration von Zellen aus Tuberkulose-Patienten und deren Kontaktpersonen 67

4.3. Induktion antibakterieller Aktivität gegen *M. tuberculosis* durch Toll-like-Rezeptoren 68

4.3.1. Transkriptionelle Regulation von TLR 2 nach Infektion von AM mit *M. tuberculosis* 68

4.3.2. TLR 2-abhängige antimykobakterielle Aktivität des 19 kDa Lipoproteins 68

5. Zusammenfassung 70

6. Literatur 71

1. Einleitung

1.1. Die Geschichte der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine Erkrankung, welche die Menschheit über ihre Geschichte hinweg begleitet. Es wird spekuliert, dass die Tuberkulose seit über 15000-20000 Jahren existiert. Die ersten wissenschaftlichen Beweise für die Existenz der Tuberkulose wurden durch die Entdeckung von spezifischer mykobakterieller DNA in einer 3000 Jahre alten ägyptischen Mumie [1] und aus einer Lungenläsion einer vor 1000 Jahre spontan mumifizierten erwachsenen Südperuanerin [2] geliefert. Die Tuberkulose wurde erstmals in der griechischen Literatur erwähnt und als Phthisis bezeichnet. 460 v.Chr. identifizierte Hippokrates die Tuberkulose als die zur damaligen Zeit am häufigsten verbreitete und fast immer tödlich verlaufende Krankheit.
1865 konnte Jean-Antoin Villemin, ein französischer Militärarzt, zeigen, dass die Tuberkulose durch Injektion von Pus oder Flüssigkeit aus Tuberkuloseläsionen auf Tiere übertragen werden kann. 17 Jahre später gelang es Robert Koch, den Erreger *Mycobacterium* (*M.) tuberculosis* als das auslösende Agenz der Tuberkulose zu identifizieren. Seine Arbeiten über die Tuberkulose wurden mit dem Nobelpreis im Jahre 1905 ausgezeichnet [3]. Weitere 38 Jahre später reinigte Selman A. Wakefield Streptomycin aus *Streptomyces griseus* auf, das als erstes Antibiotikum antimykobakterielle Wirksamkeit zeigte. Die Arbeiten hierüber wurden im Jahre 1952 ebenfalls durch einen Nobelpreis ausgezeichnet.

1.2. Die Epidemiologie der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine weltweit vorkommende Erkrankung. Sie ist die häufigste Todesursache, die durch eine bakterielle Infektionskrankheit ausgelöst wird und die acht häufigste Todesursache überhaupt. Von der WHO wird geschätzt, dass ungefähr ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Erreger infiziert ist, wobei sich 80% der Fälle auf nur 22 Länder der Erde verteilen (**Abb. 1**). Jährlich erkranken 8,7 Millionen Menschen an der Tuberkulose und 2 Millionen Menschen sterben weltweit

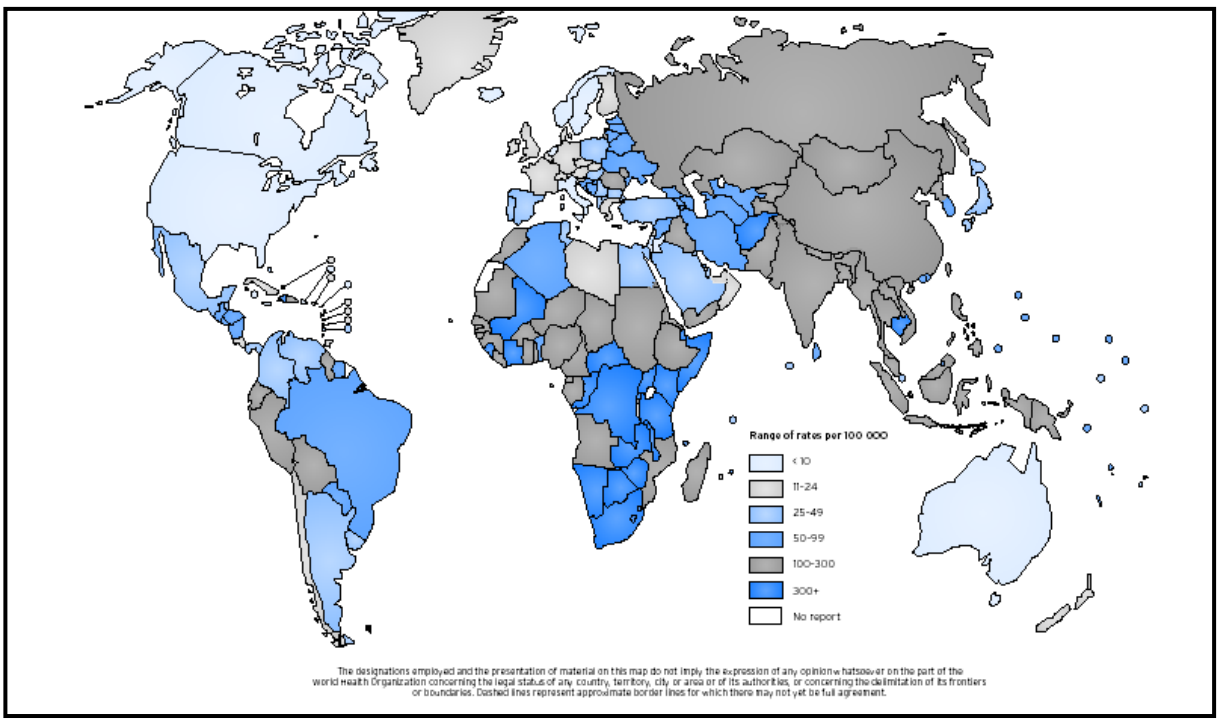


Abb. 1: Geschätzte Inzidenzraten der Tuberkulose 2001 weltweit (Quelle: WHO Report 2003)

daran [4, 5]. Davon entfallen 95% der Infektionen und 98% der Todesfälle auf die Entwicklungsländer. Für das Jahr 2005 werden 10 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr erwartet. 1950 wurden 123.000 neue Tuberkuloseinfektionen in Deutschland registriert. Während der letzten 51 Jahre ist die Anzahl der Neuerkrankungen auf weniger als 10.000 pro Jahr gesunken. 2002 wurden noch 7.723 Neuerkrankungen gemeldet. Dies entspricht einer Inzidenz von 9,4 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner [6]. Der Rückgang der Neuerkrankungen in Deutschland ist auf eine verbesserte Ernährung, Veränderung in der Sozialstruktur und die Verfügbarkeit hochwirksamer Medikamente zurückzuführen.

Obwohl die Tuberkulose eine heilbare Erkrankung ist, wird global gesehen ein Anstieg in der Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr prognostiziert. Dies liegt zum einen am Auftreten von HIV-Infektionen und der daraus resultierenden Immunschwäche der Infizierten, sowie der Bildung von Resistenzen der Erreger gegenüber einem oder mehreren Antibiotika. Die Therapie ist teuer, langwierig und Bedarf Disziplin bei der Einnahme der Medikamente. Zur Heilung der Tuberkulose wird für die ersten zwei Monate die Kombination aus Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol verabreicht. Für weitere vier Monate müssen dann noch Isoniazid und Rifampicin eingenommen werden [7].

Bis heute ist noch keine effektive Immunisierung möglich, die einen Ausbruch der

Krankheit verhindert. Die Verwendung des attenuierten Lebendimpfstoffes *M. bovis Bacille Calmette-Guerin* (*BCG*), hervorgegangen aus *M. bovis* und entdeckt durch Calmette und Guerin 1908, bietet nur unzuverlässigen Impfschutz. Er verhindert weder eine Infektion noch eine Erkrankung, reduziert aber das Risiko eines schweren Krankheitsverlaufs im Kindesalter. 1999 wurde diese Impfung in Deutschland aus der Liste der empfohlenen Vakzinierungen genommen, da sie gravierende Nachteile hat. So handelt es sich um einen Lebendimpfstoff, der bei immundefizienten Menschen zu Erkrankungen führen kann. Außerdem kommt es zur Tuberkulinkonversion, wodurch die Tuberkulosediagnostik erschwert wird.

1.3. Die Manifestationsformen einer Tuberkulose

Nur 5-10% der Menschen, die Kontakt mit dem Erreger der Tuberkulose (*M. tuberculosis*) hatten, werden in ihrem Leben an der Tuberkulose erkranken [8]. Die Lunge des Menschen ist die “Eintrittspforte” für den Erreger. Da die Bakterien inhaliert werden, ist die Lunge der häufigste Ort einer Infektion. In über 80% der Fälle ist die Lunge betroffen. Aber auch andere Organe können von *M. tuberculosis* befallen werden. In 8% der Tuberkulosefälle sind die Lymphknoten, in 4% ist die Pleura, in 3% ist der Urogenitaltrakt, in 2% sind die Knochen und Gelenke und in 1% sind die Meningen betroffen [7].

1.4. Der Erreger der Tuberkulose: *Mycobacterium* (*M.) tuberculosis*

Der Erreger der Tuberkulose ist *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* gehört zur Familie der Mycobacteriaceae und dem Genus Mycobacterium. Das Genus Mycobacterium enthält zahlreiche Arten, wobei die Erreger der klassischen Tuberkulose aufgrund genetischer und biochemischer Gemeinsamkeiten zum *M. tuberculosis*-Komplex zusammengefasst werden. Zu diesem zählen *M. tuberculosis* und seine Varianten wie *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* und *M. canetti*.

Mykobakterien sind 0.4 μm breite und 3-4 μm lange, aerob wachsende,

stäbchenförmige Bakterien (**Abb. 2**). Sie besitzen eine lipidreiche, säurefeste Zellwand, d.h. einmal angefärbte Bakterien lassen sich nicht mehr durch sauren (HCl) Alkohol entfärben. Diese Eigenschaft wird für diagnostische Zwecke ausgenützt, da sie für Mykobakterien spezifisch ist. Die Generationszeit von *M. tuberculosis* beträgt 16-24 Std. Wegen dieses langsamen Wachstums ist die Tuberkulose eine langsam fortschreitende Erkrankung. Mykobakterien besitzen keine Virulenzfaktoren oder Exotoxine [9, 10].

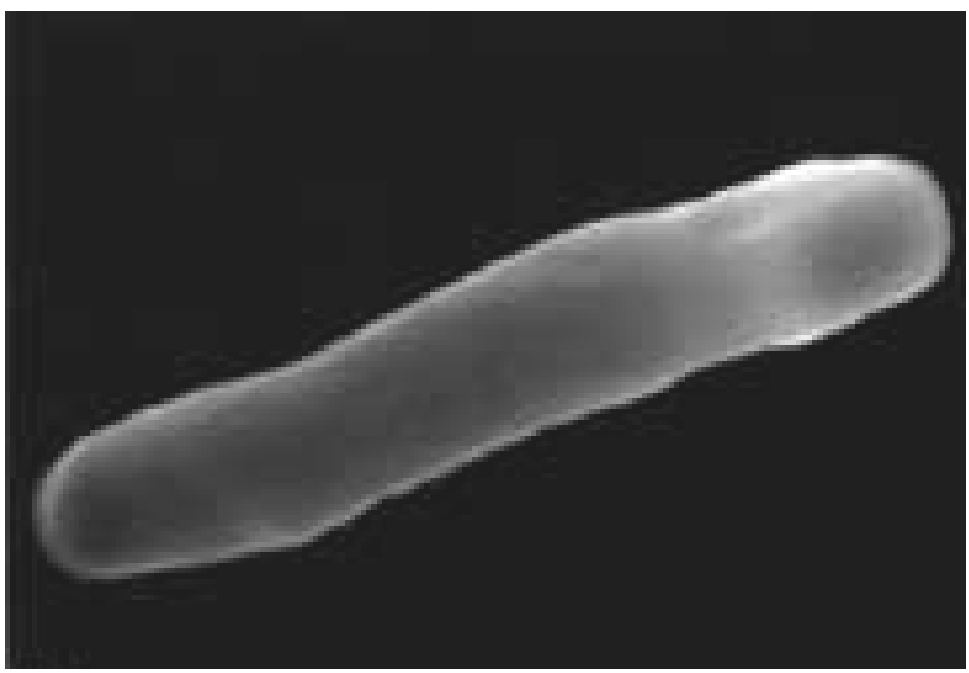


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *M. tuberculosis* [11]

1.5. Übertragung der Tuberkulose

Die Tuberkulose wird durch Tröpfcheninfektion übertragen. Die Erreger gelangen durch den Ausstoß *M. tuberculosis*-haltiger Aerosole beim Husten, Niesen oder Sprechen eines Patienten mit offener Tuberkulose in die Umwelt. Diese Partikel sind 1-5 µm groß. Eine Infektion findet statt, wenn eine empfängliche Person diese Aerosole inhaliert. Mit dem Atemstrom gelangen diese Aerosole in die Alveolen. Es wird vermutet, dass nur die Bakterien, die auch die Alveolen erreichen, eine Infektion auslösen können. Dort treffen sie auf die in der Lunge häufigste Zellpopulation, die Alveolarmakrophagen (AM) [12].

1.6. Die angeborene Immunabwehr gegen *M. tuberculosis*

Die angeborene Immunabwehr ist ein evolutionär altes Abwehrsystem. Durch sofort verfügbare Abwehrmechanismen schützt sie den Wirt vor einer Vielzahl von Erregern, unter anderem auch vor dem intrazellulären Erreger *M. tuberculosis*. Aufgaben der angeborenen Immunabwehr sind erstens die Phagozytose und Prozessierung von Mikroorganismen, zweitens Effektormechanismen zu induzieren, die den Erreger zerstören (z.B. Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF oder reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Radikalen) und drittens die Anlockung und Aktivierung von Zellen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr (Sekretion von Chemokinen). Auf die einzelnen Phasen der angeborenen Immunabwehr soll im Folgenden näher eingegangen werden.

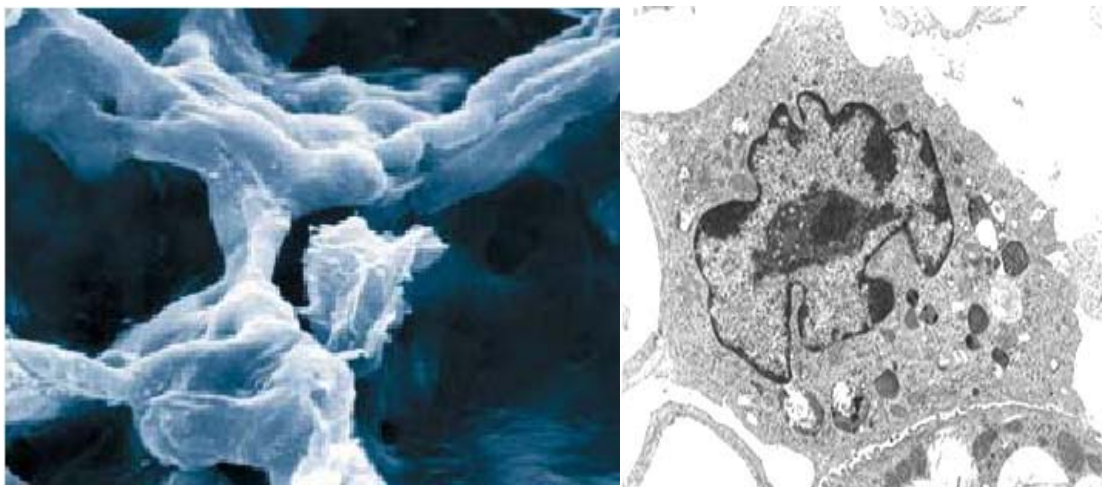
1.6.1. Die erste Abwehrlinie: Die Alveolarmakrophagen (AM)

Die AM sitzen auf der epithelialen Oberfläche der Atemwege und in den Alveolen. Im unteren Respirationstrakt sind die meisten AM zu finden. Die absolute Anzahl an AM in der menschlichen Lunge wird auf 15-30 x 10^9 geschätzt, wobei 50-100 AM pro Alveole vorhanden sind.

AM werden aus bronchoalveoläre Lavagen (BALs) isoliert. Eine BAL ist eine Methode zur Gewinnung löslicher und zellulärer Bestandteile aus dem Alveolarsystem. Sie wird aus diagnostischen (Diagnostik pulmonaler Infektionen und Lungengerüsterkrankungen, Beurteilung entzündlicher Erkrankungen, Abklärung röntgenologischer Befunde) und therapeutischen (Alveolarproteinose, Sekretverhalt bei Asthma bronchiale) Gründen durchgeführt. Dazu werden die Patienten sediert, bronchodilatiert und lokal anästhesiert. Über Mund oder Nase wird das Bronchoskop in die Lunge eingeführt, bis das Endoskop die Bronchien verschließt. Es wird dann, in kleinen Portionen, insgesamt 100-300 ml isotone Kochsalzlösung instilliert und vorsichtig aspiriert. Die Spülflüssigkeit, etwa 50-70% des Ausgangsvolumens, wird zur Zytodiagnostik und für die mikrobiologische Diagnostik verwendet.

In einer BAL machen die AM 85-95% der Zellen aus. Sie sind 15-50 μm groß, stark granuliert und besitzen ein Zytoplasma zu Kernverhältnis von 3:1 (**Abb. 3**). Die AM setzen sich täglich mit vielen Antigenen, Pathogenen und Toxinen aus der Umwelt

auseinander und bieten entscheidenden Schutz vor diesen humanpathogenen Agenzien. Sie treten als erste Abwehrlinie des angeborenen Immunsystems auf [13-15].



mensch+umwelt spezial 15. Ausgabe 2002 http://zellbio.ana.uni-heidelberg.de/ELMI/HTML/a3-gross.html

Abb. 3: Rasterelektronenmikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahme von AM

1.6.2. Abwehrmechanismen der AM gegen *M. tuberculosis*

Die Rolle der AM bei der angeborenen Immunabwehr gegen *M. tuberculosis* ist vielfältig. AM gehören zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen und besitzen eine hohe Zytotoxizität gegen Bakterien. In ihren Granula sind zytotoxische Effektormoleküle wie z.B. saure Phosphatasen, Kathepsine, Lysozyme, β-Glucuronidasen, β-Galaktosidasen, Arylsulfatasen, saure Ribonukleasen und Phospholipasen gespeichert [13, 14]. Sie produzieren reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale, welche direkte antimikrobielle Aktivität besitzen [16-18], sowie Abbauprodukte der Arachidonsäure [19].

AM produzieren, nach Infektion mit *M. tuberculosis* Chemokine (RANTES, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β und IL-8), die T-Zellen an den Ort der Infektion locken [20, 21]. Durch die Produktion von IL-12 und IL-18 werden die an den Ort der Infektion gelockten T-Zellen zu Th1 T-Zellen differenziert [22, 23]. Die Sekretion von Zytokinen (TNF, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF), IL-1 und IL-6) führt zur Aktivierung der T-Zellen und Makrophagen am Infektionsherd [24]. Um

immunpathologische Reaktionen zu vermeiden, müssen die aktivierten Zellen nach erfolgreicher Elimination des Erregers deaktiviert werden. Dazu können Transformierender Wachstumsfaktor (TGF)β [25-27] und IL-10 [28, 29] produziert werden.

1.6.3. Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) und seine Rolle bei der Tuberkulose

Nach Aufnahme von mikrobiellen Antigenen kommt es zur Freisetzung einer komplexen Mischung von Zytokinen, darunter auch TNF. TNF wird primär von Makrophagen produziert, kann aber auch von Lymphozyten und NK Zellen gebildet werden. TNF, ein 18 kDa großes Protein, welches als membrangebundenes oder lösliches Molekül vorkommt, löst seine Wirkungen durch Bindung als Trimer an einen 55 kDa TNF Rezeptor (TNFR)1 oder einen 75 kDa TNFR 2 aus.

Bei der Maus führt TNF zur Aktivierung der infizierten Makrophagen und damit zu einem direkten Abtöten der Mykobakterien [30]. Zusätzlich kann TNF zur Apoptose der infizierten Zellen sowie möglicherweise zum Freisetzen der Mykobakterien führen. Diese können durch frisch aus dem peripheren Blut rekrutierte Monozyten aufgenommen und abgetötet werden [31]. Durch das Zusammenspiel von TNF und IFNγ werden antibakterielle Moleküle, wie Sauerstoff- und Stickstoffoxid-Radikale, produziert [32]. Zusätzlich verstärkt TNF die Wirkung von Chemokinen, wodurch Makrophagen und Lymphozyten in die Lunge gelockt werden. Dadurch ist TNF maßgeblich an der Entstehung der Granulome beteiligt [33]. Entsprechend bleibt in TNF-defizienten Mäusen die Formierung von Granulomen aus und es kommt zu einer progredienten Disseminierung der Bakterien [34].

Zum einen induziert TNF Nekrose und kann dadurch zur Gewebeschädigung führen. Zum anderen kann es in Abwesenheit von TNF (z.B. bei anti-TNF behandelten Patienten mit rheumatoider Arthritis) zum Aufbrechen von Granulomen und der Reaktivierung einer latenten Tuberkulose kommen [35]. Im Gegensatz zur Tuberkulose bei der Maus aktiviert TNF auch in Kombination mit IFNγ keine antibakterielle Abwehr in humanen Monozyten [36-38]. Es ist noch unklar, welchen direkten Einfluss TNF auf das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* in AM hat und war daher Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit.

1.6.4. Die Rolle von Chemokinen bei der Tuberkulose

Eine weitere Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist es, Monozyten und Zellen der adaptiven Immunabwehr, T-Zellen, an den Infektionsherd zu locken. Dies wird durch die Sekretion von Chemokinen gewährleistet.

Chemokine sind kleine, Heparin-bindende Moleküle, die ihre Wirkung durch Bindung an einen siebenfach transmembran-gelagerten, heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptor auslösen. Je nach Ligandenspezifität werden diese Rezeptoren in vier Klassen eingeteilt: CR, CCR, CXCR und CX_3CR. Es sind über 40 verschiedene Liganden bekannt, die man in vier Gruppen einteilt. Die Unterteilung erfolgt über die relative Anordnung von Cysteinen. So gibt es die C (γ-), CC (β-), CXC (α-) und die CX_3C (δ-) Chemokine. Zu den C Chemokinen gehören Lymphotactin und SCM-1β, zu den CC Chemokinen gehören unter anderem RANTES, MCP-1, MIP-1α und MIP-1β, zu den CXC Chemokinen gehört unter anderem IL-8 und zu den CX_3C Chemokinen gehört als einziges Mitglied Fractalkin [39, 40].

Chemokine spielen eine zentrale Rolle bei der Tuberkulose. So konnte in der BAL von Tuberkulose-Patienten erhöhte IL-8-, MCP-1- und RANTES-Konzentrationen gefunden werden [20]. Nach Infektion von Makrophagen mit *M. tuberculosis* in *vitro* wurden RANTES, MCP-1 und MIP-1α induziert. Diese Chemokine wurden auch in den Alveolen während einer aktiven Lungentuberkulose gefunden [21]. Analysen von 375 Genen mittels DNA-Chip Microarray zeigte, dass nach Infektion von Makrophagen mit *M. tuberculosis* die mRNS für IL-8, RANTES, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, u.v.a. hochreguliert wurden [41]. Eine Infektion von AM mit Mykobakterien führt zur Freisetzung der β-Chemokine RANTES, MIP-1α und MIP-1β. Die Sekretion der Chemokine ist teilweise von der TNF-Produktion abhängig. Erste Befunde deuten darauf hin, dass RANTES und MIP-1β das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* supremieren [42].

Demzufolge werden Chemokine nach einer Infektion mit Mykobakterien freigesetzt und spielen wahrscheinlich eine Rolle beim Schutz vor der Tuberkulose. Doch es ist noch nicht verstanden, welche Zellen durch infizierte AM angelockt werden, ob diese am Aufbau der Granulome beteiligt sind und ob diese Zellen antimikrobielle Effektormechanismen ausüben können. Diese Fragen sollten in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht werden.

1.6.5. Die Rolle von NK Zellen bei der Tuberkulose

NK Zellen repräsentieren eine aus dem Knochenmark gereifte Lymphozytensubpopulation. Sie entwickeln sich mit den T-Zellen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle. Im Gegensatz zu T- und B-Zellen ist bei den NK Zellen die Differenzierung und Funktion unabhängig von einer Genrearrangierung. Die NK Zellen machen bis zu 20% der peripheren Blutlymphozyten aus. Phänotypisch sind 90% der NK Zellen CD3 negativ (CD3 ist ein T-Zellrezeptor assoziiertes Molekül), CD16 positiv (der niedrig-affine Rezeptor für den Fc-Teil von IgG) und CD56 positiv (neurales Zelladhäsionsmolekül auf NK Zellen). Diese Zellen werden auch als „large granular lymphocytes“ bezeichnet, da sie sich durch große, azurophile Granula auszeichnen. Funktionell sind die NK Zellen dadurch charakterisiert, dass sie MHC-unabhängig ohne vorherige Aktivierung Tumorzellen lysieren können. Tumorzellen regulieren MHC I-Moleküle herunter, was durch die NK Zellen erkannt wird und diese zur Lyse der Tumorzelle veranlasst. Eine weitere Funktion der NK Zellen bei der Immunabwehr ist die Produktion von löslichen Botenstoffen. Nach Stimulation produzieren NK Zellen Zytokine wie Interferon (IFN)γ, TNF und GM-CSF sowie Chemokine, z.B. RANTES, MIP-1α und MIP-1β. Diese sezernierten Proteine induzieren eine inflammatorische Antwort und modulieren die Immunantwort [43-45].

1.6.6. Das antibakterielle Effektormolekül Granulysin

Granulysin wurde 1987 erstmals als granuläres Protein in T-Zellen und NK Zellen beschrieben. Es gehört zur saposin-like-protein-Familie (SAPLIP) [46-49]. Granulysin kommt in zwei verschiedenen Formen vor, einer 15 kDa inaktiven Vorläuferform und einer 9 kDa aktiven Form [50]. Es besitzt antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Parasiten und Pilze [11]. Granulysin ist aus fünf α-Helices mit überwiegend positiv geladenen Aminosäuren aufgebaut. Diese interagieren direkt mit der negativ geladenen Bakterienwand und können so in die Zellwand integrieren. Die dadurch entstandene Permeabilitätserhöhung führt zu einem Verlust der Integrität der Bakterienzellwand und endet mit einem osmotischen Platzen des Erregers [51]. Granulysin kann seine Wirkung jedoch nur dann entfalten, wenn es direkten Zugang zum Erreger hat. So muß erst Perforin eine Pore in der infizierten Zelle bilden um dann Granulysin den Zugang zum intrazellulären Pathogen gewähren zu können

[11].

Auch bei der Tuberkulose ist Granulysin von Bedeutung. CD8-positive T-Zellen hemmen das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* Granula-abhängig [11, 52]. So scheint Granulysin ein Molekül mit zentraler Bedeutung bei der Abtötung von *M. tuberculosis* zu sein.

1.6.7. Die Erkennung mykobakterieller Liganden über Toll-like Rezeptoren (TLR)

Das evolutionär konservierte System der Erkennung von mikrobiellen Antigenen aus Drosophila kommt im Menschen in Form der TLR vor. An diese Rezeptoren können mikrobielle Liganden binden, die von unterschiedlichen Pathogenen geteilt werden. Zu ihnen zählen unter anderem Lipoproteine von Bakterien und Parasiten (z.B. 19 kDa Lipoprotein von *M. tuberculosis*), Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von Gram-positiven Bakterien, doppelsträngige RNS von Viren, LPS von Gram-negativen Bakterien, Flagellin und CpG-DNS von Bakterien. Die Erkennung dieser Liganden wird durch konservierte, nicht klonale, Keimbahn-kodierte Rezeptoren der Wirtszelle, gewährleistet. Es sind mittlerweile die Rezeptoren TLR 1-10 bekannt. Bisher bekannte Liganden-Rezeptor Interaktionen sind Lipoproteine, Peptidoglycan und Lipoteichonsäure, die durch TLR 2, doppelsträngige RNS, die durch TLR 3, LPS, das durch TLR 4, Flagellin, das durch TLR 5 und CpG-DNS, welche durch TLR 9 erkannt werden (**Abb. 4**).

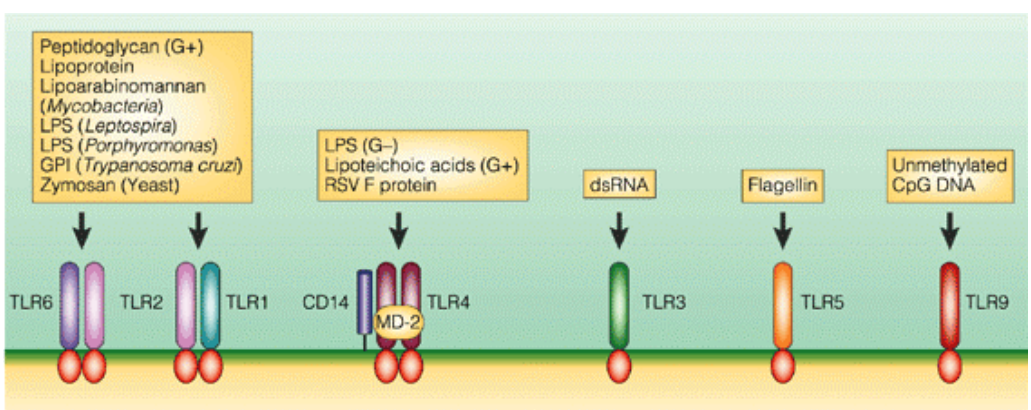


Abb. 4: Liganden der TLR [53]

TLR sind Typ I Transmembranproteine mit einer Leucin-reichen extrazellulären Domäne und einer dem IL-1 Rezeptor ähnlichen Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)

intrazellulären Domäne. Nach Bindung des Liganden an den TLR kommt es zur Bindung von MyD88 an TIR. MyD88 rekrutiert über seine aminoterminale Todesdomäne IL-1 Rezeptor aktivierte Kinase (IRAK) und es kommt zur Bildung eines Signalkomplexes an TIR. IRAK, eine Serin-Threonin Kinase, autophosphoryliert und bindet an TNF Rezeptor-assoziierter Faktor (TRAF) 6. Dieses Adaptermolekül ist u.a. für die Nukleus Faktor (NF)κB Aktivierung notwendig. NFκB transloziert, nach der Abspaltung von IκB und der Dimerisierung, in den Kern und initiiert die Transkription verschiedener Gene (**Abb. 5**). Es kommt zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen, z.B. TNF und IL-1, von Zytokinen, die für eine Differenzierung von T-Zellen in eine Th1-Antwort notwendig sind, z.B. IL-12 und IL-18, und von zytotoxischen Effektormlekülen, z.B. Stickoxid-Radikalen (NO) und anderen antimikrobiellen Proteinen [53, 54].

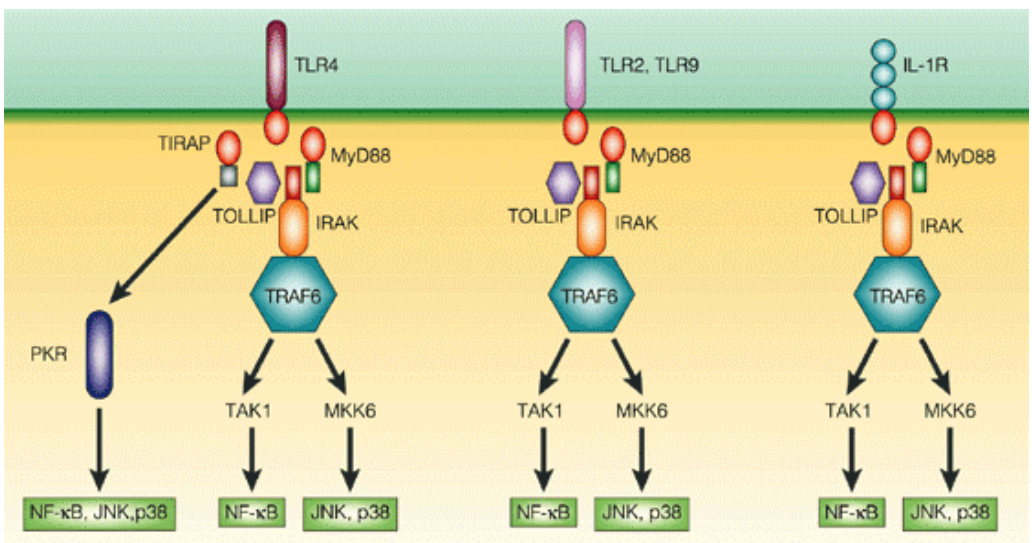


Abb. 5: Signaltransduktionskaskade der TLR [53]

Eine effiziente Immunabwehr gegen *M. tuberculosis* ist abhängig von der schnellen Erkennung des Pathogens durch das angeborene Immunsystem und der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Aufgereinigte mykobakterielle Liganden (19 kDa Lipoprotein, Lipoarabinomannan, Phosphatidylinositolmannan) interagieren bevorzugt mit TLR 2. Eine Infektion mit dem kompletten Mykobakterium führt zu einem komplexeren Aktivierungsmuster. Dabei sind v.a. TLR 2 und TLR 4 von Bedeutung, welche antibakterielle Effektorfunktionen induzieren. Der mykobakterielle Ligand für TLR 4 ist noch nicht bekannt. Es existieren Hinweise, dass die mykobakteriellen Liganden sezerniert werden können [55-57], die dann auf

umliegende uninfizierte Zellen einwirken. Es gibt erste Hinweise, dass Mykobakterien die Expression von TLR an der Zelloberfläche modulieren. Eine Infektion von murinen Makrophagen mit *M. avium* führt zur Herunterregulation von TLR 4- und zur Hochregulation von TLR 2-mRNS. Lipopeptide führen TLR-abhängig zur Reifung von dendritischen Zellen und somit zur Induktion einer Immunantwort. Bakterielle Lipoproteine können TLR 2-abhängig Apoptose in den infizierten Zellen induzieren. Die in den apoptotischen Körperchen enthaltenen Bakterien können durch frische Phagozyten aufgenommen werden. Durch TLR 2-Liganden wird die Freisetzung von IL-12 induziert, welches zur Differenzierung von T-Zellen zu Th1-Zellen führt. Es kommt aber auch zur Induktion antibakterieller Effektormoleküle wie z.B. NO in der Maus. Im Gegensatz zu diesen aktivierenden Mechanismen kann andererseits eine Bindung von 19 kDa Lipoprotein an seinen TLR zu einer Herunterregulation von MHC II führen. Zusammengefasst führt die TLR-Signaltransduktion zur Induktion einer Th1-Antwort, zur Reifung von dendritischen Zellen und zur antimykobakteriellen Aktivität [58].

Die TLR besitzen eine wichtige Rolle bei der Initiation einer Immunantwort gegen Mykobakterien und stellen eine direkte Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr dar. Somit bieten sie ein attraktives Feld für präventive und therapeutische Interventionsstrategien. Doch die Regulation von TLR 2 im Menschen, sowie die Induktion möglicher antibakterieller Effektormechanismen sind noch wenig untersucht.

1.7. Zielsetzung

Die Tuberkulose ist die weltweit häufigste Todesursache durch eine bakterielle Infektion. Vor allem in den Entwicklungsländern stellt sie eine große Bedrohung dar. AIDS, die Zunahme multiresistenter Stämme, sowie die globale Zusammenführung der Menschen tragen zur Ausbreitung der Tuberkulose bei, die auch für die Industrienationen eine Gefahr bedeutet. Eine effektive Impfung steht bisher noch nicht zur Verfügung. Deshalb ist das Verständnis über die Immunabwehr bei der Tuberkulose von großer Bedeutung. Nach Inhalation der Erreger kommt es durch das Wechselspiel zwischen angeborener und erworbener Immunantwort zur Ausbildung von Granulomen, die eine Ausbreitung der Erreger verhindern. Diese Granulome persistieren lebenslang als aktive immunologische Zentren, in denen es essentiell ist die Balance zwischen Pathogen und Immunabwehr zu wahren. Über die Mediatoren, die diese Interaktion steuern, ist nur wenig bekannt. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher Chemokine und Zytokine zu identifizieren, welche die Einwanderung von Lymphozyten an den Ort der Infektion induzieren. Außerdem untersuchten wir antibakterielle Effektormechanismen in humanen Alveolarmakrophagen, welche die zentrale Rolle für die Kontrolle des mykobakteriellen Wachstums in der Lunge einnehmen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Arbeitsgeräte

• Beta-Counter	Berthold, München
• ELISA-Reader Dynatech MR5000	Dynatech Laboratories, Chantilly, NA, USA
• FACScalibur Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
• Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
• Gene Quant II Photometer	Pharmacia Biotech, 80-2105-58, Freiburg
• GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Foster City, CA
• Inkubator BB 6220	Heraeus, Hanau
• Invers-Mikroskop	Zeiss, 471202-9901
• Laminair-Werkbank HLB 5472	Heraeus
• LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
• Microflow-Werkbank	Nunc, Wiesbaden
• Power Pac 300	BioRad, 283BR07684, München
• Sicherheitswerkbank Modell 51424/5	MDH Limited, Hampshire, UK
• Thermomix B	B. Braun, Melsungen
• Ultraschallwasserbad	Elma, Singen
• Wasserbad Julabo 12B	B. Braun
• Zellkulturinkubator	Heraeus, 51007484
• Zentrifuge 5417R	Eppendorf, 5407000.015, Hamburg
• Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus

2.1.2. Arbeitsmaterial

• Chemo Tx 96-Loch, 3 µm	Receptor Technologies, 106-3, Oxon, UK
• Einmalfilter, 0,2 µm	Schleicher & Schüll, 443401, Dassel
• Einmalspritzen	BD Biosciences, 2004-02
• ELISA-Platten, 96-Loch, Flachboden	Nunc, 430341
• Zellkulturplatten 24-Loch	Greiner, 662160, Nürtingen
• Zellkulturplatten 6-Loch	Corning, 3506, Cambridge, MA
• Zellkulturplatten 96-Loch	Nunc, 13970
• Hermetikbecher	Kendro, 70098863, Hanau
• Kulturflaschen für Mykobakterienkultur	Corning, 430195
• LightCycler Kapillaren	Roche Diagnostics, 1909339
• LightCycler Zentrifugenadapter	Roche Diagnostics, 1909312
• Permanox 8-Loch-Objektträger	Nunc, 177445
• Schraubröhrchen, 1,5 ml	Bioscience, 15590, Salt Lake City
• Schraubröhrchen, 15 ml	Sarstedt, 62.554.502, Nümbrecht
• Schraubröhrchen, 50 ml	Sarstedt, 62.547.254
• Transwell-Platten 6-Loch, 0,4 µm	Costar, 3412
• Zellkulturflaschen	Nunc, 156502
• Zellschaber	Costar, 3010
• Zellsieb, 40 µm	BD Biosciences, 2340

2.1.3. Chemikalien

• [^{3}H]-Uracil	Amersham Biosciences, TRK 408
• Agarose	Gibco, 540-5510UA, Karlsruhe
• Aktinomycin D	Sigma, A-9415, Taufkirchen
• Amphotericin B	Sigma, A-9528

• Aquatex-Eindeckmedium	Merck, 1.08562
• Auramin-Rhodamin	Merck, 1.09093, Darmstadt
• BacLight	Molecular Probes, L-13152, Leiden, NL
• β-Mercaptoethanol	Sigma, M-3148
• Borsäure	Sigma, B-7901
• bovines Serum Albumin	Sigma, A-2153
• Brefeldin A	Sigma, F-7524
• Bromphenolblau	Sigma, B-3269
• $CaCl_2$	Sigma, C-3881
• Calibrite Beads	BD Biosciences, 340486
• Cell Death Detection ELISA Plus	Roche Diagnostics, 1774425
• Diethyl-Pyrocarbonat	Fluka, 32490, Taufkirchen
• Dimethylsulfoxid	Sigma, D-5879
• DNA-free Kit	Ambion, 1906, Huntingdon, UK
• dNTP	PE Applied Biosystem, G 0141
• dNTP	Amersham Biosciences, 27203501, Freiburg
• Ethanol	Merck, 1.00986.100
• Ethidiumbromid	Roth, 2218.1, Karlsruhe
• Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma, E-6511
• Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, 17144002
• Formaldehyd	Roth, 4979.1
• Fötales Kälberserum	Sigma, F-7524
• Gene Ruler 100 bp DNA-Ladder Plus	MBI Fermentas, SM 0321, Vilnius, Lithuania
• Glycerol	Roth, 4043.1
• Hepes	Roth, 9105.3
• Isopropanol	Roth, 6752.2
• Latexkügelchen	Molecular Probes, F-8827
• L-Glutamin	Seromed, K2082, Berlin
• Lipopolysaccharid	Sigma, L-2630

• *M. bovis*	Klinische Mikrobiologie
• *M. tuberculosis*	Klinische Mikrobiologie, Erlangen
• Methanol (95%)	Roth, 4627.1
• Methylthiazoltetrazolium	Sigma, M-5655
• $MgCl_2$	Roth, 2189
• Middlebrook 7H9 Medium	BD Biosciences, 11417
• Middlebrook OADC	BD Biosciences, 4311422
• Natriumazid (NaN_3)	Roth, K305.1
• Natriumchlorid	Sigma, S-7653
• Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Roth, 2326.1
• Natriumhydrogencarbonat	Merck, 6329.1
• Oligo$(dT)_{12-18}$-Primer	Gibco, 18064014
• Paraformaldehyd	Sigma, P-6148
• PBS	Biochrom, L182-10, Berlin
• Penicillin	Seromed, A322145
• Platinum-Taq	Invitrogen, 10966-031, Karlsruhe
• Primer	TIB MolBiol, Berlin
• RNeasy MiniKit	Qiagen, 74104, Hilden
• RPMI 1640 Pulver	Seromed, T12105
• Salzsäure	Roth, 4625.1
• Saponin	Sigma, S-2149
• Schwefelsäure	Roth, 9316.1
• StrepAB-Komplex/HRP	DAKO, K0377, Hamburg
• Superskript II	Gibco, 18064014
• SYBR Green	Roche Diagnostics, 1988131
• Taq-Polymerase	Gibco, 10342012
• Taq-Puffer	Gibco, YO2028
• TMB Substrat Lösung	Endogen, N-301, Woburn, MA
• Tris	Roth, 4855.1
• Trypanblau	Biochrom, L6323
• Tween 20	Sigma, P-2287

- Tween 80 Sigma, P-4780

2.1.4. Medien und Puffer

2.1.4.1. Durchflusszytometrie

- FACS-Puffer: PBS, 2% FCS, 1% NaN_3
- Permeabilisierungspuffer: PBS, 2% FCS, 0,5% Saponin

2.1.4.2. ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay)

- Coating Puffer: PBS
- Inkubationspuffer: PBS, 2% BSA
- Waschpuffer: 50 mM Tris, 0,1% Albumin, 0,2% Tween 20
- Stoplösung: 0,18 M H_2SO_4

2.1.4.3. Zellmedien

- Komplettes Medium: RPMI 1640, 60 µg/ml Penicillin, 5,6 µg/ml Amphotericin B, 10 mM Hepes, 13 mM Natriumhydrogencarbonat, 2 mM L-Glutamin
- Zellkultur-Medium: Komplettes Medium, 10% FCS bzw. Humanserum
- Chemotaxis-Medium: Komplettes Medium, 10% FCS, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,9 mM $CaCl_2$

2.1.4.4. Gelelektrophorese

- 10x TBE-Puffer: für 1l: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 0,5 M EDTA (pH = 8,0)
  Gebrauchslösung: 0,5x

2.1.5. Zytokine und Antikörper

- Annexin V - PE BD Biosciences, 556422

• anti-hu-CCR 1, Maus IgG 2b - PE	R&D Systems, FAB145P, Wiesbaden
• anti-hu-CCR 3, Ratte IgG 2a - FITC	R&D Systems, FAB155F
• anti-hu-CCR 4, Maus IgG 1 - PE	BD Biosciences, 551120
• anti-hu-CCR 5, Maus IgG 2a - PE	BD Biosciences, 556042
• anti-hu-CCR 7, Maus IgM	BD Biosciences, 550937
• anti-hu-CD1a, Maus IgG 2a - FITC	Serotec, MCA 80F, Düsseldorf
• anti-hu-CD14, Maus IgG 1 - PE	Caltag, MHCD1404, Hamburg
• anti-hu-CD19, Maus IgG 1 - APC	BD Biosciences, 345791
• anti-hu-CD3, Maus IgG 1 - PE	BD Biosciences, 630105
• anti-hu-CD3, Maus IgG 2a - PE	Caltag, MHCD0304
• anti-hu-CD3, Maus IgG 1 - PerCP	BD Biosciences, 347344
• anti-hu-CD4, Maus IgG 1 - FITC	BD Biosciences, 347324
• anti-hu-CD4, Maus IgG 2a - FITC	Caltag, MHCD0401
• anti-hu-CD4, Maus IgG 1 - PerCP	BD Biosciences, 347324
• anti-hu-CD56, Maus IgG 1 - APC	BD Biosciences, 555518
• anti-hu-CD66, Maus IgG 1 - FITC	Immunotech, 0531, Marseille, F
• anti-hu-CD8, Maus IgG 1 - APC	BD Biosciences, 345775
• anti-hu-CD8, Maus IgG 2a - PE	Caltag, MHCD0804
• anti-hu-HLA-DR, Maus IgG 2a - FITC	BD Biosciences, 555811
• anti-hu-HLA-DR, Maus IgG 2a - PerCP	BD Biosciences, 347364
• anti-hu-IL-1β, Maus IgG 2b	R&D Systems, M-421B-E
• anti-hu-IL-1β, Maus IgG 1 - biot.	R&D Systems, ILB1-H6
• anti-hu-IL-10, Maus IgG	Endogen, M-010-A
• anti-hu-IL-10, Maus IgG - biot.	Endogen, M-011-B
• anti-hu-IL-12, Maus IgG 1	R&D Systems, MAB 609
• anti-hu-IL-12, Ziege IgG 1 - biot.	R&D Systems, BAF 219
• anti-hu-TNF, IgG 1 - APC	BD Biosciences, 554514
• anti-hu-TNF, Maus IgG 1	Endogen, M-303
• anti-hu-TNF, Maus IgG 1 - biot.	Endogen,M-302-B
• Esel-anti-Kaninchen - FITC	Dianova, 711096152
• DH 4, monoklonal	Krensky, A.M.; Stanford University, Palo Alto, CA
• Maus IgG 1 - APC	Caltag, MG 105

• Maus IgG 1 - FITC	Caltag, MG 101
• Maus IgG 1 - PE	Caltag, MG 104
• Maus IgG 1 - PerCP	BD Biosciences, 345817
• Maus IgG 2a - FITC	Caltag, MG 2a01
• Maus IgG 2a - PE	Caltag, MG 2a04
• Maus IgG 2b - PE	Caltag, MG 2b04
• Maus IgM	Cymbus Biotechnology, CBL 603, Hampshire, UK
• rhu MCP-1	R&D Systems, 279-MC
• rhu RANTES	R&D Systems, 278-RN
• rhu IL-1β	R&D Systems, 201-LB
• rhu IL-10	R&D Systems, 217-IL
• rhu IL-12	R&D Systems, 219-IL
• rhu IL-15	R&D Systems, 247-IL
• rhu SLC	R&D Systems, 366-6C
• rhu TNF	Endogen, DC875.02
• Ziege-anti Maus IgM - FITC	Immunotech, 1620
• Ziege IgG 1	R&D Systems, AB-108-C

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation von Zellen aus menschlichem Venenblut

2.2.1.1. Reagenzien für die Zellkultur

Zellen wurden in RPMI 1640 ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 13 mM $NaHCO_3$, 5,6 μg/ml Amphotericin B und 60 μg/ml Penicillin kultiviert. In Infektionsexperimenten mit *M. tuberculosis* wurde das FCS durch Humanserum verschiedener, gesunder Spender (hergestellt aus Blut gesunder Freiwilliger) ersetzt, um die Phagozytose der Bakterien zu optimieren.

2.2.1.2. Isolation von AM

AM wurden isoliert aus der BAL von Patienten, die einer Bronchoskopie aus diagnostischen Zwecken unterzogen wurden. Die AM von Patienten mit einer infektiösen Lungenerkrankung oder einer Erkrankung, die den Alveolarraum betraf, wurden verworfen. Die Lavageflüssigkeit wurde durch einen Zellsieb (40 µm) filtriert und anschließend zentrifugiert bei 1200 UpM für 10 Min. und 4°C. Das Zellpellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und in einer 6-Loch Platte mit einer Dichte von 1 x 10^6 AM/ml ausgesät. Die AM wurden über Nacht bei 37°C zur Adhärenz gebracht. Nicht-adhärente Zellen wurden durch gründliches Waschen mit PBS entfernt. Frisches Zellkulturmedium wurde zu den Zellen gegeben. Die AM wurden durch vorsichtiges Schaben mit einem Zellschaber geerntet, was die Viabilität der Zellen nicht beeinträchtigte. Die Reinheit der Zellen wurde durch eine α-Naphtylacetatesterase-Färbung überprüft und war >95% in jedem Experiment. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten diese Reinheit (CD3 < 1%, CD19, CD56, CD66, CD1 negativ).

2.2.1.3. Isolation von peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMC) und Monozyten

Frisches mit Antikoagulantien (Natriumcitrat) behandeltes Blut wurde über einem Ficoll-Paque Plus-Gradienten (1,077 g/ml) für 20 Min. bei 1600 UpM ohne Bremse zentrifugiert. Während aggregierte Erythrozyten und granuläre Granulozyten sich in einem Pellet ansammelten, bildeten die Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten eine Interphase zwischen Ficoll und Serum. Durch weitere Waschschritte bei 1 x 1800, 1 x 1300, 2 x 1000 und 2 x 800 UpM wurden die Thrombozyten entfernt. Die verbliebenen Zellen (PBMC) wurden in Zellkulturmedium in Kulturflaschen inkubiert.

Zur Isolierung von Monozyten wurden die PBMC für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die nicht-adhärenten Zellen wurden entfernt und die adhärenten Zellen (Monozyten) wurden mindestens viermal mit PBS gewaschen. Die Monozyten wurden durch zehn-minütige Behandlung mit PBS/1 mM EDTA oder durch vorsichtiges Schaben mit einem Zellschaber losgelöst. Die Reinheit der so erhaltenen Monozyten wurde in ausgewählten Experimenten mittels einer CD3, CD14, MHC II Färbung im Durchflusszytometer überprüft und lag bei über 95%.

2.2.2. Wachstum von *M. tuberculosis*

M. tuberculosis (virulenter Stamm H37Rv) wuchs in einer Suspension aus Middlebrook 7H9 Medium ergänzt durch 1% Glycerol, 0,05% Tween 80 und 10% Middlebrook OADC, unter ständiger Rotation in Kulturflaschen in einem Rollerinkubator. Aliquots von logarithmisch wachsenden Kulturen wurden in PBS mit 10% Glycerol eingefroren. Ein repräsentatives Aliquot wurde ausplattiert auf Middlebrook 7H11 Platten und die Anzahl an Kolonie bildende Einheiten (KBE) bestimmt. Eine Färbung der Bakterien mit BacLight zeigte eine Lebendigkeit der Mykobakterien von über 90%. Da das Verklumpen der Mykobakterien ein allgemeines Problem darstellt und die Validität und Reproduzierbarkeit der Experimente beeinflusst, wurden verschiedene Vorsichtsmaßnahmen getroffen: 1) die Wahl der Kulturbedingungen (Rotation, Tween), 2) vor der *in vitro* Infektion mit *M. tuberculosis* wurden diese 5 Min. im Wasserbad (37°C) beschallt, um kleine Bakterienaggregate zu zerstören und 3) für die *in vitro* Infektion wurde die Anzahl an Mykobakterien pro AM so gewählt, dass maximal ein bis zwei Bakterien je Zelle vorhanden waren.

2.2.3. Infektion von AM und Monozyten mit *M. tuberculosis*

AM und Monozyten wurden mit einer Einzelzellsuspension von *M. tuberculosis* in einer 6-Loch-Platte mit 1 x 10^6 Zellen/ml in einem Volumen von 3 ml infiziert. In ausgewählten Experimenten wurden die Mykobakterien bei 80°C für 30 Min. im Wasserbad abgetötet. Nach 4 Std. Inkubation bei 37°C wurden extrazelluläre Bakterien durch intensives Waschen mit PBS entfernt. Für die intrazelluläre Analyse von Zytokinen und Mykobakterien im Durchflusszytometer und die Quantifizierung des mykobakteriellen Wachstums mussten die adhärenten Zellen durch vorsichtiges Schaben mit einem Zellschaber geerntet werden. Für die Quantifizierung des mykobakteriellen Wachstums wurden die Zellen in einer 24-Loch-Platte in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml in 0,5 ml kompletten Medium ohne Antibiotika und 10% Humanserum ausplattiert. Die Infektionseffizienz wurde durch Färbung von Kontrollkulturen auf Permanox 8-Loch-Objektträgern für jedes Experiment quantifiziert und war abhängig von der Anzahl der Mykobakterien pro infizierender Zelle (MOI). In ausgewählten Experimenten wurden die AM mit FITC-konjugierten

Latexkügelchen unter identischen Bedingungen inkubiert. Die mikroskopische Evaluierung der infizierten Makrophagen im Fluoreszenzmikroskop bestätigte die Abwesenheit von Mykobakterienaggregaten.

2.2.4. Messung der Zytokinfreisetzung

2.2.4.1. ELISA

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellüberständen wurden Sandwich-ELISAs durchgeführt. Dazu wurden die vom Hersteller empfohlenen Antikörperpärchen verwendet, und die Durchführung der Versuche wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Die Sensitivität lag bei 15 pg/ml (TNF und IL-1β), 60 pg/ml (IL-10) und 125 pg/ml (IL-12).

2.2.4.2. Nachweis der biologischen Aktivität von TNF

Die TNF Bioaktivität wurde durch Messung des lytischen Effekts von TNF auf die Fibrosarcoma Zelllinie WEHI 164 bestimmt [59]. Die WEHI Zellen wurden mit 1 μg/ml Aktinomycin D für 2 Std. vorbehandelt. Nach dem Waschen der Zellen wurden 5 x 10^4 Zellen/Loch sowie die Überstände und 2 μg/ml Aktinomycin D zusammengegeben. Nach Übernacht-Inkubation wurde Methylthiazoltetrazolium (500 μg/ml) dazugegeben und für 4 Std. inkubiert. Um die Formazan-Kristalle in Lösung zu bringen, wurden die Zellen mit 100 μl saurem Natrium-Dodecylsulfat über Nacht behandelt. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm in einem ELISA-Platten-Messgerät bestimmt. Zur Ermittlung der Konzentration von vorhandenem bioaktiven TNF in den Überständen wurde rhu TNF mit bekannter Konzentration als Standard eingesetzt. In ausgewählten Experimenten wurde die biologische Aktivität von TNF mit 10 μg/ml anti-TNF-Antikörpern inhibiert. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Sensitivität des WEHI-Experiments war kleiner als 50 pg/ml in allen Versuchen.

2.2.5. Durchflusszytometrie

2.2.5.1. Färbung von Oberflächenmolekülen für die Durchflusszytometrie

3 x 10^5 Zellen wurden in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit monoklonalen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern für 30 Min. im Kühlschrank inkubiert. Die Proben wurden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, dann mit 2% Paraformaldehyd fixiert und im Kühlschrank bis zur Aquisition im Durchflusszytometer aufbewahrt. Die Daten wurden mit der CellQuest Pro Software (BD Biosciences) analysiert.

2.2.5.2. Färbung von *M. tuberculosis* für die Durchflusszytometrie

50 µl Mykobakteriensuspension wurden mit einem gleichen Volumen an SYTO 9, einer Komponente der BacLight-Färbung für 15 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden fünfmal mit 1 ml PBS bei 3200 UpM für 20 Min. gewaschen. Um die möglicherweise entstandenen Bakterienaggregate zu zerstören, wurden die gefärbten Mykobakterien für 5 Min. bei 37°C im Ultraschallwasserbad beschallt und damit die Makrophagen infiziert. Die gefärbten Mykobakterien unterschieden sich bezüglich ihrer Lebendigkeit, Infektiosität, intrazellulärem Wachstum oder ihrem Einfluß auf die Lebendigkeit eukaryontischer Zellen nicht von ungefärbten Mykobakterien. Diese Methode erlaubt die Detektion von intrazellulären Mykobakterien im Durchflusszytometer, angeregt durch einen Laser der Wellenlänge von 488 nm.

2.2.5.3. Intrazelluläre Färbung von Zytokinen für die Durchflusszytometrie

AM wurden mit gefärbten oder ungefärbten Mykobakterien mit einer MOI 2,5 für 6 Std. infiziert. Die letzten 2 Std. der Inkubation wurden in Anwesenheit von 10 µg/ml Brefeldin A durchgeführt. Die infizierten AM wurden mit einem Zellschaber vorsichtig geerntet. Die Zellen wurden in Hermetikbechern zentrifugiert und die Überstände wurden abgenommen. Nach Sterilfiltration (0,2 µm Filter) wurden die Überstände bei -70°C für weitere Analysen und Experimente gelagert. Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS / 2% FCS / 4% Paraformaldehyd resuspendiert und für 20 Min. bei RT inkubiert. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde auf einen Glasobjektträger pipettiert, luftgetrocknet und mit Auramin-Rhodamin gefärbt. Die Zellen wurden zweimal in

FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 150 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen. Nach 10 Min. wurde anti-TNF - APC (1/150 verdünnt) zugegeben und für 30 Min. im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, im FACSCalibur aufgenommen und analysiert.

2.2.6. Quantifizierung des mykobakteriellen Wachstums

Um eine verlässliche Aussage über das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* geben zu können, wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet. Zum einen wurde eine Auramin-Rhodamin-Färbung der Mykobakterien durchgeführt. Zum anderen wurde die Anzahl KBE bestimmt. Dazu wurden die infizierten Zellen mit 0,3% Saponin lysiert, um die intrazellulären Bakterien freizusetzen. Zu allen Zeitpunkten wurde zusätzlich ein nicht-lysiertes Aliquot an infizierten Zellen geerntet. Dies erlaubt die Bestimmung der Vitalität der Zellen. Zur Bestimmung der Zelllebendigkeit der Wirtszellen wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Der Anteil lebendiger Zellen lag bei über 90% der Gesamtzellen. Die Lysate der infizierten Zellen wurden kräftig resuspendiert, in 15 ml Röhrchen überführt und in einem auf 37°C vorgewärmten Wasserbad für 5 Min. sonifiziert. Sonifizierte 50 µl Aliquote wurden 1:10 in 7H9 Medium verdünnt. Jede Verdünnung wurde als Duplikat auf 7H11 Platten plattiert und bei 37°C und 5% CO_2 für 21 Tage inkubiert. Zum Dritten, wurde die Aufnahme von Tritium markierten Uracil ([^{3}H]-Uracil) gemessen. Die Aufnahme von [^{3}H]-Uracil in die mykobakterielle RNS wurde nach der Methode von Rook et al. bestimmt [60] und nach [61] modifiziert. 1 x 10^6 infizierte AM wurden wie oben beschrieben in Duplikaten kultiviert. Nach der Inkubationszeit, wurden die Zellen mit 0,3% Saponin lysiert, kräftig resuspendiert und in 15 ml Röhrchen überführt. Die Lysate wurden in Hermetikbechern für 20 Min. bei 3000 UpM zentrifugiert und die Pellets anschließend in 100 µl 7H9 Medium resuspendiert. Die Lysate wurden in 96-Loch-Rundbodenplatten überführt und in der Anwesenheit von 3 µCi [^{3}H]-Uracil inkubiert. Nach 24 Std. wurden die Mykobakterien mit 4% Paraformaldehyd (Endkonzentration) für 30 Min. abgetötet. Die [^{3}H]-Uracil Aufnahme wurde in einem Beta-Counter gemessen. Der Hintergrund an Radioaktivität in uninfizierten Zellen war kleiner 500 cpm in allen Experimenten.

2.2.7. Experimente in einem Zweikammersystem mit einer semipermeablen Membran

Zur Untersuchung, ob lösliche Bestandteile uninfizierte AM zur TNF-Produktion stimulieren, wurden AM wie oben beschrieben infiziert (MOI 2,5) und geerntet. 1 x 10^6 infizierte Zellen wurden in die obere Kammer der Transwell-Platten ausgesät. Diese Zellen sind von 1 x 10^6 uninfizierten AM in der unteren Kammer durch eine semipermeable Membran getrennt. Der Durchmesser der Poren erlaubt nur das Durchtreten von Partikeln, die kleiner als 0,4 μm sind, wie z.B. Zytokine und sezernierte Proteine. Bakterien können die Membran nicht passieren. Nach einer Inkubationsdauer von 18 Std. wurden die Überstände abgenommen und auf das Vorhandensein von TNF untersucht. Die Zellen in der unteren Kammer wurden geerntet (wie oben beschrieben) und im Durchflusszytometer auf die Expression von intrazellulärem TNF analysiert.

2.2.8. Chemotaxis-Experimente

Um das Migrationsverhalten von Zellen zu untersuchen wurden Chemotaxis-Experimente durchgeführt. Dazu wurden 100 ng/ml rhu RANTES, 100 ng/ml rhu MCP-1, 1 μg/ml SLC, komplettes Medium mit 10% FCS, Überstände von infizierten und nicht-infizierten AM in einem Volumen von 29,5 μl luftblasenfrei in die Kammern einer 96-Loch-Chemotaxis-Platte pipettiert. Die chemotaktischen Stimuli wurden durch das Aufsetzen einer permeablen Membran mit Poren von 3 μm Durchmesser von den Zellen getrennt. Auf die Membran wurden in einem Volumen von 80 μl Chemotaxis-Medium 1,5 x 10^5 frisch isolierte PBMC pipettiert. Nach 1 Std. Inkubation bei 37°C wurden die nicht-gewanderten Zellen von der Membran entnommen, die Membran entfernt und die migrierten Zellen aus der Kammer in ein Plastikröhrchen geerntet. Diese Zellen wurden auf verschiedene Oberflächenmoleküle zur Analyse im Durchflusszytometer gefärbt. Zu den Zellen eines jeden Ansatzes, wurde eine konstante (1 µl) und bekannte Menge an Calibrite beads gegeben. Im FACSCalibur wurde ein Fünftel der beads akquiriert und phänotypisch analysiert.

2.2.9. Messung der Apoptose

Zum Ausschluss, dass die Infektion von AM unter den von uns gewählten Bedingungen zum Zelltod (Apoptose) führt wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt. 1) Apoptotische Zellen kehren die auf der inneren Seite der Zellmembran befindlichen, negativ geladenen Phosphatidylserine nach außen. Diese können durch Annexin V - PE angefärbt werden. Die Färbung wurde genau nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Quantifizierung wurden mindestens 1 x 10^4 Zellen im Durchflusszytometer analysiert. 2) Während der Apoptose kommt es zur Bildung von zytoplasmatischen, Histon-assoziierten DNS-Fragmenten (Mono- und Oligonukleosomen), welche durch den Cell Death Detection ELISA Plus quantifiziert wurden. Dazu wurden 1 x 10^4 Zellen lysiert und bei 1300 UpM für 10 Min. zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden in die mit Streptavidin gecoatete ELISA Platte pipettiert. Die Bedingungen für die Aufreinigung, Infektion (MOI 0,5) und Kultivierung der AM waren identisch mit den Bedingungen für die Quantifizierung des mykobakteriellen Wachstums.

2.2.10. Relative Quantifizierung der transkribierten RNS

2.2.10.1. Isolierung von RNS

3 x 10^6 AM wurden in einer 6-Loch-Platte mit *M. tuberculosis* infiziert (MOI 10). Nach 24 Std. wurden die AM geerntet und pelletiert. Die Isolierung der RNS erfolgte streng nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe des RNeasy-Kits von Qiagen.

Um etwaige DNS-Kontaminationen zu entfernen wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu wurden die aus dem RNeasy Kit enthaltenen 50 µl Nukleinsäuren mit 5 µl DNase I Puffer und 2 µl DNase I versetzt und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurde 5 µl DNase Inaktivierungsreagenz hinzugegeben und für 2 Min. bei RT inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 14.000 UpM für eine Min. an. Im Überstand befand sich nun die DNS-freie RNS. Die so erhaltene RNS wurde auf ihre Reinheit im Photometer überprüft. Dazu wurde die Extinktion (E) bei 260 nm und 280 nm bestimmt und der Quotient aus diesen Werten gebildet. Bei einem Quotienten E_{260}/E_{280} = 1,8 - 2,0 kann von reiner RNS ausgegangen werden. In allen Versuchen lag die Reinheit zwischen 1,7 und 1,9. Die RNS wurde bei –70°C gelagert.

2.2.10.2. Die Reverse Transkription

Hier erfolgt das Umschreiben von einsträngiger RNS in eine „copy-DNA“ oder cDNS. Dazu wurden 9,0 µl DEPC (Diethyl-Pyrocarbonat)-Wasser mit 1,0 µl Oligo$(dT)_{12-18}$-Primer und 5,0 µl RNS gemischt und für 10 Min. bei 70°C erhitzt. Danach wurde 34,5 µl Master-Mix bestehend aus 10 µl 5x First-Strand-Buffer (Endkonzentration: 1x), 5 µl 0,1 M DTT (Dithiothreitol) (Endkonzentration: 0,01 M), 1 µl Nukleotidgemisch (25 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Endkonzentration: 0,125 mM) und 18,5 µl DEPC-Wasser dazugegeben. Nach zwei Min. bei 42°C und 2,5 Min. auf Eis wurde 0,5 µl Superscript (reverse Transkriptase) hinzugefügt. Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler für 50 Min. bei 42°C und weiteren 15 Min. bei 70°C. Die fertige cDNS wurde bei –20°C gelagert.

2.2.10.3. Die „Real-Time“ PCR

Die „Real-Time“ PCR ist eine PCR, die in Echtzeit und online die Amplifikation von DNS durchführt. Dadurch kann die Menge an DNS quantifiziert werden. Hierzu verwendet man den in die DNS interkalierenden Farbstoff SYBR Green. Dieser lagert sich in die doppelsträngige DNS ein und nach Ende der Elongationsphase wird die Fluoreszenzintensität des eingelagerten Farbstoffes gemessen.

Zur relativen Quantifizierung der TLR-Expression auf transkriptioneller Ebene wurde eine „Real-Time“ PCR durchgeführt. Dazu wurde ein 218 bp großes Amplifikat von TLR 2 und von 197 bp für TLR 4 amplifiziert. Die Menge an TLR-Produkten wurde auf β_2-Microglobulin (305 bp) normiert. Die „Real-Time“ PCR wurde in einem 20 µl-Ansatz in eigens dafür entwickelten Kapillaren durchgeführt. Zuerst wurde ein Master-Mix hergestellt, der pro Ansatz 1x PCR-Puffer ohne $MgCl_2$ (2,0 µl), 4 mM $MgCl_2$ (1,6 µl), 0,5 mg/ml BSA (1,0 µl), 5% DMSO (1,0 µl), 0,5x SYBR Green (1,0 µl), 1 µM Primer-Mix (1,0 µl), 0,25 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP (0,2 µl), 1 U Platinum-Taq (0,2 µl) und 9,0 µl Wasser enthielt. Davon wurden 18 µl in die Kapillaren gegeben und 2 µl cDNS (1 : 5 verdünnt) hinzugegeben. Die Kapillaren wurden kurz anzentrifugiert und in den LightCycler gestellt. Es wurden folgende Bedingungen für die PCR gewählt:

Denaturierung	:	95°C 10 Min.	Vorinkubation

Denaturierung	:	95°C	15 Sek.	Amplifikation
Annealing	:	58°C	10 Sek.	
Elongation	:	72°C	15 Sek.	
Denaturierung	:	95°C	0 Sek.	Schmelzkurve
Annealing	:	64°C	15 Sek.	
Schmelzkurve	:	95°C	0,1°C/Sek.	
Kühlung	:	40°C	30 Sek.	Abkühlung

Die Amplifikationseffizienz für TLR lag bei 1,9 und für β_2-Microglobulin bei 1,8. Zur Berechnung der relativen Expression von TLR-mRNS wurde folgende Formel herangezogen: $1{,}9^{\Delta n(TLR)}/1{,}8^{\Delta n(\beta 2)}$ (Δn = Zyklus(stimuliert) – Zyklus(unstimuliert)). Die Schmelztemperaturen für die Amplifikate betrugen für TLR 2 84°C, für TLR 4 85°C und für β_2-Microglobulin 82°C.

Verwendete Primersequenzen:

TLR 2:

Vorwärtsprimer: 5' – TGT CTT GTG ACC GCA ATG GTA – 3'

Rückwärtsprimer: 5' – GCC CAG GGA AGA AAA AGA ATC – 3'

TLR 4:

Vorwärtsprimer: 5' – GGA GCC CTG CGT GGA GA – 3'

Rückwärtsprimer: 5' – GGT TGT CGG GGA TTT TGT AG – 3'

β_2-Microglobulin:

Vorwärtsprimer: 5' – AGC GTA CTC CAA AGA TTC AGG TT – 3'

Rückwärtsprimer: 5' – ATG ATG CTG CTT ACA TGT CTC GAT – 3'

2.2.11. Statistische Analysen

Die gezeigten Daten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, bis auf einzelne Daten, die als repräsentative Resultate dargestellt wurden. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz *p* zwischen zwei unterschiedlich behandelten Kulturen wurde der Student's *t* Test angewandt. Die Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn $p<0{,}05$ war.

3. Ergebnisse

3.1. Induktion von TNF in AM und dessen Einfluss auf das Wachstum von *M. tuberculosis*

3.1.1. Infektion von AM mit *M. tuberculosis*

Humane AM wurden mit einem virulenten Stamm von *M. tuberculosis* (H37Rv) in verschiedenen MOIs infiziert. Nach 4 Std. wurden infizierte Zellen geerntet und mit Auramin-Rhodamin gefärbt. Die Anzahl der infizierten Zellen sowie die bakterielle Beladung je Zelle stieg mit zunehmender MOI an. Bei einer MOI von 10 konnte eine maximale Anzahl an infizierten AM (32 ± 2%) mit einer maximalen bakteriellen Last von 14 ± 2 Bakterien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Erhöhung der Anzahl an Mykobakterien brachte keine Steigerung der Anzahl infizierter Zellen wie auch in der bakteriellen Beladung je AM, da die AM nekrotisch wurden. Die Mehrzahl der AM blieb jedoch trotz einer Erhöhung der Anzahl an Mykobakterien je AM uninfiziert. Eine Verlängerung der Infektionsphase auf 18 Std. hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Unter identischen Kulturbedingungen ist die Phagozytose von Latexkügelchen effizienter und führt zu einer höheren Anzahl an Latexkügelchen beladenen AM als die Infektion mit lebendigen *M. tuberculosis* (**Abb. 6**).

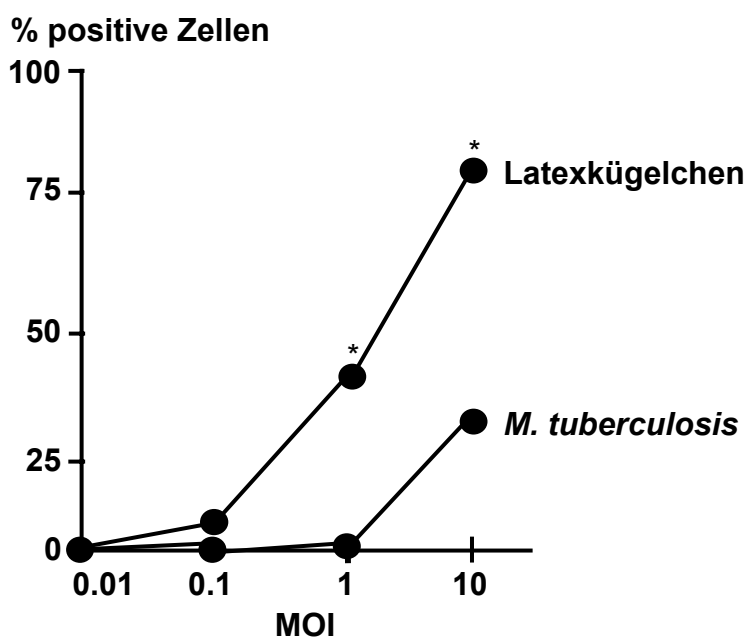


Abb. 6: Infektion von AM mit *M. tuberculosis*. AM wurden mit einer zunehmenden Anzahl an SYTO 9-gefärbten Mykobakterien oder inerten FITC-konjugierten Latexkügelchen infiziert. Nach 4 Std. wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert. Diese Daten zeigen einen repräsentativen Spender von insgesamt drei (* $p<0,01$).

Diese Daten zeigen, dass nur eine begrenzte Anzahl an AM in der Lage ist, lebendige Mykobakterien zu phagozytieren. Die AM scheinen einen Mechanismus entwickelt zu haben um der Infektion durch *M. tuberculosis* zu entgehen.

3.1.2. TNF-Produktion nach Infektion mit *M. tuberculosis*

AM wurden mit verschiedenen MOIs für 18 Std. infiziert. Die Konzentration an sezerniertem TNF wurde in einem ELISA bestimmt. Mit steigender MOI, sowie steigender bakterieller Beladung der Zellen, stieg die TNF-Konzentration in den Überständen infizierter AM an (**Abb. 7**).

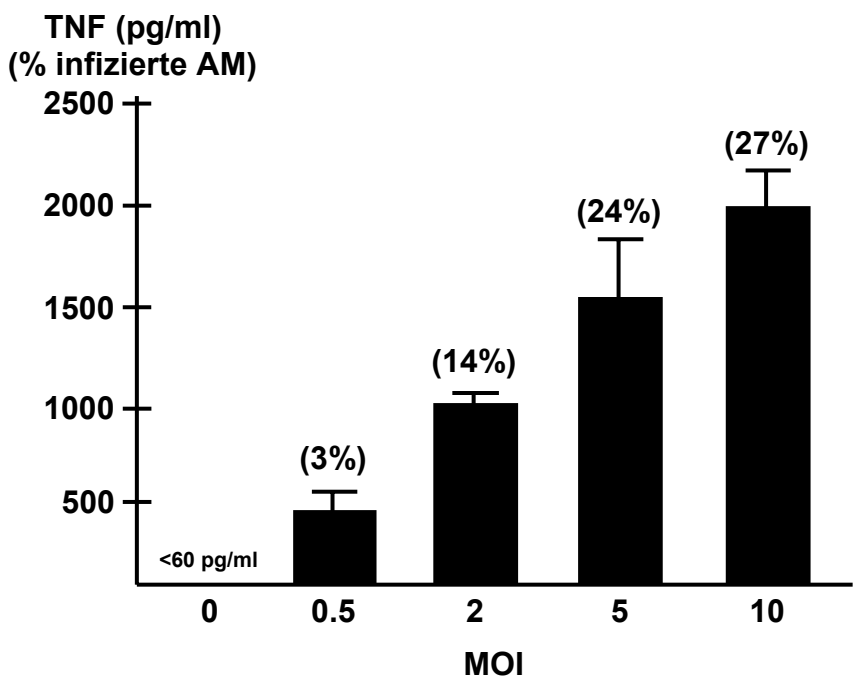


Abb. 7: TNF-Produktion von AM nach Infektion mit *M. tuberculosis*. AM wurden mit einer zunehmenden Anzahl an Mykobakterien infiziert und nach 18 Std. wurden die Überstände geerntet. Die Konzentration an sezerniertem TNF wurde in einem ELISA bestimmt. Die Anzahl infizierter Zellen wurde mit einer Auramin-Rhodamin-Färbung bestimmt. Es wurden 500 Zellen in jeder Probe auf das Vorhandensein von intrazellulären Mykobakterien analysiert.

3.1.3. Sekretion von biologisch aktivem TNF

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität des sezernierten TNFs durch infizierte AM wurden die Überstände zu Fibrosarkomzellen (WEHI 164) gegeben, die durch biologisch aktives TNF abgetötet werden. Es zeigte sich, dass mit zunehmender MOI auch die TNF-Bioaktivität steigt (**Abb. 8**). Da die Menge an sezerniertem TNF mit der

Anzahl infizierter AM korrelierte, lag die Vermutung nahe, dass die infizierten Zellen die TNF-Produzenten sind.

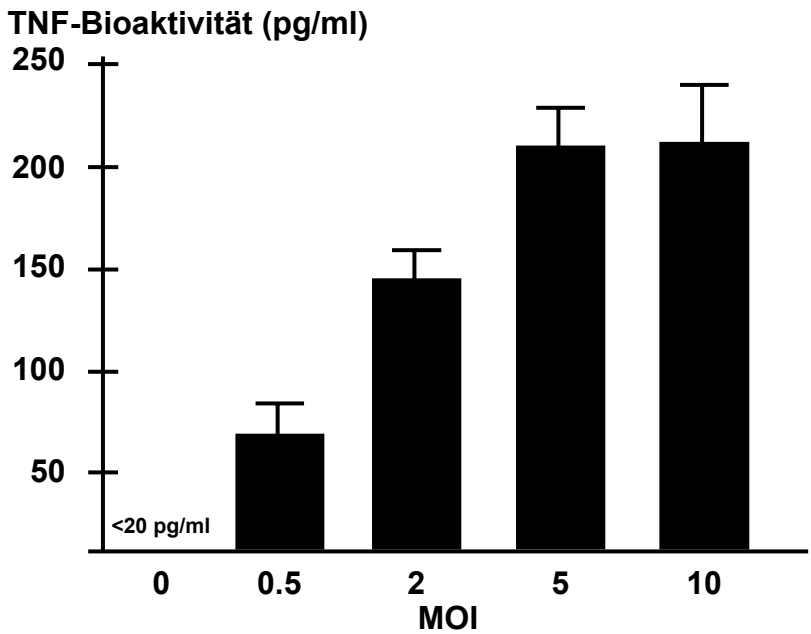


Abb. 8: Sekretion von bioaktiven TNF nach Infektion von AM mit *M. tuberculosis*. AM wurden mit einer zunehmenden Anzahl an Mykobakterien infiziert und nach 18 Std. wurden die Überstände geerntet. Die Bioaktivität der Überstände wurde durch Lyse von WEHI-Zellen bestimmt. Dieser Graph fasst 14 unabhängige Experimente mit 14 verschiedenen AM-Spendern (± SD) zusammen.

3.1.4. Analyse TNF produzierender Zellen auf Einzelzellebene

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde eine Doppelfärbung von intrazellulärem TNF und Mykobakterien in den AM für die Durchflusszytometrie etabliert. Diese Färbung erlaubt die gleichzeitige Detektion von TNF und Mykobakterien auf Einzelzellebene.

3.1.4.1. Intrazelluläre TNF Färbung

In Abhängigkeit von der MOI wurde eine höhere Anzahl TNF-positiver Zellen detektiert. Bei einer MOI von 1 waren 8% der Zellen, bei einer MOI von 5 waren 14% und bei einer MOI von 10 waren 20% der Zellen TNF-positiv. Eine Stimulation der AM mit LPS resultierte in einer dreifach höheren Anzahl an TNF-exprimierenden Zellen als bei einer Infektion mit lebendigen Mykobakterien. Auch ohne Stimulus sind 3% der AM TNF-positiv (**Abb. 9**).

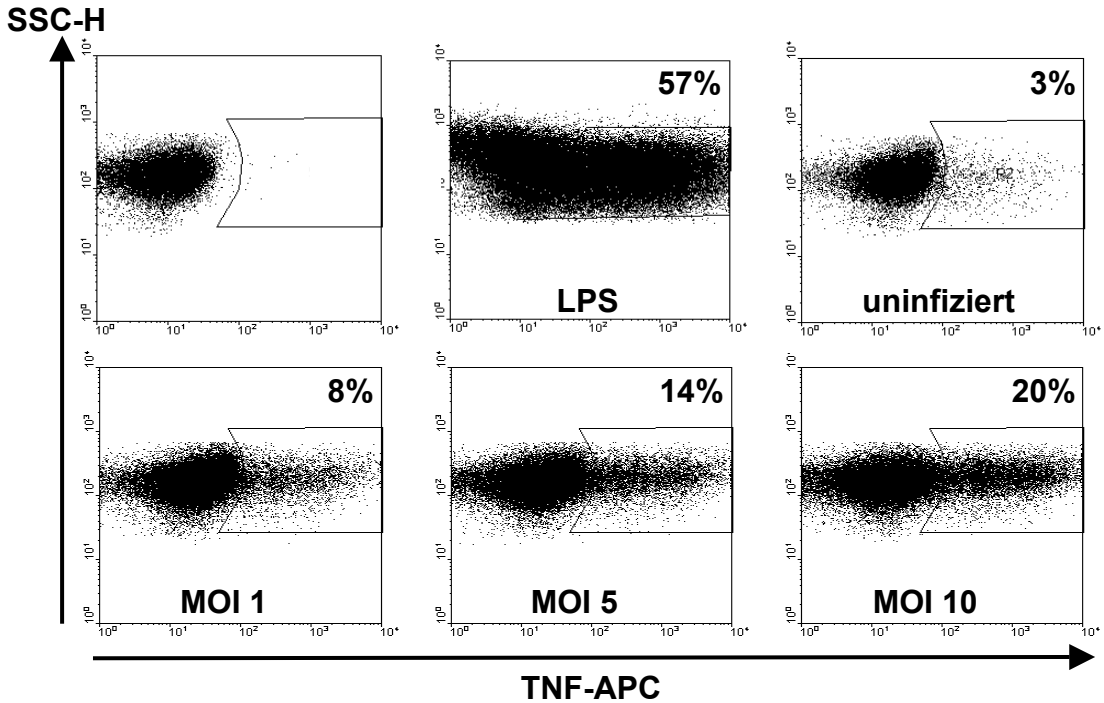


Abb. 9: Intrazelluläre TNF-Färbung in *M. tuberculosis* infizierten AM. Die Zellen waren für 6 Std. infiziert, wobei die letzten 2 Std. in Anwesenheit von Brefeldin A waren. Uninfizierte und LPS (20 ng/ml)-stimulierte Zellen dienten als Kontrolle. 1 x 10^5 Zellen wurden aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Diese Abbildung zeigt 5 x 10^4 Zellen eines repräsentativen AM-Spenders von insgesamt drei.

Dieses Experiment zeigt, dass nur eine Subpopulation von AM nach Infektion mit *M. tuberculosis* TNF produziert. Die Mehrheit der AM verhält sich immunologisch still, obwohl eine LPS-Stimulation zur TNF-Freisetzung führte.

3.1.4.2. Intrazelluläre Detektion von gefärbten *M. tuberculosis*

Zur Detektion von infizierten AM im Durchflusszytometer wurde die bakterielle DNS mit SYTO 9 vor der Infektion der AM angefärbt. Extrazellulär gefärbte Mykobakterien lassen sich im Durchflusszytometer einfach detektieren. Gefärbte Mykobakterien zeigen einen 40-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität im Vergleich mit ungefärbten Bakterien (**Abb. 10**).

Infiziert man die AM mit den SYTO 9-gefärbten Mykobakterien, so lassen sich die infizierten Zellen von den Uninfizierten unterscheiden. Mit steigender MOI steigt die Anzahl infizierter Zellen an. Bei einer MOI von 0,01 und 0,1 sind 1% der AM, bei einer MOI von 1 sind 3% und bei einer MOI von 10 sind 27% der AM infiziert (**Abb. 11**).

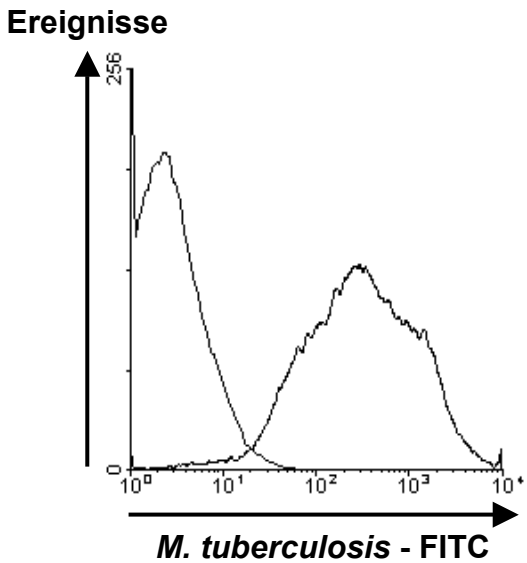


Abb. 10: Detektion von SYTO 9-gefärbten extrazellulären Mykobakterien im Durchflusszytometer. Die Mykobakterien wurden mit einem gleichen Volumen an SYTO 9 für 15 Min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Zellen wurden sechsmal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend im Durchflusszytometer im Fluoreszenz 1- Kanal aufgenommen.

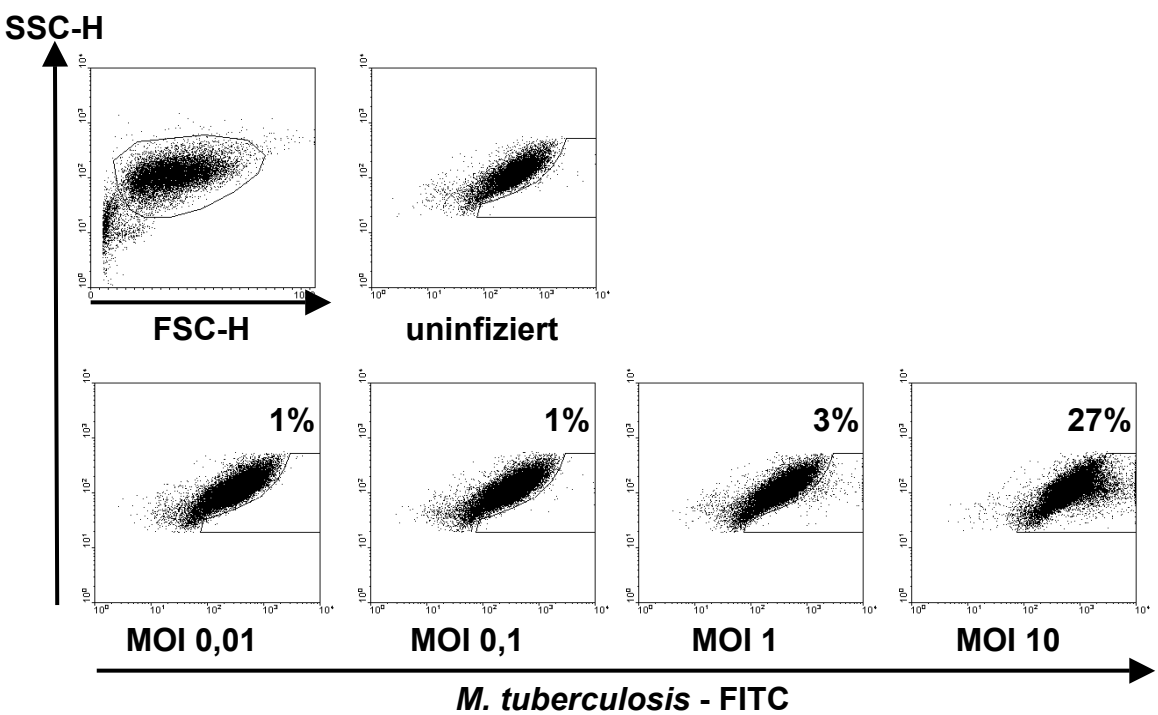


Abb. 11: TNF-Produktion von AM auf Einzelzellebene. AM wurden mit SYTO 9-gefärbten Mykobakterien infiziert und für 4 Std. inkubiert. Anschließende wurden die nicht-phagozytierten Mykobakterien weggewaschen, die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert.

Diese Daten liessen sich durch eine Auramin-Rhodamin-Färbung mikroskopisch bestätigen (**Tabelle 1**).

Spender	Durchflusszytometrie (%)	Auramin-Rhodamin-Färbung (%)
1	11	14
2	13	10
3	35	26
4	8	11
5	20	17
6	29	19

Tabelle 1: Korrelation zwischen durchflusszytometrischer und mikroskopischer Detektion von *M. tuberculosis*. AM von jedem Spender wurden mit gefärbten oder ungefärbten Mykobakterien in einer 6-Loch-Platte infiziert (MOI 2,5). Nach 4 Std. wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert oder auf einen Objektträger gegeben (1 x 10^5 in 250 µl). Nach Fixierung mit 4% Paraformaldehyd und Lufttrocknung wurde eine Auramin-Rhodamin-Färbung durchgeführt. Es wurden mindestens 400 Zellen von jedem Spender analysiert. Die Mehrheit der Zellen hatte 1-2 Mykobakterien phagozytiert.

3.1.4.3. Intrazelluläre Doppelfärbung von *M. tuberculosis* und TNF

Um *M. tuberculosis*-infizierte und TNF-produzierende AM simultan zu identifizieren, wurde eine Doppelfärbung von TNF und Mykobakterien 6 Std. nach Infektion durchgeführt. Frühere Resultate bestätigend, war nur eine Subpopulation von AM (23%) mit *M. tuberculosis* infiziert. 8% der AM waren bei einer MOI von 2,5 TNF-positiv. Die Hälfte der TNF-positiven Zellen war infiziert (4 von 26%, oberer rechter Quadrant). Aber auch in einer Teilpopulation der uninfizierten AM war TNF nachweisbar (4 von 74%, oberer linker Quadrant) (**Abb. 12**).

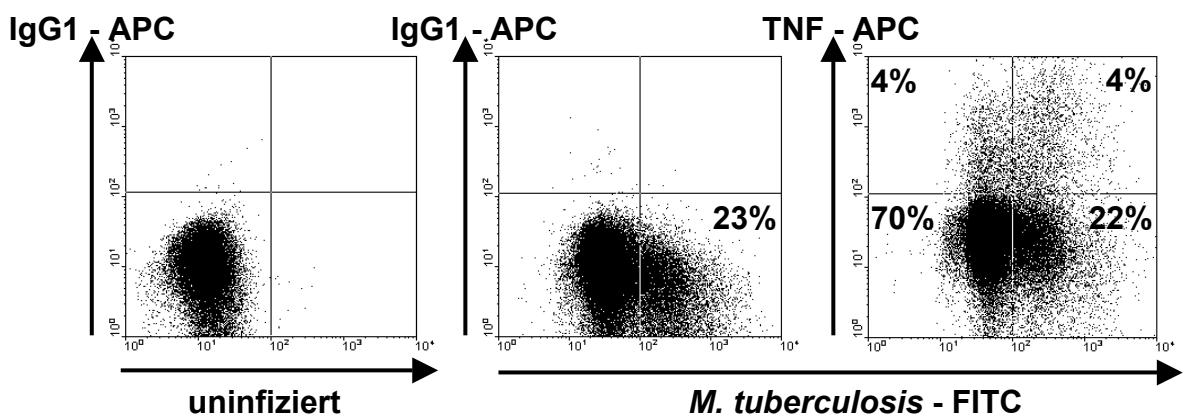


Abb. 12: TNF-Produktion durch AM auf Einzelzellebene. AM wurden mit SYTO 9-gefärbten Mykobakterien infiziert (MOI 5). Nach 4 Std. wurde Brefeldin A dazugegeben. Nach weiteren 2 Std. Inkubation wurden die Zellen geerntet und eine intrazelluläre Färbung auf TNF durchgeführt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von elf mit ähnlichen Ergebnissen.

Die Aufnahme von Mykobakterien fördert die TNF-Produktion, sie ist aber nicht zwingend erforderlich. Grund für die TNF-Produktion von uninfizierten Zellen kann

die Sekretion von löslichen Faktoren sein, die uninfizierte Zellen zur TNF-Produktion stimulieren. Die TNF-Produktion könnte aber auch durch direkten Zell-Zell Kontakt zwischen uninfizierter und infizierter Zelle zustande kommen.

3.1.5. Mechanismus der TNF-Produktion in uninfizierten AM

Zur Untersuchung des Mechanismus der TNF-Produktion in uninfizierten AM wurden infizierte AM in die obere Kammer einer Transwell-Platte gegeben. Diese Platte erlaubt die Diffusion von löslichen Mediatoren, die kleiner als 0,4 µm sind, nicht aber von ganzen Mykobakterien. Uninfizierte AM befanden sich in der unteren Kammer dieses Systems. Nach 18 Std. Koinkubation wurden die unteren AM geerntet und auf TNF gefärbt. Im Gegensatz zu einer Kontrollkultur infizierter AM, die zu 16 ± 3% TNF-positiv waren, war die Population uninfizierter AM aus der unteren Kammer nur zu 2 ± 0,6% TNF-positiv (**Tabelle 2**). Dies weist darauf hin, dass die TNF-Produktion uninfizierter AM nicht durch lösliche Faktoren verursacht wird.

obere Kammer	untere Kammer	TNF positive Zellen (%) (untere Kammer)
keine Zellen	infizierte AM	2 ± 0.4%
keine Zellen	infizierte AM	16 ± 3%
infizierte AM	uninfizierte AM	2 ± 0.6%

Tabelle 2: TNF-Produktion in uninfizierten AM wird nicht durch lösliche Faktoren hervorgerufen. AM wurden in die entsprechenden Kammern gegeben und infiziert (MOI 2,5) oder unbehandelt belassen. Nach 18 Std. Inkubation wurden die Zellen der unteren Kammer geerntet und auf das Vorhandensein von intrazellulärem TNF gefärbt. Die Tabelle zeigt die Resultate von drei verschiedenen AM-Spendern (± SEM).

3.1.6. Abhängigkeit der TNF-Produktion von der Virulenz des Mykobakterienstammes

Es sollte nun geklärt werden, ob die Virulenz der Bakterien die Kapazität der AM zur TNF-Produktion beeinflusst. Dazu wurden zwei genetisch eng verwandte Stämme miteinander verglichen, nämlich *M. tuberculosis H37Ra* (avirulent) mit *H37Rv* (virulent) und *M. bovis* (virulent) mit *M. bovis BCG* (avirulent). In der intrazellulären TNF-Färbung zeigte sich, dass die virulenten Mykobakterien mehr AM zur TNF-

Produktion aktivieren als ihre genetisch avirulenten Verwandten (**Abb. 13**). Dabei war die Phagozytose-Effizienz zur Aufnahme der verschiedenen Mykobakterien-Stämme ähnlich.

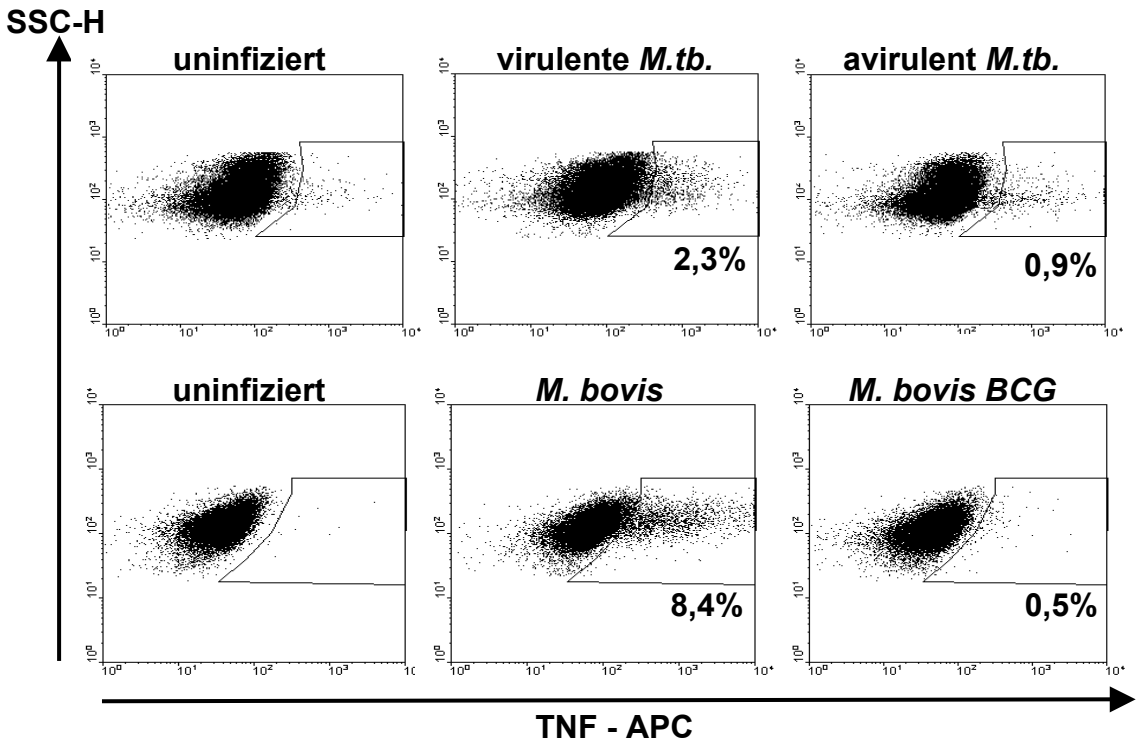


Abb. 13: Vergleich der Zytokin-Induktion durch virulente und avirulente Mykobakterien. AM wurden mit virulenten und avirulenten *M. tuberculosis* und *M. bovis* mit einem MOI 2,5 infiziert. Nach 4 Std. Infektion wurde für weitere 2 Std. Brefeldin A (10 µg/ml) hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend geerntet und auf das Vorhandensein von intrazellulärem TNF gefärbt. Für jeden Spender wurden 1 x 10^6 Zellen aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Spender von insgesamt vier.

Die virulenzabhängige TNF-Produktion bestätigte sich bei sechs verschiedenen Blutspendern im ELISA. Im Mittel induzierten virulente *M. tuberculosis* 1954 ± 235 pg/ml TNF, während avirulente *M. tuberculosis* nur 623 ± 135 pg/ml induzierten. Ähnlich verhielt es sich bei *M. bovis* und *M. bovis BCG*. Hier induzierte der virulente Stamm 2156 ± 303 pg/ml und der avirulente Stamm 498 ± 218 pg/ml TNF (**Abb. 14**). Dieses Phänomen trifft auch auf andere Monokine wie IL-1β, IL-12 und IL-10 zu. Durch virulente Mykobakterien konnte jeweils eine höhere Konzentration dieser Monokine induziert werden als durch ihre avirulenten genetischen Verwandten. Nicht nur die Virulenz ist für die TNF-Induktion in AM entscheidend, sondern auch die Viabilität der Bakterien. So induzierten Hitze-abgetötete Mykobakterien weder TNF noch IL-1β oder IL-12, dafür aber IL-10 in gleichem Maße wie lebendige Mykobakterien (**Abb. 15**).

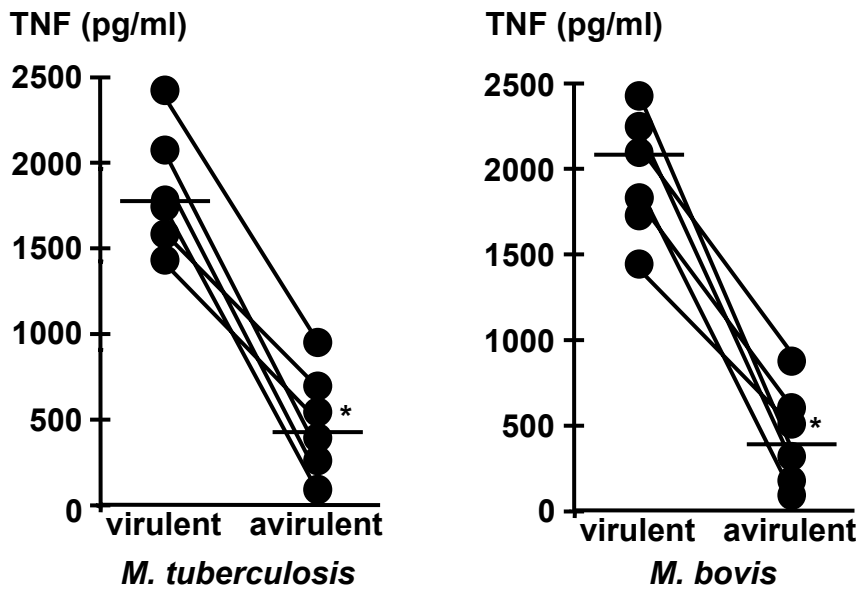


Abb. 14: Vergleich der Zytokin-Induktion durch virulente und avirulente Mykobakterien. AM wurden mit virulenten und avirulenten *M. tuberculosis* und *M. bovis* mit einem MOI 2,5 infiziert. Die Überstände wurden nach 18 Std. abgenommen und ein TNF-ELISA wurde durchgeführt. Die Graphen zeigen die sechs unabhängigen und verschiedenen AM-Spender. Der Stern weist auf den signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten aus der TNF-Produktion durch die virulenten und avirulenten Mykobakterien hin.

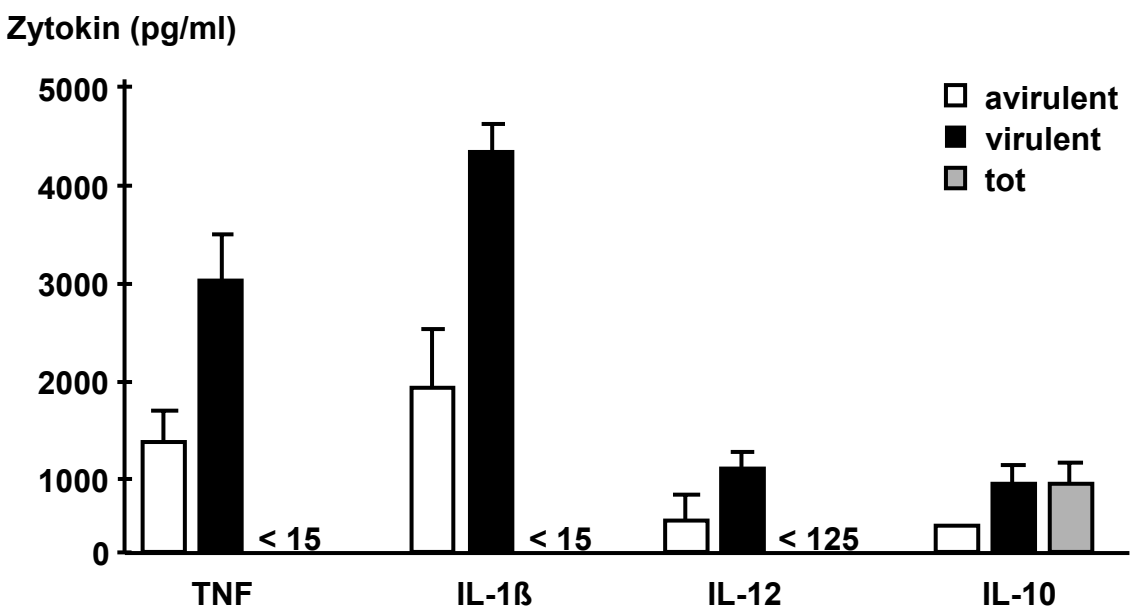


Abb. 15: Vergleich der Zytokin-Induktion durch virulente und avirulente Mykobakterien. AM wurden mit virulenten und avirulenten *M. tuberculosis* und *M. bovis* mit einer MOI von 2,5 infiziert. AM wurden mit lebendigen oder Hitze-getöteten Mykobakterien für 48 Std. infiziert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Spender von zwölf.

Da eine Infektion mit virulenten viablen Mykobakterien höhere TNF-Konzentrationen induziert als ihre avirulenten oder toten Verwandten, überprüften wir die Hypothese, ob eine Korrelation zwischen TNF-Freisetzung und intrazellulärem Wachstum besteht.

3.1.7. Zeitliche Korrelation zwischen der TNF-Produktion und dem mykobakteriellen Wachstum

Die Kinetik der Zytokinfreisetzung im ELISA zeigt, dass nach 18 Std. die maximale TNF-Konzentration im Überstand *M. tuberculosis* infizierter AM gefunden wurde. Danach ist wieder ein Abfall der TNF-Menge zu beobachten. Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der TNF-Sekretion und dem intrazellulären Wachstum von *M. tuberculosis* in humanen AM besteht, wurde die Bakterienlast infizierter AM nach 1-, 18-, 28-, 48- und 96-stündiger Infektion durch Plattierung von Zell-Lysaten bestimmt. Die Auszählung der KBE erfolgte nach drei Wochen. Nach einer stationären Phase in den ersten 18 Std. begannen die Mykobakterien sich zu replizieren und erreichten nach 96 Std. die vierfache Menge des Ausgangswertes (**Abb. 16**). Dieses Ergebnis impliziert, dass eine zeitliche Korrelation zwischen der TNF-Sekretion und dem mykobakteriellen Wachstum vorhanden sein könnte.

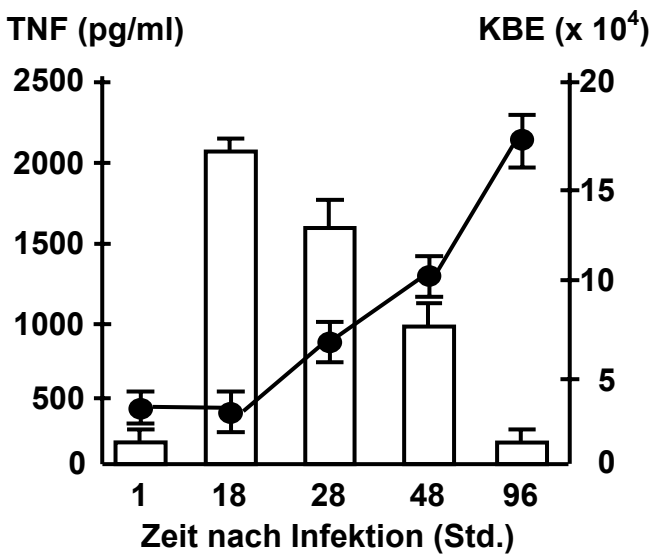


Abb. 16: TNF-Produktion von AM nach Infektion mit *M. tuberculosis*. AM wurden mit *M. tuberculosis* infiziert und für 4 Std. inkubiert. Danach wurden die extrazellulären Mykobakterien weggewaschen. Die Überstände wurden nach 1, 18, 28, 48 und 96 Std. abgenommen und die TNF-Konzentration wurde in einem TNF-ELISA bestimmt. Der Graph fasst sieben unabhängige Experimente zusammen (Mittelwert ± SD). In vier von diesen Experimenten wurden die AM nach Abnahme der Überstände lysiert. Die Lysate wurden auf 7H11-Platten plattiert. Die Anzahl KBE sind als Kreise (± SEM) dargestellt.

3.1.8. Einfluss von TNF auf das Wachstum von Mykobakterien

Um den indirekten Einfluss von TNF auf das intrazelluläre mykobakterielle Wachstum in AM zu untersuchen, wurden diese Zellen infiziert und für sieben Tage inkubiert. Anschließend erfolgte eine Plattierung der vorhandenen Mykobakterien (wie oben

beschrieben). Während die virulenten Stämme von *M. tuberculosis* und *M. bovis* eine Vervielfachung von mehr als einer Log-Stufe zeigten (*M. tuberculosis*: 11,8-fache, *M. bovis*: 13,2-fache Vervielfachung), zeigten die avirulenten Stämme kein Wachstum über den beobachteten Zeitraum (**Abb. 17**).

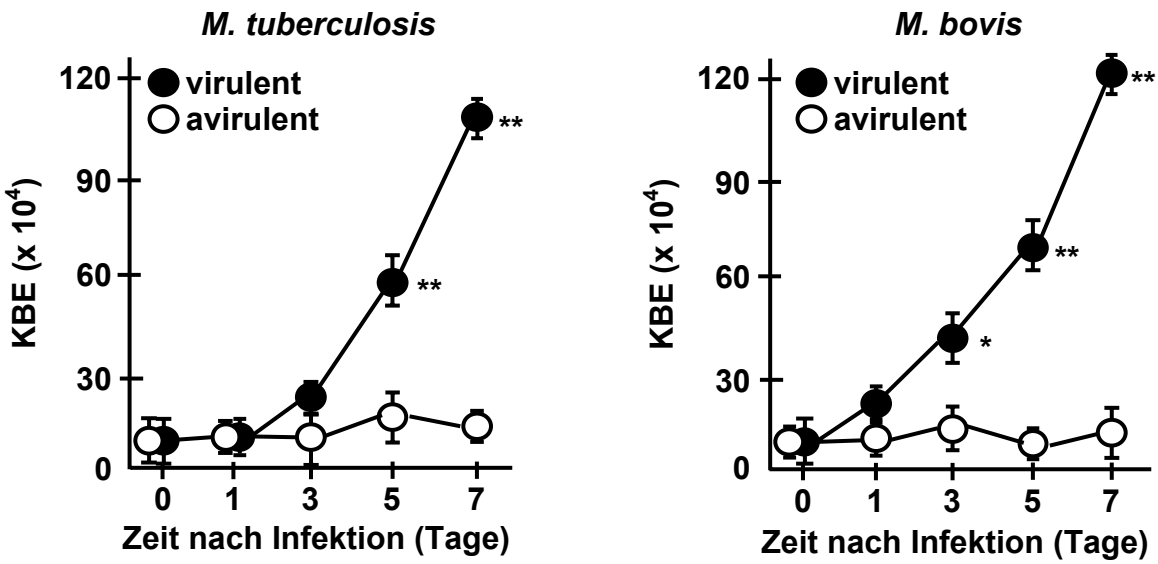


Abb. 17: Vergleich des Wachstums von virulenten und avirulenten Mykobakterien. AM wurden infiziert mit virulenten und avirulenten Stämmen von *M. tuberculosis* und *M. bovis*. Nach 0, 1, 3, 5 und 7 Tagen wurden die AM lysiert und die Lysate auf 7H11-Platten plattiert. Die Graphen zeigen jeweils ein repräsentatives Experiment von jeweils sechs. Die Ergebnisse sind als KBE ± SD angegeben. Die Sterne indizieren die statische Signifikanz der Unterschiede im Wachstum von virulenten und avirulenten Mykobakterien (*$p<0.05$; **$p<0.01$).

Aus der Beobachtung, dass virulente Mykobakterien besser wachsen als die avirulenten Stämme, wurde die Hypothese abgeleitet, dass TNF für diesen Effekt verantwortlich sein könnte. Diese Möglichkeit wurde untersucht, indem infizierte AM mit rhu TNF oder anti-TNF-Antikörpern für fünf Tage inkubiert wurden und anschließend die Anzahl intrazellulärer Mykobakterien bestimmt wurde.

Die Anzahl von *M. tuberculosis* in der unbehandelten Kultur stieg von $16 \pm 2 \times 10^4$ auf $78 \pm 4 \times 10^4$ an. In der Anwesenheit von anti-TNF-Antikörpern stieg die Anzahl der virulenten Bakterien nur auf $43 \pm 2 \times 10^4$ (45% Wachstumsreduktion) bei *M. tuberculosis* bzw. auf $30 \pm 2 \times 10^4$ (67% Wachstumsreduktion) bei *M. bovis* an. Eine Inkubation mit dem Kontroll IgG 1 Antikörper hatte keinen Einfluss auf das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* in den AM.

Weiterhin wurde untersucht, wie eine zusätzliche exogene Gabe von TNF das intrazelluläre Wachstum von Mykobakterien in AM beeinflusst. Die exogene Zugabe von rhu TNF verstärkte das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* um 35 ± 3%

und von *M. bovis* um 38 ± 4% (**Abb. 18**). Vergleichbare Resultate wurden erzielt bei Verwendung von Monozyten anstelle von AM als Wirtszelle (Daten nicht gezeigt).

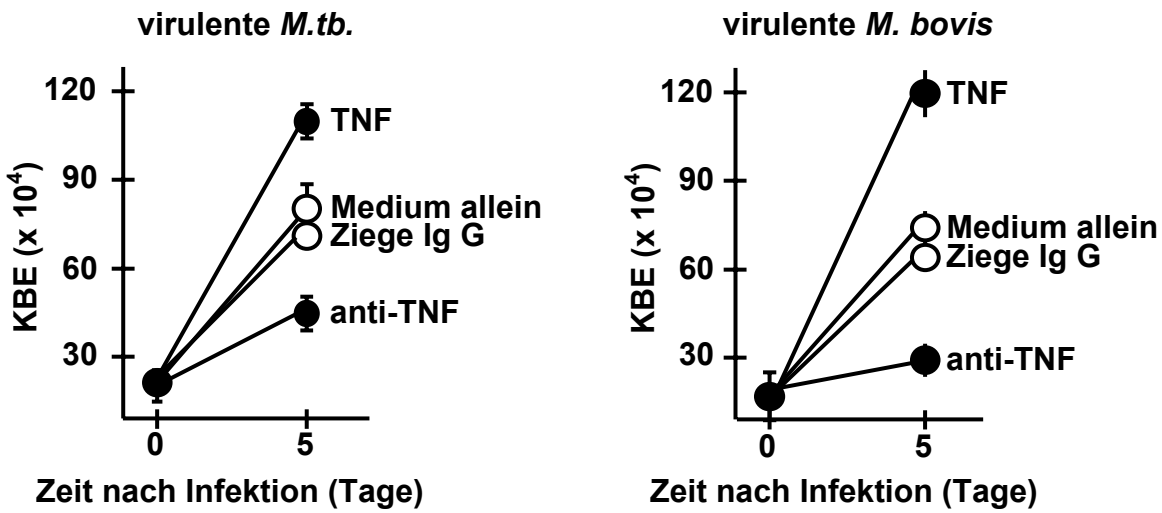


Abb. 18: TNF unterstützt das intrazelluläre Wachstum virulenter Mykobakterien in AM. AM wurden mit Mykobakterien infiziert (MOI 0,5) und für 4 Std. inkubiert. Nach Entfernung der extrazellulären Bakterien wurde TNF (20 ng/ml), anti-TNF (20 µg/ml) oder Ziege-IgG (20 µg/ml) zugegeben. Nach fünf Tagen wurden die Zellen lysiert und auf 7H11-Platten plattiert. Der Graph zeigt den Mittelwert aus acht unabhängige Experimente (Mittelwert ± SEM).

M. bovis BCG infizierte Zellen sowie AM, die mit dem avirulenten Stamm von *M. tuberculosis* infiziert wurden, wurden ebenfalls mit anti-TNF-Antikörpern wie auch mit exogenem TNF behandelt. Im Gegensatz zu den virulenten Mykobakterien inhibiert TNF das intrazelluläre Wachstum von avirulenten Bakterien in humanen AM, während es durch anti-TNF verstärkt wird (**Abb. 19**).

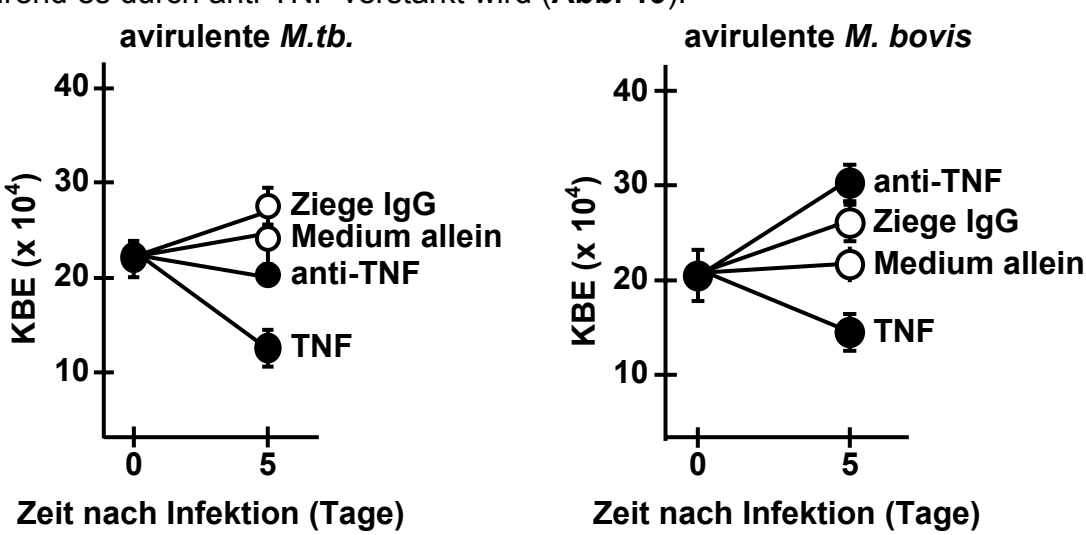


Abb. 19: TNF inhibiert das intrazelluläre Wachstum von avirulenten Mykobakterien in AM. AM wurden mit Mykobakterien infiziert (MOI 0,5) und für 4 Std. inkubiert. Nach Entfernung der extrazellulären Bakterien wurde TNF (20 ng/ml), anti-TNF (20 µg/ml) oder Ziege-IgG (20 µg/ml) zugegeben. Nach fünf Tagen wurden die Zellen lysiert und auf 7H11-Platten plattiert. Der Graph zeigt fünf unabhängige Experimente (Mittelwert ± SEM).

Unter Verwendung zweier weiterer Methoden (Bestimmung der metabolischen Aktivität der Mykobakterien durch Aufnahme von [^{3}H]-Uracil und Auramin-Rhodamin-Färbung infizierter AM und anschließende Fluoreszenzmikroskopie) wurden die Plattierungsergebnisse bestätigt. Es zeigte sich, dass in der Anwesenheit von anti-TNF-Antikörpern die Aufnahme von [^{3}H]-Uracil von 9487 ± 423 auf 4730 ± 301 cpm (50% Reduzierung) reduziert wurde. Bei Behandlung der infizierten AM mit exogenem TNF war eine Zunahme um 38% im Tritium-Einbau zu erkennen. Die Auramin-Rhodamin-Färbung erlaubt die direkte mikroskopische Quantifizierung der infizierten Zellen.

In Anwesenheit von anti-TNF-Antikörpern war eine Abnahme der Anzahl infizierter Zellen als auch der bakteriellen Beladung je Zelle zu beobachten. Hingegen war ein Anstieg der Anzahl infizierter AM von 49 ± 5% auf 68 ± 3% und der bakteriellen Beladung je Zelle von 8,2 ± 2 auf 12,9 ± 2,7 zu erkennen (**Tabelle 3**).

	Medium allein	**anti-TNF**	**TNF**
[^{3}H]-Uracil Aufnahme	9487 ± 423	4730 ± 301**	15256 ± 496**
infizierte Zellen (%)	49 ± 5	35 ± 3*	68 ± 3*
Bakterien / infizierte Zelle	8 ± 2	4 ± 1*	13 ± 3*

Tabelle 3: TNF unterstützt das Wachstum von *M. tuberculosis* in AM. AM wurden mit einem virulenten Stamm von *M. tuberculosis* in einem 8-Loch-Objektträger (für Auramin-Rhodamin-Färbung) oder in einer 24-Loch-Platte ([^{3}H]-Uracil Aufnahme) infiziert (MOI 1). Nach 4 Std. wurden die extrazellulären Mykobakterien weggewaschen und es wurde TNF (20 ng/ml) oder anti-TNF (20 µg/ml) zugegeben. Nach fünf Tagen Inkubation wurde die Anzahl an Bakterien bestimmt. Nach einem Tag waren 27 ± 7% der AM infiziert, sie hatten 2 ± 0,4 Bakterien phagozytiert und nahmen 740 ± 42 [^{3}H]-Uracil auf. Die Daten zeigen ein repräsentatives Experiment von vier. Alle Experimente wurden in Duplikaten angesetzt. Bei der Auramin-Rhodamin-Färbung wurden mindestens 400 Zellen ausgewertet. Beim [^{3}H]-Uracil- Versuch wurden Triplikate angesetzt. Eine Isotyp-Kontrolle (Ziege IgG, 20 µg/ml) hatte keinen Einfluss auf die [^{3}H]-Uracil-Aufnahme. Die Sterne indizieren den statisch signifikanten Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Kulturen (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

3.1.9. Induktion von Apoptose durch Infektion mit *M. tuberculosis*

Da unter ausgewählten Bedingungen die Infektion von AM mit *M. tuberculosis* zur Induktion von Apoptose in den Wirtszellen führen könnte [62, 63] wurde die Vitalität der infizierten AM unter unseren Versuchsbedingungen untersucht. Zur Messung der Apoptose in *M. tuberculosis* infizierten AM wurden zwei verschiedene Methoden angewandt (Annexin V - PE Färbung, Freisetzung zytoplasmatischer Nukleosomen). Unter unseren experimentellen Bedingungen konnte mit keiner dieser Methoden Apoptose in den infizierten AM nachgewiesen werden. Apoptose liess sich aber in

UV-bestrahlten Jurkat-Zellen (humane T-Lymphomzelllinie) sowohl mittels Annexin V-Färbung als auch im ELISA zeigen (**Abb. 20/21**).

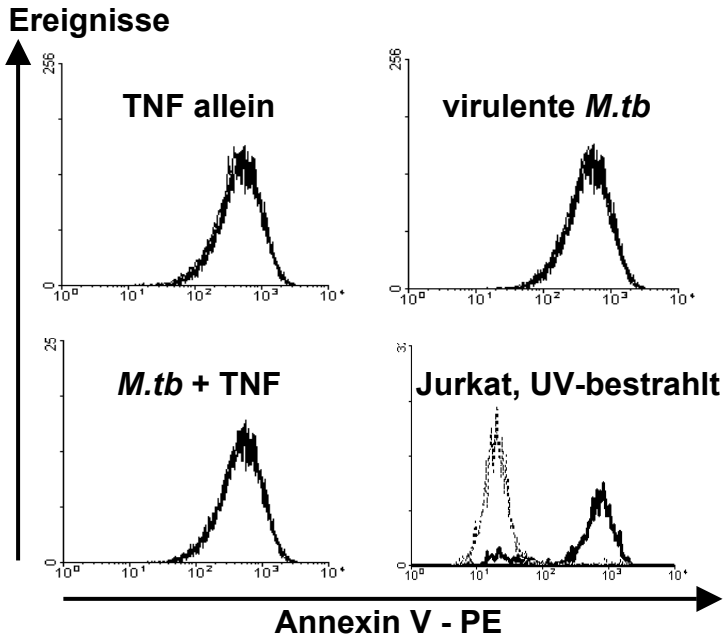


Abb. 20: TNF induziert keine Apoptose in infizierten AM. AM wurden infiziert mit virulenten *M. tuberculosis* (MOI 0,5) und für fünf Tage in An- oder Abwesenheit von TNF (20 ng/ml) inkubiert. AM wurden mit PBS/EDTA geerntet und für 15 Min. mit Annexin V - PE (5 µl) gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Graphen zeigen eine Überlagerung der behandelten (—) mit den unbehandelten Zellen (···). Die Jurkat-Zellen wurden für 60 Sek. UV-bestrahlt und anschließend für 4 Std. inkubiert. Sie dienten als Positiv-Kontrolle.

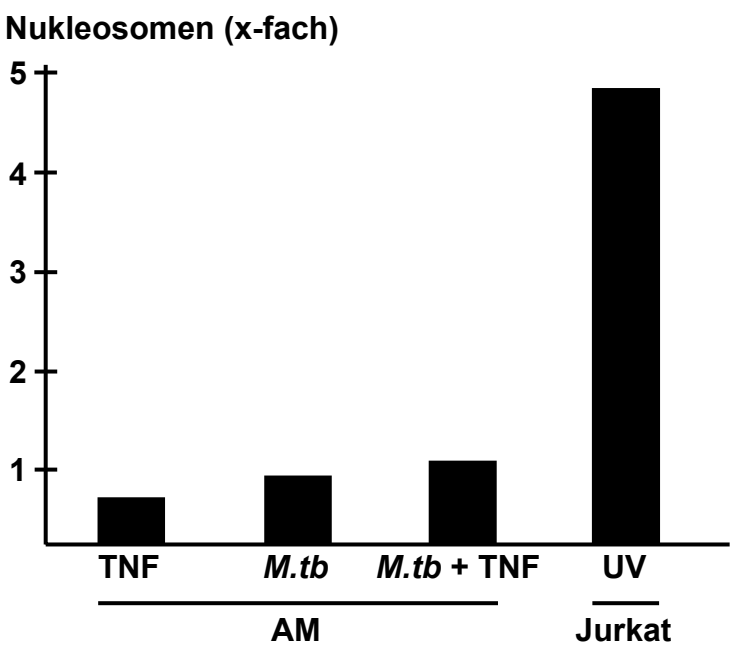


Abb. 21: TNF induziert keine Apoptose in infizierten AM. AM wurden infiziert und für fünf Tage in An- oder Abwesenheit von TNF (20 ng/ml) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Konzentration an zytoplasmatischen Nukleosomen wurde im ELISA bestimmt. Der Graph zeigt die x-fache Anreicherung an Nukleosomen in behandelten Zellen bezogen auf die unbehandelten Zellen. Berechnet wurde die x-fache Anreicherung mittels der Formel: OD_{405}(behandelte Zellen)/OD_{405}(unbehandelte Zellen). Der Graph zeigt ein repräsentatives Experiment von vier mit jeweils ähnlichen Ergebnissen. Die Jurkat-Zellen wurden für 60 Sek. UV-bestrahlt und anschließend für 4 Std. inkubiert.

3.2. Migration von Zellen auf Überstände von *M. tuberculosis* infizierten AM

Nach Inhalation der mykobakterienhaltigen Aerosole eines Patienten mit offener Tuberkulose erreichen die Mykobakterien die Alveolen der Kontaktperson. Die AM phagozytieren die Mykobakterien und initiieren eine Reihe von immunologischen Reaktionen. Unter anderem werden Zellen an den Infektionsort gelockt und bilden dort ein Granulom. Noch ist nicht geklärt, welche Zellen durch infizierte AM angelockt werden und welche Chemokine dafür verantwortlich sind. Um diese Fragen zu beantworten wurden AM mit *M. tuberculosis* infiziert. Nach 24 Std. Inkubation wurden die Überstände geerntet, steril filtriert und in einem Chemotaxis-Experiment eingesetzt.

3.2.1 Anlockung von Leukozyten durch Überstände von infizierten AM

Zur Untersuchung, welche Zellen durch Überstände infizierter AM angelockt werden, wurden frisch isolierte PBMCs eingesetzt. Nach einer Stunde Inkubation wurden die gewanderten Zellen geerntet, der Phänotyp bestimmt und der Migrationsfaktor, der sich aus der Anzahl spezifisch angelockter Zellen dividiert durch die Anzahl unspezifisch gewanderter Zellen zusammensetzt, berechnet.

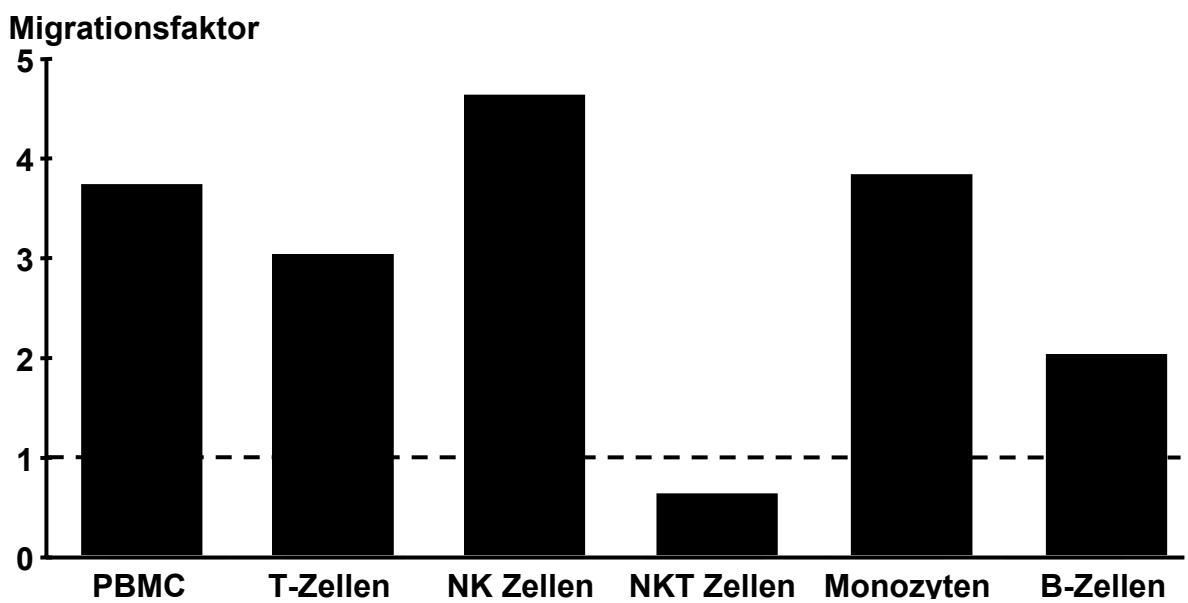


Abb. 22: Überstände von AM locken NK Zellen, T-Zellen, Monozyten und B-Zellen an. Nach 1 Std. wurden die migrierten Zellen (PBMCs gesunder Spender) geerntet. Diese Zellen wurden mit anti-CD3 - PerCP, anti-CD56 - APC, anti-CD14 - PE und anti-CD19 - APC markiert und die Anzahl gewanderter Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Der Graph zeigt ein repräsentatives Experiment von drei mit ähnlichen Ergebnissen.

Es zeigte sich, dass durch die Überstände von AM Gesamt-PBMCs, T-Zellen, NK Zellen, Monozyten und B-Zellen angelockt wurden. Die Migrationsfaktoren dieser Zellpopulationen betrugen für die PBMCs 4, für die T-Zellen 3, für die NK Zellen 5, für die Monozyten 4 und für die B-Zellen 2. Hingegen wanderten NKT Zellen nicht (**Abb. 22**). Auffällig war vor allem, dass auch NK Zellen, über deren Bedeutung bei der Immunabwehr gegen *M. tuberculosis* nur wenig bekannt ist, migrierten. Dieser neue Befund wurde in den folgenden Experimenten genauer analysiert.

3.2.2. Migrationsverhalten von NK Zellen

An 25 verschiedenen Spendern wurde überprüft, ob eine Infektion von AM mit *M. tuberculosis* zur Anlockung von NK Zellen führt. Bei elf der 25 Spendern war der Migrationsfaktor größer als zwei, bei zehn der 25 Spendern lag er zwischen eins und zwei und bei vier Spendern konnte keine Wanderung von NK Zellen beobachtet werden (**Abb. 23**). Die Migration von NK Zellen in Richtung von Überständen uninfizierter AM war zwar variabel, aber deutlich niedriger als in Richtung *M. tuberculosis*-induzierter Überstände. Auch uninfizierte AM sezernieren demzufolge Mediatoren, die chemotaktisch auf Zellen aus dem peripheren Blut wirken. Um sicherzustellen, dass die Wanderung von NK Zellen Chemokin-vermittelt ist, wurde die Signaltransduktion der Chemokinrezeptoren blockiert.

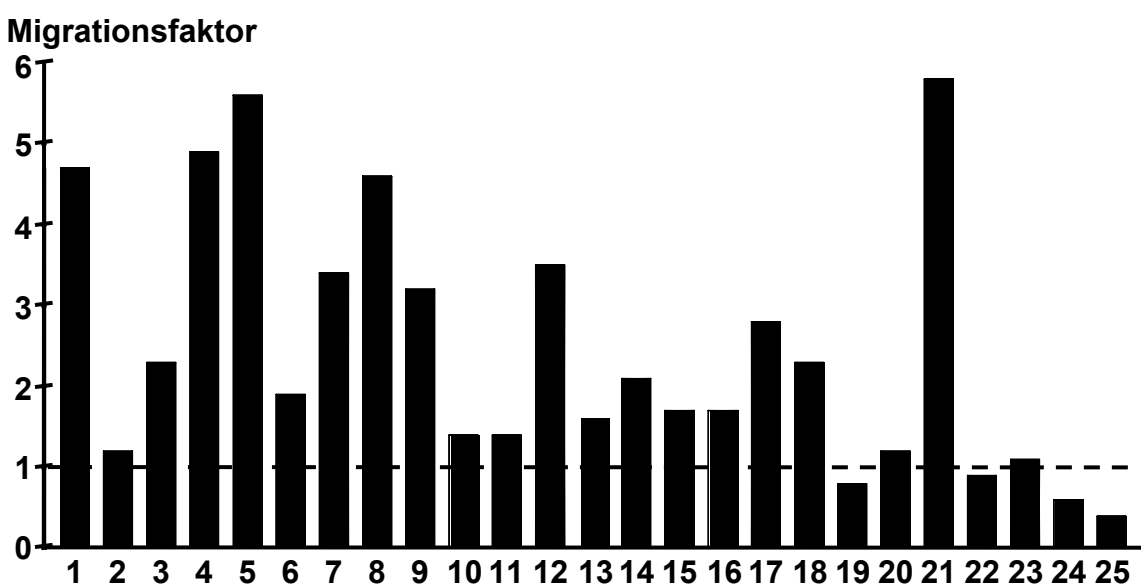


Abb. 23: Überstände von AM locken NK Zellen an. AM wurden mit virulenten *M. tuberculosis* infiziert (MOI 2,5) und für 24 Std. inkubiert. 29 µl Überstand wurden in einem Chemotaxis-Versuch eingesetzt. Nach 1 Std. wurden die migrierten Zellen geerntet und mit anti-CD56 - APC markiert. Diese Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.3. Beteiligung von Chemokinrezeptoren an der Wanderung von Lymphozyten

Pertussis Toxin (PTx) ist ein Toxin von *Bordetella pertussis*, welches die Signaltransduktion aller G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und somit auch die der Chemokinrezeptoren blockiert. Nach zwei-stündiger Vorinkubation der Zellen mit PTx wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in einen Migrationsversuch eingesetzt. Die Inkubation der Zellen mit PTx reduzierte die Anzahl der Zellen, die auf einen Überstand von infizierten AM wandern, um 49 ± 23%. Als Positivkontrolle wurde das Chemokin SLC verwendet, welches über den Chemokinrezeptor CCR 7 NK Zellen anlockt. Auch hier sank die Anzahl gewanderter Zellen bei Vorinkubation mit PTx auf ein Drittel im Vergleich zum unbehandelten Ansatz. Um toxische Effekte von PTx auszuschließen wurde IL-15 verwendet, welches NK Zellen Chemokinrezeptor-unabhängig anlockt [64]. Es zeigte sich, dass PTx keinen Einfluss auf das Wanderungsverhalten der Zellen hatte und somit PTx per se die Wanderung nicht hemmt (**Abb. 24**).

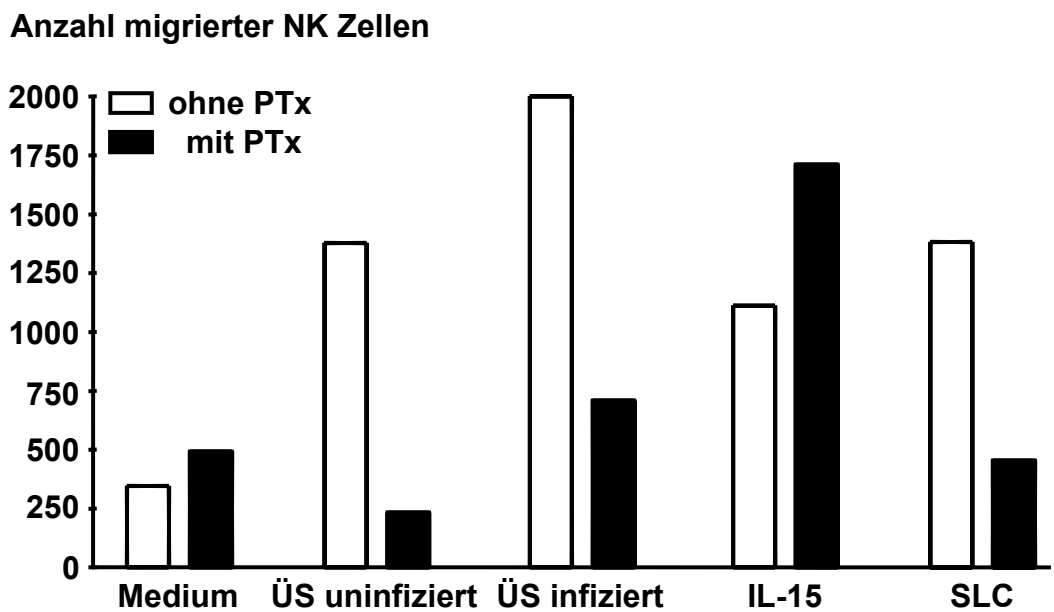


Abb. 24: Die Migration der NK Zellen ist PTx sensitiv. NK Zellen wurden mit oder ohne PTx (100 ng/ml) für 2 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen. 29 µl Überstand von 24 Std. mit *M. tuberculosis* infizierten und uninfizierten AM, 10 ng/ml IL-15, 1 µg/ml SLC wurden in die Kammern der Chemotaxis-Platte gegeben. Die Anzahl an gewanderten NK Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Der Graph zeigt ein repräsentatives Experiment von sechs mit ähnlichen Ergebnissen.

3.2.4. Anlockung von NK Zellen aus der bronchoalveolären Lavage

Da die Tuberkulose vor allem eine Erkrankung der Lunge ist, wurde jetzt die Anlockung von NK Zellen aus der BAL durch Überstände infizierter AM untersucht.

Nicht-adhärente Zellen der Lungenspülflüssigkeit wurden auf die Membran der Chemotaxis-Platte gegeben. Nach 1 Std. wurden die gewanderten Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert. Bei fünf von sieben Spendern kam es zu einer Wanderung von NK Zellen. Die Migrationsfaktoren bei diesen fünf Spendern waren größer als zwei, was auf eine spezifische Wanderung der alveolären NK Zellen hinweist. Bei zwei von den sieben Spendern war der Migrationsfaktor kleiner als zwei (**Abb. 25**). Überstände von uninfizierten AM lockten ebenfalls alveoläre NK Zellen an, aber mit geringeren Migrationsfaktoren (Daten nicht gezeigt). Zusätzliche Experimente mit unterschiedlichen unabhängigen Spendern werden die statistische Aussagekraft der bisherigen Befunde klären.

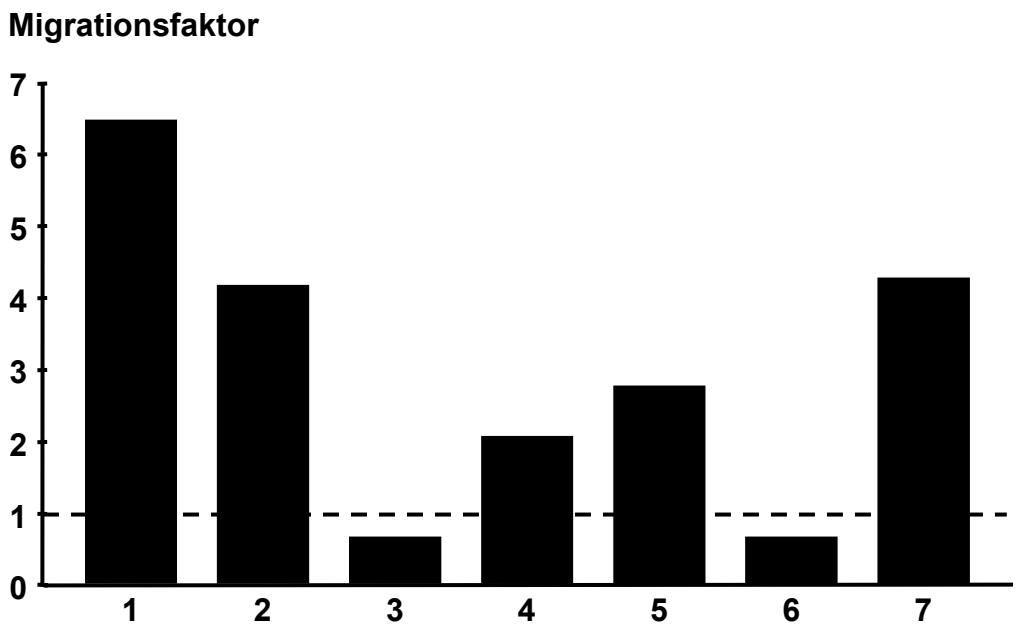


Abb. 25: Anlockung von NK Zellen aus der Lunge durch Überstände von AM. Auf die Membran der Chemotaxis-Platte wurden 1,5 x 10^5 nicht-adhärente Zellen aus der BAL auf jede Kammer gegeben. Die gewanderten Zellen wurden mit anti-CD56 - APC markiert und die Anzahl gewanderter Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Abbildung zeigt sieben unabhängige Experimente mit unterschiedlichen Spendern.

3.2.5. Anlockung Granulysin-exprimierender Zellen

Es stellte sich nun die Frage, ob die Überstände von *M. tuberculosis*-infizierten AM Zellen anlocken, die eine antimikrobielle Aktivität gegen Mykobakterien ausüben könnten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die gewanderten Zellen (PBMC) auf die Expression von Granulysin untersucht. Es zeigte sich, dass bei sechs von zehn Spendern eine Anlockung mit einem Migrationsfaktor größer als zwei zu beobachten war und bei den verbliebenen vier Spendern der Faktor zwischen eins und zwei lag

(**Abb. 26**). Dies zeigt, dass es zu einer unterschiedlich starken Anlockung von Granulysin-exprimierenden Zellen kommt.

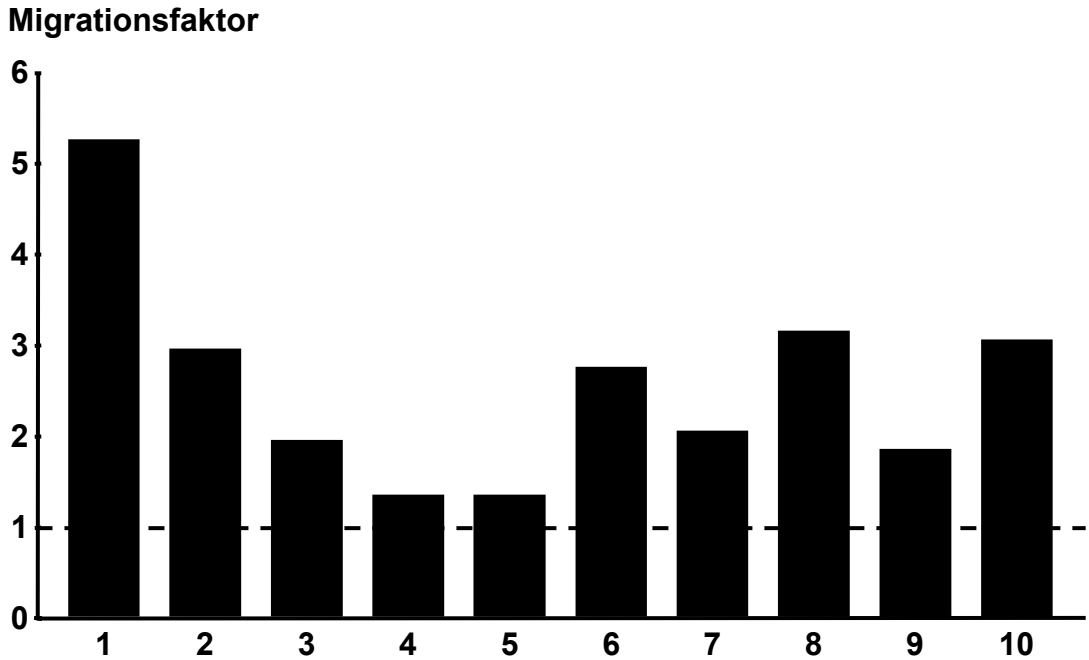


Abb. 26: Anlockung Granulysin-exprimierender Zellen durch Überstände von AM. Überstände von infizierten AM wurden in einem Chemotaxis-Versuch eingesetzt. Die gewanderten Zellen wurden mit einem polyklonalen anti-Granulysin Antikörper markiert und im Durchflusszytometer quantifiziert.

3.2.6. Migration Granulysin-exprimierender NK Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob die gewanderten Granulysin-positiven Zellen zu der Population der NK Zellen gehört. Dazu wurde eine Doppelfärbung der gewanderten Zellen mit Granulysin und dem NK Zellmarker CD56 durchgeführt. Es zeigte sich, dass von den 50% Granulysin-positiven Zellen (Summe aus den beiden oberen Quadranten) nur 20% NK Zellen (oberer rechter Quadrant) waren. Ein Großteil der Granulysin-positiven Zellen (80%) war CD56 negativ (**Abb. 27**). Derzeit laufende Experimente sollen klären, welcher Lymphozytenpopulation die übrigen Granulysin-positiven Zellen zuzuordnen sind.

An zehn verschiedenen Spendern wurde untersucht, ob infizierte AM Granulysin-exprimierende NK Zellen anlocken. Bei zwei Spendern wurde eine Anlockung von Granulysin-exprimierenden NK Zellen mit einem Migrationsfaktor größer als zwei beobachtet, bei den anderen acht Spendern lag der Faktor zwischen eins und zwei (**Abb. 28**). Dieses Ergebnis lässt keine eindeutige Aussage über das Migrationsverhalten von Granulysin-exprimierenden NK Zellen zu.

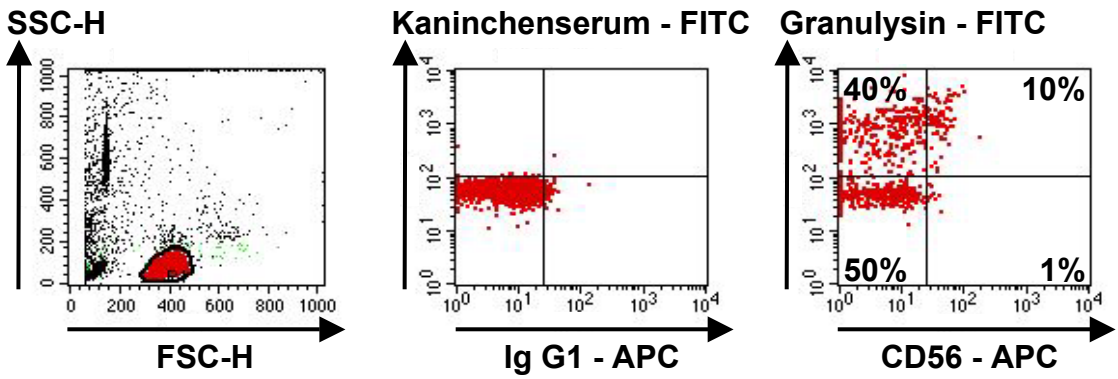


Abb. 27: Anlockung Granulysin-exprimierender NK Zellen. Die migrierten Zellen wurden mit anti-CD56 - APC und anti-Granulysin Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer aufgenommen und analysiert. Der Graph zeigt auf der x-Achse die NK Zell-Färbung und auf der y-Achse die Granulysin-Färbung. Diese Abbildung ist eine repräsentative Färbung von zehn.

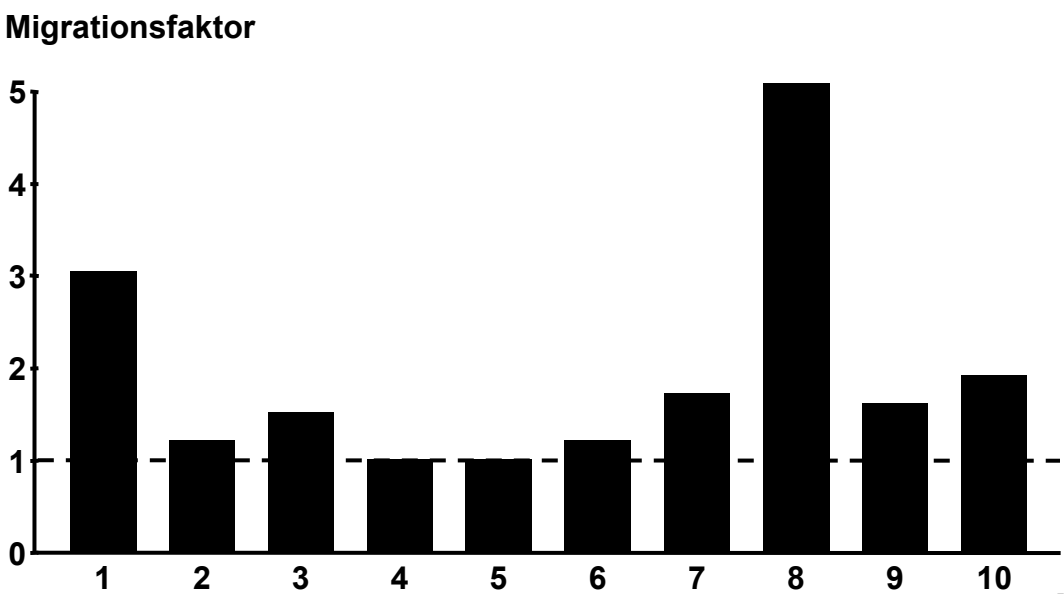


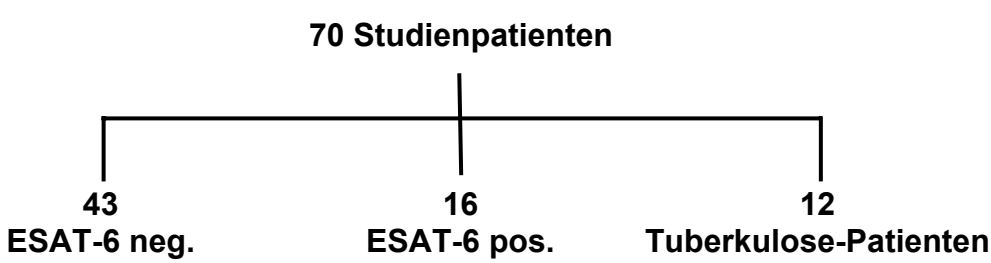
Abb. 28: Anlockung Granulysin-exprimierender NK Zellen durch Überstände von AM. 1,5 x 10^5 frisch PBMCs von zehn verschiedenen Spendern wurden in die obere Kammer der Chemotaxis-Platte gegeben und die Migration in Richtung von Überständen infizierter AM bestimmt. Die migrierten Zellen wurden geerntet und mit anti-CD56 - APC und anti-Granulysin Antikörpern markiert. Im Durchflusszytometer wurde die Anzahl gewanderter Zellen bestimmt.

3.2.7. Vergleich der Migration von Zellen bei Tuberkulose-Patienten und gesunden Spendern

Die Migration von Lymphozyten ist entscheidend für die Entwicklung von Granulomen und somit für den Schutz vor einer Ausbreitung der Tuberkulose. Wir überprüften daher die Hypothese, dass die Wanderung von Lymphozyten bei Tuberkulose-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern verändert ist. Da die epidemiologische Situation in Deutschland eine derartige klinische Studie nicht

erlaubt, etablierten wir eine Zusammenarbeit mit dem Medical Research Council (MRC) in Fajara, Gambia (Afrika).

Gambia ist ein kleines westafrikanisches Land in der Mitte von Senegal mit direktem Zugang zum atlantischen Ozean. Auf 11.300 km^2 leben ca. 1,5 Millionen Menschen. Die Tuberkulose hat in diesem Land eine Inzidenzrate von 94 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner und ist somit zehnfach höher als in Deutschland. Jährlich kommen 8-10% pro 1.000 Einwohner neue Tuberkulose-Patienten mit gleichzeitiger HIV-Infektion hinzu [65]. Am MRC in Fajara liegt ein Forschungsschwerpunkt bei der Tuberkulose. Eine große Studie über Tuberkulose-Patienten und deren Kontaktpersonen, die im sozialen Verbund der Großfamilie leben, wurde von diesem Institut initiiert. In naher Zukunft wird eine klinische Phase I Studie gestartet, in der ein neuer Impfstoff erprobt wird. Im Gegenzug zu dem für die Tuberkulose-Studie erforderlichen Blut, erhalten die Menschen kostenlose medizinische Versorgung. Von den Personen werden aus dem Blut die PBMCs isoliert und verschiedene Parameter mittels ELIspot, Durchflusszytometrie und PCR untersucht. Unter anderem wird die Reaktivität auf das mykobakterielle Antigen ESAT-6 bestimmt, um festzustellen, ob die Patienten schon einmal Kontakt mit *M. tuberculosis* hatten. Da die Menschen in Gambia geimpft wurden ist eine Aussage mittels PPD (Mendel-Mentoux-Test oder TINE-Test) nicht möglich. Im Gegensatz zur klassischen Tuberkulinprobe führt die Injektion von ESAT-6 bei *M. bovis BCG* geimpften Personen nicht zu einer positiven Hautreaktion. Aus diesen Daten und den klinischen Befunden konnten so die Studienpatienten in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Zum einen gibt es Kontaktpersonen, die gesund und ESAT-6 negativ waren. Zum anderen gibt es Kontaktpersonen, die gesund und ESAT-6 positiv waren. Und schließlich gibt es die Gruppe der Patienten mit offener Lungentuberkulose (positiver mikroskopischer und kultureller Nachweis).



Die Wanderung frisch isolierter PBMCs dieser drei Studiengruppen wurde in Richtung der chemotaktischen Stimuli RANTES und MCP-1 bestimmt, da diese nach Infektion von Makrophagen mit *M. tuberculosis* sezerniert werden und in der BAL von

Tuberkulose-Patienten vorhanden sind [20, 21, 42].

Bei Verwendung von RANTES als chemotaktischen Stimulus war eine sehr hohe Spendervariabilität in den Migrationsfaktoren zu beobachten. Es wurden Werte von 0 bis 25 erhalten. Auf RANTES konnte keine Migration und kein Unterschied zwischen den einzelnen Studiengruppen festgestellt werden (**Tabelle 4**, **Abb. 29**).

Studiengruppe	PBMC	T-Zellen	CD4+ T-Zellen	CD8+ T-Zellen	DN T-Zellen	NK Zellen	NKT Zellen
ESAT-6 neg.	1,1 ± 0,9 1,0	1,2 ± 0,8 1,1	1,2 ± 1,1 0,9	1,7 ± 2,9 1,1	1,5 ± 2,1 0,9	1,1 ± 1,5 0,7	1,8 ± 4,1 0,8
ESAT-6 pos.	1,0 ± 0,5 1,1	1,9 ± 2,5 1,2	2,3 ± 3,1 1,2	1,5 ± 2,1 0,7	0,9 ± 1,3 0,8	1,8 ± 1,9 1,2	2,2 ± 2,2 1,0
Tuberkulose-Patienten	1,0 ± 0,4 1,0	1,4 ± 1,3 1,2	1,0 ± 0,9 0,8	1,8 ± 2,0 1,1	1,0 ± 1,1 0,9	1,0 ± 0,9 1,0	2,7 ± 3,6 1,0

Tabelle 4: Chemotaktische Anlockung der Zellen durch RANTES. Es wurde 100 ng/ml RANTES als chemotaktischer Stimulus verwendet. Nach einer Std. Inkubation wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer quantifiziert. Die Tabelle fasst die Migrationsfaktoren der drei verschiedenen Studiengruppen zusammen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD in den oberen Zeilen und darunter die dazugehörigen Mediane. Die ESAT-6 negative Studiengruppe umfasste 38, die ESAT-6 positive Gruppe 15 und die Gruppe der Tuberkulose-Patienten 10 Spender.

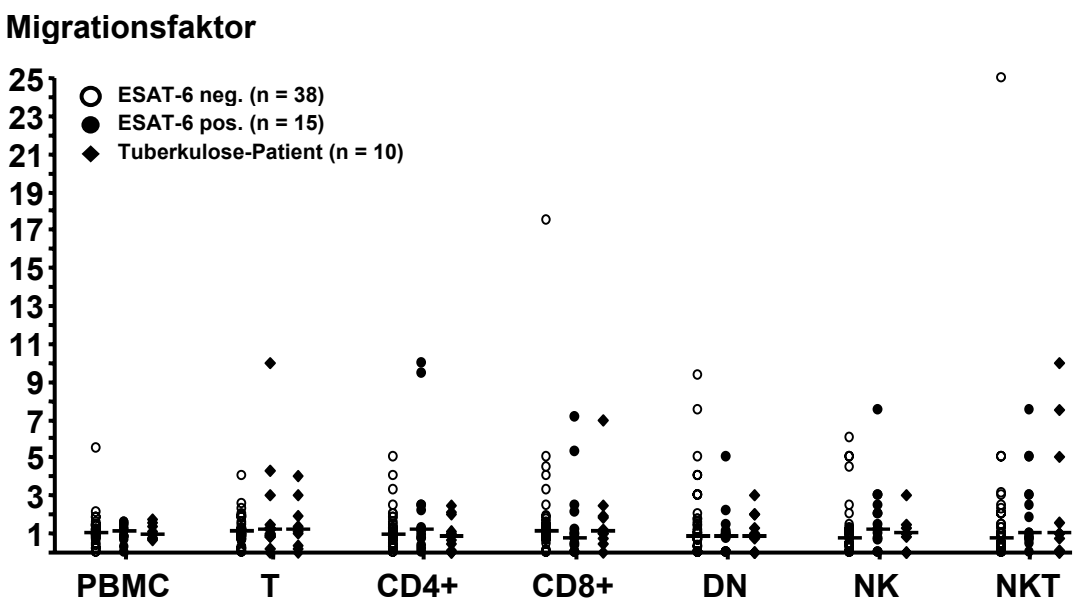


Abb. 29: Migration von Zellen auf RANTES. 1,5 x 10^5 frisch isolierte humane PBMCs der drei Personengruppen wurden durch 100 ng/ml RANTES chemotaktisch angelockt. Nach einer Std. wurden die migrierten Zellen geerntet, auf CD56 - APC gefärbt und im Durchflusszytometer quantifiziert.

Im Gegensatz dazu wurde eine Migration der Zellen auf MCP-1 beobachtet. Ach hier gab es extreme Schwankungen der Migrationsfaktoren (0 - 313). Besonders die CD4+ T-Zellen werden durch MCP-1 angelockt. In der Studiengruppe der ESAT-6 negativen Probanden betrug der Migrationsfaktor 29,0 ± 60,7 (Median: 5,7), in der Gruppe der ESAT-6 positiven war er 69,5 ± 96,2 (Median: 16,2) und bei den Tuberkulose-Patienten betrug er 19,0 ± 18,3 (Median: 10,3). Aufgrund der fehlenden

statistischen Signifikanz zeigt sich kein Unterschied in der Migrationsfähigkeit der drei Personengruppen auf das Chemokin MCP-1 (**Tabelle 5**, **Abb. 30**).

Studiengruppe	PBMC	T-Zellen	CD4+ T-Zellen	CD8+ T-Zellen	DN T-Zellen	NK Zellen	NKT Zellen
ESAT-6 neg.	12,2 ± 14,3 3,8	11,1 ± 14,5 4,7	29,0 ± 60,7 5,7	5,0 ± 10,0 2,4	4,4 ± 8,7 2,0	9,3 ± 15,4 2,3	4,9 ± 7,9 2,0
ESAT-6 pos.	13,1 ± 13,6 8,5	30,8 ± 51,0 9,0	69,5 ± 96,2 16,2	6,7 ± 7,5 2,4	9,7 ± 6,73 2,0	21,4 ± 32,5 4,7	5,6 ± 6,3 3,0
Tuberkulose-Patienten	7,2 ± 7,2 5,8	11,3 ± 17,0 6,2	19,0 ± 18,3 10,3	2,6 ± 2,9 1,4	1,4 ± 1,9 1,0	6,2 ± 8,8 3,2	4,2 ± 6,3 1,0

Tabelle 5: Chemotaktische Anlockung der Zellen durch MCP-1. Es wurde 100 ng/ml MCP-1 als chemotaktischer Stimulus verwendet. Nach einer Std. Inkubation wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer quantifiziert. Die Tabelle zeigt die Migrationsfaktoren (obere Zeile: Mittelwerte ± SD, untere Zeile: Median) der drei verschiedenen Studiengruppen. Die ESAT-6 negative Studiengruppe umfasste 38, die ESAT-6 positive Gruppe 15 und die Gruppe der Tuberkulose-Patienten 10 Spender.

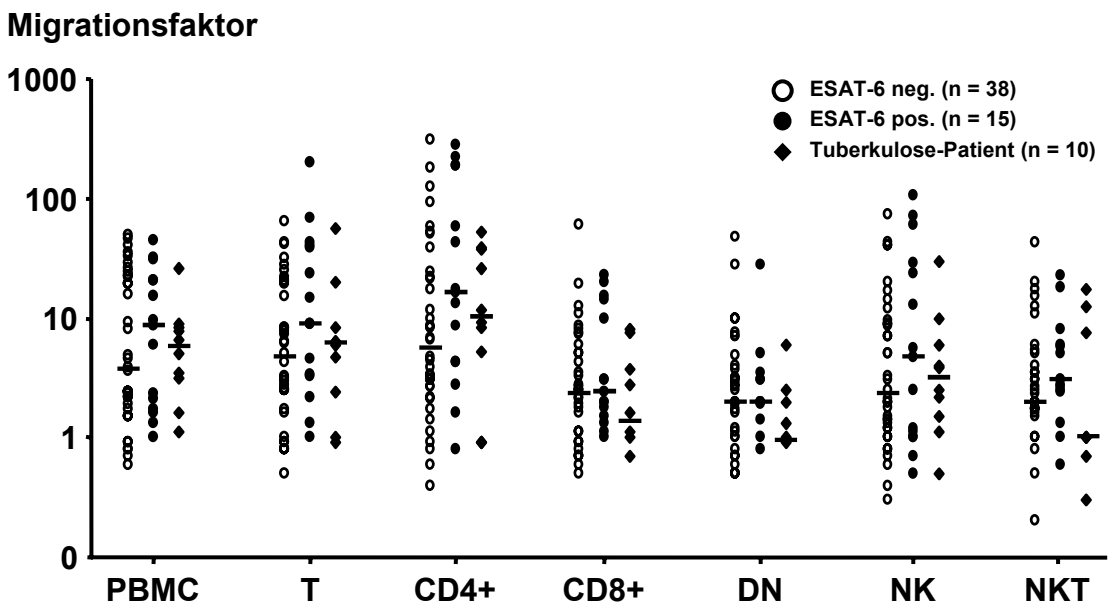


Abb. 30: Migration von Zellen auf MCP-1. Als chemotaktischer Stimulus diente 100 ng/ml MCP-1. Nach einer Std. Inkubation wurden die migrierten Zellen geerntet, auf CD56 - APC gefärbt und im Durchflusszytometer quantifiziert.

Damit Chemokine ihre Wirkung entfalten können, ist es erforderlich, dass die Zellen die entsprechenden Chemokinrezeptoren exprimieren. MCP-1 bindet an die Rezeptoren CCR 1, CCR 2, CCR 4, CCR 9 und CCR 10. Die Chemokinrezeptoren CCR 1, CCR 3, CCR 4, CCR 5, CCR 9 und CCR 10 haben als Liganden RANTES. Eine Oberflächenfärbung der Chemokinrezeptoren CCR 1, CCR 3, CCR 4, CCR 5, und CCR 7 auf PBMCs zeigte, dass es Zellen gibt, auf denen CCR 4, CCR 5 und CCR 7 exprimiert wird. Es gibt dagegen nahezu keine CCR 1- und CCR 3-exprimierenden Zellen. Zwischen 0,1 ± 0,3% und 0,2 ± 0,4% (Median jeweils: 0%) der Zellen exprimierten CCR 1. Vergleichbare Werte erhielt man für die Expression von CCR 3. Bei der Expression von CCR 4 waren in der ESAT-6 negativen Gruppe

3,7 ± 2,0% (Median: 3,3%), in der ESAT-6 positiven Gruppe 3,6 ± 2,9% (Median: 2,7%) und in der Gruppe der Tuberkulose-Patienten 11,1 ± 15,4% (Median: 5,3%) der Zellen positiv. In der ESAT-6 negativen Studiengruppe exprimierten 2,0 ± 1,8% (Median: 1,7%), in der ESAT-6 positiven Gruppe 2,7 ± 1,4% (Median: 2,9%) und in der Patienten-Gruppe 2,1 ± 2,1% (Median: 1,4%) der Zellen CCR 5. Die Expression von CCR 7 war deutlich höher als die der anderen Rezeptoren. 31,3 ± 19,3% (Median: 29,3%) der Zellen aus der Kontrollgruppe, 27,6 ± 26,8% (Median: 18,3%) aus der Gruppe, die schon Kontakt mit *M. tuberculosis* hatte und 20,8 ± 15,1% (Median: 21,8%) aus der Tuberkulose-Gruppe exprimierten CCR 7. Es waren jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen festzustellen, was die fehlenden Unterschiede in den Migrations-Versuchen bestätigt. Auffällig waren auch die extremen interindividuellen Unterschiede in der Expression der einzelnen Rezeptoren (**Tabelle 6**, **Abb. 31**).

Studiengruppe	CCR 1 [%]	CCR 3 [%]	CCR 4 [%]	CCR 5 [%]	CCR 7 [%]
ESAT-6 neg.	0,2 ± 0,4 0	0,2 ± 0,4 0	3,7 ± 2,0 3,3	2,0 ± 1,8 1,7	31,3 ± 19,3 29,3
ESAT-6 pos.	0,1 ± 0,2 0	0,1 ± 0,2 0,1	3,6 ± 2,9 2,7	2,7 ± 1,4 2,9	27,6 ± 26,8 18,3
Tuberkulose-Patienten	0,1 ± 0,3 0	0,2 ± 0,2 0,1	11,1 ± 15,4 5,3	2,1 ± 2,1 1,4	20,8 ± 15,1 21,8

Tabelle 6: Expression von Chemokinrezeptoren auf PBMCs. Die Tabelle stellt die Anzahl der Zellen dar, welche die jeweiligen Rezeptoren exprimieren. Die obere Zeile gibt die Mittelwerte ± SD und die untere Zeile die jeweiligen Mediane wieder. Die einzelnen Studiengruppen umfassten für die ESAT-6 negative Gruppe 43, für die ESAT-6 positive Gruppe 16 und für die Tuberkulose-Gruppe 12 Spender.

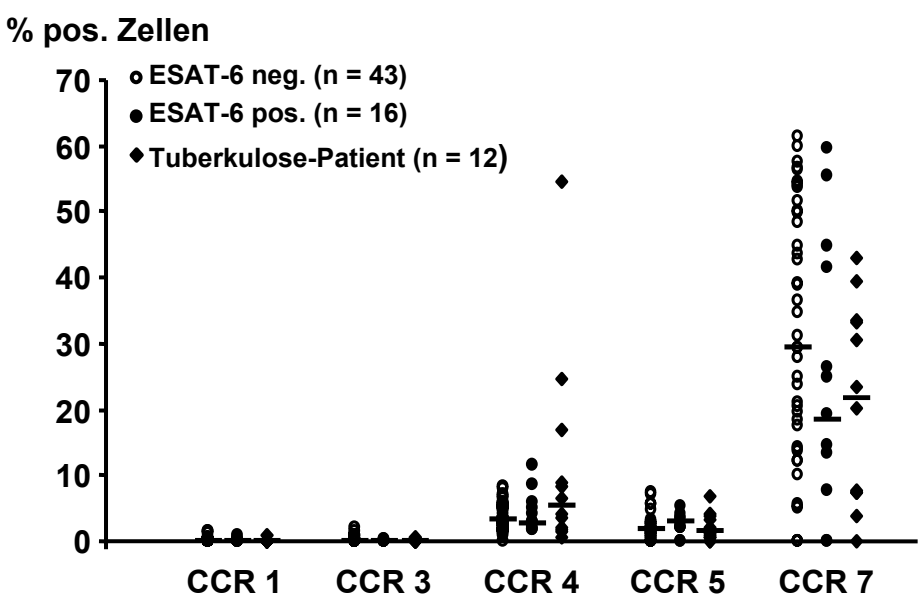


Abb. 31: Expression von Chemokinrezeptoren auf PBMCs von Tuberkulose-Patienten und ihren Kontaktpersonen. Frisch isolierte PBMCs der drei Personengruppen wurden mit CCR 1 - PE, CCR 3 - FITC, CCR 4 - PE, CCR 5 - PE und CCR 7 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. CCR 7 wurde mit einem Ziege-anti-Maus IgM - FITC Zweitantikörper markiert.

Gründe hierfür sind die individuellen genetischen, sozialen und gesundheitlichen Unterschiede in den Probanden und die z.T. auftretenden technischen Probleme durch Verwendung von unkonjugierten IgM Erstantikörpern bei der CCR 7-Färbung.
Ein entscheidendes Ziel des Forschungsaufenthaltes in Gambia war auch die Asservierung von in Deutschland nicht verfügbaren Patientenmaterial. So konnte von allen 71 Spendern, von denen die Details der Krankengeschichte gut dokumentiert sind, Serum gewonnen werden. In Anlehnung an die im ersten Teil dieser Arbeit geschilderten Experimente, wurden primäre Monozyten der Spender mit *M. tuberculosis* infiziert und der Überstand nach 24 Std. asserviert. Diese Überstände stehen jetzt für vergleichende Untersuchungen über die Anlockung von NK Zellen zur Verfügung.

3.3. Induktion antibakterieller Aktivität gegen *M. tuberculosis* durch Toll-like-Rezeptoren

Mikrobielle Liganden wie LPS und bakterielle Lipoproteine binden an die TLR der Säuger und führen dadurch zur Transkription von Genen, darunter Zytokine und kostimulatorische Moleküle, welche die erworbene Immunantwort regulieren [66-70]. Bislang blieb jedoch die Frage offen, ob die Aktivierung von TLR auch beim Menschen antimikrobielle Effektormechanismen induziert.

3.3.1. Einfluss des Wachstums von *M. tuberculosis* in humanen AM durch bakterielle Lipoproteine

Zunächst wurde der Einfluss des 19 kDa Lipoproteins, ein mykobakterieller Zellwandbestandteil, der TLR-abhängig Monozyten aktiviert, auf das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* untersucht. Dazu wurden AM aus der BAL aufgereinigt, mit *M. tuberculosis* infiziert und mit dem 19 kDa Lipoprotein für 48 Std. inkubiert. Durch Zählung der KBE wurde die Anzahl lebendiger Mykobakterien bestimmt. Eine Stimulation infizierter AM mit Lipoprotein induzierte eine antimykobakterielle Aktivität (**Abb. 32**). Die Anzahl intrazellulärer Mykobakterien sank

von 18 ± 2 x 10^4 auf 8 ± 2 x 10^4 ab.

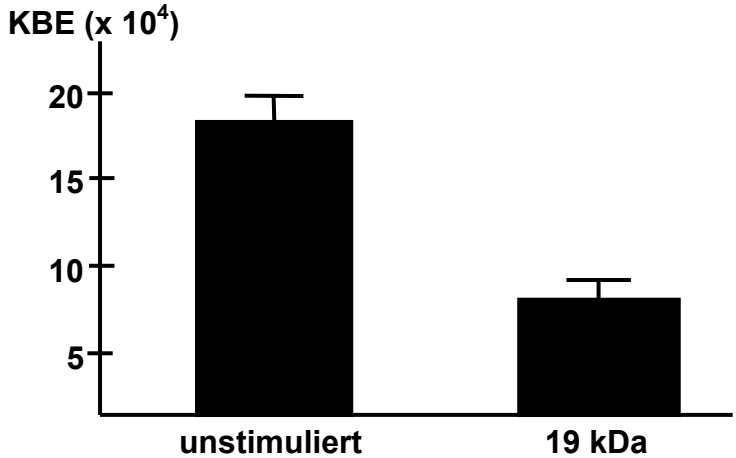


Abb. 32: Inhibition des Wachstums von *M. tuberculosis* in humanen AM durch das 19 kDa Lipoprotein. AM wurden mit *M. tuberculosis* für 4 Std. infiziert (MOI 2). Danach wurde das 19 kDa Lipoprotein (1 µg/ml) zugegeben. Nach 48 Std. wurden die Zellen lysiert und die Lysate auf 7H11-Platten plattiert. Drei Wochen später wurden die KBE gezählt und das intrazelluläre Wachstum bestimmt. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus vier Experimenten mit unterschiedlichen Spendern. Die Daten sind als KBE ± SEM angegeben.

Um zu überprüfen, ob die antimykobakterielle Aktivität durch TLR 2 vermittelt ist, wurde das gleiche Experiment in Anwesenheit eines anti-TLR 2-Antikörpers durchgeführt. Die Anzahl der KBE stieg dadurch auf 13 ± 2 x 10^4 Kolonien an und erreichte damit wieder den Ausgangswert. Der Einsatz eines Kontroll IgG-Antikörpers hatte keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität des 19 kDa Lipoproteins (**Abb. 33**). Es stellte sich nun die Frage, welche antibakteriellen Effektormechanismen durch Bindung des Lipoproteins an TLR 2 induziert werden.

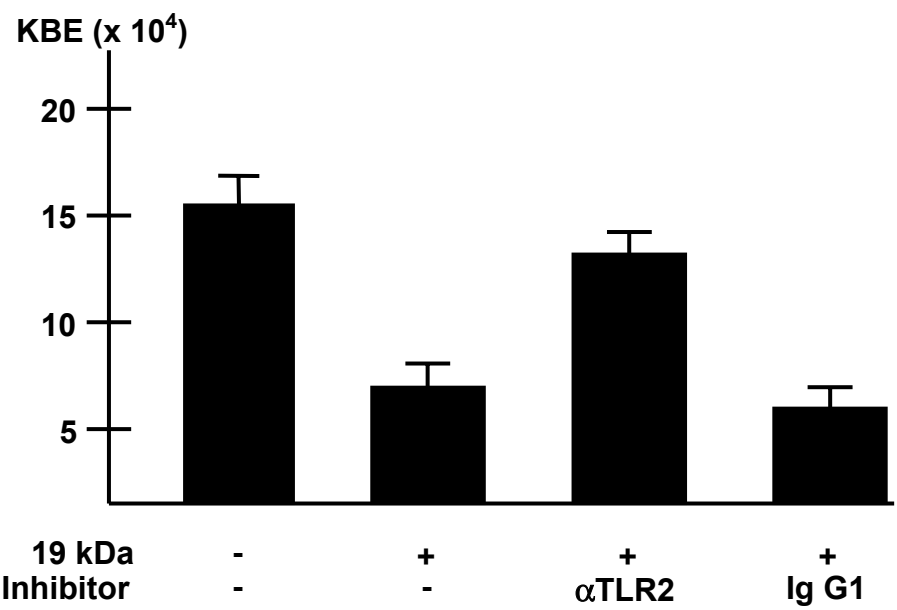


Abb. 33: TLR2-abhänigige antimykobakterielle Aktivität des 19 kDa Lipoproteins. Infizierte AM (MOI 2) wurden mit 19 kDa Lipoprotein (1 µg/ml) stimuliert und in An- oder Abwesenheit von anti-TLR2 Antikörpern (10 µg/ml) für 48 Std. inkubiert. Danach wurden die Zelllysate plattiert und die KBE gezählt und das intrazelluläre Wachstum bestimmt. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus vier Experimenten mit unterschiedlichen Spendern. Die Daten sind als KBE ± SEM angegeben.

3.3.2. Identifikation des Effektormoleküls der 19 kDa Lipoprotein vermittelten antimykobakteriellen Aktivität

Als potentielle Abwehrmechanismen, die durch die TLR 2-Signalkaskade induziert werden, kommen vor allem die Induktion von Tryptophan-abbauenden Enzymen (Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO)), die Bildung von NO durch die induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS) oder die Sekretion von TNF in Frage.

Um zu untersuchen, ob die Abbauprodukte von Tryptophan für die antimikrobielle Aktivität verantwortlich sind, wurden die AM mit *M. tuberculosis* infiziert und mit dem 19 kDa Lipoprotein und 6-Chloro-D,L-Tryptophan (6-CDLT), ein Tryptophan-Analogon, welches die IDO inhibiert, koinkubiert. Nach 48 Std. wurden die Zellen lysiert und plattiert. Die Anzahl der KBE sank bei der unstimulierten Kontrolle auf 37% ab, unabhängig von einer Inkubation mit 6-CDLT (**Abb. 34**).

L-N^6-(1-Iminoethyl)-Lysin (L-NIL) ist ein Inhibitor der iNOS und verhindert die Entstehung von NO. Die Inkubation der *M. tuberculosis*-infizierten und 19 kDa Lipoprotein-stimulierten AM mit L-NIL hatte aber keinen Einfluss auf das Wachstum der Mykobakterien. Es ist eine Reduktion der KBE auf das Niveau der nur mit 19 kDa Lipoprotein stimulierten Probe (63% Reduktion) zu beobachten (**Abb. 34**).

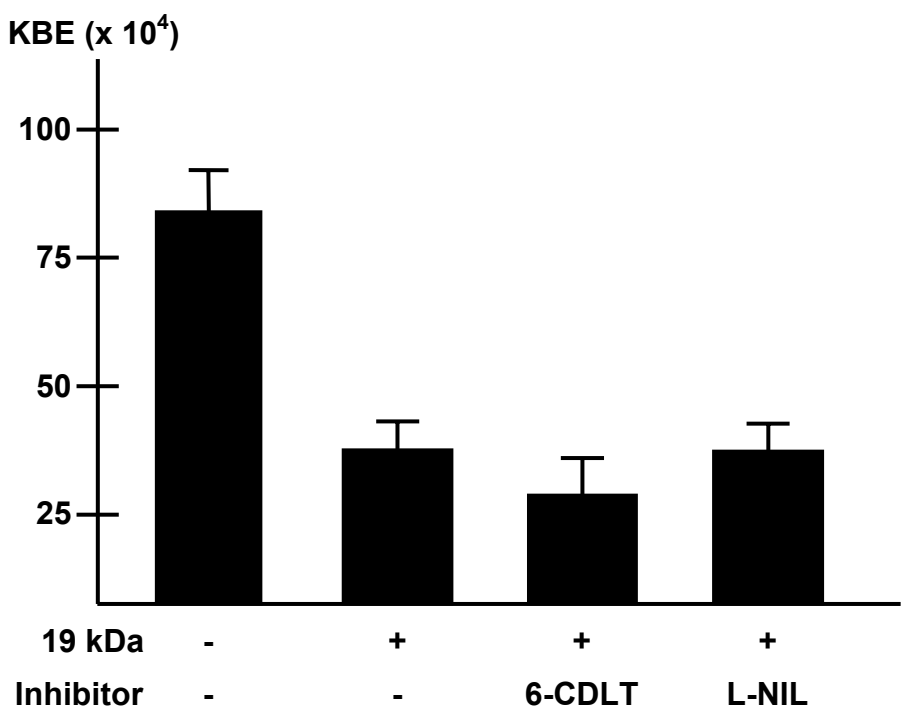


Abb. 34: Tryptophan und NO unabhängige antimykobakterielle Aktivität des 19 kDa Lipoproteins. AM wurden mit *M. tuberculosis* für 4 Std. infiziert (MOI 2). Danach wurde das 19 kDa Lipoprotein (1 µg/ml) zugegeben und für 48 Std. in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren (6-CDLT 0,8 mM, L-NIL 1mM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lysate auf 7H11-Platten plattiert. Drei Wochen später wurden die KBE bestimmt. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus vier Experimenten mit unterschiedlichen Spendern. Die Daten sind als KBE ± SEM angegeben.

Da TNF das Wachstum von Mykobakterien bei der Maus beeinflusst, wurde jetzt untersucht, ob dieses Zytokin das Abtöten der Bakterien auch im Menschen vermittelt. Dazu wurden die infizierten Zellen mit dem 19 kDa Lipoprotein und einem anti-TNF-Antikörper koinkubiert. Die Zugabe von anti-TNF-Antikörpern hatte keinen Einfluss auf die durch das 19 kDa Lipoprotein induzierte Wachstumsinhibierung von Mykobakterien. Nach 48 Std. stieg die Anzahl der KBE mit Medium allein von 6 x 10^4 auf 92 x 10^4 an. Durch Inkubation mit 19 kDa Lipoprotein allein oder in Kombination mit anti-TNF-Antikörpern konnte das Wachstum der Mykobakterien inhibiert werden. Die Anzahl der KBE nach 48 Std. war nur um das 2,5-fache gegenüber dem Ausgangswert angestiegen (**Abb. 35**).

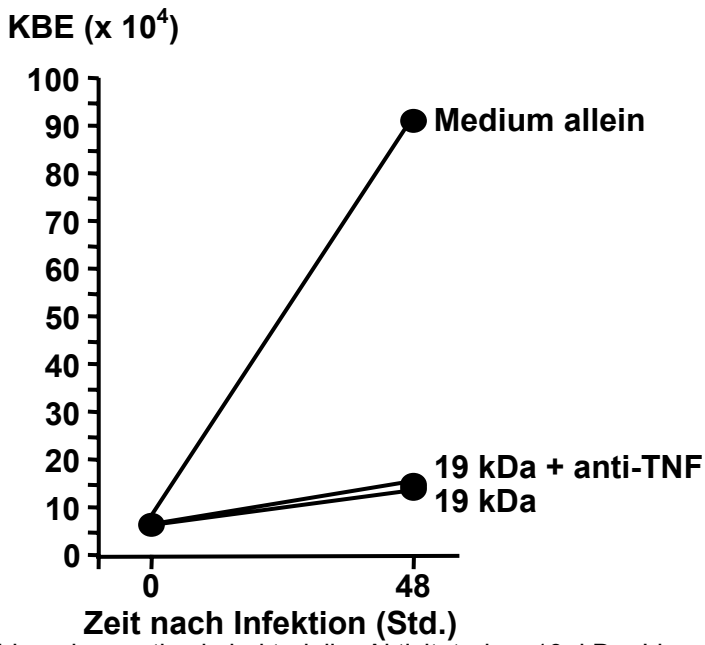


Abb. 35: TNF unabhängige antimykobakterielle Aktivität des 19 kDa Lipoproteins. Das 19 kDa Lipoprotein (2 µg/ml) und Antikörper gegen TNF (20 µg/ml) wurden wie in der Beschriftung angegeben pipettiert. Die Zellen wurden nach 48 Std. lysiert und die Anzahl an KBE bestimmt. Das Schaubild fasst vier unabhängige Experimente zusammen.

3.3.3. Regulation von TLR 2 nach Infektion von AM mit *M. tuberculosis*

Eine Infektion mit Mykobakterien kann zu einer Modulation von Oberflächenmolekülen führen. Dies konnte bereits für CD1 [71] und auch für MHC Klasse II [58] gezeigt werden. Wir stellten uns daher die Frage, ob eine Infektion von AM mit *M. tuberculosis* auch die Expression von TLR 2 beeinflusst.

Dazu wurde eine sensitive und quantitative PCR, eine „Real-Time“ PCR mit dem LightCycler, etabliert. Diese Technik erlaubt die Amplifikation in Echtzeit und online zu verfolgen. Da nur relative Unterschiede in der TLR 2-mRNS-Menge zwischen

infizierten und uninfizierten AM von Interesse waren, konnte auf einen Standard zur absoluten Quantifizierung verzichtet werden. AM wurden für 24 Std. mit *M. tuberculosis* infiziert und anschließend die RNS isoliert. Da es sich um einen virulenten Mykobakterien-Stamm handelt, musste vor der RNS-Isolierung sicher gestellt werden, dass keine Infektionsgefahr besteht. Dazu wurden die infizierten Zellen mit dem im RNeasy-Kit enthaltenen Lysepuffer lysiert und plattiert. In mehreren Experimenten konnten keine Mykobakterien angezüchtet werden (Daten nicht gezeigt). Die erhaltene RNS wurde in eine cDNS umgeschrieben und in der „Real-Time“ PCR wurde die relative Menge an TLR 2-mRNS bestimmt. Nach 24 Std. Infektion bei einer MOI von 10 war eine Hochregulation der TLR 2-mRNS festzustellen. Dies konnte daran erkannt werden, dass nach Infektion eine Zunahme in der Fluoreszenz schon bei Zyklus 26,5 zu beobachten war. Dem gegenüber stieg die Fluoreszenz im unstimulierten Ansatz erst bei Zyklus 29,1 an (**Abb. 36**).

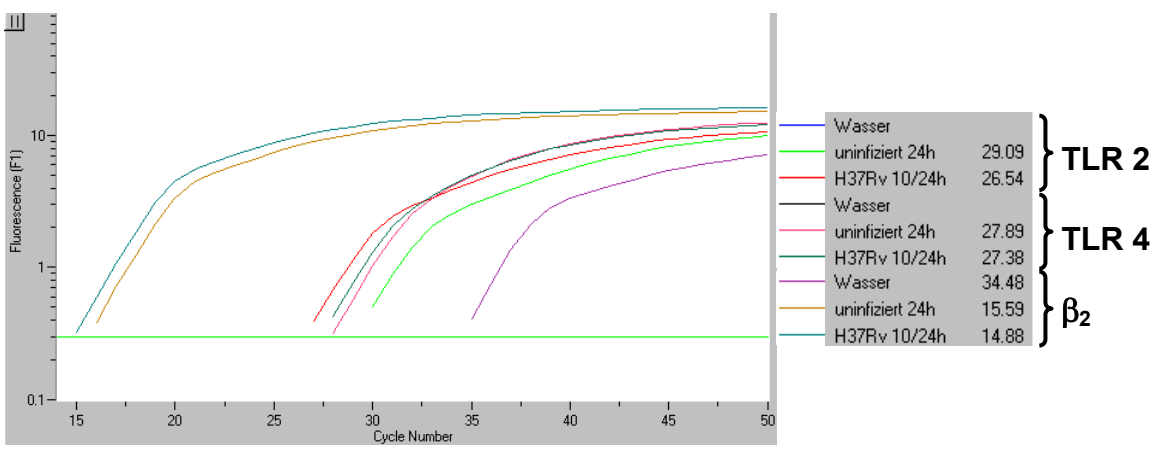


Abb. 36: Hochregulation von TLR 2-mRNS nach Infektion von AM mit M. tuberculosis. Aus 24 Std. mit M. tuberculosis (MOI 10) infizierten AM wurde die RNS isoliert und in einer „Real-Time“ PCR quantifiziert. Dieses Schaubild zeigt ein repräsentatives Experiment von insgesamt sechs unabhängigen Spendern.

Zur Kontrolle, dass auch die richtigen Produkte amplifiziert wurden, wurde eine Schmelztemperaturanalyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass das TLR 2-Amplifikat bei 84,4°C, das TLR 4-Amplifikat bei 85,6°C und das β_2-Microglobulin-Amplifikat bei 82,5°C aufschmolz (**Abb. 37**). Diese Schmelztemperaturen stimmen mit den vorhergesagten Temperaturen von der für die Herstellung der Primer beauftragten Firma überein.

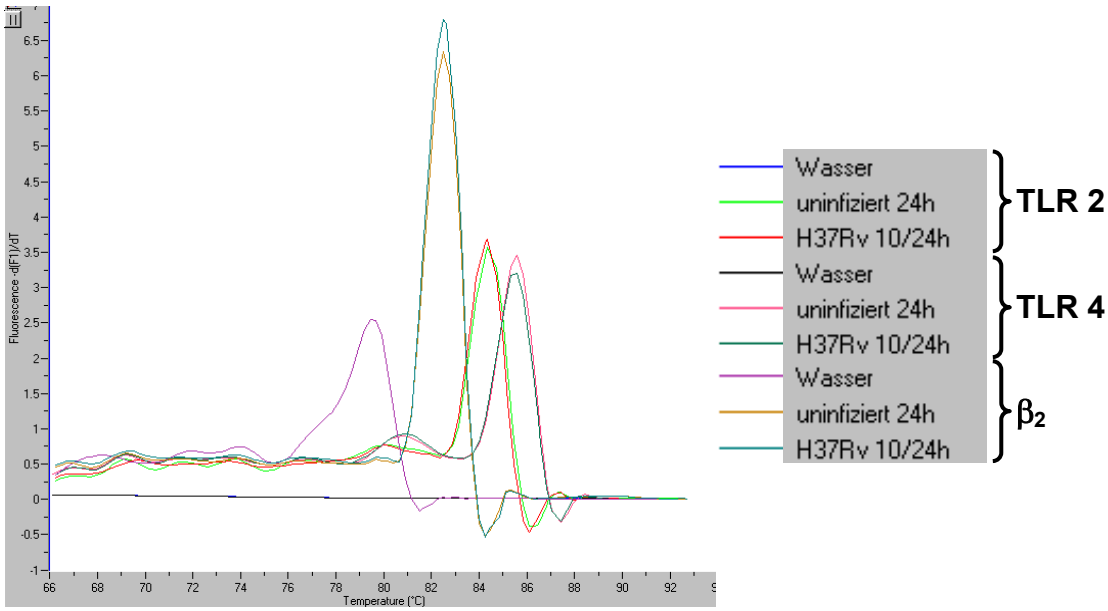


Abb. 37: Schmelztemperaturanalyse der TLR-Amplifikate. Die TLR-Amplifikate wurden einer Schmelztemperaturanalyse im LightCycler unterzogen. Dieses Schaubild zeigt ein repräsentatives Experiment von sechs unabhängigen Spendern.

Eine gelelektrophoretische Auftrennung auf einem 1,5%-igen Agarosegel zeigte Produkte auf einer Höhe von 218 bp, 197 bp und von 305 bp. Dies entspricht den vorhergesagten Größen für die Produkte für TLR 2, TLR 4 und für β_2-Microglobulin. Dies bestätigte, dass die richtigen Produkte amplifiziert wurden. In der Spur von Wasser bei β_2-Microglobulin (violetter Peak in Abb. 32) war kein Produkt zu erkennen, sondern nur eine kleine, schwache und nicht scharf abgegrenzte Bande von vermutlich Primer-Dimeren zu beobachten. Dies zeigt, dass keine unspezifischen Nebenprodukte amplifiziert wurden (**Abb. 38**).

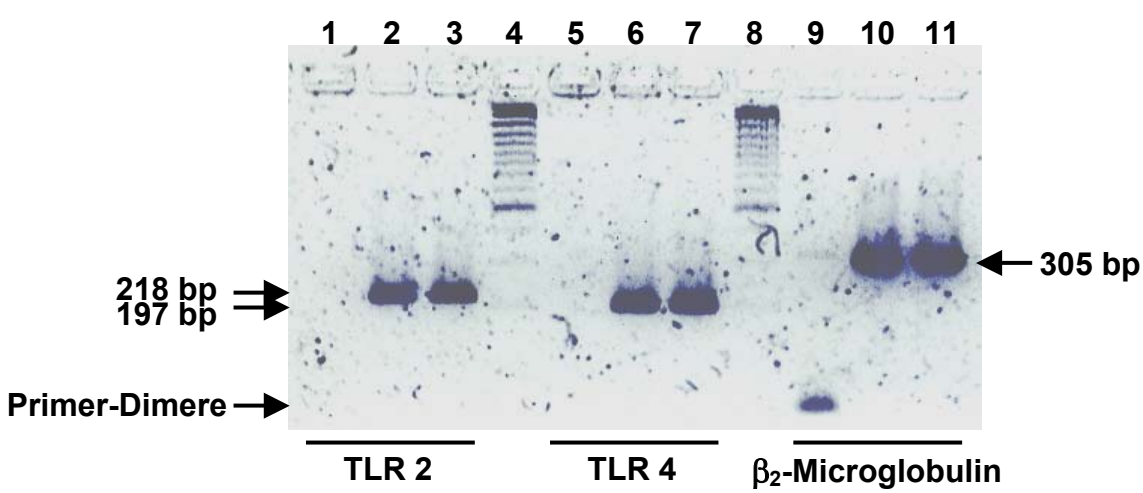


Abb. 38: Gelelektrophoretische Auftrennung der „Real-Time“ PCR-Produkte. Aus *M. tuberculosis*-infizierten und uninfizierten AM wurden nach 24 Std. die RNS isoliert und eine LightCycler „Real-Time“ PCR durchgeführt. Die entstandenen Produkte wurden der Größe nach auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Spur 1, 5, 9: H_2O, Spur 2, 6, 10: unstimulierte AM, Spur 3, 7, 11: *M. tuberculosis*-infizierte AM, Spur 4, 8: 100 bp Standard.

Dieser Befund wurde an sechs unabhängigen Spendern verifiziert. Es kam zu einer mittleren relativen Expression von TLR 2-mRNS von 3,5 ± 1,2. Im Vergleich dazu war keine Regulation von TLR 4-mRNS zu beobachten. Hier betrug die mittlere relative TLR 4-mRNS-Expression 1,0 ± 0,7 (**Abb. 39**).

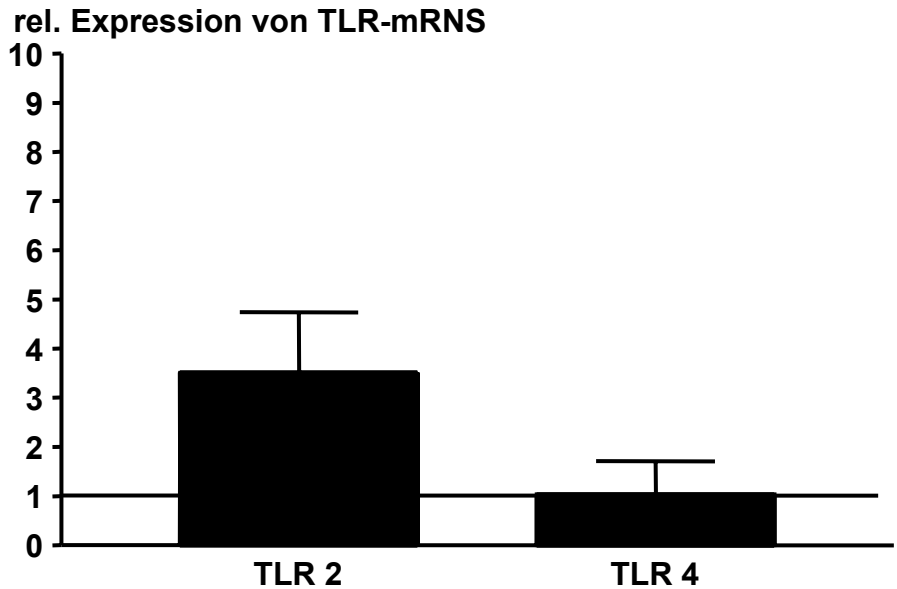


Abb. 39: Hochregulation von TLR 2-mRNS in AM nach 24 Std. Infektion mit *M. tuberculosis*. AM wurden mit *M. tuberculosis* für 24 Std. infiziert (MOI 10). Nach Ernten der Zellen wurde die mRNS präpariert, in cDNS umgeschrieben und mittels Real-Time PCR amplifiziert. Als Kontrollgen diente β_2-Microglobulin. Die rel. Expression von TLR-mRNS berechnet sich mittels: $1{,}9^{\Delta n(TLR)}/1{,}8^{\Delta n(\beta 2)}$ (Δn = Zyklus(stimuliert) – Zyklus(unstimuliert)). Das Schaubild zeigt den Mittelwert aus sechs verschiedenen unabhängigen Spendern (± SD).

Vorläufige Experimente deuten darauf hin, dass die Steigerung der TLR 2-Expression mit der Zunahme des bakteriellen Inoculums positiv korreliert. Die relative TLR 2 mRNS-Menge erreichte in diesen Experimenten ein Maximum nach 24 Std. um danach sukzessiv wieder abzufallen (Daten nicht gezeigt).

Die Bestätigung dieser Befunde auf Proteinebene scheitert derzeit noch an der ausgeprägten Hintergrundfärbung von AM in der Durchflusszytometrie. Geplant ist eine Reduktion der unspezifischen Färbung durch Blockade der stark exprimierten Fc-Rezeptoren auf AM durch Antikörper gegen CD16 (FcγRIII) und CD32 (FcγRII).

4. Diskussion

4.1. Induktion von TNF in AM und dessen Einfluss auf das Wachstum von *M. tuberculosis*

4.1.1. Infektion von AM mit *M. tuberculosis*

In den initialen Experimenten zeigte sich, dass nicht alle AM Mykobakterien phagozytieren (**Abb. 6**). Diese bisher noch nicht beschriebene Beobachtung kann folgende Ursache haben: Da die Phagozytose von Mykobakterien nach deren Bindung an Oberflächenrezeptoren, wie z.B. Komplementrezeptoren, Mannose-Rezeptoren, CD14, das Sialoglykoprotein CD43 und DC-SIGN (CD209) erfolgt, ist die Phagozytosekapazität von der Expression dieser Rezeptoren abhängig. Frisch aufgereinigte AM, wie sie in unseren Experimenten verwendet wurden, stellen eine heterogene Population bezüglich ihrer Reifungs- und Aktivierungsgrade dar. Daher ist anzunehmen, dass sie ein unterschiedliches Repertoire der genannten Oberflächenrezeptoren exprimieren. So exprimieren ausdifferenzierte AM mehr Komplementrezeptor 3 als Monozyten und phagozytieren folglich Mykobakterien signifikant besser [72].

Außerdem ist denkbar, dass während einer Infektion mit Mykobakterien, die für die Phagozytose notwendigen Rezeptoren aktiv durch die AM herunterreguliert werden. Diese Herunterregulation könnte durch das Zytokinmilieu einer floriden Infektion vermittelt werden. Da sich *M. tuberculosis* nur intrazellulär vermehren kann, ist dies für die Bakterien ein Überlebensnachteil und unser Befund könnte auf einen Abwehrmechanismus von AM hinweisen. Ob, und wenn ja, welche Rezeptoren durch inflammatorische Zytokine auf der Oberfläche von AM herunterreguliert werden, ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

4.1.2. TNF-Produktion durch infizierte und uninfizierte AM

Mittels einer Doppelfärbung von Mykobakterien und TNF zeigten wir, dass sowohl infizierte als auch uninfizierte AM an der TNF-Produktion beteiligt sind. Es ist bekannt, dass nach einer Infektion mit dem avirulenten Impfstamm *M. bovis BCG* sowohl infizierte wie auch uninfizierte Makrophagen TNF produzieren können [73].

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit erweitern diesen Befund durch die Verwendung eines medizinisch relevanten Infektionsmodells. Nicht nur der apathogene Mykobakterienstamm, sondern auch ein virulenter Stamm induzierte in infizierten und nicht-infizierten AM TNF. Die TNF-Produktion durch uninfizierte Phagozyten, im Sinne eines „Bystander-Effektes“, könnte somit ein generelles Phänomen bei der Immunabwehr gegen intrazelluläre Erreger darstellen.
Die Hypothese, dass lösliche Faktoren wie zum Beispiel IL-1, IL-6, IL-10 oder TNF uninfizierte AM zur TNF-Produktion stimulieren, konnte experimentell ebensowenig bestätigt werden wie die Beteiligung apoptotischer Körperchen (**Tabelle 2, Abb. 20/21**). Alternativ könnte die Induktion von TNF in uninfizierten AM durch abgebaute und sezernierte bakterielle Produkte erfolgen, da diese durch Makropinozytose in einem Rezeptor-unabhängigen Weg aufgenommen werden [74]. Außerdem wurde gezeigt, dass Exosomen (extrazelluläre Vesikel) am Transport von bakteriellen Bestandteilen teilnehmen und damit ebenfalls indirekt zur TNF-Produktion führen können [75, 76]. Schließlich ist es möglich, dass Zell-Zell-Kontakt zwischen uninfizierten und infizierten AM erforderlich ist. So könnte die Aktivierung der uninfizierten AM durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen erfolgen.

4.1.3. Höhere TNF-Produktion durch virulente Mykobakterien als durch avirulente Bakterien

Ob virulente oder avirulente Mykobakterien mehr TNF in ihren Wirtszellen induzieren, ist ein kontrovers diskutiertes Thema. In verschiedenen Populationen humaner Makrophagen und Monozyten wurde eine geringere [77], vergleichbare [62] oder sogar höhere [78, 79] Freisetzung von TNF gefunden. Unsere Experimente zeigen, dass virulente Mykobakterien (*M. tuberculosis H37Rv*, *M. bovis*) mehr TNF in AM induzieren als ihre avirulenten genetischen Verwandten (*M. tuberculosis H37Ra*, *M. bovis BCG*). Für diese Unterschiede sind am ehesten methodische Aspekte verantwortlich. So wurden bei den zitierten Arbeiten entweder Makrophagen, AM oder Monozyten verwendet, die unterschiedlich lang und mit verschiedenen MOIs infiziert waren. Die Stärke der hier dargestellten Experimente liegt in der Durchführung unter stringenten und reproduzierbaren Versuchsbedingungen (Reinheit der AM, Bestimmung der Infektionseffizienz, konstante Kulturbedingungen).

Die Validität unserer Befunde wurde zusätzlich durch den Einsatz von drei verschiedenen unabhängigen Methoden zur Messung von TNF (ELISA, intrazelluläre Durchflusszytometrie, biologische Aktivität) gesichert.

4.1.4. Die Rolle von TNF bei der Tuberkulose

Eine Vielzahl von Experimenten bei Maus und Mensch belegen die bedeutende, aber sehr unterschiedliche Rolle von TNF bei der Immunabwehr gegen die Tuberkulose. Bei der Maus führt TNF zur Aktivierung infizierter Makrophagen und damit zum direkten Abtöten von Mykobakterien [30]. Dieser Effekt wird durch den Synergismus von TNF mit IFNγ erklärt, welcher eine Induktion antibakterieller Effektormoleküle, wie z.B. reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale, hervorruft. Entsprechend zeigen TNF-defiziente Mäuse einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf nach Infektion mit *M. tuberculosis* als Kontrollmäuse [34, 80].

Zusätzlich kann TNF zur Lyse infizierter Zellen und damit zur Freisetzung von Mykobakterien führen. Durch frisch aus dem Blut rekrutierte Monozyten können dann freigesetzte Mykobakterien aufgenommen und abgetötet werden [31].

Eine weitere wichtige Funktion von TNF ist die Anlockung von Lymphozyten an den Ort der Infektion. Demzufolge sinken in Abwesenheit von TNF Anzahl und Größe der Granulome und es finden sich keine Epitheloidzellen [33]. Wegen des fehlenden Einschlusses der Mykobakterien in den Granulomen ist die Anzahl an Mykobakterien in der Lunge TNF-defizienter Mäuse erhöht und die Bakterien streuen ungehindert in Knochenmark, Milz und Leber. Obwohl T-Zellen, Makrophagen und Effektormoleküle, wie z.B. NO, in der Lunge zu finden sind, ist die Infektion in diesen Mäusen nicht kontrollierbar, da die Formation der Effektorzellen zu funktionsfähigen Granulomen ausbleibt [80].

Beim Menschen gibt es hingegen Hinweise, dass TNF den klinischen Verlauf einer Tuberkulose zunächst verschlechtert. So wird TNF mit immunpathologischen Phänomenen wie Fieber, Hyperthermie und schwerem Krankheitsgefühl in Verbindung gebracht [81]. Zusätzlich belegen unsere Daten *in vitro*, dass TNF das Wachstum virulenter Mykobakterien in AM unterstützt. Virulente Mykobakterien scheinen effiziente Evasionsmechanismen zum Schutz vor der Wirkung von TNF entwickelt zu haben, während avirulente Stämme durch TNF getötet werden [82]

(**Abb. 18/19**). Mögliche Erklärungen für die wachstumsfördernde Effekte von TNF sind die Modulation der Eisenverfügbarkeit für Mykobakterien oder die Modulation des Reifegrades und der Zytokin-Sekretion von AM.

Es ist beschrieben, dass TNF den Eisenmetabolismus von Phagozyten moduliert [83, 84] und somit die Eisenverfügbarkeit für Mykobakterien erhöht. Dies könnte die Aktivität der zahlreichen Eisen-abhängigen mykobakteriellen Enzyme fördern und das Wachstum beschleunigen. Dieser Mechanismus wurde experimentell für die Wirkung von TNF auf das Wachstum von *M. tuberculosis* in Monozyten belegt [36].

Eine erst kürzlich beschriebene Funktion von TNF besteht in der Unterstützung der Ausreifung von hämatopoetischen Zellen. Vor allem für die Reifung von dendritischen Zellen ist TNF unersetzlich. Da TNF auch gleichzeitig zu einer Zunahme des mykobakteriellen Wachstums in dendritischen Zellen führt, wird eine direkte Korrelation zwischen dem Reifegrad von Zellen und der Ausübung antibakterieller Effekte diskutiert [61]. Da für unsere Experimente humane AM verwendet wurden, die mittels Adhärenz aus einer BAL gewonnen wurden, sind diese unterschiedlich stark differenziert. Möglicherweise moduliert TNF den Reifegrad der AM und beeinflusst so, wie für dendritische Zellen gezeigt, die antibakteriellen Effektormechanismen. Somit wäre der wachstumsfördernde Effekt von TNF kein direkter Eingriff in antibakterielle Effektormechanismen der Wirtszelle, sondern vielmehr ein indirekter Effekt über die Modulation des Reifungsprozesses von Zellen.

Schließlich könnte TNF die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine wie TGFβ und IL-10 in der Lunge modulieren. Infizierte AM sezernieren TGFβ und IL-10, die antibakterielle Makrophagen-Funktionen inhibieren können [85, 86]. Durch Modulation der Ausschüttung dieser Zytokine könnte TNF indirekt das Wachstum der Mykobakterien in den AM fördern.

Überraschenderweise führt jedoch die Applikation von anti-TNF beim Menschen nicht zu einem Schutz vor der Tuberkulose. Diese Beobachtungen wurden möglich, da in der Klinik TNF-Antikörper (Infliximab) zur Therapie von Autoimmunkrankheiten wie rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn verwendet werden. Die therapeutische Wirkung dieser biotechnologisch hergestellten Antikörper hat zu einer deutlichen Verbesserung der Therapie von Autoimmunerkrankungen geführt und somit schwer kranken Menschen ein normales Leben ermöglicht. Unter vielen hunderttausend erfolgreich behandelten Patienten erkrankten jedoch ungefähr 250 Patienten an einer Tuberkulose [35, 87, 88]. Immunhistologische Untersuchungen zeigten eine

prominente interstitielle Fibrose, eine lymphoide Inflammation und desorganisierte, aufbrechende Granulome. Diese histologischen Befunde lassen vermuten, dass TNF beim Influx und Efflux von Zellen in ein Granulom entscheidend beteiligt ist. Die hier dargestellten Daten stehen dazu in keinem Widerspruch, da unsere Versuche zum Einfluss von TNF auf das Wachstum von Mykobakterien in AM *in vitro* und in der Abwesenheit von Lymphozyten durchgeführt wurden [38]. So ist die Reaktivierung einer Tuberkulose bei Infliximab-therapierten Patienten wahrscheinlich nicht auf einen Verlust der antimykobakteriellen Aktivität zurückzuführen, sondern beruht auf einer Desintegration von Granulomen, wodurch Mykobakterien metabolisch aktiv werden und sich wieder vermehren.

4.2. Migration von Zellen auf Überstände von *M. tuberculosis* infizierten AM

4.2.1. Migration von humanen Zellen auf Überstände von AM

Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Infektion von AM mit Mykobakterien verschiedene Zellpopulationen aus dem peripheren Blut angelockt werden. Die Signifikanz unserer Ergebnisse wird durch folgende Sachverhalte erschwert: die große Spendervariabilität, die Migration von Zellen auch bei Verwendung von Überständen nicht-infizierter AM und die insgesamt geringe Anzahl migrierter Zellen.

Mögliche Ursache für die Schwankungen der Migrationsfaktoren sind die individuellen Unterschiede beim Menschen. Für unsere Experimente verwendeten wir Zellen von Spendern, die vor einer elektiven Operation Erythrozyten gespendet haben. Diese Spender wurden nicht im Hinblick ihres genetischen, sozialen und gesundheitlichen Hintergrundes gruppiert, so dass mit funktionellen Unterschieden der Immunzellen gerechnet werden muß.

Eine mögliche Ursache, weshalb auch Überstände uninfizierter AM chemotaktisch wirken, liegt in der Aufreinigungsmethode von AM. Diese beinhaltet eine Adhärenzphase auf Plastik und bewirkt neben einer Aktivierung der Zellen [89, 90] möglicherweise auch eine Chemokinfreisetzung, wodurch die Wanderung von Zellen unabhängig von der Infektion mit Mykobakterien angeregt wird.

Die statistische Signifikanz der dargestellten Befunde wird auch durch die sehr geringe Anzahl gewanderter Zellen limitiert. Um einen Verlust der Zellen aufgrund

eines systematischen Fehlers auszuschließen, wurde die Wiederfindungsrate der Zellen bestimmt. Diese setzt sich aus dem Verhältnis der Summe aus migrierten und nicht-migrierten Zellen dividiert durch die Anzahl der ursprünglich in den Versuch eingesetzten Zellen zusammen. Speziell bei Verwendung von PBMCs war die Wiederfindungsrate gering und betrug zumTeil nur 34%. Um zu gewährleisten, dass die gewählten Bedingungen für die Quantifizierung der Chemotaxis geeignet sind, wurden die Versuchsbedingungen vor Beginn der Experimente durch Variation folgender Parameter optimiert: Chemokinkonzentration, Porengröße, Inkubationszeit und die Konzentration an Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Ionen, welche wichtige Cofaktoren der Zellen für den Migrationsprozess darstellen. Ausführliche Vorversuche ergaben als optimale Versuchsbedingungen den Zusatz von Ca^{2+}- (0,9 mM) und Mg^{2+}-Ionen (0,5 mM) im Zellmedium, eine Inkubationszeit von einer Stunde und die Verwendung von 3 µm Porendurchmesser. Da alle Chemotaxis-Experimente unter den optimierten Bedingungen durchgeführt wurden, ist ein systematischer Fehler unwahrscheinlich.

4.2.2. Die Bedeutung von NK Zellen bei der Tuberkulose

Wie in den Experimenten gezeigt wurde, locken infizierte AM NK Zellen an (**Abb. 23**). Dies legt die Vermutung nahe, dass NK Zellen als Effektorzellen bei der angeborenen Immunantwort gegen *M. tuberculosis* beteiligt sind. Funktionell könnte ihre lytische Aktivität oder die Freisetzung antibakterieller Effektormoleküle von Bedeutung sein.

NK Zellen entfalten ihre lytische Aktivität überwiegend durch die Freisetzung von Perforin. Perforin induziert Apoptose, wodurch es zur Beseitigung infizierter Zellen ohne immunpathologische Gewebeschäden kommt. Zusätzlich wird das antibakterielle Molekül Granulysin in die Zielzelle injiziert und zerstört die Zellwand der Bakterien [11]. Somit führen NK Zellen sowohl zur Elimination infizierter Zellen, als auch zu einem direkten Abtöten intrazellulärer Mikroorganismen.

Da NK Zellen nur in geringer Anzahl in einer gesunden Lunge vorkommen, müssen sie im Falle einer Infektion aktiv angelockt werden. Dazu exprimieren sie eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren (CCR 2, CCR 4, CCR 5 und CXCR 1) [91, 92]. Nach einer Infektion von AM mit virulenten Mykobakterien werden Chemokine (MCP-1, RANTES, MIP-1α, MIP-1β und IL-8) freigesetzt [21], welche an diese Rezeptoren

binden können und so zu einer Akkumulation von NK Zellen während der frühen Phase der Immunantwort führen. Auch dendritische Zellen, die in der akuten Phase einer Tuberkulose Mykobakterien in der Lunge phagozytieren, sezernieren Chemokine (MIP-1α und MIP-1β) [93]. Somit setzen verschiedene Populationen professioneller Phagozyten nach Infektion mit *M. tuberculosis* Botenstoffe frei, die NK Zellen anlocken [94]. Dementsprechend zeigen vorläufige Befunde immunhistologischer Färbungen von Lungengewebe von Tuberkulose-Patienten eine Akkumulation von NK Zellen (Doktorarbeit V. Kießler, Labor S. Stenger).

Möglicherweise sind Granulysin-exprimierende NK Zellen an der protektiven Immunantwort einer weiteren mykobakteriellen Erkrankung, nämlich der Lepra, beteiligt [95]. Die Granulysin-Expression korreliert hier direkt mit dem Schweregrad der Erkrankung. In Hautläsionen der milderen Verlaufsform, der tuberkuloiden Lepra, konnten mehr Granulysin-exprimierende Zellen gefunden werden als bei der schwerer verlaufenden Form, der lepromatösen Lepra. Zu klären bleibt, ob bei der Immunabwehr gegen Lepra NK Zellen *in vivo* tatsächlich eine Rolle spielen.

Demzufolge leisten NK Zellen durch mehrere Effektorfunktionen einen wichtigen Beitrag zur Immunabwehr der Tuberkulose. Sie sind in Granulomen anwesend und können direkte antimykobakterielle Aktivität ausüben. Zukünftige therapeutische Interventionsstrategien sollten deshalb darauf abzielen neben den T-Lymphozyten auch NK Zellen zu stimulieren.

4.2.3. Vergleich der Migration von Zellen von Tuberkulose-Patienten und deren Kontaktpersonen

Die Zellen von Tuberkulose-Patienten und deren Kontaktpersonen, die nicht erkrankten, zeigten keinen Unterschied hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens oder der Expression von Chemokinrezeptoren (**Abb. 29-31**). Dies liegt möglicherweise daran, dass die Versuche mit Zellen aus dem Blut durchgeführt wurden. Blut könnte für diese Versuche ein ungeeignetes Untersuchungsmaterial darstellen, da Mykobakterien aerogen übertragen werden und somit der erste Kontakt mit Zellen in der Lunge stattfindet. Daher werden vermutlich nur Experimente mit Zellen aus der infizierten Lunge klären, ob die Wanderung von Lymphozyten oder die Expression von Chemokinrezeptoren bei Tuberkulose-Patienten verändert ist. Möglicherweise ist

die Anfälligkeit an einer Tuberkulose zu erkranken aber auch unabhängig von Veränderungen im Chemokin- oder Chemokinrezeptor-Repertoire. Aufgrund der Komplexität der Immunabwehr gegen *M. tuberculosis* ist anzunehmen, dass die Summe multipler gegebenenfalls minimaler Defizite eher für eine Tuberkulose prädisponiert als ein einzelner dominanter Faktor.

4.3. Induktion direkter antibakterieller Aktivität gegen *M. tuberculosis* durch Toll-like-Rezeptoren

4.3.1. Transkriptionelle Regulation von TLR 2 nach Infektion von AM mit *M. tuberculosis*

Die Regulation von TLR 2 durch Mykobakterien wurde bisher kaum untersucht. Eine Infektion von murinen Makrophagen mit *M. avium*, einer ubiquitär vorkommenden mykobakteriellen Spezies, führte zu einer Hochregulation von TLR 2-mRNS [96]. Auch Peptidoglykan, ein mykobakterieller Zellwandbestandteil, induzierte auf transkriptioneller Ebene TLR 2 in Monozyten [97]. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten sind der erste Hinweis darauf, dass bei einer Infektion von Lungenmakrophagen des Menschen mit virulenten *M. tuberculosis* eine Hochregulation von TLR 2-mRNS stattfindet. Keine der hier zitierten Arbeiten hat die Hochregulation von TLR 2 auf Proteinebene bisher bestätigen können. Die Problematik könnte einerseits an der präferenziell intrazellulären Lokalisation von TLR 2 liegen [98] und andererseits am Fehlen kommerziell erhältlicher Reagenzien zur Detektion von TLR 2 an der Zelloberfläche.

4.3.2. TLR 2-abhängige antimykobakterielle Aktivität des 19 kDa Lipoproteins

Über hunderte von Millionen Jahren der Evolution hat das Immunsystem die Struktur der TLR als einen Abwehrmechanismus der angeborenen Immunantwort beibehalten, um der Bedrohung durch mikrobielle Krankheitserreger zu begegnen. Die geschilderten Ergebnisse zeigen, dass sowohl humane als auch murine Zellen den TLR-Signalweg benutzen, über den antimikrobielle Effektormechanismen

stimuliert werden. Allerdings sind die Effektormoleküle unterschiedlich: Während in Mäusen TLR-Aktivierung zu einer NO-abhängigen antibakteriellen Aktivität führt, ist der TLR-vermittelte Abwehrmechanismus beim Menschen NO-unabhängig (**Abb. 34**).

Die Effektormoleküle der TLR-induzierten antimykobakteriellen Aktivität in Maus und Mensch sind unterschiedlich. Dies bedeutet, dass die Signaltransduktion vergleichbar verläuft, aber die Effektormoleküle beziehungsweise die funktionellen Endstrecken in Maus und Mensch unterschiedlich sind. In humanen Zellen wurde die Beteiligung von Stickstoffradikalen, der Indolamin-2,3-dioxygenase sowie von TNF durch Blockierungsexperimente ausgeschlossen (**Abb. 34/35**). Somit bleibt die Identität des Effektormoleküls weiterhin unklar. Als potentielle Kandidaten kommen vor allem reaktive Sauerstoffradikale in Frage. Bei einer Infektion des Menschen mit *M. tuberculosis* werden unter anderem über TLR 2 durch den „oxidative burst“ reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt, die zu einem direkten Abtöten der Bakterien führen [99]. Unsere bisherigen Bemühungen, die Mitwirkung von Sauerstoffradikalen auszuschließen, scheiterten an technischen Schwierigkeiten, welche die Detektion der Metabolite mit sich bringen. Momentan wird versucht, die experimentellen Probleme durch den Einsatz von sensitiveren und weniger störanfälligen Methoden zu überwinden.

TLR 2 wird *in vivo* bei zwei mykobakteriellen Erkrankungen am Ort der Infektion exprimiert [37, 100]. Sowohl bei der Lepra wie auch der Tuberkulose imponieren die TLR 2-positiven Zellen in der Immunhistologie phänotypisch als Makrophagen. Die Expression von TLRs in Granulomen, verbunden mit ihrer Fähigkeit, das Töten von Mykobakterien zu vermitteln, lässt eine Beteiligung an der protektiven Immunantwort vermuten. Die Identifikation zusätzlicher natürlicher Liganden sowie die Identifikation der biologisch entscheidenden Effektormoleküle werden zeigen, ob die in dieser Arbeit gezeigten Befunde als Basis für die Entwicklung neuer Formen der Immunintervention bei mykobakteriellen Erkrankungen dienen können.

5. Zusammenfassung

Die Mechanismen, die zur Immunabwehr bei der Tuberkulose in der Lunge des Menschen beitragen, sind noch nicht geklärt. In der vorgelegten Arbeit werden Befunde vorgestellt, die den Tumor Nekrose Faktor und von Alveolarmakrophagen freigesetzte Chemokine als Modulatoren der Immunantwort bei der Tuberkulose identifizieren. Im Einzelnen wurden folgende Schlüsselbefunde erhoben:

1. Alveolarmakrophagen setzen Tumor Nekrose Faktor frei, welcher das Wachstum von virulenten Mykobakterien unterstützt.

2. Infizierte Alveolarmakrophagen locken Lymphozyten an, darunter Natürliche Killerzellen, die antibakterielle Effektormoleküle exprimieren.

3. Alveolarmakrophagen töten nach Stimulation von Toll-like-Rezeptoren *Mycobacterium tuberculosis*.

Diese Ergebnisse identifizieren Alveolarmakrophagen als Schlüsselzelle der angeborenen Immunantwort bei der Tuberkulose. Sie beeinflussen das Wachstum der Bakterien, sind an der Bildung von Granulomen beteiligt und unterstützen die Einwanderung von antibakteriellen Natürlichen Killerzellen.

6. Literatur

1. Nerlich AG, Haas CJ, Zink A, Szeimies U, Hagedorn HG: Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. Lancet 350(9088):1404, 1997.
2. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA: Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. Proc Natl Acad Sci U S A 91(6):2091, 1994.
3. Schadewaldt H: Immunologie Aktuell:, 2000.
4. WHO: WHO Report 2003: Global Tuberculosis Control.:, 2003.
5. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC: Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. Jama 282(7):677, 1999.
6. Robert-Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin 12, 2003.
7. Robert-Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin 11, 2002.
8. WHO: Fact Sheet. No. 104, 2002.
9. Brandis H, Pulverer G: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 6. Auflage:454, 1988.
10. Barksdale L, Kim KS: Mycobacterium. Bacteriol Rev 41(1):217, 1977.
11. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 282(5386):121, 1998.
12. Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornbostel H, Waller HD: Lehrbuch der inneren Medizin, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York, 1987.
13. Hocking WG, Golde DW: The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts). N Engl J Med 301(11):580, 1979.
14. Hocking WG, Golde DW: The pulmonary-alveolar macrophage (second of two parts). N Engl J Med 301(12):639, 1979.
15. Bezdicek P, Crystal RG: Pulmonary Macrophages. Philadelphia, Lippincott - Raven Publishers, 1997.
16. Kuo HP, Ho TC, Wang CH, Yu CT, Lin HC: Increased production of hydrogen peroxide and expression of CD11b/CD18 on alveolar macrophages in patients with active pulmonary tuberculosis. Tuber Lung Dis 77(5):468, 1996.

17. Rich EA, Torres M, Sada E, Finegan CK, Hamilton BD, Toossi Z: Mycobacterium tuberculosis (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. Tuber Lung Dis 78(5-6):247, 1997.
18. Wang CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP: Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. Eur Respir J 11(4):809, 1998.
19. Nathan CF: Secretory products of macrophages. J Clin Invest 79(2):319, 1987.
20. Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T, Matsushima K: Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. Am J Respir Crit Care Med 155(4):1474, 1997.
21. Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA: Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. Am J Respir Cell Mol Biol 19(3):513, 1998.
22. Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH: Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. Infect Immun 65(5):1936, 1997.
23. Kinjo Y, Kawakami K, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Hoshino T, Okamoto M, Kawase Y, Yokota K, Yoshino K, Takeda K, Akira S, Saito A: Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by Mycobacterium tuberculosis: a comparative study with IL-12p40. J Immunol 169(1):323, 2002.
24. Tsao TC, Hong J, Huang C, Yang P, Liao SK, Chang KS: Increased TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with the upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients with active pulmonary tuberculosis. Tuber Lung Dis 79(5):279, 1999.
25. Hirsch CS, Ellner JJ, Blinkhorn R, Toossi Z: In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against Mycobacterium tuberculosis by natural inhibitors of transforming growth factor beta. Proc Natl Acad Sci U S A 94(8):3926, 1997.
26. Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH: Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell

responses to Mycobacterium tuberculosis by interleukin-10 and transforming growth factor beta. Infect Immun 67(12):6461, 1999.

27. Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S: Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. J Immunol 145(3):940, 1990.
28. Gong JH, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y, Barnes PF: Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. Infect Immun 64(3):913, 1996.
29. Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF: TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. J Immunol 162(10):6122, 1999.
30. Flesch IE, Kaufmann SH: Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. Infect Immun 58(8):2675, 1990.
31. Kaufmann SH: CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. Immunol Today 9(6):168, 1988.
32. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J Immunol 141(7):2407, 1988.
33. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. Cell 56(5):731, 1989.
34. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR: Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. Immunity 2(6):561, 1995.
35. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM: Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N Engl J Med 345(15):1098, 2001.
36. Byrd TF: Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) promotes growth of virulent Mycobacterium tuberculosis in human monocytes iron-mediated growth suppression is correlated with decreased release of TNFalpha from iron-

treated infected monocytes. J Clin Invest 99(10):2518, 1997.

37. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL: Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. Science 291(5508):1544, 2001.
38. Engele M, Stossel E, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bolcskei P, Rollinghoff M, Stenger S: Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent Mycobacterium tuberculosis. J Immunol 168(3):1328, 2002.
39. Zlotnik A, Yoshie O: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 12(2):121, 2000.
40. Rossi D, Zlotnik A: The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol 18:217, 2000.
41. Ragno S, Romano M, Howell S, Pappin DJ, Jenner PJ, Colston MJ: Changes in gene expression in macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis: a combined transcriptomic and proteomic approach. Immunology 104(1):99, 2001.
42. Saukkonen JJ, Bazydlo B, Thomas M, Strieter RM, Keane J, Kornfeld H: Beta-chemokines are induced by Mycobacterium tuberculosis and inhibit its growth. Infect Immun 70(4):1684, 2002.
43. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol 17:189, 1999.
44. Trinchieri G: Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. Semin Immunol 7(2):83, 1995.
45. Perussia B: Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. Curr Opin Immunol 3(1):49, 1991.
46. Jongstra J, Schall TJ, Dyer BJ, Clayberger C, Jorgensen J, Davis MM, Krensky AM: The isolation and sequence of a novel gene from a human functional T cell line. J Exp Med 165(3):601, 1987.
47. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, Modlin RL: Differential effects of cytolytic

T cell subsets on intracellular infection. Science 276(5319):1684, 1997.

48. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melian A, Leslie DS, Lee HK, van Donselaar E, Hanson DA, Krensky AM, Majdic O, Porcelli SA, Morita CT, Brenner MB: Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. J Exp Med 191(6):937, 2000.
49. Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM: Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. J Immunol 158(6):2680, 1997.
50. Pena SV, Krensky AM: Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. Semin Immunol 9(2):117, 1997.
51. Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, Ko C, Hanson DA, Clayberger C, Krensky AM, Leippe M, Bloom BR, Ganz T, Modlin RL: Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. J Immunol 165(12):7102, 2000.
52. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournie JJ, Krensky AM, Bonneville M, Peyrat MA, Caccamo N, Sireci G, Salerno A: Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. J Infect Dis 184(8):1082, 2001.
53. Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 1(2):135, 2001.
54. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr.: A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388(6640):394, 1997.
55. Ashbridge KR, Booth RJ, Watson JD, Lathigra RB: Nucleotide sequence of the 19 kDa antigen gene from Mycobacterium tuberculosis. Nucleic Acids Res 17(3):1249, 1989.
56. Young DB, Garbe TR: Lipoprotein antigens of Mycobacterium tuberculosis. Res Microbiol 142(1):55, 1991.
57. Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, van Heyningen T, Chatterjee D, Orme I, Allen P, Russell DG: Intracellular trafficking in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-infected macrophages. J Immunol 153(6):2568, 1994.
58. Stenger S, Modlin RL: Control of Mycobacterium tuberculosis through

mammalian Toll-like receptors. Curr Opin Immunol 14(4):452, 2002.

59. Rollinghoff M, Warner NL: Antibody-mediated inhibition of primary antibody formation in vivo and vitro in NZB mice. Proc Soc Exp Biol Med 142(2):621, 1973.
60. Rook G, Rainbow S: An isotype incorporation assay for the antimycobacterial effects of human monocytes. Ann Immunol 132D:281, 1981.
61. Fortsch D, Rollinghoff M, Stenger S: IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent Mycobacterium tuberculosis. J Immunol 165(2):978, 2000.
62. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H: Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. Infect Immun 65(1):298, 1997.
63. Keane J, Remold HG, Kornfeld H: Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. J Immunol 164(4):2016, 2000.
64. Allavena P, Giardina G, Bianchi G, Mantovani A: IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. J Leukoc Biol 61(6):729, 1997.
65. Lienhardt C, Manneh K, Bouchier V, Lahai G, Milligan PJ, McAdam KP: Factors determining the outcome of treatment of adult smear-positive tuberculosis cases in The Gambia. Int J Tuberc Lung Dis 2(9):712, 1998.
66. Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M: Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. J Exp Med 188(11):2091, 1998.
67. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science 282(5396):2085, 1998.
68. 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: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 285(5428):732, 1999.
69. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A: Cell activation and apoptosis by bacterial

lipoproteins through toll-like receptor-2. Science 285(5428):736, 1999.

70. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A: The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature 401(6755):811, 1999.

71. Stenger S, Niazi KR, Modlin RL: Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis. J Immunol 161(7):3582, 1998.

72. Skold CM, Eklund A, Hallden G, Hed J: Different cell surface and phagocytic properties in mononuclear phagocytes from blood and alveoli. A comparative study of blood monocytes and alveolar macrophages from human nonsmokers using flow cytofluorometry. Apmis 98(5):415, 1990.

73. Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM: Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by M. bovis BCG. Tuber Lung Dis 80(4-5):197, 2000.

74. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature 392(6671):86, 1998.

75. Schaible UE, Hagens K, Fischer K, Collins HL, Kaufmann SH: Intersection of group I CD1 molecules and mycobacteria in different intracellular compartments of dendritic cells. J Immunol 164(9):4843, 2000.

76. Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG: Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. Traffic 1(3):235, 2000.

77. Beltan E, Horgen L, Rastogi N: Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. Microb Pathog 28(5):313, 2000.

78. Rook GA, Taverne J, Leveton C, Steele J: The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. Immunology 62(2):229, 1987.

79. Silver RF, Li Q, Ellner JJ: Expression of virulence of Mycobacterium tuberculosis within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. Infect Immun 66(3):1190, 1998.

80. Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, Britton

WJ: Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin. J Immunol 162(6):3504, 1999.

81. Bekker LG, Maartens G, Steyn L, Kaplan G: Selective increase in plasma tumor necrosis factor-alpha and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. J Infect Dis 178(2):580, 1998.

82. Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA: Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophages. J Immunol 152(2):743, 1994.

83. Torti SV, Kwak EL, Miller SC, Miller LL, Ringold GM, Myambo KB, Young AP, Torti FM: The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. J Biol Chem 263(25):12638, 1988.

84. Schaible UE, Collins HL, Priem F, Kaufmann SH: Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. J Exp Med 196(11):1507, 2002.

85. Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ: Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. J Immunol 154(1):465, 1995.

86. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG: Pathogenic Mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. J Immunol 161(5):2636, 1998.

87. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, Smolen J, Emery P, Harriman G, Feldmann M, Lipsky P: Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. Lancet 354(9194):1932, 1999.

88. Nunez Martinez O, Ripoll Noiseux C, Carneros Martin JA, Gonzalez Lara V, Gregorio Maranon HG: Reactivation tuberculosis in a patient with anti-TNF-

alpha treatment. Am J Gastroenterol 96(5):1665, 2001.

89. Standiford TJ, Kunkel SL, Kasahara K, Milia MJ, Rolfe MW, Strieter RM: Interleukin-8 gene expression from human alveolar macrophages: the role of adherence. Am J Respir Cell Mol Biol 5(6):579, 1991.

90. Losa Garcia JE, Rodriguez FM, Martin de Cabo MR, Garcia Salgado MJ, Losada JP, Villaron LG, Lopez AJ, Arellano JL: Evaluation of inflammatory cytokine secretion by human alveolar macrophages. Mediators Inflamm 8(1):43, 1999.

91. Nieto M, Navarro F, Perez-Villar JJ, del Pozo MA, Gonzalez-Amaro R, Mellado M, Frade JM, Martinez AC, Lopez-Botet M, Sanchez-Madrid F: Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. J Immunol 161(7):3330, 1998.

92. Inngjerdingen M, Damaj B, Maghazachi AA: Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. Blood 97(2):367, 2001.

93. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL: Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. J Immunol 159(2):635, 1997.

94. Lande R, Giacomini E, Grassi T, Remoli ME, Iona E, Miettinen M, Julkunen I, Coccia EM: IFN-alpha beta released by Mycobacterium tuberculosis-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. J Immunol 170(3):1174, 2003.

95. Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S, Krensky AM, Rollinghoff M, Nunes Sarno E, Burdick AE, Rea TH, Modlin RL: T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. Nat Med 7(2):174, 2001.

96. Wang T, Lafuse WP, Zwilling BS: Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following Mycobacterium avium infection. J Immunol 165(11):6308, 2000.

97. Liu Y, Wang Y, Yamakuchi M, Isowaki S, Nagata E, Kanmura Y, Kitajima I, Maruyama I: Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation. Infect Immun 69(5):2788, 2001.

98. Kirschning CJ, Schumann RR: TLR2: cellular sensor for microbial and

endogenous molecular patterns. Curr Top Microbiol Immunol 270:121, 2002.

99. Walker L, Lowrie DB: Killing of Mycobacterium microti by immunologically activated macrophages. Nature 293(5827):69, 1981.

100. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL: Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. Nat Med:, 2003.