

AUS DEM

*LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GEßNER*

*DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*UNTERSUCHUNGEN ZUR EIGNUNG VON PLASMIDTRANSFIZIERTEN
ANTIGENPRÄSENTIERENDEN ZELLEN ZUR REAKTIVIERUNG
TUBERKULOSESPEZIFISCHER T-HELFERZELLEN*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Yasmin Hedy Qamar

2012

AUS DEM

LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GEßNER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNGEN ZUR EIGNUNG VON PLASMIDTRANSFIZIERTEN
ANTIGENPRÄSENTIERENDEN ZELLEN ZUR REAKTIVIERUNG
TUBERKULOSESPEZIFISCHER T-HELFERZELLEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Yasmin Hedy Qamar

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: PD Dr. Ludwig Deml
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Fleck
Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. Möglichkeiten und Grenzen aktueller Verfahren zur Diagnostik von Infektionen mit <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.2. Das humane Immunsystem.....	3
1.3. Entstehung von naiven T-Lymphozyten.....	4
1.4. Aktivierung von naiven T-Helferzellen zu Effektorzellen.....	5
1.5. Antigenpräsentation durch professionelle APC und Erkennung von Fremdprotein durch T-Lymphozyten.....	7
1.6. T-Zell-induzierte Reifungsprozesse in antigenpräsentierenden Zellen (APC).....	10
1.7. Bedeutung von 4.1BBL und OX40L für die Immunantwort.....	11
1.8. Aktuelle Methoden der T-Zell-Diagnostik.....	12
1.9. Das <i>Reverse Signalling</i> von Th-Zellen: ein innovativer Ansatz zur Bestimmung erregerspezifischer aktivierter T-Zellen.....	13
1.10. Zielsetzung der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Material.....	16
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.3. Nährmedien und Puffer.....	19
2.1.4. Bakterien und Zellen.....	21
2.1.5. Nukleinsäuren.....	22
2.1.5.1. Plasmide.....	22
2.1.5.2. Oligonukleotide.....	24
2.1.6. Enzyme.....	24
2.1.7. Rekombinante Proteine.....	24
2.1.8. Verwendete kommerziell erhältliche Kits.....	24
2.1.9. Antikörper.....	25
2.1.10. Computerprogramme.....	25
2.2. Methoden.....	26
2.2.1. Arbeiten mit Bakterien.....	26
2.2.1.1. Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	26
2.2.1.1.1. Flüssigkulturen.....	26
2.2.1.1.2. Plattenkulturen.....	26
2.2.1.1.3. Glycerinkulturen.....	26
2.2.1.2. Transformation von DNA in Bakterienzellen.....	26
2.2.2. Arbeiten mit DNA.....	27
2.2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA mit alkalischer Schnelllyse.....	27
2.2.2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA.....	27

2.2.2.3.	PCR Analyse	27
2.2.2.4.	Agarose- Gelelektrophorese.....	28
2.2.2.5.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	29
2.2.2.6.	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
2.2.2.7.	Ligation von DNA Fragmenten.....	29
2.2.2.8.	PCR Verfahren zur Charakterisierung rekombinanter Bakterienklone	30
2.2.3.	Arbeiten mit Zellen.....	30
2.2.3.1.	Bestimmung der Zellzahl.....	30
2.2.3.2.	Arbeiten mit DG75-Zellen.....	30
2.2.3.2.1.	Auftauen von DG75-Zellen.....	30
2.2.3.2.2.	Kultivierung von DG75-Zellen.....	31
2.2.3.3.	Arbeiten mit humanen PBMC (mononukleäre, periphere Blutzellen).....	31
2.2.3.3.1.	Isolierung von PBMC aus Vollblut.....	31
2.2.3.3.2.	Kultivierung von PBMC.....	31
2.2.3.4.	Isolierung von Zellpopulationen aus PBMC mit der MACS® Technologie.....	31
2.2.3.4.1.	Isolierung von CD19 ⁺ B-Zellen.....	32
2.2.3.4.2.	Isolierung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	32
2.2.3.4.3.	Isolierung von CD14 ⁺ Monozyten.....	33
2.2.3.5.	Differenzierung von Monozyten zu unreifen und reifen dendritischen Zellen und Beladung mit ESAT-6/ CFP-10.....	33
2.2.3.6.	Expansion ESAT-6/ CFP-10 spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen.....	33
2.2.3.7.	Restimulation ESAT-6/ CFP-10 spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen.....	34
2.2.3.8.	Stimulation von Vollblut mit rekombinantem ESAT-6/ CFP-10 Protein.....	34
2.2.3.9.	Transfektion mit der <i>Nucleofector</i> ® Technologie.....	35
2.2.4.	Biochemische Methoden.....	35
2.2.4.1.	Vorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE (Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	35
2.2.4.1.1.	Herstellung der Polyacrylamidgele.....	35
2.2.4.1.2.	Aufbereitung von Zellen und Überständen.....	36
2.2.4.1.3.	Auftrennung von Proteinen mit der SDS-PAGE.....	36
2.2.4.2.	Western Blot Analyse.....	37
2.2.4.2.1.	Transfer von Proteinen im <i>Semi-Dry-Blot</i> Verfahren.....	37
2.2.4.2.2.	Transfer von Proteinen im <i>Wet-Blot</i> Verfahren.....	37
2.2.4.2.3.	Nachweis spezifischer Proteine mittels <i>Immunoblotting</i>	37
2.2.5.	Immunologische Methoden.....	38
2.2.5.1.	Durchflusszytometrie.....	38
2.2.5.2.	Färbung von Oberflächenmarkern.....	38
2.2.5.3.	Intrazelluläres Färben von Markern.....	39
2.2.5.4.	Färben in Vollblut.....	39
2.2.5.5.	Färben von Zellen mit Propidiumjodid.....	39
3.	Ergebnisse.....	41
3.1.	T-Zell induzierte Reifungsprozesse in antigenpräsentierenden Zellen (APC) als Marker für akute Infektionserkrankungen.....	41
3.2.	Vergleichende Testung verschiedener Methoden zur Antigenbeladung von	

APC.....	42
3.2.1. Etablierung eines Verfahrens zur Antigenbeladung durch Transfektion mit Expressionsplasmiden.....	43
3.2.1.1. Transfektionsraten von PBMC und B-Zellen in PBMC.....	45
3.2.1.2. Transfektionsraten von T-Zellen in PBMC, B-Zellen in PBMC und Gesamt-PBMC.....	48
3.2.1.3. Vitalität von PBMC-Populationen bei Verwendung des Transfektionsverfahrens.....	50
3.2.1.4. Transfektionsraten von B-Zellen in PBMC, abhängig von deren Anteil im Spenderblut.....	52
3.2.1.5. Transfektionsraten von isolierten B-Zellen.....	53
3.2.2. Herstellung von Expressionsvektoren zur Präsentation intrazellulär exprimierter Proteine auf HLA-Klasse-II Molekülen.....	55
3.2.3. Funktionelle Charakterisierung des Transfektionssystems.....	58
3.2.3.1. Proteinexpression in PBMC.....	58
3.2.3.2. Proteinexpression in DG75-Zellen.....	60
3.2.3.3. Vergleichende Untersuchung der Zellvitalität vor und nach Transfektion mit verschiedenen Plasmiden unter Verwendung des <i>Nucleofector®</i> Verfahrens.....	61
3.2.3.4. Stimulation von T-Helferzellen nach Transfektion mit ESAT-6- bzw. ESAT-6/CFP-10-Expressionsplasmid in PBMC unter Verwendung des <i>Human B Cell Nucleofector® Kits</i>	63
3.2.4. Etablierung eines Zellkulturmödells zur Optimierung des Nachweises antigenspezifischer T-Helferzellen.....	64
3.2.4.1. Expansion von ESAT-6/ CFP-10-spezifischen T-Helferzellen.....	64
3.2.4.2. Restimulation spezifischer T-Helferzellen durch proteinbeladene bzw. mit Expressionsplasmid transfizierte APC.....	65
3.2.5. Proteinbeladung der APC in Vollblut.....	67
4. Diskussion.....	69
4.1. Eignung des <i>Nucleofector®</i> Verfahrens zur Plasmidtransfektion in primäre B-Zellen	69
4.1.1. Analyse von Transfektionsraten anhand der Expressionseffizienz von GFP in PBMC und deren Subpopulationen nach Verwendung des <i>Nucleofector®</i> Verfahrens.....	70
4.1.2. Analyse der Vitalität und GFP-Expression von PBMC und ihren Subpopulationen bei Anwendung verschiedener Transfektionsprogramme des <i>Nucleofector®</i>	71
4.1.3. Versuche zur Analyse und Optimierung der Transfektionseffizienz und Proteinexpression in humanen B-Zellen.....	73
4.2. Herstellung von ESAT-6 respektive ESAT-6/ CFP-10 Expressionsplasmiden.....	74
4.3. Expression von ESAT-6 in humanen Zellen.....	75
4.4. Untersuchung von ESAT-6-spezifischen Zellantworten.....	76
Zusammenfassung.....	79
Literaturverzeichnis.....	81
Anhang.....	91
Danksagung.....	94
Erklärung zum Promotionsverfahren.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Prozessierung und Präsentation von Antigenen auf <i>major histocompatibility complex</i> (MHC)-Klasse-I-Molekülen.....	9
Abbildung 2:	Prozessierung und Präsentation von Antigenen auf <i>major histocompatibility complex</i> (MHC)-Klasse-II-Molekülen.	10
Abbildung 3:	Das Prinzip der Reversen T-Zelltechnologie (RTT).	14
Abbildung 4:	Der Vektor <i>pcDNA3.1 (+)ΔNeoLAMP</i>	23
Abbildung 5:	Der Vektor <i>pET-22b(+)_esxAB</i>	23
Abbildung 6:	Übersicht über die Interaktion zwischen APC und aktiverter T-Helferzelle.	42
Abbildung 7:	<i>Gatingschema</i> zur Erfassung der mittels des <i>Human B Cell Nucleofector® Kit</i> GFP-transfizierten Gesamt-PBMC, B- und T-Zellen.....	44
Abbildung 8:	<i>Gatingschema</i> zur Erfassung Propidiumiodid gefärbter PBMC.	45
Abbildung 9:	Bestimmung der Transfektionsrate von B-Zellen und PBMC in PBMC Kulturen 24 Stunden nach Transfektion mittels des <i>Human B Cell Nucleofector® Kit</i>	46
Abbildung 10:	Bestimmung der Transfektionsrate von B-Zellen und PBMC in PBMC Kulturen 41 Stunden nach Transfektion mittels des <i>Human B Cell Nucleofector® Kit</i>	47
Abbildung 11:	Vergleich der Transfektionsraten von PBMC, B und T-Zellen in PBMC Kulturen.....	49
Abbildung 12:	Vitalität der PBMC Populationen 41 Stunden nach Transfektion mit verschiedenen Transfektionsprogrammen des <i>Nucleofector®</i> unter Verwendung des <i>Human B Cell Nucleofector® Kits</i>	50
Abbildung 13:	Vitalität der PBMC Populationen 24 Stunden nach Transfektion mit Transfektionsprogramm U15 des <i>Nucleofector®</i> Verfahrens.....	51
Abbildung 14:	Zusammenhang der Transfektionsrate von B-Zellen in PBMC mit ihrem prozentualen Anteil in der PBMC Kultur.....	53
Abbildung 15:	Transfektionsraten isolierter B-Zell-Populationen unter Verwendung des <i>Human B Cell Nucleofector® Kits</i>	54
Abbildung 16:	Transfektionsraten von DG75 Zellen unter Verwendung des <i>Human B Cell Nucleofector® Kits</i>	55
Abbildung 17:	Klonierung eines Expressionsvektors für die intrazelluläre Synthese von ESAT-6 in Kombination mit Signalsequenzen zum Einschleusen des exprimierten Proteins in den HLA-Klasse-II-Prozessierungsweg.....	57
Abbildung 18:	Klonierung eines Expressionsvektors für die intrazelluläre Synthese des ESAT-6/ CFP-10 Fusionsproteins in Kombination mit Signalsequenzen	

zum Einschleusen des exprimierten Proteins in den HLA-Klasse-II-Prozessierungsweg.....	58
Abbildung 19: Expression des ESAT-6 Proteins in PBMC nach Transfektion mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid unter Verwendung des <i>Human B Cell Nucleofector® Kits</i>	59
Abbildung 20: Expression des ESAT-6 Proteins in DG75 Zellen nach Transfektion mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid unter Verwendung des <i>Human B Cell Nucleofector® Kits</i>	61
Abbildung 21: Überlebensrate von mittels des <i>Nucleofector®</i> -Verfahrens transfizierten und nicht transfizierten PBMC nach vierundzwanzigstündiger Kultur.	62
Abbildung 22: Zahl IFN- γ -produzierender T-Helferzellen in PBMC eines akut an Tuberkulose erkrankten Probanden nach einer spezifischen Restimulation mit ESAT-6 respektive ESAT-6/ CFP-10. Die Antigenbeladung der APC in PBMC zur spezifischen Stimulation der Th-Zellen erfolgte durch Transfektion mit dem ESAT-6- und ESAT-6/ CFP-10-Expressionsplasmid unter Verwendung des <i>Human B Cell Nucleofector® Kits</i>	63
Abbildung 23: Analyse <i>ex vivo</i> expandierter ESAT-6/ CFP-10-spezifischer T-Helferzellen...65	
Abbildung 24: Vergleichende Analyse der Effizienz von unter Verwendung des <i>Human B Cell Nucleofector® Kits</i> ESAT-6-Expressionsplasmid transfizierten und mit ESAT-6 Protein stimulierten PBMC zur spezifischen Restimulation ESAT-6/ CFP-10 spezifischer T-Zellen.	66
Abbildung 25: Vergleich der Zahl IFN- γ -produzierender T-Helferzellen in Vollblut TB-negativer Probanden sowie Patienten mit einer latenten und akuten Tuberkulose nach sechsständiger Stimulation mit ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein.	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Geräte.....	16
Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	17
Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Nährmedien.....	19
Tabelle 2.5: Übersicht über die verwendeten Puffer.....	20
Tabelle 2.6: Liste der Blutspender.....	21
Tabelle 2.7: Verwendete kommerziell erhältliche Kits.....	24
Tabelle 2.8: Verwendete Antikörper.....	25
Tabelle 2.9: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele.....	36

Abkürzungsverzeichnis

4.1BBL	4.1BB-Ligand (CD137L)
A	Adenin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BZM	B-Zellmedium
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CFP-10	<i>culture filtrate protein 10</i>
CMV	Zytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	Gefahr-assoziiertes molekulares Muster
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECD	<i>PE-TexasRed-Konjugat</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESAT-6	<i>early secretory antigenetic target 6</i>
FITC	Fluorscein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FS	<i>forward scatter</i>
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten/ Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
iDC	unreife dendritische Zelle

IFN	Interferon
IgM	Immunglobulin M
IgG	Immunglobulin G
IGRA	<i>in vitro</i> T-Zell-basierte Interferon- γ Freisetzungstests
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membranangriffskomplex
MBL	Mannan-bindendes Lektin
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1
mDC	reife dendritische Zelle
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MTBC	<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NKZ	natürliche Killerzellen
OX40L	OX40-Ligand (CD134L)
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS ₀	phosphatgepufferte Salzlösung ohne zweiwertige Ionen
Pc5	Peridininchlorophyllprotein-Cyanin-5.5
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerithrin
Pen/ Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PJ	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Aacetat
PRR	molekulare Mustererkennungsrezeptoren
QFT	Quantiferon®-TB Gold <i>In Tube</i> Test
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-gekoppelte Polymerase-Kettenreaktion
RTT	Reverse T-Zell-Technologie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SS	<i>side scatter</i>
STIKO	Ständige Impfkommission am Robert-Koch-Institut
T	Thymin
TB	Tuberkulose
TBS	Tris(hydroxymethyl)-Aminoethan-gepufferte Salzlösung
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor β

Th-Zelle	T-Helperzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TRAF	Tumornekrosefaktor assozierte Faktoren
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminoethan
TTBS	<i>Tween</i> und Tris(hydroxymethyl)-Aminoethan-gepufferte Salzlösung
TZM	T-Zellmedium
TZR	T-Zellrezeptor
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
(w/v)	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
WHO	Weltgesundheitsorganisation

X

1. Einleitung

Tuberkulose ist eine Krankheit, welche die Menschheit schon seit Jahrtausenden plagt, wie kürzlich Untersuchungen an ägyptischen (Donoghue *et al.*, 2009) und lateinamerikanischen (Daniel, 2000) Mumien enthüllten. Tatsächlich geht man davon aus, dass ihr Erreger *Mycobacterium tuberculosis* seit 15 000 bis 35 000 Jahren in seiner heutigen Form existiert (Arnold, 2007). Die Symptomatik bei Erkrankung zeigt sich variabel, meist jedoch durch einen über Wochen persistierenden Husten, Fieber und Schwitzen, einen Verlust an Gewicht und eine starke körperliche Schwäche. Bis ins zwanzigste Jahrhundert hinein endete die ursächlich umstrittene Krankheit meist tödlich (Daniel, 2006). Sowohl erbliche wie klimatische Einflüsse als auch natürliche Prozesse wurden zeitweilig diskutiert (Gradmann, 2006), bis 1790 Benjamin Marten erstmals eine infektiöse Genese postulierte (Doetsch, 1978).

Der Klärung dieser Frage nahmen sich über die Jahrhunderte viele Wissenschaftler an, starben doch in den Epidemien Millionen von Menschen durch die „Weiße Pest“ (Daniel, 2006). Am 24. März 1882 gelang Robert Koch schließlich die Identifikation des häufigsten Erregers der Tuberkulose, wofür ihm 1905 der Nobelpreis verliehen wurde (Sakula, 1982): *Mycobacterium tuberculosis*, ein gram-positives Stäbchen, das durch seinen außergewöhnlichen Lipidmantel säurefest ist und dessen Pathogenität u.a. durch sein intrazellulär parasitierendes, sehr langsames Wachstum und seine Fähigkeit zum jahrelangen, inaktiven Überdauern im Organismus gekennzeichnet ist. Auf diese Weise ist es später in der Lage, zum Beispiel bei Immunschwäche des Trägers, eine aktive Infektion zu verursachen (Höner zu Bentrup, 2001).

Seither galten die Bemühungen der Forscher präventiv, diagnostisch und therapeutisch der Infektionserkrankung entgegenzutreten. Ein Meilenstein dieser Entwicklung war 1890 die Extraktion von Tuberkulin aus *Mycobacterium tuberculosis* durch Robert Koch. Der Einsatz von Tuberkulin als Medikament zur Behandlung der Tuberkulose zeigte jedoch nicht die erhoffte Wirkung (Gradmann, 2005). Jedoch gelang es Clemens von Pirquet 1909 mit Hilfe des Tuberkulins eine Methode zum Nachweis der Tuberkuloseinfektion, den Tuberkulin-Hauttest, zu entwickeln. Bald darauf im Jahre 1910 erarbeiteten Felix Mendel und Charles Mantoux eine nach Ihnen benannte und heute weit verbreitete sensitivere Variante des Tests, die auf einer intradermalen Injektion des Tuberkulins beruht (Daniel, 2003). Mit der Entwicklung des BCG-Impfstoffs aus einem apathogenen Impfstamm durch Albert Calmette und Camille Guérin im Jahr 1906 und dessen Verfügbarkeit ab 1921 (Daniel; 2005) sowie der Entdeckung und Gewinnung von Streptomycin im Jahr 1943 durch Albert Schatz, Elizabeth Bugie und Selman Waksman (Schatz *et al.*, 1944), gelangen den Forschern weitere bedeutende Fortschritte in der Bekämpfung der Tuberkulose.

1.1. Möglichkeiten und Grenzen aktueller Verfahren zur Diagnostik von Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*

Obwohl die Inzidenz der Tuberkulose in den letzten Jahren in Deutschland und auch weltweit unter Berücksichtigung des Bevölkerungswachstums rückläufig ist, gilt dies nicht allerorts. Laut WHO traten in Asien im Jahr 2008 allein in Indien und China 35 % aller Neuerkrankungen an Tuberkulose auf. Ferner verstarben weltweit 1,3 Millionen Menschen in Folge der Erkrankung, was sie – bei Mangel an therapeutischen Möglichkeiten – heutzutage immer noch zu einer der am häufigsten tödlich endenden Infektionen macht (Chaisson, 2009).

Nach großen Erfolgen in den 70er und 80er Jahren durch die Einführung von Tuberkulostatika verbreitete sich ein Gefühl der Sicherheit und die weitere Forschung an Prävention und Therapie dieser Krankheit trat in den Hintergrund (Chaisson, 2009). Dies änderte sich erst, nachdem epidemiologische Studien der letzten Jahrzehnte die drohende Gefahr durch die Entwicklung und Verbreitung von multiresistenten Keimen enthüllten, insbesondere im Zusammenhang mit der Ausbreitung von HIV und gesundheitsökonomischen Versorgungsproblemen (Ghandi, 2006). Daraufhin verfolgte Pläne zur Bekämpfung der Tuberkulose wie zuletzt das *Millennium Development Goal* mit dem Ziel die Tuberkulose bis zum Jahr 2050 zu eliminieren (Komatsu, 2007) werden nicht erreicht werden (Mandeep, 2010).

Ferner ist der Erreger weit verbreitet. So leidet etwa ein Drittel der Weltbevölkerung unter einer zumeist unentdeckten, latenten Tuberkuloseinfektion (LTBI), die laut WHO bei jedem Zehnten im Laufe seines Lebens akut werden wird. Verantwortlich dafür ist zumeist eine Immunsuppression, wie sie bei (malignen) Erkrankungen, im Alter, bei mangelhaften Ernährungs- und Hygienezuständen oder auch Infektionskrankheiten wie AIDS auftritt (Horsburgh, 2004). Aus diesen Gründen stellt die Entwicklung besserer Verfahren sowohl zur Früherkennung als auch zur Therapie dieser Infektion weiterhin eine große Herausforderung dar.

Für die Diagnose einer aktiven Tuberkulose stehen derzeit verschiedene Verfahren zur Verfügung, die aber mit Limitationen behaftet sind. Die Anzucht von TB-Erregern aus Sputum des Patienten auf Löwenstein-Jensen Agar ist immer noch diagnostischer Goldstandard. Das Wachstum auf diesem festen Nährmedium benötigt jedoch drei bis vier Wochen, in teureren Flüssigkulturen genügen hierfür acht bis sechzehn Tage (Getahun, 2007). Ein mikroskopischer Nachweis von säurefesten Stäbchen unter Verwendung der Ziehl-Neelsen-Färbung ist schnell und kostengünstig. Da jedoch so keine Differenzierung hinsichtlich der Pathogenität der Stäbchen möglich ist und darüber hinaus bei geringer Keimzahl die Sensitivität zu wünschen übrig lässt, kann der Nachweis säurefester Stäbchen lediglich ein Hinweis sein. Die Diagnose einer akuten Tuberkulose ist so nicht möglich.

Die inzwischen häufig eingesetzte PCR ist ebenfalls eine schnelle aber teure Methode, die in der Lage ist, verschiedene Tuberkuloseerreger anhand spezifischer Gene zu erkennen und zu unterscheiden. Zu bemängeln ist, dass sie im Fall einer LTBI falsch positive Ergebnisse liefern kann, und darüber hinaus in ihrer Sensitivität ebenso von der Erregerzahl im Patientenmaterial abhängig ist (Chaisson, 2009). Insgesamt ist bei diesen Testverfahren zu

bedenken, dass die Gewinnung von Patientenmaterial – je nach Lokalisation der Tuberkulose – aufwendig sein kann (Bronchoskopie, Liquorpunktion etc.) und für den Patienten eine zusätzliche Belastung darstellt.

Der bei einem klinischen Verdacht routinemäßig durchgeführte Test nach Mendel-Mantoux kann nach BCG-Impfung, Kontakt zu apathogenen Mykobakterien oder bei LTBI falsch positiv sein. Eine vorliegende Tuberkulose kann in Einzelfällen von ihm nicht erkannt werden, wenn die Ersterkrankung erst seit wenigen Wochen besteht oder eine Immundefizienz vorliegt. Die neueren Interferon ($\text{IFN}-\gamma$) Sekretionstests (IGRA, *in vitro T-cell-based interferon release assay*) verfügen über eine weitaus höhere Spezifität, da sie auf der selektiven Stimulation von T-Zellen mit Antigenen aus den humanpathogen relevanten Mykobakterien, dem *Mycobacterium-tuberculosis-Komplex* (MTBC) basieren. Diese Vertreter zeichnen sich durch eine besonders hohe genetische Übereinstimmung aus und umfassen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, and *M. canetti* (Ahmad, 2011). Derzeit verwendet werden ausgewählte Peptide des *early secretory antigenic target 6* (ESAT-6) und *culture filtrate protein 10* (CFP-10) Proteins, die spezifisch für den MTBC sind und weder im BCG-Impfstamm noch in apathogenen Mykobakterien vorkommen (Lalvani, 2001 und Jiang, 2009). Eine Differenzierung zwischen einer latenten und einer aktiven Tuberkulose ist allerdings auch mit diesen Tests nicht möglich (Diel *et al.*, 2008).

Insofern besteht ein dringender Bedarf für ein schnelles und unkompliziertes Verfahren zum gesicherten Nachweis einer aktiven Tuberkuloseinfektion (Chaisson, 2009).

1.2. Das humane Immunsystem

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für das Überleben vielzelliger Organismen ist die Ausbildung von Barrieren gegen schädigende Umwelteinflüsse. Als wichtiger Teil dieses Schutzschildes begegnet das menschliche Immunsystem täglich einer Vielzahl von pathogenen Erregern (Hoebe, 2004). Um Schaden für den Organismus möglichst effektiv abzuwehren entwickelte sich im Laufe der Evolution ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und humoraler Botenstoffe (Chemo- und Zytokine). In der Lehre der Immunologie wird das humane Immunsystem sinnvoll in einen unspezifischen, angeborenen (*innate immunity*) und einen spezifischen, erworbenen Bereich (*adaptive immunity*) eingeteilt (Loewendorf, 2010).

Überwindet ein Erreger die mechanischen Schutzfunktionen des Körpers, so werden unmittelbar Bestandteile des unspezifischen Immunsystems aktiviert. Dieses setzt sich zusammen aus Phagozyten – Monozyten, Makrophagen (Geissmann, 2010), Granulozyten, Dendritischen Zellen (DC) und natürlichen Killerzellen (NKZ) – Zytokinen wie Interferon- $\alpha\beta$ (IFN- $\alpha\beta$) und Tumornekrosefaktor (TNF; Loewendorf, 2010) sowie dem phylogenetisch ältesten Teil, dem Komplementsystem (Wills-Karp, 2007). Dazu gehören Antikörper und Proteine, wie Mannan-bindendes Lektin (MBL), C-reaktives Protein (CRP), Komplementfaktoren wie C1q, C3, C4, C5 und der Membranangriffskomplex (MAC), die exogene und endogene schädliche Moleküle – sogenannte PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) und DAMPs (Gefahr-assoziierte molekulare Muster) – markieren und

opsonieren (Köhl, 2006). Mittels all dieser Komponenten werden sowohl bekannte als auch bisher fremde Pathogene schnell eliminiert und der Organismus akut geschützt.

Unser erworbenes Immunsystem zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus, ein über lange Zeit stabiles Gedächtnis für bekannte gefährliche Antigene auszubilden. Daher ist es entscheidend für den gezielten Angriff bei erneutem Kontakt (Paust, 2010), unerlässlich zur Infektkontrolle (Loewendorf, 2010) und spielt eine entscheidende Rolle in der Ausbildung von Allergien, Autoimmunerkrankungen und Tumorimmunität (Zhu, 2010).

Wesentlicher Bestandteil sind B- und T-Lymphozyten sowie professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC), die extrazelluläre Pathogene aufnehmen und mit deren Hilfe die spezifische Erkennung durch T-Zellen erst möglich ist. Untergruppen der T-Lymphozyten sind zytotoxische T-Zellen (ZTL, CD8⁺) und T-Helferzellen (Th-Zellen, CD4⁺) in ihren unterschiedlichen Entwicklungsstufen: den naiven und aktivierten T-Zellen sowie Gedächtnis-T-Zellen (Klarenbeek, 2010). Auch NKZ werden seit einiger Zeit erworbene antigenspezifische Fähigkeiten zugesprochen, die ihnen unabhängig von Lymphozyten die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses gestatten (O'Leary, 2006). Die Gruppe der APC besteht im Wesentlichen aus dendritischen Zellen (DC), Monozyten, Makrophagen und B-Zellen (Chatzigeorgiou, 2009, Drolet, 2010 und Mok, 2010), den sogenannten professionellen APC.

An der Schnittstelle dieser beiden zentralen Abwehrmechanismen kommt der angeborenen Immunabwehr als Initiator der Antigenpräsentation eine wesentliche Bedeutung für die Aktivierung des erworbenen Immunsystems zu. Unspezifische Phagozyten erkennen mittels ihrer spezifischen Mustererkennungsrezeptoren (PRR) pathogene Moleküle. Die Erkennung bakterieller Bestandteile durch PRR führt zur Aktivierung und Reifung der APC, wodurch sie die Fähigkeit erlangen, effizienter T-Zellen zu aktivieren.

Unter den PRR fasst man unter anderem das Komplementsystem (Carroll, 2004) und Rezeptoren auf den NK-Zellen zur Diskriminierung zwischen gesunden und geschädigten Körperzellen (Raulet, 2004) zusammen sowie die 13 bisher in Säugetieren beschriebenen membranständigen Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR, Hoebe, 2004 und Iwasaki & Medzhitov, 2004). Diese können spezifisch Strukturen mikrobiellen Ursprungs wie LPS (TLR4), bakterielle Lipoproteine und Fettsäuren (TLR2), Flagellin (TLR5), doppelsträngige RNA (TLR3), einsträngige virale DNA (TLR7) oder unmethylierte CpG DNA (TLR9) erkennen (Iwasaki&Medzhitov, 2004). Der Antigenaufnahme schließen sich in der APC Reifungsprozesse an, die über die Steigerung der Synthese von MHC-Rezeptormolekülen und kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 sowie insbesondere über die darauf erfolgende Epitoppräsentation nach unspezifischer Phagozytose von Pathogenen Voraussetzung für die Ausprägung und Polarisierung der spezifischen Immunantwort sind (Hoebe, 2004).

1.3. Entstehung von naiven T-Lymphozyten

Um als Teil der adaptiven Immunantwort im Fall einer Infektion zuverlässig zu funktionieren, durchlaufen T-Zellen eine komplizierte Entwicklung. Die aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen wandern zunächst in den Thymus ein. Dieser

gibt den T-Zellen ihren Namen, und dort findet in zwei Entwicklungsschritten ihre Differenzierung zu naiven T-Helferzellen respektive zytotoxischen-T-Zellen statt (Lynch, 2009). Zuerst werden in einer positiven Selektion alle Zellen eliminiert, die über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) nicht in der Lage sind, spezielle Rezeptoren – MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex)-I- bzw. MHC-II-Moleküle – zu erkennen. In der nun folgenden negativen Selektion werden die Thymozyten eliminiert, die über ihren TZR Autoantigene erkennen (Bonilla, 2010). Die übrigen Zellen, die sowohl die negative als auch positive Selektion überstanden haben, reifen nun aus und verlieren dabei abhängig von ihrer MHC-Spezifität ihr CD-Antigen. MHC-I-spezifische Zellen werden zu CD8⁺ ZTL und MHC-II-spezifische differenzieren zu CD4⁺ T-Helferzellen. Die auf diese Weise vorbereiteten naiven T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren so über Jahre im Organismus, während sie ständig in lymphatischen Organen in Kontakt zu diversen APC treten (Bonilla, 2010).

1.4. Aktivierung von naiven T-Helferzellen zu Effektorzellen

Trifft eine so vorbereitete CD4⁺-T-Zelle nun erstmals auf ihr im Kontext mit einem MHC Molekül auf der Oberfläche einer APC präsentiertes Epitop, beginnt die Differenzierung der naiven zur aktivierte, klonal expandierenden T-Effektorzelle (Elgueta, 2009), die sich abhängig von Dauer des Antigenkontakts und des umgebenden Milieus vermehrt und alle 6 bis 8 Stunden teilt (Kaech, 2002 und Michalek, 2010). Zur Bekämpfung einer Infektion ist auf diese Weise eine große Anzahl epitopspezifischer T-Zellen verfügbar.

Darüber hinaus spielen für die Entwicklung und Modulation der Th-Effektorzelle Interaktionen mit APC über ihre teils transient und teils konstitutionell exprimierten kostimulatorischen Oberflächenmolekülen wie CD40-Ligand (CD154), CD27, CD28, OX40 und 4.1BB eine wesentliche Rolle (Taraban, 2002 und Kaech, 2002). So kann die Affinität und Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors durch parallele Stimulation von CD28 oder CD40L gesteigert werden, hingegen tragen OX40 und 4.1BB zur Aufrechterhaltung der Immunantwort der T-Zellen bei (Kaech, 2002).

Ferner reifen die naiven Th-Zellen im Zuge ihrer Aktivierung zu spezialisierten Subtypen aus, die man anhand ihres Spektrums von Oberflächenmolekülen und Zytokinen zur Immunmodulation unterscheidet (Del Prete, 1998 und Zhu, 2010): dabei spielen insbesondere Th1- und Th2-Zellen eine Schlüsselrolle für den Verlauf der Abwehrreaktion. Th1 sezernieren IFN- γ , Interleukin (IL)-2 und TNF- β (Tumornekrosefaktor- β , Synonym: Lymphotxin- α ; Zhu, 2010), womit sie insbesondere Einfluss auf die Aktivität von ZTL nehmen (Jiang, 2009). Ferner aktivieren sie Monozyten und Makrophagen und regen die Produktion von komplementbindendem IgG an, worüber sie die Zytolyse und Phagozytose markierter Mikroben vermitteln (Romagnani, 1996). Über die Produktion der inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- β können Th1 dominierte Entzündungsreaktionen sogar mit Gewebeschäden einhergehen, die zur nachhaltigen Bekämpfung von intra- und extrazellulären Pathogenen jedoch in Kauf genommen werden (Abbas, 1996). Die gleichen Th1 vermittelten Mechanismen der Autoaggressivität könnten auch im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie Morbus Basedow, der

Hashimoto Thyreoiditis oder der Enzephalomyelitis disseminata gezeigt werden (Romagnani, 1996).

Th2 Zellen sind stärker an der Immunregulation sowie an Allergieentstehung und Parasitenbekämpfung beteiligt. Sie sezernieren die Zytokine IL-4 IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Dieses Milieu führt zur Ausreifung von B-Zellen zu Plasmazellen und somit zu IgE vermittelten Entzündungsreaktionen. Ferner werden über die Produktion von IL-5 eosinophile Granulozyten aktiviert (Romagnani, 1996). Über die Synthese von IL-4, IL-13 und TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor β) vermag die Th2 andere Leukozyten – insbesondere Makrophagen und Th1 – zu hemmen und die Wirkung von IL-10 und IFN- γ zu antagonisieren. Unter Einfluss der Th2 Zellen werden große Mengen IgM und nicht-komplementbindendes IgG gebildet (Abbas, 1996, Miner, 1998). Th0 bezeichnet einen Phänotyp, der sowohl für Th1 als auch für Th2 charakteristische Zytokine exprimiert und wohl einen Übergangstyp zu Beginn der lymphozytären Aktivierung darstellt (Miner, 1998 und Abbas, 1996).

2003 wurde mit der Th17 Zelle ein weiterer Subtyp der CD4 $^{+}$ -T-Helferzelle identifiziert, der durch die spezifische Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17 charakterisiert ist. Th17 Zellen stimulieren mittels IL-17 Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen zur Produktion weiterer proinflammatorischer Zytoskeletale und Chemokine wie IL-6, IL-8, G-CSF und MCP-1. Auf diese Weise werden durch den Einfluss von IL-17 rasch Monozyten und neutrophile Granulozyten, zwei klassische Fresszellen des unspezifischen Immunsystems bereitgestellt. Daneben scheinen Th17 eine Rolle für den Verlust oder Erhalt der Selbttoleranz zu spielen, worauf signifikant erhöhte IL-17 Spiegel bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Encephalitis Disseminata, Psoriasis und rheumatoider Arthritis hinweisen (Aggarwal, 2003 und Zhu, 2010).

Inwiefern die Differenzierung der naiven Th-Zellen in ihre Subtypen durch das umgebende Zytokinprofil gesteuert wird oder von Anfang an genetisch determiniert ist, wird derzeit kontrovers diskutiert (Zhu, 2010).

Daneben wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Reihe weiterer T-Zell-Subtypen vorgeschlagen. Am bedeutendsten darunter ist die sich stets vergrößernde Gruppe der phänotypisch verwandten Treg (regulatorische T-Zellen, ehemals Suppressor-T-Zellen), die man in iTreg (induzierte Treg, den Th-Zellen zugehörig) und nTreg (natürliche Treg, eigenständige T-Zell-Subpopulation) einteilt (Zhu, 2010). Ihnen werden suppressive immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben, da sie zur Vermeidung schädigender Aktivitäten sowohl T-Effektorzellen, B-Zellen als auch APC hemmen (Shevach, 2006). Regulatorische T-Zellen tragen mehrheitlich den Oberflächenmarker CD25 und exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxp3, dessen Defekt bei Menschen Autoimmunerkrankungen auslöst (Sakaguchi, 2007). Somit erfüllen Treg eine zentrale Aufgabe in der Erhaltung von Selbttoleranz und Kontrolle der Immunabwehr.

Nach Ablauf einer Immunreaktion und Beseitigung der auslösenden Pathogene differenzieren einige der T-Effektorzellen zu T-Gedächtniszellen. Bei diesem Prozess sterben zunächst innerhalb weniger Wochen – der sogenannten Kontraktionsphase – über 90% der CD4 $^{+}$ oder CD8 $^{+}$ T-Effektorzellen infolge von Veränderungen des Zytokinmilieus und der Stoffwechselleage unter anderem durch ein reduziertes IL-2-Angebot an

konsekutiver Apoptose (Kaech, 2002 und Michalek, 2010). Auf diese Weise wird das ursprüngliche Gleichgewicht der T-Zell Diversität wieder hergestellt und die während einer Immunantwort erzeugte Dominanz erregerspezifischer Klone beseitigt (Badovinac, 2006). Bei der Weiterentwicklung in T-Gedächtniszellen verlieren die verbleibenden T-Zellen ihre proinflammatorische Oberflächenantigen- und Zytokinexpression (Michalek, 2010), die für die weitere Aktivität hauptsächlich relevanten und weiterhin exprimierten Oberflächenmoleküle sind CCR7 und CD45RA (Seder, 2008).

T-Gedächtniszellen zeichnen sich durch eine große phänotypische Vielfalt und funktionelle Plastizität (Kaech, 2002, McKinstry, 2008 und Van Leeuwen, 2009) sowie durch eine erhöhte Sensitivität für ihr spezifisches Antigen aus (Suhr, 2009). Für ihr Überleben sind sie auf die Stimulation durch IL-7 und IL-15 angewiesen (Suhr, 2009). Sie verbleiben im Organismus und führen bei erneutem Epitopkontakt zu einer schnelleren und massiven Sekundärantwort, die zusammen mit den anderen Effektoren des spezifischen und unspezifischen Immunsystems eine rasche und effektive Infektkontrolle und Pathogenbekämpfung ermöglicht (Kaech, 2002). Neben der Reaktivierung durch Epitopkontakt spielt dafür außerdem die Ausschüttung der Zytokine IFN- γ , TNF und IL-2 eine Rolle (Seder, 2008).

1.5. Antigenpräsentation durch professionelle APC und Erkennung von Fremdprotein durch T-Lymphozyten

Die Besonderheit der professionellen APC gegenüber Phagozyten des unspezifischen Immunsystems besteht darin, dass sie MHC-II-Moleküle besitzen, und darüber in der Lage sind, Epitope aus phagozytiertem und in endolysosomalen Kompartimenten prozessiertem Fremdantigen speziell an CD4 $^{+}$ -T-Helferzellen zu präsentieren (Elgueta, 2009). Dies ermöglicht die Erzeugung von spezifischen Immunantworten (den Haan & Bevan, 2000).

Im Gegensatz dazu besitzen alle kernhaltigen Zellen die Fähigkeit, aus endogen vorliegenden Proteinen generierte Peptide auf MHC-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Diese MHC-I/Peptidkomplexe werden von zytotoxischen T-Zellen erkannt. Üblicherweise präsentieren gesunde Zellen dort eigene Epitope. Sobald die Zelle – bei Befall mit Viren, intrazellulär parasitierenden Bakterien oder einer malignen Entartung – ein fremdes Epitop auf ihrem MHC-I-Molekül zeigt, wird dieses von der ZTL erkannt und die autologe Zelle innerhalb von Minuten durch die Ausschüttung von Zytotoxinen, Proteasen wie Granzymen und die Expression des Fas-Liganden zur Apoptose angeregt und eliminiert (Bonilla, 2010). Im Sonderfall können zytoplasmatisch vorliegende Proteine auch auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden. So gelangen MHC-I-Proteine und das Lysosom-assoziierte Membranprotein 1 (LAMP1), vermittelt durch spezielle Adressierungssignale am N-Terminus in endolysosomale Kompartimente (Janvier & Bonifacino, 2005). Diese Erkenntnis eröffnet die Möglichkeit intrazellulär produzierte Fremdproteine durch Fusion mit diesen Adressierungssignalen gezielt in den endolysosomalen Abbau zur Epitop-Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen einzuschleusen. Beispiele für solche Adressierungssignale sind die N-terminale Translokationsdomäne (AS 1-28) in Verbindung mit der lysosomalen Adressierungssequenz (AS 378-417) des LAMP1-Proteins, welche in

der Lage sind, Fremdproteine dem endolysosomalen Abbau zuzuführen (Wu, 1995). Umgekehrt sind auch professionelle APC, insbesondere dendritische Zellen in der Lage, bestimmte extrazelluläre Antigene auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren. Man bezeichnet diesen Vorgang als *cross presentation* und *cross priming*. Dieser Prozess ist für die Aktivierung von ZTL zur Bekämpfung von Malignomen und Infektionen von besonderer Bedeutung (Kurts, 2010).

Im Gegensatz zur direkten Bekämpfung infizierter und maligner Zellen erfüllen die CD4⁺-T-Zellen die Aufgabe der Steuerung der Immunreaktion. Der Kontakt zwischen dem von der professionellen APC auf MHC-II Molekülen präsentierten Epitop und dem TZR der T-Helferzelle dient der Erkennung von fremden Peptiden aus dem Extrazellulärtraum, wie phagozytierten Bakterienbestandteilen oder Toxinen. Dies induziert in Th-Zellen diverse Aktivierungs- und Regulationsmechanismen (siehe Kapitel 1.4.), die wiederum direkt oder indirekt die Aktivierung von ZTL, Makrophagen, der Produktion von Antikörpern durch B-Zellen sowie die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses steuern und so wesentlich sowohl zur Infektkontrolle als auch zum Schutz vor Autoimmunerkrankungen beitragen (Zhu, 2010).

Auch die APC variieren in ihrer Fähigkeit zur Prozessierung und Präsentation von Antigenen. DC gelten als die effektivsten APC. Im unreifen Zustand dominiert ihre Fähigkeit zur Phagozytose. Infolge der Aufnahme von Pathogenen werden in DC Reifungsprozesse induziert, welche die Fähigkeit zur Aufnahme von Antigenen reduzieren sowie eine Steigerung der Proteinprozessierung und Epitoppräsentation an T-Zellen bewirken (den Haan & Bevan, 2000). Zudem wandern die Antigen-beladenen APC in lymphatische Organe, wo der Kontakt mit erregerspezifischen naiven T-Zellen erfolgt.

Monozyten und die aus ihnen differenzierenden Makrophagen sind ebenfalls Phagozyten, die im Blut (Monozyten) oder in ihrem jeweiligen Effektororgan (Makrophagen) Erreger und Proteine aufnehmen und anschließend an T-Zellen präsentieren (Hoebe, 2004 und Köhl, 2006).

B-Zellen, die ihren Namen ihrem Entstehungsort – *bone marrow* – verdanken, endozytieren und präsentieren Fremdantigen, das sie zuvor mit ihren spezifischen membranständigen Immunglobulinen gebunden haben (Drolet, 2010). Ferner können B-Zellen im Zuge der Primärantwort – dem Erstkontakt mit Fremdantigen – zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren, die bei erneutem Kontakt zu klonal expandierenden, Antikörper sezernierenden Plasmazellen ausreifen (siehe Kapitel 1.4., Bonilla, 2010).

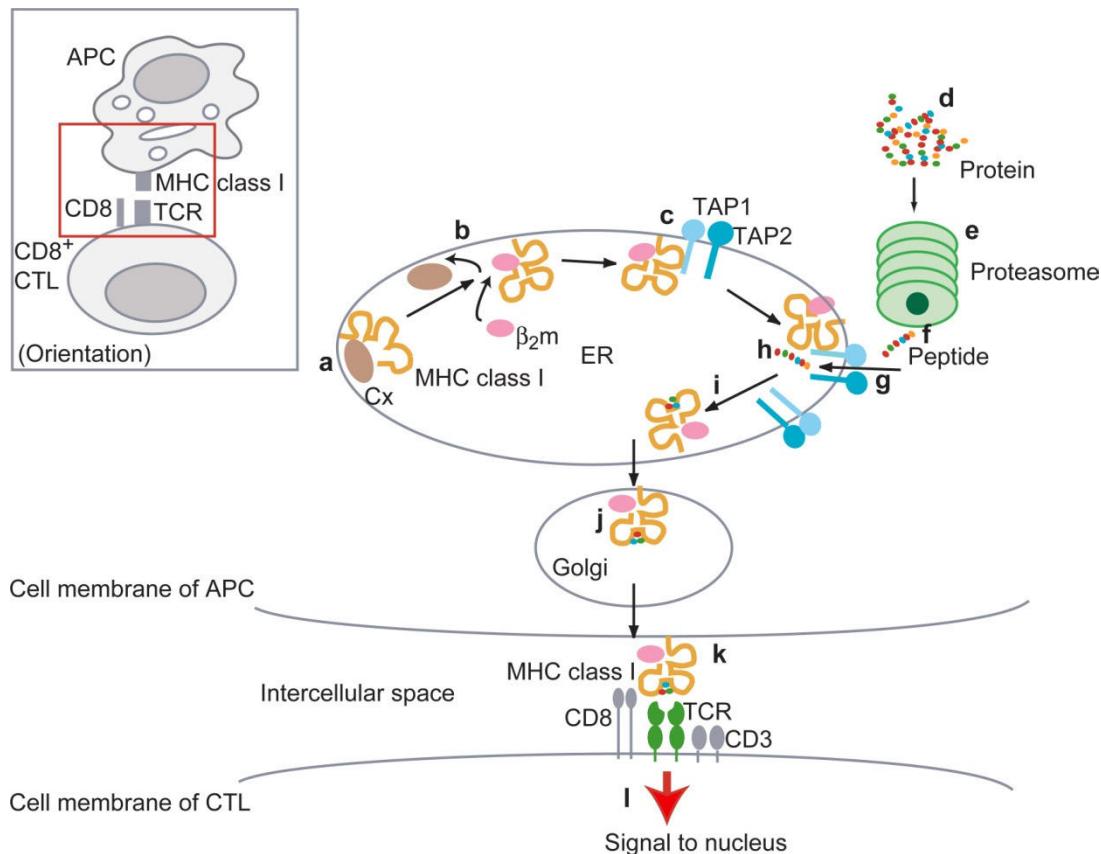


Abbildung 1: Prozessierung und Präsentation von Antigenen auf major histocompatibility complex (MHC)-Klasse-I-Molekülen.

(a) Neu synthetisierte MHC-I-Moleküle binden an Calnexin (Cx) und werden dadurch im Endoplasmatischen Retikulum (ER) in einem vorgefalteten Zustand gehalten. (b) Anschließend erfolgt ein Austausch des Calnexins durch β_2 Mikroglobulin (β_2 m). (c) Der MHC-I- β_2 m-Komplex bindet an den TAP-Komplex (TAP1-TAP2) und erwartet ein Einschleusen von kurzen zytosolischen Peptiden. Diese entstehen durch den Abbau von zytosolischen Proteinen (d) durch das Proteasom (e). Die Peptide (f) werden durch den TAP-Komplex geschleust (g), binden den MHC-I- β_2 m-Komplex durch Wechselwirkung mit der Antigenbindungstasche (h) und dissoziieren zusammen mit diesem von dem TAP-Komplex (i). Das beladene MHC-I-Moleköl wird durch Golgi-Vesikel auf die Zelloberfläche transportiert (j). Für eine erfolgreiche Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle ist eine gleichzeitige Interaktion Peptid-beladener MHC-I-Moleküle mit dem T-Zell-Rezeptor sowie APC- und T-zellständiger kostimulatorischer Moleküle mit ihren Liganden erforderlich (Man, 1998).

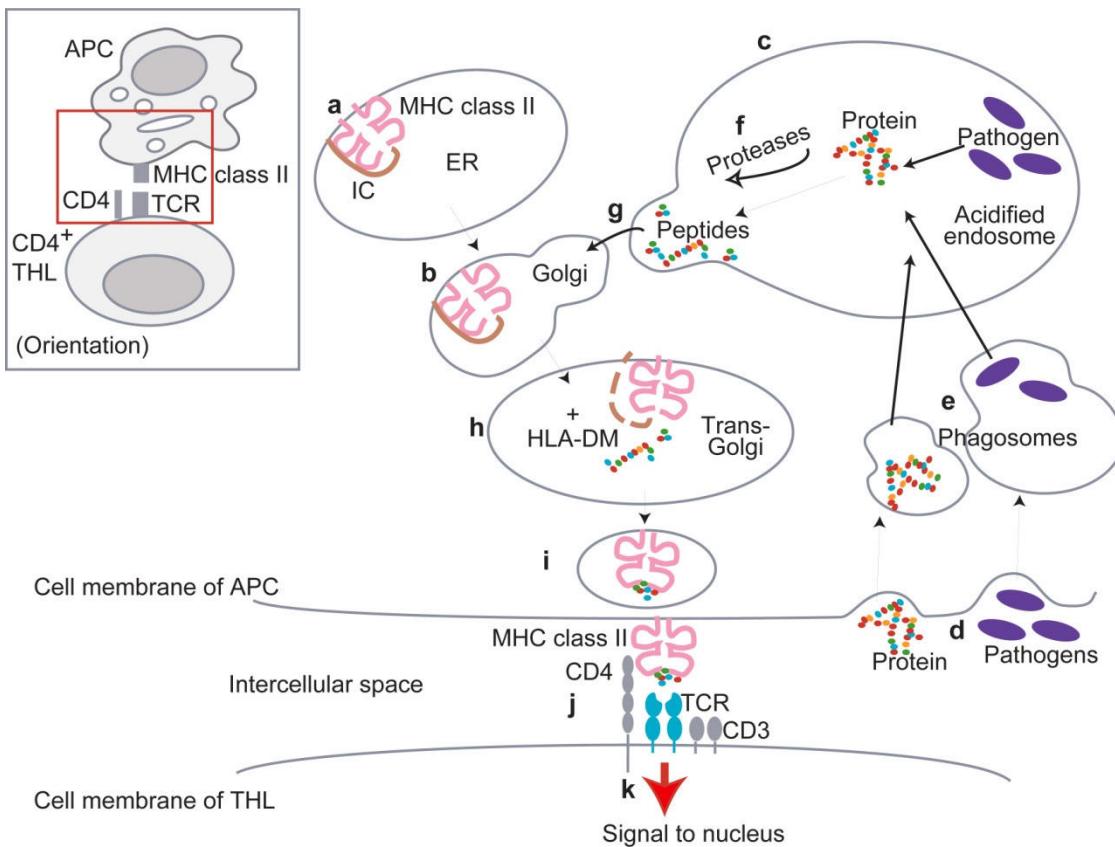


Abbildung 2: Prozessierung und Präsentation von Antigenen auf *major histocompatibility complex (MHC)*-Klasse-II-Molekülen.

(a) Unspezifische Bindung von Peptiden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) an MHC-II-Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen (APC) werden durch die invariant chain (IC) verhindert. (b) Die IC ermöglicht den Transport von MHC-II-Molekülen vom ER zu angesäuerten Proteasomen des Golgi-Apparats (c). Das Endosom enthält Peptide von intrazellulär lebenden, pathogenen Mikroorganismen oder von extrazellulär aufgenommenen und durch das Phagosom zum Endosom transportierten Mikroorganismen oder Proteinen (d, e). Diese werden durch Proteasen in Peptide gespalten (f). (g) Das Endosom verschmilzt mit dem Golgi zum trans-Golgi. Hier wird die IC abgespalten, dissoziert vom MHC-II-Molekül und ermöglicht die Bindung der Peptide im Endosom auf die MHC-II-Moleküle. Diesen Prozess unterstützt HLA-DM (MHC-II-ähnliches Molekül). (i) Der MHC-II-Peptidkomplex wird auf die Zelloberfläche transportiert, wo er durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) von T-Helferzellen (THL) erkannt wird (j). Durch diesen Prozess wird eine T-Zell-Aktivierung ausgelöst (k) (Man, 1998).

1.6. T-Zell-induzierte Reifungsprozesse in antigenpräsentierenden Zellen (APC)

Aktivierte Th-Zellen zeichnen sich durch die transiente Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen zur Interaktion mit APC aus. Eine zentrale Rolle für die Entwicklung der spezifischen Immunantwort spielt dabei CD40-Ligand (CD40L; Elgueta, 2009). Wie van Kooten & Banchereau 2000 zeigten, beginnt dessen Expression ein bis zwei Stunden nach Aktivierung und erreicht ihren Höhepunkt nach 6 bis 8 Stunden. Noch für weitere 2 bis 5 Tage ist der CD40L gut auf aktivierte Th-Zellen nachweisbar (Elgueta, 2009). Die anschließende allmähliche Abnahme von CD40 Ligand wird dabei durch mehrere Faktoren gesichert. So induziert die CD40/CD40L-Interaktion in der Th-Zelle den proteolytischen Abbau von CD40L sowohl durch receptorvermittelte Endozytose als auch

durch Freisetzung von löslichem CD40 (sCD40) welches CD40L bindet. Darüber hinaus wird auch die Synthese von CD40L-mRNA reduziert (Van Kooten, 2000).

Da verschiedene APC konstitutionell CD40 auf ihrer Oberfläche tragen, jedoch nur aktivierte Th-Zellen vorübergehend CD40L exprimieren, kann in diesem Fall gleichzeitig zur Antigenpräsentation und – Erkennung ein CD40-CD40L Kontakt stattfinden (den Haan & Bevan, 2000). Dieser induziert in der APC Reifungsprozesse, die mit einer Hochregulierung der TRAF (Tumornekrosefaktorrezeptor assoziierter Faktor) und einer nachfolgenden Aktivierung der MAP-Kinase und NF-κB Signalübertragungswegen einhergeht (Quezada, 2004). Hierdurch wird u.a. die Produktion von Entzündungsmediatoren und die Expression von Vertretern der TNFR-Familie, wie des OX40-Liganden (OX40L) und des 4.1BB-Liganden (4.1BBL, Croft, 2009) induziert.

Aufgrund des komplexen Informationsaustauschs bei Zusammentreffen von TZR mit seinem spezifischen Epitop im Kontext eines MHC-Moleküls und diverser Korezeptoren bezeichnet man diesen Komplex auch als immunologische Synapse (Bonilla, 2010).

1.7. Bedeutung von 4.1BBL und OX40L für die Immunantwort

Die Interaktion der kostimulatorischen Moleküle 4.1BB und OX40 mit ihren Liganden 4.1BBL und OX40L spielt bei der Aktivierung und Expansion verschiedener T-Zell Populationen eine zentrale Bedeutung. Zusammen mit CD40-CD40L führen sie zu Zytokinproduktion, Proliferation und Aktivierung von naiven und reifen CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen (Kober, 2009). Darüber hinaus steigt die Leistung der einzelnen TZR und sowohl Expansion als auch Signalwirkung der T-Zell-Klone werden verstärkt (Kaech, 2002).

Beide Liganden sind auf verschiedenen Subpopulationen aktivierter APC nachweisbar (Murata, 2000 und Wang, 2009). Salih *et al.* (2001) konnten zeigen, dass 4.1BBL nicht nur membranständig, sondern auch in einer löslichen Form existiert. Von OX40L existiert ebenfalls eine lösliche Form, deren Serumspiegel von Patienten mit der Basedowschen Krankheit erhöht ist (Wang, 2006).

4.1BBL ist bezüglich nachhaltiger T-Zell-Proliferation und Sekretion das wirkungsvollste Kostimulans aus der TNF-Gruppe (Kober *et al.*,). Nach Aktivierung der APC über den NF-κB Signalübertragungsweg steigt die 4.1BBL mRNA Synthese kontinuierlich an, erreicht nach 4 Stunden ihr Maximum bis sie nach 12 Stunden wieder zum Ausgangswert zurückgekehrt ist (Kang, 2007). Sowohl aktivierte CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen tragen den Rezeptor 4.1BB auf ihrer Oberfläche (Vinay, 1998), beide Lymphozytenpopulationen lassen sich durch 4.1BBL aktivieren (Cannons, 2001).

Taraban und Mitarbeiter fanden heraus, dass die Expression von 4.1BB auf aktivierte ZTL insbesondere bei geringer TZR Stimulation stattfindet (Taraban, 2002). Sie wiesen auch nach, dass die 4.1BB/4.1BBL Interaktion für die Stimulation von ZTL von großer Bedeutung ist (Taraban, 2002). Fehlt 4.1BBL so sinkt die Anzahl von ZTL. Während sich die Expansion von ZTL durch Gabe von Anti-4.1BB-Antikörper steigern ließ, waren Th-Zellen hiervon weitgehend unbeeinflusst (Tan, 1999 und Shuford, 1997).

Dies lässt vermuten, dass die Aktivität CD8⁺-ZTL stärker von der Signaltransduktion über 4.1BB-4.1BBL gelenkt wird (Bevan, 2007). CD4⁺-Th-Zellen sind dagegen in ihrer Aktivität

von CD40L und OX40 Stimulation abhängig. Wie Gerloni *et al.* 2000 jedoch zeigten, kann die *in vivo* Aktivierung von Th-Zellen über die Wechselwirkungen zu APC nicht *in vitro* durch stimulierende Anti-CD40- und Anti-OX40L-Antikörper ersetzt werden. Bedingung für die massive Aktivierung der APC scheint der CD40/CD40L Kontakt in Verbindung mit gleichzeitiger Antigenpräsentation und –erkennung durch die Th-Zelle sowie wahrscheinlich Aktivität von weiteren Signalwegen zu sein (den Haan 2000).

All diese Erkenntnisse führten zu der Modellvorstellung, dass Th-Zellen über die Signalwirkung von CD40L im Kontext von Antigenpräsentation und kostimulatorischen Molekülen in der Lage sind, die ZTL Antwort auszulösen und die Expansion spezifischer Th-Zellen zu fördern. Dabei erfolgt die Induktion spezifischer ZTL über 4.1BB-4.1BBL Signaltransduktion umso effizienter, je schwächer oder kürzer der Epitopkontakt am TZR bzw. je weniger ausgeprägt die umgebende Entzündungssituation ist (den Haan 2000 und Bevan, 2009).

Bei starken Immunreaktionen infolge einer akuten Infektion scheint die Aktivierung der APC durch Erkennung von PAMPs über TLR, konsekutive Zytokinsekretion und bei Antigenerkennung mittels TZR die Induktion der ZTL über B7-CD28 Interaktion zu überwiegen (Iwasaki & Medzhitov, 2004 und Bevan, 2007).

Dessen ungeachtet erfüllt das 4.1BB-4.1BBL Rezeptor-Ligand-Paar wichtige Aufgaben in der Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen und aktivierten ZTL, Antitumorimmunität, Selbsttoleranz sowie für die Ausbildung von CD8⁺-Gedächtniszellen (Wang, 2009). Angesichts dieses beachtlichen Einfluss von 4.1BB-4.1BBL auf die Immunmodulation untersuchen Forscher derzeit auch, inwiefern hier neue Möglichkeiten zur Therapie von chronischen viralen Infektionen, Malignomen und Autoimmunerkrankungen zu finden sind (Vonderheide, 2003 und Wang, 2009).

Somit sind CD4⁺ T-Zellen sowohl zur ZTL-Induktion in wenig entzündlichem Milieu sowie zur Generation eines immunologischen Gedächtnisses essentiell (Bevan, 2007).

1.8. Aktuelle Methoden der T-Zell-Diagnostik

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Technologien zum T-Zell Nachweis entwickelt, die sich grob in zwei Kategorien einteilen lassen.

Die erste Gruppe von Verfahren beruht auf der direkten Identifizierung und Quantifizierung Polypeptid-spezifischer T-Zellen unter Einsatz von Peptid-HLA Multimeren, wie beispielsweise Tetrameren (Beckman Coulter), Pentameren (Proimmune) und Streptameren (IBA) in Kombination mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen für definierte T-Zell-Subpopulationen charakteristische Oberflächenmarker. Dieses Verfahren ermöglicht eine sensitive Quantifizierung epitopspezifischer T-Zellen mit bekannter MHC-Restriktion. Eine Analyse der Funktionalität von T-Zellen ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Die bedeutendsten Einschränkungen bei der Verwendung von Peptid / MHC Multimeren für das Routinemonitoring Krankheits- oder Erreger-spezifischer T-Zellen ergeben sich daraus, dass die MHC Peptid Multimere sowohl Epitop als auch HLA-spezifisch sind. Somit erfordert ein umfassendes Monitoring Virus bzw. Krankheits-spezifischer T-Zellen den Einsatz eines breiten Spektrums unterschiedlicher Peptid / MHC Multimere, was mit einem hohen

Kostenaufwand verbunden ist. Zudem sind diese Peptid / MHC Multimere bislang nur für ein begrenztes Spektrum von MHC Proteinen, insbesondere für verschiedene häufig in der Bevölkerung vertretene MHC-Klasse-I Proteine verfügbar.

Ein weiteres Verfahren zur Messung spezifischer T-Zellen beruht auf dem Einsatz Peptidbeladener HLA-Moleküle, die mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) gekoppelt sind. Die epitopspezifische Erkennung und Bindung dieser Komplexe durch den T-Zell-Rezeptor führt zu einer Internalisierung der GFP-markierten Peptide, wodurch die entsprechende CTL sichtbar wird (Tomaru *et al.*, 2003).

Im Gegensatz dazu beruhen die „funktionellen“ Verfahren zum Monitoring spezifischer T-Zellen auf der *ex vivo* Stimulation von T-Zell- und APC-haltigen Blutleukozyten mit Stimulatorantigenen und dem anschließenden Nachweis von Reifungsprozessen in spezifisch reaktivierten T-Zellen mittels verschiedener Technologien.

Der Nachweis spezifischer CD4⁺ T-Zellen erfolgt hierbei üblicherweise durch die Stimulation von APC und T-Zell-haltigen Patientenproben (z.B. heparinisiertes Vollblut, isolierte periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC)) mit Proteinen, Polypeptiden oder Peptiden mit einer Länge von 15 bis 25 Aminosäuren und dem Nachweis der spezifischen T-Zellaktivierung durch die Bestimmung der Produktion charakteristischer Markerzytokine (z.B. mittels durchflusszytometrischer Verfahren (intrazelluläre Zytokinfärbung, Zytokin Sekretion Assay), der ELISPOT oder ELISA Technik oder anhand der Bestimmung der T-Zellproliferation z.B. mittels eines Bromdeoxyuridin (BrdU), [³H]-Thymidin oder CSFE Proliferation Assay).

Dagegen erfolgt der Nachweis spezifischer CD8⁺ T-Zellen (CTL) üblicherweise durch die Stimulation APC und T Zell-haltiger Patientenproben mit kurzen Peptiden von 8 bis 16 AS Länge oder rekombinannten Viren, welche die Zielstrukturen von T-Zellen exprimieren und die anschließende Bestimmung der produzierten Markerzytokine (üblicherweise IFN- γ) mittels durchflusszytometrischer Verfahren (z.B. intrazelluläre Zytokinfärbung) oder unter Einsatz der ELISpot bzw. ELISA Technologie.

Diese verfügbaren Technologien ermöglichen einen effizienten Nachweis und eine Quantifizierung Krankheits- und erregerspezifischer CD4⁺ oder CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen, eignen sich aber nicht oder nur sehr begrenzt zum Nachweis aktiver T-Helferzellen, die transient bei aktiven Krankheitsgeschehen auftreten.

1.9. Das Reverse Signalling von Th-Zellen: ein innovativer Ansatz zur Bestimmung erregerspezifischer aktiver T-Zellen

Da epitopspezifische aktivierte T-Zellen über CD40-CD40L Signaltransduktion eine Aktivierung der Promotoren von 4.1BBL und OX40L sowie die nachfolgende Synthese von 4.1BBL und OX40L in der APC auslösen (Lane, 1999), lässt sich umgekehrt durch Nachweis dieser T-Zell induzierten Komponenten in der APC auf den Reifegrad der beteiligten T-Zelle schließen. Dieses Verfahren wird Reverse T-Zelltechnologie genannt (Arbeitsgruppe Herr PD Dr. Ludwig Deml, unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob nach Inkubation von Blutzellen eines Probanden mit einem krankheits- oder erregerspezifischen Antigen durch Nachweis einer gesteigerten Expression

des 4.1BBL oder OX40L auf das Vorhandensein von aktivierte epitopspezifischen T-Zellen – und somit eine akute Infektion – geschlossen werden kann.

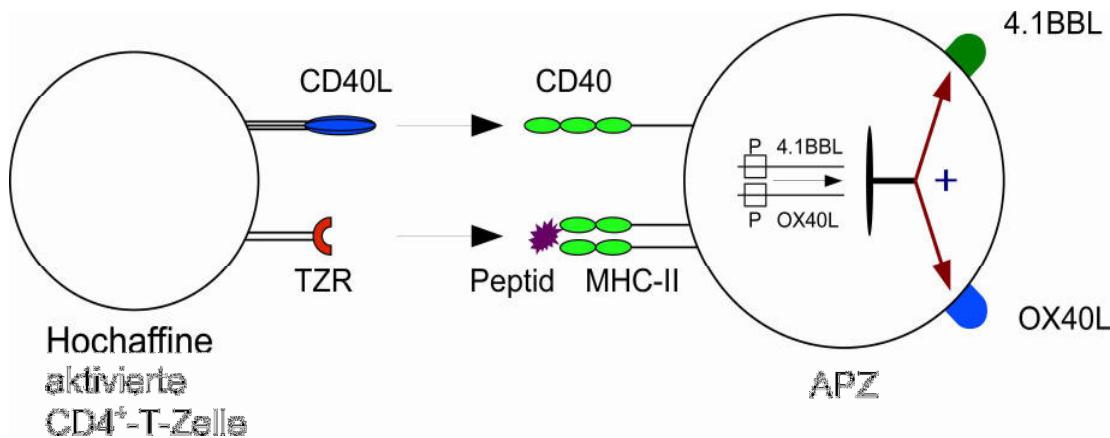


Abbildung 3: Das Prinzip der Reversen T-Zelltechnologie (RTT).

Der Kontakt einer hochaffinen aktivierte T-Helferzelle mit einer APC führt vermittelt durch die gleichzeitige Interaktion Peptid-beladener MHC-Klasse-II Moleküle mit dem TZR, und des APC ständigen CD40 Moleküls mit dem T-zellständigen CD40L zu Reifungsprozessen in der APC, die sich beispielsweise in der Aktivierung der Promotoren der Gene für 4.1BBL und OX40L und einer transienten Expression und Exposition der zugehörigen Genprodukte auf der Oberfläche der APC äußern. Die gesteigerte Produktion dieser T-Zell-induzierten Faktoren in APC dient hier als Biomarker für den Nachweis erregerspezifischer aktiver T-Helferzellen.

4.1BBL: 4.1BB Ligand; APC: Antigen-präsentierende Zelle; CD40L: CD40-Ligand; MHC-II: MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-II-Molekül; OX40L: OX40-Ligand; P: Promotor; TZR: T-Zell-Rezeptor

1.10. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen des zuvor genannten Forschungsvorhabens soll am Beispiel der Tuberkulose untersucht werden, ob die Transfektion von Expressionsvektoren, welche für mit ER- und endosomalen Translokationssignalen ausgestattete chimäre Proteine kodieren eine geeignete Strategie zur Epitopbeladung von MHC Klasse-II Molekülen auf APC und insbesondere B-Zellen darstellt. Dieses Verfahren soll zudem mit der Inkubation von löslichem Protein mit PBMC oder Vollblut verglichen werden. Die Tuberkuloseerkrankung wurde als Modellsystem ausgewählt, da klinisch der Bedarf nach einem sensitiven und spezifischen diagnostischen Werkzeug zur Differenzierung zwischen einem akut-infektiösen und einem latenten Geschehen groß ist.

In einem ersten Arbeitspaket soll untersucht werden, inwiefern die Transfektion von Expressionsvektoren in B-Zellen und PBMC unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits* der Lonza Cologne AG, Köln zur erfolgreichen Antigenpräsentation geeignet ist. Dazu sollen PBMC sowie aufgereinigte B-Zellen und Zelllinien unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits* mit dem Plasmid *pmaxGFP®* - einem Expressionsvektor des grün fluoreszierenden Protein (GFP) – transfiziert werden (beide Lonza Cologne AG, Köln). Als Nachweis einer erfolgreichen Transfektion soll zu

verschiedenen Zeitpunkten die Expression von GFP in humanen B-Zellen, T-Zellen und PBMC durchflusszytometrisch bestimmt werden. Ferner soll untersucht werden, inwiefern unter Verwendung dieses Systems die Vitalität der eingesetzten Zellpopulation leidet. In einem zweiten Arbeitspaket sollen Vektoren zur Expression der TB-spezifischen Proteine ESAT-6 sowie des Fusionsproteins ESAT-6/CFP-10 in APC generiert werden. Die Antigene ESAT-6 und CFP-10 aus dem *Mycobacterium-tuberculosis-Komplex* (Lalvani, 2001 und Jiang, 2009) wurden gewählt, da sie immundominante Proteine der TB-spezifischen zellvermittelten Immunantwort darstellen. Um die Präsentation dieser intrazellulär synthetisierten Proteine auf MHC-II Molekülen zu gewährleisten, sollen den Sequenzen jeweils zwei Lokalisierungskonstrukte des Lysosom-assoziierten Membranprotein 1 (LAMP1) hinzugefügt werden. Die Funktionalitätstestung soll mittels Transfektion der klonierten Expressionsvektoren in PBMC sowie Zellen der B-Zelllinie DG75 und die anschließende Bestimmung der Proteinexpression mittels Immunoblot Analysen erfolgen. Zudem soll ein Zellkulturmödell geschaffen werden, indem die Fähigkeit plasmidtransfizierter APC zur Stimulation spezifischer T-Helferzellen als Marker für die MHC Klasse-II Beladung der APC mit Peptiden der exprimierten Proteine aus dem *Mycobacterium-tuberculosis-Komplex* untersucht werden kann. Hierfür sollen zunächst ESAT-6/CFP-10 spezifische T-Helferzellen über mehrere Tage bis Wochen expandiert werden. In diesem Zellkultursystem sollen zudem Plasmid-transfizierte und mit löslichen rekombinanten Antigenen inkubierte APC bezüglich ihrer Fähigkeit zur Reaktivierung spezifischer T-Helferzellen vergleichend getestet werden. Die Bestimmung des Anteils aktivierter T-Helferzellen soll durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer IFN- γ Färbung erfolgen.

Die etablierten Verfahren zur Beladung von APC mit MTBC-Antigenen sollen schließlich in einem letzten Arbeitspaket bezüglich ihrer Eignung zum Nachweis und der Quantifizierung MTBC-spezifischer T-Zellen im Blut von Patienten mit einer aktiven bzw. latenten Tuberkulose getestet werden. Hierbei soll auch untersucht werden, ob die Zahl spezifischer, IFN- γ produzierender T-Helferzellen Rückschlüsse auf das Stadium der Tuberkuloseerkrankung zulässt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Geräte

Name	Hersteller
Agarosegelkammer Agargel	Biometra, Göttingen
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
<i>Centrifuge 5417R</i> (Tischzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg
COULTER® EPICS® XL-MCL™	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Eismaschine AF 100	Scotsman, Vernon Hills, IL, USA
FACSCanto II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<i>Fast-Blot semidry</i> -Apparatur	Biometra, Göttingen
<i>GeneAmpTM 9600</i>	PerkinElmer, Waltham, MS, USA
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Heiz- und Rührplatte	Heidolph Instruments, Schwabach
iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Mastercycler Gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Mili-Q plus <i>ultra pure water system</i>	Millipore, Billerica, MA, USA
Minigel-Apparatur	Biometra, Göttingen
<i>Multifuge 3 S-R</i>	Heraeus Instruments, Hanau
Neubauer-Zählkammer Superior	Marienfeldt, Ladau
<i>Nucleofector®</i>	Lonza Cologne AG, Köln
<i>Orbital Shaker</i>	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
<i>Pipetboy acu</i>	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Promax 2020	Heidolph Instruments, Schwabach
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Ultra-Gefrierschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Sonifier 450	Branson, Danbury, CT, USA
UV-Durchlichtschirm	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
UVICON 930 Spektrometer	Kontron Instruments
Wasserbad	Memmert, Schwabach

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
<i>CryoTube</i> TM -Gefäße	Nalge Nunc International, Hereford, UK
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
FACS Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Falcon TM Röhrchen 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<i>Blotting</i> Papier MN 218 B	Macherey-Nagel, Düren
Falcon Kulturflaschen 25, 75 cm ²	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
gestopfte Pipettenspitzen	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
LS-Säule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
<i>Microplate Reader</i> 550	Bio-Rad, Hercules, USA
MULTIWELL TM 6-/12-Napf-Platte	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Nitrozellulosemembran	Serva, Heidelberg
PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen 200 µl, gelb	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl, blau	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Plastikpipetten Cellstar 5, 10, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
<i>QIAquick</i> -Säulchen	Qiagen, Hilden
sterile Transfer-Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatte, 96 Rundbodennäpfe	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid 4K	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt
APS	Sigma-Aldrich Chemie, München
Bacto-Trypton	Difco Laboratories GmbH, Augsburg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Chemie, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, München
BSA	AppliChem GmbH, Darmstadt
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
DNA-Molekulargewichts-Standard	Boehringer, Hildesheim
dNTPs	PerkinElmer, Waltham, MS, USA
Dulbecco´s ISCOVE Medium	Sigma-Aldrich Chemie, München

EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	VWR International, Darmstadt
FACS <i>lysing solution</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FKS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glyzin	Merck, Darmstadt
GM-CSF	CellGenix Technologie Transfer, Freiburg
Hefeextrakt	Difco Laboratories GmbH, Augsburg
Heparin	Ratiopharm, Ulm
IL-1 β	CellGenix Technologie Transfer, Freiburg
IL-2	CellGenix Technologie Transfer, Freiburg
IL-4	CellGenix Technologie Transfer, Freiburg
IL-6	CellGenix Technologie Transfer, Freiburg
Insulin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried/Allgäu
Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natrium-Desoxycholat	Merck, Darmstadt
NBT/BCIP Stock Solution	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PanColl	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
PFA	Sigma-Aldrich Chemie, München
10 x PCR Puffer I	PerkinElmer, Waltham, MS, USA
Pen/Strep	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
PGE ₂	Axxora Deutschland GmbH, Lörrach
PMA	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ponceau-Sulfosalicylsäure	Merck, Darmstadt
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie, München
RPMI 1640	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie, München
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Sulfosalicylsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
TEMED	Merck, Darmstadt
TNF	CellGenix Technologie Transfer, Freiburg
Transferrin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris/ HCl	Merck, Darmstadt

Tween 20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

2.1.3. Nährmedien und Puffer

Verwendete Nährmedien sind in Tabelle 2.4 aufgeführt, verwendete Puffer in Tabelle 2.5.

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Nährmedien

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	5 g NaCl 10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt ad 1 L mit H ₂ O bid., pH 7,3 einstellen
LB _{amp} -Medium	5 g NaCl 10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt ad 1 L mit H ₂ O bid., pH 7,3 einstellen 50-200 µg/ml Ampicillin
DG75-Medium	RPMI Medium 1640 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) Pen/Strep
B-Zellmedium (BZM)	Dulbecco´s ISCOVE Medium 10 % (v/v) inaktiviertes Humanserum 6 ng/ml IL-4 5 µg/ml Insulin 50 µg/ml Transferrin
iDC-Medium	RPMI Medium 1640 10 % (v/v) inaktiviertes Humanserum 500 U/ml GM-CSF 500 U/ml IL-4
mDC-Medium	RPMI Medium 1640 10 % (v/v) inaktiviertes Humanserum 500 U/ml GM-CSF 10 ng/ml IL-1β 500 U/ml IL-4 1000 U/ml IL-6 1 µg/ml PGE ₂ 10 ng/ml TNF
Expansionsmedium	RPMI Medium 1640 5 % (v/v) inaktiviertes Humanserum 1 % Pen/Strep 50 U/ml IL-2

Tabelle 2.5: Übersicht über die verwendeten Puffer

Name	Zusammensetzung
PBS _o	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
AP-Puffer	0,05 M MgCl ₂ 0,1 M NaCl 0,1 M Tris/HCl
<i>Boiling-Mix</i>	40 % (w/v) Saccharose 1 % (w/v) SDS 100 mM Tris/HCl pH 7,0 1:1000 (v/v) gesättigte wässrige Bromphenolblaulösung 10 % (v/v) Mercaptoethanol
DNA-Auftragspuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 40 % (w/v) Saccharose
MACS-Puffer	PBS _o 2 mM EDTA 0,5 % (w/v) BSA
SDS-Puffer	14,41 g Glyzin 1 g SDS 3,03 g Tris-Base ad 1 L mit H ₂ O bid.
T4-Ligase-Puffer	20 mM Tris / HCl pH 7,6 5 mM DTT 5 µg/ml BSA 0,1 mM ATP
TBE	27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA 54 g Tris-Base ad 1 L mit H ₂ O bid.
TBS	8,766 g NaCl 1,211 g Tris-Base ad 1 L mit H ₂ O bid.
TTBS	8,766 g NaCl 1,211 g Tris-Base 0,1 % (v/v) Tween20 ad 1 L mit H ₂ O bid.
Sammelgelpuffer	0,625 M Tris/HCl pH 6,8

Trenngelpuffer	1,88 M Tris/HCl pH 8,8
Westernblotpuffer	113,2 g Glyzin 36 g Tris-Base ad 1 L mit H ₂ O bid.
Tankblotpuffer	72 g Glycin 15 g Tris-Base 1 L Methanol ad 5 L mit H ₂ O bid.

2.1.4. Bakterien und Zellen

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*) K12-Bakterienstamm DH5α (Hanahan, 1983) verwendet. Dieser Stamm lag bereits transformationskompetent in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Deml vor.

Die DG75-Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Helmut Niller, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Sie wurde 1975 aus dem Pleuraerguss eines zehnjährigen Jungen gewonnen, der an einem Burkitt Lymphom litt (Ben Bassat, Goldblum *et al.* 1977).

Die für die Untersuchungen benötigten Blutzellen wurden einem Kollektiv von Patienten mit aktiver und persistierender Tuberkulose sowie von gesunden Kontrollpersonen entnommen. Im Rahmen dieser Blutentnahme wurden die freiwilligen Spender vorschriftsmäßig aufgeklärt. Für die Blutentnahmen liegt ein genehmigter Ethikantrag vor, die zugehörige Patienteninformation und Einverständniserklärung sind der Arbeit als Anhang A und Anhang B beigefügt. Eine Auflistung der Probanden und deren TB-Status zeigt Tabelle 2.6. Die Kultivierung der aus heparinisiertem Vollblut isolierten PBMC (*engl. peripheral blood mononuclear cells*, periphere mononukleäre Blutzellen) erfolgte im jeweils angegebenen Medium.

Tabelle 2.6: Liste der Blutspender

Nummer	TB-Status	Geschlecht	Alter
30	negativ, keine BCG Impfung	weiblich	38
22	negativ, BCG geimpft	weiblich	23
31	latent, zuletzt akut 1987	weiblich	56
13	negativ, BCG geimpft	weiblich	24
32	negativ, keine BCG Impfung	weiblich	24
33	negativ, BCG geimpft	weiblich	27
34	negativ, BCG geimpft	weiblich	27
16	negativ, BCG geimpft	weiblich	23
11	negativ, BCG geimpft	weiblich	28
35	Negativ	weiblich	24
36	negativ, keine BCG Impfung	weiblich	24
37	negativ, keine BCG Impfung	weiblich	23

38	latent	weiblich	unbekannt
39	negativ, keine BCG Impfung	weiblich	27
40	akut, Kultur pos.	weiblich	unbekannt
26	negativ	weiblich	26
24	latent, zuletzt akut 2001	weiblich	53
41	latent, zuletzt akut 2004	weiblich	46
25	latent	weiblich	55
98	negativ, keine BCG Impfung	männlich	34
42	akut, Kultur pos.	männlich	54
43	akut, Kultur pos.	männlich	46
44	akut, Kultur pos., QFT negativ	männlich	74

2.1.5. Nukleinsäuren

2.1.5.1. Plasmide

Als Ausgangsvektor zur Herstellung der Expressionskonstrukte diente eine Variante des kommerziell erhältlichen Vektors *pcDNA3.1(+)* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), welche eine Deletion des Gens für die Neomycin-Resistenz aufweist. Dieser Vektor enthält zudem unter der Kontrolle des CMV *immediate early* Promotors ein synthetisches Fusionsgen, welches für die N-terminal lokalisierte Adressierungssequenz für das endoplasmatische Retikulum und die C-terminal gelegene lysosomale Adressierungssequenz des humanen LAMP-1 Proteins kodiert. Eine zwischen den Gensequenzen für die beiden Adressierungssignale gelegene *Bam* HI-Schnittstelle ermöglicht das Einfügen von Genen für beliebige Fremdproteine. Mit Hilfe dieser Adressierungssequenzen ist es möglich, intrazellulär exprimierte Proteine in den MHC-Klasse-II Prozessierungsweg einzuschleusen (Wu, 1995). Der beschriebene Vektor *pcDNA3.1(+)\NeoLAMP* (siehe Abbildung 4) lag bereits im Labor von Herrn PD Dr. Deml vor.

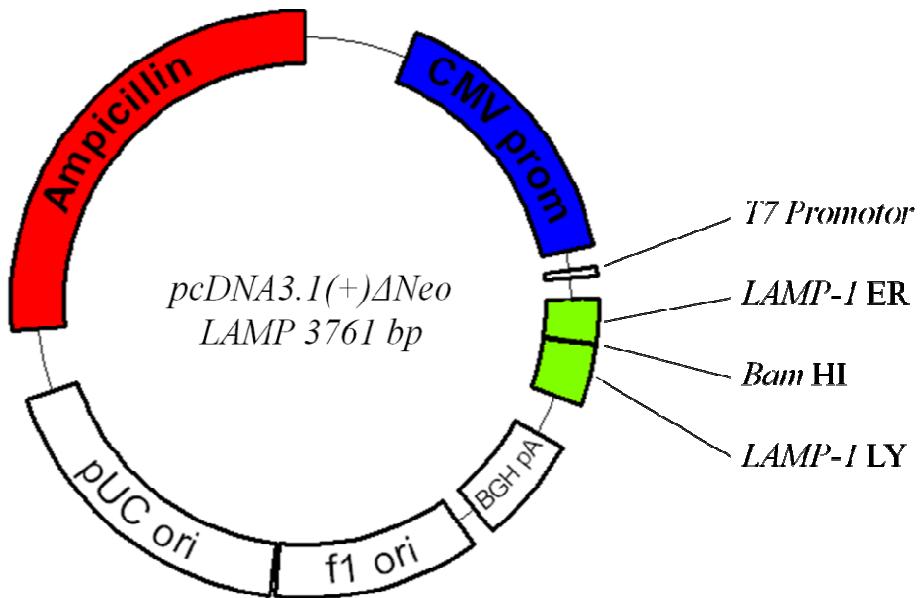


Abbildung 4: Der Vektor pcDNA3.1 (+)ΔNeoLAMP.

Ampicillin: Gen für die β-Laktamase (vermittelt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin); **CMV prom:** *immediate early* Promotor des Cytomegalievirus; **T7 Promotor:** Promotor des Phagen T7, **LAMP-1:** Gen des *Lysosome-associated membrane protein 1*, **ER:** Signalsequenz des *LAMP-1* für das Endoplasmatische Retikulum; **LY:** Signalsequenz des *LAMP-1* für das Lysosom, **BGH pA:** Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone*; **f1 ori:** *origin of replication* des Phagen f1; **pUC ori:** *origin of replication* des pUC Plasmids; **ΔNeo:** bezeichnet die **Deletion** des Resistenzgens gegen das Antibiotikum **Neomycin**.

Der Vektor *pET-22b*(+)_*esxA**esxB*, welcher die Gensequenzen der Proteine ESAT-6 und CFP-10 aus *Mycobacterium tuberculosis* als Fusionsprotein trägt, wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. Petra Lindner (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 5).

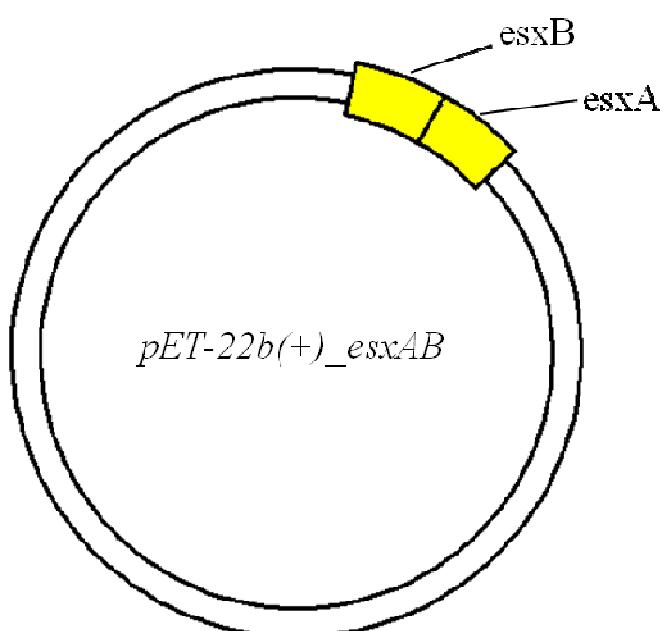


Abbildung 5: Der Vektor *pET-22b(+)_esxAB*.
esxB: Gen von CFP-10, esxA: Gen von ESAT-6.

2.1.5.2. Oligonukleotide

Zur Amplifikation der Gensequenzen von ESAT-6 bzw. ESAT-6/CFP-10 für Klonierungsarbeiten sowie zur Überprüfung der Korrektheit neu klonierter Expressionsvektoren wurden in PCR Reaktionen folgende Primer eingesetzt:

CFP-10 for (5' GGAGGGGATCCATGGCAGAGATGAAGACCG 3')

CFP-10 seq (5' CTCCACCTGGTCGATCTGGG 3')

ESAT-6 for (5' GGAGGGGATCCATGACAGAGCAGCAGTGG 3')

ESAT-6 rev (5' GGAGGGGATCCTGCGAACATCCCAGTGACG 3')

ESAT-6 seq (5' CTTCCCCTCGTCAAGGAGGG 3')

2.1.6. Enzyme

Für Klonierungsarbeiten wurden die Restriktionsenzyme *Bam* HI (Boehringer, Hildesheim) und *Bgl* II (NEB, Frankfurt am Main) verwendet. Ferner kam die Taq-Polymerase 5U (PerkinElmer, Waltham, MS, USA) und die T4-DNA-Ligase (NEB, Schwalbach/Taunus) zum Einsatz.

2.1.7. Rekombinante Proteine

Die rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteine ESAT-6 und das Fusionsprotein ESAT-6/CFP-10 aus *Mycobacterium tuberculosis* wurden dankenswerterweise von Frau Dr. Petra Lindner (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.8. Verwendete kommerziell erhältliche Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Kits sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tabelle 2.7: Verwendete kommerziell erhältliche Kits

Name	Hersteller
<i>B Cell Isolation Kit II</i> [®]	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>CD4⁺ T Cell Isolation Kit II</i> [®]	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>CD14 MicroBeads human Kit</i> [®]	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>Human B Cell Nucleofector[®] Kit</i>	Lonza Cologne AG, Köln
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> [®]	Qiagen, Hilden

2.1.9. Antikörper

Alle im Rahmen der Arbeit benützten Antikörper sind zusammen mit ihrem Verwendungszweck in Tabelle 2.8 aufgelistet.

Tabelle 2.8: Verwendete Antikörper

Name	Hersteller	Verwendungszweck
anti CD3 APC Cy7 Ab	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflusszytometrie
anti CD3 ECD Ab	Beckman Coulter, Krefeld	Durchflusszytometrie
anti CD3 FITC Ab	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflusszytometrie
anti CD4 APC Ab	Beckman Coulter, Krefeld	Durchflusszytometrie
anti CD4 Pc5 Ab	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflusszytometrie
anti CD8 PerCP Ab	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflusszytometrie
anti CD8 ECD Ab	Beckman Coulter, Krefeld	Durchflusszytometrie
anti CD19 Pc5 Ab	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflusszytometrie
anti CD28 Ab	Becton Dickinson, Heidelberg	T-Zell-Expansion
anti CD49d Ab	Becton Dickinson, Heidelberg	T-Zell-Expansion
anti ESAT-6 ab, <i>Mouse monoclonal (ab26246)</i>	Abcam plc., Cambridge, England	Western Blot
anti IFN- γ FITC Ab	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflusszytometrie
anti IFN- γ PE Ab	Beckman Coulter, Krefeld	Durchflusszytometrie
anti Mouse AP Ab, <i>Goat polyclonal</i>	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark	Western Blot

2.1.10. Computerprogramme

Die Texte dieser Arbeit wurden mit Microsoft Word 2007 (Microsoft Corp., Redmond, USA) erstellt, Tabellen und Diagramme mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corp., Redmond, USA) und Sigma Plot, Version 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Die Plasmidgrafiken wurden mit pDRAW 32 (AcaClone) erzeugt.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messdaten erfolgte unter Einsatz der Programme Expo 32 ADC (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) und FACSDiva™ 6.0 (BD Biosciences, San Jose). Bilder wurden mit *Adobe Photoshop CS2*, Version 9.0.2 (Adobe Systems GmbH, München) und *Corel Photo-Paint 8* (Corel Corp., Ottawa, Kanada) erstellt und bearbeitet. Für Literatur- und Sequenzsuche wurde die PubMed Publikations- und Sequenzdatenbank verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1. Kultivierung und Lagerung von Bakterien

2.2.1.1.1. Flüssigkulturen

Steriles LB_{amp}-Medium wurde mit einer Einzelkolonie von Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C im einem Inkubationsschüttler (Orbital Shaker, Forma Scientific, Marietta, OH, USA) bei 180 rpm inkubiert. Die Bestimmung der Bakterienkonzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (UVICON 930 Spektrometer, Kontron Instruments) gegen das Kulturmedium ($1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8 \text{ Bakterien/ml}$).

2.2.1.1.2. Plattenkulturen

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer einzelnen Bakterienkolonie, aus einer Flüssigkultur oder einer Glycerinkultur Bakterien aufgenommen und auf einer LB- oder, im Falle von transformierten Bakterien mit Ampicillinresistenz, auf LB_{amp}-Agarplatten (LB oder LB_{amp} Medium mit 1,5 % (w/v) Agar so ausgestrichen, dass nach Inkubation über Nacht im 37 °C Brutschrank (Heraeus Instruments) Einzelkolonien isoliert werden konnten.

2.2.1.1.3. Glycerinkulturen

Die Bakterien einer Einzelkolonie wurden in 5 ml Flüssigkultur aufgenommen, nach Erreichen der stationären Phase für 5 Minuten bei 4.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert, in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und in CryoTubeTM-Gefäßen (Nalge Nunc International, Hereford, UK) mit 0,5 ml sterilem Glycerin (37 %) gemischt. Die so erhaltenen Kulturen sind bei -80 °C in einem Ultra-Gefrierschrank (Heraeus Sepatec, Osterode) nahezu unbegrenzt haltbar.

2.2.1.2. Transformation von DNA in Bakterienzellen

Transformationskompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und pro Ansatz 100 µl der Suspension mit 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis, in der die DNA an die Zellen adsorbieren konnte, wurden die Proben für 45 Sekunden auf 42 °C (Thermomixer 5436, Eppendorf) erwärmt und anschließend für 5 bis 10 Minuten auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz wurde nach Zugabe von 900 µl LB-Medium für 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Expression der auf dem Expressionsplasmid kodierten β-Lactamase, welche eine

Resistenz gegen Ampicillin vermittelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB_{amp}-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank angezogen, um transformationspositive Einzelkolonien zu erhalten.

2.2.2. Arbeiten mit DNA

2.2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA mit alkalischer Schnelllyse

Kleine Mengen Plasmid-DNA für Klonierungsarbeiten und zur Charakterisierung positiver Klone wurden aus 5 ml Übernachtkulturen durch alkalische Schnelllyse (*rapid lysis*) gewonnen (Birnboim & Doly, 1979). Hierzu wurden jeweils 1,5 ml der Bakterienkultur in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 Minuten bei 3.000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das resultierende Bakteriensediment wurde in 250 µl Puffer S1 (50 mM Tris/ HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A/ml, pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer S2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes durch wiederholtes Schwenken gemischt. Anschließend wurde 250 µl eiskalter Puffer S3 (2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1) zur Fällung von Proteinen, SDS und chromosomaler DNA zum Ansatz pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen und einer zwanzigminütigen Inkubation auf Eis wurden die gefällten Komponenten durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 30 Minuten bei 4 °C in der Tischzentrifuge pelletiert. Der resultierende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 630 µl Isopropanol durch Schwenken gemischt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 14.000 rpm für 30 Minuten bei 4 °C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, um die durch das Isopropanol gefällte Plasmid-DNA zu pelletieren. Das erhaltene DNA-Pellet wurde im Weiteren mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl H₂O bid. aufgenommen. Die resultierende Plasmid-Lösung wies in der Regel eine DNA-Konzentration von ca. 200 ng/µl auf. Üblicherweise wurden 10 µl dieser Plasmid-Lösung im Restriktionsansatz verwendet.

2.2.2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Konzentration und Reinheit isolierter Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines Zweistrahl-Spektrometers (UVICON 930 Spektrometer, Kontron Instruments) in einem UV-Absorptionsspektrum zwischen 230 nm und 300 nm ermittelt. Aus dem Wert der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 258 nm (OD₂₅₈) konnte anschließend die Konzentration doppelsträngiger DNA (dsDNA), also Plasmid DNA, berechnet werden (1 OD₂₅₈ = 47,5 µg dsDNA/ml).

2.2.2.3. PCR Analyse

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur exponentiellen Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleinsäuresequenzen *in vitro*. Diese Methode eröffnet die Möglichkeit, gezielt ein DNS-Vorlagefragment zu vervielfältigen und über die verwendeten

Oligonukleotide geeignete Restriktionsschnittstellen für die Klonierung einzufügen (Saiki, 1988).

Die PCR wurde präparativ zur Gewinnung ligierbarer DNS-Fragmente und analytisch zur Charakterisierung rekombinanter Bakterienklone eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.2.8.).

Die Durchführung der PCR-Reaktionen erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler (iCycler, BioRad). Die hierbei verwendeten Oligonukleotide sind unter Kapitel 2.1.5.2. aufgeführt. Um Kontaminationen in den Versuchsansätzen zu vermeiden, wurden die Reaktionen ausschließlich mit gestopften Pipettenspitzen (BIOZYM, Hess. Oldendorf) angesetzt. Ein Standardansatz in einem Volumen von 50 µl enthielt folgende Komponenten:

5 µl	10 x PCR Puffer I (PerkinElmer, Waltham, MS, USA)
8 µl	2 mM dNTPs (PerkinElmer, Waltham, MS, USA)
50 pmol	5' Oligonukleotid
50 pmol	3' Oligonukleotid
10-50 ng	DNS-Vorlagefragment
1 µl	Taq-Polymerase 5 U (PerkinElmer, Waltham, MS, USA)
Ad 50 µl H ₂ O _{bid} .	

Zur Inkubation der Reaktionsansätze wurde folgendes Standardprogramm verwendet:

Einleitender Denaturierungsschritt:	94 °C, 5 Minuten
3-Stufen-PCR (25-30 Zyklen):	94 °C, 45 Sekunden (Denaturierung)
	55 °C, 45 Sekunden (Oligonukleotidanlagerung)
	72 °C, 30 Sekunden (Elongation)
Abschließender Polymerisationsschritt:	72 °C, 10 Minuten
Dauerkühlung:	4 °C

Zur Bestimmung der Ausbeute und Größe der produzierten PCR-Produkte wurden jeweils 5 µl der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Gelelektrophorese zusammen mit einer definierten Menge eines Molekulargewichtsstandards analysiert (siehe Kapitel 2.2.2.4.).

Die PCR-Produkte wurden entweder ungereinigt weiterverwendet (PCR-Screening) oder zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und anschließend gefällt. Letzteres betraf Amplifikate, die vor einem Einsatz in Ligationsreaktionen durch Restriktionsendonukleasen gespalten wurden sowie PCR Produkte, die in Sequenzierungsreaktionen verwendet wurden.

2.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente hinsichtlich ihres Molekulargewichtes erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. 2 % Agarose (CambreX Bio Science, Rockland,

USA) wurde in TBE-Puffer (54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA ad 1 L H₂O bid.) unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 50 ng/ml versetzt. Die DNA-Fragmente wurden im Volumenverhältnis 1:10 mit DNA-Auftragspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 40 % (w/v) Saccharose) versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgröße zusammen mit entsprechendem DNA-Molekulargewichts-Standard (Boehringer, Hildesheim) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei konstanter Stromstärke (24 mA bis 200 mA) und Spannung (50 V bis 120 V, siehe Kapitel 2.2.4.1.3.). Die Detektion der DNA erfolgte anschließend mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirmes (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm, dem Absorptionsmaximum des DNA-interkalierenden Ethidiumbromids.

2.2.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die über die Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.2.4.) aufgetrennten DNA-Fragmente wurden für die anschließende Ligation aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) eluiert. Alle im Versuch verwendeten Puffer wurden von der Firma Qiagen mitgeliefert. Die zu eluierende, ausgeschnittene Bande wurde in 300 µl Puffer QG unter zehnminütigem Schütteln bei 50°C gelöst und anschließend mit 100 µl 100 %igem Isopropanol versetzt. Die resultierende Suspension wurde in *QIAquick*-Säulchen gefüllt. Beim anschließenden Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge (1 Minute, 13.000 rpm, RT) wurde die Lösung durch die Säule gepresst, wobei die DNA an die glasmilchhaltige Säulenmatrix adsorbierte. Nach zweimaligem Waschen mit 750 µl Puffer PE wurde die DNA mit 50 µl H₂O_{bid.} von der Säulenmatrix eluiert.

2.2.2.6. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die aus *E. coli* isolierte Plasmid-DNA wurde zur Charakterisierung und für präparative Zwecke mit Restriktionsendonukleasen enzymatisch geschnitten. Eine Einheit (U) bezeichnet dabei die Enzymaktivität, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei optimalen Temperatur-, Puffer- und pH-Bedingungen vollständig zu schneiden.

In einem Standardansatz für einen präparativen Verdau wurden 5 µg bis 30 µg Plasmid-DNA mit je 60 U Restriktionsenzym *Bam* HI (Boehringer, Hildesheim) bzw. *Bgl* II (NEB, Frankfurt am Main) und 5 µl Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei einer vom Hersteller angegebener Temperatur für mindestens 90 Minuten inkubiert.

2.2.2.7. Ligation von DNA Fragmenten

Die isolierten Vektor- und Fragment-DNAs wurden je nach Fragmentgrößen in einem molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:30 in die Ligationsreaktion eingesetzt. Der 20 µl Standard-Ligationsansatz enthielt neben der Fragment-DNA 100 ng Vektor-DNA, 1 µl (1 U) T4-DNA-Ligase (NEB, Schwalbach / Taunus) und 2 µl des zehnfach konzentrierten T4-Ligase-

Puffers (20 mM Tris / HCl pH 7,6, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 5 µg/ml BSA (bovines Serumalbumin), 0,1 mM ATP). Die Reaktion erfolgte über Nacht bei einem Temperaturgradienten von 0 °C bis RT und konnte anschließend direkt zur Transformation von *E. coli* (siehe Kapitel 2.2.1.2.) verwendet werden.

2.2.2.8. PCR Verfahren zur Charakterisierung rekombinanter Bakterienklone

Zur Verifizierung einer korrekten Klonierung wurde ein PCR-basiertes Verfahren verwendet. Mittels eines Außerhalb des klonierten DNA-Fragments bindenden Primers (*forward*-Orientierung) und eines im klonierten DNA-Fragment bindenden Primers (*reverse*-Orientierung) konnte bei Klonierung über eine Schnittstelle die Orientierung des Inserts sowie die gelungene Klonierung überprüft werden.

Dazu wurde ein Teil einer Bakterienkolonie mit einer sterilen Impföse in einen 25 µl PCR-Ansatz gegeben (siehe Kapitel 2.2.2.3.) der die benötigte Primer-Kombination enthielt. Die PCR wurde unter Standard-Bedingungen durchgeführt. Lieferte die analytische PCR ein DNA-Produkt der richtigen Größe, wurde der Rest der zugehörigen Bakterienkolonie in Flüssigkultur aufgenommen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass schnell und unkompliziert viele Bakterienklone gleichzeitig untersucht werden können.

Zur genaueren Charakterisierung, insbesondere zur Überprüfung der eingefügten Inserts, wurden alle neuen Plasmidkonstrukte in den entsprechenden Bereichen sequenziert. Dies erfolgte durch die Firma Metabion®, Regensburg. Die anschließende großmaßstäbliche Produktion von endotoxinfreier Plasmid-DNA erfolgte durch GeneArt®, Regensburg.

2.2.3. Arbeiten mit Zellen

2.2.3.1. Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl aufgereinigter Zellen wurde regelmäßig mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus einem dünnen Deckgläschen und einem Objektträger, in dessen Mitte ein Liniennetz geschliffen ist. Das Deckgläschen wurde so auf den Objektträger gelegt, dass ein Hohlraum eines definierten Volumens entstand. 10 µl der Zellsuspension wurde in diesen Hohlraum gefüllt, im Durchlichtmikroskop waren sowohl Liniennetz als auch PBMC sichtbar. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter der Suspension wurden die Zellen in mehreren der kleinen mittigen Quadrate ausgezählt, daraus der Mittelwert pro Quadrat gebildet, und dieser mit 250000 multipliziert.

2.2.3.2. Arbeiten mit DG75-Zellen

2.2.3.2.1. Auftauen von DG75-Zellen

Ein bei -80 °C tiefgefrorenes Aliquot wurde in einem Wasserbad (Memmert, Schwabach) bei 37 °C schnellst möglichst aufgetaut und sofort mit 37 °C warmem DG75-Medium

versetzt. Die Zellen wurden anschließend bei 300 g für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in auf 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. In einem Gesamtvolumen von 10 ml wurden die Zellen in eine 25 cm² BD Falcon™ Zellkulturflasche ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ aufrecht stehend inkubiert.

2.2.3.2.2. Kultivierung von DG75-Zellen

Das Wachstum der Zellen erfolgte in 25 cm² bzw. 75 cm² BD Falcon™ Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden regelmäßig im Mikroskop kontrolliert und bei Bedarf in einem Verhältnis von 1 : 3 in frisches Kulturmedium gesplittet.

2.2.3.3. Arbeiten mit humanen PBMC

2.2.3.3.1. Isolierung von PBMC aus Vollblut

Die verwendeten PBMC (periphere mononukleäre Zellen des Blutes) wurden aus heparinisiertem humanem Vollblut (siehe Kapitel 2.1.4.) mittels Pancoll Dichtezentrifugation gewonnen.

Zur Isolierung wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen als Trennlösung 15 ml Pancoll (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach) vorgelegt und mit Vollblut (für ein Gesamtvolumen von 35 ml pro Falcon 1:1 bis 2:1 mit PBS₀ verdünnt) überschichtet. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 880 g und Raumtemperatur mit einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Dabei erfolgte die Auf trennung gemäß des Dichtegradienten der Blutbestandteile, sodass Erythrozyten sowie mehrkernige Zellen die unterste Bande bildeten, darüber erst Pancoll, dann PBMC, zuoberst die Plasmabande. Die PBMC wurden mit einer sterilen Transfer-Pipette (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht) vorsichtig abgenommen und zweimal mit 50 ml sterilem PBS₀-Puffer gewaschen. Die Sedimentation der Zellen erfolgte jeweils durch Zentrifugation bei 300 g für 10 Minuten und Raumtemperatur. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml des entsprechenden Mediums oder Puffers aufgenommen, die Zellzahl ermittelt und die Zellen entsprechend in den Versuchen eingesetzt.

2.2.3.3.2. Kultivierung von PBMC

Humane PBMC wurden in einer Konzentration von 1 x 10⁶/ml in dem angegebenen Medium auf MULTIWELL™-6-well-Platten (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) ausgesät. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.3.4. Isolierung von Zellpopulationen aus PBMC mit der MACS® Technologie

Das MACS®-System (Miltenyi Biotec GmbH) erlaubt eine einfache und schnelle Trennung von Zellpopulationen. Hierfür werden die Zellen, in diesem Fall die PBMC, mit so

genannten *MicroBeads*, 50 nm großen Magnetpartikeln, inkubiert. MicroBeads bestehen aus Eisenoxid mit einer Umhüllung aus Polysacchariden, an die Antikörper gebunden sind. Diese erkennen und binden spezifische Oberflächenstrukturen der Zielzellen. Beim Durchfluss durch eine Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, werden die *MicroBeads* sowie die daran spezifisch gebundenen Zellen in der Säule zurückgehalten. Beim Spülen der Säule werden die ungebundenen Zellen von den markierten Zellen getrennt und können für weitere Versuche verwendet werden. Nach Entfernen des Magnetfeldes können auch die markierten Zellen von der Säule eluiert werden. Stellen die markierten Zellen die gewünschte Zielpopulation dar, spricht man von positiver Selektion, falls die unmarkierten Zellen für weitere Versuche verwendet werden, von Abreicherung. Vorteil der Abreicherung ist, dass hierbei Artefakte vermieden werden können, die aufgrund von Antikörperbindung an Oberflächenstrukturen entstehen. Die Isolationen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.4.1. Isolierung von CD19⁺ B-Zellen

Die Isolation von naiven B-Zellen erfolgte mit dem *B Cell Isolation Kit II*® (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) mittels Abreicherung aus PBMC. Hierfür wurden in einem 15 ml Falcon™ Röhrchen die eingesetzten PBMC pro 1×10^7 Zellen mit 40 µl MACS-Puffer (PBS_o, 2 mM EDTA, 0,5 % (w/v) BSA) resuspendiert und mit 10 µl biotinyliertem Antikörpercocktail versetzt. Diese Antikörper erkannten spezifisch CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 und CD235a (Glykophorin A). Nach Inkubation für 10 Minuten bei 4 °C wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl anti-Biotin *MicroBeads* zugegeben und weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen.

Eine LS-Säule wurde in einem *MidiMACS™-Separator* (welcher das Magnetfeld erzeugt platziert und mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Pro Säule wurden bis zu 1×10^8 Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Anschließend wurde dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde in einem 15 ml Falcon™ Röhrchen aufgefangen und enthielt die unmarkierten CD19⁺ B-Zellen.

2.2.3.4.2. Isolierung von CD4⁺ T-Zellen

Die Isolation von CD4⁺ Th-Zellen unter Verwendung des *CD4⁺ T Cell Isolation Kit II*® (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) erfolgte ebenfalls durch Abreicherung (negative Selektion) aus PBMC. Hierfür wurden in einem 15 ml Falcon™ Röhrchen die eingesetzten PBMC pro 1×10^7 Zellen mit 40 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 10 µl biotinyliertem Antikörpercocktail versetzt. Diese Antikörper erkannten spezifisch CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und CD235a (Glykophorin A). Nach Inkubation für 10 Minuten bei 4 °C wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl anti-Biotin *MicroBeads* zugegeben und weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Des Weiteren wurde wie bereits in Kapitel 2.2.3.4.1. verfahren: Hier enthielt der Durchlauf die unmarkierten CD4⁺ Th-Zellen.

2.2.3.4.3. Isolierung von CD14⁺ Monozyten

Die Isolation von CD14⁺ Monozyten aus PBMC erfolgte durch positive Selektion unter Verwendung des *CD14 Micro-Beads Human Kit*® (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Das Pellet wurde in einem 15 ml Falcon™ Röhrchen pro 1×10^7 PBMC mit 80 µl MACS-Puffer resuspendiert und 20 µl anti-CD14 *MicroBeads* zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4 °C wurde mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen.

Eine LS-Säule wurde in einem MidiMACS™-Separator platziert und mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Pro Säule wurden bis zu 1×10^8 Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Anschließend wurde dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen. Zur Elution wurde das Säulchen aus dem Magnetfeld entfernt und 5 ml MACS-Puffer aufgetragen. Die gebundene, aufgereinigte CD14⁺ Monozytenfraktion konnte mit dem beiliegenden, sterilen Stempel in ein 15 ml Falcon™ Röhrchen gedrückt werden.

2.2.3.5. Differenzierung von Monozyten zu unreifen und reifen dendritischen Zellen und Beladung mit ESAT-6/ CFP-10

Die in Kapitel 2.2.3.4.3. aufgereinigten CD14⁺-Monozyten wurden für Experimente zu iDCs (*immature dendritic cells*, unreife dendritische Zellen) bzw. zu mDCs (*mature dendritic cells*, reife dendritische Zellen) ausdifferenziert. Hierfür wurden die Monozyten in 75 cm² BD Falcon™ Zellkulturflaschen in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in iDC-Medium (RPMI Medium 1640 mit 10 % (v/v) inaktiviertem Humanserum, und je 500 U/ml IL-4 und GM-CSF) für fünf Tage inkubiert. In dieser Zeit differenzierten sich die Monozyten zu iDCs aus.

Zur völligen Ausdifferenzierung zu ESAT-6/ CFP-10 präsentierenden mDCs wurde das Medium in Gegenwart von 10 µg/ml ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein anschließend zusätzlich mit 1000 U/ml IL-6 (Interleukin 6), 10 ng/ml IL-1β (Interleukin-1β), 10 ng/ml TNF (Tumornekrosefaktor) und 1 µg/ml PGE₂ (Prostaglandin E₂) versetzt und die Zellen für weitere 2 Tage inkubiert.

2.2.3.6. Expansion ESAT-6/ CFP-10 spezifischer CD4⁺ T-Zellen

Die Herstellung einer Kultur angereicherter ESAT-6/ CFP-10-spezifischer CD4⁺ Th-Zellen beruht auf der Isolation von Th-Zellen aus dem Blut eines Probanden mit latenter Tuberkulose und die darauf folgende wöchentliche Restimulation dieser Th-Zellen mit ESAT-6/ CFP-10-beladenen mDCs desselben Spenders. Auf diese Weise sollen T-Zellen dieser Spezifität zur Proliferation angeregt werden, während T-Zellen mit anderer Spezifität aufgrund des mangelnden Stimulus absterben und deshalb aus der Population verschwinden (Yssel & Spits, 2002).

Frisch aus dem Blut eines latent mit *M. tuberculosis* infizierten Probanden aufgereinigte CD4⁺ Th-Zellen (siehe Kapitel 2.2.3.4.2.) wurden in Expansionsmedium aufgenommen. Dieses enthält neben RPMI 1640, inaktiviertem Humanserum und 1 % Penicillin/

Streptomycin auch IL-2, welches die T-Zell-Proliferation verbessert. Zur Kultivierung wurden 96-well-Rundbodennapfplatten benutzt. Die Population wurde wöchentlich gesammelt, neu ausgezählt und anschließend wieder pro Kulturplatte 2 Millionen T-Zellen und 2 Millionen bestrahlte mit ESAT-6/ CFP-10 beladenen mDC (respektive ebenfalls bestrahlte nicht proteinbeladene PBMC als Negativkontrolle) in einem Gesamtvolumen von 20 ml ausgesät. Dabei wurde jeder Napf mit 200 µl der Suspension gefüllt.

Jeweils vor Beginn der Kokultur wurden die mDC für 3 Stunden im Brutschrank in einer Konzentration von 1×10^7 /ml mit 10 µg/ml ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein inkubiert und anschließend mit 30 Gy bestrahlt. Das Kulturmedium wurde wöchentlich gewechselt, gelagert wurde die Kultur aus T-Helferzellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.3.7. Restimulation ESAT-6/ CFP-10 spezifischer CD4⁺ Th-Zellen

Sowohl zur Ermittlung der Spezifität der expandierten T-Zell-Kultur, als auch zur Bestimmung der Effizienz der Antigenpräsentation von APC nach Transfektion mit einem Expressionsplasmid wurden Restimulationsexperimente durchgeführt.

Dazu wurde ein Aliquot der antigenspezifischen T-Zell-Kultur aus Kapitel 2.2.3.6. über Nacht in IL-2 freiem Expressionsmedium (RPMI Medium 1640 mit 5 % (v/v) inaktiviertes Humanserum und 1 % Pen/Strep) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1×10^6 Zellen aus der Kultur (in 0,5 ml IL-2 freiem Expressionsmedium) mit 1×10^6 PBMC (in 0,5 ml BZM) und je 1 µg anti-CD28-Antikörper und 1 µg anti-CD49d-Antikörper zusammengegeben. Falls die eingesetzten PBMC nicht bereits mit einem Expressionsplasmid transfiziert worden waren, wurde dem Ansatz noch 10 µg/ml rekombinantes ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein zugesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz, dem 1 µg/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin zugesetzt wurde. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz aus Zellsuspension, der nur 1 µg/ml anti-CD28-Antikörper und 1 µg/ml anti-CD49d-Antikörper erhielt. 2 Stunden nach Stimulationsbeginn wurde je 10 µg Brefeldin A zupipettiert. Brefeldin A aus *Penicillium brefeldianum* führt über einen retrograden Proteintransport vom Golgiapparat zurück ins ER (endoplasmatisches Retikulum) zu einer dortigen Akkumulation der auszuschleusenden Proteine (Nebenführ, 2002). Nach weiteren 4 Stunden wurde sofort mit der Färbung der Zellmarker (vergleiche Kapitel 2.2.5.2. und 2.2.5.3.) für die durchflusszytometrische Analyse begonnen.

2.2.3.8. Stimulation von Vollblut mit rekombinantem ESAT-6/ CFP-10 Protein

1 ml Vollblut gesunder, latent oder akut TB infizierter Spender wurde mit je 1 µg anti-CD28-Antikörper, anti-CD49d-Antikörper und 10 µg rekombinantem ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein inkubiert. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz, dem 1 µg PMA und 1 µg Ionomycin zugesetzt wurde. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der nur Vollblut, 1 µg anti-CD28-Antikörper und 1 µg anti-CD49d-Antikörper erhielt. 2 Stunden nach Stimulationsbeginn wurde je 10 µg/ml Brefeldin A zupipettiert, und nach 4 weiteren Stunden sofort das Färben von Zellmarkern in Vollblut (siehe Kapitel 2.2.5.4.) durchgeführt.

2.2.3.9. Transfektion mit der *Nucleofector*[®] Technologie

Für Transfektionen wurde das *Human B Cell Nucleofector*[®] Kit des Herstellers Lonza Cologne AG, Köln (ehemals Amaxa) verwendet, welches die selektive Transfektion von B-Zellen im PBMC-Gemisch ermöglicht und laut Herstellerangaben dabei B-Zell-Transfektionsraten von durchschnittlich ca. 37 % erzielt (www.lonzabio.com, *Optimized Protocol for Human B Cells*). Das Verfahren beruht auf einer Kombination von Elektroporation und Lipofektion. Gearbeitet wurde nach Angaben und Empfehlungen des Herstellers. Pro Transfektion wurden $2-5 \times 10^6$ Zellen und 1-4 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Frisch aus Vollblut isolierte oder für maximal 24 Stunden in BZM bei 37 °C gelagerte PBMC, B-Zellen oder Zellen der DG75-Zelllinie wurden ausgezählt, die benötigte Anzahl (Anzahl der Transfektionsexperimente x Zellen pro Experiment) herausgenommen und bei 300 g und Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde sehr sorgfältig abgenommen, und das Zellpellet in 100 µl pro Transfektion „*Nucleofector Solution*“ (im *Human B Cell Nucleofector*[®] Kit enthalten) resuspendiert. Rasch wurden jeweils 100 µl Zellsuspension mit 1-4 µg Plasmid-DNA vermischt und sofort in eine ebenfalls im Kit enthaltene spezielle Küvette überführt. Diese besteht im unteren Teil aus zwei parallelen Metallplättchen, in deren Mitte die Zellsuspension zum Liegen kommt. Die gefüllte Küvette wurde in das Transfektionsgerät, den *Nucleofector*[®] (Lonza Cologne AG, Köln), gesteckt und die Probe mit dem vorher am Gerät eingestellten Transfektionsprogramm transfiziert. Anschließend wurde die Probe sofort mit speziellen im Set enthaltenen Pipetten in 2 ml auf 37 °C vorgewärmtes Medium überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei der Transfektion wurde auf eine schnelle zeitliche Abfolge geachtet.

2.2.4. Biochemische Methoden

2.2.4.1. Vorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE (Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur Größenanalyse von Proteinen wurde in dieser Arbeit die SDS-PAGE verwendet. Dank der Bindung von SDS an die Proteine entstehen in Gegenwart eines hohen SDS Überschusses negativ geladene Protein-SDS-Komplexe mit einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis. Im elektrischen Feld wandern die Komplexe zum positiv geladenen Pol. Sie werden zuerst im Sammelgel konzentriert und anschließend durch den Molekularsiebeffekt in der höherprozentigen Polyacrylamidmatrix des Trenngels nach ihrer Molekularmasse getrennt (Laemmli, 1970).

2.2.4.1.1. Herstellung der Polyacrylamidgele

Der Zusammenbau der Elektrophoreseapparaturen und das Gießen der Gele erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Je nach gewünschtem Trennbereich wurden 12,5 %ige oder 15 %ige Trenngele verwendet. In Tabelle 2.9 ist deren Zusammensetzung aufgeführt.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele

	5 % Sammelgel	12,5 % Trenngel	15 % Trenngel
Acrylamid 4K ¹	0,99 ml	7,5 ml	9 ml
Sammelgelpuffer	1,2 ml		
Trenngelpuffer		3,6 ml	3,6 ml
steriles H ₂ O	1,2 ml	3,6 ml	3,6 ml
10% (w/v) APS	30 µl	90 µl	90 µl
TEMED	6 µl	15 µl	15 µl

¹ 29,2 % Acrylamid/ 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

2.2.4.1.2. Aufbereitung von Zellen und Überständen

Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und separat vorbereitet. Das erhaltene Zellpellet wurde in *Boiling-Mix* (40 % (w/v) Saccharose, 1 % (w/v) SDS, 100 mM Tris/HCl pH 7,0, 1/1000 Vol. gesättigte wässrige Bromphenolblaulösung, 10 % v/v Mercaptoethanol) gelöst. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Auf diese Weise wurden die Zellen lysiert und Proteine denaturiert.

Aus den verbliebenen Überständen wurde von je 0,5 ml eine Proteinfällung mit der Natrium-Desoxycholatmethode (Na-DOC-Methode) durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit 0,5 ml H₂O und 25 µl 2 %iger Natrium-Desoxycholatlösung gemischt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und dann mit 30 µl 40 %iger Trichloressigsäure ausgefällt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation auf Eis wurde bei 300 g für 8 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde in Boiling-Mix resuspendiert und bei 95 °C für 5 Minuten inkubiert.

Eine weitere verwendete Methode ist die Proteinfällung aus Überständen mit Aceton. Hierfür wurde ein Aliquot eines Zellkulturüberstandes mit demselben Volumen Aceton gemischt und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die gefällten Proteine in der Tischzentrifuge für 10 Minuten bei 300 g pelletiert, für 15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und zur Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel in dem entsprechenden Volumen Boiling-Mix aufgenommen. Vor dem Aufkochen der Probe in einem Heizblock bei 95 °C für 5 Minuten wurde das Pellet durch fünfzehnminütige Ultraschallbehandlung in einem Wasserbad (Bandelin Sonorex, Bandelin electronic, Berlin) vollständig gelöst.

2.2.4.1.3. Auftrennung von Proteinen mit der SDS-PAGE

Die Elektrophorese erfolgte nach Beladung der Gele mit den Proben in SDS-Puffer. Die Minigel-Apparatur (Biometra, Göttingen) lief bei 24 mA pro Gel, die Maxigel-Apparatur

(Biometra, Göttingen) lief bei 200 mA pro zwei Gele und beide wurden direkt nach Auslaufen der Bromphenolbande gestoppt.

2.2.4.2. Western Blot Analyse

Beim Western Blot werden Proteine zuerst durch SDS-PAGE nach Kapitel 2.2.4.1 aufgetrennt. Bei der anschließenden Elektrophorese wandern die denaturierten Proteine, entsprechend ihrer nach SDS-Behandlung negativen Ladung, in Richtung Anode und werden auf der Nitrozellulosemembran immobilisiert. Dort werden sie mit einem für das gesuchte Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Ein sekundärer Antikörper, der eine Alkalische Phosphataseaktivität besitzt, macht bei Zugabe eines Substrats die transferierten Proteine sichtbar.

2.2.4.2.1. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose im *Semi-Dry-Blot* Verfahren

Ein beliebtes Verfahren zum Transfer von Proteinen aus einer SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran ist die Verwendung von Semi-Dry-Apparaturen. Nach Auftrennung des Proteingemisches durch SDS-PAGE wurde das Gel auf eine mit TBE-Puffer äquilibrierte Nitrozellulosemembran gelegt und dieser Komplex zwischen je drei in Westernblotpuffer getränkten Whatman® 3MM-Filterpapierstreifen platziert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in einer *fast-blot-semidry*-Apparatur (BIOMETRA, Göttingen) für 15 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA.

2.2.4.2.2. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose im *Wet-Blot* Verfahren

Eine ähnliche Methode zum Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Trenngel auf Nitrozellulose stellt das *Wet-Blot*-Verfahren dar. Verwendet wurde hierbei eine Elektro-Blot-Apparatur, welche für das Blotting vollständig in einem speziellen Tankblotpuffer (Sambrook *et al.* 1989) steht. Das Gel wurde hierbei auf die mit Puffer benetzte Nitrozellulosemembran aufgelegt und zwischen zwei Graphitplatten, zwei puffergetränkten Schwämmen und zwei Lagen Whatman® 3MM-Papier (ebenfalls puffergetränkt) platziert. Über Platinelektroden konnte quer zum Gel eine Spannung von 20 bis 30 V bei 1,5 A (circa 2 Stunden) an die Kohleplatten angelegt werden, wodurch die denaturierten Proteine vom Gel auf die Nitrozellulose übertragen wurden.

2.2.4.2.3. Nachweis spezifischer Proteine mittels *Immunoblotting*

Zur Überprüfung der Übertragung wurde die Membran anschließend in 2 % (w/v) Ponceau-S Lösung (0,2 g Ponceau-S, 3 g Trichloressigsäure, 3 g Sulfosalicylsäure, ad 100 ml H₂O_{bid}. (Sambrook *et al.* 1989)) gefärbt. Dabei wurden die Positionen der Proteine des Molekulargewichtsstandards für einen späteren visuellen Größenvergleich angezeichnet. Anschließend wurde die Färbung mit TTBS wieder ausgewaschen.

Die folgende Inkubation in TBS-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver über Nacht bei 4 °C ermöglichte die Absättigung der noch freien Proteinbindungstellen. Es folgten drei Waschschrifte mit TBS für je 15 Minuten. Nach Zugabe des primären anti-ESAT-6-Antikörpers (ESAT-6 *antibody, Mouse monoclonal*, ab26246, Abcam plc., Cambridge, England) in einer Verdünnung von 1 : 2000 in TBS erfolgte die Inkubation der Membran wiederum über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der Blot dreimal mit TBS für je 15 Minuten gewaschen. Der sekundäre, AP-gekoppelte polyklonale anti-Maus-Antikörper (*Polyclonal Goat anti-Mouse-Ab AP*, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurde in einer Verdünnung von 1 : 1000 in TBS eingesetzt. Der Blot wurde mit dem sekundären Antikörper 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für je 15 Minuten - um die ungebundenen Antikörper zu entfernen - folgte das Färben der Membran. Dazu wurden 300 µl raumwarme Färbelösung (NBT/BCIP Stock Solution, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), welche ein Substrat für die am sekundären Antikörper gebundene alkalische Phosphatase enthält, in 15 ml AP-Puffer verdünnt auf die Membran gegeben. Gewöhnlich zeigte sich eine violette Farbreaktion auf den spezifisch gefärbten Proteinbanden nach 2 bis 10 Minuten.

2.2.5. Immunologische Methoden

2.2.5.1. Durchflusszytometrie

Die Analyse der Oberflächenmarkerexpression der Zellen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Hierbei wurden monoklonale Antikörper, die spezifisch Oberflächenmarker erkennen und binden können, verwendet. Am F_c-Teil dieser Antikörper ist kovalent ein Fluorochrom gebunden.

Das COULTER® EPICS® XL-MCL™ Durchflusszytometer kann gleichzeitig bis zu vier verschiedene Farbkanäle unterscheiden. Die Färbeschemata umfassten hierbei die Fluorochrome Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin/Texas Red (ECD) und Phycoerythrin/Cyanin 5 (Pc5). Bei Kopplung der Fluorochrome mit vier verschiedenen Antikörpern konnten somit pro Färbung bis zu vier verschiedene Marker unterschieden werden.

Dagegen kann das FACSCanto II Durchflusszytometer (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) gleichzeitig in bis zu acht verschiedenen Farbkanälen messen. Verwendet wurden hier die Fluorochrome Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC), Allophycocyanin (APC), Allophycocyanin / Cy7 (APC-Cy7) und Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP).

2.2.5.2. Färbung von Oberflächenmarkern

Je Ansatz wurden 4×10^5 aufgereinigte Zellen in 100 µl PBS₀ aufgenommen. Die Färbung der Oberflächenmarker erfolgte durch Zugabe der Antikörper und Inkubation auf Eis im Dunkeln für 20 Minuten. Die Zellen wurden mit 1 ml eiskaltem PBS₀ gewaschen und bei 300 g für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 300 µl PBS₀

resuspendiert und in ein FACS Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Probe sofort im Durchflusszytometer gemessen.

2.2.5.3. Intrazelluläres Färben von Markern

Bis zu 1×10^7 Zellen wurden mit 3 ml PBS_o gewaschen, bei 300 g für 8 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann in 100 µl kaltem PBS_o gelöst und die Oberflächenmarker 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml eiskaltem PBS_o gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 1 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) resuspendiert, bei Raumtemperatur für 10 Minuten im Dunkeln fixiert und danach erneut mit 3 ml PBS_o gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen in 10 µl 2 % (w/v) Saponinlösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) resuspendiert. Die Färbung des intrazellulären Markers IFN-γ erfolgte durch Zugabe von 20 µl anti-IFN-γ-PE-Antikörper/ anti-IFN-γ-FITC-Antikörper und Inkubation im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit 1 ml 0,1 % (w/v) Saponinlösung entfernt. Das Pellet wurde schlussendlich in 300 µl 1 % (w/v) PFA resuspendiert, in ein FACS Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.5.4. Färben in Vollblut

Für das direkte Färben ohne vorangehende Aufreinigung der PBMC wurde 1 ml Vollblut mit 100 µl eiskalter 20 mM Ethylenediamintetraacetat-Lösung (EDTA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) versetzt und gevortext. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Ansatz nochmals gevortext, anschließend 9 ml FACS *Lysing Solution* (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) hinzugegeben, erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4 °C und 300 g für 8 Minuten abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 9 ml PBS_o wurden die Zellen in 100 µl PBS_o aufgenommen, Antikörper für die Oberflächenfärbung hinzugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Es schlossen sich zwei weitere Waschschritte mit je 9 ml PBS_o an. Danach wurden die Zellen mit 500 µl 2 % PFA fixiert und in FACS-Röhrchen überführt. Es wurde wieder für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, mit 3 ml PBS_o gewaschen und nun durch Zugabe von 10 µl 2 % Saponinlösung und 1 µl IFN-γ-FITC die Zellen permeabilisiert und die intrazellulären Marker gefärbt. Nach Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde zweimal mit 3 ml 0,1 % Saponinlösung gewaschen, zuletzt die Zellen mit 500 µl 1 % PFA fixiert und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.5.5. Färben von Zellen mit Propidiumjodid

Die Propidiumjodid (PJ) Färbung dient zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. PJ ist nicht in der Lage, mit der DNA von lebenden Zellen zu interkalieren, da es deren

Zellmembranen nicht durchdringen kann. Sobald aber beim Zelltod deren Permeabilität steigt, dringt PJ ein und bindet an die DNA. Auf diese Weise lassen sich im Durchflusszytometer lebende von toten Zellen unterscheiden (Darzynkiewicz *et al.*, 1992). Für das Färben wurden 4×10^6 Zellen in 100 µl PBS_o gelöst und 1 µl Propidiumjodid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde zweimal mit PBS_o gewaschen um überschüssiges PJ zu entfernen. Die Zellen wurden in 300 µl PBS_o in ein FACS-Röhrchen überführt und innerhalb von 30 Minuten im Durchflusszytometer gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. T-Zell-induzierte Reifungsprozesse in antigenpräsentierenden Zellen (APC) als Marker für akute Infektionserkrankungen

Dringen Tuberkelbakterien in unseren Körper ein, so beginnt eine vielschichtige Immunantwort (siehe Einleitung). Neben Reaktionen des unspezifischen Immunsystems beginnen unter anderem APC mit der Phagozytose von sowohl *M. tuberculosis* als auch sezerniertem Antigen des Erregers. Anschließend präsentieren sie daraus einzelne charakteristische Polypeptide auf MHC-II-Molekülen. Beim Erstkontakt einer naiven T-Helferzelle mit ihrem Zielepitop sowie bei erneutem Antigenkontakt einer T-Helfer-Gedächtniszelle wird diese zu einer „bewaffneten“ aktivierte T-Helferzelle, welche nun CD40L exprimiert und ihre Effektorfunktionen (z.B. Produktion von Zytokinen) ausübt. Neben diesen Effektorfunktionen besitzen T-Helferzellen zudem eine Helferfunktion zur Steigerung der Funktionalität von APC.

Findet nun neben Antigenpräsentation und – erkennung gleichzeitig eine Interaktion von CD40L der Th-Zelle mit CD40 der APC statt, werden Reifungsprozesse in der APC ausgelöst, welche die Fähigkeit der APC zur Aktivierung von Th-Zellen und CTL nochmals deutlich erhöhen. Diese Reifungsprozesse äußern sich beispielsweise in einer verstärkten Expression von Vertretern der TNFR-Familie, 4.1BBL und OX40L (den Haan, 2000). Durch die Detektion dieser Proteine kann dann indirekt auf die Anwesenheit CD40L-tragender aktiverter T-Zellen geschlossen werden (siehe Abbildung 6). Dieser Ablauf, den wir uns im Folgenden zu Nutze machen wollen, wird Reverse T-Zelltechnologie (RTT) genannt.

Parallel zum Geschehen *in vivo* soll in dieser Arbeit überprüft werden, ob nach Stimulation mit Antigenen aus *M. tuberculosis* eine Hinreaktion zwischen APC und aktiverter T-Zelle genauso *in vitro* erfolgt. Diese beinhaltet dabei die Reaktivierung antigenspezifischer T-Helfer-Gedächtniszellen durch antigenbeladene APC zur aktivierte THZ. Im Anschluss soll in weiterführenden Projekten die Rückreaktion untersucht werden, bei welcher erst nach gleichzeitiger Epitoperkennung und CD40-Kontakt durch die aktivierte THZ Reifungsprozesse in der APC induziert werden.

Nur eine aktive Tuberkulose sollte dann durch Nachweis von 4.1BBL bzw. OX40L erkennbar sein, alle anderen Fälle (latente TB, gesunde Probanden) sollten keine zunehmende Expression dieser beiden Liganden hervorrufen. Auf diese Weise könnte man ein Testsystem entwickeln, das künftig spezifisch die akute, aktive Infektion mit *M. tuberculosis* erkennt und eine Abgrenzung von einer persistierenden Tuberkulose ermöglicht.

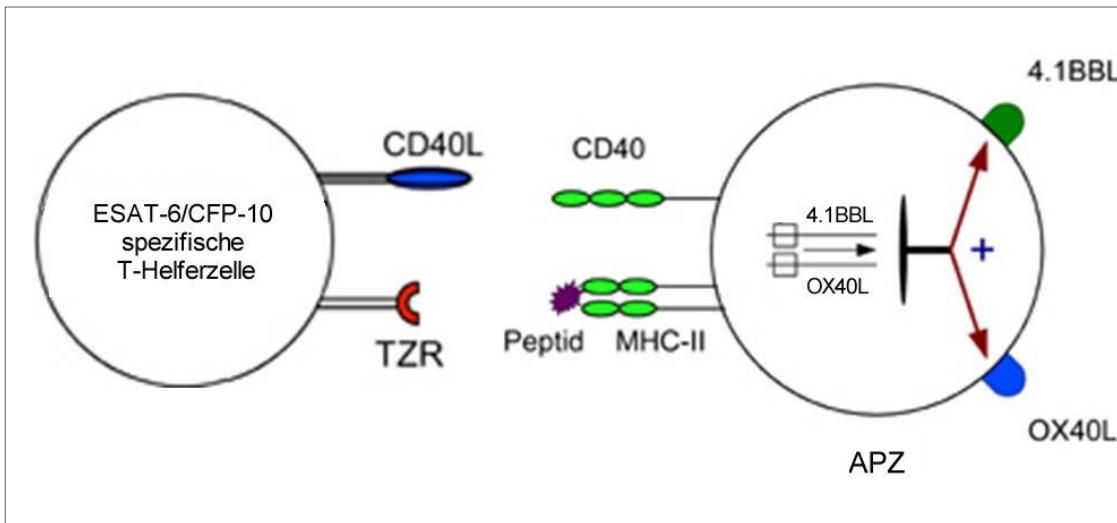


Abbildung 6: Übersicht über die Interaktion zwischen APC und aktiverter T-Helferzelle.

Die naive T-Helferzelle erkennt über ihren T-Zell Rezeptor (TZR) ihr Zielepitop, welches die APC auf ihrem MHC-II-Molekül präsentiert. Dies induziert in der T-Zelle die Reifung zur aktiven T-Helferzelle, woraufhin unter anderem CD40-Ligand an ihrer Oberfläche exprimiert wird. Bei einer nachfolgenden Interaktion der aktiven Th-Zelle mit einer Epitop-präsentierenden APC werden durch die gleichzeitige Erkennung von Peptid-beladenen MHC Molekülen durch den TZR und den CD40-CD40L-Kontakt Reifungsprozesse in der APC ausgelöst; die Promotoren der 4.1BBL und OX40L Gene werden aktiviert und die Expression von 4.1BBL und OX40L induziert. 4.1BBL: 4.1BB Ligand; APC: Antigen-präsentierende Zelle; CD40L: CD40-Ligand; MHC-II: Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II-Molekül; OX40L: OX40-Ligand; TZR: T-Zell-Rezeptor.

3.2. Vergleichende Testung verschiedener Methoden zur Antigenbeladung von APC

Zur Realisierung des zu etablierenden Verfahrens musste zunächst eine zuverlässige Methode zur suffizienten Beladung der APC mit Zielstrukturen gefunden werden. Da sich die verschiedenen professionellen APC – dendritische Zellen, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen – in ihren Mechanismen zur Aufnahme und Präsentation von Proteinen unterscheiden, wurden unterschiedliche Methoden zur Antigenbeladung der jeweiligen Population getestet.

Die effektivsten APC sind dendritische Zellen. Da die Ausdifferenzierung von Monozyten zu reifen, antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (mDC, siehe Kapitel 2.2.3.5.) jedoch sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mehrere Tage in Anspruch nimmt, sind mDC nur für Stimulationsexperimente geeignet, denen ein Zeitraum von mindestens einer Woche zur Verfügung steht (Sung, 2008).

Eine effiziente Alternative hierzu sind B-Zellen (Schultze, 1997). Diese erkennen Antigen über ihren B-Zell-Rezeptor um es anschließend zu endozytieren. Allerdings existieren jeweils nur sehr wenige für ein Antigen spezifische B-Zellen, was für eine Nutzung in der Diagnostik ein großes Problem darstellen würde. Außerdem weisen sie vergleichsweise schlechte phagozytotische Eigenschaften auf, weshalb in dieser Arbeit ein alternativer Weg zur Antigenpräsentation auf MHC-II Molekülen eingeschlagen wurde. Unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits*, welches nach Herstellerangabe selektive

Transfektionen von B-Zellen im PBMC Gemisch ermöglicht (www.lonzabio.com), wurde ein für die zu präsentierenden Antigene von *M. tuberculosis* kodierender Expressionsvektor transfiziert.

Als Drittes wurden in dieser Arbeit schließlich PBMC, in denen als Vertreter der APC vor allem B-Zellen und Monozyten enthalten sind, durch die Inkubation mit rekombinanten TB-Proteinen beladen.

3.2.1. Etablierung eines Verfahrens zur Antigenbeladung durch Transfektion mit Expressionsplasmiden

Zur Analyse der Transfektionsraten von PBMC und deren Unterpopulationen bei Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* (Lonza Cologne AG, Köln) wurden anhand des ebenfalls im Kit enthaltenen *pmaxGFP®*-Plasmid (Lonza, GFP: engl. *green fluorescent protein*) verschiedene Experimente durchgeführt.

Das *pmaxGFP®*-Plasmid enthält das Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), welches ursprünglich aus *Pontellina plumata*, einem Vertreter der Ruderfußkrebse stammt. Dieses Protein hat die Eigenschaft zu fluoreszieren, genauer: Licht mit einer Wellenlänge von 502 nm zu emittieren. Es erscheint dem menschlichen Auge als grün und ist auch durchflusszytometrisch detektierbar. Auf diese Weise können Zellen, die dieses Protein exprimieren, nachgewiesen und somit der Transfektionserfolg von *pmaxGFP®* überprüft werden. Zur weiteren durchflusszytometrischen Charakterisierung wurden die verwendeten transfizierten PBMC auch mit anti-CD19-PE-konjugierten und anti-CD4-PC5-konjugierten Antikörpern beziehungsweise mit Propidiumjodid gefärbt.

Für die Auswertung der Versuche wurde nach einem Stufenschema zuerst die Population der vitalen PBMC mit einem Fenster erfasst. Daraus wurden je nach Interesse mittels Antikörpermarkierung die Populationen von B-Zellen (CD19 exprimierend) oder T-Zellen (CD3 exprimierend) bestimmt, sowie GFP-exprimierende oder durch Propidiumjodid angefärbte Zellen ermittelt (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Innerhalb der PBMC Population war nach Transfektion mit dem *Nucleofector®* Verfahren insbesondere wegen Zunahme der Zellgröße ein weiterführendes Gating nach morphologischen Kriterien nicht möglich.

Durch Anfärben der Zellen mit PC5-gekoppelten anti-CD19 und ECD-gekoppelten anti-CD3 Antikörpern sowie durch entsprechendes konstruieren der Fenster konnte mittels durchflusszytometrischer Verfahren die Gruppe der PBMC in ihre Subpopulationen unterteilt werden. Die Effizienz des Transfektionssystems konnte anhand der ebenfalls durchflusszytometrisch detektierten GFP-Expression der einzelnen Subtypen untersucht werden. Es zeigte sich in diesen ersten Experimenten eine unselektive Transfektion aller PBMC. Bei einem B-Zell-Anteil von nur gut 2 % exprimierten insgesamt über 10 % aller PBMC das *green fluorescent protein*. Bei näherer Betrachtung zeigt sich, dass auch in der Einzelanalyse sowohl B- als auch T-Zellen nach Transfektion und Inkubation zu etwa 10 % GFP exprimieren.

Durch Anfärben mit Propidiumjodid konnte der Anteil der PBMC gezeigt werden, der nach Anwendung des Transfektionsverfahrens apoptotisch wurde. In ersten Messungen reduzierte sich die Gesamtpopulation um etwa ein Fünftel. Ferner zeigte sich, dass die GFP-exprimierende Zellpopulation nur zu weniger als 1 % apoptotisch wurde.

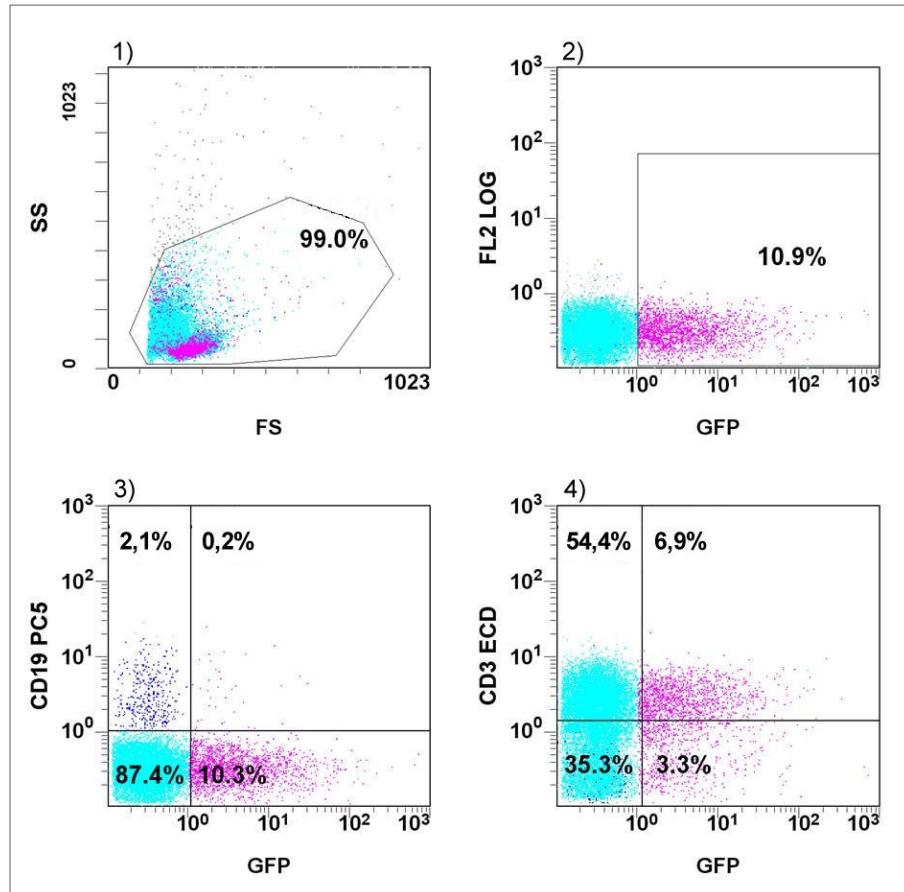


Abbildung 7: Gatingschema zur Erfassung der mittels des Human B Cell Nucleofector® Kit GFP-transfizierten Gesamt-PBMC, B- und T-Zellen.

Nach Aufreinigung aus Vollblut wurden 2 bis 5 Millionen PBMC mit 2 bis 4 µg *pmaxGFP*[®]-Plasmid transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 41 Stunden im Wärmeschrank bei 37 °C, während der die transfizierten Zellen GFP exprimierten, wurde eine Zellprobe entnommen und wie benötigt mit fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern gegen zellspezifische Oberflächenantigene gefärbt. Die Frequenz der verschiedenen Zelltypen wurde anschließend durchflusszytometrisch ermittelt.

Die Teilabbildungen 1), 2), 3) und 4) zeigen das für die durchflusszytometrischen Messungen verwendete Gating Schema. 1) zeigt alle gemessenen Events der Probe, das Fenster begrenzt die Population vitaler PBMC die 99,0 % des PBMC Gemisches ausmacht. 2) zeigt die PBMC Population, gegatet wurde der 10,9 % messende Anteil GFP-exprimierender Zellen. In den Teilabbildungen 3) und 4) sieht man über der Abszisse die aus der Lymphozytenpopulation herausdriftende Population der GFP-exprimierenden Zellen in den rechten beiden Quadranten. In 3) erscheint neben der Ordinate als nach oben driftende Population die Gruppe der CD19⁺ B-Zellen (2,3 % der Lymphozyten) in den oberen zwei Quadranten, in 4) die der CD3⁺ T-Zellen (61,3 % der Lymphozyten). Im rechten oberen Quadranten befinden sich die GFP-exprimierenden CD19⁺ (0,2 % aller Lymphozyten) bzw. CD3⁺ Zellen (6,9 % aller Lymphozyten).

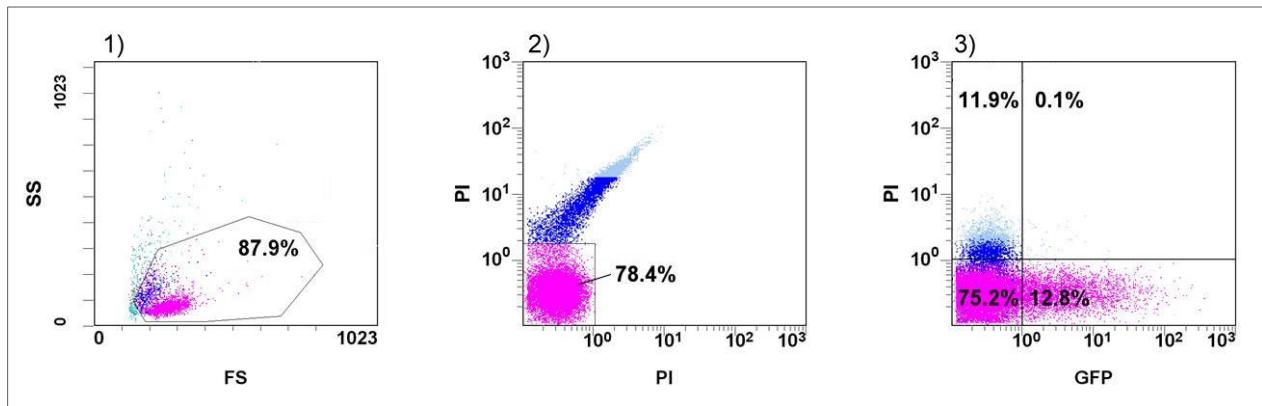


Abbildung 8: Gatingschema zur Erfassung Propidiumiodid gefärbter PBMC.

Nach Aufreinigung aus Vollblut wurden 2 bis 5 Millionen PBMC unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* mit 2 bis 4 µg *pmaxGFP®*-Plasmid transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 41 Stunden im Wärmeschrank bei 37 °C, während der die transfizierten Zellen GFP exprimierten, wurde eine Zellprobe entnommen und mit Propidiumjodid gefärbt. Die Frequenz der GFP-exprimierenden und der Propidiumjodid gefärbten Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch ermittelt.

1), 2) und 3) zeigen das für die durchflusszytometrischen Messungen verwendete *Gating Schema*. 1) zeigt alle gemessenen Events der Probe, das Fenster begrenzt die Population vitaler PBMC (87,9 % aller PBMC). 2) zeigt die PBMC Population, gegagtet wurde der Anteil nicht Propidiumjodid gefärbter Zellen, hier 78,4 %. In 3) sieht man über der Abszisse die aus der Lymphozytenpopulation herausdriftende Population GFP-exprimierender Zellen in den rechten beiden Quadranten, anteilig 12,9 % der Lymphozytenpopulation. Als neben der Ordinate nach oben driftende Population erscheint die Gruppe der Propidiumjodid positiven, also toten Zellen in den oberen zwei Quadranten, die 12,0 % ausmacht. Im rechten oberen Quadranten befinden sich die toten, GFP-exprimierenden Zellen (0,1%).

3.2.1.1. Transfektionsraten von PBMC und B-Zellen in PBMC

Zunächst sollte die Transfektionseffizienz von Gesamt-PBMC und primären B-Zellen unter Einsatz des *Nucleofector®* Verfahrens und des *Human B Cell Nucleofector® Kit* untersucht werden. Hierzu wurden PBMC mittels Ficoll-Gradient aus heparinisiertem Vollblut isoliert, mit *pmaxGFP®*-Plasmid-DNA transfiziert und anschließend in BZM im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Transfektionsrate anhand der Zahl GFP-exprimierender Zellen ermittelt. Diese sowie die Identität der Zellen konnte in durchflusszytometrischen Verfahren bestimmt werden.

Die Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen den Anteil GFP exprimierender B-Zellen (blaue Balken) und PBMC (rote Balken) nach 24 und nach 41 Stunden Inkubationszeit. In Abbildung 9 ist die Transfektionsrate nach 24 Stunden dargestellt. Die maximale Transfektionsrate der B-Zellen betrug hier 42,86 %, bei Spender 11 wurde in beiden Ansätzen keine GFP Expression erreicht. Die Transfektionsrate der PBMC betrug maximal 43,1 % und minimal 2,4 %. Dabei fiel auf, dass die kompletten PBMC insgesamt effizienter transfiziert wurden als die Population der B-Zellen ($MW_{PBMC} = 24,75\%$, $MW_{B-Zellen} = 11,18\%$). Bis auf einen Ansatz wurden die PBMC stets prozentual häufiger transfiziert. Der Anteil der B-Zellen am PBMC Gemisch schwankte bei den verschiedenen Spendern von 1,5 % bis 5,7 %. Spender 11 besaß den prozentual geringsten Anteil an B-Zellen, also 1,5 % der PBMC. Den höchsten Anteil besaß Proband 35 mit 5,7 %.

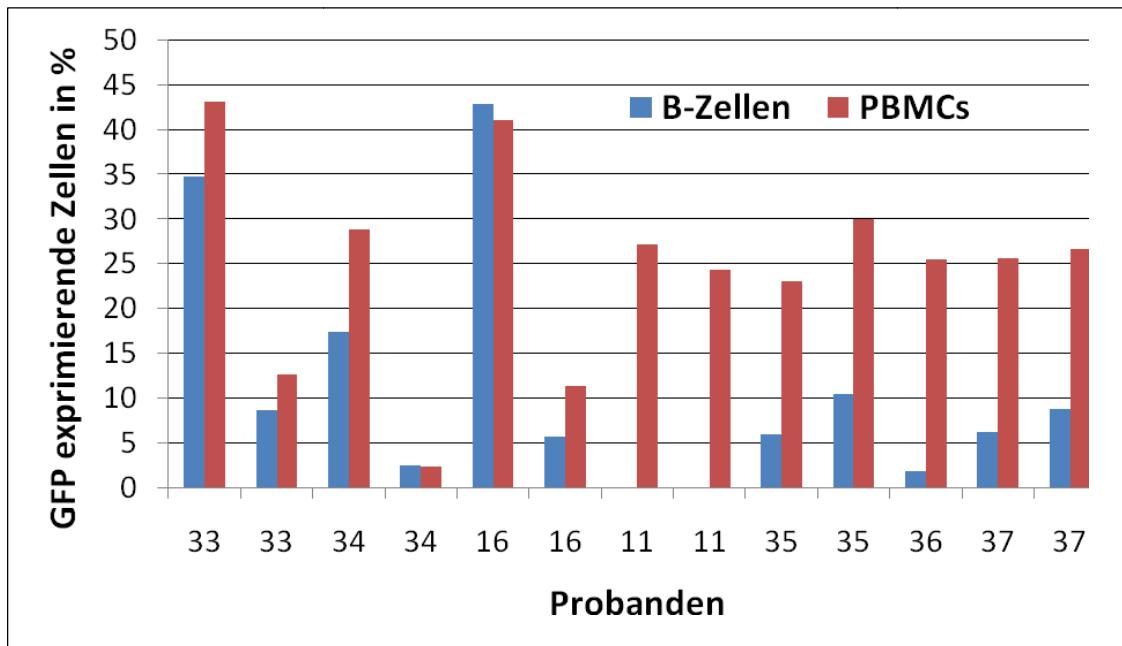


Abbildung 9: Bestimmung der Transfektionsrate von B-Zellen und PBMC in PBMC Kulturen 24 Stunden nach Transfektion mittels des *Human B Cell Nucleofector® Kit*.

Zur Ermittlung der Transfektionsrate von B-Zellen und Gesamt-PBMC unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* wurden PBMC aus Spenderblut isoliert. Pro Transfektion (Programm U15) wurden 4 (Probanden 33, 34, 16) oder 5 (Probanden 11, 35, 36, 37) Millionen PBMC und 4 µg *pmaxGFP®* Plasmid-DNA eingesetzt. Die GFP Expression der verschiedenen Zellpopulationen wurde 24 Stunden nach Transfektion durchflusszytometrisch ermittelt. In der Grafik zeigen die blauen Balken den Prozentsatz der transfizierten B-Zellen, die roten den transfizierten Anteil aller PBMC.

Es wurden 13 unabhängige Transfektionsexperimente mit Blutzellen von 7 Probanden durchgeführt, dabei maximal 2 Experimente pro Spender.

Abbildung 10 zeigt vergleichend dazu den Anteil GFP-exprimierender Zellen 41 Stunden nach Transfektion mit dem *pmaxGFP®*-Plasmid. Die maximale Transfektionsrate der B-Zellen betrug hier 14,29 %, die minimale 3,16 %; Mittelwert war 6,25 %. Bei den PBMC wurde mit einem Mittelwert von 10,32 % maximal 20,4 % und minimal 5,6 % erreicht. Auch bei diesem Ansatz wurden die PBMC insgesamt wieder prozentual häufiger transfiziert als ihr B-Zell Anteil, allerdings wichen die Mittelwerte nach 41 Stunden Inkubationszeit nur um 4,07 % auseinander, während es vorher, nach 24 Stunden noch 13,57 % waren.

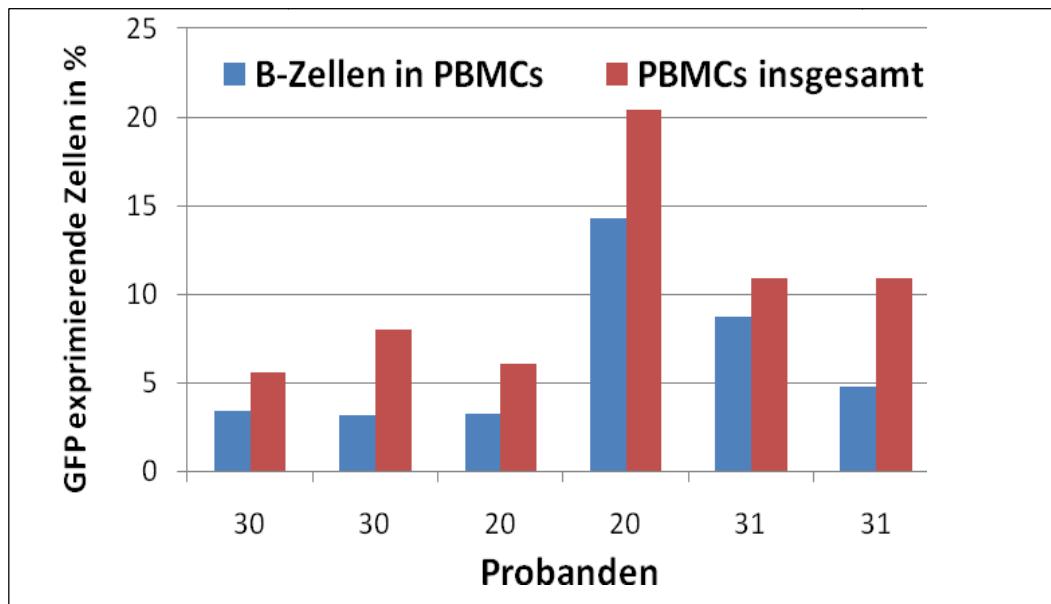


Abbildung 10: Bestimmung der Transfektionsrate von B-Zellen und PBMC in PBMC Kulturen 41 Stunden nach Transfektion mittels des *Human B Cell Nucleofector® Kit*.

Zur Ermittlung der Transfektionsrate von B-Zellen und PBMC unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* wurden PBMC aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Pro Transfektion (Programm U15) wurden 4 Millionen PBMC und 3 µg *pmaxGFP®* Plasmid-DNA eingesetzt. Die Zahl GFP-exprimierender Zellen der verschiedenen Populationen wurde 41 Stunden nach Transfektion durchflusszytometrisch bestimmt. In der Grafik zeigen die blauen Balken den Prozentsatz der transfizierten B-Zellen, die roten den transfizierten Anteil aller PBMC.

Es wurden 6 unabhängige Transfektionsexperimente mit Blutzellen von 3 Probanden durchgeführt, dabei je 2 Experimente pro Spender.

Vergleicht man die Transfektionsergebnisse nach 24 und 41 Stunden Inkubationszeit, fällt sowohl bei PBMC als auch nur bei den darin enthaltenen B-Zellen eine im Zeitverlauf fallende GFP-Expression auf. Diese fällt in den PBMC von durchschnittlich 24,75 % auf 10,32 %, in B-Zellen von 11,18 % auf 6,25 %. Dies zeigt auch, dass nach beiden Zeitabschnitten die GFP-Expression im gesamten PBMC Kollektiv gegenüber der in den B-Zellen durchschnittlich sowie in den Einzelwerten (bis auf eine Ausnahme, siehe Abb.9, fünftes Säulenpaar) größer ist. Gegenüber der GFP-Expression im B-Zell-Anteil ist die GFP-Expression im PBMC Kollektiv nach 24 Stunden rund zweieinhalbmal höher, nach 41 Stunden nur noch etwa aufs Doppelte erhöht.

Die beiden Versuchsreihen zeigten, dass unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* PBMC insgesamt anteilig deutlich besser transfiziert wurden, als die im PBMC Gemisch enthaltenen B-Zellen. Maximal ließ sich eine Transfektionsrate von 42,86 % bei den B-Zellen erreichen. Nach verlängerter Inkubationszeit von insgesamt 41 Stunden reduzierte sich die Diskrepanz zwischen den Transfektionsraten von PBMC und den darin enthaltenen B-Zellen auf Mittelwerte von 6,25 % bei den B-Zellen und 10,32 % bei den PBMC.

3.2.1.2. Transfektionsraten von T-Zellen in PBMC, B-Zellen in PBMC und Gesamt-PBMC

Im weiteren sollte untersucht werden, ob auch T-Zellen unter Einatz des *Human B Cell Nucleofector® Kit* im PBMC Gemisch transfiziert wurden. Diese Frage ist von besonderer Bedeutung, da T-Zellen durch die Transfektion möglicherweise so funktionell beeinträchtigt werden, sodass sie nicht mehr in der Lage sind, die RTT Reaktion auszulösen. Außerdem wurde untersucht, in welcher Weise sich der Einsatz unterschiedlicher Transfektionsprogramme des *Nucleofector®* Einfluss auf die Transfektionsraten auswirkt.

Hierzu wurden wiederum PBMC aus heparinisiertem Vollblut dreier gesunder Spender (20, 30, 31) isoliert. Jeweils 6 Ansätze wurden pro Transfektionsprogramm mit *pmaxGFP®*-Plasmid-DNA transfiziert und anschließend für 41 Stunden in BZM im Brutschrank inkubiert. Die durchflusszytometrisch ermittelten Transfektionsraten der PBMC und ihren Unterpopulationen wurden in Boxplot-Diagrammen (Berechnung der Quartile mit der Clevelandmethode nach John Tukey, siehe Anhang C) dargestellt und sind in Abbildung 11 gezeigt. Innerhalb der Box liegen 50 % der Messwerte. Der Median liegt als Querstrich in der Box und teilt alle Werte in zwei Hälften, sodass oberhalb und unterhalb je 50 % liegen. Der Boden der Box ist das untere Quartil, 25 % der Daten sind kleiner oder gleich diesem Wert, analog verhält es sich mit der Decke der Box, dem oberen Quartil, hier sind 75 % der Messwerte kleiner oder gleich diesem Wert.

In diesem Diagramm zeigen die roten Balken die Transfektionsraten der PBMC insgesamt, während die grünen und die blauen Balken jeweils die Transfektionsrate der T-Zell- bzw. der B-Zell Unterpopulation darstellen. Es fiel auf, dass die T-Zellen in allen drei Programmen am besten transfiziert wurden, da der Median jeweils der höchste seiner Gruppe war, mit Werten von 11,04 % (U15), 14,21 % (M30) und 26,40 % (U20). Dabei fiel hier auch auf, dass der Interquartilabstand bei Programm M30 nur 1,57 % betrug, die Transfektionsraten in allen 6 Messungen also sehr ähnlich waren. Für den B-Zell-Anteil traf eher das Gegenteil zu, hier schwankten die Transfektionsraten stark, besonders bei Programm M30, wo der Interquartilabstand 12,97 % betrug. Weiter war zu sehen, dass die B-Zell-Population pro Gruppe stets am wenigsten effizient transfiziert wurde, (Mediane von 4,07 % (U15), 7,58 % (M30) und 9,00 % (U20)). Auffällig ist hier auch, dass sich bei Verwendung der Programme U15 und M30 die Messwerte stark zwischen 25% Quartil und Median häufen. Der Anteil der GFP-exprimierenden gesamten PBMC rangiert in etwa zwischen der Transfektionsrate von B- und T-Zellen, die Mediane betrugen hier 9,45 % (U15), 11,65 % (M30) und 20,80 % (U20).

Die Effizienz der drei verwendeten Transfektionsprogramme zeigte sich insgesamt heterogen. Im Vergleich wurden jedoch durchschnittlich alle drei Zellpopulationen mit Programm U15 schlechter und mit Programm U20 effizienter transfiziert.

In dieser Versuchsreihe konnte somit gezeigt werden, dass bei Transfektion von PBMC mit dem *pmaxGFP®*-Plasmid unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* und Betrachtung der Unterpopulationen der T- und B-Zellen erstere effizienter und letztere anteilig nur gering transfiziert wurden. Maximal wurde bei T-Zellen eine

Transfektionseffizienz von 29,37 %, bei B-Zellen dagegen nur von 19,05 % erreicht. Die Gruppe der gesamten PBMC befand sich bezüglich ihrer Transfektionseffizienz durchschnittlich zwischen den beiden Untergruppen.

Bei dem Vergleich der Transfektionsprogramme ergab sich eine kontinuierliche Steigerung der Transfektionseffizienzen von Programm U15 über M30 zu U20. Dabei verbesserte sich die Rate der GFP-exprimierenden B-Zellen im Median von Programm U15 zu Programm U20 um 4,93 %, die der T-Zellen und Gesamt-PBMC jedoch um 15,36 % bzw. 11,35 %.

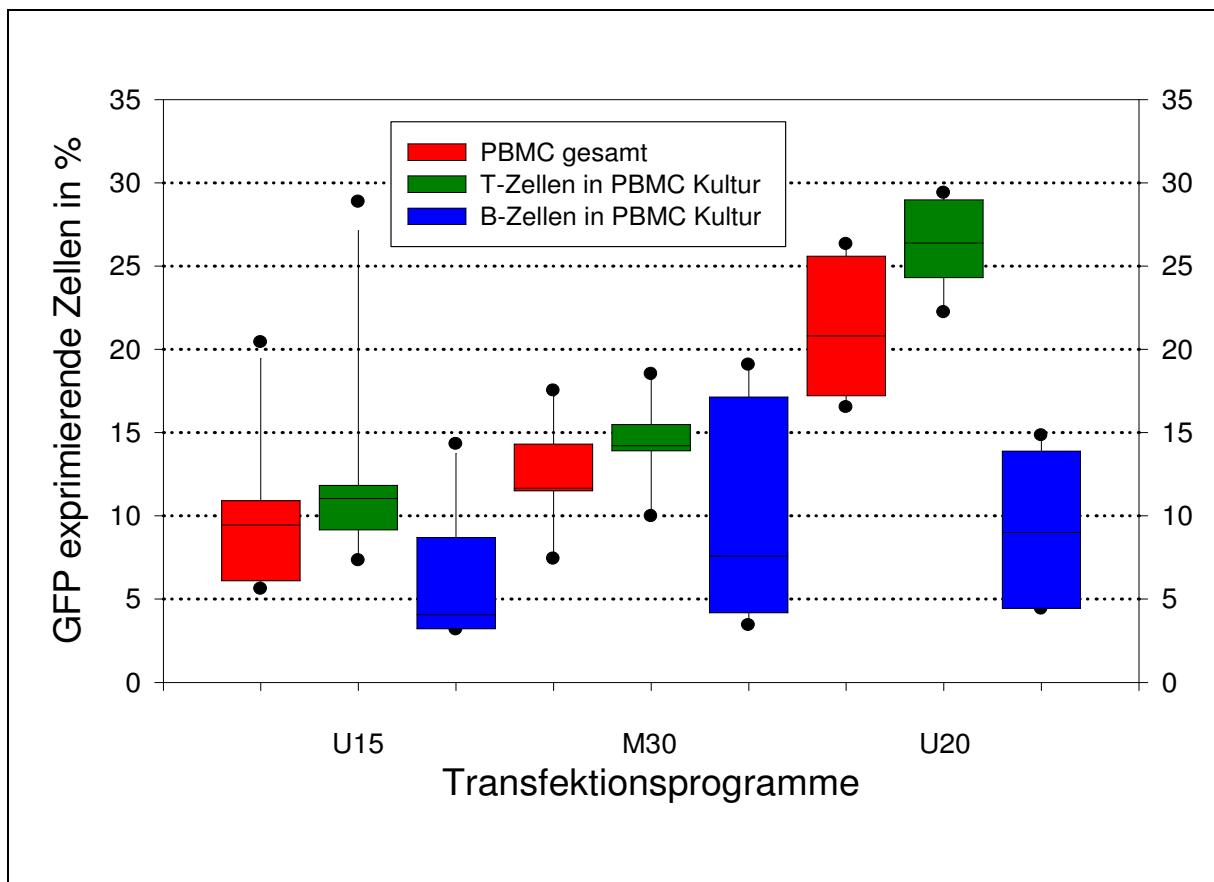


Abbildung 11: Vergleich der Transfektionsraten von PBMC, B und T-Zellen in PBMC Kulturen.

Die Abbildung zeigt die Transfektionsraten von PBMC, B- und T-Zellen bei Verwendung von drei unterschiedlichen Transfektionsprogrammen (U15, M30, U20) des *Nucleofector®*. Je Transfektionsprogramm wurden 6 unabhängige Experimente durchgeführt (je 2 Experimente pro Blutspender). Zur Ermittlung der Transfektionsrate von Gesamt-PBMC, T- und B-Zellen wurden PBMC aus Blut von 3 Probanden isoliert und je 4 Millionen Zellen mit 3 µg *pmaxGFP®* Plasmid-DNA unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* transzisiert. Nach einer Inkubationszeit von 41 Stunden wurden die Proben entnommen und durchflusszytometrisch der Anteil GFP exprimierender Gesamt-PBMC und der darin enthaltenen B- bzw. T-Zellen bestimmt. Die im Diagramm abgebildeten Boxplots zeigen den Median und das obere und untere Quartil des jeweiligen Datensatzes.

3.2.1.3. Vitalität von PBMC-Populationen bei Verwendung des Transfektionsverfahrens

In weiteren Untersuchungen sollte abgeklärt werden, inwiefern die Transfektionen unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* Einfluss auf die Vitalität der eingesetzten Zellen nahmen.

Hierzu wurden PBMC aus heparinisiertem Vollblut von 3 Spendern (20, 30, 31) isoliert, jeweils 6 Ansätze pro Transfektionsprogramm mit *pmaxGFP®*-Plasmid-DNA transfiziert und anschließend für 41 Stunden in BZM im Brutschrank inkubiert. Zur Unterscheidung der lebenden von den toten Zellen wurde je ein Aliquot entnommen, abzentrifugiert, und die Zellen mit Propidiumjodid (PJ) angefärbt (siehe Kapitel 2.2.5.5.). Die Zahl der PJ positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt und die Messung nach dem unter Abbildung 8 angegebenen *Gating* Schema ausgewertet.

Die Ergebnisse wurden in Box Plot Diagrammen dargestellt und sind in Abbildung 12 gezeigt. Es fand sich ein Abfall der Vitalität in den transfizierten Proben, verglichen mit den nicht transfizierten Vergleichsproben. Die Population lebender – PJ negativer – Zellen in den nicht transfizierten Proben betrug noch 95,8 % bis 97,6 %. Je nach Transfektionsprogramm verhielt sich die Vitalität der Zellen unterschiedlich. Im Median betrug der Anteil lebender Zellen bei Verwendung von U15 74,0 %, bei M30 69,3 % und bei U20 61,6 %, mit Interquartilsabständen von 6,5 % (U15), 4,7 % (M30) und 7,9 % (U20). Die minimale und maximale Transfektionsrate pro Transfektionsprogramm wurde als Punkt eingezzeichnet.

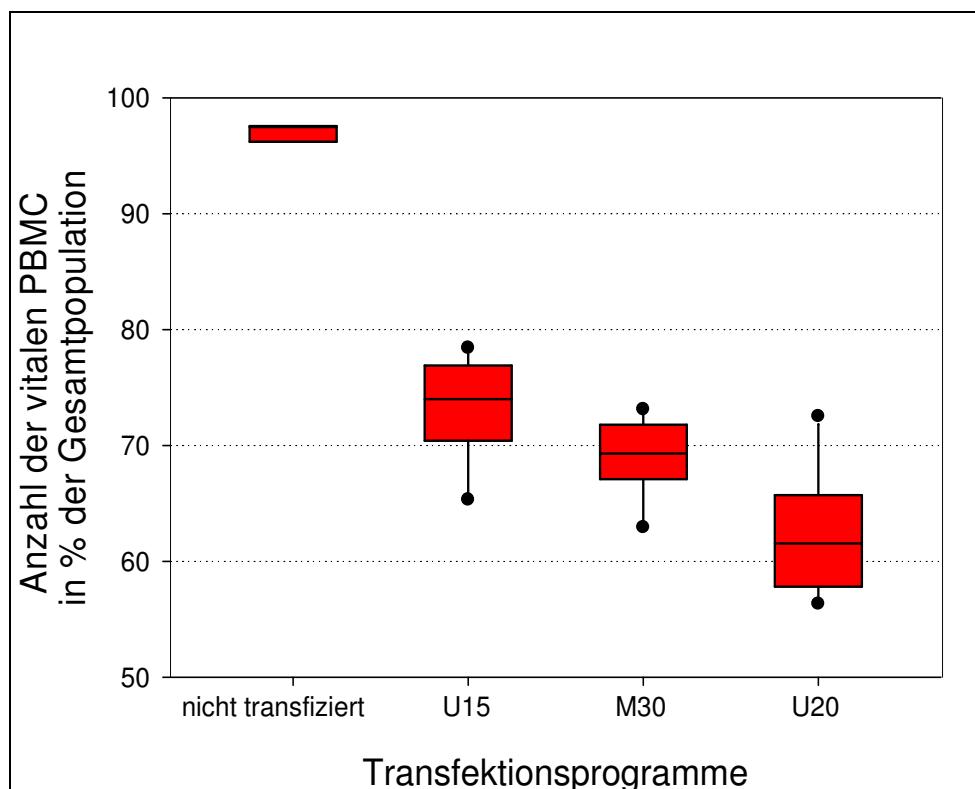


Abbildung 12: Vitalität der PBMC Populationen 41 Stunden nach Transfektion mit verschiedenen Transfektionsprogrammen des Nucleofector® unter Verwendung des Human B Cell Nucleofector® Kits.

Pro Transfektionsprogramm wurden in 6 unabhängigen Experimenten je 4×10^6 PBMC dreier Spender mit je 3 µg *pmaxGFP*® Plasmid-DNA transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 41 Stunden wurden Proben entnommen und für eine durchflusszytometrische Untersuchung mit Propidiumiodid gefärbt. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der nicht PI gefärbten Zellen der Population. Pro verwendetes Transfektionsprogramm ist ein Boxplot gezeigt, der Median, 25 % und 75 % Quartil der Wertemenge aus je sechs Messungen angibt (Berechnung der Quartile nach der Standardmethode). Als Positivkontrolle dienten Messungen aus drei Proben nicht transfizierter PBMC.

In einem Folgeversuch sollte untersucht werden, wie sich die Vitalität der unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* transfizierten Zellen zu einem früheren Zeitpunkt verhielt. Dazu wurden ebenso PBMC aufgereinigt (Probanden 11, 35, 36, 37), insgesamt 7 Ansätze unter Verwendung des Transfektionsprogramm U15 mit *pmaxGFP*®-Plasmid-DNA transfiziert und anschließend für nur 24 Stunden in BZM im Brutschrank inkubiert. Es wurde ebenfalls eine Färbung der Zellen mit PJ vorgenommen und die Probe durchflusszytometrisch analysiert. Die Messung wurde nach dem unter Abbildung 8 angegebenen Gating Schema ausgewertet und das Ergebnis in Abbildung 13 in einem Box Plot Diagramm dargestellt. Der Maximal- und Minimalwert wurde jeweils als Punkt eingezeichnet. Bei einem Median von 87,3 % und einem Interquartilabstand von 3,4 % zeigte sich hier die Vitalität der Zellpopulation viel stabiler. Die Rate vitaler Zellen in der Lymphozytenpopulation der untransfizierten Vergleichsprobe betrug 99,6 %.

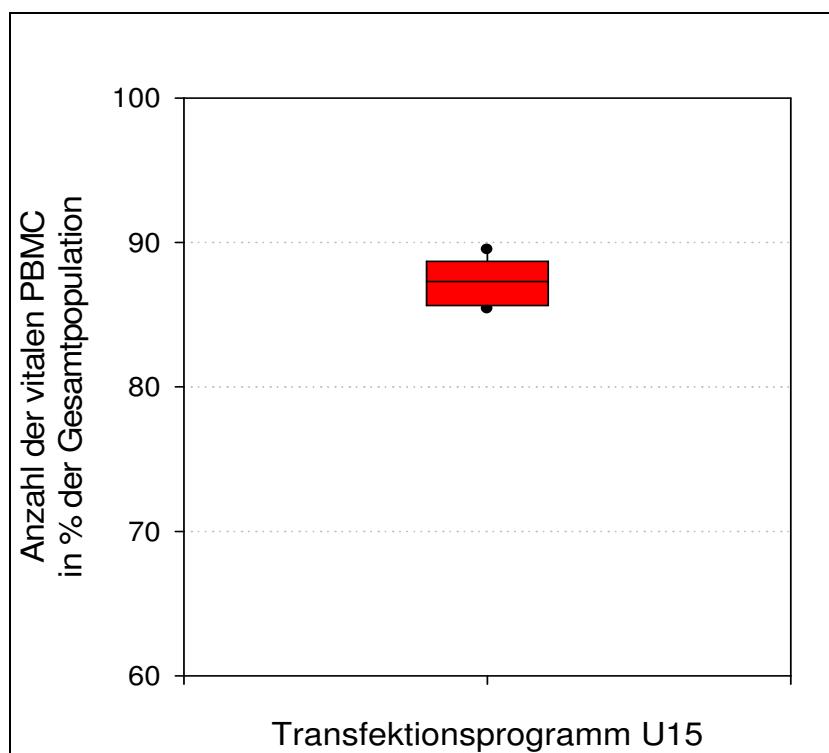


Abbildung 13: Vitalität der PBMC Populationen 24 Stunden nach Transfektion mit Transfektionsprogramm U15 des Nucleofector® Verfahrens.

In 7 unabhängigen Experimenten wurden je 5×10^6 PBMC (Probanden 11, 35, 36, 37) mit je 4 µg *pmaxGFP*®-Plasmid-DNA transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden Proben entnommen und für eine durchflusszytometrische Untersuchung mit Propidiumiodid gefärbt. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der nicht PI gefärbten Zellen der Population. Gezeigt ist ein Boxplot, der Median, 25 % und 75 % Quartil der Wertemenge angibt (Berechnung der Quartile nach der Standardmethode).

Diese Untersuchungen zeigten, dass infolge einer Transfektion mit dem *Human B Cell Nucleofector® Kit* die Vitalität der eingesetzten PBMC nach einer Inkubationszeit von 41 Stunden im Vergleich mit gleichermaßen inkubierten untransfizierten Zellen durchschnittlich um mindestens 20 % fiel. Bei einer reduzierten Inkubationszeit von 24 Stunden betrug die Vitalität jedoch im Median 87,3 %, was im Vergleich zur untransfizierten Probe nur einer Reduktion von knapp 10 % entspricht.

3.2.1.4. Transfektionsraten von B-Zellen in PBMC, abhängig von deren Anteil im Spenderblut

Im folgenden Experiment sollte nun untersucht werden, inwiefern sich die Höhe des prozentualen Anteil an B-Zellen im PBMC Gemisch des Spenders auf deren Transfektionsrate auswirkt. Da B-Zellen gewöhnlich etwa 2 bis 20 % der PBMC ausmachen, ist von Natur aus eine große Variabilität vorhanden, die als Einflussgröße untersucht wurde.

Erneut wurden PBMC aus heparinisiertem Vollblut von 3 Spendern (20, 30, 31) isoliert, jeweils 6 Ansätze pro Transfektionsprogramm mit *pmaxGFP*®-Plasmid-DNA transfiziert und anschließend für 41 Stunden in BZM im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch der prozentuale Anteil der B-Zellen in der PBMC-Kultur und der prozentuale Anteil GFP-produzierender B-Zellen nach Transfektion mit den Programmen U15, M20, U30 ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt. Die blauen Balken zeigen den B-Zell-Anteil der PBMC jedes Probanden. Die grauen Balken stellen den Anteil an B-Zellen dar, der 41 Stunden nach Transfektion GFP exprimiert. Zur Transfektion wurden drei verschiedene Programme im Vergleich verwendet.

Auch hier fielen die Transfektionsraten sehr unterschiedlich aus. Die Vermutung, dass mit größerem B-Zell-Anteil in den PBMC auch ihre Transfektionseffizienz stieg, ließ sich nicht bestätigen.

So wurden die B-Zellen von Spender 31, der nur einen Anteil von 3,30 % B-Zellen in isolierten PBMC aufwies, mit Raten von 14,81 %, 17,14 % und 19,05 % transfiziert, während bei Spender 30, der einen weitaus höheren B-Zell-Anteil von 8,70 % aufwies, maximal eine Transfektionsrate von 4,44 % der B-Zellen feststellbar war. Spender 22 mit einem B-Zell-Anteil von 3,60 % lag mit den erzielten Transfektionsraten in etwa dazwischen (3,23 % bis 14,29 %).

Somit wurde in diesem Experiment gezeigt, dass die Transfektionsrate von B-Zellen nicht abhängig von deren Anteil im PBMC Gemisch des Spenders ist.

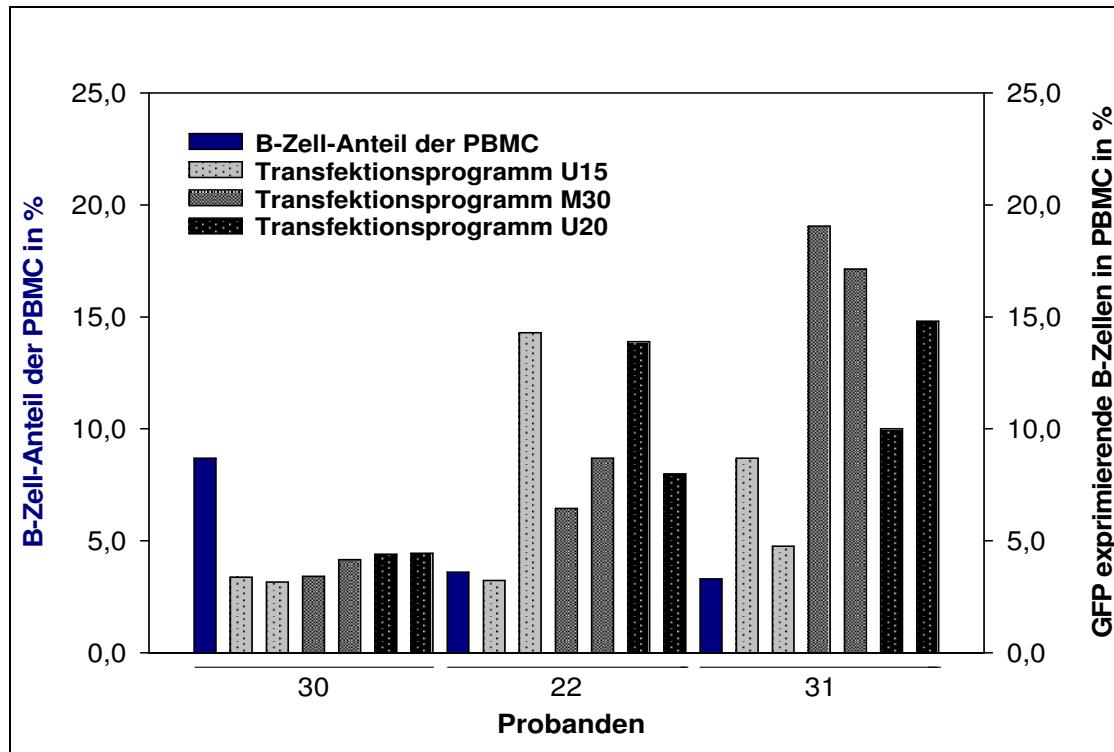


Abbildung 14: Zusammenhang der Transfektionsrate von B-Zellen in PBMC mit ihrem prozentualen Anteil in der PBMC Kultur.

Die Abbildung zeigt 3 parallele Transfektionsexperimente mit aus Vollblut aufgereinigten PBMC verschiedener Probanden. Der blaue Balken beschreibt den Anteil der B-Zellen von den PBMC des jeweiligen Spenders. Unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* wurden mit den Programmen U15, M30 und U20 jeweils 2 unabhängige Transfektionsexperimente durchgeführt. Pro Transfektion wurden 4 Millionen PBMC und 3 µg *pmaxGFP®* Plasmid-DNA eingesetzt. Die grauen Balken zeigen den Anteil GFP exprimierender B-Zellen ($CD19^+$), der 41 Stunden nach Transfektion durchflusszytometrisch ermittelt wurde.

3.2.1.5. Transfektionsraten von isolierten B-Zellen

In einem nächsten Versuchsansatz wurde untersucht, ob sich primäre B-Zellen oder B-Zelllinien im Vergleich zu B-Zellen in Gemischen verschiedener Blutleukozyten effizienter transfizieren lassen. Diese Fragestellung wurde unter Verwendung frisch aus PBMC isolierter B-Zellen und der Zelllinie DG75 untersucht. Letztere ist eine 1975 etablierte B-Zelllinie, die ursprünglich aus einem Burkitt Lymphom stammt (siehe Kapitel 2.1.4.).

Zunächst wurden PBMC mittels Ficoll-Gradient aus Spenderblut (Probanden 39, 98) aufgereinigt. Aus diesen wurden unter Verwendung des *B Cell Isolation Kit II®* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) die $CD19^+$ B-Zellen isoliert, in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in BZM aufgenommen und für 12 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 im Wärmeschrank inkubiert. Es folgte die Transfektion mit *pmaxGFP®*-Plasmid DNA und

anschließend nach einer weiteren Inkubationszeit von 7, 24, 48 oder 72 Stunden die durchflusszytometrische Messung der GFP-Expression (siehe Abbildung 15).

Dabei fand sich zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ein prozentualer Anteil GFP-exprimierender primärer B-Zellen von 0,0 % bis maximal 0,9 %. Allen Proben gemein war hier der Expressionsabfall hin zum 72 Stunden Messwert. Interessant ist, dass alle drei Proben ihre maximale GFP-Expression zu einem anderen Zeitpunkt haben. Probe 39A weist eine Expressionsrate von maximal 0,3 % zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden auf. Den frühesten Spitzenwert der GFP-Expression erreichte Probe 39B schon bei der ersten Messung nach 7 Stunden mit 0,4 %. Probe 98 zeigt mit 0,9 % die höchste Rate GFP-exprimierender Zellen zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion.

So wurde mit diesem Experiment zwar gezeigt, dass auch bei aus PBMC aufgereinigten B-Zellen eine Transfektion und nachweisbare GFP-Expression stattfindet, allerdings war die Transfektionsrate mit maximal 0,9 % zum Zeitpunkt 48 Stunden deutlich niedriger als bei Transfektionen von B-Zellen in PBMC.

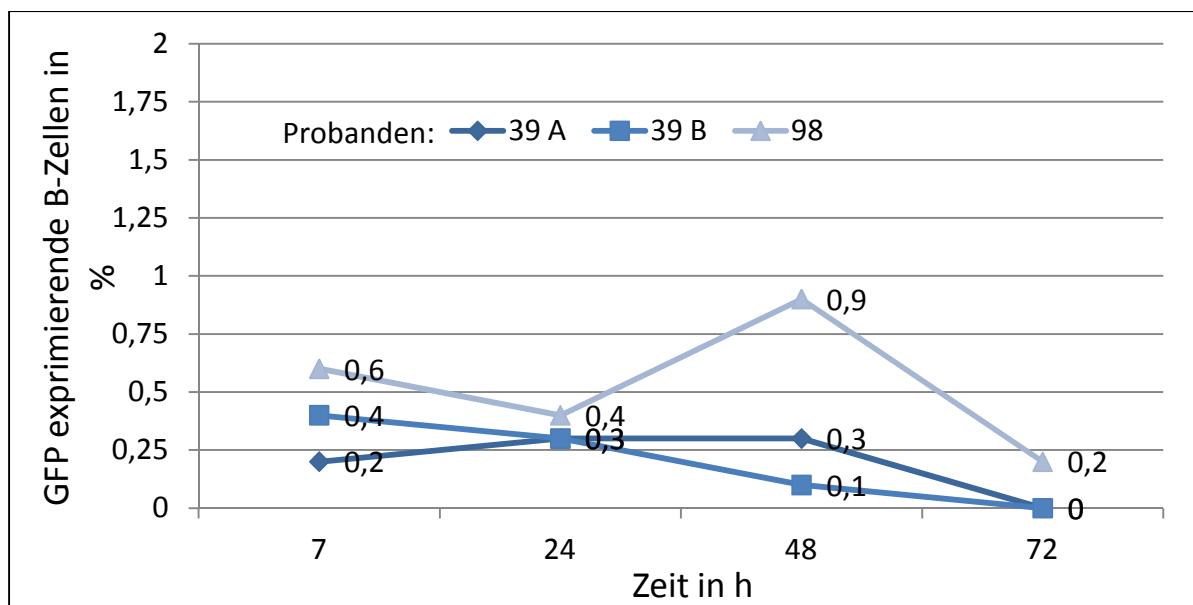


Abbildung 15: Transfektionsraten isolierter B-Zell-Populationen unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit*.

Aus frisch isolierten PBMC von 2 Spendern (39, 98) wurden mittels der MACS® Technologie CD19⁺ B-Zellen isoliert. In 3 unabhängigen Transfektionsexperimenten wurden je 2 Millionen B-Zellen unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* mit je 2 µg *pmaxGFP®* Plasmid-DNA transfiziert (Programm U15) und nach 7, 24, 48 und 72 Stunden der Prozentsatz GFP exprimierender Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Bei Proband 39A wurden zum jeweiligen Zeitpunkt 0,2 %, 0,3 %, 0,3 % und 0,0 % GFP-exprimierende Zellen gemessen, bei Proband 39B analog dazu 0,4 %, 0,3 %, 0,1 % und 0,0 %, bei Proband 98 0,6 %, 0,4 %, 0,9 % und 0,2 % GFP-Expression.

Der zweite Ansatz zur Untersuchung der Transfektionsraten von reinen B-Zellen war die Verwendung von Zellen der DG75-Zelllinie. Hierzu wurden DG75 Zellen unter

Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* mit *pmaxGFP®* transfiziert, anschließend in DG75-Medium aufgenommen und im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der durchflusszytometrisch ermittelte Anteil GFP-produzierender Zellen zu den Zeitpunkten 7, 24, 48 und 72 Stunden ist in Abbildung 16 aufgetragen. Man sieht einen stetigen Anstieg des Prozentsatzes GFP exprimierender transfizierter Zellen beginnend bei 34,1 % zu Stunde 7 nach Transfektion bis zu 49,5 % nach 72 Stunden Inkubation. Beispielhaft wurde hier der Zeitverlauf von einem Transfektionsexperiment aufgetragen.

Es zeigte sich also nach der Transfektion von *pmaxGFP®* in DG75-Zellen mit maximal 49,5 % ein deutlich höherer Anteil GFP-exprimierender Zellen als in den bisherigen Versuchen.

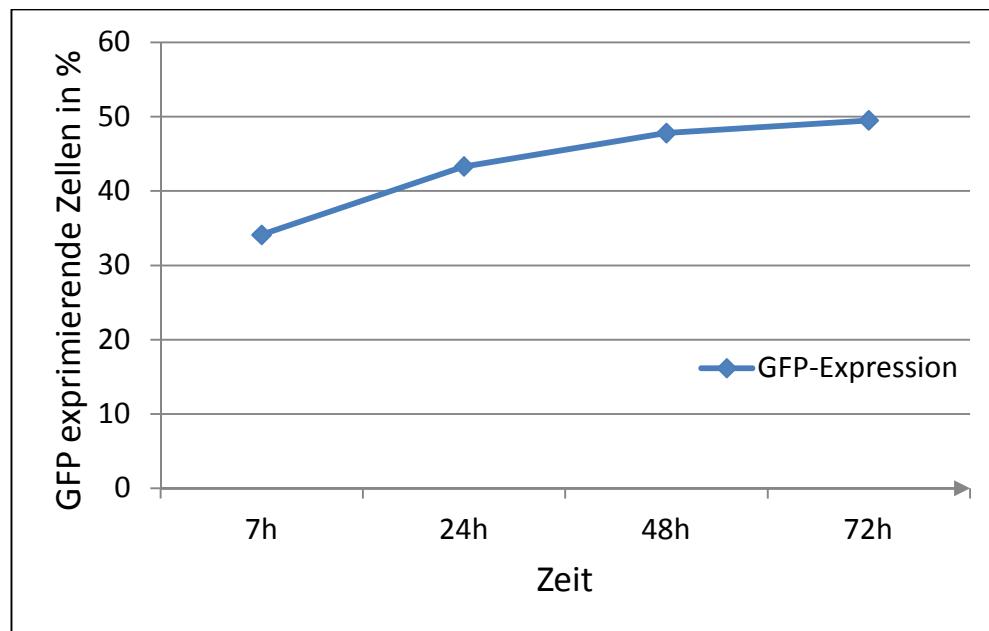


Abbildung 16: Transfektionsraten von DG75 Zellen unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits*.

Das Diagramm zeigt die prozentuale Zahl GFP exprimierender DG75 Zellen nach Transfektion des GFP-Expressionsvektors unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit*. Zur Ermittlung der Transfektionsrate wurden 4 Millionen DG75 Zellen mit 4 µg *pmaxGFP®* Plasmid-DNA transfiziert (Programm U15). Die Zahl GFP exprimierender Zellen wurde nach 7, 24, 48 und 72 Stunden durchflusszytometrisch ermittelt.

3.2.2. Herstellung von Expressionsvektoren zur Präsentation intrazellulär exprimierter Proteine auf HLA-Klasse-II Molekülen

Um dem Ziel der Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Differentialdiagnose der Tuberkulose näherzutreten, wurden im folgenden Abschnitt Plasmide zur Expression von Zielstrukturen kloniert.

Es sollten zwei Plasmide hergestellt werden, die für das Protein ESAT-6 bzw. das synthetische Fusionsprotein ESAT-6/ CFP-10 aus *Mycobacterium tuberculosis* kodierten.

Diese stellen bekannte Pathogenitätskriterien des *Mycobacterium-tuberculosis-Komplex* dar, die zum einen nicht im BCG-Impfstamm vorkommen und zum anderen *in vivo* eine starke T-Zell-Antwort erzielen können (Lalvani, 2001). Da intrazellulär exprimierte Proteine gewöhnlich entweder zytosolisch bleiben oder sezerniert werden, sollte der Expressionsvektor gleichzeitig zwei Lokalisierungskonstrukte des LAMP 1 enthalten. Diese sorgen für die Einschleusung des intrazellulär exprimierten Proteins in den HLA-Klasse-II-Weg, sodass nach Proteinexpression in der B-Zelle eine Epitoppräsentation an T-Helferzellen möglich ist.

Als Ausgangsplasmid diente *pcDNA 3.1(+)\NeoLAMP* (siehe Kapitel 2.1.5.1.), ursprünglich ein *pcDNA3.1(+)* Vektor, aus dem die Resistenz für Neomycin entfernt und in den bereits ein Fusionsgen aus zwei Regionen des LAMP 1 Gens einkloniert worden war. Diese Lokalisierungssequenz besteht aus einem Teil, der später den Transport aus dem Zytoplasma ins endoplasmatische Retikulum vermittelt und am 5'-Ende lokalisiert ist (83 Basenpaare) und einer zweiten Region (120 Basenpaare), welche die Weiterleitung des Proteins in das Lysosom vermittelt (Wu, 1995). Zwischen beiden Regionen des LAMP1 Gens befand sich eine *Bam* HI Schnittstelle.

Das zweite verwendete Plasmid *pET-22b(+)_esxAB* (siehe Kapitel 2.1.5.1.) enthielt bereits die Sequenzen von ESAT-6 und CFP-10 als Fusionsgen unter der Kontrolle eines CMV-*immediate-early*-Promotors. Das Gen von ESAT-6 trägt die Bezeichnung *esxA*, das von CFP-10 *esxB*, und das synthetische Fusionsgen *esxAB*. Mithilfe unterschiedlicher Primersequenzen (siehe Kapitel 2.1.5.2.) ließen sich hier in einer PCR Reaktion sowohl *esxA* als auch *esxAB* herausamplifizieren. Dabei wurden die PCR Produkte durch die verwendeten Primer an ihren Enden jeweils mit Restriktionsschnittstellen für *Bgl* II versehen. Anschließend wurden sie über diese in einen mit *Bam* HI (Basenpaar 930) linearisierten *pcDNA3.1(+)\NeoLAMP* -Vektor irreversibel eingeführt (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Da *Bam* HI und *Bgl* II Schnittstellen über eine identische Überlappungssequenz verfügen, war eine Ligation durchführbar, die Schnittstellen gingen damit allerdings jeweils verloren.

Die Überprüfung der korrekten Orientierung des Inserts im Plasmid erfolgte durch ein analytisches PCR-Verfahren. Lieferte dieses ein DNA-Fragment der erwarteten Größe, konnte von der erwünschten Lage des Inserts ausgegangen werden. Die Korrektheit des Inserts und der flankierenden Sequenzen wurde durch Sequenzierung (Firma Metabion®, Regensburg) bestätigt. Die anschließende großmaßstäbliche Produktion von endotoxinfreier Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma GeneArt, Regensburg.

Die auf diese Weise generierten Expressionsvektoren erhielten die Bezeichnung *pcDNA3.1(+)\neoLAMP_esxA* und *pcDNA3.1(+)\NeoLAMP_esxAB* (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). In dieser Arbeit werden sie als ESAT-6- bzw. ESAT-6/CFP-10-Expressionsvektoren bezeichnet. Als Negativkontrolle diente *pcDNA3.1(+)\NeoLAMP*, der nachfolgend als Leervektor bezeichnet wurde.

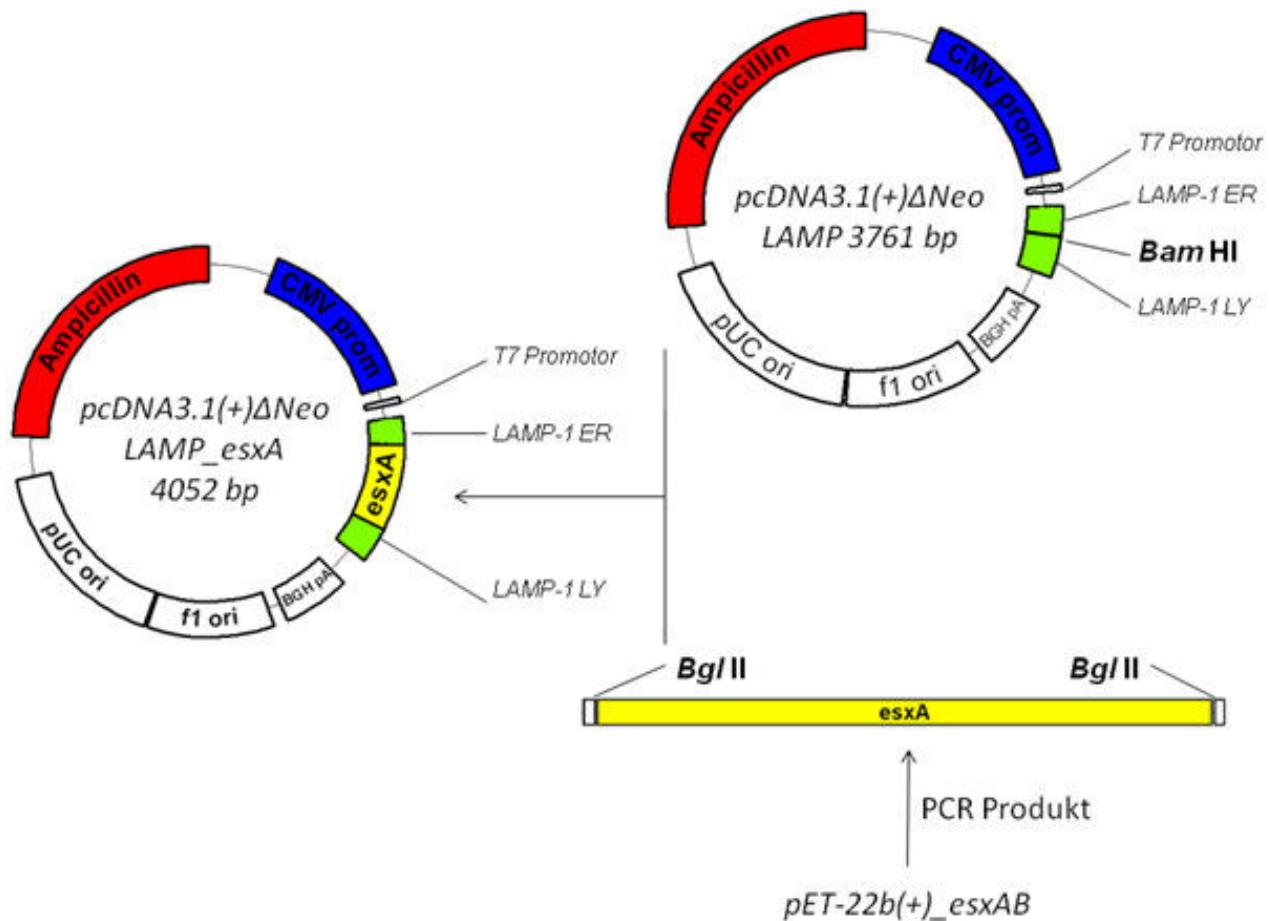


Abbildung 17: Klonierung eines Expressionsvektors für die intrazelluläre Synthese von ESAT-6 in Kombination mit Signalsequenzen zum Einschleusen des exprimierten Proteins in den HLA-Klasse-II-Prozessierungsweg.

EsxA, das Gen des Proteins ESAT-6 aus *Mycobacterium tuberculosis*, wurde zuerst durch eine PCR (Polymerasekettenreaktion) aus dem pET-22b(+)_esxAB Plasmid herausamplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten sowohl am 5' als auch am 3' Ende neben der Erkennungssequenz für esxA eine Schnittstelle für *Bgl* II. Das Konstrukt wurde durch einen Restriktionsverdau mit *Bgl* II geschnitten und in den mit *Bam* HI linearisierten pcDNA3.1(+)\DeltaNeoLAMP Vektor kloniert.

esxAB: Gen des ESAT-6/CFP-10 Fusionsproteins; Ampicillin: Gen für die β-Laktamase (vermittelt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin); CMV prom: Promotor des Cytomegalievirus; T7 Promotor: Promotor des Phagen T7, LAMP 1: Gen des Lysosom-assoziierten Membranprotein 1, ER: Signalsequenz des LAMP 1 für das Endoplasmatische Retikulum; LY: Signalsequenz des LAMP-1 für das Lysosom, BGH pA: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons ; f1 ori: Replikationsursprung des Phagen f1; pUC ori: Replikationsursprung des pUC Plasmids; ΔNeo: bezeichnet die Deletion des Resistenzgens gegen das Antibiotikum Neomycin.

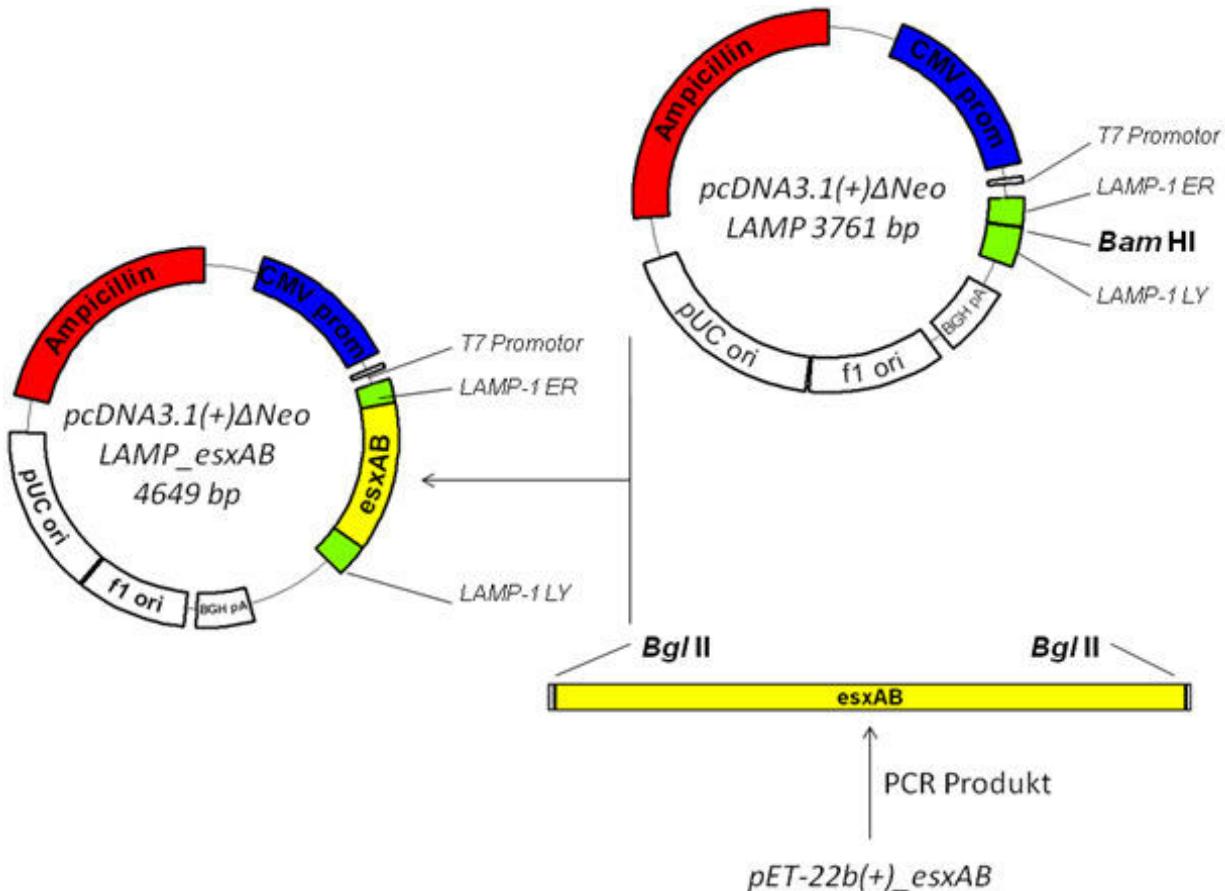


Abbildung 18: Klonierung eines Expressionsvektors für die intrazelluläre Synthese des ESAT-6/ CFP-10 Fusionsproteins in Kombination mit Signalsequenzen zum Einschleusen des exprimierten Proteins in den HLA-Klasse-II-Prozessierungsweg.

EsxAB, das Gen eines Fusionsproteins aus ESAT-6 und CFP-10 (beide aus *Mycobacterium tuberculosis*), wurde zuerst durch eine PCR Reaktion aus dem *pET-22b(+)_esxAB* Plasmid herausamplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten sowohl am 5' als auch am 3' Ende neben der Erkennungssequenz für *esxAB* die Schnittstelle für *Bgl* II. Das Amplifikat wurde durch *Bgl* II Restriktionsverdau geschnitten und in den mit *Bam* HI linearisierten *pcDNA3.1(+)\DeltaNeoLAMP* Vektor kloniert.

esxAB: Gen des ESAT-6/ CFP-10 Fusionsproteins; *Ampicillin*: Gen für die β-Laktamase (vermittelt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin); *CMV prom*: Promotor des Cytomegalievirus; *T7 Promotor*: Promotor des Phagen T7, *LAMP 1*: Gen des Lysosom-assoziierten Membranprotein 1, *ER*: Signalsequenz des *LAMP 1* für das Endoplasmatische Retikulum; *LY*: Signalsequenz des *LAMP 1* für das Lysosom, *BGH pA*: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons ; *f1 ori*: Replikationsursprung des Phagen f1; *pUC ori*: Replikationsursprung des pUC Plasmids; *\DeltaNeo*: bezeichnet die Deletion des Resistenzgens gegen das Antibiotikum Neomycin.

3.2.3. Funktionelle Charakterisierung des Transfektionssystems

3.2.3.1. Proteinexpression in PBMC

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob nach Transfektion von PBMC mit dem ESAT-6- oder dem ESAT-6/ CFP-10-Expressionsplasmid unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits* eine nachweisbare Proteinexpression stattfindet.

Hierzu wurden PBMC aus Vollblut (Proband 13) isoliert und anschließend 4×10^6 Zellen mit je 2 µg ESAT-6-Expressionsplasmid transfiziert (siehe Kapitel 2.2.3.9.). Die Zellen wurden nach der Transfektion sofort in einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in BZM ausgesäht und für 24 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Aliquots der Zellen und Überstände wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der gewünschten Proteine erfolgte mittels Western Blot unter Einsatz eines monoklonalen anti-ESAT-6 Antikörpers ab26246 (ESAT-6 antibody, Mouse monoclonal, ab26246, Abcam plc., Cambridge, England) sowie eines anti-Maus-AP-Antikörpers (Polyclonal Goat Anti-Mouse-Ab AP, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark, siehe Kapitel 2.2.4.2.1.).

In diesen Experimenten konnte nach Transfektion der Zellen mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits* weder in Zelllysaten noch im Kulturüberstand das ESAT-6 Protein nachgewiesen werden. Analog dazu war nach Transfektion mit dem ESAT-6/ CFP-10-Expressionsplasmid ebenfalls keine Expression nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte in der Kontrollspur 7 des Gels, welche mit rekombinant hergestelltem ESAT-6 Protein beladen wurde, ein Protein mit einer molaren Masse von ungefähr 6 kD nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19).

Somit induzierten die Plasmide ESAT-6 bzw. ESAT-6/ CFP-10 nach Transfektion in PBMC keine mittels Immunoblotting nachweisbare Expression des ESAT-6 bzw. ESAT-6/ CFP-10 Proteins.

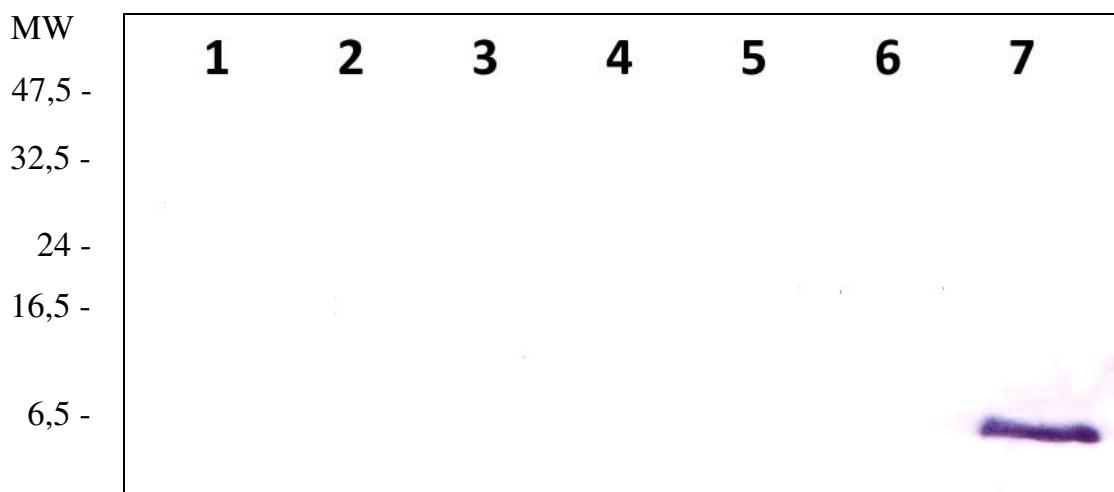


Abbildung 19: Expression des ESAT-6 Proteins in PBMC nach Transfektion mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits*.

4×10^6 PBMC wurden mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid unter Verwendung des Programms U15 transfiziert und für 12 Stunden kultiviert. Dann wurden alle Zellen des Kulturansatzes sedimentiert und in 20 µl Boiling-Mix aufgenommen. Von den Überständen wurden je 0,5 ml mit der Na-Doc-Methode ausgefällt und das Pellet anschließend ebenfalls in 20 µl Boiling-Mix aufgenommen. Alle so gewonnenen Proben wurden 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Je 20 µl Zellprobe (Spur 1: Leervektor transfiziert, Spur 2 und 3: ESAT-6-Expressionsplasmid transfiziert) und je 20 µl Überstandprobe (Spur 4: Leervektor transfiziert, Spur 5 und 6: ESAT-6-Expressionsplasmid transfiziert) wurden auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und unter

Verwendung eines Maus-anti-ESAT-6-Antikörpers (ab26246) und eines anti-Maus-AP-Antikörpers entwickelt. Spur 7: 0,5 µg rekombinantes ESAT-6 Protein, MW: Größenmarker, in kDa (ColorPlus Prestained Protein Marker P7709V, *Broad Range* (6,5-175 kDa), New England Biolabs, Ipswich, USA).

3.2.3.2. Proteinexpression in DG75-Zellen

Zur Überprüfung der Funktionalität der Plasmide wurden zudem Expressionsexperimente in der B-Zelllinie DG75 herangezogen.

Unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits* (Lonza, Köln) wurden DG75-Zellen mit dem ESAT-6- und dem ESAT-6/CFP-10-Expressionsplasmid transfiziert und anschließend in einer Konzentration von 2×10^6 /ml in DG75-Medium bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach 7, 24, 48 und 72 Stunden wurden Proben entnommen, Zellen und Überstände separat auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen, anschließend im *Wet-Blot* Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit der AP-Reaktion entwickelt (siehe Kapitel 2.2.4.2.2..)

Abbildung 20 zeigt das Ergebnis des Western Blots. Die Berechnung der Molekulargewichte von detektierten Proteinen erfolgte anhand der ermittelten Regressionsgerade ($MW = 10^{(1,2903x + 0,6921)}$, x = relative Laufstrecke, siehe Anhang D). Es zeigt sich, dass der verwendete Antikörper das als Positivkontrolle aufgetragene ESAT-6 Protein (Spur 18) erkannt hat. Es erscheint kurz unterhalb der 7 kD Bande des Markers und analog dazu im vorangehenden Blot in Abbildung 19 bei 6,5 kD. Angegeben war die molekulare Masse des rekombinanten Proteins mit 9,9 kD. Zu sehen ist ferner das ebenfalls als Positivkontrolle aufgetragene ESAT-6/CFP-10 Fusionsprotein (Spur 17). Es erscheint bei circa 19,6 kD, seine molekulare Masse war angegeben mit 21,21 kD. In den Spuren 1 bis 4, die ESAT-6-Expressionsplasmid transfizierte Zellen der Inkubationszeiträume 7, 24, 48 und 72 Stunden enthalten, ist ebenfalls Protein mit einer molaren Masse von 11,1 kD zu erkennen. Dieses Protein entspricht in seiner Größe in etwa dem erwarteten Molekulargewicht für ESAT-6 von 9,6 kD, im Vergleich zur Positivkontrolle in Spur 18 läuft es höher. Eine Erklärung für diesen Befund wäre, dass in den mit ESAT-6-Expressionsplasmid transfizierten Zellen synthetisiertes ESAT-6 zusätzlich die lysosomale Zielsequenz des LAMP 1 enthält. Diese hat ein Molekulargewicht von 4,3 kD, man würde also insgesamt ein Fusionsprotein von 13,9 kD erwarten.

Dagegen war in mit dem ESAT-6/CFP-10-Expressionsplasmid bzw. dem Leervektor transfizierten Zellen (Spuren 9 bis 12 bzw. 13 bis 16), sowie in allen getesteten Zellkulturüberständen (Spuren 5 bis 8: Überstände nach Transfektion mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid; weitere Daten nicht gezeigt) kein Protein nachweisbar.

Unter Verwendung von DG75-Zellen gelang zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden und in geringerem Ausmaß auch nach 7 Stunden nach Transfektion mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid ein immunologischer Nachweis des Proteins. Die Größe des nachgewiesenen Proteins spricht ebenfalls für das Vorliegen von ESAT-6. Der Nachweis signifikanter ESAT-6 Mengen zeigt sowohl die Funktionalität des produzierten Plasmids als auch des verwendeten Transfektionsverfahrens.

In DG75-Zellen war – wie zuvor in PBMC – keine detektierbare Expression von ESAT-6/CFP-10 Fusionsprotein zu beobachten.

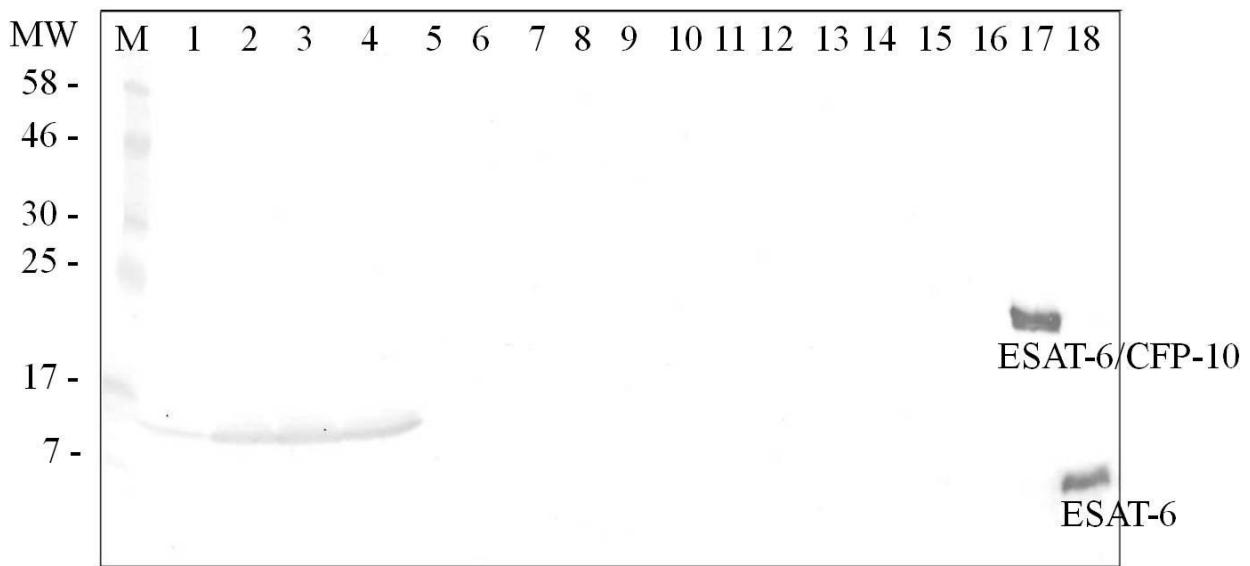


Abbildung 20: Expression des ESAT-6 Proteins in DG75 Zellen nach Transfektion mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits*.

Für die Transfektion (Programm U15) wurden je 4 µg Plasmid-DNA und 4 x 10⁶ Zellen eingesetzt, die anschließend in 2 ml DG75 Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubierten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 500 µl Zellsuspension entnommen. Die sedimentierten Zellproben wurden in 40 µl Boiling-Mix aufgenommen, die in den Überständen enthaltenen Proteine wurden mit Aceton ausgefällt und in 80 µl Boiling-Mix aufgenommen. Je 40 µl Zellprobe (Spuren 1: 7 h, 2: 24 h, 3: 48 h, 4: 72 h nach Transfektion mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid; Spuren 9: 7 h, 10: 24 h, 11: 48 h, 12: 72 h nach Transfektion mit dem ESAT-6/ CFP-10-Expressionsplasmid; Spuren 13: 7 h, 14: 24 h, 15: 48 h, 16: 72 h nach Transfektion mit dem Leervektor) und je 40 µl Überstandprobe (Spuren 5: 7 h, 6: 24 h, 7: 48 h, 8: 72 h nach Transfektion mit dem ESAT6-Expressionsplasmid) wurden auf einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, anschließend auf Nitrozellulosemembran geblottet, und unter Verwendung eines Maus-anti-ESAT-6-Antikörpers und eines Anti-Maus-AP-Antikörpers entwickelt. Spur 17: 0,5 µg rekombinantes ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein, Spur 18: 0,5 µg rekombinantes ESAT-6 Protein, MW: Molekulargewicht in kDa, M: Größenmarker (*Prestained Protein Marker P7708S, Broad Range (7-175 kDa)*, New England Biolabs, Ipswich, USA).

3.2.3.3. Vergleichende Untersuchung der Zellvitalität vor und nach Transfektion mit verschiedenen Plasmiden unter Verwendung des *Nucleofector®* Verfahrens

Um eine Beeinträchtigung der Zellvitalität durch toxische Wirkungen der verschiedenen Plasmide sowie des Transfektionsreagens *Human B Cell Nucleofector® Solution* zu untersuchen wurde in den folgenden Experimenten vergleichend die Gesamtzahl der PBMC vor sowie 24 Stunden nach Transfektion erfasst.

Dafür wurden wiederum PBMC aus heparinisiertem Vollblut (Probanden 37, 40) aufgereinigt, in einer definierten Zellzahl für Transfektionen mit verschiedenen Plasmiden eingesetzt und nach vierundzwanzigstündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ die Zellzahl jeder Probe erneut ausgezählt.

Abbildung 21 zeigt die Zellzahl Plasmid-transfizierter Proben (Säulen 3 bis 7) in % der Zellzahl aus den untransfizierten Vergleichsproben (Säulen 1) 24 Stunden nach Transfektion. Die Säulen 2 zeigen untransfizierte Proben, die nur mit der *Human B Cell Nucleofector® Solution* Transfektionslösung versetzt wurden (ebenfalls in % von den Säulen 1). Sie zeigen eine geringfügige Zellreduktion von 2,2 % bzw. 5,7 %. Betrachtet man die transfizierten Proben, fallen deutlich reduzierte Zellzahlen auf. Der Mittelwert der verbliebenen Zellen betrug für diese 38,0 % aus den ursprünglich eingesetzten. Ein Ausreißer ist Probe 3, Proband 40 mit einer nur gering reduzierten Zellpopulation von 77,9 %. In allen eingesetzten transfizierten Blutproben der Probanden war nach 24 Stunden ein vergleichbarer Abfall zu beobachten.

Dieser Versuch zeigte, dass sich infolge der Transfektion mit dem *Human B Cell Nucleofector® Kit* die Gesamtzahl der eingesetzten PBMC im Vergleich mit untransfizierten autologen PBMC auf durchschnittlich auf 38,0 % reduzierte..

Dagegen war nach Behandlung der PBMC mit der Transfektionslösung nur eine geringfügige Reduktion der Zellzahl im Vergleich mit der unbehandelten Zellkultur zu beobachten.

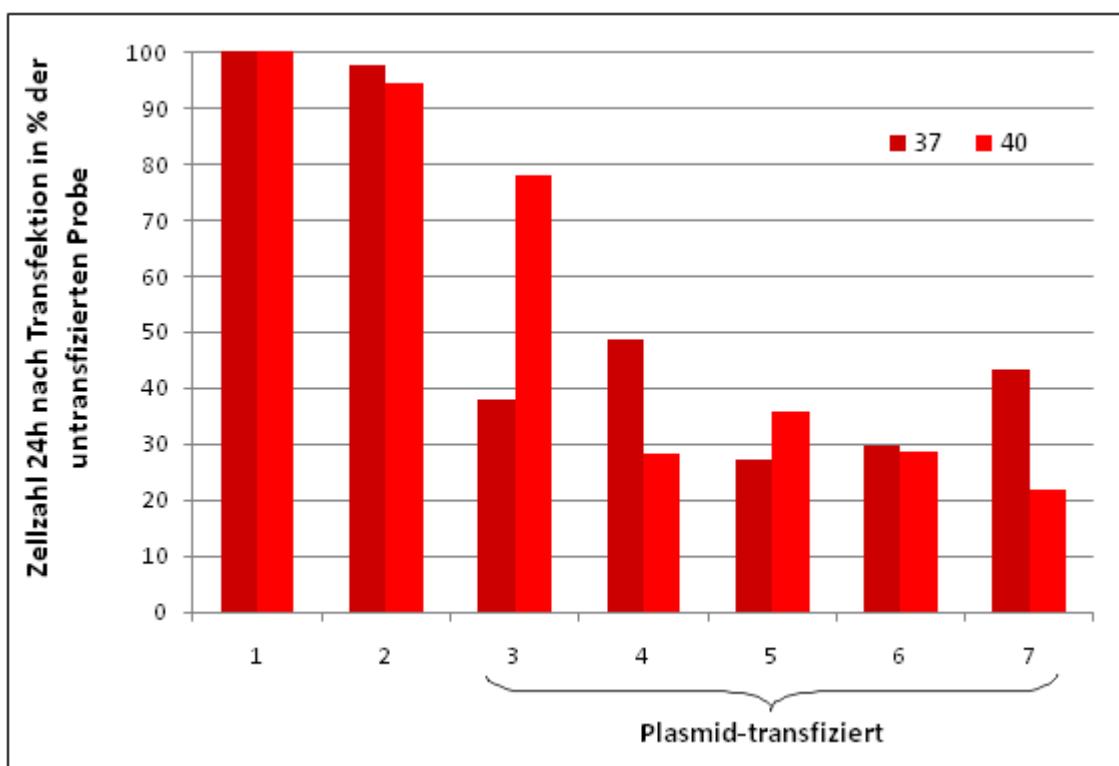


Abbildung 21: Überlebensrate von mittels des *Nucleofector®*- Verfahrens transfizierten und nicht transfizierten PBMC nach vierundzwanzigstündiger Kultur.

Zur Ermittlung der Zytotoxizität des Transfektionsverfahrens von Lonza wurde die Zellzahl 24 Stunden nach der Transfektion bestimmt. In gleicher Weise kultivierte untransfizierte und mit der *Human B Cell Nucleofector® Solution* Transfektionslösung behandelte Zellen dienten hierbei als Kontrollen. Pro Versuch wurden je 8 µg Plasmid DNA und 5 Millionen (Proband 37) bzw. 10 Millionen Blutzellen (Proband 40) eingesetzt. Das Diagramm zeigt die Zellreduktion der transfizierten Proben (Programm U15) im Vergleich

zu der untransfizierten Probe (Zellzahl 100 %). 1: untransfizierte Zellen, 2: mit Transfektionslösung versetzte, untransfizierte Zellen, 3: pcDNA3.1(+), 4: pcDNA3.1(+) Δ NeoLAMP, 5: pmaxGFP, 6: pcDNA3.1(+) Δ NeoLAMP_esxA, 7: pcDNA3.1(+) Δ NeoLAMP_esxAB.

Diese Untersuchungen zeigten sehr anschaulich, dass die Transfektion von PBMC mittels des *Nucleofector*[®] Verfahrens zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Vitalität sowie einer substantiellen Reduktion der Zahl der zur Transfektion eingesetzten Zellen führt. Die mit verschiedenen Plasmiden transfizierten Proben ergaben vergleichbare Ergebnisse. Somit befinden sich 24 Stunden nach erfolgter Transfektion im Durchschnitt nur etwas mehr als 30 % der eingesetzten Zellen in einem vitalem Zustand.

3.2.3.4. Stimulation von T-Helferzellen nach Transfektion mit ESAT-6- bzw. ESAT-6/ CFP-10-Expressionsplasmid in PBMC unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector*[®] Kits

Im folgenden Experiment sollte die Fähigkeit von mit Expressionsplasmid transfizierten PBMC eines akut an Tuberkulose erkrankten Probanden zur Reaktivierung darin enthaltener ESAT-6 respektive CFP-10 spezifischer T-Helferzellen getestet werden.

Dazu wurden mittels eines Ficoll-Gradienten PBMC aus frischem, heparinisiertem Vollblut gewonnen und jeweils 1×10^7 PBMC mit 8 μ g Plasmid DNA unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector*[®] Kit transfiziert. In diesen Versuchen konnten in den mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid transzulierten PBMC des Spenders nach einer sechzehnständigen Inkubation 0,09 % IFN- γ -produzierende T-Helferzellen nachgewiesen werden. Dagegen wiesen mit dem Vektor zur Expression von ESAT-6/ CFP-10 transfizierte PBMC nur 0,03 % IFN- γ produzierende T-Helferzellen auf.

Somit konnte gezeigt werden, dass sich mit ESAT-6 bzw. ESAT-6/ CFP-10-Expressionsplasmiden transfizierte APC prinzipiell zum durchflusszytometrischen Nachweis ESAT-6/ CFP-10-spezifischer T-Helferzellen eignen.

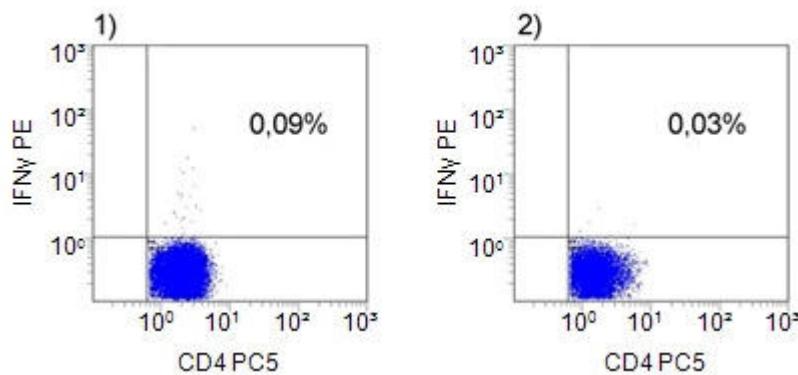


Abbildung 22: Zahl IFN- γ -produzierender T-Helferzellen in PBMC eines akut an Tuberkulose erkrankten Probanden nach einer spezifischen Restimulation mit ESAT-6 respektive ESAT-6/ CFP-10. Die Antigenbeladung der APC in PBMC zur spezifischen Stimulation der Th-Zellen erfolgte

durch Transfektion mit dem ESAT-6- und ESAT-6/ CFP-10-Expressionsplasmid unter Verwendung des Human B Cell Nucleofector® Kits.

Von einem an aktiver Tuberkulose erkrankten Probanden wurden pro Transfektion je 1×10^7 PBMC und 8 µg ESAT-6 bzw. ESAT-6/ CFP-10-Expressionsplasmid eingesetzt. Nach 16 Stunden Inkubationszeit wurde jedem Ansatz 10 µg/ml Brefeldin A zugefügt und die Proben für weitere 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurde in durchflusszytometrischen Untersuchungen der Anteil IFN-γ positiver T-Helferzellen bestimmt, gegatet wurde analog zu Abbildung 23. Die Abbildung zeigt jeweils die CD4⁺ Zellpopulation des Probanden, in Bild 1) wurden die PBMC mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid transfiziert, in Bild 2) mit jenem für ESAT-6/ CFP-10. Die Zahlen geben den prozentuellen Anteil IFN-γ produzierender T-Helferzellen an.

3.2.4. Etablierung eines Zellkulturmodells zur Optimierung des Nachweises antigenspezifischer T-Helferzellen

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurde nun das Stimulationssystem in frisch aufgereinigten PBMC auf ein Zellkulturmodell übertragen. Dieses Modellsystem beruht auf der Kokultivierung von antigenspezifischen, ex vivo expandierten T-Helferzellen mit Proteinbeladenen autologen PBMC. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass T-Zellen in diesem Modellsystem in definierten Konzentrationen eingesetzt werden können. Hierfür wurden ESAT-6/ CFP-10-spezifische Th-Zellen expandiert. Da ESAT-6 und CFP-10 zwei spezifische Proteine des *Mycobacterium-tuberculosis-Komplex* sind (Lalvani, 2001 und Jiang, 2009), wurde eine Kultur geschaffen, die antigenspezifische T-Zellen beider Proteine enthielt.

3.2.4.1. Expansion von ESAT-6/ CFP-10-spezifischen T-Helferzellen

Zunächst wurden ESAT-6/ CFP-10-spezifische T-Helferzellen expandiert. Hierfür wurden CD4⁺ Th-Zellen aus Blut eines Probanden (31) mit einer latenten Tuberkuloseinfektion aufgereinigt und wöchentlich mit bestrahlten, autologen, ESAT-6/ CFP-10 beladenen reifen dendritischen Zellen (mDC) stimuliert. Als Negativkontrolle diente eine T-Zell-Population, die regelmäßig mit bestrahlten, unbeladenen autologen PBMC kokultiviert wurde (siehe Kapitel 2.2.3.6.). Um den Prozentsatz ESAT-6/ CFP-10-spezifischer Th-Zellen zu ermitteln, wurde ein Aliquot der Zellkultur über Nacht in IL-2 freiem Medium kultiviert, um eine unspezifische Aktivierung der T-Zellen zur IFN-γ-Produktion zu vermeiden. Am nächsten Tag wurden diese Th-Zellen dann für 6 Stunden mit ESAT-6/ CFP-10-Fusionsprotein beladenen, bestrahlten autologen PBMC kokultiviert (siehe Kapitel 2.2.3.7.). Es folgte die intra- und extrazelluläre Färbung von Markern für eine durchflusszytometrische Analyse. Das Ergebnis dieser Charakterisierung ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Teilabbildungen 4), 5) und 6) zeigen die Th-Zellen der Restimulationsansätze zu den Zeitpunkten 2, 3 und 4 Wochen nach Beginn der Expansion. Der Anteil Antigen-spezifischer IFN-γ produzierender T-Helferzellen erscheint als Unterpopulation im rechten oberen Quadranten. Er stieg vom ersten Messwert 0,91 % 2 Wochen nach Beginn der Expansion sehr stark an auf 24,68 % zum Zeitpunkt 3 Wochen; 4 Wochen nach Beginn der Expansion, sank die Spezifität bereits wieder auf 12,75 %.

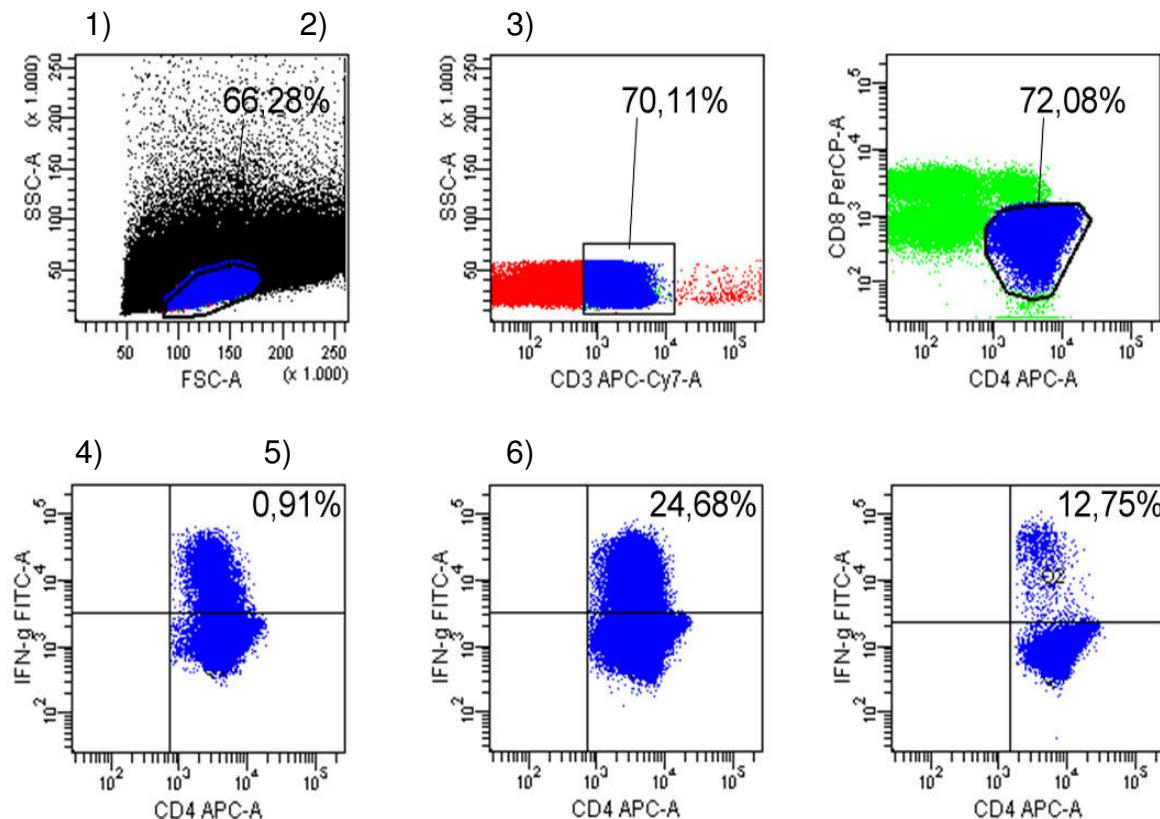


Abbildung 23: Analyse ex vivo expandierter ESAT-6/ CFP-10-spezifischer T-Helferzellen.

Aus dem Blut eines Spenders mit einer persistierenden Tuberkulose (Spender 31) wurden mittels Abreicherung CD4⁺ Th-Zellen isoliert und nachfolgend wöchentlich mit ESAT-6/ CFP-10 beladenen, bestrahlten reifen dendritischen Zellen desselben Spenders stimuliert. Als Negativkontrolle erfolgte die Kokultur von Th-Zellen mit unbeladenen, bestrahlungsinaktivierte PBMC. Zur Ermittlung des prozentualen Anteils ESAT-6-spezifischer T-Zellen in der Expansionskultur wurde zu den Zeitpunkten 2, 3, und 4 Wochen der Expansion eine spezifische Restimulation der T-Zellen mit ESAT-6/ CFP-10-beladenen, bestrahlten PBMC durchgeführt. Hierbei wurden je 1 x 10⁶ T-Helferzellen und 1 x 10⁶ PBMC in einem Gesamtvolumen von 1 ml und in Anwesenheit von 10 µg/ml ESAT-6/ CFP-10 für 6 Stunden im Wärmeschrank inkubiert. Die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch intrazelluläre IFN-γ Färbung ermittelt.

1), 2) und 3) zeigen das für die durchflusszytometrischen Messungen verwendete Gating Schema. 1) zeigt alle gemessenen Events der Probe, das Fenster begrenzt die Lymphozytenpopulation. 2) zeigt die Zellen der Lymphozytenpopulation, gegatet wurde die Gruppe der CD3⁺ Zellen. Aus dieser Population wurde in 3) der Anteil der CD4⁺ T-Helferzellen ermittelt. 4), 5) und 6) zeigen im oberen, rechten Quadranten die Fraktion der CD4⁺ Zellen, welche IFN-γ produzieren. Dabei stammen die Messungen 4), 5) und 6) der ESAT-6/ CFP-10-spezifischen CD4⁺ Th-Zell-Kultur jeweils von den Zeitpunkten 2, 3 und 4 Wochen nach Beginn der Expansion.

3.2.4.2. Restimulation spezifischer T-Helferzellen durch proteinbeladene bzw. mit Expressionsplasmid transfizierte APC

Ziel des folgenden Versuchs war die Abklärung, inwiefern sich ESAT-6-Expressionsplasmid transfizierte PBMC für eine Restimulation ESAT-6/ CFP-10-spezifischer T-Helferzellen eignen. Zum Vergleich wurde zur Stimulation ebenfalls das bereits etablierte Verfahren der Beladung von PBMC mit rekombinant hergestelltem Antigen durchgeführt.

Hierfür wurden ex vivo expandierte Zellen (Proband 38, latente Infektion) der ESAT-6/CFP-10 spezifischen Kultur nach dreiwöchiger Expansion (siehe Kapitel 2.2.3.7.) mit ESAT-6 gepulsten PBMC oder mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid transfizierten PBMC kokultiviert. Letztere waren 14 Stunden zuvor unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* transfiziert und zur Expression des Proteins im Brutschrank aufbewahrt worden. Es folgte die intra- und extrazelluläre Färbung von Zellmarkern für eine durchflusszytometrische Analyse, deren Ergebnis in Abbildung 24 dargestellt ist. Bild 1) und 2) zeigen das Ergebnis zweier Parallelansätze nach Stimulation durch transfizierte PBMC. In beiden Bildern ist keine Population IFN- γ -produzierender T-Helferzellen abgrenzbar. Bild 3) zeigt die Population der CD4 $^{+}$ Zellen des Ansatzes, der mit ESAT-6 beladenen PBMC stimuliert wurde. Hier konnten aus der ESAT-6/ CFP-10-spezifischen T-Helfer-Zellkultur 5,9 % ESAT-6-spezifische T-Helferzellen ermittelt werden.

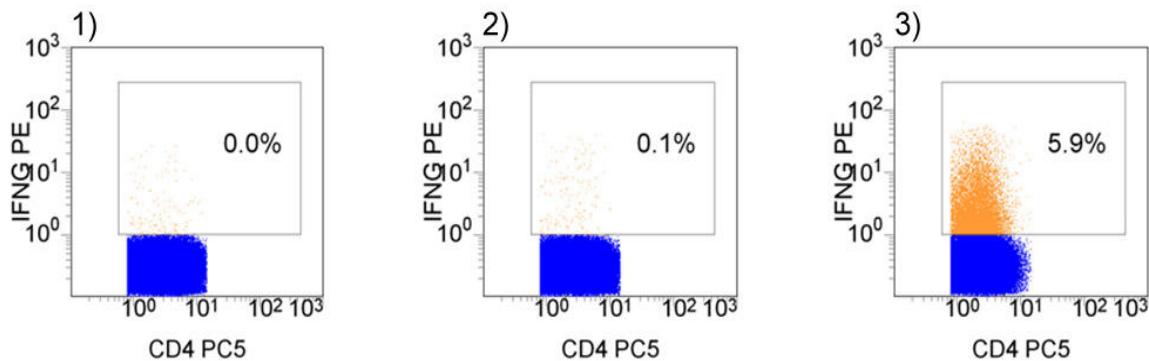


Abbildung 24: Vergleichende Analyse der Effizienz von unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits* ESAT-6-Expressionsplasmid transfizierten und mit ESAT-6 Protein stimulierten PBMC zur spezifischen Restimulation ESAT-6/ CFP-10 spezifischer T-Zellen.

Zur Expansion ESAT-6/ CFP-10-spezifischer T-Helferzellen wurden aus Spenderblut (Proband 38, latente Infektion) CD4 $^{+}$ Zellen isoliert, welche wöchentlich mit ESAT-6/ CFP-10 beladenen, bestrahlten reifen dendritischen Zellen desselben Spenders stimuliert wurden (siehe Kapitel 2.2.3.6.). Nach dreiwöchiger Expansion erfolgte eine Restimulation von jeweils 8×10^6 CD4 $^{+}$ Th-Zellen mit 8×10^6 PBMC für 6 Stunden im Brutschrank (siehe Kapitel 2.2.3.7.). Die Antigenpräsentation wurde in Bild 1) und 2) von PBMC übernommen, die 14 Stunden zuvor mit dem ESAT-6-Expressionsplasmid unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* (Programm U15) transfiziert worden waren. In 3) wurde zur Restimulation den PBMC und antigenspezifischen T-Zellen 10 μ g/ml ESAT-6-Protein zugegeben. Expansion und durchflusszytometrische Messung erfolgten analog zu Abbildung 18.

Diese Versuche zeigten, dass bei PBMC, die mit rekombinantem ESAT-6-Protein oder ESAT-6/ CFP-10-Fusionsprotein beladen worden waren, eine zuverlässige Stimulation von antigenspezifischen T-Helferzellen erfolgte. Bei Verwendung von ESAT-6-Expressionsplasmid transfizierten PBMC war dagegen keine spezifische Reaktion der T-Helferzellen induzierbar.

3.2.5. Proteinbeladung der APC in Vollblut

Nachdem in den vorangehenden Experimenten gezeigt werden konnte, dass rekombinant hergestelltes ESAT-6/ CFP-10- Fusionsprotein in der Zellkultur eine spezifische Stimulation der T-Helferzellen induziert, sollte in einem letzten Schritt untersucht werden, ob es sich auch für den Nachweis und die vergleichende Analyse ESAT-6/ CFP-10-spezifischer T-Zellen in Vollblut gesunder, latent und akut Tuberkulose infizierter Probanden eignet.

Dafür wurde heparinisiertes Vollblut von jeweils drei Spendern mit einer aktiven Infektion mit *M. tuberculosis* (1-3), einer latenten Tuberkulose (4-6) und von drei gesunden Spendern (7-9) für jeweils 6 Stunden mit rekombinantem ESAT-6/ CFP-10- Fusionsprotein inkubiert (siehe Kapitel 2.2.3.8.). Anschließend wurde sofort eine Färbung der oberflächlichen Zellmarker sowie von intrazellulärem IFN- γ durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5.4.). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen sind in Abbildung 25 dargestellt. In diesen Untersuchungen zeigten 2 der 3 Blutproben der Spender mit einer aktiven TB eine geringe (0,05 % und 0,09 %) und ein Spender eine deutliche Aktivierung IFN- γ produzierender T-Helferzellen (0,55 %). Im Vergleich dazu war in allen getesteten Blutproben von Spendern mit einer persistierenden TB eine geringe Zahl IFN- γ sezernierender T-Helferzellen nachweisbar (0,05-0,08 %). Im Gegensatz dazu waren in den Blutproben von gesunden Spendern keine (0,00 %) bzw. nur eine sehr geringe Zahl IFN- γ produzierender T-Helferzellen (0,01 %) nachweisbar.

Somit ließ sich aus diesem Experiment folgern, dass sich das Fusionsprotein ESAT-6/ CFP-10 sehr gut zum durchflusszytometrischen Nachweis ESAT-6/ CFP-10-spezifischer T-Zellen im Blut von Patienten mit einer aktiven und persistierenden Tuberkulose eignet. Allerdings wiesen latent und akut TB infizierten Probanden keine ausreichend signifikanten Unterschiede in ihrer Zahl IFN- γ produzierender T-Helferzellen auf, sodass die Bestimmung ESAT-6/ CFP-10-spezifischer IFN- γ produzierender T-Helferzellen hierfür keine Differentialdiagnostik von Stadien der Tuberkuloseerkrankung ermöglicht.

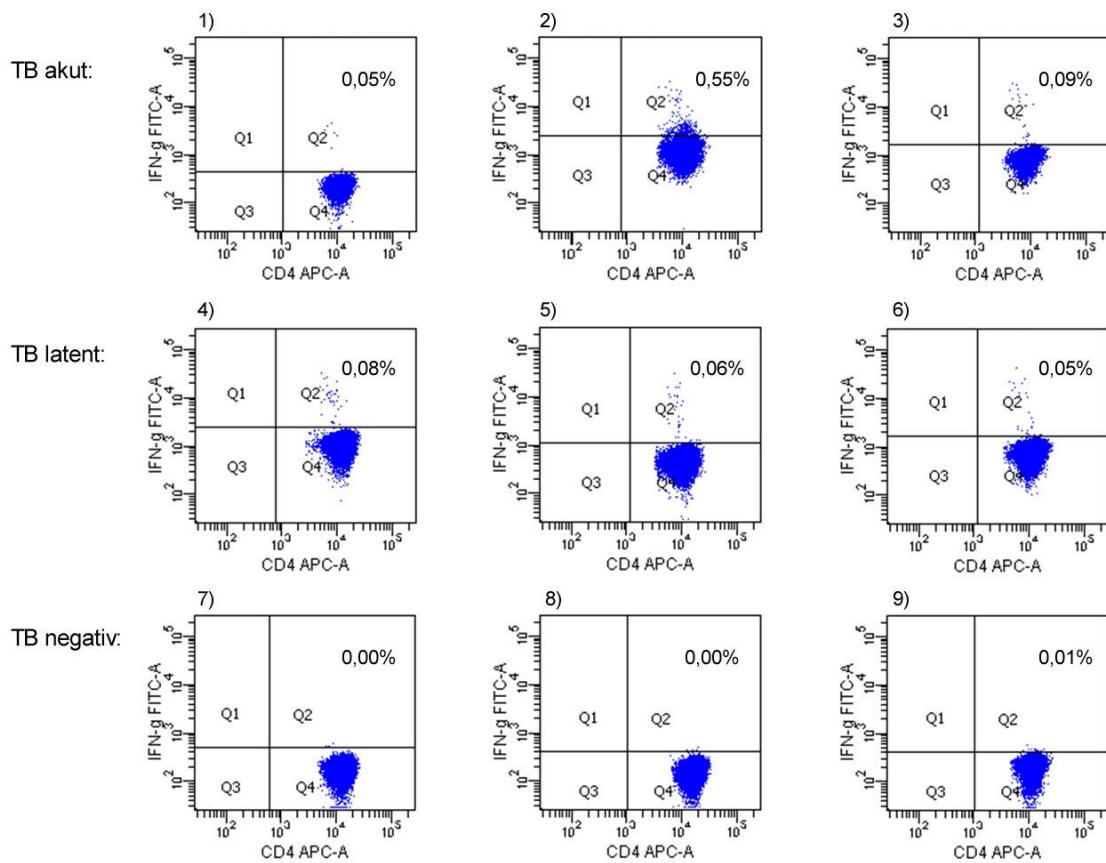


Abbildung 25: Vergleich der Zahl IFN- γ -produzierender T-Helferzellen in Vollblut TB-negativer Probanden sowie Patienten mit einer latenten und akuten Tuberkulose nach sechsständiger Stimulation mit ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein.

Von je drei Tuberkulose negativen Probanden (7: Proband 26, 8: Proband 37, 9: Proband 22) sowie Patienten mit einer latenten (4: Proband 24, 5: Proband 41, 6: Proband 25) oder akuten Tuberkulose (1: Proband 44, 2: Proband 42, 3: Proband 43) wurde je 1 ml Vollblut für 6 Stunden mit 10 μ g ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein stimuliert. Anschließend wurde in durchflusszytometrischen Untersuchungen der Anteil IFN- γ positiver CD4 $^{+}$ T-Helferzellen bestimmt. Die Abbildung zeigt jeweils die CD4 $^{+}$ Zellpopulation der Probanden, gegaget wurde wie in Abbildung 23 beschrieben.

4. Diskussion

4.1. Eignung des *Nucleofector®* Verfahrens zur Plasmidtransfektion in primäre B-Zellen

Ziel dieses Arbeitspakets war die Etablierung eines Verfahrens zur Antigenpräsentation auf primären B-Zellen als Grundlage für die Entwicklung einer neuen Technologie zur Diagnose akuter Tuberkuloseinfektionen basierend auf dem Prinzip der Reversen T-Zell-Technologie (RTT). Um eine optimale Präsentation ausgewählter Peptiden des *Mycobacterium-tuberculosis-Komplex* zu erreichen, wurde im Vergleich zur Beladung von PBMC mit rekombinantem Antigen die *Nucleofector®* Technologie von Lonza (ehemals Amaxa) zur Transfektion von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mit Expressionsvektoren getestet. Die Verwendung von Plasmid DNA wäre dem Einsatz von rekombinantem Protein aufgrund von hoher Stabilität sowie leichter und kostengünstiger Produktion unter reproduzierbaren Bedingungen vorzuziehen. Die Handhabung von DNA für Stimulationsexperimente gestaltet sich dagegen komplizierter, da sowohl die Transfektion der DNA als auch das Schaffen von optimalen Expressionsbedingungen in den Zellen erforderlich ist.

Durch bislang verfügbare Verfahren zur Transfektion von Plasmid DNA in primäre humane Zellen konnten stets nur geringe Transfektionsraten ermöglicht werden. Das *Nucleofector®* Verfahren wurde ausgewählt, da es aufgrund der Kombination aus Elektroporation und speziellen, zellspezifischen Transfektionspuffern im Vergleich zu den etablierten Techniken höhere Transfektionsraten zu ermöglichen vermag (Flanagan, 2011). Damit kann es als erstes Elektroporationsverfahren effizient in sich langsam teilenden primären Zellen genutzt werden (Gresch, 2004) und bei Verwendung der Substanzen des *Human B Cell Nucleofector® Kit* gleichzeitig die vornehmliche Transfektion von B-Zellen in PBMC ermöglichen. Es ist bekannt, dass die Transfektion von primären Zellen generell heikel ist (Jordan, 2008). Daher wurde in ersten Versuchsreihen die Transfektionseffizienz des *Nucleofector®* Verfahrens eingehend untersucht. Hierfür wurden PBMC aus humanem Vollblut aufgereinigt und unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kits* mit einem GFP-Expressionsplasmid transfiziert. In durchflusszytometrischen Analysen erfolgte anschließend die Spezifizierung der Zellen nach Oberflächenantigenen sowie GFP-Expression. Anhand dieser Ergebnisse konnte im Anschluss die Transfektionseffizienz für die verschiedenen Subpopulationen abgeschätzt werden.

Dabei zeigten sich von Anbeginn Schwierigkeiten bei der durchflusszytometrischen Auswertung, da die gewöhnlich anhand ihrer Morphologie differenzierbaren Subtypen der PBMC nach Transfektion nicht mehr voneinander abgrenzbar waren und nicht durch Fenster erfasst werden konnten. Es zeigte sich tendenziell eine Zunahme der Zellgröße. Mit Fenstern konnte nur zwischen lebenden und sicher toten PBMC in der Peripherie des Auswertungsfeldes differenziert werden. Somit konnte beispielsweise der Anteil einzelner Lymphozytenpopulationen nur durch Färbung mit fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern eruiert werden. Problematisch hierbei war wie sich in einigen Messungen

herausstellte (Daten nicht gezeigt) ein Verlust von zellspezifischem Oberflächenantigen, der Zielstruktur der fluoreszenzgekoppelten Antikörper, möglicherweise durch Internalisation. Dieses Phänomen wurde bisher insbesondere bei aktivierten T-Zellen beobachtet (Sleckman, 1992 und Petersen, 1992). Daher ist stets mit Messungenauigkeiten zu rechnen. Ursächlich für die morphologischen Veränderungen insbesondere der Größenzunahme der PBMC nach Transfektion mag die vorübergehende erhöhte Membranpermeabilität sein, die zu einem Aufquellen ähnlich dem apoptotischer Zellen führt. Laut Lonza führt die Transfektion durch ihre elektroporatorische Komponente zu einer zehn- bis fünfzehnminütigen Öffnung der Membranporen.

In den Untersuchungen bezüglich der Vitalität von transfizierten PBMC und anschließender Färbung der Zellen mit Propidiumjodid (PI) sieht man im durchflusszytometrischen Auswertungsfeld regelmäßig eine Population grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimierender PI negativer PBMC und einen Anteil PI positiver Zellen, die kein GFP exprimieren; es finden sich kaum doppelt positive Zellen. Bei Überlegungen muss man berücksichtigen, dass es sich bei den PI positiven, nicht GFP-exprimierenden Zellen wahrscheinlich ebenfalls um transfizierte Zellen handelt. Durch die Transfektion mögen Schäden entstehen, welche die Expression von GFP verhindern oder auch die Apoptose herbeiführen könnten.

4.1.1. Analyse von Transfektionsraten anhand der Expressionseffizienz von GFP in PBMC und deren Subpopulationen nach Anwendung des *Nucleofector®* Verfahrens

Der Vergleich der GFP Expressionsraten von PBMC und deren B-Zell-Subpopulation 24 und 41 Stunden nach Transfektion (siehe Kapitel 3.2.1.1.) ergab zum einen eine Reduktion der Expression von GFP in beiden Populationen zum späteren Zeitpunkt, zum anderen wurden Gesamt-PBMC stets effizienter transfiziert. Die Gruppe der GFP-exprimierenden PBMC verringert sich von Stunde 24 bis 41 um etwa 60 %, die B-Zellen darunter nur um 44 %. Dies spricht trotz insgesamt schlechterer Transfektionsrate für ein besseres Überleben der erfolgreich transfizierten B-Zellen.

Gründe für die reduzierte GFP-Expression nach 41 Stunden können sowohl im Transfektionverfahren selbst als auch in den verschiedenen verwendeten Reagenzien zu finden sein. Von GFP ist eine toxische Wirkung bekannt, die je nach Variante des GFP unterschiedlich ausgeprägt ist und zu einem bevorzugten Tod transfizierter und exprimierender Zellen führen kann (Miyawaki, 2011). Darunter gibt es auch toxische Wirkungen von durch GFP induzierten Sauerstoffradikalen die zumeist jedoch vernachlässigbar sind (Remington, 2006). Ebenfalls kommt es nach Transfektion von Plasmiden – insbesondere von solchen, die für nicht zelleigene Proteine codieren – häufig innerhalb von Stunden zu deren Inaktivierung. Ursächlich hierfür sind meist Bereiche der verwendeten Plasmid DNA mit einem hohen Gehalt an CG (Cytosin, Guanin) Dinukleotiden, sogenannten CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) Inseln. CpG Inseln finden sich typischerweise im Bereich von eukaryotischen Promotoren. Zum einen findet in diesen Bereichen bevorzugt eine Methylierung statt, die über ein *promotor-silencing* zum Sistieren

der Translationsprozesse führt, zum anderen stellt selbst ein hoher Gehalt von unmethylierten CpG Inseln einen Entzündungsreiz dar, weshalb Zellen die solche DNA enthalten rasch eliminiert werden (Kosovac, 2011 und Bestor, 2000). In Übereinstimmung hierzu konnten Yew *et al.* zeigen, dass Plasmide mit künstlich vermindertem CpG Gehalt über eine geringere Toxizität sowie eine erhöhte und verlängerte Expressivität verfügen (Yew, 2000 und Yew, 2002). Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide stehen sämtlich unter Kontrolle eines CMV *immediate-early*-Promotors. Die genaue Sequenz des im *Human B Cell Nucleofector® Kit* enthaltenen *pmaxGFP®*-Plasmid ist ein Firmengeheimnis. Der im ESAT-6 respektive ESAT-6/ CFP-10 Expressionsplasmid verwendete CMV *immediate-early*-Promotor hat einen geringen CpG Anteil von 9,7 %, sodass keine relevante Funktionseinschränkung zu erwarten ist. Das Vorliegen von CpG Inseln auf dem *pmaxGFP®*-Plasmid ist jedoch nicht auszuschließen und mag ein Grund für die teils geringe GFP-Expression sein.

Gründe für die im Vergleich zu den PBMC durchschnittlich geringere Expression von GFP in B-Zellen werden im Kapitel 4.1.2. diskutiert. Die verhältnismäßig höhere bleibende GFP Expressionsrate der B-Zellen nach 41 Stunden ist am ehesten auf den Zusatz von IL-4 im Kulturmedium (BZM) zurückzuführen. Dieses ist ein starkes Stimulans für das Überleben der B-Zellen und bewirkt deren Ausreifung zu Plasmazellen. Gleichzeitig hemmt es insbesondere zytotoxische T-Zellen und Makrophagen – und damit einen Großteil der PBMC – sowohl direkt als auch durch Antagonisierung der T-Zell-Stimulanzien IL-10 und IFN- γ (Romagnani, 1996).

Laut Lonza liegt das GFP-Expressionsmaximum von B-Zellen in PBMC zwischen 24 und 48 Stunden nach Transfektion mit dem *pmaxGFP®*-Plasmid. Dies ist vereinbar mit unseren Ergebnissen, das Expressionsmaximum sollte sich also zwischen 24 und 41 Stunden nach Transfektion befinden. Die Gruppe um Xinxin Zhao veröffentlichte kürzlich ihre Ergebnisse bei Verwendung des *Nucleofector®*-Verfahrens zur Transfektion von PBMC des Schweines. Sie zeigten dabei eine maximale GFP-Expression in 35 % bis 39 % der T-Zellen im PBMC-Gemisch zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion mit dem *pmaxGFP®*-Plasmid (Zhao, 2011).

Ein weiterer Aspekt der Ergebnisse dieser Messreihen ist die teils große Heterogenität der GFP-Expressionsraten in PBMC. Dabei findet sich eine solche Expressionsvariabilität sowohl in PBMC unterschiedlicher Probanden als auch in Parallelmessungen aus gleichem Spenderblut. Besonders hervor stechen diesbezüglich die B-Zellen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion mit einer GFP-Expressionsrate der PBMC von minimal 2,4 % und maximal 43,1 %.

4.1.2. Analyse der Vitalität und GFP-Expression von PBMC und ihren Subpopulationen bei Anwendung verschiedener Transfektionsprogramme des *Nucleofector®*

In Kapitel 3.2.3.3. ist dargestellt, dass die Transfektion von PBMC selbst zu einer Reduktion der Zellzahl auf durchschnittlich 38 % des Ausgangswerts führt. In diesem Experiment konnte auch gezeigt werden, dass diese zellreduktive toxische Wirkung

unabhängig von den verwendeten Plasmiden eintritt und nur zu einem vernachlässigbar geringen Anteil auf die Transfektionslösung zurückzuführen ist. Da sich die transfizierten Proben in ihrem Anteil an vitalen Zellen untereinander nur geringfügig unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass die Toxizitäten der eingesetzten Plasmide und Inserts (GFP, ESAT-6, CFP-10, LAMP) vergleichbar sind. Inwiefern sich die Expressivität der Plasmide unterscheidet, lässt sich auf diese Weise jedoch nicht beurteilen. Einen ähnlichen Befund erhoben auch Gresch *et al.*, die bei Transfektion primärer B-CLL (B-Zellen von an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Probanden) unter Verwendung des gleichen Verfahrens einen Zellverlust von 40 % beobachteten (Gresch, 2004).

In weiteren Experimenten wurden drei verschiedene Transfektionsprogramme miteinander verglichen und deren Einfluss sowohl auf eine effiziente GFP-Expression der PBMC und deren Subpopulationen als auch auf die Vitalität der nach Transfektion verbleibenden Zellen untersucht. Das Programm U20 erwies sich dabei im Vergleich zu den anderen beiden getesteten als signifikant effizienter bezüglich Induktion der GFP-Expression in PBMC nach Transfektion. Ebenso verhielt es sich bei alleiniger Betrachtung des T-Zell-Anteils der PBMC, von ihm wurde im Vergleich zu Transfektionen mit den Programmen U15 und M30 bei Verwendung von U20 signifikant effizienter GFP exprimiert. Der B-Zell-Anteil der PBMC zeigte ebenso nach Transfektion mit U20 im Median eine gegenüber den Programmen M30 und U15 effizientere GFP-Expression. Das Programm U15 schnitt bezüglich der GFP-Expression am schlechtesten ab. Dies steht im Widerspruch zu den Nutzungsempfehlungen von Lonza, für die Transfektion von B-Zellen in PBMC unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector® Kit* stets Programm U15 zu nutzen. Laut Lonza sind die Unterschiede zwischen den Transfektionsprogrammen zur Elektroporation Firmengeheimnis und beruhen wohl hauptsächlich auf einer Variabilität der Spannung sowie Impulsdauer. Zusätzlich kommt vor jeder Transfektion als Trägersubstanz und Komponente der Lipofektion eine Transfektionslösung hinzu (in unserem Fall die *Human B Cell Nucleofector® Solution*), deren Zusammensetzung zellspezifisch variiert und ebenso geheim ist (Flanagan, 2011).

Bei Betrachtung der Vitalität der PBMC Populationen mittels PI-Färbung 41 Stunden nach Transfektion verhielt es sich genau umgekehrt. So betrug der Anteil vitaler Zellen nach Verwendung von Programm U15 im Median 74,0 % (bei Programm M30 69,3 %, bei Programm U20 61,1 %). Eine erneute Messung der Vitalität 24 Stunden nach Transfektion mit Programm U15 ergab einen Anteil vitaler Zellen von 87,3 % (Median). Insofern beruht die Empfehlung von Lonza Programm U15 zu verwenden wahrscheinlich auf der signifikant verbesserten Vitalität der transfizierten Zellen im Vergleich zu den Programmen U20 und M30. Diese Befunde decken sich in etwa mit den Ergebnissen von Gresch *et al.*, die nach Transfektion von primären B-CLL-Zellen unter Verwendung des *Nucleofector®-Verfahren* unter den verbleibenden Zellen eine Rate von 9,5 % PI positiven, also toten Zellen fanden (Gresch, 2004).

Bei allen drei Programmen exprimierte der T-Zell-Anteil der PBMC 41 Stunden nach Transfektion prozentual signifikant mehr GFP als der B-Zell-Anteil. Dies steht im Widerspruch zu unseren Erwartungen an das *Human B Cell Nucleofector® Kit*, welches zur Transfektion von B-Zellen in frisch aufgereinigten PBMC geeignet ist und laut Lonza dabei

B-Zell-Transfektionsraten von etwa 35 % erreicht (Lonza, *Optimized Protocol for Human B Cells*). Unter Verwendung von Programm U20 konnte im Rahmen dieser Arbeit einmalig eine B-Zell-Transfektionsrate von maximal 19,05 % erreicht werden, im Median 9,0 %. Weshalb T-Zellen anteilig stets besser transfiziert wurden ließ sich nicht klären, es ist jedoch bekannt dass sowohl primäre NK-Zellen als auch B-Lymphozyten aus bislang ungeklärten Gründen durch gängige Methoden nahezu nicht transfizierbar sind (Goffinet, 2006 und Trompeter, 2003).

Dass unter Verwendung der *Nucleofector®*-Technologie trotz Verwendung von Kits mit zellspezifischer Transfektionslösung alle lymphozytären Zellen (NK, B- und T-Zellen) transfiziert werden, zeigten auch Goffinet und Keppler. Sie erzielten nach zellspezifischer Stimulation von primären B-, T- und NK-Zellen aus Ratten und Transfektion mit dem *Human Nucleofector® T Cell Kit* in allen beteiligten Zellen Transfektionserfolge, davon in nicht T-Zellen anteilig bis zu 38 % (Goffinet, 2006).

4.1.3. Versuche zur Analyse und Optimierung der Transfektionseffizienz und Proteinexpression in humanen B-Zellen

In weiteren Versuchen wurde speziell noch einmal auf die Transfektionseffizienzen in B-Zellen eingegangen. Es zeigte sich, dass die GFP-Expressionsrate der B-Zellen nach Transfektion unabhängig vom Anteil der B-Zellen an den Gesamt-PBMC ist (siehe Kapitel 3.2.1.4.). In frisch aus PBMC aufgereinigten primären B-Zellen blieb in einem Zeitverlauf über 72 Stunden die GFP-Expressionsrate stets unter 1 % mit einem Tiefpunkt von durchschnittlich 0,1 % zum Zeitpunkt 72 Stunden (siehe Kapitel 3.2.1.5.). Obwohl in dem als Kulturmedium eingesetzten BZM B-Zell-Stimulanzien enthalten sind, zeigte sich die Expressivität der isolierten B-Zellen stark reduziert. Dies ist wohl am ehesten im Zusammenhang mit einem Mangel an Stimulation durch Mediatoren und andere Zellen zu sehen, die den B-Zellen in Vorversuchen als Subpopulation der PBMC stets zur Verfügung gestanden haben und konsekutiv wohl für die höhere Expressivität verantwortlich gewesen sind. Solche in diesem Fall jedoch minderstimulierte, ruhende Zellen werden beispielsweise nicht zur Bildung von Transkriptionsfaktoren angeregt, ein Großteil ihrer Translationsenzyme befinden sich im dephosphorylierten, inaktiven Zustand weshalb solche Zellen auf RNA-, DNA- und Proteinebene nur zu einer reduzierten Aktivität fähig sind (Singh, 2009).

Ein weiterer Grund für die unzureichende Proteinexpression der primären B-Zellen mag in der Aufreinigung unter Verwendung des *B Cell Isolation Kit II®* liegen, welches den Zellen möglicherweise ebenfalls Schaden zufügen kann. Gresch *et al.* konnten im Widerspruch dazu allerdings zeigen, dass durch das Miltenyi-Verfahren aufgereinigte CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen für Transfektionen unter Verwendung des *Nucleofector®*-Verfahrens geeignet sind. Sie führten nach Anreicherung der CD34⁺ Zellen eine eintägige Stimulation mit IL-3, IL-4 und Stammzellfaktor durch und erzielten anschließend Transfektionsraten von über 70 % (Gresch, 2004). Dabei muss man jedoch berücksichtigen, dass Stammzellen im Gegensatz zu ausdifferenzierten B-Lymphozyten über eine höhere Plastizität verfügen.

In einem analogen Versuch – jetzt mit DG75 Zellen, einer B-Zelllinie aus einem Burkitt Lymphom – konnten im Zeitverlauf von 7 bis 72 Stunden nach Transfektion stetig steigende GFP-Expressionsraten gemessen werden (Anteil GFP-exprimierender Zellen nach 7 Stunden: 34,1 %, nach 72 Stunden: 49,5 %). Da im Versuchsaufbau lediglich die eingesetzten Zellen und deren Medium verändert wurden, ist eine alleinige derart verbesserte Transfektionseffizienz unwahrscheinlich. Das DG75-Zellen – maligne entartete Tumorzellen – im Vergleich zu aufgereinigten primären B-Zellen so effizient das Protein des transfizierten Plasmids synthetisieren mag vor allem daran liegen, dass sie als Tumorzellen zum einen von der Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Zytoskelettketten sowie anderen Zellen entkoppelt sind, zum anderen besitzen sie eine veränderte Promotoraktivität und modifizierte Transkriptionsfaktoren.

4.2. Herstellung von ESAT-6 respektive ESAT-6/ CFP-10 Expressionsplasmiden

Zunächst wurden Vektoren zur Expression der *M. tuberculosis* Proteine ESAT-6 und CFP-10 in humanen Zellen hergestellt. Diese Proteine wurden gewählt, da sie bei Infektion *in vivo* unabhängig von genetischen Faktoren (HLA Komposition) der infizierten Person eine starke T-Zell-Antwort induzieren (Lalvani, 2001). Ferner sind sie nicht im BCG Impfstamm enthalten und Bestandteil der Vertreter des humanpathogenen *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (Lalvani, 2001, Ahmad, 2011). Als Basisvektor diente *pcDNA 3.1(+)* Δ *NeoLAMP*, ein durch Deletion von Promotor und Gen für die Neomycinresistenz um 1905bp verkleinertes *pcDNA 3.1(+)* Plasmid, das bereits ein Konstrukt aus zwei Regionen des LAMP 1, einem membranständigen lysosomalen Glykoprotein, enthielt. Die N-terminale Translokationsdomäne (AS 1-28) erwirkt eine Translation des vom Vektor codierten Proteins ins ER, dessen Weitertransport in das Lysosom wird durch die lysosomale Adressierungssequenz (AS 378-417) des LAMP1-Proteins ermöglicht. Dort kann dann im endolysosomalen Abbau die Prozessierung des exprimierten Antigens sowie die Beladung von MHC-II-Proteinen mit den erzeugten Epitopen erfolgen (Wu, 1995). Die Funktionalität dieses Lokalisierungskonstrukts konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden (Uchiyama, 2002 und de Arruda, 2004). Zwischen die beiden funktionellen Sequenzen des LAMP 1 Konstrukts wurden die Gene von ESAT-6 respektive ESAT-6/ CFP-10 eingefügt (*pcDNA3.1(+)* Δ *NeoLAMP_esxA*, 4052 bp und *pcDNA3.1(+)* Δ *NeoLAMP_esxAB*, 4649 bp). Neben der Verfügbarkeit eines effizienten Transfektionsverfahrens wird der Erfolg des Plasmidtransfers maßgeblich von der Reinheit (Zhao, 2011), Zustandsform und Größe des Expressionsplasmids bestimmt. Die für Transfektionsexperimente vorteilhafte Zustandsform ist *supercoiled* DNA, eine zu kompakter Größe mit sich selbst verdrillte Helix, wie sie auch natürlicherweise in Zellkernen vorkommt. Im Bereich der Gentherapie setzen insbesondere Forscher die mit nicht viralen Methoden zum Plasmidtransfer arbeiten auf die Optimierung dieser Eigenschaft. So schufen Crouzet *et al.* *supercoiled minicircles*, verkleinerte Plasmide die auf ihren therapierelevanten Expressionsapparat reduziert worden waren und für die Transfektion ebenfalls *supercoiled* vorlagen (Crouzet *et al.*, 1997). Bloquel und Fabre zeigten 2004 in Experimenten mit murinen Muskelzellen, dass die Transfektionseffizienz umgekehrt proportional zur Vektorgröße ist. Gresch *et al.* konnten ebenfalls unter

Verwendung der *Nucleofector®*-Technologie mit einem Plasmid von 14,7 kbp Größe nur Transfektionsraten von 5 % in B-CLL-Zellen erreichen. Im Vergleich wurden jedoch zwei Vektoren mit einer Größe von 1,6 kbp und 4,6 kbp zu 43,0 % bzw. 38,3 % – und damit achtmal häufiger – transfiziert (Gresch, 2004). Die hier generierten Expressionsplasmide bieten mit einer Größe von unter 5000 bp und anschließender hochwertiger Vervielfältigung und Aufreinigung durch die Firma GeneArt® also optimale Arbeitsbedingungen.

4.3. Expression von ESAT-6 in humanen Zellen

In PBMC konnte nach Transfektion mit den Expressionsplasmiden unter Verwendung des *Nucleofector®* Verfahrens in Western Blot Analysen keine ESAT-6 respektive ESAT-6/CFP-10 Synthese nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.3.1.). Im analogen Versuch mit DG75-Zellen war lediglich in den mit ESAT-6 Expressionsplasmid transfizierten Zellen in Western Blot Analysen Protein nachweisbar. Die als Positivkontrolle aufgetragenen rekombinanten Proteine ESAT-6 (9,9 kD) und ESAT-6/CFP-10 (21,21 kD) bandierten entsprechend einer molekularen Masse von 6,5 kD und 19,6 kD. Nach Transfektion mit dem ESAT-6 Expressionsplasmid in DG75 Zellen ließ sich in Zellproben zu den Zeitpunkten 7, 24, 48 und 72 Stunden ESAT-6 unter Verwendung eines Anti-ESAT-6-Antikörpers bei einer molekularen Masse von 11,1 kD nachweisen. Neben diesen visualisierten Banden war kein weiteres Protein in den Spuren nachweisbar.

Bei Betrachtung der Positivkontrollen zeigt sich, dass die Laufweite der Proteine nicht ihrem erwarteten Molekulargewicht entspricht. Ursächlich für dieses unerwartete Laufverhalten im Gel kann eine spezifische Proteinfaltung oder SDS-Bindung sein. In Entsprechung dazu kann man das bei 11,1 kD detektierte Protein als Fusionsprotein aus ESAT-6 und der lysosomalen Zielsequenz des LAMP 1 Proteins (4,3 kD) interpretieren welches man bei 13,9 kD erwarten würde. Es erscheint somit genauso wie die Positivkontrollen bei einer geringeren molekularen Masse als erwartet. Ebenso kann sich dahinter auch intrazellulär synthetisiertes ESAT-6 (9,6 kD) verbergen, welches durch sein Laufverhalten auf dem Western Blot größer als erwartet erscheint. Die scharfe Begrenzung der Banden aus DG75-Zellproben bei 11,1 kD zu vier Zeitpunkten zeigt jedoch, dass es sich bei dem detektierten Protein stets um das selbe, gleichgroße Protein handelt.

Die Chimäre ESAT-6/CFP-10 konnte in keiner Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Grund hierfür kann eine stärkere toxische Wirkung von CFP-10 sein, wobei in Kapitel 3.2.3.3. im Vergleich zu den übrigen verwendeten Plasmiden keine signifikant reduzierte Zellvitalität nachgewiesen werden konnte. Bekannt ist jedoch, dass es durch ein toxisches Protein zu einer schnellen und effizienten Elimination der exprimierenden Zellen kommen kann. Ferner ist aufgrund des um rund 600 bp größeren Vektors mit einer reduzierten Transfektionseffizienz zu rechnen. Für die erfolglose ESAT-6 und ESAT-6/CFP-10 Expression in PBMC mag ebenso eine verglichen mit GFP toxischere Wirkung der codierten Proteine ursächlich sein.

Nach Antigensynthese und -prozessierung in den transfizierten primären Zellen kann es zu einer Spaltung der Proteine für die Epitoppräsentation kommen, ebenso könnten die

fremden Polypeptide durch Degradation und lysosomalen Abbau rasch eliminiert werden, weshalb der Proteinnachweis möglicherweise misslingt.

Eine primär schwache Aktivität ist beim verwendeten CMV *immediate early* Promotor grundsätzlich nicht anzunehmen, da bereits mehrere Arbeitsgruppen dessen hohe Effizienz in verschiedenen Säugerzellen zeigen konnten (Boshart, 1985 und Nelson, 1987). Das die ESAT-6 Proteinexpression in DG75-Zellen gelang, kann wohl am ehesten durch die erhöhte Zellteilungs- und Proteinsyntheseaktivität der maligne entarteten Lymphomzellen erklärt werden.

4.4. Untersuchung von ESAT-6 spezifischen Zellantworten

In Stimulationsexperimenten wurde vergleichend untersucht, wie gut sich Plasmidtransfizierte PBMC und Proteine zur Erzeugung einer CD4⁺-T-Zell Reaktion in Blutproben sowie in Kulturen ESAT-6/ CFP-10 spezifischer T-Zellen eignen. Dazu wurden nach einer bestimmten Inkubationszeit jeweils IFN- γ produzierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in durchflusszytometrischen Verfahren erfasst.

Im ersten Modellversuch *ex vivo* wurde durch repetitive Antigenstimulation eine über Wochen expandierende ESAT-6/ CFP-10 spezifische CD4⁺ T-Zellkultur erzeugt. Diese Zellen wurden gemeinsam entweder mit Expressionsplasmid transfizierten oder proteinbeladenen autologen PBMC inkubiert und währenddessen stimuliert, sodass im Anschluss die Frequenz spezifisch zur Produktion von IFN- γ angeregten CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden konnte. Hierbei wiesen die mit rekombinantem Protein beladenen PBMC signifikant bessere stimulatorische Eigenschaften auf als plasmidtransfizierte PBMC (siehe Kapitel 3.2.3.4. und 3.2.4.).

Mit transfizierten PBMC stimulierte, autologe CD4⁺ T-Zellen der Expansionskultur produzierten nur zu 0,1 % IFN- γ , die mit proteinbeladenen PBMC waren zu 5,9 % IFN- γ positiv. In einem anderen Versuch wurden Gesamt-PBMC eines akut an TB erkrankten Probanden transfiziert, und anschließend die Rate IFN- γ produzierender T-Helferzellen ermittelt. Nach Transfektion mit dem ESAT-6 Expressionsplasmid wurden 0,09 % IFN- γ positive CD4⁺ Zellen erfasst, analog nach Anwendung des ESAT-6/ CFP-10 Expressionsplasmid 0,03 %. Die Negativkontrolle mit Verwendung von gesundem Spenderblut ergab 0,1 % IFN- γ positive CD4⁺ Zellen (Daten nicht gezeigt).

Ursächlich für die mangelhafte T-Zell-Stimulation durch transfizierte PBMC mag zum einen die geringe Proteinexpressionsrate nach Transfektion sein (die GFP-Expressionsrate der B-Zellen in PBMC beträgt nach 24 Stunden durchschnittlich 11,18 %). Gründe hierfür sind eine wechselhafte Transfektionseffizienz der Plasmide unter Verwendung des *Nucleofector*[®] Verfahrens sowie eine wohl geringe Translation der Gene in primären Zellen. Ein anderer Faktor, der die Zytokinexpression der Zellen beeinflusst, ist das dem BZM zugesetzte IL-4, welches ein starkes B-Zell Stimulans ist und deren CD40 Expression steigern kann. Es gibt jedoch Ergebnisse die zeigen, dass unter der Wirkung von IL-4 die IFN- γ Produktion der T-Zellen unangemessen sinken kann (Van der Meide, 1996 und Romagnani, 1996). Als weiterer Faktor mag sich der Transfektionsreiz durch Zellschädigung und funktionelle Beeinträchtigung auf alle PBMC Subpopulationen

auswirken, weshalb auch die T-Zellen in ihren Fähigkeiten zur Antigenerkennung und –prozessierung sowie zu ihrer IFN- γ Syntheseaktivität möglicherweise gestört sein können. Ferner mag durch den Transfektionsreiz auch das fein regulierte Zusammenspiel der verschiedenen Zellpopulationen aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Dies wäre auch eine Erklärung für den hohen Anteil IFN- γ produzierender T-Zellen in der Negativkontrolle. Im Widerspruch hierzu stehen jedoch die Ergebnisse von Zhao *et al.*, die kürzlich 24 Stunden nach Transfektion von PBMC aus Schweinen mit dem *Nucleofector*[®] die CD25, CD69 und IFN- γ mRNA-Spiegel bestimmten und keinen signifikanten Unterschied zu untransfizierten T-Zellen feststellen konnten.

Ebenso konnten sie nach Stimulation mit Concanavalin A eine vergleichbare Vermehrung und Aktivierung transfizierter respektive untransfizierter PBMC nachweisen. Daher kann man zum einen davon ausgehen, dass die PBMC durch die Transfektion nicht unspezifisch aktiviert werden, zum anderen wurde die unbeeinträchtigte Funktionalität der T-Zellen nach Transfektion gezeigt (Zhao, 2011). Diese Daten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Hier konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass nach Transfektionen von PBMC in einem signifikanten Anteil der Zelltod eintrat. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine massive Beeinträchtigung der Zellvitalität durch das Transfektionsverfahren.

Der Modellversuch mit der ESAT-6/ CFP-10 spezifischen T-Helfer-Zellkultur zeigt die Überlegenheit der Restimulation durch mit rekombinantem Protein beladene PBMC respektive mit Expressionsplasmid transfizierte PBMC. Während der Inkubation von PBMC mit dem rekombinanten Protein spielen wahrscheinlich Monozyten die Hauptrolle bezüglich Phagozytose, Prozessierung und Antigenpräsentation. Monozyten haben sehr gute phagozytotische Eigenschaften und nehmen lösliche Antigene unspezifisch auf (Geissmann, 2010). Dies steht im Gegensatz zu den B-Zellen, die exogen vorliegendes Protein nur nach Erkennung über ihren epitopspezifischen B-Zellrezeptor endozytieren können (Drolet, 2010). B-Zellen tragen darüber hinaus im Vergleich zu Monozyten größere Mengen von CD40 auf ihrer Oberfläche, was wiederum für das RTT Verfahren zum indirekten Nachweis aktiver T-Helferzellen sehr vorteilhaft wäre. Dennoch ist die Aufnahmewahrscheinlichkeit für Peptide durch B-Zellen im Vergleich zu Monozyten und dendritischen Zellen sehr gering (den Haan und Bevan, 2000). Unter Verwendung des *Nucleofector*[®] Verfahrens könnte man diese Problematik umschiffen, die Anwendung dieser nicht zuletzt auch kostspieligen Technik zur Antigenpräsentation auf B-Zellen ist allerdings unter Beachtung der insgesamt ineffizienten Proteinexpression nach Transfektion nicht sinnvoll. Zu diesem Schluss bezüglich der *Nucleofector*[®] Technologie kamen auch Kraus *et al.*. Sie konnten das Verfahren trotz Transfektionsraten von 10 % in Schwann-Zellen aufgrund relevanter Beeinträchtigung der Zellviabilität nicht nutzen (Kraus, 2011).

In abschließenden Stimulationsexperimenten unter Einsatz des ESAT-6/ CFP-10 Fusionsproteins war mittels ICS in Blutproben von latent und aktiv mit M. tuberculosis infizierten Patienten, nicht aber im Blut von gesunden Probanden eine signifikante Zahl ESAT-6/ CFP-10 spezifischer T-Zellen nachweisbar.

So waren in Proben latent TB infizierter Probanden 0,05 % bis 0,08 %, in Spenderblut von akut an TB Erkrankten 0,05 % (Proband 44, 74 Jahre alt, Kultur positiv, Quantiferon-Test negativ), 0,09 % (Proband 43, 46 Jahre alt, Kultur positiv) und 0,55 % (Proband 42, 54 Jahre alt, Kultur positiv) IFN- γ positive T-Helferzellen nachweisbar. Dagegen enthielten die Proben gesunder TB negativer Probanden keine beziehungsweise nur eine sehr geringe Zahl spezifisch reaktivierbarer T-Helferzellen (0,00 % bis 0,01 %).

Diese Ergebnisse geben auch unter Berücksichtigung der geringen Zahl der getesteten Personen erste Hinweise darauf, dass sich das beschriebene Verfahren zur Erkennung von latent beziehungsweise aktiv mit *M. tuberculosis* infizierten Personen und ihrer Abgrenzung von nicht infizierten gesunden Probanden eignet. Eine Differenzialdiagnose von aktiv und latent Infizierten ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Bei der Analyse der Werte fällt auf, dass sich die Anteile IFN- γ positiver T-Helferzellen bei Patienten mit einer aktiven TB heterogen verhalten, mit einem Maximalwert von 0,55 %.

Ein Grund für die unterschiedliche Zahl IFN- γ produzierender Zellen in den getesteten Proben mag in einer die Erkrankung begünstigende Immunsuppression zu finden sein, eine häufige Komorbidität der TB. Diese erzeugt u.a. eine T-Zell-Suppression, aus welcher die schwachen IFN- γ Signale stammen könnten. Ferner treten Zustände der Immunschwäche auch im Alter vermehrt auf, was speziell den niedrigen IFN- γ Wert von 0,05 % und den negativen Quantiferon-Test, ein IGRA, von Proband 44 erklären könnte.

Zusammenfassung

Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Ludwig Deml befasst sich in einem Forschungsvorhaben unter Einsatz ihrer proprietären Reversen T-Zell-Technologie (RTT) mit der Entwicklung neuer Diagnostikprodukte zur Bestimmung aktiver mikrobieller Infektionen. Dieses Verfahren beruht auf der Bestimmung von Reifungsprozessen, welche in Antigen-präsentierenden Zellen (APC) infolge einer epitopspezifischen Interaktion mit einer aktivierten T-Helferzelle hervorgerufen werden. Aktivierte T-Helferzellen treten transient während der aktiven Phase einer Infektion auf und stellen somit einen interessanten neuen Biomarker für den Nachweis aktiver Infektionen dar.

Das Verfahren beruht auf der MHC-Klasse-II Beladung von APC in frisch isolierten PBMC eines Patienten mit erregerspezifischen Peptiden, der Kultivierung des stimulierten APC und T-Zellen enthaltenden Zellgemisches sowie der anschließenden Messung T-Zell-induzierter Reifungsprozesse in APC als Marker für die Anwesenheit *in vivo* aktiver T Helferzellen.

Im Rahmen dieses Projektes sollte am Beispiel der Tuberkulose untersucht werden, ob die Transfektion von Expressionsvektoren, welche für mit ER- und endosomalen Translokationssignalen ausgestattete chimäre Proteine kodieren, eine geeignete Strategie zur Epitopbeladung von MHC-Klasse-II Molekülen auf APC und insbesondere B-Zellen darstellt. Dieses Verfahren sollte bezüglich der Präsentationseffizienz zudem mit der Inkubation von PBMC bzw. Vollblut mit löslichen Proteinen verglichen werden.

Das Ziel des ersten Arbeitspakets war es zu untersuchen, ob sich die *Nucleofector*® Technologie von Lonza zum gezielten und ausreichend effizienten Plasmidtransfer in APC und insbesondere in B-Zellen eignet. Dazu wurden verschiedene Zellpopulationen unter Verwendung des *Human B Cell Nucleofector*® Kits mit einem GFP-Expressionsplasmid transfiziert und die Zahl GFP-produzierender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es zeigte sich, dass mit dieser Technologie nur eine relativ ineffiziente und wenig selektive Transfektion von B-Zellen in PBMC erzielt werden kann. So zeigten etwa 25 % aller transfizierten PBMC, jedoch nur etwa 11 % der darin enthaltenen B-Zellen 24 Stunden nach erfolgter Transfektion eine messbare GFP Expression. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Anteil vitaler PBMC im Median 87,3 %. Zudem weisen isolierte primäre B-Zellen im Vergleich mit in PBMC vorliegenden B-Zellen nach Transfektion nur zu einem geringen Prozentsatz eine messbare GFP Produktion auf (ca. 1 % versus 11 % Marker-positive Zellen). Dagegen sind B-Zell-Linien im Vergleich mit frisch isolierten primären B-Zellen wesentlich effizienter transfizierbar (bis zu 49,5 % versus 1% Marker-positive Zellen).

Im zweiten Arbeitspaket wurden nun Plasmide zur Expression des *Mycobacterium tuberculosis* Proteins ESAT-6 sowie eines ESAT-6/CFP-10 Fusionsproteins kloniert, welche wichtige Zielstrukturen für TB-spezifische T-Helferzellen beinhalten. Um die Präsentation dieser intrazellulär synthetisierten Proteine auf MHC-II Molekülen zu gewährleisten, wurden die Gene dieser Proteine um Sequenzen des Lysosom-assoziierten Membranprotein 1 (LAMP1) erweitert, welche für endoplasmatische und lysosomale Adressierungssignale kodieren. In Transfektionsexperimenten und anschließenden

Immunoblot-Analysen konnte lediglich in der B-Zell-Line DG75, nicht aber in isolierten primären B-Zellen eine Expression von ESAT-6 gezeigt werden. Das ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein war weder in primären B-Zellen noch in DG75 Zellen nachweisbar.

Zur funktionellen Bestimmung der Präsentation von Epitopen des ESAT-6 bzw. CFP-10 Proteins auf MHC-Klasse-II-Molekülen in transfizierten PBMC wurde ein Zellkultursystem etabliert, dass auf der Kokultivierung von mit den etablierten Expressionsplasmiden transfizierten APC mit autologen, ex vivo expandierten ESAT-6/ CFP-10 spezifischen T-Helferzellen beruht. Dazu wurden durch eine repetitive Stimulation mit autologen ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein beladenen PBMC T-Zellkulturen etabliert, welche bis zu 25 % ESAT-6/ CFP-10-spezifische T-Helferzellen enthielten. Der Anteil spezifischer T-Helferzellen wurde anhand deren IFN- γ Produktion bestimmt. Diese konnte mittels intrazellulärer IFN- γ Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse erfasst werden. In den Kokultivierungsexperimenten wurden durch mit dem Expressionsplasmid transfizierte PBMC 0,1 % der expandierten T-Helferzellen zur Produktion von IFN- γ angeregt. Im Vergleich dazu führte die Stimulation der Kokulturansätze mit löslichem ESAT-6/ CFP-10 Protein in 5,9 % der T-Zellen zu einer spezifischen IFN- γ Produktion. Diese Untersuchungen belegten, dass die Inkubation mit löslichen Proteinen im Vergleich zum Plasmidtransfer mittels des Amaxa Verfahrens zu einer wesentlich effizienteren MHC-Klasse-II Beladung mit Epitopen und somit zu einer effizienteren Aktivierung spezifischer T-Helferzellen führt.

In abschließenden Experimenten wurde zudem untersucht, ob sich das lösliche ESAT-6/ CFP-10 Fusionsprotein auch in Vollblutproben von latent bzw. akut an einer Tuberkulose Erkrankten zum Nachweis TB-spezifischer T-Zellen eignet. In diesen Untersuchungen konnte durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer IFN- γ Färbung in allen getesteten Blutproben von Patienten mit einer latenten und aktiven Tuberkulose eine signifikante Zahl spezifischer T-Helferzellen nachgewiesen werden. Hier war in den wenigen getesteten Proben von Patienten mit einer latenten und aktiven TB kein signifikanter Unterschied in der Frequenz reaktiver T-Zellen beobachtbar.

Die erzielten Untersuchungsergebnisse zeigen, dass sich der Plasmidtransfer mittels der Amaxa Technologie und „zellspezifischer“ Transfektionsreagentien aufgrund der geringen Transfektionsraten und Selektivität sowie der hohen Zytotoxizität nur sehr begrenzt zur Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen auf primären B-Zellen miterreger spezifischen Peptiden eignet.

Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM, Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 1996. 383(6603):787-93, PubMed: [8893001]

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL: Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of biological chemistry*, 2003. 278(3):1910-4, PubMed: [12417590]

Ahmad S: Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical & Developmental Immunology*, 2011. 2011:814943. Epub 2010 Dec 27, PubMed: [21234341]

Arnold C: Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2007. 13: 120–128, PubMed: [17328723]

de Arruda LB, Chikhlikar PR, August JT, Marques ET: DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. *Immunology*, 2004. 112(1):126-33, PubMed: [15129672]

Badovinac VP, Harty JT: Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunological reviews*, 2006. 211:67-80, PubMed: [16824118]

Ben-Bassat H, Goldblum N, Mitrani S, Goldblum T, Yoffey JM, Cohen MM, Bentwich Z, Ramot B, Klein E, Klein G: Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Internationel journal of cancer*, 1977. 19(1):27-33, PubMed: [188769]

Bestor TH: Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *The Journal of clinical investigation*, 2000. 105(4):409-11, PubMed: [10683368]

Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979. 7(6):1513-23, PubMed: [388356]

Bloquel C, Fabre E, Bureau MF, Scherman D: Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *The journal of gene medicine*, 2004. 6 Suppl 1:S11-23, PubMed: [14978747]

Bonilla FA, Oettgen HC: Adaptive Immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2010. 125(2 Suppl 2):S33-40, PubMed: [20061006]

Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W: A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 1985. 41(2):521-30, PubMed: [2985280]

Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, Watts TH: 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *Journal of immunology*, 2001. 167(3):1313-24, PubMed: [11466348]

Carroll MC: The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology*, 2004. 5(10):981-6, PubMed: [15454921]

Chaisson RE, Harrington M: How research can help control tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 2009. 13(5):558-68, PubMed: [19383187]

Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymparis G, Nezos A, Kamper E: CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors*, 2009. 35(6):474-83, PubMed: [19904719]

Darquet AM, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J: A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Therapy*, 1997. 4(12):1341-9, PubMed: [9472558]

Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 1992. 13(8):795-808, PubMed: [1333943]

Croft M: The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature reviews immunology*, 2009. 9(4):271-85, PubMed: [19319144]

Croft M, So T, Duan W, Soroosh P: The Significance of OX40 and OX40L to T cell Biology and Immune Disease. *Immunol Rev*. 2009. 229(1):173-91, PubMed: [19426222]

Daniel T: Clemens Freiherr von Pirquet and the tuberculin test. *The international journal of tuberculosis and lung disease* 2003. 7(12):1115-6, PubMed [14677885]

Daniel T: Leon Charles Albert Calmette and BCG vaccine. *The international journal of tuberculosis and lung disease* 2005. 9(9):944-5, PubMed [16158885]

Daniel T: The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out?. *The international journal of tuberculosis and lung disease* 2000. 4(5):395-400, PubMed: [10815731]

Daniel T: The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* 2006. 100, 1862-1870, PubMed: [16949809]

Del Prete G: The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *International reviews of immunology*, 1998. 16(3-4):427-55, PubMed: [9505198]

Doetsch R: Benjamin Marten and his "New Theory of Consumptions". Microbiological Reviews 1978. 42(3):521-8, PubMed: [362148]

Donoghue H, Lee O, Minnikin D, Besra G, Taylor J, Spigelman M: Tuberculosis in Dr Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis. Proc. R. Soc. B 2010. 277, 51–56, PubMed: [19793751]

Drolet JP, Frangie H, Guay J, Hajoui O, Hamid Q, Mazer BD: B lymphocytes in inflammatory airway diseases. Clinical and Experimental Allergy, 2010. 40(6):841-9, PubMed: [20557549]

Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ: Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Immunological Reviews 2009. 229(1):152-72, PubMed: [19426221]

Flanagan M, Gimble JM, Yu G, Wu X, Xia X, Hu J, Yao S, Li S: Competitive electroporation formulation for cell therapy. Cancer Gene Therapy, 2011. 18(8):579-86, Epub 2011 Jun 10, PubMed: [21660061]

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K: Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science, 2010. 327(5966):656-61, PubMed: [20133564]

Getahun H, Harrington M, O'Brien R, Nunn P: Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. Lancet 2007. 369(9578):2042-9, PubMed: [17574096]

Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Laloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G: Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. Lancet 2006. 368(9547):1575-80, PubMed: [17084757]

Goffinet C, Keppler OT: Efficient nonviral gene delivery into primary lymphocytes from rats and mice. The FASEB Journal, 2006. 20(3):500-2. Epub 2006 Jan 9, PubMed: [16401643]

Gradmann C: Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. Microbes and Infection 2006. 8(1):294-301, PubMed: [16126424]

den Haan JM, Bevan MJ: A novel helper role for CD4 T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000. 97(24):12950-2, PubMed: [11087850]

Hanahan D: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. Journal of molecular biology, 1983. 166(4):557-80, PubMed: [6345791]

Hoebe K, Janssen E, Beutler B: The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* 2004. 5(10):971-4, PubMed: [15454919]

Höner zu Bentrup K, Russell DG: Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends in Microbiology* 2001. 9(12):597-605, PubMed: [11728873]

Horsburgh CR jr: Priorities for the Treatment of Latent Tuberculosis Infection in the United States. *NEJM* 2004. 350(20):2060-7, PubMed: [15141044]

Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 2004. 5(10):987-95, PubMed: [15454922]

Janvier K, Bonifacino JS: Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Molecular biology of the cell*, 2005. 16(9):4231-42, PubMed: [15987739]

Jassal MS, Bishai WR: Epidemiology and challenges to the elimination of global tuberculosis. *Clinical infectious diseases* 2010. 50 Suppl 3:S156-64, PubMed: [20397943]

Jiang W, Shao L, Zhang Y, Zhang S, Meng C, Xu Y, Huang L, Wang Y, Wang Y, Weng X, Zhang W: High-sensitive and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by IFN-gamma release assay among HIV-infected individuals in BCG-vaccinated area. *BMC immunology*, 2009. 10:31, PubMed: [19476627]

Jordan ET, Collins M, Terefe J, Uguzzoli L, Rubio T: Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 2008. 19(5):328-34, PubMed: [19183796]

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R: Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 2002. 2(4):251-62, PubMed: [12001996]

Kang YJ, Kim SO, Shimada S, Otsuka M, Seit-Nebi A, Kwon BS, Watts TH, Han J: Cell surface 4-1BBL mediates sequential signaling pathways 'downstream' of TLR and is required for sustained TNF production in macrophages. *Nature Immunology*, 2007. 8(6):601-9, PubMed: [17496895]

Klarenbeek PL, Tak PP, van Schaik BD, Zwinderman AH, Jakobs ME, Zhang Z, van Kampen AH, van Lier RA, Baas F, de Vries N: Human T-cell memory consists mainly of unexpanded clones. *Immunology Letters* 2010. doi:10.1016/j.imlet.2010.06.011, PubMed: [20621124]

Kober J, Leitner J, Klauser C, Woitek R, Majdic O, Stöckl J, Herndler-Brandstetter D, Grubeck-Loebenstein B, Reipert B, Pickl W, Pfistershamer K, Steinberger P: The capacity of the TNF family members 4-1BBL, OX40L, CD70, GITRL, CD30L and LIGHT to

costimulate human T cells. European Journal Of Immunology 2008. 38(10):2678-88, PubMed: [18825741]

Köhler J: The role of complement in danger sensing and transmission. Immunologic Research 2006. 34(2):157-76, PubMed: [16760575]

Komatsu R, Low-Bee D, Schwartländer B: Global Fund-supported programmes contribution to international targets and the Millennium Development Goals: an initial analysis. Bull World Health Organ 2007; 85(10):805-11, PubMed: [18038063]

van Kooten C, Banchereau J: CD40-CD40 ligand. Journal of Leukocyte Biology 2000. 67(1):2-17, PubMed: [10647992]

Kosovac D, Wild J, Ludwig C, Meissner S, Bauer AP, Wagner R: Minimal doses of a sequence-optimized transgene mediate high-level and long-term EPO expression in vivo: challenging CpG-free gene design. Gene Therapy, 2011. 18(2):189-98, Epub 2010 Oct 14, PubMed: [20944679]

Kraus A, Täger J, Kohler K, Haerle M, Werdin F, Schaller HE, Sinis N: Non-viral genetic transfection of rat Schwann cells with FuGENE HD[®] lipofection and AMAXA[®] nucleofection is feasible but impairs cell viability. Neuron Glia Biology, 2011. 2011 Jun 7:1-6, PubMed: [21729347]

Kurts C, Robinson BW, Knolle PA: Cross-priming in health and disease. Nature reviews immunology, 2010. 10(6):403-14, PubMed: [20498667]

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970. 227(5259):680-5, PubMed: [5432063]

Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV: Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. American journal of respiratory and critical care medicine, 2001. 163(4):824-8, PubMed: [11282752]

Lane PJ, Brocker T: Developmental regulation of dendritic cell function. Current opinion in immunology, 1999. 11(3):308-13, PubMed: [10375555]

van Leeuwen EM, Sprent J, Surh CD: Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells. Current opinion in immunology, 2009. 21(2):167-72, PubMed: [19282163]

Lin GH, Sedgmen BJ, Moraes TJ, Snell LM, Topham DJ, Watts TH: Endogenous 4-1BB ligand plays a critical role in protection from influenza-induced disease. Journal of immunology, 2009. 182(2):934-47, PubMed: [19124736]

Lindner J, Barabas S, Saar K, Altmann D, Pfister A, Fleck M, Deml L, Modrow S: CD4(+) T-cell responses against the VP1-unique region in individuals with recent and persistent

parvovirus B19 infection. *Journal of Veterinary Medicine*, 2005. 52(7-8):356-61, PubMed: [16316401]

Loewendorf A, Benedict CA: Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. *Journal Of Internal Medicine*, 2010. 267(5):483-501, PubMed: [20433576]

Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD: Thymic involution and immune reconstitution. *Trends in immunology* 2009. 30(7):366-73, PubMed: [19540807]

McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL: The effector to memory transition of CD4 T cells. *Immunologic Research*, 2008. 40(2):114-27, PubMed: [18213525]

Van der Meide PH, Schellekens H: Cytokines and the immune response. *Biotherapy*, 1996;8(3-4):243-9. PubMed: [8813336]

Michalek RD, Rathmell JC: The metabolic life and times of a T-cell. *Immunological reviews*, 2010. 236:190-202, PubMed: [20636818]

Miner KT, Croft M: Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells: role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. *Journal of Immunology*, 1998. 160(11):5280-7, PubMed: [9605125]

Miyawaki A: Proteins on the move: insights gained from fluorescent protein technologies. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2011. 12(10):656-68, doi: 10.1038/nrm3199, PubMed: [21941275]

Mok MY: The immunological basis of B-cell therapy in systemic lupus erythematosus. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 2010. 13(1):3-11, PubMed: [20374380]

Murata K, Ishii N, Takano H, Miura S, Ndhlovu LC, Nose M, Noda T, Sugamura K: Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *The Journal of experimental medicine*, 2000. 191(2):365-74, PubMed: [10637280]

Nebenführ A, Ritzenthaler C, Robinson DG: Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiology*, 2002. 130(3):1102-8, PubMed: [12427977]

Nelson JA, Reynolds-Kohler C, Smith BA: Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Molecular and cellular biology*, 1987. 7(11):4125-9, PubMed: [2828927]

O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH: T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature Immunology* 2006. 7(5):507-16, PubMed: [16617337]

Paust S, Senman B, von Andrian UH: Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunological Reviews* 2010. 235(1):286-96, PubMed: [20536570]

Petersen CM, Christensen EI, Andresen BS, Møller BK: Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells. *Exp Cell Res*, 1992. 201(1):160-73, PubMed: [1612121]

Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ: CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annual Reviews in Immunology* 2004. 22:307–28, PubMed: [15032580]

Raulet DH: Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nature Immunology*, 2004. 5(10):996-1002, PubMed: [15454923]

Remington SJ: Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Current opinion in structural biology*, 2006. 16(6):714-21. Epub 2006 Oct 24, PubMed: [17064887]

Romagnani S: Th1 and Th2 in human diseases. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1996. 80(3 Pt 1):225-35, PubMed: [8811042]

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988. 239(4839):487-91, PubMed: [2448875]

Sakaguchi S, Wing K, Miyara M: Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European journal of immunology*, 2007. 37 Suppl 1:S116-23, PubMed: [17972355]

Sakula, A: Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax* 1982. 37:246-251, PubMed: [6180494]

Salih HR, Schmetzer HM, Burke C, Starling GC, Dunn R, Pelka-Fleischer R, Nuessler V, Kiener PA: Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. *Journal of immunology*, 2001. 167(7):4059-66, PubMed: [11564827]

Schatz A, Bugie E, Waksman SA: Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Clinical Orthopedics and related research*, 1944. (437):3-6, PubMed: [16056018]

Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, Delgado JC, Gribben JG, Nadler LM: CD40-activated *Human B Cell s*: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive

immunotherapy. *The Journal of clinical investigation*, 1997. 100(11):2757-65, PubMed: [9389740]

Seder RA, Darrah PA, Roederer M: T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature Reviews Immunology* 2008.8(4):247-58. Epub 2008 Mar 7, PubMed: [18323851]

Shevach EM: From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*, 2006. 25(2):195-201, PubMed: [16920638]

Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emwiler J, Raecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, Mittler RS: 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification *in vivo* of cytotoxic T cell responses. *The Journal of experimental medicine*, 1997. 186(1):47-55, PubMed: [9206996]

Singh H: Teeing up transcription on CpG islands. *Cell*, 2009. 138(1):14-6, PubMed: [19596228]

Sleckman BP, Shin J, Igras VE, Collins TL, Strominger JL, Burakoff SJ: Disruption of the CD4-p56lck complex is required for rapid internalization of CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1992. 89(16):7566-70, PubMed: [1502168]

Sung SS: Monocyte-derived dendritic cells as antigen-presenting cells in T-cell proliferation and cytokine production. *Methods in molecular medicine*, 2008. 138:97-106, PubMed: [18615247]

Tan JT, Whitmire JK, Ahmed R, Pearson TC, Larsen CP: 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *Journal of immunology*, 1999. 163(9):4859-68, PubMed: [10528187]

Taraban VY, Rowley TF, O'Brien L, Chan HT, Haswell LE, Green MH, Tutt AL, Glennie MJ, Al-Shamkhani A: Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *European journal of immunology*, 2002. 32(12):3617-27, PubMed: [12516549]

Tomaru U, Yamano Y, Nagai M, Maric D, Kaumaya PT, Biddison W, Jacobson S: Detection of virus-specific T cells and CD8+ T-cell epitopes by acquisition of peptide-HLA-GFP complexes: analysis of T-cell phenotype and function in chronic viral infections. *Nat Med*, 2003. 9(4):469-76, PubMed: [12652294]

Trompeter HI, Weinhold S, Thiel C, Wernet P, Uhrberg M: Rapid and highly efficient gene transfer into natural killer cells by nucleofection. *Journal of immunological methods*, 2003. 274(1-2):245-56, PubMed: [12609550]

Uchiyama H, Nagata T, Yamada T, Uchijima M, Aoshi T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Koide Y: Endosomal/lysosomal targeting of a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium by DNA immunisation induces a specific T-cell subset and partial protective immunity in vivo. *FEMS Microbiology Letters*, 2002. 216(1):91-7, PubMed: [12423758]

Vinay DS, Kwon BS: Role of 4-1BB in immune responses. *Seminars in immunology*, 1998. 10(6):481-9, PubMed: [9826581]

Vonderheide RH, June CH: A translational bridge to cancer immunotherapy: exploiting costimulation and target antigens for active and passive T cell immunotherapy. *Immunologic Research*, 2003. 27(2-3):341-56, PubMed: [12857980]

Wang C, Lin GH, McPherson AJ, Watts TH: Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunological reviews*, 2009. 229(1):192-215, PubMed: [19426223]

Wang Q, Chen Y, Xie F, Ge Y, Chen L, Wu H, Qu Q, Wang X, Zhang X: Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble OX40L (CD252) in human sera of different ages or with Graves' disease. *Cytokine*, 2006. 36(1-2):23-8, PubMed: [17166734]

WHO: Global tuberculosis control – a short update to the 2009 report. World Health Organization, Switzerland, 2009

Wills-Karp M: Complement Activation Pathways: A Bridge between Innate and Adaptive Immune Responses in Asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2007. 4(3):247-51, PubMed: [17607007]

Wu TC, Guarneri FG, Staveley-O'Carroll KF, Viscidi RP, Levitsky HI, Hedrick L, Cho KR, August JT, Pardoll DM: Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. 92(25):11671-5, PubMed: [8524826]

Yew NS, Zhao H, Przybylska M, Wu IH, Tousignant JD, Scheule RK, Cheng SH: CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Molecular Therapy*, 2002. 5(6):731-8, PubMed: [12027557]

Yew NS, Zhao H, Wu IH, Song A, Tousignant JD, Przybylska M, Cheng SH: Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Molecular Therapy*, 2000. 1(3):255-62, PubMed: [10933941]

Yssel H, Spits H: Generation and maintenance of cloned human T cell lines. *Current protocols in immunology*, 2002. Chapter 7:Unit 7.19, PubMed: [18432890]

Zhang S, Zhang H, Zhao J: The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. Biochemical and Biophysical Research Communications 2009. 384(4):405-8, PubMed: [19410556]

Zhao X, Su H, Yin G, Liu X, Liu Z, Suo X: High transfection efficiency of porcine peripheral blood T cells via nucleofection. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011. 2011 Oct 15 [Epub ahead of print], PubMed: [22055481]

Zhu J, Yamane H, Paul WE: Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. Annual Review of Immunology 2010. 28:445-89, PubMed: [20192806]

Anhang

A. Patienteninformation zur Durchführung einer Blutentnahme zu Forschungszwecken

Sehr geehrter Blutspender,

zunächst möchten wir uns herzlichst für Ihr Interesse an der Teilnahme bei dem von uns, dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. Hans Wolf) und der Fachklinik für Erkrankungen der Atmungsorgane (Direktor: Prof. Dr. med. Michael Pfeiffer) durchgeführten Forschungsprojektes bedanken.

Das Bakterium Mykobakterium tuberkulosis (*M. tuberculosis*) verursacht die Tuberkulose, eine chronisch verlaufende Infektionserkrankung, welche in erster Linie die Lunge betrifft, aber auch andere Organe, wie die Hirnhäute, Lungenfell, Knochen, Harnwege, den Verdauungstrakt und die Haut betreffen kann. Nach einer Ansteckung durch Tröpfcheninfektion bildet sich im Verlauf von etwa 6 Wochen eine kleine knötchenförmige Entzündung - der Primärkomplex - aus, welcher im Allgemeinen keine Beschwerden verursacht. Während etwa 90 % der Infizierten keine weiteren Symptome ausbilden, können insbesondere in Personen mit geschwächtem Immunsystem schwere, zum Teil lebensbedrohliche Krankheitsbilder, wie das Anschwellen der Lymphknoten der Lunge, Entzündungen des Rippenfells, des Herzbeutels, der Hirnhäute oder der Lunge auftreten. Ziel der geplanten Studien ist es zu untersuchen, welche Rolle die Immunreaktionen (T-Helferzellen, Killerzellen) des Körpers bei der Kontrolle von Mykobakterien sowie bei der Entstehung einer Tuberkuloseerkrankung spielen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung stimulieren wir im Reagenzglas die Immunzellen, die wir aus Ihrem Blut isolieren mit verschiedenen Bestandteilen des Erregers. Die gegen Mykobakterium tuberkulosis gerichteten Immunzellen werden bei diesem Verfahren zur Teilung und Produktion von Botenstoffen angeregt. Diesen Vorgang können wir messen und so das Ausmaß Ihrer Immunantwort bestimmen.

Für die Gewinnung der Zellen ist eine venöse Blutentnahme notwendig. Diese wird von einem Arzt durchgeführt, und ist mit keinen schwerwiegenden Komplikationen verbunden. In einigen Fällen kann es bei der Blutabnahme zu Schwindelgefühlen bis hin zum Kollaps kommen. In sehr seltenen Fällen kann es auch zur Infektion des umliegenden Gewebes, zur Einblutung nach kleineren Verletzungen der Blutgefäße oder zu Nervenschädigungen in dem Areal kommen. Ihre persönlichen Daten und die gewonnenen Ergebnisse werden verschlüsselt registriert, so dass für Unbefugte keine Möglichkeit besteht, in den Besitz dieser Informationen zu gelangen. Bei allen weiteren verwaltungstechnischen Schritten werden die gesetzlichen Datenschutzbestimmungen und die ärztliche Schweigepflicht

beachtet. Wir versichern ihnen des weiteren, dass ihre Blutproben zu keinem anderen Zweck als dem oben aufgeführten verwendet werden.

Vielen Dank für ihre Mitarbeit.

Prof. Dr. Hans Wolf

Prof. Dr. med. Michael Pfeiffer

Ort, Datum, Unterschrift des Blutspenders

Ort, Datum, Unterschrift des aufklärenden Arztes

B. Einverständniserklärung zur Durchführung einer Blutentnahme zu Forschungszwecken

Hiermit willige ich in die Durchführung einer Blutentnahme zu Forschungszwecken ein. Mir wurde neben der schriftlichen Patienteninformation auch sonst ausreichend Gelegenheit gegeben, mich über den Sinn und Zweck der Studie und der Blutentnahme zu informieren. Das von mir gespendete Blut darf nur zu dem mit mir besprochenen Zweck verwendet werden und beim Umgang mit meinen persönlichen Daten müssen die gesetzlichen Datenschutzbestimmungen sowie die ärztliche Schweigepflicht beachtet werden.

Ort, Datum, Unterschrift des Blutspenders

Ort, Datum, Unterschrift des aufklärenden Arztes

C. Berechnung der Quartile mit der Clevelandmethode nach John Tukey

Die in der Arbeit aufgeführten Box Plots wurden mit dem Programm Sigma Plot, Version 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) erstellt. Im *Sigma Plot User Guide* ist auf S. 336 die zur Erstellung der Perzentilen vom Programm zur Interpolation verwendete Cleveland-Methode aufgeführt:

“Both the Cleveland method and the Standard method use linear interpolation to determine the percentile value, but each uses a different method of rounding when determining the smallest data index used for the interpolation. The two methods give the same result when computing the 50th percentile (median).

If the data in increasing order is x_1, x_2, \dots, x_N and the percentile is p , then the two methods compute the data percentile value v using the following formulas:

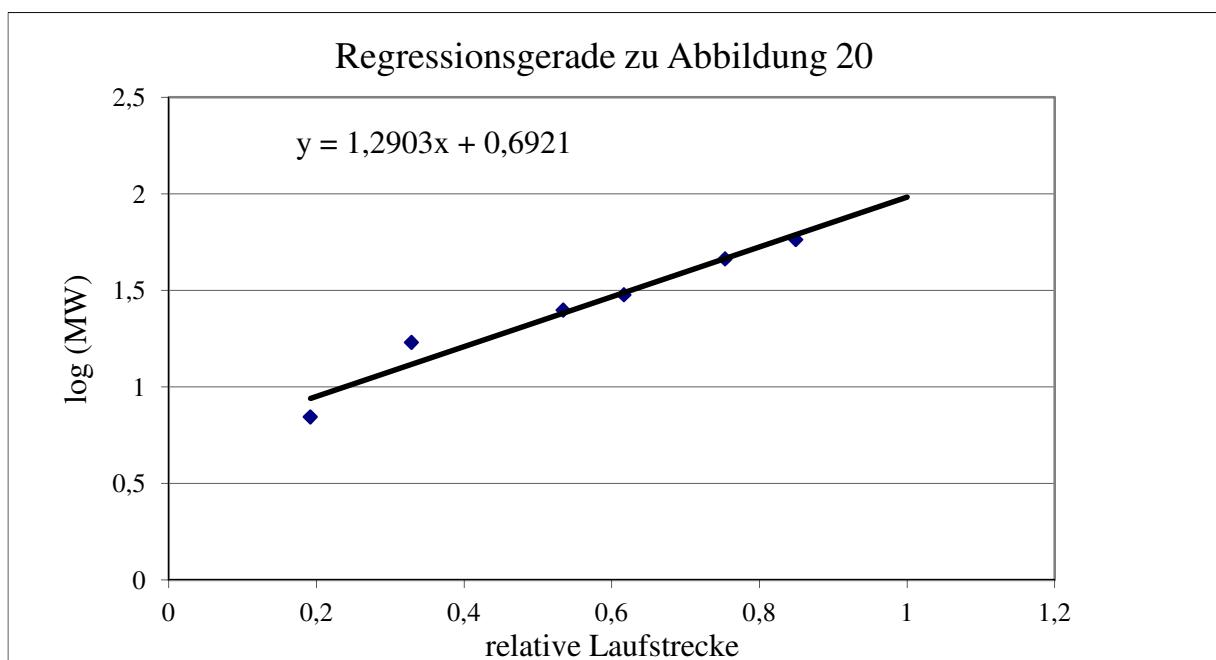
*Cleveland: Let k be the nearest integer to $N*p/100$, and let $f = N*p/100 + 0.5 - k$.*

*Standard: Let k be the largest integer less than or equal to $(N+1)*p/100$, and let $f = (N+1)*p/100 - k$.*

To compute the percentile value, each of the above methods uses the formula:

*$v = f*x_k + 1 + (1-f)*x_{k+1}$*

D. Regressionsgerade aus Molekulargewichtstandard und jeweiliger relativer Laufstrecke zur Ermittlung der Größe detekterter Proteine (zu Abbildung 20)



Danksagung

Herrn Prof. em. Dr. Hans Wolf und **Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner** danke ich dafür, dass ich die Möglichkeit bekommen habe dieses interessante Thema in ihrem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg zu bearbeiten.

Meinem Doktorvater und Betreuer dieser Arbeit, **Herrn PD Dr. Ludwig Deml** danke ich für die schöne und sehr interessante Zeit die ich in seinem Labor verbringen durfte. Nicht nur durfte ich währenddessen Einblicke in die Immunologie erhaschen und das wissenschaftliche Arbeiten kennenlernen, ich bin dabei auch in vielfältiger Weise bei diversen Problemen stets unterstützt worden.

Ich danke **Frau Dr. Petra Lindner** für die Bereitstellung des Vektor *pET-22b(+)_esxAB*, **Herrn Prof. Dr. med. Hans-Helmut Niller** für die Bereitstellung der DG75-Zelllinie, **Frau Prof. Dr. Susanne Modrow** für die Bereitstellung des *Nucleofector®* Geräts (alle Mitarbeiter des Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg).

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Deml, besonders **Herrn Dr. Sascha Barabas, Kristina Naumann, Karin Beckenlehner-Lukas, Dominik Altmann, Markus Priller, Katrin Edmaier, Anastasija Chan** und **Kerstin Göbel** danke ich für die Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima. Besonders möchte ich mich bei **Steffi Eder** und **Theresa Spindler** bedanken, die mir bei vielen Versuchen eine große Hilfe und fachliche Unterstützung waren.

Ich danke **meiner Familie** und **meinen Freunden** für all die Unterstützung und Geduld. Besonders danke ich **meinem Freund David** für jeglichen Rückhalt bei meinen Vorhaben.

Erklärung zum Promotionsverfahren

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Name: Qamar_____
Vorname: Yasmin Hedy_____
geb. am: 27. April 1986_____
in: Frankfurt am Main_____

Ich erkläre,

- dass ich den **Doktorgrad der Medizin** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- das ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des **medizinischen Doktorgrades** zugelassen bin
- dass ich die **medizinische Doktorprüfung** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 26.09.2012_____

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Die einmalige Rücknahme des Promotionsgesuches ist bis zur Bestellung der Gutachter zulässig.