

Aus dem Institut für Infektionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Antituberkulotika auf die Reifung und Funktion
humaner dendritischer Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Corinna Rehse

aus Berlin

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. R. Ignatius
2. Prof. Dr. med. M. Mielke
3. Prof. Dr. H. Stoiber

Datum der Promotion: 07.09.2012

Gewidmet meinem Verlobten und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	6
1.1	Die Tuberkulose.....	6
1.1.1	<i>M. tuberculosis</i> : Beschreibung des Erregers	7
1.1.2	Übertragung von <i>M. tuberculosis</i>	7
1.1.3	Pathogenese	8
1.1.4	Klinik	9
1.1.5	Diagnostik.....	9
1.1.6	Therapie	10
1.2	Dendritische Zellen.....	11
1.2.1	DCs und die Immunantwort gegen <i>M. tuberculosis</i>	12
1.2.2	IL-12 und IL-23 im Rahmen der Immunantwort gegen <i>M. tuberculosis</i>	14
1.2.3	TNF- α im Rahmen der Immunantwort gegen <i>M. tuberculosis</i>	15
1.3	Antibiotika und ihr immunmodulatorischer Effekt auf Zellen des Immunsystems.....	16
1.4	Fragestellung.....	18
2	Materialien und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Verwendete Geräte	20
2.1.2	Pipetten und Pipettenzubehör	20
2.1.3	Zellkultur- und ELISA-Platten	20
2.1.4	Röhrchen.....	21
2.1.5	Bakterielle Antigene	21
2.1.6	Antikörper.....	21
2.1.7	Antituberkulotika.....	22
2.1.8	Pufferlösungen.....	22
2.1.9	Zellkulturmedium	23
2.1.10	Zytokine.....	23
2.1.11	Chemikalien.....	23
2.1.12	Leukozytenkonzentrate.....	23
2.1.13	Materialien zur Zellseparation.....	24
2.2	Methoden	24
2.2.1	Isolierung von PBMCs aus Leukozytenkonzentraten.....	24
2.2.2	Magnetische Zellseparation von Monozyten und Gewinnung von DCs.....	24

2.2.3	Stimulation von DCs mit proinflammatorischen Zytokinen, Mtb-Ag oder LPS	26
2.2.4	Inkubation von DCs mit Mtb-Ag unter dem Einfluss von Antituberkulotika.....	26
2.2.5	Magnetische Anreicherung von T-Lymphozyten.....	26
2.2.6	Allogene MLR.....	27
2.2.7	Durchflusszytometrie.....	28
2.2.8	Zytokinnachweis mittels ELISA.....	28
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Aktivierung unreifer humaner DCs mittels Mtb-Ag.....	30
3.2	Moxifloxacin inhibiert die Expression von CD25 und CD83 sowie die Sekretion von IL-12p40, TNF- α und IL-10 von Mtb-Ag stimulierten DCs	34
3.3	Isoniazid reduziert die Expression von CD25, hat jedoch keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion Mtb-Ag aktivierter DCs.....	38
3.4	Ethambutol reduziert die Expression von CD25 sowie die Sekretion von IL-10 und TNF- α Mtb-Ag-aktivierter DCs.....	42
3.5	Rifampicin steigert die Expression von CD25 und CD83 und verändert die Sekretion von IL-12p40 von Mtb-Ag stimulierten DCs.....	46
4	Diskussion.....	51
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62
7	Abkürzungsverzeichnis	78
8	Lebenslauf.....	80
9	Danksagungen	81
10	Erklärung an Eides Statt.....	82

1 Einleitung

1.1 Die Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, meist verursacht durch den Erreger *Mycobacterium tuberculosis*. Zu den Regionen mit der höchsten Tuberkuloseinzidenz und -prävalenz zählen Afrika und Süd-Ost Asien, wohingegen die Meldungen des europäischen Raumes (gemäß WHO: Albanien, Andorra, Armenien, Österreich, Aserbaidschan, Weißrussland, Belgien, Bosnien und Herzegowina, Bulgarien, Kroatien, Zypern, die Tschechische Republik, Dänemark, Estland, Finnland, Frankreich, Georgien, Deutschland, Griechenland, Ungarn, Island, Irland, Israel, Italien, Kasachstan, Kirgistan, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Monaco, Montenegro, die Niederlande, Norwegen, Polen, Portugal, die Republik von Moldawien, Rumänien, Russland, San Marino, Serbien, die Slowakei, Slowenien, Spanien, Schweden, die Schweiz, Tadschikistan, Mazedonien, die Türkei, Turkmenistan, die Ukraine, Großbritannien und Usbekistan) nur 5-10% der weltweiten Gesamtfallzahl betragen (Tab. 1.).

Tab. 1. Geschätzte Tuberkuloseinzidenz, -prävalenz und -mortalität, 2008 (WHO)

WHO Region	Inzidenz ^a		Prävalenz ^b		Mortalität	
	Anzahl in 1.000 (in %)	Pro 100.000 Personen	Anzahl in 1.000	Pro 100.000 Personen	Anzahl in 1.000	Pro 100.000 Personen
Afrika	2.828 (30)	351	3.809	473	385	48
Amerika	282 (3)	31	221	24	29	3
Östliche Mittelmeerregion	675 (7)	115	929	159	115	20
Europa	425 (5)	48	322	36	55	6
Süd-Ost Asien	3.213 (34)	183	3.805	216	477	27
Westpazifik	1.946 (21)	109	2.007	112	261	15
Global	9.369 (100)	139	11.093	164	1.322	20

^aInzidenz: neu aufgetretene Fälle im betrachteten Zeitraum

^bPrävalenz: die zum untersuchten Zeitpunkt existierenden Fälle in der Population.

Gegenwärtig ist etwa ein Drittel der Weltbevölkerung (etwa 2 Milliarden Menschen) mit dem Erreger infiziert und jede Sekunde infiziert sich ein Mensch neu (Sudre et al., 1992). Allein im Jahr 2004 kam es zu 8,9 Millionen Neuinfektionen (WHO, 2007). Die WHO schätzt, dass pro Jahr 1,4 bis 2,8 Millionen Menschen an Tuberkulose versterben, auch hier die meisten in

Afrika und Süd-Ost Asien (Tab. 1., Dye et al., 1999). Dieses Ausmaß wird auf den insuffizienten Gebrauch von effektiven Behandlungsmöglichkeiten, die steigende Anzahl an multiresistenten Erregerstämmen und die Ausbreitung von HIV zurückgeführt (Selwyn et al., 1989; Kochi, 1994). Die Wahrscheinlichkeit eines Infizierten ohne Immunsuppression, während seines Lebens an einer aktiven Tuberkulose zu erkranken, liegt bei 5-10%. Zu den Risikofaktoren, die die Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöhen, gehören vornehmlich eine HIV-Infektion oder andere Immunschwächekrankheiten, aber auch Unterernährung, die Einnahme von immunsuppressiven Medikamenten, Diabetes mellitus, Silikose oder eine Gastrektomie. In Deutschland sind die Erkrankung und der Tod an Tuberkulose nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtig. Dadurch können Umgebungsuntersuchungen eingeleitet werden, die dem Schutz der Bevölkerung vor Ansteckung und weiterer Verbreitung der Erkrankung dienen. Dies trägt auch dazu bei, dass die Fallzahlen in Deutschland seit Jahren fallen.

1.1.1 *M. tuberculosis*: Beschreibung des Erregers

Der Erreger der Tuberkulose wurde im Jahr 1882 von Robert Koch entdeckt. 1934 stellte Seifert ein gereinigtes Isolat her, das die Grundlage für den heutigen Tuberkulintest lieferte (Collins, 1982). Die Bakterien sind obligat aerob lebende säurefeste Stäbchen. Sie besitzen eine mehrschichtige Zellwand, ähnlich der von grampositiven Bakterien, welche zusätzlich Mykolsäuren und Peptidoglykolipidfilamente enthält (Brennan und Nikaido, 1995). Diese Substanzen verleihen den Bakterien eine große Unempfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen (z.B. Austrocknung, chemische Desinfektionsmittel und alkalische Substanzen) und ermöglichen das Überleben in den Phagozyten des Wirtes (Glickman, 2001; Daffé, 1999). Die Bakterien wachsen sehr langsam und teilen sich alle 16 – 20 Stunden (Glickman, 2001; Cole et al., 2002). Die lange Replikationszeit und die Fähigkeit der Mykobakterien ein Dormanzstadium einzunehmen komplizieren die Diagnosestellung und bedingen die langen Behandlungszeiträume (Connolly et al., 2007).

1.1.2 Übertragung von *M. tuberculosis*

Die Übertragung von *M. tuberculosis* erfolgt hauptsächlich auf aerogenem Weg, ist aber auch oral oder hämatogen möglich (Amin, 2006; Jensen et al., 2005). Bei 90% der Erkrankten manifestiert sich die Tuberkulose in der Lunge, da diese die Haupteintrittspforte darstellt (Amin, 2006). Meistens geht die aerogene Übertragung von Erwachsenen aus, da die von Kindern abgehustete Bakterienmenge zu gering ist (paucibazillär = erregerarm). Bei einer offenen Lungentuberkulose sind Bakterien im Sputum nachweisbar, die durch Husten in die

Luft abgegeben werden können (Glickman und Jacobs, 2001). Diese erregerehaltigen Aerosole können mehrere Stunden in der Luft bestehen bleiben (Wells, 1955). Eine Infektion aufgrund von kontaminierter Kuhmilch ist ebenfalls möglich (Thoen und Barletta, 2005). Die Rindertuberkulose wird allerdings durch *M. bovis* hervorgerufen. Früher war daher nicht pasteurisierte Milch eine weit verbreitete Infektionsquelle. Heutzutage sind in den Industrieländern die meisten Rinderbestände tuberkulosefrei und die Milch pasteurisiert, weshalb dieser Übertragungsweg selten geworden ist. Neugeborene stecken sich seltener auf hämatogenem Weg bei der Mutter an (Mnyani und McIntyre, 2011). Häufiger findet die Infektion über das Verschlucken erregerehaltigen Fruchtwassers statt, wenn die Infektion auf die Plazenta übergegriffen hat. Im Falle der Infektion der Geschlechtsorgane der Mutter ist eine Infektion auch während der Geburt möglich (Grenville-Mathers et al., 1960).

1.1.3 Pathogenese

Jede Person, die an offener Tuberkulose erkrankt ist, infiziert pro Jahr zwischen 10 und 15 Menschen (WHO Fact Sheet No. 104, 2010). Nach der Aufnahme von *M. tuberculosis* kommt es nach 4 – 12 Wochen zur Tuberkulinkonversion.

Bei der Tuberkulose unterscheidet man zwischen der Primär- und der Sekundärtuberkulose (Reaktivierung der Tuberkulose). Bei der Erstinfektion gelangen die Erreger auf aerogenem Weg in die Lunge und werden dort von Alveolarmakrophagen phagozytiert. Man spricht von einem Primäraffekt (Manifestation der Infektion an der Eintrittsstelle). Liegt sowohl ein Primäraffekt als auch eine Beteiligung der regionären Lymphknoten vor, so spricht man von einem Primärkomplex. Spezifische T-Zellen induzieren am Infektionsort die Bildung von Granulomen (Details siehe ab 1.2.1), welche charakteristischerweise aus zentral gelegenen Langhans-Riesenzellen, die von Makrophagen und Lymphozyten umgeben sind, bestehen. Es findet jedoch keine vollständige Eradikation der Erreger statt. Die Erreger zeigen dabei eine Reduktion oder Aufhebung ihres Stoffwechsels, wodurch sie besonders wenig Sauerstoff benötigen (Dormanzstadium) (Flynn und Chan, 2001). Die Sekundärtuberkulose entsteht durch die Freisetzung der Bakterien aus den Granulomen. Bei einer hyperergen Abwehrlage kommt es zur zentralen Nekrose der Granulome (verkäsende Nekrose), die durch inflammatorische Zellen verflüssigt werden kann. Haben diese Nekrosen Anschluss an einen Bronchus, so spricht man von einer offenen Tuberkulose. Es können Kavernen entstehen, in denen es zu einer Bakterienvermehrung kommen kann (Bloom and Murray, 1992). Eine anerge Abwehrlage führt zu einer Proliferation der Mykobakterien (Flynn und Chan, 2001), einer hämatogenen Generalisation und Organmanifestation. Zudem ist eine Ausbreitung des Erregers auf lymphogenem oder kanalikulärem Weg in alle Gewebe des Körpers möglich.

Kommt es, zum Beispiel bei erheblicher zellulärer Immunsuppression, zum Ausbleiben der Granulombildung, kann eine foudroyant verlaufende Landouzy-Sepsis auftreten.

1.1.4 Klinik

Je nachdem, in welchem Stadium sich die Infektion befindet, treten unterschiedliche Symptome auf. Im Latenzstadium haben Infizierte in der Regel keine Symptome. Eine aktive Infektion führt zu subfebrilen Temperaturen, Gewichtsabnahme und Nachtschweiß. Müdigkeit, Schwäche und Appetitlosigkeit können hinzukommen. Die Lymphknoten können geschwollen sein, und auch ein ständiger produktiver Husten, der zu Schmerzen in der Brust führen und Atemnot verursachen kann, ist typisch (Dormandy, 1999). Tritt eine länger andauernde Heiserkeit auf, kann das ein Hinweis auf eine Kehlkopftuberkulose sein, die mit einer erhöhten Ansteckungsgefahr einhergeht. Bei Erwachsenen mit einer guten Konstitution können diese Symptome, trotz hoher Infektiosität, gering ausgeprägt sein. Die Infektion kann sich zusätzlich in Form einer Hämoptoe infolge Arrosion kleinerer Gefäße manifestieren. Eine Anämie, Untergewicht oder terminale Kachexie sind weitere Symptome (Dormandy, 1999). Findet aufgrund einer Immunschwäche eine hämatogene oder lymphogene Erregerausbreitung statt, kann eine Miliartuberkulose oder eine tuberkulöse Meningitis entstehen. Da es sich in der Regel um eine basale Meningitis handelt, treten neben den allgemeinen Symptomen wie anfänglicher Verwirrtheit, Wesensveränderungen, Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, Halluzinationen und Krampfanfällen auch basale Hirnnervenläsionen (Hirnnerven II, III, VI und VII) auf. Erfolgt keine adäquate Therapie, fällt der Patient ins Koma und verstirbt. Weitere Organmanifestationen können eine Knochen-, Darm-, Urogenital- und Hauttuberkulose sein.

1.1.5 Diagnostik

Bei der Diagnostik der Tuberkulose steht an erster Stelle die Erhebung der Anamnese. Weitere Anhaltspunkte über eine Infektion durch *M. tuberculosis* liefert das Röntgenbild der Lungen. Ein mottenfraßartiges Erscheinungsbild des Lungenparenchyms ist zwar typisch, eine sichere Unterscheidung zwischen einem Tuberkulosebefall und einer anderen Lungenerkrankungen ist aber nicht immer möglich (Swingler, 2005). Des Weiteren wird ein Tuberkulin-Hauttest nach Mendel-Mantoux durchgeführt (National Institute for Health and Clinical Excellence, 2006; Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society, 1998). Da eine BCG-Impfung oder der Kontakt zu atypischen Mykobakterien zu einer falsch positiven Reaktion (WHO, 2006) und eine Immunsuppression, zum Beispiel durch HIV, zu falsch negativen Resultaten führen kann, ist dieser Test zur alleinigen Diagnostik der

Erkrankung jedoch nicht aussagekräftig (Bloom und Murray, 1992). Der mikroskopische Nachweis des Erregers gelingt mittels Ziehl-Neelsen-Färbung aus dem Sputum des Patienten (International Union against Tuberculosis, 1977). Sichern lässt sich die Diagnose durch den kulturellen Nachweis des Erregers (Pai et al. 2006). Die Erregeranzucht benötigt in Abhängigkeit von der Erregeranzahl in festen Kulturmedien etwa vier bis sechs Wochen, in Flüssigmedien sind die Ergebnisse nach etwa zwei Wochen zu erwarten (Pai et al., 2006). Der Nachweis von erregerspezifischen Nukleinsäuren mittels PCR führt innerhalb weniger Stunden zur Diagnose (Bloom und Murray, 1992; Caws und Drobniewski, 2001), ist aber weniger sensitiv als der kulturelle Nachweis, teuer und technisch aufwändig (National Institute for Health and Clinical Excellence, 2006). Die neuste diagnostische Methode ist die Durchführung eines Interferon-gamma (IFN- γ) Assays. Dieser bestimmt quantitativ die IFN- γ Freisetzung sensibilisierter T-Lymphozyten im Vollblut des Patienten nach in vitro Inkubation mit Antigenen von *M. tuberculosis* (Hauer et al., 2006; Pai et al., 2004; Dheda et al., 2005).

1.1.6 Therapie

Zur Behandlung der Tuberkulose sollte immer eine Kombinationstherapie durchgeführt werden, da sich unter einer Monotherapie schnell Resistenzen ausbilden. Die Behandlung sollte über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten erfolgen, damit es nicht zu Rückfällen kommt (Mitchinson et al., 1956; Mc Cune et al., 1956). Bei Erwachsenen erfolgt in den ersten zwei Monaten eine Kombinationstherapie mit Isoniazid, Ethambutol, Rifampicin und Pyrazinamid, in den folgenden vier Monaten mit Isoniazid und Rifampicin. Bei Kindern wird in den ersten zwei Monaten nur eine Dreifachtherapie ohne Ethambutol appliziert (National Institute for Health and Clinical Excellence, 2006; Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society, 1998; Enarson, 2000; WHO, 2003).

Zeigt das Antibiogramm Resistenzen des Erregers gegen eines der verwendeten Medikamente, so kann die Therapie auf andere Präparate (z.B. Streptomycin) umgestellt werden (NSB Editorial Comment, 2000). Primäre Resistenz ist dabei definiert als die natürliche Resistenz des Mikroorganismus gegenüber dem Medikament ohne vorherige Anwendung, wohingegen sekundäre Resistenz aus der vorangegangenen Anwendung in Rahmen einer ineffizienten Therapie resultiert (Telenti und Iseman, 2000).

Da Rifampicin, Isoniazid und Pyrazinamid zu Leberschäden führen können, Ethambutol zu Schäden des Nervus opticus führen kann und Streptomycin Veränderungen der Niere und des Innenohrs verursachen kann, sollten diese Organe während der Therapie regelmäßig kontrolliert werden. Dies bedeutet, dass eine Kontrolle des Kreatinins, der Transaminasen,

eine ophthalmologische Untersuchung sowie Hörtests erfolgen müssen. Liegen multiresistente Erreger vor, die resistent gegen Rifampicin und Isoniazid sind (Telenti und Iseman, 2000), so muss die pharmakologische Therapie entsprechend der Sensibilität der Erreger modifiziert werden und auch über einen längeren Zeitraum (etwa 21 Monate) erfolgen.

1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, aus denen sich durch Teilung gemeinsame lymphatische und myeloide Vorläuferzellen bilden. Aus letzteren entstehen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, DCs, Erythrozyten und Megakaryozyten. Die DCs wurden 1886 von Paul Langerhans entdeckt. Allerdings ging er damals aufgrund der Morphologie der Zellen davon aus, dass es sich um kutane Nervenzellen handelt. Später wurden die Zellen von Steinmann und Cohn in muriner Milz entdeckt (Steinmann und Cohn, 1973; Steinmann und Cohn, 1974). Sie gaben ihnen aufgrund des baumartigen Aussehens mit ihren zahlreichen langen, fingerförmigen Fortsätzen ihren Namen (griechisch dendros, Baum).

DCs findet man in den lymphatischen und den meisten nicht lymphatischen Organen einschließlich der Dermis und Epidermis, der Mukosa des Gastrointestinaltraktes und im Interstitium von Organen wie Herz, Niere und Lunge. Des Weiteren sind sie im Blut und in der Lymphe vorhanden (Reis e Sousa et al., 1993). Sie gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems und spielen eine essentielle Rolle bei der Induktion T-zellvermittelter Immunantworten. DCs zirkulieren im Blut und wandern in verstärktem Maße in das Gewebe aus, wenn eine Entzündung oder Infektion vorliegt (Steinman, 1991; Ibrahim et al., 1995). Unreife DCs nehmen über Endozytose, Phagozytose oder Makropinozytose Antigene auf. Sie exprimieren in diesem Stadium kaum MHC-Proteine der Klasse II und kostimulierende Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 (siehe Abb. 1.), weshalb sie nur ein geringes T-zellstimulierendes Potential aufweisen (Reis e Sousa et al., 1993; Pure et al., 1990). Nach der Antigenaufnahme wandern die DCs über die afferenten Lymphgefäße in den drainierenden Lymphknoten, was, abhängig vom aufgenommenen Antigen, mit einer funktionellen und phänotypischen Reifung der Zellen verbunden sein kann. Die Fähigkeit, Antigene zu phagozytieren, ist dann reduziert. Allerdings erhöht sich die Kapazität, naive T-Lymphozyten zu stimulieren, durch die vermehrte Expression von MHC-Molekülen der Klasse II (Mellman et al., 1998) und kostimulierenden Molekülen (Steinman, 1991; Guermonperez et al., 2002) (siehe Abb. 1.). Neben CD40, CD80 und CD86 werden auch verstärkt Adhäsionsmoleküle exprimiert (Giacomini et al., 2001).

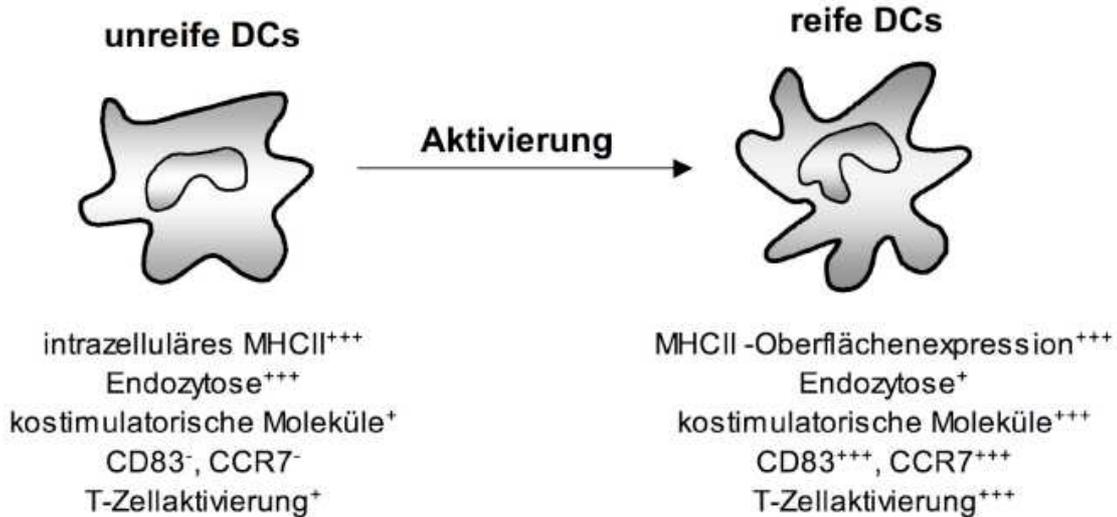


Abb. 1. Eigenschaften von unreifen und durch Aktivierung gereiften DCs

1.2.1 DCs und die Immunantwort gegen *M. tuberculosis*

DCs kommen im Lungengewebe vor und sind an der Immunantwort gegen *M. tuberculosis* beteiligt (Inaba et al., 1993; Henderson et al., 1997). Die Aufnahme der Bakterien in die DCs wird durch die Interaktion des Oberflächenmoleküls DC-SIGN (Tailleux et al., 2003) mit mannosyliertem Lipoarabinomannan ermöglicht. Die Interaktion der Mykobakterien mit Toll-like Rezeptoren (TLR) führt zur Reifung der DCs (Geijtenbeek et al., 2003), die sich durch die Änderung der Oberflächenmoleküle und die Veränderung des Zytokinprofils der Zellen äußert (Hickman et al., 2002; Henderson et al., 1997; Kim et al., 1999). Nach Aktivierung durch *M. tuberculosis* wandern die DCs in die regionären Lymphknoten, sezernieren IL-12, Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α) und IL-1 (Giacomini et al., 2001) und exprimieren vermehrt CD40, CD80, CD86 und MHC-Moleküle der Klasse II. Einzelne Studien haben gezeigt, dass in vivo DCs, die nicht mit *M. tuberculosis* infiziert sind, *M. tuberculosis*-spezifische T-Zellen am effektivsten stimulieren. Im Gegensatz dazu sind mit *M. tuberculosis* infizierte DCs relativ ineffektiv in der Stimulation antigenspezifischer T-Lymphozyten (Wolf et al., 2007). *M. tuberculosis* inhibiert außerdem die Präsentation von Antigenen über MHC-Moleküle der Klasse II, ohne die Expression der Moleküle auf der Zelloberfläche zu vermindern (Wolf et al., 2007).

In In-vitro-Versuchen wurde gezeigt, dass eine Infektion der DCs mit *M. tuberculosis* mit einer gesteigerten IL-12 Sekretion assoziiert ist, wohingegen infizierte Makrophagen vermehrt IL-10 sezernieren. IL-10 bewirkt eine reduzierte IL-12 Produktion und führt somit zu einer Inhibition der zellulären Immunantwort (Hickman et al., 2002; Giacomini et al., 2001). Dies limitiert die Gewebszerstörung (Wallis and Ellner, 1994), die aus der durch IL-12

initiierten Th1 Antwort resultiert. Zudem inhibiert IL-10 die Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen, die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, TNF- α (Ksontini et al., 1998) und IFN- γ (Detanico et al., 2004). IL-10 inhibiert auch die IFN- γ -vermittelte Aktivierung von Monozyten und Makrophagen und die Abtötung aufgenommener Mikroorganismen (Moore et al., 2002). Dies vermindert, wie auch in Experimenten mit IL-10 knockout- oder IL-10 überexprimierenden Mäusen gezeigt, anti-mykobakterielle Immunität (Jacobs et al., 2000; Murray und Young, 1999).

DCs, die mit *M. tuberculosis* infiziert sind, sezernieren IL-12 (Demangel und Britton, 2000), IFN- α , IFN- β (Lande et al., 2003) aber auch IL-23 (Happel et al., 2005), die an der Ausbildung einer Th1 Immunantwort beteiligt sind (Lanzavecchia und Sallusto, 2001). Antigen-spezifische T-Zellen wandern dann über das Blut an den Ort der Infektion und bewirken dort den Einschluss der Bakterien in Granulomen, bei *M. tuberculosis* jedoch keine vollständige Abtötung. Die T-Lymphozyten sezernieren IFN- γ , was zur Aktivierung von Makrophagen und dadurch zur Kontrolle der intrazellulären Replikation führt (siehe Abb.2.). Auch IL-17, welches von Th17 und $\gamma\delta$ T-Zellen produziert wird, stimuliert die Makrophagenaktivierung und beeinflusst die Granulombildung (Kolls und Linden, 2004). Es entsteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Erregerpersistenz und dem aktivierten Immunsystem (Fenton und Vermeulen, 1996; Kaufmann et al., 2003).

Mykobakterien haben die Fähigkeit, in DCs zu überleben und zu replizieren (Bodnar et al., 2001; Mohaghehpour et al., 2000; Tailleux et al., 2003), aber nicht die Eigenschaft, die Wirtszelle abzutöten. Die Persistenz der Mykobakterien in den DCs wird darauf zurückgeführt, dass die Phagosomen, in denen sich die Erreger befinden, nicht mit den Lysosomen fusionieren (Armstrong et al., 1975; Clemens et al., 1995).

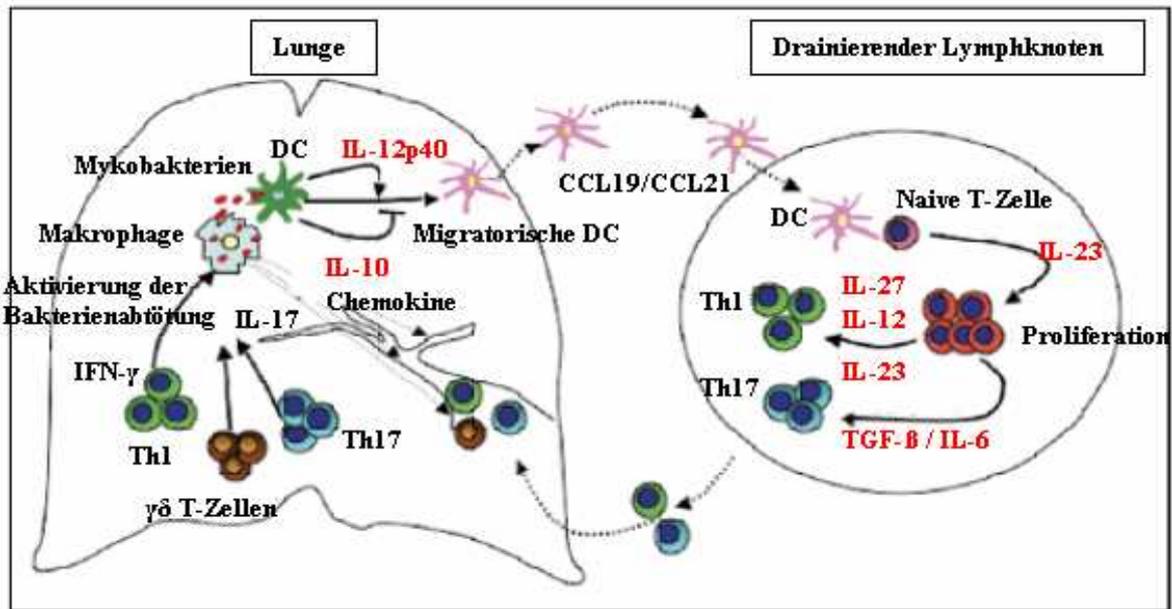


Abb. 2. Die zelluläre Immunantwort bei Infektion mit *M. tuberculosis* (nach Cooper et al., 2007)

Die durch *M. tuberculosis* in der Lunge aktivierten DCs produzieren IL-12p40 und transportieren das aufgenommene Antigen unter dem Einfluss von CCL19 und CCL21 in den drainierenden Lymphknoten. Dort produzieren die DCs IL-23, welches zur Proliferation antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen führt. Vor allem IL-12 aber auch IL-23 und IL-27 fördern die Umwandlung der naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen, TGF-β und IL-6 die Umwandlung zu Th17-Zellen. Die IFN-γ-produzierenden Th1-Zellen stehen in der Lunge in Wechselwirkung mit infizierten Makrophagen und fördern die Bakterienabtötung. Die IL-17 Produktion durch Th17-Zellen hat einen Einfluss auf die Granulombildung, nicht aber auf die bakterielle Belastung. γδ T-Zellen sezernieren ebenfalls IL-17.

1.2.2 IL-12 und IL-23 im Rahmen der Immunantwort gegen *M. tuberculosis*

IL-12 ist ein Heterodimer, welches sich aus einer p35 und einer p40 Untereinheit zusammensetzt, wobei letztere in Kombination mit einer p19 Untereinheit auch IL-23 bildet. IL-12 wird bei vielen Infektionen in der frühen Phase von DCs, aber auch von Makrophagen und B-Zellen produziert. Es aktiviert die zellvermittelte Abwehr (Trinchieri, 2003) und induziert die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten zu Th1-Effektorzellen. Dies spielt eine entscheidende Rolle für die Abtötung intrazellulärer Pathogene wie *M. tuberculosis*. Des Weiteren bewirkt IL-12 die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). IL-12 induziert in Kombination mit TNF-α eine IFN-γ Sekretion von NK-Zellen und T-Zellen (Janeway et al., 2002; Trinchieri, 1995 und 2003; Sieling et al., 2002). Dadurch wird eine Th1-Antwort gefördert und die Infektion eingedämmt. In IL-12p40 defizienten Mäusen ist die Wanderung der DCs in die drainierenden Lymphknoten defekt, und es kommt zu keiner Aktivierung naiver T-Zellen (Khader et al., 2006).

Im Gegensatz zu IL-12 ist die biologische Wirkung von IL-23 bisher nur unzureichend bekannt. Produziert wird IL-23 von aktivierten DCs (Oppmann et al., 2000), aktivierten Makrophagen (Verreck et al., 2004) und aktivierten Monozyten (Lee et al., 2004). IL-23 stimuliert die IL-17 Sekretion CD4⁺ T-Zellen (Aggarwal et al., 2003) aber auch die IFN- γ Sekretion naiver humaner T-Zellen (Oppmann et al., 2000). Des Weiteren stimuliert IL-23 Makrophagen, TNF- α und Stickoxid (NO) zu sezernieren. Außerdem hat IL-23 die Fähigkeit, die IL-12 und IFN- γ Produktion von DCs zu induzieren (Belladonna et al., 2002).

1.2.3 TNF- α im Rahmen der Immunantwort gegen *M. tuberculosis*

TNF- α wird vornehmlich von Makrophagen, aber auch von DCs, B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen gebildet und spielt eine Rolle bei der Apoptose, der Zellaktivierung und Zelldifferenzierung (Old, 1988; Sedgwick et al., 2000). TNF- α fördert die Reifung von DCs und ihre Migration in die regionären Lymphknoten (Banchereau et al., 2000). Es aktiviert Endothelzellen zur Bildung von Adhäsionsmolekülen, welche das Eindringen inflammatorischer Lymphozyten und mononukleärer Phagozyten in den Infektionsherd unterstützen und somit eine entscheidende Bedeutung bei der Eindämmung lokaler Infektionen durch Granulombildung besitzen (siehe Abb. 3.).

Bei der Infektion mit *M. tuberculosis* führt die Freisetzung von TNF- α zu einer Stimulation von Makrophagen, die infolgedessen vermehrt NO produzieren (Bekker et al., 2001). TNF- α ist auch in der Lage, den programmierten Zelltod von mit *M. tuberculosis* infizierten Makrophagen auszulösen (Keane et al., 1997). Dies führt zur Abtötung der Mykobakterien und ermöglicht die Stimulation des erworbenen Immunsystems durch die anschließende Präsentation mykobakterieller Antigene durch DCs (Schaible et al., 2003). Aufgrund dieser Funktionen ist TNF- α essentiell, um das Dormanzstadium einer Infektion mit *M. tuberculosis* aufrecht zu erhalten (Keane et al., 2001; Gomez-Reino et al., 2003; Mohan et al., 2004; Wallis et al., 2004). Die Relevanz dieses Zytokins für die Abwehr einer Infektion durch *M. tuberculosis* wird bei TNF- α defizienten Mäusen offensichtlich, da diese keine Granulome ausbilden (Kindler et al., 1989; Pfeffer et al., 1993) und sehr rasch an einer Infektion mit *M. tuberculosis* versterben (Flynn et al., 1995).

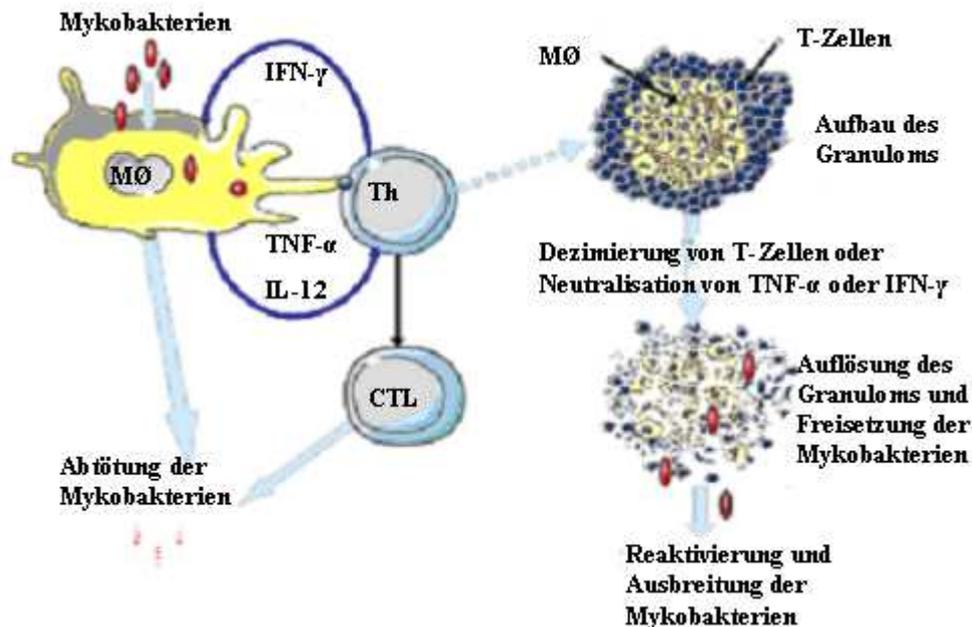


Abb. 3. TNF- α in der Immunreaktion bei Infektion mit *M. tuberculosis* (nach Jacobs et al., 2007)

Durch *M. tuberculosis* aktivierte Makrophagen sezernieren TNF- α und IL-12, aktivieren T-Zellen und töten einen großen Teil der Bakterien ab. TNF- α ist zusammen mit IFN- γ ursächlich an der Granulombildung und der Abtötung der Erreger beteiligt. Die Neutralisation der Zytokine führt zur Aufhebung der Granulombildung und zu einer disseminierten Infektion.

1.3 Antibiotika und ihr immunmodulatorischer Effekt auf Zellen des Immunsystems

Eine große Anzahl von Antibiotika besitzt neben den antimikrobiellen Eigenschaften auch die Fähigkeit, signifikante immunmodulatorische Effekte durch eine Reduktion oder Induktion der Zytokinsekretion hervorzurufen (Morikawa et al., 1996). Dies spielt eine wichtige Rolle für Patienten, die an inflammatorischen Krankheiten leiden und besonders für solche, deren zelluläre Immunität geschwächt ist. Die Bedeutung von Zytokinen und Chemokinen im Verlauf einer Infektion unterstreicht die Wichtigkeit, die Einflüsse von Antibiotika auf die Zytokinproduktion zu untersuchen (Remick et al., 1997).

Für unterschiedliche Fluoroquinolone wurden Effekte auf Zellen des Immunsystems (Monozyten und PBMCs) beschrieben. Fluoroquinolone gehören zu den Gyrasehemmern und damit zu den Antibiotika mit einem breiten antimikrobiellen Spektrum, die unter anderem zur Behandlung von systemischen Infektionen eingesetzt werden (Hooper et al., 1991). Moxifloxacin, welches auch in der Behandlung von Patienten mit Tuberkulose Verwendung findet, reduziert die Produktion von TNF- α und IL-1 α (Araujo et al., 2002) sowie IL-8 und IL-1 β (Weiss et al., 2004) von humanen LPS aktivierten Monozyten in vitro. Trovafloxacin,

ein weiteres Fluoroquinolon, ist ebenso wie Moxifloxacin gegen grampositive und gramnegative aerobe und anaerobe Bakterien wirksam. In einer Studie von Khan et al. (Khan et al., 1998) zeigte sich, dass auch Trovafloxacin die Sekretion von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α durch mit LPS oder Pansorbin aktivierte humane Monozyten signifikant reduziert. Levofloxacin steigert die IL-2 Sekretion und inhibiert die IL-1 β Sekretion von mit Phytohämagglutinin stimulierten humanen PBMCs (Yoshimura et al., 2000), und Grepafloxacin inhibiert die IL-1 α und IL-1 β Sekretion von mit LPS inkubierten humanen PBMCs (Ono et al., 2000). Grepafloxacin inhibiert zudem die TNF- α induzierte IL-8 Expression in humanen Lungeneithelzellen (Hashimoto et al., 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass Ciprofloxacin, Pefloxacin und Ofloxacin in einer Konzentration über 25 $\mu\text{g/ml}$ die TNF- α Produktion von LPS-aktivierten humanen Monozyten dosisabhängig hemmen (Bailly et al., 1990).

Ähnliche Effekte konnten auch für Makrolide gezeigt werden, welche unter anderem zur Behandlung von Patienten mit Infektionen des Respirationstraktes verwendet werden. Erythromycin inhibiert die Zytokinproduktion (IL-12p70, IL-1 β und IL-10) von humanen DCs, die mittels LPS oder Poly (I:C) aktiviert wurden. Des Weiteren ist eine reduzierte Expression von CD54 und CD86 nachweisbar (Yasutomi et al., 2005). Clarithromycin und Azithromycin führen spenderabhängig entweder zu einem Anstieg oder einer Reduktion der Sekretion von IL-6, IL-10, IL-1 β und TNF- α von mit LPS stimulierten humanen Monozyten (Khan et al., 1999). In dieser Arbeit bewirkte Clarithromycin in 71% eine signifikante Suppression und in 29% einen signifikanten Anstieg der TNF- α Sekretion.

Wesentliche Unterschiede in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten und den bisher beschriebenen In-vitro-Systemen liegen in der Art der verwendeten Zellen, da zuvor meist Monozyten oder PBMCs verwendet wurden. DCs wurden lediglich in der Arbeit von Yasutomi et al. (Yasutomi et al., 2005) eingesetzt. Dies ist in sofern von Bedeutung, da bereits in anderen Untersuchungen gezeigt wurde, dass der Effekt von Fluoroquinolonon auf die Zytokinsekretion vom Zelltyp beeinflusst wird (Dalhoff und Shalit, 2003). So haben Stünkel et al. (Stünkel et al., 1991) gezeigt, dass beispielsweise Mausmakrophagen oder über vier Wochen kultivierte humane Monozyten nach Inkubation mit Ciprofloxacin IL-1 sezernieren, während Ciprofloxacin auf die IL-1 Sekretion von Keratinozyten oder frisch isolierten humanen Monozyten keinen Einfluss hat. Des Weiteren spielt die Ko-Stimulation eine wichtige Rolle, da Quinolone allein keinen wesentlichen immunmodulatorischen Effekt auf unstimulierte Zellen gesunder Spender haben. Unterschiedliche Stimuli führen dann wiederum zu unterschiedlichen Effekten bei den untersuchten Zellen (Araujo et al., 2002).

Die Stimulation erfolgte fast ausschließlich durch LPS, aber auch Pansorbin, Phytohämagglutinin und Poly (I:C) wurden verwendet. Eine Stimulierung durch Tuberkuloseantigene erfolgte in den bisher verwendeten In-vitro-Systemen nicht. Da LPS Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien ist und Mykobakterien zu den grampositiven Erregern zählen, ist die Vergleichbarkeit der Stimuli eingeschränkt. Des Weiteren zählten die bislang untersuchten Antiinfektiva vornehmlich zu den Fluoroquinolonen oder Makroliden, während andere Antibiotika nicht untersucht wurden. Dies ist durchaus von Relevanz, da gezeigt werden konnte, dass sogar unterschiedliche Fluoroquinolone verschiedene Effekte auf die Produktion desselben Zytokins haben können (Blau et al., 2006). Moxifloxacin, aber nicht Ciprofloxacin, inhibiert beispielsweise die Sekretion von IL-6 und IL-8 von Bronchialepithelzellen. Zusätzlich beeinflusst die Konzentration der Medikamente deren Effekte. So kann Ciprofloxacin in einer Dosierung, die über der therapeutischen liegt, die IL-1, IL-6 und TNF- α Sekretion reduzieren, während niedrigere Konzentrationen die Produktion dieser Zytokine erhöhen (Bailly et al., 1993).

Die bisherigen In-vitro-Modelle stellen somit ein Vorbild für das in der vorliegenden Arbeit verwendete System dar. In Hinblick auf die zu untersuchenden Fragestellungen sollte eine Stimulation durch mykobakterielle Antigene erfolgen, um anschließend die Effekte von drei Erstlinien-Antituberkulotika und einem Zweitlinien-Antituberkulotikum auf die Reifung und Funktion von DCs zu untersuchen. DCs wurden ausgewählt, da es sich dabei um eine einzelne Zellart handelt, die bei der Induktion zellulärer Immunantworten, z.B. bei Infektion eines Organismus mit *M. tuberculosis*, eine wichtige Rolle spielt.

1.4 Fragestellung

Es wurde beobachtet, dass Antibiotika die Zytokinproduktion unterschiedlich aktivierter DCs oder Monozyten inhibieren oder steigern. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Moxifloxacin die Sekretion von TNF- α und IL-1 α von LPS aktivierten humanen Monozyten reduziert (Araujo et al., 2002). Untersuchungen zum Einfluss von Moxifloxacin auf die Zytokinsekretion von DCs wurden bisher nicht durchgeführt. Moxifloxacin wird als Reserveantibiotikum in der Behandlung einer Infektion mit *M. tuberculosis* eingesetzt. Bisher ist also unklar, ob während der langen Therapie einer Infektion mit *M. tuberculosis* über mindestens 6 Monate, zum Beispiel mit Moxifloxacin, die Funktion von DCs gestört sein könnte. Dieses führte zu folgenden Fragestellungen:

- 1) Führt das verwendete *M. tuberculosis* Antigen (Mtb-Ag) zu einer phänotypischen Reifung der DCs, haben diese anschließend die Fähigkeit, naive T-Zellen zu

stimulieren, und wird deren IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-23 oder TNF- α Sekretion induziert?

- 2) Hat Moxifloxacin, wie zuvor für humane Monozyten beschrieben, einen Einfluss auf die Funktion, insbesondere die Zytokinsekretion, von Mtb-Ag stimulierten DCs?
- 3) Haben Isoniazid, Ethambutol und Rifampicin einen Einfluss auf die phänotypische Reifung der DCs, auf deren Potential, naive T-Zellen zu stimulieren, und induzieren oder inhibieren sie die Zytokinsekretion der Mtb-Ag stimulierten DCs?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Geräte

- Brutschränke (Heraeus, Hanau)
- Durchflusszytometer, FACS Calibur™ (BD Biosciences, Heidelberg)
- Flüssigkeitsszintillationszähler, Tri-Carb®2000CA (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)
- Heraeus-Varifuge RF, Rotortyp 5310 für Röhrchen, Rotortyp 4070 für Platten (Heraeus)
- Lichtmikroskop (Zeiss, Jena)
- Neubauer Zählkammer (Roth, Karlsruhe)
- Sicherheitswerkbank (Heraeus)
- Tischzentrifuge, Biofuge 13 (Heraeus)
- Trockenschrank (Memmert, Schwabach)
- Vortexer, Reamix 2789 (Assistent, Sondheim)
- Wasserbad (Köttermann, Uetze/Hänigsen)
- Zellharvester Titerek™ (Flow Laboratories, McLean, Virginia, USA)

2.1.2 Pipetten und Pipettenzubehör

- Akku-Pipettierhilfe (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
- Multikanalpipette (Costar, NY, USA)
- Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
- Pipetten, Research, 0,5-10 µl, 2,0-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
- Spitzen für Pipetten, Research, 0,1-10 µl, 0,5-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 50-1000 µl (Eppendorf)
- Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml (Falcon®, Wiesbaden)

2.1.3 Zellkultur- und ELISA-Platten

- ELISA-Platten, Immunomodule (Nunc™, Wiesbaden)
- Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen (Nunc™)
- Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen (Nunc™)

- Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen, Flachboden (Nunc™)
- Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen, Rundboden (Nunc™)
- Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen, Spitzboden (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

2.1.4 Röhren

- FACS-Röhren, 12 mm x 75 mm (BD Falcon™)
- Mikro-Schraubenröhren, 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Szintillationsröhren, 6 ml (Perkin Elmer)
- Verdünnungsröhren, Polyesterol, Rundboden (Greiner Bio-One)
- 15 ml Zentrifugenröhren (Nunc™)
- 50 ml Zentrifugenröhren (Nunc™)

2.1.5 Bakterielle Antigene

- Lipopolysaccharid (LPS), *Escherichia coli*, 0111:B4 (Sigma, Taufkirchen)
- *M. tuberculosis* Antigen (Mtb-Ag), 1 µg/µl: Mtb-Ag wurde aus einer Kultur des Stammes H37Rv gewonnen, die in Middlebrook 7H9 Medium gewachsen ist. Die zunächst gefriergetrockneten Bakterien wurden anschließend in PBS sonifiziert. Freundlicherweise von Dr. Timo Ulrichs, Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin, zur Verfügung gestellt

2.1.6 Antikörper

Tab 2. Die verwendeten Antikörper und deren Klon, Fluorchrom und Hersteller

AK	Klon	Fluorchrom	Hersteller
α-CD3	SP34	PE	BD Pharmingen, Heidelberg
α-CD14	MΦP9	PE	Becton Dickinson
α-CD20	L27	PE	Becton Dickinson
α-CD25	2A3	PE	Becton Dickinson
α-CD40	mAb89	PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
α-CD80	L307.4	PE	Becton Dickinson
α-CD83	HB15e	PE	Caltag, Burlingame, CA, USA
α-CD86	2331	PE	BD Pharmingen
α-HLA-DR	L243	FITC/PE	Becton Dickinson
Isotypkontrolle	X40 bzw. X39	FITC/PE	Becton Dickinson

2.1.7 Antituberkulotika

Antituberkulotika der 1. Wahl:

- Ethambutol (Haupt Pharma, Wolfratshausen), verwendet in einer Konzentration von 1 mg/ml
- Isoniazid, Tebesium®-s-100 mg (Sanavita Pharma, Wernigerode), verwendet in einer Konzentration von 1 mg/ml
- Rifampicin, Eremfat 400 mg (Fatol, Schiffweiler), verwendet in einer Konzentration von 1 mg/ml

Antituberkulotika der 2. Wahl:

- Moxifloxacin (Bayer AG, Leverkusen), verwendet in einer Konzentration von 1 mg/ml

2.1.8 Pufferlösungen

EDTA-Puffer

- 1 mM EDTA (Sigma)
- 0,5% BSA (Sigma) in PBS (Biochrom AG, Berlin)

FACS-Fix

- 4% Formaldehyd (Sigma) in PBS

FACS-Puffer

- 5% FCS (Biochrom AG)
- 0,02% Natriumazid (Sigma) in PBS

PBS-T

- 0,05% Tween 20 (Sigma) in PBS

PBST-B

- 0,5% BSA in PBS-T

Substrat-Puffer:

- 12,85 ml Na₂PO₄, 0,2 M (Merck, Darmstadt)
- 12,15 ml Zitronensäure, 1 M (Merck)

- 25 ml Aqua destillata (Fresenius Kabi, Bad Homburg)

2.1.9 Zellkulturmedium

- RPMI 1640 (Gibco BRL, Invitrogen, Karlsruhe)
- 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL, Invitrogen)
- 10 mM HEPES (Gibco BRL, Invitrogen)
- 50 μ M 2-Mercaptoethanol (Sigma)
- 10% FCS (Biochrom AG)

2.1.10 Zytokine

- GM-CSF (Berlex, Wayne, NJ, USA)
- IL-1 β (R&D, Minneapolis, MN, USA)
- IL-4 (R&D)
- IL-6 (R&D)
- PGE2 (Sigma)
- TNF- α (R&D)

2.1.11 Chemikalien

- Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, München)
- Natrium-Ascorbat (Sigma)
- Natriumazid (Sigma)
- Salzsäure (Sigma)
- Schwefelsäure (Sigma)
- Szintillationsflüssigkeit Hionic Fluor (Perkin Elmer)
- Thymidin (Perkin Elmer)
- TMB-Tabletten (Sigma)
- Trypanblau (Biochrom AG)
- Wasserstoffperoxid (Sigma)

2.1.12 Leukozytenkonzentrate

- Leukozytenkonzentrate: Gesunde Spender, Deutsches Rotes Kreuz, Blutspendedienst, Berlin

2.1.13 Materialien zur Zellseparation

- MACS-Mikromagnetpartikel-gekoppelte anti-CD14-Antikörper (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- MACS-Trennsäulen (Miltenyi Biotec)
- MACS-Mikromagnetpartikel-gekoppelte anti-FITC-Antikörper (Miltenyi Biotec)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von PBMCs aus Leukozytenkonzentraten

Für die Gewinnung von PBMCs aus Leukozytenkonzentraten wurden 10 ml Ficoll mit 40 ml Blut in 50 ml Zentrifugenröhrchen überschichtet. Danach wurden die Röhrchen für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 2000 rpm ungebremst zentrifugiert. Die Blutbestandteile ordnen sich dabei entlang ihres Dichtegradienten an. Das Plasma, welches sich als oberste Schicht im Zentrifugenröhrchen sammelt, wurde verworfen. Die PBMCs, die sich in der Interphase anreichern, wurden mit einer Pipette entnommen, in ein weiteres Röhrchen überführt und in PBS resuspendiert. Bei 1700 rpm, 4 °C und Bremse Stufe 5 wurden die Zellen 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde anschließend zweimal bei 1300 rpm wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge Medium resuspendiert. Um die PBMCs zu zählen, wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt und in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. In der Zählkammer wurden 16 Kleinquadrate ausgezählt und die Gesamtzellzahl mit der Formel $n \times \text{Volumen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$ berechnet. Dabei ist n die Zellzahl, die man in 16 Kleinquadraten gezählt hat.

2.2.2 Magnetische Zellseparation von Monozyten und Gewinnung von DCs

Die magnetische Zellseparation dient der Isolierung von Monozyten aus PBMCs, indem die CD14⁺ Zellen durch die Bindung an Mikromagnetpartikel-gekoppelte anti-CD14-Antikörper abgetrennt werden. Dazu wurden die gewonnenen PBMCs 10 Minuten bei 1300 rpm und 4 °C in EDTA-Puffer gewaschen. Anschließend wurden jeweils 1×10^7 PBMCs in 95 µl EDTA-Puffer resuspendiert, 5 µl MACS Mikromagnetpartikel-gekoppelte anti-CD14-Antikörper zugefügt und 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit EDTA-Puffer. Nachdem die MACS-Trennsäulen einmal mit 500 µl EDTA-Puffer gespült wurden, wurde die Zellsuspension aufgetragen. Die Säulenkapazität betrug dabei 1×10^8 Zellen. Anschließend wurden die Säulen noch dreimal mit 500 µl EDTA-Puffer gespült. Die

CD14⁺ Zellen wurden nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld mit 500 µl EDTA-Puffer aus der Säule eluiert und dreimal in Zellkulturmedium gewaschen, um im Anschluss erneut eine Verdünnung mit Trypanblau für die Zellzählung zu erstellen.

Die CD14⁺ Zellen wurden anschließend in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen kultiviert, wobei sich in einer Vertiefung jeweils 3×10^6 Zellen in 3 ml Zellkulturmedium befanden. Den Vertiefungen wurden 1000 U/ml humanes GM-CSF und 100 U/ml humanes IL-4 als Differenzierungsstimulus zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 6 Tage, wobei am zweiten und vierten Tag erneut GM-CSF und IL-4 in der oben beschriebenen Dosis und 200 µl Zellkulturmedium/Plattenvertiefung hinzugefügt wurden. Es standen am sechsten Tag unreife DCs zur Verfügung, die nach der Aktivierung einer FACS-Analyse oder einer gemischten Leukozytenreaktion (Mixed Leukocyte Reaktion, MLR) zugeführt wurden (Abb. 4.).

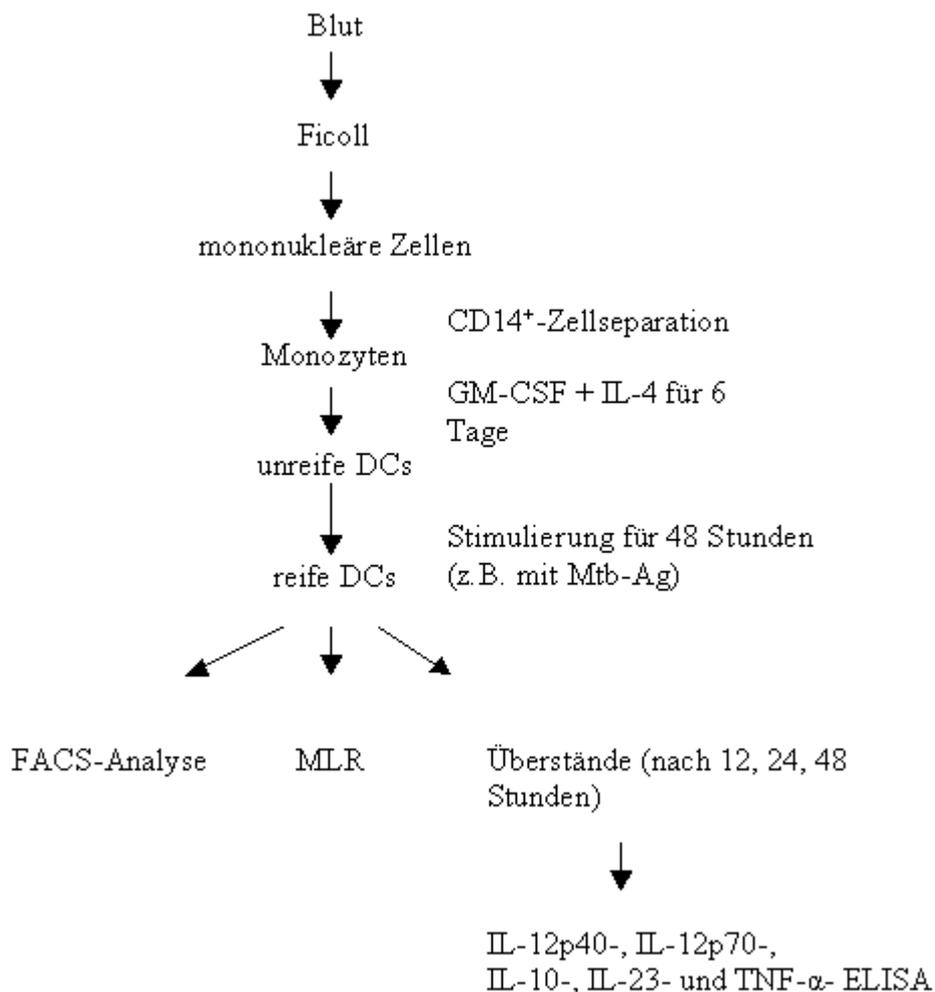


Abb. 4. Prozess zur Gewinnung unreifer und reifer DCs aus monozytären Vorläuferzellen aus peripherem Blut von Menschen und deren weitere Verwendung

2.2.3 Stimulation von DCs mit proinflammatorischen Zytokinen, Mtb-Ag oder LPS

An Tag 6 wurden die unreifen DCs mit einer Dichte von jeweils 5×10^5 in 1,5 ml Zellkulturmedium in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät, wobei für jede Kondition 3-fach-Ansätze angelegt wurden. Die unreifen DCs wurden anschließend mit folgenden Stimuli inkubiert:

- Proinflammatorische Zytokine (1 $\mu\text{g/ml}$ PGE₂, 0,7 $\mu\text{l/ml}$ IL-6, 2 $\mu\text{l/ml}$ IL-1 β und 2 $\mu\text{l/ml}$ TNF- α)
- 10 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-Ag
- 20 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-Ag
- LPS 1 $\mu\text{g/ml}$

In jede Vertiefung wurde zusätzlich zu den Stimuli jeweils 1000 U/ml GM-CSF und 100 U/ml IL-4 pipettiert. Die DCs wurden für 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, wobei nach 12, 24 und 48 Stunden jeweils 500 μl Überstand entnommen und für die spätere Zytokinbestimmung bei -80 °C eingefroren wurden.

An Tag 8 wurden die DCs phänotypisch mittels Durchflusszytometrie analysiert und für die MLR verwendet. Diese Verfahrensweise gilt ebenso für die folgenden Versuche.

2.2.4 Inkubation von DCs mit Mtb-Ag unter dem Einfluss von Antituberkulotika

Nach dem oben genannten Schema (siehe 2.2.3) wurden unreife humane DCs in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und zusätzlich Moxifloxacin (1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ oder 10 $\mu\text{g/ml}$), Isoniazid (1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$), Ethambutol (1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ oder 6 $\mu\text{g/ml}$) oder Rifampicin (5 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$) hinzugefügt. Es wurden jeweils die physiologische Konzentration, eine niedrigere sowie eine doppelt so hohe Konzentration der Antibiotika gewählt.

Das sich im Isoniazid-Präparat als Zusatzstoff befindliche HCl und das sich als Zusatzstoff im Rifampicin-Präparat befindliche Natrium-Ascorbat wurden der Kontrolle in der dem Medikament entsprechenden Konzentration beigefügt.

2.2.5 Magnetische Anreicherung von T-Lymphozyten

Für die Anreicherung von T-Lymphozyten wurden PBMCs wie unter 2.2.1 beschrieben gewonnen und anschließend die HLA-DR negativen Zellen mittels Mikromagnetpartikelgekoppelter Antikörper separiert. Dazu wurden PBMCs mit EDTA-Puffer resuspendiert und anschließend bei 1300 rpm, 4 °C und einer auf Stufe 5 gestellten Bremse 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 1×10^7 PBMCs in 100 μl EDTA-Puffer resuspendiert und

2 $\mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen α -HLA-DR-FITC zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 4 °C in Dunkelheit wurden die Zellen dreimal in EDTA-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (1300 rpm, 4 °C, Bremse Stufe 5, 10 Minuten). Dann wurden jeweils 1×10^7 Zellen mit 90 μl EDTA-Puffer resuspendiert und Mikromagnetpartikel-gekoppelte anti-FITC-Antikörper in einer Konzentration von 10 $\mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei 4 °C in Dunkelheit wurden die Zellen in EDTA-Puffer gewaschen. Dieser Schritt diente der Entfernung der ungebundenen Antikörper. Bevor die Zellen auf die MACS-Säulen pipettiert wurden, wurden diese jeweils einmal mit 500 μl EDTA-Puffer gespült. Anschließend wurde auf jede Säule 1 ml der Zellsuspension pipettiert. Die HLA-DR-negativen Zellen wurden, nachdem sie die Säule passiert hatten, im Zellkulturmedium aufgefangen und dreimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml für die Verwendung im Rahmen der MLR eingestellt.

Für die Reinheitskontrolle der gewonnenen Zellpopulation wurde eine durchflusszytometrische Analyse mit PE-konjugierten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD14, CD20 durchgeführt. Die Reinheit betrug bezogen auf CD3 als T-Lymphozytenmarker $\geq 87\%$.

2.2.6 Allogene MLR

Diese Untersuchung lieferte eine Aussage darüber, in welchem Ausmaß die durch verschiedene Stimuli gereiften und gegebenenfalls mit Antibiotika behandelten DCs die Fähigkeit besitzen, T-Lymphozyten zu aktivieren und ihre Proliferation anzuregen. Da es sich um eine allogene gemischte Leukozytenreaktion handelte, wurden DCs und T-Zellen von unterschiedlichen Spendern verwendet.

DCs wurden nach 48 stündiger Inkubationszeit entnommen und nach der Zählung auf eine Zelldichte von 5×10^4 /ml eingestellt. Für jede Reifungskondition wurden die DCs in absteigenden Zahlenverhältnissen mit 2×10^5 T-Zellen in einer Flachbodenzellkulturplatte mit 96 Vertiefungen inkubiert. In 3-fach-Ansätzen wurden 100 μl der jeweiligen DC-Verdünnung zu 100 μl der T-Zellsuspension gegeben. Als Kontrolle wurden 5×10^3 DCs und 2×10^5 T-Zellen/Vertiefung in 200 μl Zellkulturmedium allein inkubiert (ebenfalls je drei Vertiefungen). Die Zellkulturplatte wurde anschließend für fünf Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bevor jeder Vertiefung 1 μCi tritiummarkiertes Thymidin zugesetzt wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Platteninhalt mit einer Pumpe auf Filtermatten (MP Biomedicals, ICN, Solon, OH, USA) überführt und diese für mindestens 90 Minuten in einem Trockenschrank bei 55 °C getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit in Szintillationsröhrchen überführt. Die Thymidininkorporation, die

proportional zur T-Zellproliferation ist, wurde abschließend im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Identifizierung und Trennung von Zellen aufgrund ihrer Oberflächenantigene. Dazu werden die Zellen zunächst mit Antikörpern inkubiert, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert wurden (siehe 2.1.6). Dann werden die Zellen durch eine Kapillare gedrückt, in der der Strom von Einzelzellen durch einen Laser erfasst wird. Fotodetektoren messen die durch die Zellen ausgesendete Lichtstreuung und können dadurch die relative Größe (FSC), die relative Granuliertheit (SSC) sowie die spezifische Fluoreszenz (FL1 und FL2) und relative Fluoreszenzintensität einer Zelle bestimmen und aufzeichnen. Dabei wird das Vorwärtsstreulicht durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die Granuliertheit beeinflusst. Die Phänotypisierung von DCs ermöglicht eine Aussage über deren Aktivierung durch die eingesetzten Stimuli. Hierfür werden mittels Durchflusszytometrie das Vorkommen und die Häufigkeit von einzelnen Oberflächenstrukturen mittels Fluoreszenz gemessen. Diese ist proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper.

Die DCs wurden zunächst mit FACS-Puffer resuspendiert und bei 1300 rpm, 4 °C zehn Minuten lang zentrifugiert, die Bremse wurde auf Stufe 5 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und jeweils 50 µl davon in eine Vertiefung einer Spitzbodenplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Insgesamt wurden acht Vertiefungen pro Kondition befüllt. Die erste erhielt 1 µl der Isotypkontrolle und diente als Maß für die nicht antigenspezifische Antikörperbindung. In die zweite bis achte Vertiefung wurden 0,5 µl des Antikörpers α -HLA-DR-FITC pipettiert und in die Vertiefungen drei bis acht zusätzlich 1 µl der PE-konjugierten Antikörper α -CD14, α -CD25, α -CD40, α -CD80, α -CD83 und α -CD86. Die Platten wurden anschließend für mindestens 30 Minuten bei 4 °C unter Lichtabschluss inkubiert, bevor sie mit FACS-Puffer drei Minuten (2200 rpm, 4 °C, Bremse Stufe 5) zentrifugiert wurden. Die Platten wurden noch zweimal gewaschen und 100 µl FACS-Fix in jede Vertiefung pipettiert. Im Anschluss erfolgte die Messung im Durchflusszytometer und die Analyse. Dazu diente die Software Cell Quest Pro 4.0.1™.

2.2.8 Zytokinnachweis mittels ELISA

Die Bestimmung der Zytokine IL-12p40, IL-12p70, IL-10, IL-23 und TNF- α erfolgte aus den Zellkulturüberständen der unterschiedlich stimulierten DCs. Diese zellfreien Überstände wurden nach der Entnahme bis zur Quantifizierung mittels ELISA bei -80 °C aufbewahrt. Es

wurden kommerziell erhältliche Sandwich-ELISA-Kits (IL-12p40, IL-12p70 und IL-10: U CyTech Biosciences, Utrecht, Niederlande; IL-23: eBioscience, San Diego, CA, USA und TNF- α : Diaclone, Besançon Cédex, Frankreich) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung unreifer humaner DCs mittels Mtb-Ag

Um zunächst zu bestimmen, ob Mtb-Ag DCs aktiviert, wurden unreife DCs für 48 Stunden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ oder 20 $\mu\text{g/ml}$ des Mtb-Ag inkubiert und anschließend der Phänotyp der Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Negativkontrolle dienten DCs, die nur in Medium inkubiert wurden, als Positivkontrolle wurden mit LPS stimulierte DCs verwendet. Sowohl 10 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-Ag als auch 20 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-Ag verursachten eine vergleichbar vermehrte Expression der reifungsrelevanten Oberflächenmoleküle im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 5.).

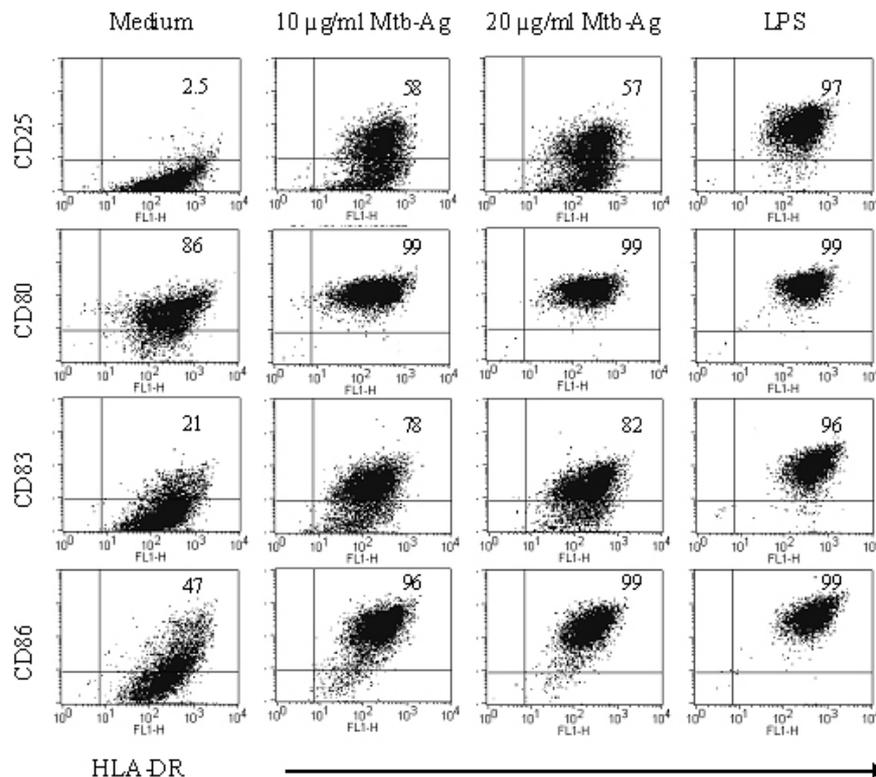


Abb. 5. Mtb-Ag aktiviert humane DCs.

Nach 48-stündiger Stimulation mit LPS oder Mtb-Ag (10 $\mu\text{g/ml}$ oder 20 $\mu\text{g/ml}$) wurden die DCs durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen geben die prozentualen Anteile CD25-, CD80-, CD83-, CD86- und HLA-DR-doppeltpositiver Zellen an. Vergleichbare Ergebnisse wurden in zwei weiteren Experimenten mit DCs von verschiedenen humanen Spendern erzielt.

Im Vergleich zu den mit LPS aktivierten DCs wurde CD25 in den drei Experimenten auf den mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-Ag aktivierten DCs um 40 bis 85% und auf den mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-Ag aktivierten DCs um 40 bis 80% weniger exprimiert. CD83 wurde auf den mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-

Ag aktivierten DCs um 19 bis 65% und auf den mit 20 µg/ml Mtb-Ag aktivierten DCs um 15 bis 47% weniger exprimiert. Bei CD80 wurde ein vergleichbarer Expressionsanstieg auf den DCs, die mit Mtb-Ag oder LPS inkubiert worden waren, beobachtet. Der Expressionsanstieg von CD86 war auf den DCs, die mit 20 µg/ml Mtb-Ag inkubiert worden waren, vergleichbar mit demjenigen von Zellen, die mit LPS aktiviert wurden. Unter Anwendung von 10 µg/ml Mtb-Ag fiel der Expressionsanstieg minimal geringer aus. Mtb-Ag induziert in den verwendeten Konzentrationen eine phänotypische Reifung unreifer DCs, die bezüglich CD25 und CD83 jedoch schwächer ist als nach LPS-Stimulation.

Die T-zellstimulierende Kapazität Mtb-Ag-aktivierter DCs wurde in MLRs bestimmt. Dafür wurden zuvor mit Mtb-Ag stimulierte, durch LPS aktivierte oder allein in Medium inkubierte DCs mit allogenen T-Zellen für 5 Tage inkubiert. DCs, die entweder mit 10 µg/ml oder 20 µg/ml Mtb-Ag aktiviert wurden, verursachten gleichermaßen eine stärkere T-Zellproliferation als DCs der Negativkontrolle und eine vergleichbare mit derjenigen, die durch LPS-aktivierte DCs induziert wurde (Abb. 6.). Hinsichtlich ihres T-zellstimulierenden Potentials unterschieden sich somit Mtb-Ag-stimulierte DCs nicht von LPS-aktivierten DCs.

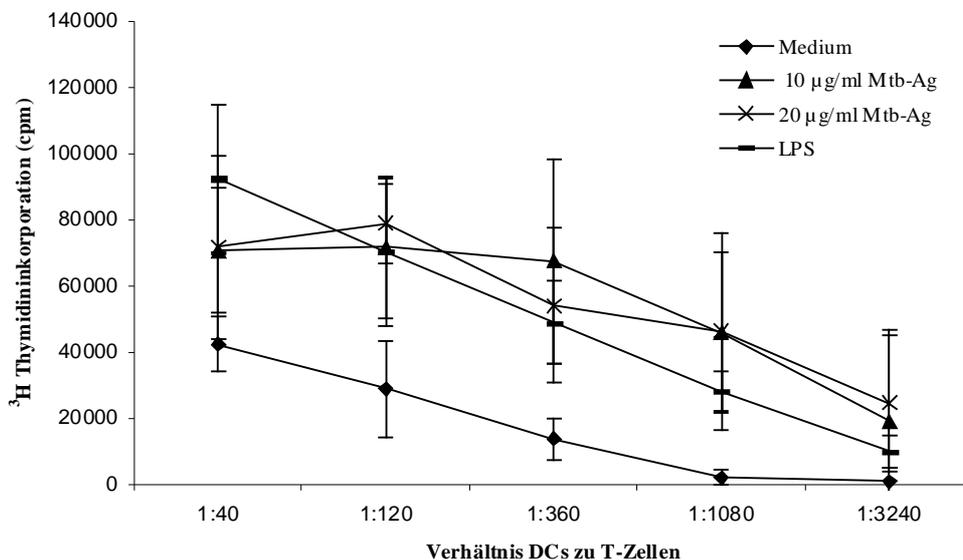


Abb. 6. T-Zellstimulierung durch Mtb-Ag oder LPS aktivierte DCs.

Die mit 10 µg/ml, 20 µg/ml oder LPS aktivierten DCs wurden in absteigenden Zahlenverhältnissen mit 2×10^5 T-Lymphozyten für 5 Tage koinkubiert bevor tritiummarkiertes Thymidin zugesetzt wurde. Nicht stimulierte DCs desselben Spenders dienten als Negativkontrolle. Am 6. Tag wurde die T-Zellproliferation durch ^3H Thymidininkorporation gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Um den Effekt von Mtb-Ag auf die Zytokinproduktion von DCs zu untersuchen, wurden in den Überständen von DCs, die 48 Stunden durch Mtb-Ag (10 µg/ml oder 20 µg/ml) stimuliert wurden, die Konzentrationen von IL-12p40, IL-12p70, TNF- α , IL-10 und IL-23 mittels ELISA bestimmt.

Mtb-Ag induzierte die Produktion von IL-12p40, wobei 20 µg/ml Mtb-Ag eine etwa doppelt so starke Sekretion bewirkte wie 10 µg/ml Mtb-Ag (Abb. 7.). Nach Aktivierung der DCs mit 10 µg/ml oder 20 µg/ml Mtb-Ag konnte die maximale IL-12p40 Sekretion nach 48 Stunden gemessen werden. Die Werte waren jedoch zu jedem Zeitpunkt geringer als die LPS-aktivierter DCs. IL-12p70 wurde von den mit Mtb-Ag stimulierten DCs nicht produziert. Lediglich LPS induzierte, wie in der Literatur beschrieben (Khayrullina et al., 2008), eine IL-12p70 Sekretion der DCs (Daten nicht gezeigt).

Da IL-12p70 und IL-23 mit IL-12p40 eine gemeinsame Untereinheit besitzen, wurde auch untersucht, ob ein Teil des gemessenen IL-12p40 als IL-23 sezerniert wurde. Weder 10 µg/ml noch 20 µg/ml Mtb-Ag induzierten eine nennenswerte IL-23 Sekretion (Daten nicht gezeigt).

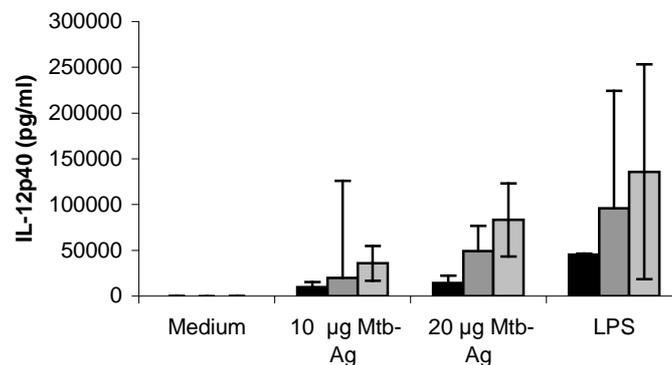


Abb. 7. Mtb-Ag induziert die Sekretion von IL-12p40 durch DCs.

Unreife humane DCs wurden über 48 Stunden mit Mtb-Ag oder LPS stimuliert und die IL-12p40 Produktion nach 12 Stunden (schwarze Säulen), 24 Stunden (dunkelgraue Säulen) und 48 Stunden (hellgraue Säulen) in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei Experimente, die mit DCs unterschiedlicher Spender durchgeführt wurden.

Mtb-Ag induzierte auch die Sekretion von TNF- α , wobei die Stimulation mit 20 µg/ml des Mtb-Ag wiederum eine etwa doppelt bis dreimal so starke TNF- α Sekretion bewirkte wie die durch 10 µg/ml (Abb. 8.). Die maximale TNF- α Sekretion konnte dabei nach 12 Stunden gemessen werden. Die TNF- α Produktion der mit Mtb-Ag stimulierten DCs war zu jedem Zeitpunkt geringer als diejenige LPS-aktivierter DCs.

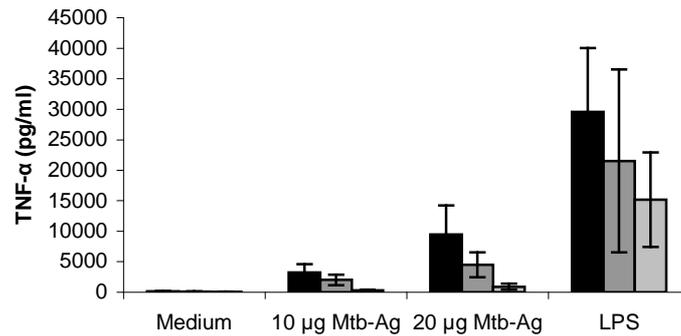


Abb. 8. Mtb-Ag induziert die TNF- α Sekretion von humanen DCs.

Unreife humane DCs wurden über 48 Stunden mit Mtb-Ag oder LPS aktiviert. In den nach 12 Stunden (schwarze Säulen), 24 Stunden (dunkelgraue Säulen) und 48 Stunden (hellgraue Säulen) entnommenen Zellkulturüberständen wurde anschließend die TNF- α Konzentration mittels ELISA gemessen. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei Versuche, die mit DCs unterschiedlicher Spender durchgeführt wurden.

Mtb-Ag aktivierte DCs sezernierten ebenfalls mehr IL-10 als in Medium inkubierte DCs (Abb. 9.). Die Stimulation der DCs mit 20 µg/ml Mtb-Ag induzierte auch hier eine etwa doppelt so starke IL-10 Sekretion im Vergleich zu 10 µg/ml Mtb-Ag. Beide Konzentrationen induzierten die maximale IL-10 Sekretion nach 12 Stunden.

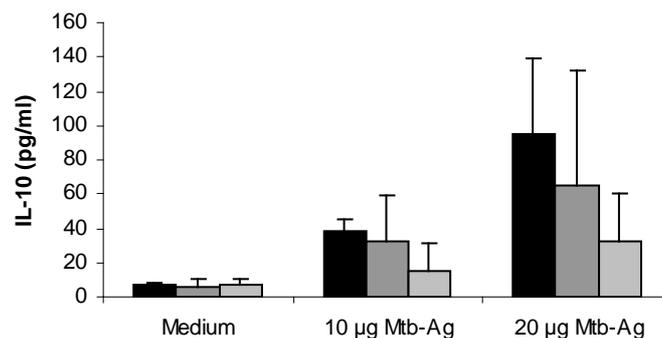


Abb. 9. Induktion der IL-10 Sekretion durch Stimulation humaner DCs mit Mtb-Ag.

Während der Stimulation unreifer DCs mit Mtb-Ag wurden nach 12 Stunden (schwarze Säulen), 24 Stunden (dunkelgraue Säulen) und 48 Stunden (hellgraue Säulen) Überstände entnommen und anschließend die IL-10 Konzentration mittels ELISA analysiert. Das Ergebnis ist repräsentativ für die drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche.

Da 20 µg/ml Mtb-Ag eine stärkere Induktion der IL-12p40-, TNF- α - und IL-10 Sekretion verglichen mit 10 µg/ml Mtb-Ag bewirkte, wurden alle Folgeversuche mit dieser Konzentration durchgeführt.

3.2 Moxifloxacin inhibiert die Expression von CD25 und CD83 sowie die Sekretion von IL-12p40, TNF- α und IL-10 von Mtb-Ag stimulierten DCs

In verschiedenen Studien wurde zuvor der inhibierende Einfluss von Moxifloxacin auf die Sekretion von TNF- α , IL-1, IL-8 und IL-12 von mit LPS stimulierten Monozyten gezeigt (Araujo et al. 2002; Weiss 2004). Um zu untersuchen, ob Moxifloxacin auch die durch Mtb-Ag induzierte DC-Aktivierung inhibiert, wurden DCs mit 20 µg/ml Mtb-Ag stimuliert und mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml inkubiert. Die gewählten Konzentrationen orientierten sich an der Publikation von Araujo et al. (Araujo et al., 2002). Hier wurde jeweils die physiologische Konzentration des Antibiotikums im Organismus, sowie eine fünfmal niedrigere und eine doppelt so hohe eingesetzt.

Bezüglich der phänotypischen Reifung der DCs zeigten sich in der Durchflusszytometrie sowohl bei den allein mit den Mtb-Ag aktivierten DCs als auch bei den Zellen, die zusätzlich mit Moxifloxacin inkubiert wurden, eine deutlich vermehrte Präsentation der Oberflächenmoleküle CD25, CD80, CD83 und CD86 gegenüber der Negativkontrolle (Abb. 10.). Die Expression von CD25 und CD83 war bei den allein mit Mtb-Ag stimulierten DCs jedoch stärker als bei den zusätzlich mit Moxifloxacin inkubierten Zellen, wobei die Expressionsstärke umso niedriger war, je mehr Moxifloxacin eingesetzt wurde. CD25 wurde bei Inkubation mit 10 µg/ml Moxifloxacin zu 42 bis 55% weniger exprimiert. Eine Kultivierung mit 1 µg/ml Moxifloxacin verursachte noch eine Reduktion von 20 bis 35%. CD83 wurde auf den DCs, die mit 10 µg/ml Moxifloxacin inkubiert wurden, um 45 bis 75% weniger exprimiert als auf den DCs der Positivkontrolle. Moxifloxacin bewirkt somit eine konzentrationsabhängige Reduktion von CD25 und CD83 auf mit Mtb-Ag aktivierten DCs.

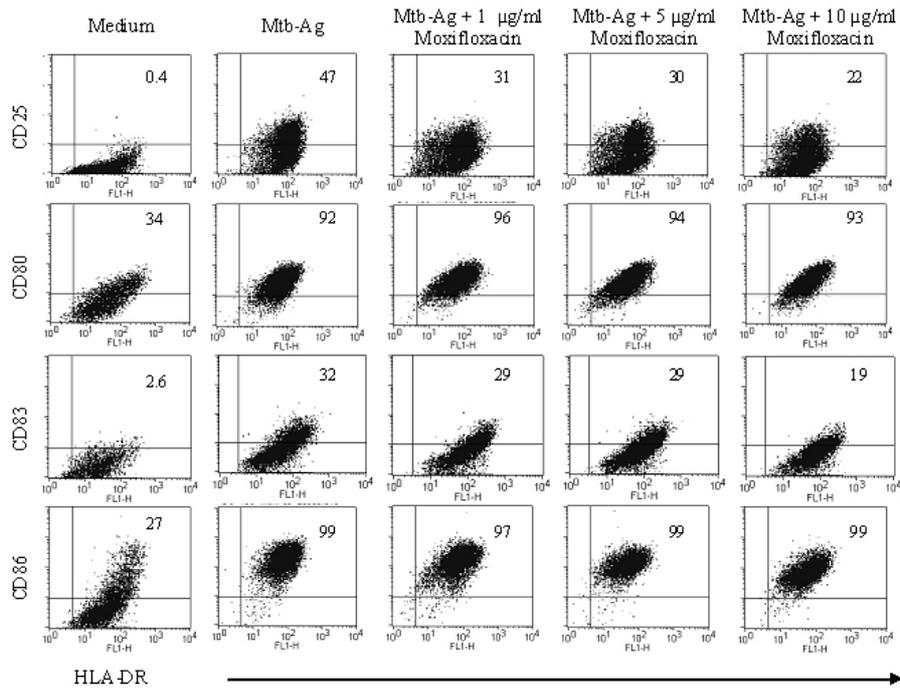


Abb. 10. Moxifloxacin reduziert die Expression von CD25 und CD83 auf Mtb-Ag aktivierten DCs.

Nach 48-stündiger Stimulation mit Mtb-Ag allein oder zusätzlich mit Moxifloxacin (1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml) wurden die DCs durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen geben die prozentualen Anteile CD25-, CD80-, CD83-, CD86- und HLA-DR-doppelpositiver Zellen an. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Bei der Untersuchung des T-zellstimulierenden Potentials der verschieden stimulierten DCs zeigten sich nahezu übereinstimmende Ergebnisse für nur mit Mtb-Ag aktivierte und für zusätzlich mit Moxifloxacin inkubierte DCs (Abb. 11.). Diese Werte lagen stets über denen der Negativkontrolle. Das T-zellstimulierende Potential Mtb-Ag aktivierter humaner DCs wird somit durch Inkubation mit Moxifloxacin nicht inhibiert.

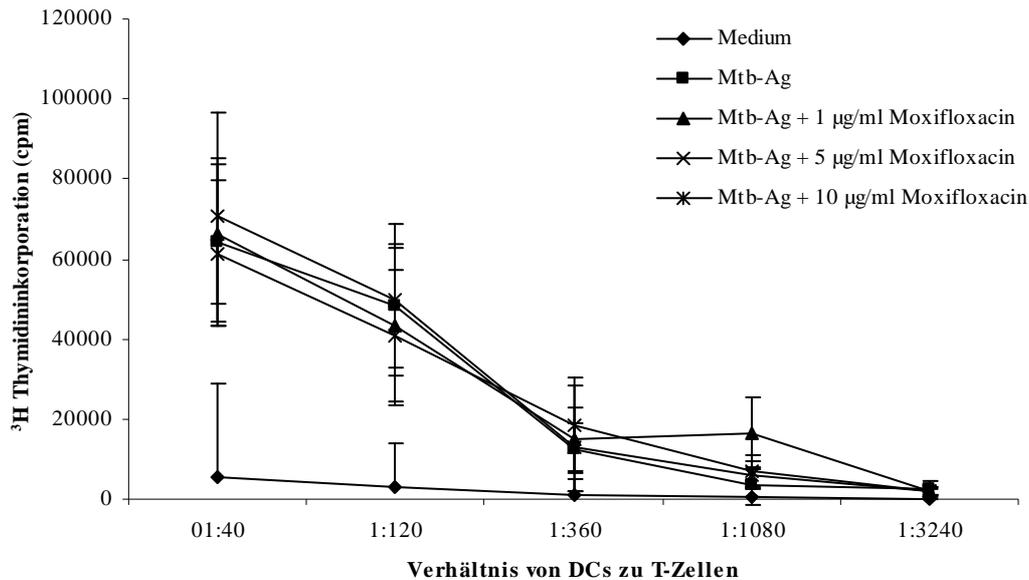


Abb. 11. Moxifloxacin inhibiert nicht das T-zellstimulierende Potential Mtb-Ag aktivierter DCs.

Unreife DCs wurden 48 Stunden mit Mtb-Ag oder zusätzlich mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml Moxifloxacin inkubiert und anschließend in absteigenden Zahlenverhältnissen mit 2×10^5 T-Lymphozyten koinkubiert. Nicht stimulierte DCs desselben Spenders dienten als Negativkontrolle. Am 6. Tag wurde die T-Zellproliferation durch ^3H Thymidininkorporation gemessen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

Um den Effekt von Moxifloxacin auf die Zytokinproduktion Mtb-Ag-aktivierter DCs zu untersuchen, wurden den über 48 Stunden mit Medium, Mtb-Ag allein oder zusätzlich mit Moxifloxacin inkubierten DCs nach 12, 24 und 48 Stunden Überstände entnommen und die Konzentrationen von IL-12p40, IL-12p70, TNF- α , IL-10 und IL-23 mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt von Moxifloxacin auf die durch Mtb-Ag induzierte IL-12p40 Sekretion (Abb.12.A). Die maximale Zytokinproduktion wurde wieder nach 48 Stunden gemessen. Bezogen auf die Werte nach 48 Stunden wurde die IL-12p40 Sekretion durch Inkubation mit 1 µg/ml Moxifloxacin um 33% und bei 5 µg/ml Moxifloxacin um 60 bis 67% reduziert. Die mit 10 µg/ml Moxifloxacin kultivierten DCs sezernierten zwischen 67 und 85% weniger IL-12p40 als die allein mit Mtb-Ag aktivierten DCs. Die IL-12p40 Konzentrationen der mit Mtb-Ag aktivierten und mit Moxifloxacin koinkubierten DCs lagen zu jedem Zeitpunkt über den Werten der allein in Medium kultivierten DCs. Das durch Mtb-Ag inkubierte DCs sezernierte IL-12p40 lag auch unter dem Einfluss von Moxifloxacin nicht als IL-12p70 oder IL-23 vor (Daten nicht gezeigt).

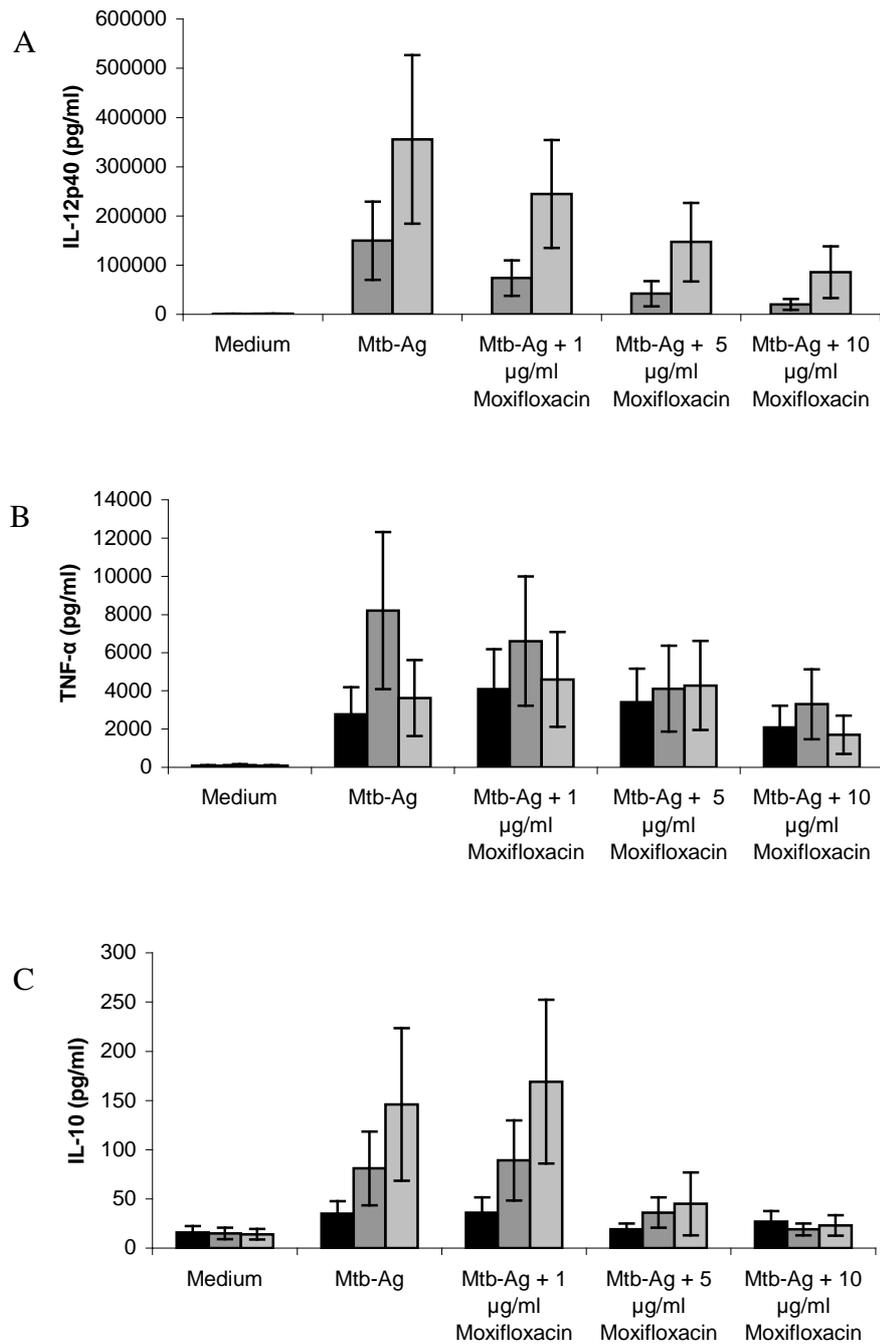


Abb. 12. Hemmung der IL-12p40, TNF- α und IL-10 Produktion von Mtb-Ag stimulierten DCs durch Moxifloxacin.

Die im ELISA analysierten Überstände der mit Mtb-Ag allein oder zusätzlich mit Moxifloxacin inkubierten DCs wurden nach 12 Stunden (schwarze Säulen), 24 Stunden (dunkelgraue Säulen) und 48 Stunden (hellgraue Säulen) entnommen. Aufgrund der geringen IL-12p40 Sekretion der DCs nach 12 Stunden sind hier nur die Werte nach 24 und 48 Stunden gezeigt. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei vergleichbaren Ergebnissen.

Moxifloxacin inhibierte auch die Induktion der TNF- α Sekretion von mit Mtb-Ag aktivierten DCs (Abb. 12.B). DCs, die nur mit Mtb-Ag reiften, zeigten die stärkste TNF- α Produktion. DCs, die in der Gegenwart von 1 $\mu\text{g/ml}$ Moxifloxacin aktiviert wurden, produzierten 20 bis 35% weniger TNF- α . Bei Inkubation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Moxifloxacin wurde die TNF- α Sekretion um 20-90% reduziert, bei Inkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Moxifloxacin um 30-90%. Die maximale TNF- α Sekretion wurde bei zwei Versuchen nach 12 Stunden, bei einem jedoch nach 24 Stunden gemessen. Ob dieser Unterschied auf der Verwendung eines neuen Mtb-Ag oder auf den verwendeten DCs beruhte, ist unklar. Individuenspezifische Unterschiede von Monozyten bei Inkubation mit anderen Antibiotika wurden bereits in früheren Untersuchungen gezeigt (Khan et al., 1999). Die IL-10 Produktion wurde ebenfalls durch Moxifloxacin inhibiert (Abb. 12.C). Die Inkubation der mit Mtb-Ag aktivierten DCs mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Moxifloxacin reduzierte die IL-10 Sekretion um 30-70%, die Inkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Moxifloxacin um 30-85%.

3.3 Isoniazid reduziert die Expression von CD25, hat jedoch keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion Mtb-Ag aktivierter DCs

Unreife humane DCs wurden mit Mtb-Ag aktiviert und zusätzlich mit Isoniazid (1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ oder 6 $\mu\text{g/ml}$) koinkubiert. Wieder wurde die physiologische sowie eine dreifach niedrigere und eine doppelt so hohe Konzentration des Antibiotikums gewählt. Da in diesem Falle ein handelsübliches Medikament eingesetzt wurde, wurde der in dem Präparat enthaltene Zusatzstoff (HCl) der Positivkontrolle zugesetzt, um einen möglichen Einfluss auszuschließen.

CD25 wurde auf den DCs, die zusätzlich zu Mtb-Ag mit 6 $\mu\text{g/ml}$ Isoniazid inkubiert wurden, zwischen 16 und 45% weniger exprimiert als auf den DCs der Positivkontrolle (Abb. 13.). Bei den niedrigeren Isoniazidkonzentrationen wurde dieser Effekt nicht gesehen. Durchflusszytometrisch zeigten sich bei CD80 und CD86 nahezu gleiche Expressionsstärken auf der Oberfläche der DCs, die zuvor mit Mtb-Ag und HCl oder zusätzlich mit Isoniazid in den gewählten Konzentrationen aktiviert wurden. Die CD83 Expression der Mtb-Ag inkubierten DCs wurde durch 3 $\mu\text{g/ml}$ oder 6 $\mu\text{g/ml}$ Isoniazid nicht beeinflusst, bei den DCs, die zusätzlich mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Isoniazid kultiviert wurden konnte kein einheitlicher Effekt festgestellt werden. Ob es sich dabei um einen spenderabhängigen Effekt handelt muss in nachfolgenden Untersuchungen gezeigt werden. Isoniazid hat somit keinen Effekt auf die Expression von CD80, CD83 oder CD86, inhibiert aber in hoher Konzentration die Expression von CD25.

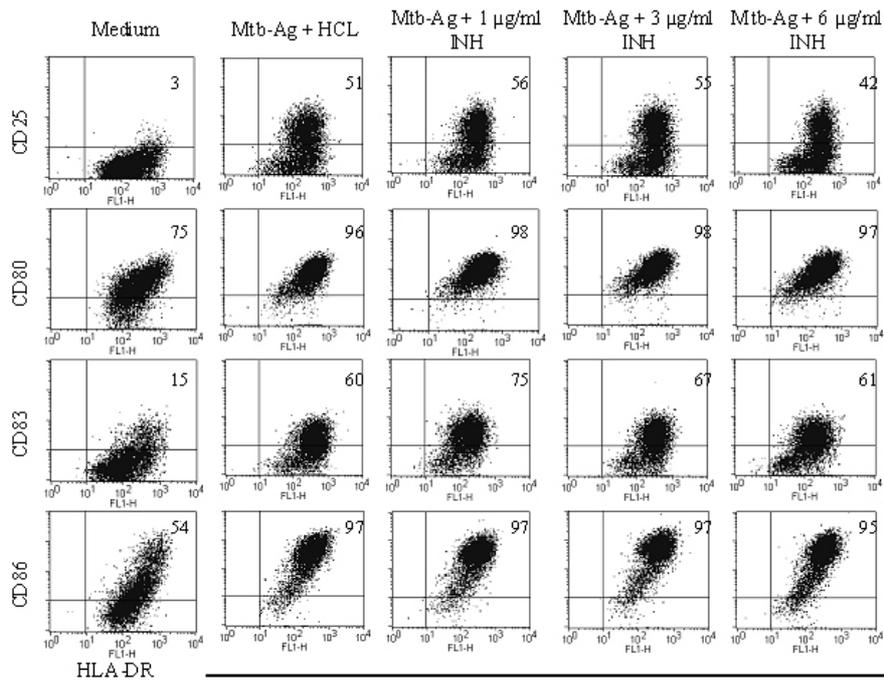


Abb. 13. Isoniazid (6 µg/ml) inhibiert die Expression von CD25 der mit Mtb-Ag stimulierten DCs.

Nach 48-stündiger Stimulation mit Mtb-Ag und HCL oder mit Isoniazid (1 µg/ml, 3 µg/ml oder 6 µg/ml) wurden die DCs durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen geben die prozentualen Anteile CD25-, CD80-, CD83-, CD86- und HLA-DR-doppeltpositiver Zellen an. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

In der MLR wurde das T-zellstimulierende Potential der mit Mtb-Ag oder zusätzlich mit Isoniazid inkubierten DCs untersucht und nahezu übereinstimmend hohe Thymidininkorporationen gemessen (Abb. 14.). Somit beeinflusste die Inkubation der DCs mit Isoniazid nicht ihr T-zellstimulierendes Potential.

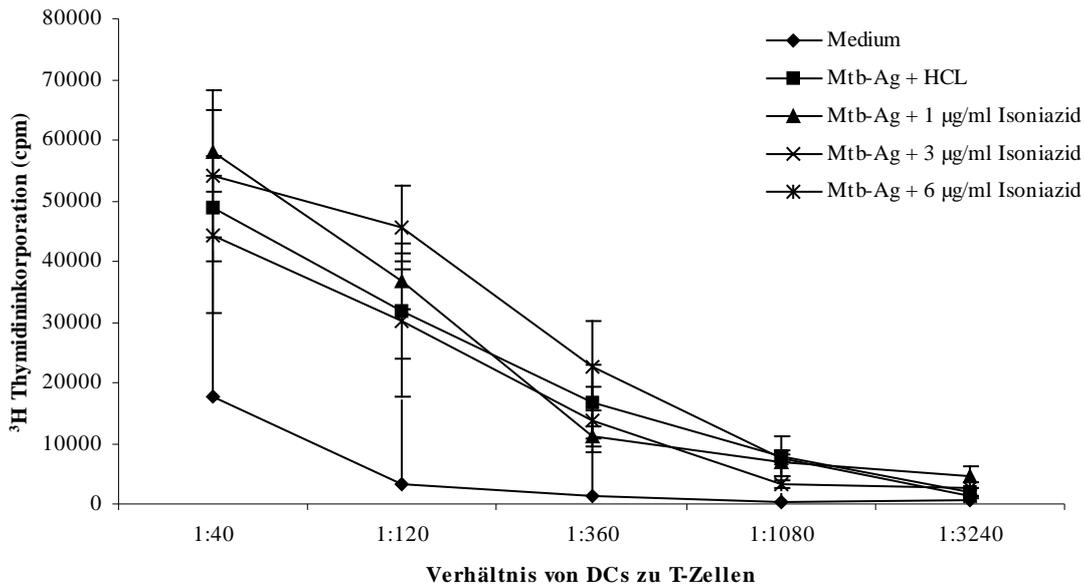


Abb. 14. Isoniazid hat keinen Einfluss auf das T-zellstimulierende Potential der durch Mtb-Ag aktivierten DCs.

Unreife DCs wurden 48 Stunden mit Mtb-Ag und zusätzlich mit HCl oder 1 µg/ml, 3 µg/ml oder 6 µg/ml Isoniazid inkubiert und anschließend in absteigenden Zahlenverhältnissen mit 2×10^5 T-Lymphozyten koinkubiert. Nicht stimulierte DCs desselben Spenders dienten als Negativkontrolle. Am Tag 6 wurde die T-Zellproliferation durch ^3H Thymidininkorporation gemessen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

Um zu untersuchen, ob Isoniazid einen Einfluss auf die Zytokinproduktion Mtb-Ag aktivierter DCs hat, wurden die Zellen mit 1 µg/ml, 3 µg/ml oder 6 µg/ml Isoniazid inkubiert. Hinsichtlich der Sekretion von IL-12p40, TNF- α und IL-10 zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den allein mit Mtb-Ag stimulierten und den zusätzlich mit Isoniazid inkubierten DCs (Abb.15.A, B und C). Dies zeigt, dass Isoniazid in den eingesetzten Konzentrationen die Sekretion von IL-12p40, TNF- α und IL-10 durch DCs weder inhibiert noch steigert. Isoniazid hatte in keiner der eingesetzten Konzentrationen einen Einfluss auf die Sekretion von IL-12p70 oder IL-23 von Mtb-Ag stimulierten DCs (Daten nicht gezeigt).

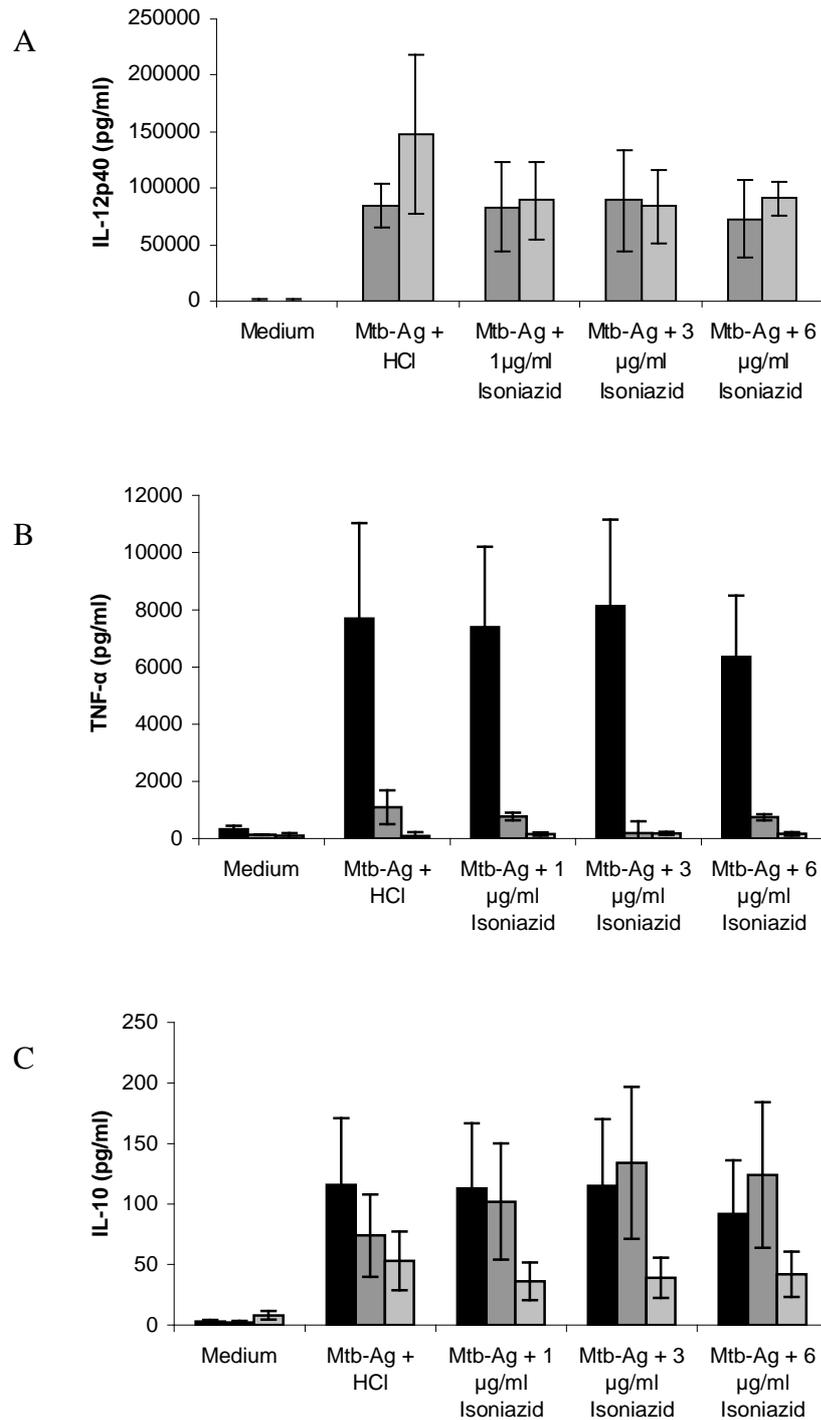


Abb. 15. Isoniazid beeinflusst nicht die Zytokinsekretion der mit Mtb-Ag stimulierten DCs.

Sowohl den allein in Medium inkubierten als auch den mit Mtb-Ag und zusätzlich mit HCl oder Isoniazid aktivierten DCs wurden nach 12 Stunden (schwarze Säulen), 24 Stunden (dunkelgraue Säulen) und 48 Stunden (hellgraue Säulen) Überstände entnommen. Aufgrund der geringen IL-12p40 Sekretion der DCs nach 12 Stunden sind hier nur die Werte nach 24 und 48 Stunden gezeigt. Die Ergebnisse entsprechen einem repräsentativen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

3.4 Ethambutol reduziert die Expression von CD25 sowie die Sekretion von IL-10 und TNF- α Mtb-Ag-aktivierter DCs

Um eine mögliche Veränderung der Reifung der DCs durch Ethambutol zu untersuchen, wurden die DCs mit Mtb-Ag aktiviert und gleichzeitig mit 1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ oder 6 $\mu\text{g/ml}$ Ethambutol inkubiert. Auch hier wurden die Konzentrationen wie zuvor bereits beschrieben ausgewählt.

In der Durchflusszytometrie zeigte sich bei den mit Mtb-Ag und zusätzlich mit Ethambutol kultivierten DCs eine gleichmäßig starke Expression von CD80 und CD86 (Abb. 16.). CD25 wurde von den allein mit Mtb-Ag aktivierten DCs um 5-21% mehr exprimiert als von denen, die zusätzlich mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethambutol kultiviert wurden. Bei Inkubation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Ethambutol wurde die Expression von CD25 um 10-25% reduziert, bei Kultivierung mit 6 $\mu\text{g/ml}$ Ethambutol um 7-16%. Die Expressionsstärken von CD83 auf den mit Mtb-Ag stimulierten DCs war verglichen mit den zusätzlich mit 1 $\mu\text{g/ml}$ oder 3 $\mu\text{g/ml}$ Ethambutol inkubierten Zellen in zwei Versuchen vergleichbar und in einem Versuch reduziert. Bei Koinkubation mit 6 $\mu\text{g/ml}$ Ethambutol war die Expression in zwei Versuchen gesteigert, in einem Versuch vergleichbar mit der unter alleiniger Aktivierung mit Mtb-Ag. Hier war somit kein einheitlicher Effekt festzustellen. Das Vorliegen einer Spenderabhängigkeit kann hier vermutet werden. Die Expression von CD80 und CD86 auf Mtb-Ag aktivierten DCs wurde somit durch Koinkubation mit Ethambutol (1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ oder 6 $\mu\text{g/ml}$) nicht verändert, die von CD83 nicht einheitlich beeinflusst. Bezüglich CD25 führt die Inkubation der Mtb-Ag aktivierten DCs mit Ethambutol zu einer Reduktion.

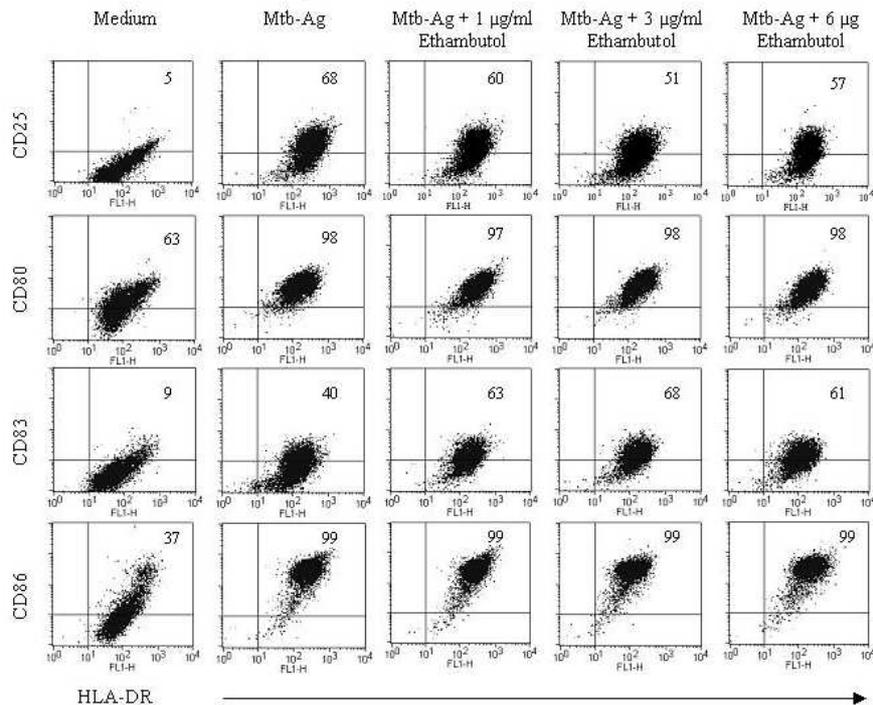


Abb. 16. Ethambutol inhibiert die Expression von CD25 von Mtb-Ag-aktivierten DCs.

Nach 48-stündiger Stimulation mit Mtb-Ag allein oder mit Ethambutol (1 µg/ml, 3 µg/ml oder 6 µg/ml) wurden die DCs durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen geben die prozentualen Anteile CD25-, CD80-, CD83-, CD86- und HLA-DR-doppeltpositiver Zellen an. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei weiteren Experimenten erzielt.

Die MLR zeigte, dass allein durch Mtb-Ag aktivierte DCs und DCs, die gleichzeitig mit 1 µg/ml, 3 µg/ml oder 6 µg/ml Ethambutol kultiviert wurden, ein vergleichbar gesteigertes T-zellstimulierendes Potential aufwiesen (Abb. 17.). Somit hat Ethambutol in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf das T-zellstimulierende Potential der mit Mtb-Ag aktivierten DCs.

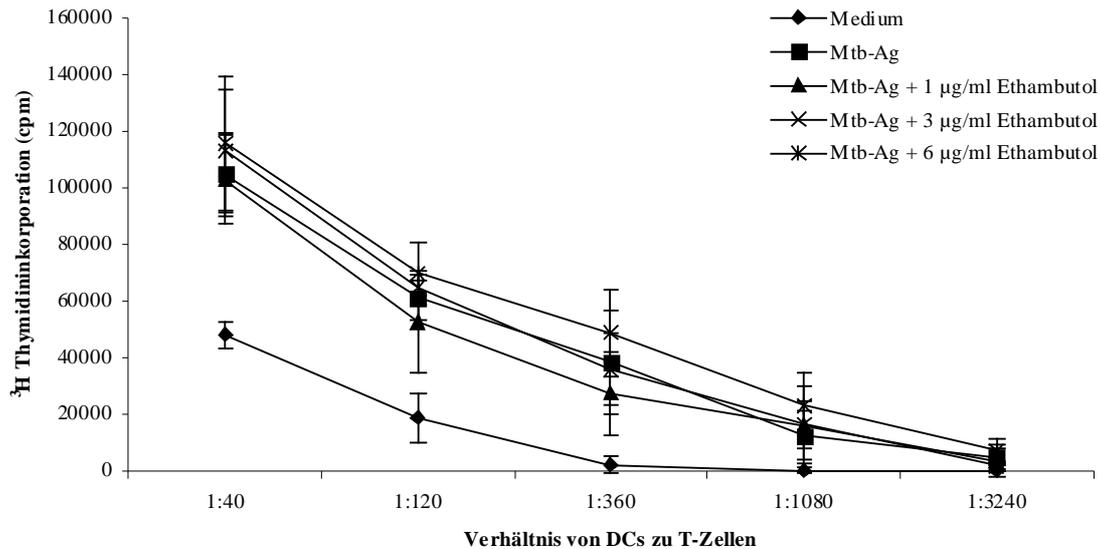


Abb. 17. Das T-zellstimulierende Potential Mtb-Ag-aktivierter DCs wird durch Ethambutol nicht beeinflusst.

Unreife DCs wurden 48 Stunden mit Mtb-Ag oder zusätzlich mit 1 µg/ml, 3 µg/ml oder 6 µg/ml Ethambutol inkubiert und anschließend in absteigenden Zahlenverhältnissen mit 2×10^5 T-Lymphozyten koinkubiert. Allein in Medium inkubierte DCs desselben Spenders dienten als Negativkontrolle. An Tag 6 wurde die T-Zellproliferation durch die ^3H Thymidininkorporation gemessen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

Um zu untersuchen, ob Ethambutol einen Einfluss auf die Zytokinsekretion der mit Mtb-Ag aktivierten DCs hat, wurden die Zellen 48 Stunden zusätzlich mit 1 µg/ml, 3 µg/ml oder 6 µg/ml Ethambutol inkubiert. Verglichen mit der IL-10 Sekretion der allein mit Mtb-Ag aktivierten DCs wurde bei den zusätzlich mit 1 µg/ml Ethambutol kultivierten DCs nach 12-stündiger Inkubation eine Reduktion um bis zu 23% (Abb. 18.A) gemessen. Nach 24- und 48-stündiger Inkubation wurde die IL-10 Sekretion um 7 bis 35% bzw. um 1 bis 27% reduziert. Die DCs, die zusätzlich mit 3 µg/ml Ethambutol inkubiert wurden, sezernierten nach 12 Stunden zwischen 17 und 20%, nach 24 Stunden zwischen 14 und 41% und nach 48 Stunden zwischen 1 und 16 % weniger IL-10 als die allein mit Mtb-Ag aktivierten DCs. Bei Koinkubation mit 6 µg/ml Ethambutol wurde die IL-10 Sekretion nach 12 Stunden um 13-29%, nach 24 Stunden um 7-57% und nach 48 Stunden um 13-33% reduziert. Somit inhibiert Ethambutol in den Konzentrationen 1 µg/ml, 3 µg/ml und 6 µg/ml die IL-10 Sekretion von mit Mtb-Ag stimulierten DCs.

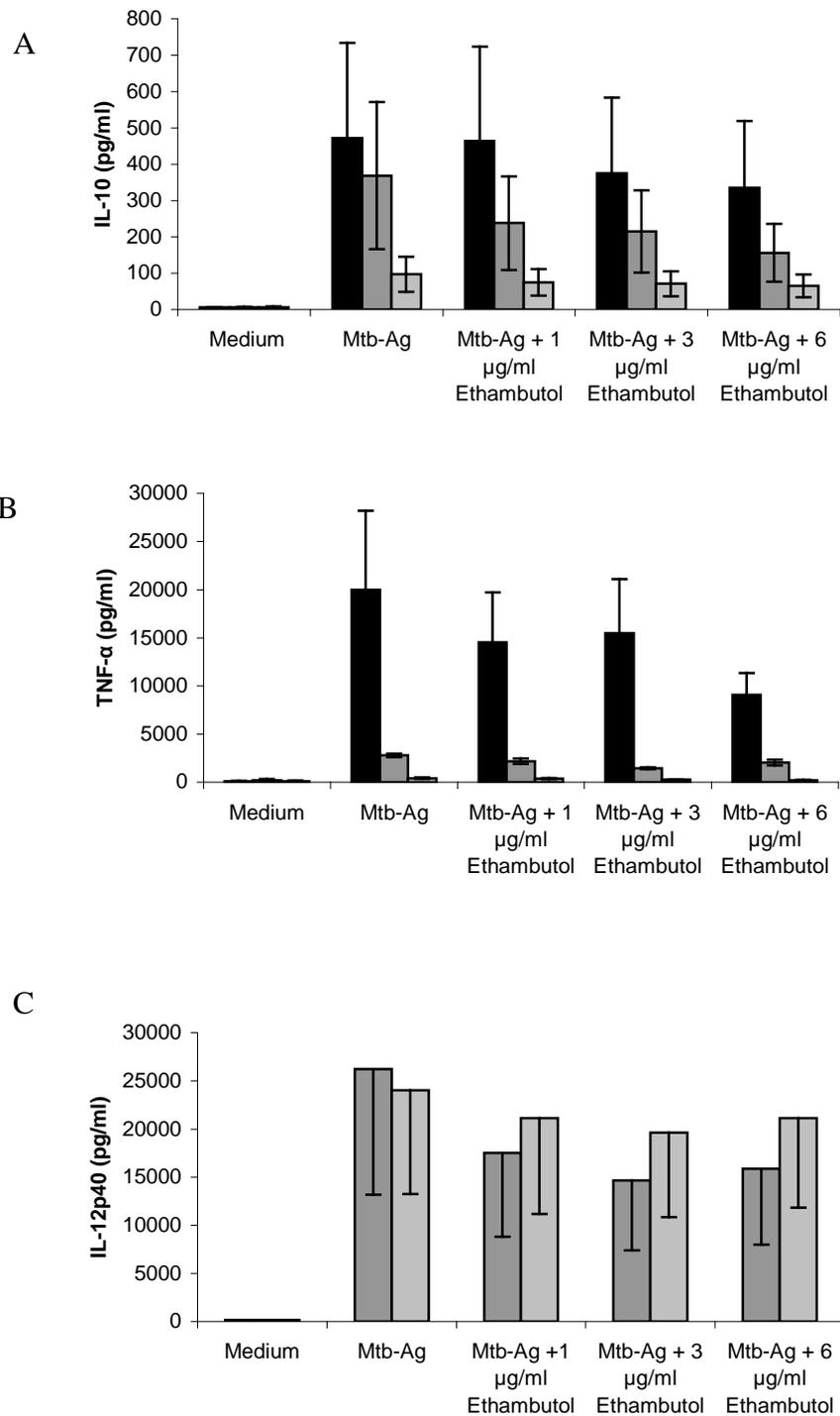


Abb. 18. Ethambutol reduziert die IL-10 und TNF- α , nicht aber die IL-12p40 Sekretion der mit Mtb-Ag stimulierten DCs.

Den in Medium inkubierten, mit Mtb-Ag allein oder zusätzlich mit Ethambutol aktivierten DCs wurden nach 12 Stunden (schwarze Säulen), 24 Stunden (dunkelgraue Säulen) und 48 Stunden (hellgraue Säulen) Überstände entnommen. Aufgrund der geringen IL-12p40 Sekretion der DCs nach 12 Stunden sind hier nur die Werte nach 24 und 48 Stunden gezeigt. Die Ergebnisse entsprechen einem repräsentativen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die TNF- α Sekretion der mit Mtb-Ag inkubierten DCs zeigte nach 12-stündigem Einfluss von Ethambutol keinen einheitlichen Effekt. Auch hier wäre das Vorliegen eines spenderabhängigen Effekts möglich. Nach 24 Stunden wurde allerdings eine Reduktion von 17 bis 44%, nach 48 Stunden um 10 bis 77% gemessen (Abb. 18.B). Die Untersuchung der Überstände der allein mit Mtb-Ag aktivierten DCs auf IL-12p40 zeigte vergleichbare Ergebnisse mit denen der zusätzlich mit Ethambutol (1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ oder 6 $\mu\text{g/ml}$) gereiften DCs (Abb. 18.C). Die Inkubation mit Ethambutol in den verwendeten Konzentrationen hatte somit keinen Einfluss auf die IL-12p70 oder IL-23 Sekretion der Mtb-Ag aktivierten DCs (Daten nicht gezeigt). Somit bewirkt die Inkubation der Mtb-Ag aktivierten DCs mit Ethambutol in den eingesetzten Konzentrationen nach 24 und 48 Stunden eine Reduktion der TNF- α aber nicht der IL-12p40 Sekretion.

3.5 Rifampicin steigert die Expression von CD25 und CD83 und verändert die Sekretion von IL-12p40 von Mtb-Ag stimulierten DCs

Um zu untersuchen, ob Rifampicin einen Effekt auf die Reifung und Funktion von Mtb-Ag aktivierten DCs hat, wurden diese zusätzlich mit 5 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$ oder 30 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin inkubiert. Auch hier wurden die Konzentrationen wie beschrieben ausgewählt. Da in diesen Versuchen ein handelsübliches Medikament eingesetzt wurde, wurde der in dem Präparat enthaltene Zusatzstoff (Natrium-Ascorbat) der Positivkontrolle zugesetzt, um einen möglichen Einfluss auszuschließen.

Es zeigte sich in der Durchflusszytometrie, dass sowohl CD25 als auch CD83 unter zusätzlicher Inkubation mit 30 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin um 2 bis 33% bzw. um 16 bis 28% vermehrt exprimiert wurden (Abb. 19.). Die Expression von CD25 und CD83 auf den DCs der Positivkontrolle entsprach derer unter Koinkubation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin oder 15 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin. Die Expression von CD80 und CD86 auf der Oberfläche der mit Mtb-Ag aktivierten oder zusätzlich mit Rifampicin kultivierten DCs war vergleichbar. Somit steigert Rifampicin in der Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ geringfügig die Expression von CD25 und CD83.

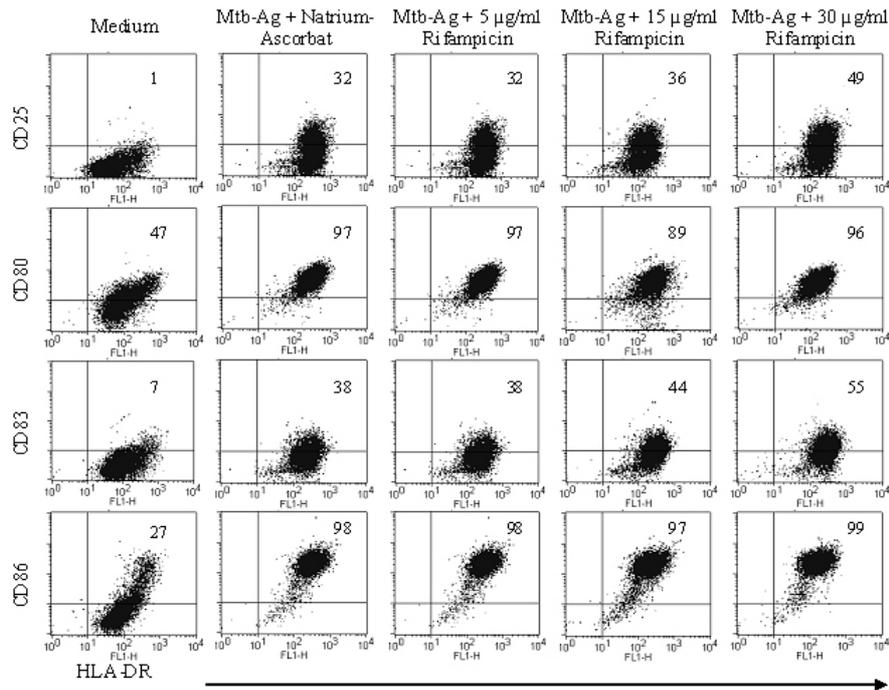


Abb. 19. Rifampicin (30 µg/ml) steigert die CD25 und CD83 Expression Mtb-Ag stimulierter DCs.

Nach 48-stündiger Stimulation mit Mtb-Ag und Natrium-Ascorbat oder zusätzlich mit Rifampicin (5 µg/ml, 15 µg/ml oder 30 µg/ml) wurden die DCs durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen geben die prozentualen Anteile CD25-, CD80-, CD83-, CD86- und HLA-DR-doppeltpositiver Zellen an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

In der MLR induzierten die DCs, die zusätzlich zu Mtb-Ag mit Rifampicin kultiviert wurden, eine ebenso starke T-Zellproliferation wie allein mit Mtb-Ag aktivierte DCs und stimulierten die T-Lymphozyten besser als die DCs der Negativkontrolle (Abb. 20.). Rifampicin beeinflusst somit in den eingesetzten Konzentrationen nicht die Fähigkeit der gereiften DCs, T-Zellen effektiv zu stimulieren.

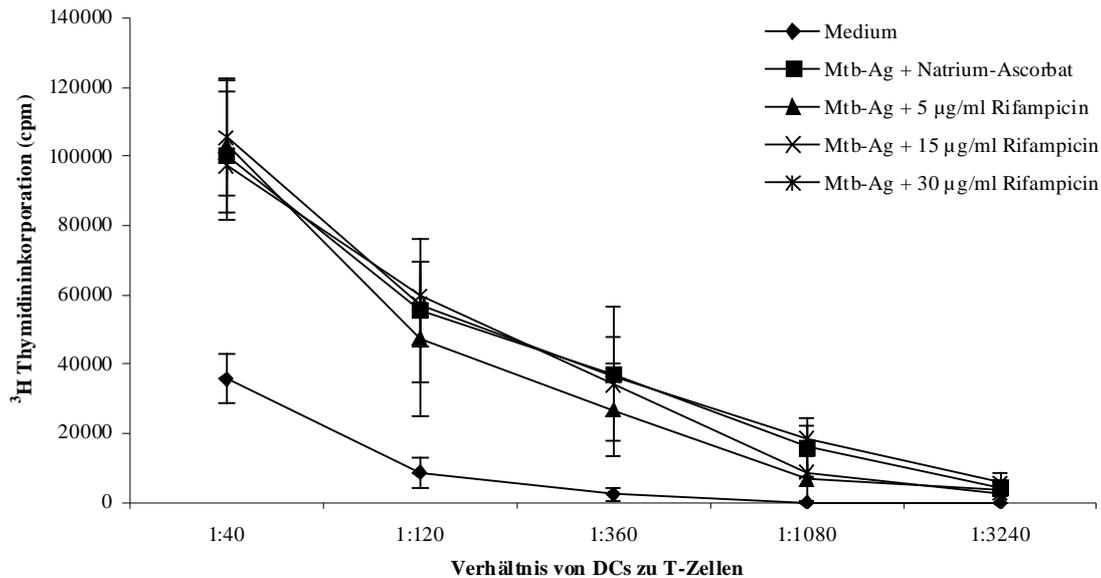


Abb. 20. Rifampicin verändert nicht das T-zellstimulierende Potential Mtb-Ag-aktivierter DCs.

Unreife DCs wurden 48 Stunden mit Mtb-Ag und zusätzlich mit Natrium-Ascorbat oder 5 µg/ml, 15 µg/ml oder 30 µg/ml Rifampicin inkubiert und anschließend in absteigenden Zahlenverhältnissen mit 2×10^5 T-Lymphozyten koinkubiert. Nicht stimulierte DCs desselben Spenders dienten als Negativkontrolle. An Tag 6 wurde die T-Zellproliferation durch ^3H Thymidininkorporation gemessen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

Um zu untersuchen, ob Rifampicin einen Einfluss auf die Zytokinproduktion mit Mtb-Ag aktivierten Zellen hat, wurden die DCs 48 Stunden mit Mtb-Ag und Natrium-Ascorbat oder zusätzlich mit 5 µg/ml, 15 µg/ml oder 30 µg/ml Rifampicin inkubiert. Nach 48 stündiger Inkubation mit 15 µg/ml Rifampicin war die Sekretion von IL-12p40 um 37 bis 47% gesteigert unter 30 µg/ml um 25 bis 52% (Abb. 21.A). Die Inkubation mit 5 µg/ml erbrachte nach 48 Stunden keine einheitlichen Ergebnisse. Rifampicin hatte in keiner der drei Konzentrationen einen Einfluss auf die IL-12p70 oder die IL-23 Sekretion der Mtb-Ag aktivierten DCs (Daten nicht gezeigt). In Bezug auf die TNF- α Sekretion führte eine Koinkubation der DCs mit 5 µg/ml, 15 µg/ml und 30 µg/ml Rifampicin im Vergleich zu den DCs der Positivkontrolle zu vergleichbaren Ergebnissen (Abb. 21.B).

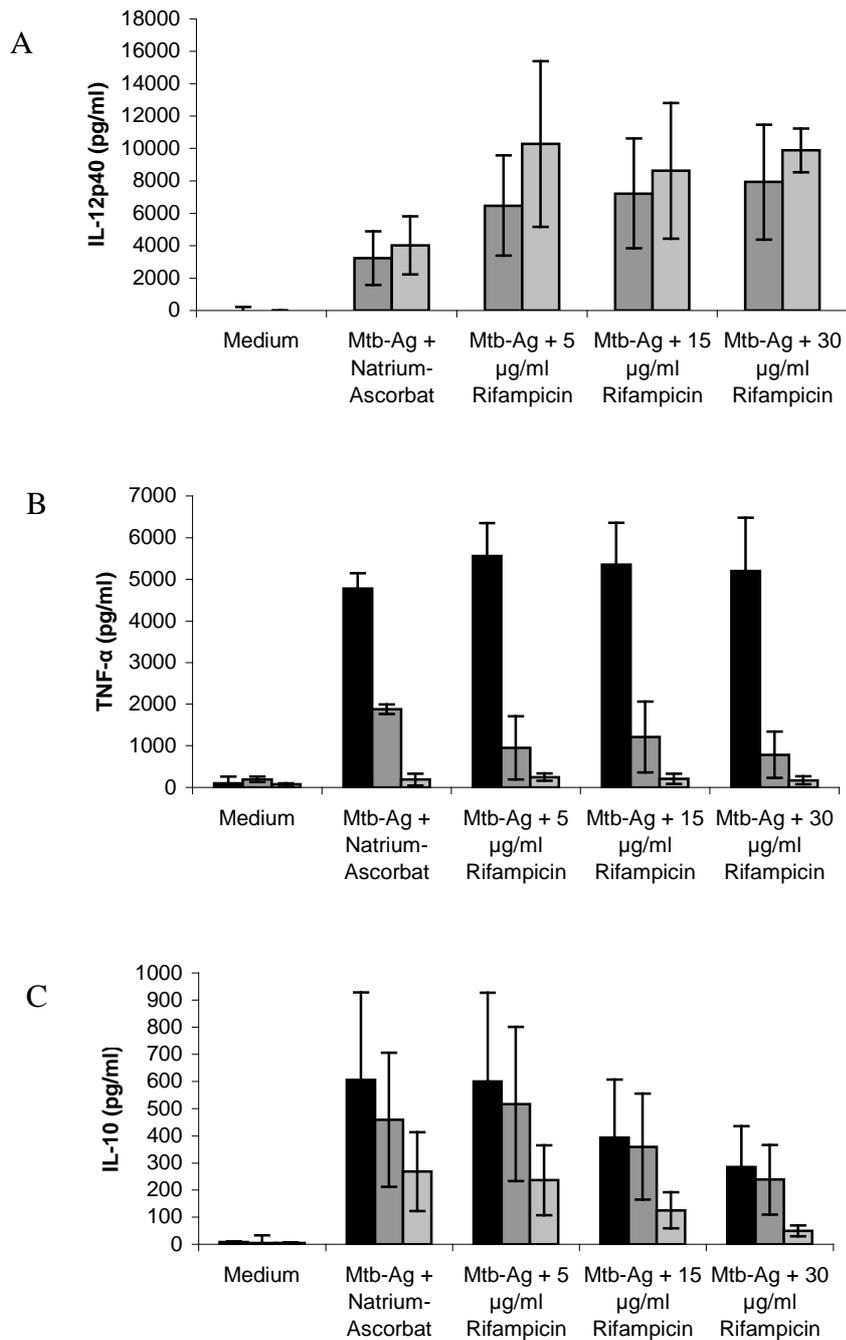


Abb. 21. Rifampicin beeinflusst die Sekretion von IL-12p40 Mtb-Ag stimulierter DCs.

Den in Medium inkubierten, mit Mtb-Ag und zusätzlich mit Natrium-Ascorbat oder Rifampicin aktivierten DCs wurden nach 12 Stunden (schwarze Säulen), 24 Stunden (dunkelgraue Säulen) und 48 Stunden (hellgraue Säulen) Überstände entnommen. Aufgrund der geringen IL-12p40 Sekretion der DCs nach 12 Stunden sind hier nur die Werte nach 24 und 48 Stunden gezeigt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für die von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Hinsichtlich der Sekretion von IL-10 führte eine Inkubation mit 5 µg/ml Rifampicin zu keiner nennenswerten Reduktion. Die Koinkubation mit 15 µg/ml oder 30 µg/ml führte in 2 Versuchen zu einer Reduktion, in einem Versuch war kein Effekt festzustellen (Abb. 21.C). Somit wird die IL-10 Sekretion von Mtb-Ag aktivierten DCs durch die gewählten Konzentrationen Rifampicin nicht einheitlich beeinflusst. Ob hier spenderabhängige Effekte auftreten, müssen nachfolgende Untersuchungen zeigen.

4 Diskussion

Die Tuberkulose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, an der jährlich schätzungsweise 1,4 bis 2,8 Millionen Menschen sterben (Dye et al., 1999). Die Infektion wird, wenn keine Resistenzen vorliegen, mit einer Kombinationstherapie aus Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid behandelt (National Institute for Health and Clinical Excellence, 2006). Bei Resistenz gegen eines der oben genannten Antibiotika wird Moxifloxacin als Zweitlinien-Antibiotikum eingesetzt. In unterschiedlichen Studien wurden zuvor immunmodulatorische Eigenschaften von Antibiotika gezeigt. Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob zur Therapie der Tuberkulose eingesetzte Antibiotika die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) beeinflussen und dadurch die Abwehr einer Infektion, die während der Therapiedauer von mindestens sechs Monaten auftreten kann, verändert wird. Untersucht wurde hierzu in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Moxifloxacin, Isoniazid, Ethambutol und Rifampicin auf DCs, da diese Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion zellulärer Immunantworten besitzen. Über den Einfluss von Moxifloxacin auf Monozyten wurde bereits berichtet (Araujo et al., 2002). Über dessen Wirkung auf DCs gab es bislang jedoch keine Daten. Es wurde daher untersucht, ob der Wirkstoff auch die Zytokinproduktion von DCs inhibiert, wie dies bei Monozyten der Fall ist, und ob eine Veränderung der phänotypischen Reifung oder des T-zellstimulierenden Potentials der DCs stattfindet. Nach denselben Kriterien wurde dann auch die Wirkung von Isoniazid, Ethambutol und Rifampicin auf DCs untersucht. Das dafür verwendete In-vitro-Modell wurde den bisher in anderen Untersuchungen verwendeten Systemen in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Tab. 3 Vergleich des hier beschriebenen mit den bisher verwendeten In-vitro-Systemen

Zelltyp	Antiinfektiva	Stimulus	Effekt	Referenz
Humane DCs	Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol oder Moxifloxacin	Mtb-Ag	Steigerung der IL-12p40 Sekretion oder Reduktion der Sekretion von IL- 12p40, IL-10 und TNF- α	Eigene Arbeit
Humane Monozyten	Moxifloxacin	LPS oder Pansorbin	Reduktion der Sekretion von IL-1 α und TNF- α	Araujo et al., 2002
Humane	Moxifloxacin	LPS	Reduktion der	Weiss et

Monozyten			Produktion von IL-8 und IL-1 β	al., 2004
Humane Monozyten	Trovafloxacin	LPS oder Pansorbin	Reduktion von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α	Khan et al., 1998
Humane PBMCs	Levofloxacin	Phytohämagglutinin	Steigerung der IL-2 und Reduktion der IL-1 β Sekretion	Yoshimura et al., 2000
Humane PBMCs	Grepafloxacin	LPS	Reduktion von IL-1 α und IL-1 β	Ono et al., 2000
Humane DCs	Erythromycin	LPS oder Poly (I:C)	Reduktion von IL-12p70, IL-1 β und IL-10	Yasutomi et al., 2005
Humane Monozyten	Clarithromycin und Azithromycin	LPS	Individuenspezifische Reduktion oder Steigerung der IL-6, IL-10, IL-1 β und TNF- α Sekretion	Khan et al., 1999
Humane Monozyten	Ciprofloxacin, Pefloxacin und Ofloxacin	LPS	Reduktion der TNF- α Sekretion	Bailly et al., 1990

Zuerst wurde gezeigt, dass Mtb-Ag einen geeigneten Stimulus für die Aktivierung von DCs darstellt. Dabei zeigte sich eine phänotypische Reifung der Zellen durch die vermehrte Expression der Oberflächenmoleküle CD25, CD80, CD83 und CD86. Die gesteigerte Expression dieser Oberflächenmoleküle wurde zuvor auch durch Aktivierung von DCs durch lebendige oder durch Hitze inaktivierte *M. tuberculosis* gezeigt (Murray et al., 2007). Hierbei war die Vitalität der Bakterien nicht von Bedeutung, da beide Ansätze eine gleichmäßig hohe Expression der Oberflächenmoleküle bewirkten. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem ein gesteigertes T-zellstimulierendes Potential der DCs dokumentiert, was sich ebenfalls mit den Daten von Murray et al. (Murray et al., 2007) deckt. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass durch Inkubation der DCs mit Mtb-Ag die Sekretion von IL-12p40, TNF- α und IL-10 induziert wurde. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in anderen Studien gesehen, in denen DCs mit einer Suspension aus Mykobakterien (H37Rv) aktiviert wurden. Auch dabei zeigte sich eine vermehrte Sekretion von IL-12 und TNF- α (Giacomini et al.,

2001). DCs sezernieren diese sowohl nach Stimulation durch den Wildtyp H37Rv, als auch nach Inkubation mit gentechnisch veränderten Bakterien (Deletion des Strukturgens sigE {ST28} oder dessen Komplementärstrang {ST29}). Die stärkste IL-10 Sekretion durch DCs wurde nach Inkubation der Zellen mit ST29 beobachtet (Giacomini et al., 2006). Die durch Mykobakterien induzierte Sekretion anderer proinflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL-1 β) wird durch mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAP Kinasen) gesteuert (Reiling et al., 2001), welche durch das 38-kDa Ag aktiviert werden (Jung et al., 2006). Im Gegensatz dazu führt das 19-kDa Ag über TLR2 zu einer Sekretion von IL-12p40 und TNF- α durch Makrophagen oder Monozytenzelllinien (Stewart et al., 2005; Brightbill et al., 1999). Bereits 1988 wurde gezeigt, dass verschiedene Präparationen von Mykobakterien (das komplette Bakterium oder einzelne mykobakterielle Antigene) eine vergleichbare TNF- α Sekretion von PBMCs induzieren (Valone et al., 1988). Die beobachteten Effekte sind somit wahrscheinlich nicht spezifisch für das verwendete Antigen (Sonifikat einer gefriergetrockneten Kultur des Stammes H37Rv), da auch andere Tuberkuloseantigene (z.B. PPD, ESAT-6/CFP-10 oder TB10.4) ähnliche Effekte (Sutherland et al., 2010) bewirken könnten. Für diese wurden jedoch bislang nur Effekte auf die gesamten Blutzellen untersucht und nicht speziell ihr Effekt auf DCs. Es wurde zudem gezeigt, dass einzelne Fraktionen von *M. tuberculosis* (apolare Lipide, polare Lipide, Zellwände, Lysate und Proteine) die IL-12 und TNF- α Sekretion von Monozyten und Makrophagen unterschiedlich stark induzieren (Mendelson et al., 2005). Außerdem induzieren sowohl ein avirulenter Stamm von *M. bovis* BCG sowie ein virulenter Stamm von *M. bovis* bei DCs und Makrophagen die IL-12, TNF- α und IL-10 Sekretion (Hope et al., 2004). Somit liegt wahrscheinlich kein spezifischer Effekt bei der Verwendung des Mtb-Ag vor.

In der vorliegenden Arbeit sezernierten mit Mtb-Ag aktivierte DCs kein IL-12p70. Auch eine Aktivierung von DCs mit *M. bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG) führt nicht zu einer Induktion der IL-12p70 Produktion (Liu et al. 2003). Ein Grund dafür könnte sein, dass BCG nicht die Fähigkeit hat, die Aktivierung des IFN regulierenden Faktors 3 zu induzieren (Giacomini et al., 2009). Möglicherweise verfügt das verwendete Mtb-Ag ebenfalls nicht über diese Fähigkeit und induziert infolge dessen auch keine IL-12p70 Sekretion. DCs, die vor einer Infektion durch BCG mit IFN- β inkubiert wurden, sezernieren signifikante Mengen an IL-12p70 (Giacomini et al., 2009). Dies könnte auch bei mit Mtb-Ag inkubierten DCs die IL-12p70 Sekretion induzieren. Die mit Mtb-Ag aktivierten DCs produzierten auch kein IL-23. Eine mögliche Erklärung könnte die Arbeit von Gerosa et al. (Gerosa et al., 2008) liefern, in der gezeigt wurde, dass die Induktion von IL-12 und IL-23 trotz ihrer gemeinsamen

Untereinheit über verschiedene Mechanismen abläuft. Die Stimulation der IL-23 Sekretion von DCs nach Infektion mit *M. tuberculosis* läuft hauptsächlich über den TLR2 ab (Lyakh et al., 2008), während TLR2 Liganden die IL-12 Sekretion inhibieren. Im Gegensatz dazu steigert die Aktivierung von DCs mit IFN- γ die IL-12, nicht aber die IL-23 Sekretion (Gerosa et al., 2008). So scheint es nicht widersprüchlich, dass das verwendete Mtb-Ag zwar die IL-12p40, nicht aber die IL-23 Sekretion induziert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mtb-Ag in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ zu einer vermehrten Expression von CD25, CD80, CD83 und CD86 auf DCs führt. Auch ist die T-Zellproliferation durch DCs, die mit 10 $\mu\text{g/ml}$ oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-Ag aktiviert wurden vergleichbar mit der nach Stimulation von DCs durch LPS. 20 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-Ag bewirkt aber eine stärkere Induktion der IL-12p40-, TNF- α und IL-10 Sekretion verglichen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-Ag.

Bei der Koinkubation der mittels Mtb-Ag aktivierten DCs mit Moxifloxacin zeigten sich verminderte Sekretionslevel von IL-12p40, TNF- α und IL-10 in konzentrationsabhängiger Weise. Über welchen Mechanismus Moxifloxacin inhibitorisch auf die Sekretion von IL-12p40, TNF- α und IL-10 wirkt, ist bisher unbekannt. Die zeitliche Variabilität der maximalen TNF- α Sekretion könnte auf individuelle Unterschiede in der Zytokinproduktion bei myeloiden Zellen nach Inkubation mit Antibiotika zurückzuführen sein (Khan et al., 1999). So bewirkte Clarithromycin in 71% eine signifikante Suppression und in 29% einen signifikanten Anstieg der Zytokinsekretion LPS-aktivierter Monozyten. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch durch Inkubation mit Azithromycin. Auch in früher durchgeführten Studien wurde der Effekt von Moxifloxacin in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ auf mit LPS stimulierte Monozyten untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen dabei denen, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige signifikant reduzierte Sekretion von TNF- α und ein Trend zur Zytokininhibition bei IL-10 und IL-12p70, der aber nicht signifikant war (Araujo et al. 2002). In anderen Studien wurde der inhibitorische Effekt von Moxifloxacin in den Konzentrationen 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ untersucht und eine signifikant verminderte Sekretion von TNF- α von mit LPS stimulierten Monozyten gemessen (Weiss et al. 2004). Auch bei Monozyten, die durch *Aspergillus fumigatus* stimuliert wurden, bewirkte die Koinkubation mit Moxifloxacin (5, 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$) eine dosisabhängig reduzierte Sekretion von TNF- α (Shalit et al., 2006). Ein inhibitorischer Effekt von Moxifloxacin auf die TNF- α Sekretion war auch bei mit LPS, LTA (von *Enterococcus faecalis*) und hitzeinaktivierten *E. coli* stimulierten PBMCs zu messen (Choi et al. 2003). Moxifloxacin hatte dagegen keinen Einfluss auf die

Zytokinproduktion von mit Pansorbin aktivierten Monozyten (Araujo et al. 2002), was daran liegen könnte, dass Pansorbin und LPS die Zytokinsynthese über verschiedene TLRs (TLR2 und TLR4) induzieren (Rabehi et al., 2001).

Andere Fluoroquinolone haben einen vergleichbaren Effekt auf die Sekretion von Zytokinen. Ciprofloxacin, Pefloxacin und Ofloxacin bewirken eine dosisabhängige Reduktion von TNF- α bei LPS-aktivierten humanen Monozyten (Bailly et al. 1990). Trovafloxacin (5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$) inhibiert die Sekretion von TNF- α von LPS- oder Pansorbin-aktivierten humanen Monozyten (Khan et al. 1998). Bei Inkubation der Monozyten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Trovafloxacin wurde spenderabhängig entweder eine Reduktion oder eine Induktion der Zytokinproduktion gefunden. Trovafloxacin (5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$) inhibiert außerdem die Sekretion von IL-10 von LPS- oder Pansorbin-aktivierten humanen Monozyten (Khan et al. 1998).

Über welche Signalwege Moxifloxacin die Zytokinproduktion inhibiert, wurde schon mehrfach untersucht, bisher allerdings nicht vollständig geklärt. Vermutet wurden Effekte auf das intrazelluläre zyklische Adenosin Monophosphat (cAMP), die Phosphodiesterase, den nukleären Faktor kappaB (NF κ B), das Aktivator Protein-1 oder NF-IL-6 (Dalhoff und Shalit, 2003).

Bei der Untersuchung der phänotypischen Ausreifung der DCs unter Inkubation mit Moxifloxacin wurde in der vorliegenden Arbeit ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Expression von CD25 und CD83 beobachtet. Dabei führte eine Inkubation der Mtb-Ag aktivierten DCs mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Moxifloxacin zur stärksten Expressionsverminderung der beiden Oberflächenmoleküle, wohingegen 1 $\mu\text{g/ml}$ Moxifloxacin die geringste Reduktion von CD25 und CD83 verursachte. Die Expression von CD80 und CD86 auf den Mtb-Ag-aktivierten DCs wurde durch Moxifloxacin in keiner der eingesetzten Konzentrationen beeinflusst. Bisher ist ein Einfluss von Moxifloxacin auf den Phänotyp myeloider Zellen noch nicht berichtet worden. Vergleiche zu anderen Studien sind daher aufgrund der mangelnden Datenlage schwierig. Lediglich eine Inhibition der Expression von CD54 und CD86 von LPS oder Poly(I:C) aktivierten DCs durch Erythromycin (Yasutomi et al. 2005) wurde bisher nachgewiesen. Insgesamt gesehen führt Moxifloxacin hier konzentrationsabhängig zu einer verminderten Expression von CD25 und CD83 auf mit Mtb-Ag aktivierten DCs und inhibiert die Sekretion von IL-12p40, TNF- α und IL-10.

Isoniazid senkte in der höchsten Konzentration (6 $\mu\text{g/ml}$) die Expression von CD25 um 16%-45%. Die Expression von CD80, CD83 und CD86 wurde nicht beeinflusst. Über immunmodulatorische Eigenschaften von Isoniazid wurde bisher nur wenig publiziert.

Allerdings reduziert Isoniazid in hohen Konzentrationen (1370 - 13700 µg/ml) die Proliferation von humanen PBMCs und T-Zellen, die durch Phytohämagglutinin oder Antikörper gegen den T-Zell Rezeptor stimuliert werden, während geringere Konzentrationen (1,37 - 13,7 µg/ml) diese steigern (Kucharz und Sierakowski 1990). Auch die Produktion von IL-2 wurde durch hohe Konzentrationen von Isoniazid inhibiert und durch niedrigere gesteigert (Kucharz und Sierakowski 1990). Demgegenüber hatte Isoniazid in den Konzentrationen 2 µg/ml, 10 µg/ml oder 50 µg/ml keinen Einfluss auf die TNF- α Sekretion muriner Monozyten, die mit *Staphylococcus aureus* aktiviert wurden (Urbaschek et al. 1991). Zudem wurde in einer In-vivo-Studie am Menschen die Wirkung von Isoniazid auf die BCG-induzierte lokale Immunantwort nach intravesikaler BCG-Applikation untersucht. Dabei reduzierte Isoniazid die Konzentration der IgG-Antikörper, wohingegen die Konzentration der IgA-Antikörper und die von TNF- α unbeeinflusst blieben (Stassar et al. 1994). Die dabei gemessenen Isoniazidkonzentrationen im Urin lagen mit 38 +/- 60,9 µg/ml jedoch wesentlich über denen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen. In einer anderen In-vivo-Studie an Mäusen wurde die zelluläre Immunantwort durch Isoniazid in der Konzentration 25 mg/kg nicht verändert (Demkow et al. 2000). Es zeigt sich also in der vorliegenden Arbeit, dass Isoniazid in einer Konzentration von 6 µg/ml die Expression von CD25 auf den mit Mtb-Ag aktivierten DCs reduziert.

Ethambutol reduzierte konzentrationsabhängig die Expression von CD25 auf Mtb-Ag aktivierten DCs um bis zu 25%. Auf die Expression von CD80 und CD86 hatte Ethambutol in den eingesetzten Konzentrationen (1 µg/ml, 3 µg/ml und 6 µg/ml) keinen Einfluss. Unter dem Einfluss von 6 µg/ml Ethambutol war in zwei Versuchen ein Anstieg der CD83 Expression sichtbar. In einem Versuch war das Ergebnis vergleichbar mit dem der Positivkontrolle. Unter Inkubation mit 1 µg/ml oder 3 µg/ml Ethambutol war die Expression von CD83 in zwei Versuchen vergleichbar mit der unter alleiniger Aktivierung mit Mtb-Ag und in einem Versuch reduziert. Bei Rifampicin hat ebenfalls die höchste Konzentration (30 µg/ml) zu einem Anstieg der CD83 Expression geführt. Die niedrigeren Konzentrationen von Rifampicin (5 µg/ml und 15 µg/ml) hatten keinen Effekt auf die Expression von CD83. Es handelt sich hier offenbar um einen dosisabhängigen Effekt auf die CD83-Expression. Da in einem Versuch mit 1 µg/ml und 3 µg/ml Ethambutol die Expression von CD83 reduziert wurde und in den Versuchen mit 30 µg/ml Rifampicin dessen Expression gesteigert wurde, wäre es möglich, dass sich in vivo aufgrund der gegensätzlichen Wirkungen die Effekte aufheben könnten, wenn die Medikamente in Kombination verabreicht werden.

Die Untersuchung der Zytokinkonzentrationen in den Überständen der DCs zeigte eine Reduktion der IL-10 und TNF- α Sekretion infolge der Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ oder 6 $\mu\text{g/ml}$ Ethambutol. Die Sekretion der anderen untersuchten Zytokine durch DCs wurde durch Koinkubation mit Ethambutol nicht beeinflusst. Über immunmodulatorische Eigenschaften von Ethambutol ist bisher nur wenig publiziert. Lediglich der Einfluss von Ethambutol auf die phagozytische Aktivität oder die Kapazität der intrazellulären Abtötung von *M. tuberculosis* durch humane polymorphkernige Leukozyten wurde bisher *in vitro* untersucht. Ethambutol führte nur in Kombination mit Amikazin, Ofloxacin, Cycloserin und Pyrazinamid zu einer Zunahme der phagozytischen Aktivität und der bakteriziden Kapazität, wohingegen Ethambutol alleine diese nicht beeinflusste (Okuyan et al. 2005). Letztendlich konnte hier gezeigt werden, dass die Inkubation der Mtb-Ag aktivierten DCs mit Ethambutol in den eingesetzten Konzentrationen eine verminderte Expression von CD25 sowie eine Reduktion der TNF- α und IL-10 Sekretion nach 24 und 48 Stunden bewirkt.

Rifampicin steigerte in hoher Konzentration (30 $\mu\text{g/ml}$) die Expression von CD25 und CD83 der Mtb-Ag aktivierten DCs, wohingegen niedrigere Konzentrationen (5 $\mu\text{g/ml}$ und 15 $\mu\text{g/ml}$) keinen Effekt hatten. Gezeigt wurde zuvor, dass Rifampicin in den Konzentrationen 2 $\mu\text{g/ml}$ oder 10 $\mu\text{g/ml}$ die Expression von CD1b auf mit Zytokinen aktivierten Monozyten signifikant steigert (Tentori et al. 1998; Giuliani et al. 1998). Dieses Ergebnis hat Bedeutung bei der Immunantwort auf eine Infektion mit *M. tuberculosis*, da CD1b ein antigenpräsentierendes Molekül für Zellwandstrukturen des Bakteriums ist (Ulrichs et al., 2003; Moody et al., 2000). Auch die Sekretion von IL-12p40 der durch Mtb-Ag stimulierten DCs wurde durch Rifampicin verändert. Die IL-12p40 Sekretion wurde nach 48 Stunden durch 15 $\mu\text{g/ml}$ und 30 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin gesteigert. Rifampicin hat auch einen Effekt auf die Zytokinsekretion muriner Milzzellen und Makrophagen. Durch *Candida albicans* und INF- γ stimulierte und mit Rifampicin koinkubierte Milzzellen oder Makrophagen zeigten eine signifikant reduzierte TNF- α Sekretion nach 48 Stunden (Mlambo et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Reduktion der TNF- α Sekretion gezeigt. Allerdings waren die eingesetzten Rifampicinkonzentrationen in der Arbeit von Mlambo et al. höher (8,2 $\mu\text{g/ml}$ – 82,3 mg/ml), und es wurden murine Zellen verwendet. Die Tatsache, dass unterschiedliche Spender oder Zelltypen zu voneinander abweichenden Ergebnissen führen, ist bekannt. Rifampicin hat beispielsweise keinen Effekt auf die NO-Produktion von Mausmakrophagen (Mlambo et al. 2003), steigert aber konzentrationsabhängig (10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$) die NO-Produktion von humanen Alveolarepithelzellen, die durch Zytokine stimuliert wurden (Yuh

et al. 2006), da die Regulation der NO-Produktion zell- und speziesspezifisch ist (Kleinert et al. 2003).

Weitere immunmodulatorische Effekte von Rifampicin sind belegt. Rifampicin (5 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) beeinflusst die Mitogen-induzierte Immunglobulinsynthese humaner PBMCs (Ibrahim et al. 1987) und reduziert dosisabhängig die Ansprechbarkeit auf Mitogene von B- und T-Lymphozyten, murinen Milzzellen und humanen PBMCs (Ibrahim et al. 1988). Auch die Allergie vom verzögerten Typ wird durch Rifampicin inhibiert (Van Vlem et al. 1996). 50 µM Rifampicin induzieren Cytochrom P-450 in vitro (Morel et al. 1990), eine Induktion in vivo bei Hunden wurde nach Verabreichung von 10 µg/kg/Tag gesehen (Nishibe et al. 1998). Rifampicin induziert in vitro auch Cytochrom P-2D und hebt den inhibitorischen Effekt von IL-1 auf die Cytochrom P-2D Untergruppe auf (Kurokohchi et al. 2001). Rifampicin supprimiert auch die phagozytische Aktivität von murinen Makrophagen (Mlambo et al. 2003). Zusammenfassend führt Rifampicin (30 µg/ml) zu einer vermehrten Expression von CD25 und CD83 auf Mtb-Ag aktivierten DCs und in einer Konzentration von 15 µg/ml und 30 µg/ml zu einer gesteigerten Sekretion von IL-12p40.

Da in dieser Arbeit bisher gezeigt werden konnte, dass Moxifloxacin, Ethambutol und Rifampicin die Zytokinsekretion von mit Mtb-Ag stimulierten DCs verändern können, wäre im Hinblick auf die zunehmende Verwendung IFN- γ -basierter diagnostischer Verfahren interessant, ob die hier untersuchten Antiinfektiva auch dieses Testverfahren beeinflussen. Da ein IFN- γ Test in der Regel zur Diagnosestellung einer Infektion mit *M. tuberculosis*, also vor Einleitung einer Therapie mit Antiinfektiva, durchgeführt wird, ist in diesem Fall keine Beeinflussung des Tests zu erwarten. Bei Durchführung eines IFN- γ Assays unter bzw. nach Therapie mit den genannten Antituberkulotika wäre eine Beeinflussung des Testergebnisses jedoch durch direkte Effekte oder eine durch die Therapie veränderte Migration von Effektorzellen denkbar. In der Literatur zeigten sich in Bezug auf Isoniazid und Rifampicin bisher teils widersprüchliche Ergebnisse. Nach einer neunmonatigen Therapie einer latenten Tuberkuloseinfektion mit INH zeigte sich eine persistierende, etwa gleich starke positive Reaktion im Quantiferon Test (Pollock et al., 2009), wohingegen in der Arbeit von Higuchi et al. (Higuchi et al., 2008) bei Patienten mit latenter Tuberkulose die IFN- γ Produktion nach sechsmonatiger INH-Therapie reduziert war. Keine signifikante Änderung der IFN- γ Produktion zeigte sich bei Patienten mit latenter Tuberkulose im Vergleich vor und nach der Kombinationstherapie mit INH und Rifampicin (Dyrhol-Riise et al., 2010). Wilkinson et al. (Wilkinson et al., 2006) zeigten bei Patienten mit latenter Tuberkulose während der

Behandlung mit INH und Rifampicin nach drei bis vier Wochen einen Anstieg der IFN- γ Sekretion und am Ende der Therapie einen Abfall derselben unter das Ausgangsniveau. Sauzullo et al. (Sauzullo et. al, 2009) haben PBMCs von 38 Patienten mit aktiver Tuberkulose vor und während einer sechsmonatigen Therapie mit Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid sowie am Therapieende mittels IFN- γ Assay getestet. Nach Therapie war bei 27 von 38 Patienten der IFN- γ Assay negativ. Bei fünf der elf übrigen Patienten wurde ein Therapieversagen nachgewiesen. In vitro wurde außerdem in dieser Studie gezeigt, dass Rifampicin, Ethambutol, Isoniazid und Pyrazinamid nur in Konzentrationen, die über den therapeutischen liegen, die IFN- γ Produktion reduzieren.

Abschließend kann man sagen, dass Moxifloxacin, Isoniazid, Ethambutol und Rifampicin verschiedene Wirkungen auf die Reifung und Funktion Mtb-Ag aktivierter DCs besitzen. In weiteren Studien sollten mögliche Effekte einer Kombination der in der vorliegenden Arbeit einzeln untersuchten Antibiotika getestet werden. Auch In-vivo Studien an Mäusen oder Ex-vivo Untersuchungen am Menschen wären von Interesse, um mögliche Auswirkungen der hier beschriebenen immunmodulatorischen Effekte zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die Tuberkulose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, die meistens mit einer Kombinationstherapie aus Rifampicin, Ethambutol, Isoniazid und Pyrazinamid behandelt wird. Bei Resistenzen gegen eines der anderen Antibiotika wird Moxifloxacin als Alternative eingesetzt. Immunmodulatorische Effekte von Moxifloxacin auf Monozyten wurden zuvor gezeigt. Der Einfluss von Moxifloxacin sowie anderer Antituberkulotika auf die Reifung und Funktion von DCs wurde jedoch noch nicht untersucht und war deshalb Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Hierzu wurden aus humanen Monozyten unreife DCs gewonnen und anschließend über 48 Stunden mit Mtb-Ag allein oder in Kombination mit Moxifloxacin (1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml), Isoniazid (1 µg/ml, 3 µg/ml oder 6 µg/ml), Ethambutol (1 µg/ml, 3 µg/ml oder 6 µg/ml) oder Rifampicin (5 µg/ml, 15 µg/ml oder 30 µg/ml) inkubiert. Es wurde jeweils die mittlere Serumkonzentration sowie eine kleinere und doppelt so hohe Konzentration gewählt. Nach 12 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden wurden Überstände entnommen, um die Konzentrationen von IL-12p40, IL-12p70, IL-10, IL-23 und TNF- α zu untersuchen. Nach 48 Stunden wurden außerdem die phänotypische Reifung der DCs mittels Durchflusszytometrie und deren T-zellstimulierendes Potential in MLRs untersucht.

Das verwendete Mtb-Ag aktivierte humane DCs, was durch eine vermehrte Expression der Oberflächenmoleküle CD25, CD80, CD83 und CD86 gezeigt wurde. Außerdem wurde die Sekretion von IL-12p40, IL-10 und TNF- α induziert, wohingegen IL-12p70 und IL-23 nicht vermehrt sezerniert wurden. Die mit Mtb-Ag aktivierten DCs bewirkten zudem eine verstärkte T-Zellstimulation im Vergleich zu nicht aktivierten DCs. Moxifloxacin inhibierte konzentrationsabhängig die durch Mtb-Ag induzierte TNF- α , IL-12p40 und IL-10 Produktion der DCs und reduzierte die Expression von CD25 und CD83. Isoniazid (6 µg/ml) reduzierte ausschließlich die CD25 Expression, wohingegen Ethambutol sowohl die CD25 Expression als auch die IL-10 und TNF- α Sekretion inhibierte. Rifampicin (30 µg/ml) steigerte die CD25 und CD83 Expression und die IL-12p40 Sekretion (15 µg/ml und 30 µg/ml). Eine IL-12p70 und IL-23 Sekretion wurde durch keines der eingesetzten Antibiotika induziert. Keines der Medikamente hatte einen Einfluss auf die Fähigkeit der DCs, allogene T-Zellen zu aktivieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Moxifloxacin, Ethambutol und Rifampicin einen Einfluss auf die phänotypische Reifung und die Zytokinsekretion von Mtb-Ag aktivierten DCs besitzen, wohingegen Isoniazid ausschließlich die CD25 Expression reduziert. Die gezeigten Daten legen somit nahe, dass Moxifloxacin, Ethambutol, Rifampicin und Isoniazid die Funktion von DCs beim Menschen verändern können. Da diese Medikamente häufig in

Kombination eingesetzt werden, sollte nachfolgend untersucht werden, welche Effekte die Kombination der getesteten Antibiotika auf DCs in vitro und in vivo hat.

6 Literaturverzeichnis

1. **Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. De Sauvage and A. L. Gurney:** Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17, *The Journal of biological chemistry*, 2003, 278:1910-4
2. **Amin, Z.:** Clinical tuberculosis problems and management, *Acta medica Indonesiana*, 2006, 38:109-16
3. **Araujo, F. G., T. L. Slifer and J. S. Remington:** Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide, *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2002, 8:26-30
4. **Armstrong, J. A. und P. D'Arcy Hart:** Phagosome-Lysosome interaction in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli, *The Journal Of Experimental Medicine*, 1975, 142:1-16
5. **Austyn, J. M.:** Dendritic cells, *Current opinion in haematology*, 1998, 5:3-15
6. **Bailly, S., M. Fay, M. A. Gougerot-Pocidallo:** Effect of quinolones on TNF-alpha production by human monocytes, *Pathologie-biologie*, 1990, 38:267-71
7. **Bailly, S., M. Fay, M. A. Gougerot-Pocidallo:** Effect of antibiotics on production of cytokines by human monocytes, *Pathologie-biologie*, 1993, 41:838-44
8. **Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka:** Immunobiology of dendritic cells, *Annual review of immunology*, 2000, 18:767-811
9. **Banchereau, J. and R. M. Steinman:** Dendritic cells and the control of immunity, *Nature*, 1998, 392:245-252
10. **Bekker, L. G., S. Freeman, P. J. Murray, B. Ryffel and G. Kaplan:** TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways, *Journal of Immunology*, 2001, 166:6728-6734
11. **Belladonna, M. L., J. C. Renauld, R. Bianchi, C. Vacca, F. Fallarino, C. Orabona, M. C. Fioretti, U. Grohmann and P. Puccetti:** IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells, *Journal of Immunology*, 2002, 168:5448-54
12. **Blau, H., K. Klein, I. Shalit, D. Halperin and I. Fabian:** Moxifloxacin but not ciprofloxacin or azithromycin selectively inhibits IL-8, IL-6, ERK1/2, JNK and NF- κ B activation in a cystic fibrosis epithelial cell line, *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2007, 292:L343-L352

13. **Bloom, B. R. and C. J. Murray:** Tuberculosis: commentary on a reemergent killer, *Science*, 1992, 257:1055-64
14. **Bodnar, K. A., N. V. Serbina and J. L. Flynn:** Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells, *Infection and Immunity*, 2001, 69:800-9
15. **Brennan, P. J. and H. Nikaido:** The envelope of mycobacteria, *Annual review of biochemistry*, 1995, 64:29-63
16. **Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzig, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski and R. L. Modlin:** Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors, *Science*, 1999, 285:732-6
17. **Buettner, M., C. Meinken, M. Bastian, R. Bhat, E. Stössel, G. Faller, G. Cianciolo, J. Ficker, M. Wagner, M. Röllinghoff and S. Stenger:** Inverse correlation of maturity and antibacterial activity in human dendritic cells, *The Journal of Immunology*, 2005, 174:4203-4209
18. **Caws, M. and F. A. Drobniowski:** Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001, 935:138-45
19. **Cheadle, E. J., P. J. Selby and A. M. Jackson:** *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin-infected dendritic cells potently activate autologous t cells via B7 and interleukin-12-dependent mechanism, *Immunology*, 2002, 108:79-88
20. **Choi, J. H., M. J. Song, S. H. Kim, S. M. Choi, D. G. Lee, J. H. Yoo and W. S. Shin:** Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47:3704-3707
21. **Clemens, D. L. and M. A. Horwitz:** Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited, *The Journal of experimental medicine*, 1995, 181:257-70
22. **Cole, S. T.:** Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Microbiology*, 2002, 148:2919-28
23. **Collins, FM:** The immunology of tuberculosis, *The American Review of Respiratory Diseases*, 1982, 125:42-49
24. **Connolly, L. E., P. H. Edelstein and L. Ramakrishnan:** Why is long-term therapy required to cure tuberculosis, *PloS Medicine*, 2007,4:e120

- 25. Cooper, A. M., A. D Roberts, E. R. Rhoades, J. E. Callahan, D. M. Getzy and I. M. Orme:** The role of interleukin-12 in acquired immunity to mycobacterium tuberculosis infection, *Immunology*, 1995, 84:423
- 26. Cooper, A. M., A. Solache and S. A. Khader:** Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited, *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19:441-447
- 27. Daffé, M., G. Etienne:** The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity, *Tubercle and lung disease*, 1999, 79:153-69
- 28. Dalhoff, A. and I. Shalit:** Immunomodulatory effects of quinolones, *The Lancet Infectious Diseases*, 2003, 3:359-371
- 29. Demangel, C. and W. J. Britton:** Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts, *Immunology and cell biology*, 2000, 78:318-24
- 30. Demkow, U., T. M. Zielonka, D. Radomska, J. Chorostowska-Wynimko and E. Skopińska-Różewska:** Influence of isoniazid on selected parameters of immunological response, *Polski merkuriusz lekarski*, 2000, 7:27-30
- 31. Detanico, T., L. Rodrigues, A. C. Sabritto, M. Keisermann, M. E. Bauer, h. Zwickey and C. Bonorino:** Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation, *Clinical and experimental immunology*, 2004, 135:336-42
- 32. Detjen, A. et al:** Immunologische Diagnostik der Tuberkulose – Interferon- γ -Tests, *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 2006, 154:152-159
- 33. Dheda, K., J. S. Chang, L. U. Kim, J. F. Huggett, M. A. Johnson, A. Zumla and G. A. Rook:** Interferon gamma assays for tuberculosis, *The Lancet infectious diseases*, 2005, 5:324-5
- 34. Dormandy, T.:** *The White Death: A History of Tuberculosis*, Hambledon Press, 1999
- 35. Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania and M. C. Raviglione:** Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project, *The Journal of the American Medicine Association*, 1999, 282:677-86
- 36. Dyrhol-Riise, A. M., G. Gran, T. Wentzel-Larsen, B. Blomberg, C. G. Haanshuus and O. Mørkve:** Diagnosis and follow-up of treatment of latent tuberculosis; the utility of the QuantiFERON-TB Gold In-tube assay in outpatients from a tuberculosis low-endemic country, *BMC infectious Diseases*, 2010, 10:57

- 37. Ehlers, S.:** Role of tumor necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF, *Annals of the rheumatic diseases*, 2003, 62:37-42
- 38. Enk, A. H., V. L. Angeloni, M. C. Udey and S. I. Katz:** Inhibition of langerhans cell antigen-presenting function by IL-10 in induction of tolerance, *Journal of Immunology*, 1993, 151:2390-2398
- 39. Enarson, D. A.:** Resistance to antituberculosis medications: hard lessons to learn, *Archives of internal medicine*, 2000, 160:581-2
- 40. Fenton, M. J. and M. W Vermeulen:** Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes, *Infection and Immunity*, 1996, 64:683-90
- 41. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak and B. R. Bloom:** Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice, *Immunity*, 1995, 2:561-72
- 42. Flynn, J. L. and J. Chan:** Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*, *Current opinion in immunology*, 2003, 15:450-5
- 43. Flynn, J. L. and J. Chan:** Immunology of tuberculosis, *Annual Review of Immunology*, 2001, 19:93-129
- 44. Flynn, J. L. and J. Chan:** Tuberculosis: Latency and Reactivation, *Infection and Immunity*, 2001, 69(7):4195-4210
- 45. Geijtenbeek, T. B., S. J. Van Vliet, E. A. Koppel, S. Sanchez Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk and Y. Van Kooyk:** *Mycobacteria* target DC-SIGN to suppress dendritic cell function, *The Journal of experimental medicine*, 2003, 197:7-17
- 46. Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, L. A. Lyakh, G. Batoni, S. Esin, R. T. Winkler-Pickett, M. R. Consolaro, M. De Marchi, D. Giachino, A. Robbiano, M. Astegiano, A. Sambataro, R. A. Kastelein, G. Carra, G. Trinchieri:** Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells, *Journal of Experimental Medicine*, 2008, 205:1447-61
- 47. Giacomini, E., E. Iona, L. Ferroni, M. Miettinen, L. Fattorini, G. Orefici, I. Julkunen and E. M. Coccia:** Infection of human macrophages and dendritic cells with *mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates t cell response, *The Journal of Immunology*, 2001, 166:7033-7041
- 48. Giacomini, E., A. Sotolongo, E. Iona, M. Severa, M. E. Remoli, V. Gafa, R. Lande, L. Frattorini, I. Smith, R. Manganeli, E. M. Coccia:** Infection of human dendritic cells with a

Mycobacterium tuberculosis sigE mutant stimulates productions of high levels of interleukin-10 but low levels of CXCL10: impact on the T-cell response, *Infection and Immunity*, 2006, 74:3296-304

49. Giacomini, E., M. E. Remoli, V. Gafa, M. Pardini, L. Fattorini, E. M. Coccia: Interferon-beta improves BCG immunogenicity by acting on DC maturation, *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, 85:462-8

50. Giuliani, A., S. A. Porcelli, L. Tentori, G. Graziani, C. Testorelli, S. P. Prete, S. Bussini, D. Ceppelletti, M. B. Brenner, E. Bonmassar and A. Aquino: Effect of rifampin on CD1b expression and double-negative T cell responses against mycobacteria-derived glycolipid antigen, *Life Sciences*, 1998, 63:985-94

51. Glickman, M. S. and W. R. Jacobs Jr.: Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline, *Cell*, 2001, 104:477-85

52. Glickman, M. S., S. M. Cahill and W. R. Jacobs Jr.: The Mycobacterium tuberculosis cmaA2 gene encodes a mycolic acid trans-cyclopropane synthetase, *The Journal of biological chemistry*, 2001, 276:2228-33

53. Gómez-Reino, J. J., L. Carmona, M. Angel Descalzo and Biobadaser Group: Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection, *Arthritis and rheumatism*, 2003, 57:756-61

54. Grenville-Mathers, R., W. C. Harris and H. J. Trenchard: Tuberculous primary infection in pregnancy and its relation to congenital tuberculosis, *Tubercle*, 1960, 41:181-5

55. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena: Antigen presentation and t cell stimulation by dendritic cells, *Annual Review of Immunology*, 2002, 20:621

56. Happel, K. I., E. A. Lockhart, C. M. Mason, E. Porretta, E. Keoshkerian, A. R. Odden, S. Nelson and A. J. Ramsay: Pulmonary interleukin-23 gene delivery increase local T-cell immunity and controls growth of Mycobacterium tuberculosis in the lungs, *Infection and Immunity*, 2005, 73:5782-8

57. Hashimoto, S., K. Matsumoto, Y. Gon, S. Maruoka, S. Hayashi, Y. Asai, T. Machino and Horie, T.: Grepafloxacin inhibits tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 expression in human airway epithelial cells, *Life Sciences*, 2000, 66:77-82

58. Hauer, B., D. Rohde, R. Loddenkemper: Tuberkulose, *Der Pneumologe*, 2005, 4:291-306

59. Hauer, B., R. Loddenkemper, A. Detjen, M. Forssbohm, W. Haas, G. Loytved, K. Magdorf, H. Mauch, A. Nienhaus, H. L. Rieder, D. Sagebiel and T. Schaberg: Interferon-

gamma assays: description and assessment of a new toll in the diagnosis of tuberculosis, *Pneumologie*, 2006, 60:29-44

60. Hauser Jr., W. E. and J. S. Remington: Effects of antibiotics on the immun response, *The American Journal of Medicine*, 1982, 72:711-716

61. Henderson, R. A., S. C. Watkins and J. L. Flynn: Activation of human dendritic cells following infection with mycobacterium tuberculosis, *Journal of Immunology*, 1997, 159:635-643

62. Hickman, S. P., J. Chan and P. Salgame: Mycobacterium tuberculosis induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naïve t cell polarization, *The Journal of Immunology*, 2002, 168:4636-4642

63. Higuchi, K., N. Harada and T. Mori: Interferon- γ responses after isoniazid chemotherapy for latent tuberculosis, *Respirology*, 2008, 13:468-72

64. Hooper, D. C. and J. S. Wolfson: Fluoroquinolone antimicrobial agents, *New England Journal of Medicine*, 1991, 324:384-394

65. Hope, J. C., M. L. Thom, P. A. McCormick and C. J. Howard: Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 100:187-195

66. Ibrahim, M. S., Z. A. Maged, A. Haron, R. Y. Khalil, A. M. Attalah: Antibiotics and immunity: effects of antibiotics on natural killer, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity and antibody production, *Chemioterapia, International Journal of Mediterranean Society of Chemotherapy*, 1987, 6:426-30

67. Ibrahim, M. S., Z. A. Maged, A. Haron, R. Y. Khalil, A. M. Attalah: Antibiotics and immunity: effects of antibiotics on mitogen responsiveness of lymphocytes and interleukin-2 production, *Chemioterapia, International Journal of Mediterranean Society of Chemotherapy*, 1988, 7:369-72

68. Ibrahim, M. A., B. M. Chain and D. R. Katz: The injured cell: the role of the dendritic cell system as a sentinel receptor pathway, *Immunology today*, 1995, 16:181-6

69. Iino, Y., M. Toriyama, K. Kudo, Y. Natori and A. Yuo: Erythromycin inhibition of lipopolysaccharide- stimulated tumor necrosis factor alpha production by human monocytes in vitro, *The Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, 1992, 101:16-20

70. Inaba, K., M. Inaba, M. Naito and R. M. Steinman: Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo, *The Journal of experimental medicine*, 1993, 178:479-88

- 71. International Union against Tuberculosis**, Technical guide for collection, storage and transport of sputum specimens and for examinations for tuberculosis by direct microscopy, 2nd ed. Paris: IUAT; 1977
- 72. Jacobs, M., D. Togbe, C. Fremond, A. Samarina, N. Allie, T. Botha, D. Carlos, S. K. Parida, S. Grivennikov, S. Nedospasov, A. Monteiro, M. Le Bert, V. Quesniaux and B. Ryffel**: Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection, 2007, *Microbes and Infection*, 9:623-628
- 73. Jacobs, M., N. Brown, N. Allie, R. Gulert and B. Ryffel**: Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10, *Immunology*, 2000, 100:494-501
- 74. Janeway, C.**: Die Bestandteile des Immunsystems, *Immunologie* 5, 2002, Spektrum, Heidelberg
- 75. Jensen, P. A., L. A. Lambert, M. F. Iademarco and R. Ridzon**: Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, *Morbidity and mortality weekly report, Recommendations and reports / Centers for Disease Control*, 2005, 54:1-141
- 76. Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society**: Chemotherapy and management of tuberculosis in the United Kingdom, *Thorax*, 1998, 53:536-48
- 77. Jung, S. B., C. S. Yang, J. S. Lee, A. R. Shin, S. S. Jung, J. W. Son, C. V. Harding, H. J. Kim, J. K. Park, T. H. Paik, C. H. Song and E. K. Jo**: The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes, *Infection and immunity*, 2006, 74:2686-96
- 78. Kaufmann, S. H.**: Immune response to tuberculosis: experimental animal models, *Tuberculosis*, 2003, 83:107-11
- 79. Keane, J., M. K. Balcewicz-Sablinska, H. G. Remold, G. L. Chupp, B. B. Meek, M. J. Fenton and H. Kornfeld**: Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis, *Infection and immunity*, 1997, 65:298-304
- 80. Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Merabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel and M. M. Braun**: Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent, *New England journal of medicine*, 2001, 345:1098-104
- 81. Khader, S. A., S. Partida-Sanchez, G. Bell, D. M. Jelley-Gibbs, S. Swain, J. E. Pearl, N. Ghilardi, F. J. Desauvage, F. E. Lund, A. M. Cooper**: IL-12p40 is required for dendritic

cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection, *The Journal of experimental medicine*, 2006, 203:1805-15

82. Khan, Anis A., Teri R. Slifer and J. S. Remington: Effect of trovofloxacin on production of cytokines by human monocytes, *American Society for Microbiology*, 1998, 42:1713-1717

83. Khan, A. A., T. R. Slifen, F. G. Araujo and J. S. Remington: Effect of clarithromycin and azithromycin on production of cytokines by human monocytes, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999, 11:121-132

84. Khayrullina, T., J. H. Jen, H. Jing, D. Ganea: In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of TH-17 cells, *Journal of Immunology*, 2008, 181:721-35

85. Kim, K. D., H. G. Lee and J. K. Kim et al.: Enhanced antigen-presenting activity and tumor necrosis factor-alpha-independent activation of dendritic cells following treatment with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin, *Immunology*, 1999, 97:626-633

86. Kindler, V., A. P. Sappino, G. E. Grau, P. F. Piguet, P. Vassalli: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection, *Cell Press*, 1989, 56:731-40

87. Kleinert, H., P. M. Schwarz, U. Förstermann: Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase, *Biological Chemistry*, 2003, 384:1343-64

88. Kochi, A.: Tuberculosis: distribution, risk factors, mortality, *Immunobiology*, 1994, 191:325-36

89. Ksontini, R., S. L. MacKay and L. L. Moldawer: Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation, *Archives of surgery*, 1998, 133:558-67

90. Kucharz, E. J. and S. J. Sierakowski: Studies of Immunomodulatory Properties of Isoniazid I. Effect of isoniazid on mitogen- and anti CD3 antibody-induced proliferation of human peripheral blood mononuclear cells and T cells, *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 1990, 34:99-105

91. Kucharz, E. J. and S. J. Sierakowski: Studies of Immunomodulatory Properties of Isoniazid II. Effect of Isoniazid on Interleukin 2 Production and Interleukin 2-Receptor Expression, *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 1990, 34:207-211

- 92. Kurokohchi, K., H. Yoneyama, M. Nishioka, Y. Ichikawa:** Inhibitory effect of rifampicin on the depressive action of interleukin-1 on cytochrome P-450-linked monooxygenase system, *Metabolism*, 2001, 50:231-6
- 93. Lanzavecchia and F. Sallusto:** Regulation of t cell immunity by dendritic cells, *Cell*, 2001, 106: 263
- 94. Lee, E., W. L. Trepicchio, J. L. Oestreicher, D. Pittman, F. Wang, F. Chamian, M. Dhodapkar and J. G. Krueger:** Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris, *The Journal of experimental medicine*, 2004, 199:125-30
- 95. Liu, E., Law, H. K., Lau Y. L.:** BCG promotes cord blood monocyte-derived dendritic cell maturation with nuclear Rel-B up-regulation and cytosolic I kappa B alpha and beta degradation, *Paediatric research*, 2003, 54:105-12
- 96. Lyakh, L., G. Trinchieri, L. Provezza, G. Carra, F. Gerosa:** Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans, *Immunological Reviews*, 2008, 226:112-31
- 97. Marino, S., S. Pawar, C. L. Fuller, T. A. Reinhart, J. L. Flynn and D. E. Kirschner:** Dendritic cell trafficking and antigen presentation in the human immune response to mycobacterium tuberculosis, *The Journal of Immunology*, 2004, 173:494-506
- 98. Mc Cune, R. M. Jr, R. Tompsett and W. Mc Dermott:** Fate of Mycobacterium tuberculosis in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique: the conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug, *Journal of experimental medicine*, 1956, 104:763-803
- 99. Mellman, I., S. J. Turley and R. M. Steinman:** Antigen processing for amateurs and professionals, *Trends in cell biology*, 1998, 8:231-7
- 100. Mellman, I. and R. M. Steinman:** Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines, *Cell*, 2001, 106:255
- 101. Mendelson, M., S. Walters, I. Smith and G. Kaplan:** Strain-specific mycobacterial lipids and the stimulation of protective immunity to tuberculosis, *Tuberculosis*, 2005, 85:407-13
- 102. Mitchinson, D. A., J. B. Selkon:** The bactericidal activities of antituberculous drugs, *The American review of respiratory disease*, 1956, 74:109-116
- 103. Mlambo, G., L. B. Sigola:** Rifampicin and dexamethason have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF- α production, *International Immunopharmacology*, 2003, 3:513-22

- 104. Mnyani, C. N. and J. A. McIntyre:** Tuberculosis in pregnancy, *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 2011, 118:226-31
- 105. Mohaghehpour, N., A. van Vollenhoven, J. Goodman and L. E. Bermudez:** Interaction of *Mycobacterium avium* with human monocyte-derived dendritic cells, *Infection and immunity*, 2000, 68:5824-9
- 106. Mohan, A. K., T. R. Coté, J. A. Block, A. M. Manadan, J. N. Siegel and M. M. Braun:** Tuberculosis following the use of etanercept, a tumor necrosis factor alpha inhibitor, *Clinical infectious diseases*, 2004, 39:295-9
- 107. Moody, D. B., M. R. Guy, E. Grant, T. Y. Cheng, M. B. Brenner, G. S. Besra and S. A. Porcelli:** CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection, *The Journal of experimental medicine*, 2000, 192:965-76
- 108. Moore, T. A., M. L. Perry, A. G. Getsoian, M. W. Newstead and T. J. Standiford:** Divergent role of gamma interferon in a murine model of pulmonary versus systemic *Klebsiella pneumoniae* infection, *Infection and immunity*, 2002, 70:6310-8
- 109. Morel, F., P. H. Beaune, D. Ratanasavanh, J.P. Flinois, C. S. Yang, F. P. Guengerich, A. Guillouzo:** Expression of cytochrom-P450 enzymes in cultured human hepatocytes, *European Journal of Biochemistry*, 1990, 191:437-44
- 110. Morikawa, K., H. Watabe, M. Araake and S. Morikawa:** Modulatory effect of antibiotics on cytokine production by human monocytes in vitro, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40:1366-1370
- 111. Murray, R. A., M. R. Siddiqui, M. Mendillo, J. Krahenbuhl and G. Kaplan:** *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation, *Journal of immunology*, 2007, 178:338-44
- 112. Murray, P. J. and R. A. Young:** Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice, *Infection and immunity*, 1999, 67:3087-95
- 113. National Institute for Health and Clinical Excellence:** Tuberculosis, clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control, 2006
- 114. Nishibe, Y., M. Wakabayashi, T. Harauchi and K. Ohno:** Characterization of cytochrome P450 (CYP3A12) induction by rifampicin in dog liver, *Xenobiotica*, 1998, 28:549-57
- 115. Okuyan, B., F. V. Izzettin, M. Sancar, O. Ertaş, A. Cevikbaş, U. S. Gürer:** Effect of antituberculous drugs on human polymorphonuclear leukocyte functions in vitro, *International Immunopharmacology*, 2005, 5:1337-42

- 116. Old, L. J.:** Tumor necrosis factor, *Scientific American*, 1988, 258:59-75
- 117. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisbarg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan and R. A. Kastelein:** Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12, *Immunity*, 2000, 13:715-25
- 118. Ono, Y., Y. Ohmoto, K. Ouo, Y. Sakata and K. Murata:** Effect of grepafloxacin on cytokine production in vitro, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, 46:91-94
- 119. Pai, M., L. W. Riley and J. M. Colford Jr.:** Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review, *The Lancet infectious diseases*, 2004, 4:761-76
- 120. Pai, M., S. Kalantri and K. Dheda:** New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance, *Expert review of molecular diagnostics*, 2006, 6(3):423-432
- 121. Papadakis, K. A. and S. R. Targan:** Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors, *Gastroenterology*, 2000, 119:1148-1157
- 122. Pfeffer, K.:** Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors, *Cytokine and growth factor reviews*, 1993, 14:185-91
- 123. Pollock, N. R., S. S. Kashino, D. R. Napolitano, A. Sloutsky, S. Joshi, J. Guillet, M. Wong, E. Nardell and A. Campos-Neto:** Evaluation of the effect of treatment of latent tuberculosis infection on Quantiferon-TB gold assay results, *Infection control and hospital epidemiology*, 2009, 30:392-5
- 124. Puré, E., K. Inaba, M. T. Crowley, L. Tardelli, M. D. Witmer-Pack, G. Ruberti, G. Fathman and R. M. Steinman:** Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain, *The Journal of experimental medicine*, 1990, 172:1459-69
- 125. Rabeih, L., T. Irinopoulou, B. Cholley, N. Haeffner-Cavaillon and M. Carreno:** Gram-positive and gram-negative bacteria do not trigger monocytic cytokine production through similar intracellular pathways, *Infection and Immunity*, 2001, 69:4590-9
- 126. Raja, A.:** Immunology of tuberculosis, *The Indian journal of medical research*, 2004, 120:213-232

- 127. Ramoner, R., C. Rieseries, M. Herold, H. Klocker, G. Bartsch, A. Stenzl and M. Thurnher:** Activation of human dendritic cells by Bacillus Calmette-Guérin, *The Journal of Urology*, 1998, 159:1488-149
- 128. Reiling, N., A. Blumenthal, H. D. Flad, M. Ernst and S. Ehlers:** Mycobacteria-induced TNF-alpha and IL-10 formation by human macrophages is differentially regulated at the level of mitogen-activated protein kinase activity, *Journal of immunology*, 2001, 167:3339-45
- 129. Reis e Sousa, C., P. D. Stahl and J. M. Austyn:** Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro, *The Journal of experimental medicine*, 1993, 178:509-19
- 130. Reis e Sousa, C., A. Sher and P. Kaye:** The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection, *Current Opinion in Immunology*, 1999, 11:392-399
- 131. Remick, D. G. and J. S. Friedland:** Cytokines in health and disease, 2nd edition New York: Marcel Dekker, Inc., 1997, 678
- 132. Schaible, U. E., F. Winau, P. A. Sieling, K. Fischer, H. L. Collins, K. Hagens, R. L. Modlin, V. Brinkmann and S. H. Kaufmann:** Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis, *Nature medicine*, 2003, 9:1039-46
- 133. Sedgwick, J. D., D. S. Remington, J. G. Cyster and H. Korner:** Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement, *Immunology Today*, 2000, 21:110-113
- 134. Selwyn, P. A., D. Hartel, V. A. Lewis, E. E. Schoenbaum, S. H. Vermund, R. S. Klein, A. T. Walker and G. H. Friedland:** A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection, *The New England journal of medicine*, 1989, 320:545-50
- 135. Shalit, I., D. Halperin, D. Haite, A. Levitov, J. Romano, N. Osherov, I. Fabian:** Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on IL-8, IL-1beta and TNF-alpha secretion and NfkappaB and MAP-kinase activation in human monocytes stimulated with *Aspergillus fumigatus*, *The Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 57:230-5
- 136. Sieling, P. A., W. Chung, B. T. Duong, P. J. Godowski and R. L. Modlin:** Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses, *Journal of immunology*, 2003, 170:194-200
- 137. Stassar, M. J., P.D. Vegt, P. A. Steerenberg, A. P. van der Meijden, H. D. Meiring, M. Dessens-Kroon, H. G. Geertzen, W. den Otter:** Effects of isoniazid (INH) on the BCG-induced local immune response after intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer, *Urological Research*, 1994, 22:177-84

- 138. Steinmann, R. M. and Z. A. Cohn:** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, I. Morphology, quantitation, tissue distribution, *Journal of experimental medicine*, 1973, 137:1142
- 139. Steinmann, R. M. and Z. A. Cohn:** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, II. Functional properties in vitro, *Journal of experimental medicine*, 1974, 139:1431
- 140. Steinman, R. M.:** The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annual review of immunology*, 1991, 9:271-96
- 141. Stenger, S.:** Immunological control of tuberculosis: role of tumor necrosis factor and more, *Annals of the rheumatic diseases*, 2005, 64:24-28
- 142. Stewart, G. R., K. A. Wilkinson, S. M. Newton, S. M. Sullivan, O. Neyrolles, J. R. Wain, J. Patel, K. L. Pool, D. B. Young and R. J. Wilkinson:** Effect of deletion or overexpression of the 19-kilodalton lipoprotein Rv3763 on the innate response to *Mycobacterium tuberculosis*, *Infection and Immunity*, 2005, 73:6831-7
- 143. Stünkel, K. G. E., G. Hewlett and H. J. Zeiler:** Ciprofloxacin enhances T cell function by modulating interleukin activities, *Clinical and experimental immunology*, 1991, 86:525-31
- 144. Sudre, P., G. Ten Dam and A Kochi:** Tuberculosis: a global overview of the situation today, *W.H.O. Bulletin*, 1992, 70:149
- 145. Sutherland, J. S., B. C. de Jong, D. J. Jeffries, I. M. Adetifa and M. O. C. Ota:** Production of TNF- α , IL-12(p40) and IL-17 Can Discriminate between Active TB Disease and Latent Infection in a West African Cohort, *PloS One*, 2010, 5:e12365
- 146. Swingler, G. H., G. du Toit, S. Andronikou, L. van der Merwe and H. J. Zar:** Diagnostic accuracy of chest radiography in detecting mediastinal lymphadenopathy in suspected pulmonary tuberculosis, *Archives of disease in childhood*, 2005, 90:1153-6
- 147. Tailleux, L., N. Maeda, J. Nigou, B. Gicquel and O. Neyrolles:** How is the phagocyte lectin keyboard played? Master class lesson by *Mycobacterium tuberculosis*, *Trends in microbiology*, 2003, 11:259-63
- 148. Telenti, A. and M. Iseman:** Drug-resistant tuberculosis: what do we do now?, *Drugs*, 2000, 59:171-9
- 149. Tentori, L., G. Graziani, S. A. Porcelli, M. Sugita, M. B. Brenner, R. Madaio, E. Bonmassar, A. Giuliani and A. Aquino:** Rifampin increases cytokine-induced expression of the CD1b molecule in human peripheral blood monocytes, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1998, 42:550-4

- 150. Thoen, C. O. and R. Barletta:** Pathogenesis of Mycobacterium bovis, Mycobacterium bovis Infections in Animals and Humans, 2005, Blackwell Publishing, Ames, IA
- 151. Thurnher, M., R. Ramoner, G. Gasti, C. Radmayr, G. Block, M. Herold, H. Klocker and G. Bartsch:** Bacillus Calmette-Guérin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells, International Journal of Cancer, 1997, 70:128-134
- 152. Trinchieri, G.:** The two faces of interleukin 12: a pro-inflammatory cytokine and a key immunoregulatory molecule produced by antigen-presenting cells, Ciba Foundation symposium, 1995, 195:203-14
- 153. Trinchieri, G.:** Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity, Advances in Immunology, 1998, 70:83-243
- 154. Trinchieri, G.:** Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, Nature reviews, Immunology, 2003, 3:133-46
- 155. Uehira, K., R. Amakawa, T. Ito, K. Tajima, S. Naitoh, Y. Ozaki, T. Shimizu, K. Yamaguchi, Y. Uemura and H. Kitajima et al.:** Dendritic cells are decreased in blood and accumulated in granuloma in tuberculosis, Clinical Immunology, 2002, 105:296-303
- 156. Ulrichs, T., D. B. Moody, E. Grant, S. H. Kaufmann and S. A. Porcelli:** T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with Mycobacterium tuberculosis infection, Infection and Immunity, 2003, 71:3076-87
- 157. Urbaschek, R., D. N. Männel, R. Urbanczik:** Isoniazid protects mice against endotoxin lethality without influencing tumor necrosis factor synthesis and release, Antimicrobial agents and chemotherapy, 1991, 35:1666-8
- 158. Valone, S. E., E. A. Rich, R. S. Wallis, J. J. Ellner:** Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole Mycobacterium bovis BCG and mycobacterial antigens, Infection and Immunity, 1988, 56:3313-5
- 159. Van Vlem, B., R. Vanhobler, P. De Paepe, D. Vogelaers and S. Ringoir:** Immunomodulating effects of antibiotics: literature review, Infection, 1996, 24:275-291
- 160. Verreck, F. A., T. de Boer, D. M. Langenberg, M. A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. de Waal-Malefyt, T. H. Ottenhoff:** Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101:4560-5
- 161. Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich:** Tumor necrosis factor signalling, Cell Death Differ, 2003, 10:45-65

- 162. Wallis, R. S., P. Kyambadde, J. L. Johnson, L. Horter, R. Kittle, M. Pohle, C. Ducar, M. Millard, H. Mayanja-Kizza, C. Whalen and A. Okwera:** A study of the safety, immunology, virology and microbiology of adjunctive etanercept in HIV-1-associated tuberculosis, *AIDS*, 2004, 18:257-64
- 163. Wallis, R. S. und J. J. Ellner:** Cytokines and tuberculosis, *Journal of leukocyte biology*, 1994, 55:676-81
- 164. Weiss, T., I. Shalit, H. Blau, S. Werber, D. Halperin, A. Levitov and I. Fabian:** Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: Inhibition of NF- κ B and mitogen-activated protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines, *American Society for Microbiology*, 2004, 48:1974-82
- 165. Wells, W. F.:** Aerodynamics of droplet nuclei: Airborne contagion and air hygiene, Harvard University Press, 1955, 13-19
- 166. Wilkinson, K. A., O. M. Kon, S. M. Newton, G. Meintjes, R. N. Davidson, G. Pasvol and R. J. Wilkinson:** Effect of Treatment of Latent Tuberculosis Infection on the T Cell Response to *Mycobacterium tuberculosis* Antigens, *The Journal of Infectious Diseases*, 2006, 193:354-9
- 167. Wolf, A. J., B. Linas, G. J. Trevejo-Nuñez, E. Kincaid, T. Tamura, K. Takatsu and J. D. Ernst:** Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo, *Journal of immunology*, 2007, 179:2509-19
- 168. World Health Organisation:** Treatment of tuberculosis, Guidelines for national programmes, 2003
- 169. World Health Organisation:** fact sheet, estimated tb incidence, prevalence and mortality, 2008
- 170. World Health Organisation:** Tuberculosis infection control in the era of expanding HIV care and treatment, 2006
- 171. World Health Organisation:** Tuberculosis surveillance in Europe, 2007
- 172. Yasutomi, M., Y. Ohshima, N. Omata, A. Yamada, H. Iwasaki, Y. Urasaki and M. Mayumi:** Erythromycin differentially inhibits Lipopolysaccharide- or Poly (I:C)- induced but not peptidoglycan- induced activation of human monocyte- derived dendritic cells, *The Journal of Immunology*, 2005, 175:8069-8076
- 173. Yoshimura, T., C. Kurita, E. Usami, T. Nakao, S. Watanabe, J. Kobayashi, F. Yamazaki and H. Nagai:** Immunomodulatory action of levofloxacin on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells, *Chemotherapy*, 1996, 42:459-464

- 174. Yoshimura, T.:** Modulation of cytokine production from human mononuclear cells by several agents, *Journal of the pharmaceutical Society of Japan*, 2000, 120:1277-90
- 175. Yuhas, Y., E. Berent, H. Ovadia, I. Azoulay, S. Ashkenazi:** Rifampicin augments cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells, *Antimicrobial agents and therapy*, 2006, 50:396-8
- 176. Zar, H. J., D. Hanslo, P. Apolles, G. Swingler and G. Hussey:** Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study, *Lancet*, 2005, 365:130-134
- 177. Ziglam, H. M., I. Daniels, R. G. Finch:** Immunomodulating activity of rifampicin, *Journal of Chemotherapy*, 2004, 16:357-61

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb. – Abbildung

APCs – antigenpräsentierende Zellen

BCG – *M. bovis* Bacille Calmette Guérin

BSA – Bovines Serumalbumin

cAMP – zyklisches Adenosin Monophosphat

CCL – Chemokinligand

CCR – Chemokinrezeptor

CD – Cluster of differentiation

DCs – Dendritische Zellen

EDTA – Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure

ELISA – Enzyme linked immuno sorbent assay

FACS – fluorescence-activated cell sorter, fluoreszenzaktivierter Zellsorter

FCS – Fetales Kälber Serum

FITC – Fluoreszein-Isothiocyanat

GM-CSF – Granulozyten Monozyten Kolonie stimulierender Faktor

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl) piperazineethansulfonsäure

HIV – Humanes Immundefizienzvirus

HLA – Humanes Leukozytenantigen

IFN – Interferon

Ig – Immunglobulin

IL – Interleukin

LPS – Lipopolysaccharid

LTA – Lipoteichonsäure

MHC – Major Histocompatibility Complex, Hauptgewebeverträglichkeitskomplex

MLR – Mixed Leukocyte Reaction, Gemischte Leukozytenreaktion

Mtb-Ag – *M. tuberculosis* Antigen

NF – nukleärer Faktor

NO – Stickstoffmonoxid

PBMCs – Peripher Blood Monocytes, periphere mononukleäre Blutzellen

PBS – Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)

PCR – Polymerasekettenreaktion

PE – Phycoerythrin

rpm – rotation per minute, Umdrehungen pro Minute

Tab. – Tabelle

TGF – Transforming Growth Factor, Transformierender Wachstumsfaktor

Th – T-Helfer

TLR – Toll-like receptor

TMB – Tetra-Methyl-Benzidin

TNF – Tumor Nekrose Faktor

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Danksagungen

Insbesondere möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer dieser Arbeit **Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ignatius** für die Überlassung des Themas, für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und für die immer freundliche, hilfreiche und anregende Unterstützung sowohl beim praktischen Teil als auch beim Schreiben dieser Arbeit danken.

Petra Huck, MTA danke ich für die Einarbeitung in die Methoden meiner Arbeit.

Herrn Dr. med. Martin Eisenblätter, Herrn Pablo Renner Viveros, Frau Ursula Rüschenndorf und **Frau Dr. Edith Jasny** danke ich für die kompetente Unterstützung in methodischen und inhaltlichen Fragen.

10 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Corinna Rehse, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der Einfluss von Antituberkulotika auf die Reifung und Funktion humaner dendritischer Zellen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift